Hematologia
2019, tom 10, nr 1, 9–18
DOI: 10.5603/Hem.2019.0012
Copyright © 2019 Via Medica
ISSN 2081–0768

VIA MEDICA

PRACA POGLĄDOWA

# Metylotransferaza EZH2 jako cel terapeutyczny w nowotworach układu chłonnego

## EZH2 methyltransferase as a therapeutic target in hematological malignancies

Beata Pytlak, Maria Chraszczewska, Monika Prochorec-Sobieszek, Anna Szumera-Ciećkiewicz

Zakład Diagnostyki Hematologicznej, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

### Streszczenie

*Metylotransferaza EZH2 jest katalityczną podjednostką kompleksu PRC2, która przeprowadza reakcję metylacji lizyny w pozycji 27 histonu 3, prowadząc do powstania jej trimetylowanej formy H3K27me. EZH2 jest jednym z białek Polycomb, które są głównymi czynnikami epigenetycznymi i odpowiadają za wyciszanie i inaktywację genów. Enzym ten pełni podwójną funkcję w etiopatogenezie nowotworów — jest zarówno onkogenem, jak i genem supresorowym. Nieprawidłowości wynikające z nadekspresji bądź mutacji w genach kodujących EZH2 wykazano zarówno u pacjentów chorujących na nowotwory hematologiczne, jak i u osób cierpiących na inne nowotwory. W związku z pojawiającą się potrzebą leczenia takich chorych rozpoczęto badania nad cząsteczkami skierowanymi przeciwko kompleksowi PRC2, w szczególności przeciwko EZH1/EZH2. Przełomowymi w rozwoju terapii celowanej inhibitorami metylotransferazy EZH2 okazało się odkrycie związków silnie selektywnych i zawierających w swojej budowie chemicznej ugrupowanie 2-pirydynowe. W pracy zwrócono uwagę na najnowsze odkrycia dotyczące onkogennych funkcji metylotransferazy EZH2 oraz przedstawiono ich wpływ na rozwój nowotworów. Ponadto zawarto aktualne informacje odnośnie do badań przedklinicznych oraz klinicznych w testowaniu inhibitorów EZH2 głównie w nowotworach hematologicznych.*

**Słowa kluczowe: metylotransferaza EZH2, inhibitory EZH2, biologia molekularna i genetyka chłoniaków**

***Hematologia 2019; 10, 1: 9–18***

### Abstract

*EZH2 methyltransferase is the subunit of the PRC2 complex that catalyzes tri-methylation of histone H3 at Lys 27 (H3K27me3). EZH2 is one of the Polycomb proteins that are the main epigenetic factors and are responsible for silencing and inactivating genes. This enzyme has a dual function in cancer - it is an oncogene and a suppressor gene. Abnormalities resulting from overexpression or mutation in EZH2 coding genes have been found in patients suffering from hematological malignancies and solid cancers. Therefore, it is necessary to treat these patients, has begun studies on molecules directed against the PRC2 complex, in particular against EZH1/EZH2. In 2012, a breakthrough in the development of targeted therapy with inhibitors of methyltransferase EZH2 has been the discovery of highly selective compounds containing the 2-pyridine in their chemical structure. In this review, draws attention to the latest findings regarding the oncogenic functions of EZH2 methyltransferase and their impact on the development of tumors. In addition, the text*

Adres do korespondencji: Anna Szumera-Ciećkiewicz, Zakład Diagnostyki Hematologicznej, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, ul. Indiry Gandhi 14, 02–776 Warszawa, e-mail: szumann@gmail.com

*contains current information about preclinical and clinical trials on EZH2 inhibitors testing mainly in hematological cancers.*

**Key words: EZH2 methyltransferase, EZH2 inhibitors, molecular biology and lymphoma genetics**

***Hematologia 2019; 10, 1: 9–18***

## Wprowadzenie

Chromatyna u eukariontów upakowana jest w nukleosomach — najmniejszych powtarzalnych jednostkach materiału genetycznego. Każdy nukleosom zawiera około 146 par zasad dwuniciowego DNA nawiniętego na oktamer histonowy, który zawiera dwie kopie histonów: H2A, H2B, H3 i H4. Z rdzenia histonu wychodzą struktury zwane ogonami histonowymi, które są szczególnie bogate w aminokwasy lizynę oraz argininę. Ogony histonów w wyniku działania określonych enzymów mogą ulegać chemicznym modyfikacjom, między innymi metylacji, która znacząco wpływa na dostępność DNA i regulację ekspresji genów. W ostatnich latach metylacja zwróciła szczególną uwagę badaczy ze względu na jej ogromne znaczenie w progresji nowotworów. Odkryto ponad 60 enzymów należących do grupy metylotransferaz histonów, do których zalicza się metylotransferazy lizyny histonowej (HKMT, *human histone methyltransferases*) oraz metylotransferazy argininy histonowej (PRMT, *protein arginine methyltransferases*). Enzymy te katalizują reakcję metylacji specyficznych łańcuchów bocznych histonów aminokwasów lizyny oraz argininy. Proces metylacji prowadzi do powstania heterochromatyny, która ze względu na jej mocne upakowanie jest nieaktywna biologicznie [1]. W licznych badaniach wykazano, że część mutacji genów kodujących białka odpowiadające za modyfikacje histonów jest związanych z występowaniem nowotworów. Ze względu na wiele doniesień o wpływie EZH2 (*enhancer of zeste homolog 2*) na rozwój raka w ostatnich latach wzrosło zainteresowanie tym enzymem [2].

Metylotransferaza EZH2 jest enzymem z grupy metylotransferaz histonów (HMT, *histone methyltransferases*) zidentyfikowanym u wielu gatunków kodowanym przez gen *EZH2* zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 7 w pozycji 7q35 i kodującym 746 aminokwasów. Jest jednym z białek *Polycomb* (PcG), które są głównymi regulatorowymi czynnikami epigenetycznymi i odpowiadają za wyciszanie i inaktywację specyficznych rejonów chromatyny. Białka PcG składają się z dwóch kompleksów wielobiałkowych PRC (*protein regulator of cytokinesis*) 1 i 2. Uważa się, że kompleks PRC1 przeprowadza reakcję ubikwitynizacji lizyny w pozycji 119 histonu H2A dzięki ligazom RING1A oraz RING1B. Natomiast EZH2 jest niezbędnym składnikiem kompleksu PRC2, w którego skład wchodzą: EED (*embryonic ectoderm development*), SUZ12 (*suppressor of zeste 12*) i RbAp46/48. Metylotransferaza EZH2, by być aktywną katalitycznie, musi być związana z powyższymi białkami. W strukturze EZH2 wyróżnia się kilka domen. Pierwszą jest domena SET na C-końcu, dzięki której EZH2 pełni funkcję metylotransferazy histonowej. Kolejne dwie domeny, CXC oraz ncRBD, są odpowiedzialne za interakcję z innymi elementami kompleksu PRC2 oraz białkami regulatorowymi [3].

W badaniach potwierdzono, że metylotransferaza EZH2 uczestniczy w wielu procesach biologicznych i cechuje się różnymi mechanizmami działania. Należy podkreślić, że jej funkcje mogą powodować zarówno hamowanie transkrypcji genów, jak i ich aktywację [3]. W niniejszej publikacji przedstawiono znaczenie EZH2 w przebiegu nowotworów oraz możliwości blokowania jej funkcji w terapii celowanej.

## Funkcje fizjologiczne EZH2

Głównym mechanizmem działania EZH2 jest kataliza procesów metylacji, dimetylacji i trimetylacji lizyny w pozycji 27 histonu H3 (H3K27) poprzez przeniesienie grupy metylowej z kofaktora S-adenozylo-L-metioniny (SAM, *S-adenosyl-L--methionine*). Po reakcji metylacji PRC1 łączy się z monoubikwitowanym histonem H2A w pozycji 119 lizyny oraz zmetylowanymi grupami (H3K27me3). Proces ten zależy od PRC2, zachodzi w jądrze komórkowym oraz prowadzi do kondensacji chromatyny, czym hamuje transkrypcję genów supresorowych. Wywołuje to ich długotrwałe wyciszenie [3, 4]. Kolejnym zależnym od PRC2 mechanizmem działania EZH2 jest metylowanie białek niehistonowych. Reakcje te zachodzą w cytoplazmie. Wykazano, że metylacji ulega GATA4 (*transcription factor* GATA-4) w pozycji 299 lizyny, co hamuje acetylację zależną od P300 i wywołuje represję

transkrypcji [5]. Ponadto dowiedziono, że EZH2 metyluje ROR$\alpha$ (*RAR-related orphan receptor alpha*) w pozycji 38 lizyny, przyczyniając się do aktywacji kompleksu DDB1/DCAF1/CUL4 (*damage-specific DNA binding protein 1/Cul4-associated factor 1/ /Cullin 4A*) pośredniczącego w ubikwitynacji. Proces ten prowadzi do wyciszenia genu *ROR* [6]. W badaniach udowodniono, że PRC2-zależny kompleks EZH2 metyluje talinę, również prowadząc do wyciszania genów [7].

Interesującym jest fakt wykazania niezależnego od PRC2 działania EZH2, dzięki przeprowadzeniu reakcji metylacji białek niehistonowych bądź oddziaływaniu z innymi białkami, co w końcowym efekcie prowadziło do aktywacji genów. Wykazano, że ufosforylowany EZH2 wiąże się bezpośrednio ze STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) i powoduje zwiększenie jego aktywności poprzez metylację, która wpływa na rozwój glejaka oraz raka prostaty [8]. Ponadto EZH2 działa jako koaktywator czynników transkrypcyjnych takich jak: AR (*androgen receptor*), NF-$\kappa$B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), TCF (*T-cell factor*)/$\beta$-katenina i PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) oraz $\beta$-katenina i ER$\alpha$ (*estrogen receptor alpha*).

W badaniach potwierdzono, że metylotransferaza EZH2 wpływa na aktywację genów poprzez utworzenie kompleksu z NF-$\kappa$B w komórkach raka piersi [9]. Z kolei Xu i wsp. [10] potwierdzili, że w wyniku fosforylacji Ser22 przez AKT (*cellular homolog of murine thymoma virus akt8 oncogene*) EZH2 łączy się i metyluje receptor androgenowy [10]. W swoim badaniu Jung i wsp. [11] dowiedli, że EZH2 aktywuje geny, łącząc się z kompleksem TCF/$\beta$-kateniną oraz czynnikiem aktywującym płytki krwi (PAF, *platelet activating factor*), co może prowadzić do rozwoju nowotworu jelita grubego [11]. Zaobserwowano również funkcję EZH2 w rozwoju niektórych chłoniaków (m.in.: chłoniaka z komórek T i NK [NKTL, *natural killer/T-cell lymphoma*]). W tym przypadku wpływ na ekspansję nowotworu ma ektopowe działanie zmutowanej formy EZH2 [12].

## Regulacja EZH2 na poziomie molekularnym

Istotnym aspektem wpływającym na dalsze funkcje EZH2 są molekularne regulacje tego enzymu przez mikroRNA (miRNA), które są małymi endogennymi niekodującymi RNA składającymi się z 21–25 nukleotydów. Pełnią one istotną rolę w wielu fizjologicznych reakcjach, takich jak przemiana tłuszczów, proliferacja oraz śmierć komórkowa. Wykazano, że niektóre miRNA potrafią regulować poziom EZH2 na drodze mechanizmów postranskrypcyjnych. Specyficzne miRNA mają zdolność wiązania się z transkryptem RNA EZH2, regulując jego stabilność, integralność oraz translację. W związku z tym negatywne działania miRNA mogą być przyczyną nieprawidłowego poziomu EZH2, a więc wpływać na progresję nowotworową. Autorzy niektórych doniesień wskazują, że represja poziomu EZH2 przez miRNA wywołuje hamowanie przerzutów nowotworowych. Między innymi dowiedziono, że miRNA-101 zmniejsza zdolności inwazji i migracji w kilku typach nowotworów, między innymi kostniakomięsaka *in vitro*, raka żołądka *in vivo* i *in vitro*, raka prostaty *in vitro* oraz glejaka *in vivo* oraz *in vitro*. Jego brak natomiast pobudza ekspresję EZH2, wywołując progresję nowotworową [13–15].

## Nadekspresja oraz mutacje EZH2

Złożoność działania EZH2 w wielu mechanizmach sugeruje, że odgrywa on kluczową rolę w losach różnych typów komórek. Wpływ EZH2 na rozwój nowotworów może wynikać z jego nadekspresji bądź mutacji w genie kodującym. Nadekspresja EZH2, czyli zjawisko prowadzące do nadmiernej metylacji, zaobserwowano między innymi w raku prostaty, piersi, jajnika, endometrium, płuc oraz czerniakach [16]. Pierwszym badaniem, w którym udowodniono, że nadekspresja EZH2 wpływa na rozwój raka, było badanie chorych na raka prostaty. Wysokie poziomy EZH2 oraz trimetylowanych białek histonu 3 korelowały z gorszym rokowaniem u tych pacjentów [17].

Mutacje w genie *EZH2* odkryto w nowotworach układu krwiotwórczego między innymi w białaczkach i chłoniakach. Zmiany te są opisywane jako mutacje „wzmocnienia funkcji" metylotransferazy EZH2, ponieważ prowadzą do zwiększenia aktywności bądź zmiany jej funkcji. W badaniach odnotowano występowanie mutacji somatycznych w genach *EZH2* w różnych typach nowotworów. Zaobserwowano między innymi występowanie heterozygotycznych somatycznych mutacji punktowych w *EZH2*, głównie na tyrozynie w pozycji 641, w C-końcowej katalitycznej domenie SET w części populacji chłoniaków B-komórkowych, w 22% przypadków chłoniaka rozlanego z dużych komórek B (DLBCL, *diffuse large B-cell lymphoma*) oraz w 7–12% przypadków chłoniaka grudkowego (FL, *follicular lymphoma*). Wykazano, że mutacja ta skutkuje zwiększoną konwersją H3K27 do postaci

trimetylowanej poprzez zahamowanie ekspresji genów, między innymi: *TCF4*, *FOXP1*, *TCL1A*, *BIK*, *RASSF6P* oraz *CDKN1A* [3, 18–20]. W analizach dowiedziono, że zmutowana metylotransferaza EZH2 słabo metyluje niezmodyfikowany histon, a proces ten jest o wiele bardziej nasilony na histonie zdimetylowanym [21]. Natomiast delecje, mutacje przesuwające z przesunięciem ramki odczytu, mutacje nonsensowne i zmiany sensu w genomie EZH2 odkryto w zespołach mielodysplastycznych (MDS, *myelodysplastic syndromes*) (25% przypadków), nowotworach mieloproliferacyjnych (MPN, *myeloproliferative neoplasms*) (3–13% przypadków), MDS/MPN (8–12% przypadków) oraz ostrej białaczce limfocytowej z komórek T (18–25% przypadków) [22]. Opisano również występowanie mutacji punktowych genu *EZH2* w A677 i A687 skutkujących hipertrimetylacją H3K27. Mutacje te zaobserwowano w grupach chłoniaków nie-Hodgkina [20, 23].

Wzmocnienie funkcji EZH2 może być spowodowane utratą funkcji innego genu działającego antagonistycznie do EZH2. W badaniach wykazano, że występowanie mutacji utraty funkcji genu *UTX* (*ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat protein X-linked*) wpływa na wzmocnienie funkcji EZH2. UTX jest metylazą histonową, której działanie polega częściowo na usuwaniu grup metylowych z dimetylowanego oraz trimetylowanego H3K27. Mutacje UTX pojawiają się w: szpiczaku plazmocytowym (PCM, *plasma cell myeloma*), rdzeniaku zarodkowym, rakach przełyku, pęcherza moczowego, trzustki oraz nerek. Mutacje inaktywujące UTX polegają na występowaniu dużych delecji homozygotycznych u kobiet oraz hemizygotycznych u mężczyzn. Dodatkowo w genie mogą się pojawiać mutacje nonsensowne, insercje i delecje przesuwające ramkę odczytu oraz mutacje prowadzące do przedwczesnego wystąpienia kodonu stop. Każda z tych mutacji jest spowodowana utratą domeny JmjC w UTX i, jak udowodniono, wpływa to na hamowanie aktywności tego enzymu, zwiększając tym samym działanie EZH2 [19].

SWI/SNF (*SWItch/Sucrose Non-Fermentable*) jest kompleksem zbudowanym z wielu podjednostek wykorzystującym energię z hydrolizy trifosforanu adenozyny (ATP, *adenosine triphosphate*) do przebudowy chromatyny. Mutacje kompleksów SWI/SNF znaleziono u 20% osób chorujących na nowotwory oraz wykazano, że działanie białek PcG oraz kompleksów SWI/SNF ma charakter antagonistyczny [24]. U osób ze zinaktywowaną podjednostką SNF5 mogą się rozwijać bardzo złośliwe nowotwory rabdoidne występujące głównie dzieci. Co interesujące, liczba różnych typów histopatologicznych nowotworów, w których stwierdzono utratę funkcji SNF5, stale się powiększa [25].

Ponadto opisano, że utrata funkcji EZH2 może również prowadzić do rozwoju nowotworu. Wykazano, że ostra białaczka limfoblastyczna z komórek T (T-ALL, *T-cell acute lymphoblastic leukemia*) jest nowotworem zależnym głównie od nadmiernej aktywacji szlaku sygnałowego NOTCH1, a mutacja polegająca na delecji bądź utracie funkcji genów *EZH2* i *SUZ12* występuje u 25% osób chorych. Aktywacja NOTCH1 oddziałuje w sposób antagonistyczny na aktywność kompleksu PRC2, promując rozwój nowotworu. Supresyjną rolę EZH2 odkryto również u osób z rakiem jasnokomórkowym nerki, u których w przypadku braku PRC2-zależnych H3K27me3 widoczna jest nadmierna ekspresja receptora chemokinowego 4 (CXCR4, *C-X-C chemokine receptor type 4*) i zwiększoną częstością powstawania przerzutów. Stwierdzono również występowanie delecji, mutacji przesuwających ramkę odczytu, typu nonsens oraz zmiany sensu powodujących inaktywacje EZH2 w MDS, MPN oraz zaburzeniach z grupy MDS/MPN. W związku ze skomplikowanymi zależnościami EZH2, jak dotąd, nie opisano szczegółowo wszystkich mechanizmów działania tej cząsteczki i konieczne są dalsze badania [3].

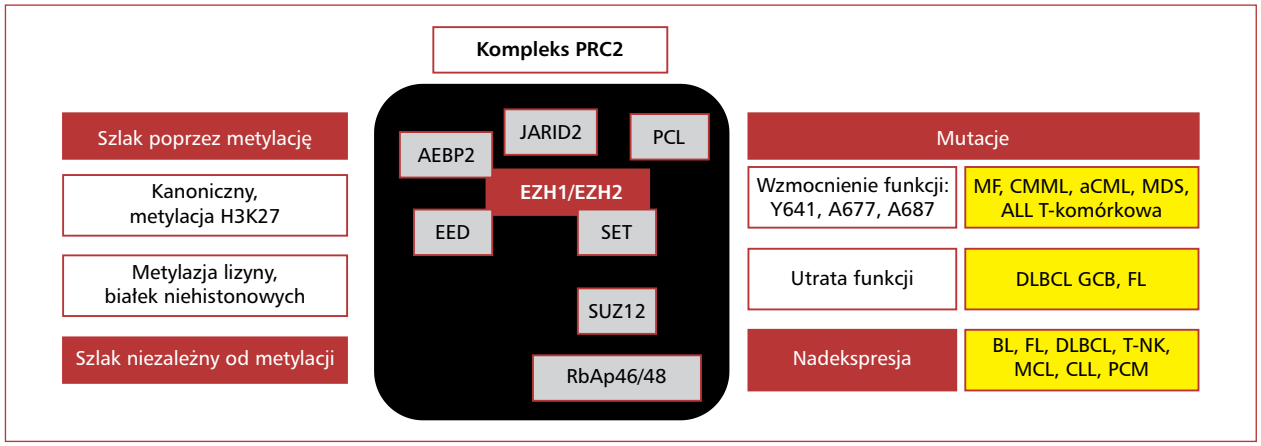
## EZH2 w nowotworach hematologicznych

Występowanie mutacji *EZH2* stwierdzono w licznych chłoniakach z komórek B, w tym w chłoniaku Burkitta (BL, *Burkitt lymphoma*) chłoniaku z komórek płaszcza (MCL, *mantle cell lymphoma*), FL oraz DLBCL. Nadekspresja białka EZH2 koreluje ze stopniem agresywności choroby i niekorzystnym rokowaniem. Regulacja epigenetyczna jest kluczowym elementem w rozwoju DLBCL, a represja genów zachodzi za pośrednictwem kompleksów represyjnych *Polycomb* 1 (PRC1) i 2 (PRC2). EZH2 odgrywa ważną rolę regulatorową w komórkach DLBCL poprzez promowanie nowotworzenia wskutek wyciszenia genów antyproliferacyjnych i supresorowych regulujących cykl komórkowy (np. CDKN1A [*cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*]) oraz genów napędzających końcowe różnicowanie komórek centrów rozmnażania (np. IRF4 [*interferon regulatory factor 4*] oraz PRDM1 [*PR domain zinc finger protein 1*]). Ekspresja zmutowanego *EZH2* w komórkach ośrodków rozmnażania prowadzi do ich rozrostu i, prawdopodobnie przy udziale BCL2, do przyspieszenia nowotworzenia

[26]. Białko EZH2 jest katalityczną podjednostką kompleksu PRC2 i odpowiada za dodawanie grupy metylowej do lizyny w pozycji Lys27 histonu H3 (H3K27). Najbardziej rozpowszechnioną mutacją *EZH2* jest mutacja punktowa Y641. Mutacje Y641 (Y641F, Y641N, Y641S, Y641C oraz Y641H) prowadzą do zmniejszenia metylacji niezmetylowanej H3K27 i zwiększenia metylacji dimetylowej wersji H3K27 (H3K27me2). Mutacja *EZH2* zdarza się w 22% DLBCL z ośrodków rozmnażania (GCB, *germinal center B-cell-like*) i praktycznie nie występuje w podtypie DLBCL z aktywowanych komórek B (ABC, *activated B-cell-like*). Rzadsze mutacje A677G i A687V opisano u 1–3% chorych na chłoniaki B-komórkowe. Mutacje punktowe *EZH2* w alaninie 677, 687 (A677 i A687) zidentyfikowano także w innych chłoniakach nie-Hodgkina [21]. Metylotransferaza EZH2 odgrywa ważną rolę w etiopatogenezie i progresji FL. U blisko 30% chorych na FL wykazano obecność mutacji genu *EZH2*. Przeprowadzono badanie służące określeniu częstości występowania i rozmieszczenia mutacji *EZH2* u 366 pacjentów z wcześniej rozpoznanym FL oraz analizę sekwencji całego kodującego regionu *EZH2* w 46 przypadkach FL, w której potwierdzono powtarzające się mutacje w kodonach Y646, A682 i A692 oraz brak dodatkowych aktywnych mutacji punktowych [27]. Występowanie mutacji *EZH2* jest czynnikiem prognostycznie korzystnym w momencie rozpoznania FL. Wykazano, że jej obecność wydłuża czas wolny od progresji choroby u pacjentów w remisji, zmniejsza prawdopodobieństwo nawrotu, nie wpływa natomiast na przeżycie całkowite (OS, *overall survival*) chorego [28]. Dodatkowo udowodniono, że zwiększona immunohistochemicznie ekspresja EZH2 koreluje z podwyższoną agresywnością chłoniaków B-komórkowych. Wykazano, że EZH2 jest niezbędny do procesu proliferacji komórek nowotworowych i wiąże się z wysokim wskaźnikiem proliferacji DLBCL, FL o wyższym stopniu zaawansowania histologicznego oraz BL [29]. Zarówno nadekspresje, jak i mutacje inaktywujące genu *EZH2* stwierdzono także w MDS i w ostrej białaczce szpikowej (AML, *acute myeloid leukemia*). Mutacja genu *EZH2* występuje u około 10% chorych na MDS [30]. Obecność tej mutacji wiąże się z gorszym rokowaniem, choć rola białka EZH2 w MDS pozostaje nie do końca poznana. W odróżnieniu od chłoniaków i guzów litych, w których ekspresja EZH2 jest zwiększona, obniżenie ekspresji EZH2 w mRNA odnotowano u 47% chorych na MDS z przewagą chorych z anomalią chromosomu 7 [31]. U pacjentów z obniżoną ekspresją EZH2, ale bez żadnych nieprawidłowości w obrębie chromosomu 7 zaobserwowano wydłużenie OS [32]. Przeprowadzono także analizę związku między ekspresją EZH2 a patogenezą PCM. Wykazano, że wysoka ekspresja EZH2 wiąże się z bardziej agresywnym przebiegiem choroby i zwiększoną proliferacją komórek nowotworowych [33].

## EZH2 w innych nowotworach

Mutacje *EZH2* nie są specyficzne tylko dla chłoniaków. Ich występowanie wykazano także w nowotworach gruczołu krokowego, piersi, nerki, jelita grubego, szyjki macicy, chrzęstniakomięsakach i w czerniaku. Nadekspresję EZH2 opisywano także w raku pęcherza moczowego, żołądka, w niedrobnokomórkowym raku płuca i w raku wątrobowokomórkowym. W raku prostaty nadekspresja EZH2 wiąże się z bardziej agresywnym przebiegiem choroby i większym prawdopodobieństwem wystąpienia przerzutów. Podobnie w raku piersi ekspresja EZH2 pozostahje zwiększona w przypadkach naciekającego raka z przerzutami i wiąże się z gorszym rokowaniem [34]. Ulegając nadmiernej ekspresji w raku piersi, EZH2 prowadzi do nowotworzenia poprzez zmniejszenie ekspresji genów supresorowych guza. W licznych badaniach udowodniono występowanie nadekspresji EZH2 w trójujemnym raku piersi, która korelowała dodatnio ze zwiększoną proliferacją komórek nowotworowych i wyższym stopniem histologicznej złośliwości raka. Natomiast nowotwory piersi z niską ekspresją receptorów estrogenowych, charakteryzujących się lepszym rokowaniem, wykazały niską ekspresję EZH2 [35]. Udowodniono także, że nadekspresja EZH2 ma związek z wielkością guza i stadium zaawansowania choroby. Obecnie niewiele wiadomo na temat roli EZH2 w rozwoju i progresji raka jelita grubego. Za pomocą technik *Western blot* i jakościową reakcji polimerazy łańcuchowej z odwrotną transkryptazą (qRT-PCR, *quantitative reverse transcriptase real-time polymerase chain reaction*) przebadano tkankę nowotworową uzyskaną od 95 pacjentów z rozpoznanym rakiem jelita grubego. W badaniach stwierdzono znacznie zwiększoną ekspresję EZH2 w liniach komórkowych raka jelita grubego niż w sąsiadujących tkankach nieobejmujących zmian nowotworowych [36]. Udowodniono również, że chorych z niską ekspresją EZH2 cechowało dłuższe OS niż pacjentów z wysoką ekspresją EZH2 [37]. Analiza związku między cechami kliniczno-patologicznymi a ekspresją EZH2 dowiodła, że wysoka ekspresja EZH2 jest ściśle związana z wielkością guza, stopniem złośliwości histologicznej




**Rycina 1.** Regulacja EZH2 na poziomie molekularnym; PRC2 — Polycomb *repressive* complex *2*; AEBP2 — *adipocyte enhancer binding protein 2*; JARID2 — *jumonji and AT-rich interaction domain containing 2*; PCL — *Polycomb-like proteins*; EED — *embryonic ectoderm development protein*; SET — *su(var)3-9, enhancer-of-zeste and trithorax*; SUZ12 — *suppressor of zeste 12 homolog*; RbAp46/48 — *retinoblastoma associated protein 46/48*; MF — włóknienie szpiku; CMML — przewlekła białaczka mielomonocytowa; aCML —atypowa przewlekła białaczka szpikowa; MDS — zespoły mielodysplastyczne; ALL T-komórkowa — ostra białaczka limfoblastyczna T-komórkowa; DLBCL — chłoniak rozlany z dużych komórek B; GCB — ośrodek rozmnażania; FL — chłoniak grudkowy; BL — chłoniak Burkitta; T-NK — chłoniak z komórek T i NK; MCL — chłoniak z komórek płaszcza; CLL — przewlekła białaczka limfocytowa; PCM — szpiczak plazmocytowy

**Figure 1.** EZH2 regulation at the molecular level PRC2 — Polycomb repressive complex 2; AEBP2 — adipocyte enhancer binding protein 2; JARID2 — jumonji and AT-rich interaction domain containing 2; PCL — Polycomb-like proteins; EED — embryonic ectoderm development protein; SET — su(var)3-9, enhancer-of-zeste and trithorax; SUZ12 — suppressor of zeste 12 homolog; RbAp46/48 — retinoblastoma associated protein 46/48; MF — myelofibrosis; CMML — chronic myelomonocytic leukemia; aCML — atypical chronic myeloid leukemia; MDS — myelodysplastic syndromes; ALL T-komórkowa — T-cell acute lymphoblastic leukemia; DLBCL — diffuse large B-cell lymphoma; GCB — germinal center B-cell-like; FL — follicular lymphoma; BL — Burkitt lynphoma; T-NK — T-cell-natural killer(NK)/lymphomas; MCL — mantle cell lymphoma; CLL — chronic lymphocytic leukemia; PCM — plasma cell myeloma

i obecnością przerzutów do węzłów chłonnych [36]. Podobne wyniki uzyskano w odniesieniu do mięsaka maziówkowego. Stwierdzono, że ekspresja EZH2 koreluje z wartościami Ki-67 i H3K27me3. Bez względu na podtyp histopatologiczny wyższa ekspresja EZH2 wiąże się z szybszą proliferacją, większym rozmiarem guza (≥ 5cm), wyższym ryzykiem występowania odległych przerzutów i gorszym rokowaniem [38]. Na rycinie 1 przedstawiono mechanizmy regulacyjne EZH2.

## Terapia celowana inhibitorami metylotransferazy EZH2

W związku z udowodnionym wpływem zwiększonej ekspresji i mutacji *EZH2* na patogenezę chorób nowotworowych obecnie trwają intensywne prace nad zastosowaniem w terapii celowanej inhibitorów metylotransferazy EZH2. Pierwszym inhibitorem EZH2, którego działanie przyniosło obiecujące rezultaty była 3-deazaneplanocyna A (DZNep, *3-deazaneplanocin A*). Substancja ta zakłóca metabolizm S-adenozylohomocysteiny (SAH, *S-adenosylhomocysteine*) oraz SAM, co wywołuje degradację cząsteczek EZH2. W konsekwencji zmniejszeniu ulegała liczba zmetylowanych grup (H3K27me3). DZnep wykazuje znaczną aktywność w różnych typach nowotworów [1]. W związku z tym, że DZNep jest pośrednim inhibitorem, jego specyficzność wobec EZH2 jest niska. Mimo potencjalnie obiecujących wyników *in vitro* i *in vivo*, dowiedziono, że DZNep ma bardzo krótki okres półtrwania i wykazuje niespecyficzne hamowanie metylacji histonów. Ten brak specyficzności doprowadził do opracowania analogów DZNep o ulepszonej charakterystyce [39]. Jednym z nich jest związek D9, który wykazał skuteczność terapeutyczną w ostrej białaczce szpikowej poprzez hamowanie onkogennych szlaków sygnałowych. Wykazano, że D9 może obniżać liczebność populacji komórek macierzystych, a tym samym wpływa na redukcję komórek AML [40]. Przełomowym momentem w terapii inhibitorami

EZH2 był rok 2012, kiedy rozpoczęto badania nad związkami 2-pirydonowymi. Sukces ten był możliwy dzięki pojawieniu nowych zaawansowanych oraz wysoko wydajnych metod przesiewowych (HTS, *high-throughput biochemical screening*). Pierwszym odkrytym selektywnym inhibitorem EZH2 był EPZ005687. Związek ten ma ponad 500 razy większą selektywność wobec kompleksu PRC2/EZH2 od innych 15 metylotransferaz, jest 50 razy bardziej selektywny dla kompleksu PRC2/ /EZH2 niż kompleksu PRC2/EZH1 oraz równoważny dla mutacji *WT* i *Y641* [41]. W tym samym roku dzięki technikom HTS udało się odkryć kolejny silny i selektywny inhibitor o nazwie GSK126. Wykazuje on działanie konkurencyjne wobec SAM, jest natomiast 1000-krotnie bardziej selektywny wobec EZH2 niż inne 20 metylotransferaz. GSK126 nie powoduje degradacji kompleksu PRC2. Dodatkowo wykazano 150 razy większą selektywność GSK126 wobec EZH2 niż w przypadku EZH1. W testach GSK126, które przeprowadzono na liniach komórkowych chłoniaka z limfocytów B — zarówno ze stwierdzonymi mutacjami w genach EZH2, jak i w komórkach bez mutacji — potwierdzono działanie inhibitora. Zaobserwowano obniżenie poziomu H3K27me3, aktywację transkrypcji i zatrzymanie dalszej proliferacji. Co interesujące, lepsze wyniki osiągnięto w komórkach z mutacją [20]. Ostatecznie GSK126 wszedł do I fazy badań klinicznych w 2014 roku u pacjentów z chłoniakami B-komórkowymi oraz PCM.

Ponownie w 2012 roku zidentyfikowano kolejny selektywny inhibitor EZH2 z budową 2-pirydonową o nazwie EI1. Podobnie jak poprzednie związki wykazuje on konkurencyjne działanie do SAM. EI1 ma około 90-krotnie większą selektywność dla EZH2 niż EZH1 oraz 10 000-krotnie większą selektywność do EZH2 od innych 10 metylotransferaz [42]. Znaczącym przełomem było opracowanie formuły inhibitora UNC1999 opisanej w 2013 roku. W swojej budowie zawiera on dwa ugrupowania pirydynowe. Był to pierwszy doustny związek o podwójnym działaniu inhibitora względem EZH2 i EZH1. UNC1999 jest konkurencyjny wobec SAM oraz ponad 1000-krotnie bardziej selektywny wobec EZH2/EZH1 niż ponad 15 innych metylotransferaz. Jego działanie zmniejsza poziom H3K27me3 oraz proliferację komórek nowotworowych niezależnie od występowania mutacji *EZH2* [43]. Udowodniono, że UNC1999 silnie blokuje proliferację w odróżnieniu do GSK126, który wykazuje silne działanie na EZH2. Przyczyną tego może być porównywalne działanie UNC1999 na EZH2 oraz EZH1 [44]. Ponadto wykazano niską cytotoksyczność UNC1999 w badaniach *in vitro*, a w terapii wraz z inhibitorem deacetylazy histonowej 1/2 (HDAC1/2, *histone deacetylase 1/2*) zaobserwowano wspólny synergizm prowadzący do apoptozy i uszkodzenia DNA [45]. Kolejnym kluczowym związkiem jest tazemostat — ma on nieco inną budowę chemiczną: rdzeń indolowy bądź imidazolowy zastąpiono grupą fenylową połączoną z ugrupowaniem pirydynowym. Tazemostat silnie hamuje EZH2 typu dzikiego i zmutowanego oraz charakteryzuje się 35-krotnie wyższą selektywnością w stosunku do EZH2 niż EZH1 oraz 4500-krotnie wyższą selektywnością wobec EZH2 niż inne 14 metylotransferaz. W badaniach *in vivo* potwierdzono wysoką siłę działania oraz tolerancję na tazemostat u myszy [46]. Tazemostat jest obecnie w I i II fazie badań klinicznych w leczeniu chłoniaków oraz zaawansowanych guzów litych.

Kolejno w wyniku zmiany struktur chemicznych powstały dwa analogi o budowie 2-pirydonowej — EPZ011989 oraz ZLD1039 [47, 48]. Dokonane zmiany chemiczne przyczyniły się do poprawienia właściwości farmakokinetycznych i farmakodynamicznych tych inhibitorów. Oba związki wykazują silne działanie w stosunku do typu dzikiego oraz zmutowanego EZH2, są około 15 razy bardziej wybiórcze względem EZH2 oraz 3–10 tys. razy bardziej selektywne niż inne metylotransferazy [47]. Niedawno Lu i wsp. [49] opracowali nowa serię inhibitorów EZH2, których budowa chemiczna opiera się na benzofuranie. Głównym przedstawicielem inhibitorów z tej grupy jest EBI-2511, który cechuje wyższa skuteczność przeciwnowotworowa od skuteczności tazemostatu [49]. W badaniach prowadzonych na myszach wykazano zmniejszenie się guza o 97% w wyniku stosowania EBI-251. W tych samych warunkach działanie tazemostatu również prowadziło do zmniejszenia objętości nowotworu w 80%. Co więcej, Honma i wsp. [50] ustalili, że inhibitory zawierające w budowie benzofuran hamują trimetylację histonu H3K27 w większym stopniu niż inhibitory selektywne. Wykazano również silniejsze działanie przeciwnowotworowe inhibitorów benzofuranowych *in vitro* oraz *in vivo* w komórkach DLBCL oraz wybranych nowotworach litych. Opisano dwa nowe inhibitory — (R)-OR-S1 oraz (R)-OR-S2 — działające podwójnie, tj. zarówno na EZH2, jak i na EZH1. Cząsteczki te wykazywały większą skuteczność niż ich selektywne odpowiedniki [49, 50].

Ważnym etapem w postępie terapii inhibitorami EZH2 było opracowanie w latach 2012—2013 związków pirazolowych oraz pirolowych. Pierwszy prototyp o budowie pirazolowej nosił nazwę

**Tabela 1.** Inhibitory EZH1/EZH2 w terapii celowanej nowotworów układu chłonnego
**Table 1.** EZH1/EZH2 inhibitors in targeted therapy of lymphoid tumors

| Cząsteczka/inhibitor | Cel terapeutyczny | Badana grupa/nowotwór | Status badań klinicznych |
|---|---|---|---|
| GSK 126 | EZH2 | Chłoniak Hodgkina, PCM | Faza I |
| EI 1 | EZH2 | DLBCL | Przedkliniczny |
| UNC1999 | EZH1/EZH2 | DLBCL, AML, PCM | Przedkliniczny |
| Tazemetostat | EZH2 | Chłoniaki B-komórkowe, DLBCL, FL | Faza I, faza II |
| CPI-1205 | EZH2 | Chłoniaki B-komórkowe | Faza I |
| DS-3201b | EZH1/EZH2 | Chłoniak Hodgkina, AML, ALL | Faza I |

PCM (*plasma cell myeloma*) — szpiczak plazmacytowy; DLBCL (*diffuse large B-cell lymphoma*) — chłoniak rozlany z dużych komórek B; AML (*acute myeloid leukemia*) — ostra białaczka szpikowa; FL (*follicular lymphoma*) — chłoniak grudkowy; ALL (*acute lymphoblastic leukemia*) — ostra białaczka limfoblastyczna

MC3629 i wykazywał inhibicję już w niskim stężeniu molowym. Jak potwierdzono w badaniach, MC3629 znacznie zmniejsza proliferację w komórkach raka piersi MDA-MB-231, białaczki K562 oraz nerwiaka płodowego SK-N-BE po 2–5 dniach leczenia. Porównując, GSK126 testowany w tych samych warunkach wykazywał analogiczną aktywność w przypadku komórek K562, natomiast gorsze efekty uzysk5wał na liniach komórkowych MDA-MB-231 oraz SK-N-BE [51]. Z kolei MC3629 już o stężeniu 5mM testowany na komórkach macierzystych rdzeniaka zarodkowego powodował spadek poziomu H3K27me3, zmniejszenie proliferacji i samoodnowy komórkowej oraz wywoływał apoptozę [52]. Pod koniec 2014 roku badaczom, którzy nadal pracowali nad ulepszeniem inhibitorów EZH2 zawierających 2-pirydynowe ugrupowania, udało się wytworzyć związek o nazwie CPI-360; jego główną zaletą jest szerokie spektrum działania obejmujące różne typy chłoniaków nie-Hodgkina. Dalsze badania polegające na ulepszeniu budowy chemicznej CPI-360 doprowadziły do opracowania jego analogów — CPI-169 oraz CPI-1205. Analog CPI-169 wykazywał większą stabilność oraz silnie działanie w komórkach DLBCL z mutacją *EZH2*, natomiast CPI-1205 był doustnym, silnie selektywnym inhibitorem EZH2 o słabszym działaniu wobec EZH1. Wykazano działanie CPI-1205 hamujące proliferację nowotworową na liniach komórkowych Karpas 422 DLBCL. Dodatkowo inhibitor ten przeszedł pomyślnie badania toksykologiczne i trwa I faza badań klinicznych ukierunkowanych na leczenie chłoniaków z komórek B [53–55]. W tabeli 1 przedstawiono badane obecnie inhibitory EZH1/EZH2, których skuteczność ocenia się w nowotworach układu chłonnego.

## Podsumowanie

EZH2 jest metylotransferazą o właściwościach katalitycznych oraz częścią kompleksu PRC2 i pośredniczy w reakcji prowadzącej do powstania H3K27me3. Deregulacja metylotransferazy EZH2 może być spowodowana działaniem czynników genetycznych (mutacje w genie), transkrypcyjnych bądź posttranskrypcyjnych i może to prowadzić do rozwoju wielu typów nowotworów. Terapia celowana chorób spowodowanych nadekspresją, wzmocnieniem bądź osłabieniem funkcji EZH2 polega na wykorzystywaniu cząsteczek działających jako inhibitory skierowanych przeciw kompleksowi EZH2/PCR2. Do inhibitorów EZH2 zalicza się głównie związki o budowie pirydonowej, pirazolowej, pirolowej, benzofuranowej, indolowej oraz imidazolowej. Tazemostat jako jedyny inhibitor metylotransferazy EZH2 przeszedł do II fazy badań klinicznych i notuje się obiecujące efekty w terapii chłoniaków z komórek B.

## Finansowanie

Praca została zrealizowana z wykorzystaniem infrastruktury projektu nr POIG.02.03.00-14-111/13 sfinansowanego z Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka 2007–2013, Priorytet II. Infrastruktura strefy B+R, Działanie 2.3. Inwestycje związane z rozwojem infrastruktury informatycznej nauki.

## Piśmiennictwo

1. Fioravanti R, Stazi G, Zwergel C, et al. Six years (2012-2018) of researches on catalytic EZH2 inhibitors: the boom of the 2-pyridone compounds. Chem Rec. 2018; 18(12): 1818–1832, doi: 10.1002/tcr.201800091, indexed in Pubmed: 30338896.

2. Wen Y, Cai J, Hou Y, et al. Role of EZH2 in cancer stem cells: from biological insight to a therapeutic target. Oncotarget. 2017; 8(23): 37974–37990, doi: 10.18632/oncotarget.16467, indexed in Pubmed: 28415635.
3. Gan Lu, Yang Y, Li Q, et al. Epigenetic regulation of cancer progression by EZH2: from biological insights to therapeutic potential. Biomark Res. 2018; 6: 10, doi: 10.1186/s40364-018-0122-2, indexed in Pubmed: 29556394.
4. Andricovich J, Kai Y, Peng W, et al. Histone demethylase KDM2B regulates lineage commitment in normal and malignant hematopoiesis. J Clin Invest. 2016; 126(3): 905–920, doi: 10.1172/JCI84014, indexed in Pubmed: 26808549.
5. He A, Shen X, Ma Q, et al. PRC2 directly methylates GATA4 and represses its transcriptional activity. Genes Dev. 2012; 26(1): 37–42, doi: 10.1101/gad.173930.111, indexed in Pubmed: 22215809.
6. Lee JiM, Lee JS, Kim H, et al. EZH2 generates a methyl degron that is recognized by the DCAF1/DDB1/CUL4 E3 ubiquitin ligase complex. Mol Cell. 2012; 48(4): 572–586, doi: 10.1016/j.molcel.2012.09.004, indexed in Pubmed: 23063525.
7. Gunawan M, Venkatesan N, Loh JT, et al. The methyltransferase Ezh2 controls cell adhesion and migration through direct methylation of the extranuclear regulatory protein talin. Nat Immunol. 2015; 16(5): 505–516, doi: 10.1038/ni.3125, indexed in Pubmed: 25751747.
8. Kim E, Kim M, Woo DH, et al. Phosphorylation of EZH2 activates STAT3 signaling via STAT3 methylation and promotes tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells. Cancer Cell. 2013; 23(6): 839–852, doi: 10.1016/j.ccr.2013.04.008, indexed in Pubmed: 23684459.
9. Lee ST, Li Z, Wu Z, et al. Context-specific regulation of NF-κB target gene expression by EZH2 in breast cancers. Mol Cell. 2011; 43(5): 798–810, doi: 10.1016/j.molcel.2011.08.011, indexed in Pubmed: 21884980.
10. Xu K, Wu ZJ, Groner AC, et al. EZH2 oncogenic activity in castration-resistant prostate cancer cells is Polycomb-independent. Science. 2012; 338(6113): 1465–1469, doi: 10.1126/science.1227604, indexed in Pubmed: 23239736.
11. Jung HY, Jun S, Lee M, et al. PAF and EZH2 induce Wnt/β-catenin signaling hyperactivation. Mol Cell. 2013; 52(2): 193–205, doi: 10.1016/j.molcel.2013.08.028, indexed in Pubmed: 24055345.
12. Yan J, Ng SB, Tay JLS, et al. EZH2 overexpression in natural killer/T-cell lymphoma confers growth advantage independently of histone methyltransferase activity. Blood. 2013; 121(22): 4512–4520, doi: 10.1182/blood-2012-08-450494, indexed in Pubmed: 23529930.
13. Zhang K, Zhang Y, Ren K, et al. MicroRNA-101 inhibits the metastasis of osteosarcoma cells by downregulation of EZH2 expression. Oncol Rep. 2014; 32(5): 2143–2149, doi: 10.3892/or.2014.3459, indexed in Pubmed: 25190211.
14. Wang HJ, Ruan HJ, He XJ, et al. MicroRNA-101 is down-regulated in gastric cancer and involved in cell migration and invasion. Eur J Cancer. 2010; 46(12): 2295–2303, doi: 10.1016/j.ejca.2010.05.012, indexed in Pubmed: 20712078.
15. Varambally S, Cao Qi, Mani RS, et al. Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer. Science. 2008; 322(5908): 1695–1699, doi: 10.1126/science.1165395, indexed in Pubmed: 19008416.
16. Han Li C, Chen Y. Targeting EZH2 for cancer therapy: progress and perspective. Curr Protein Pept Sci. 2015; 16(6): 559–570, indexed in Pubmed: 25854924.
17. Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, et al. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. Nature. 2002; 419(6907): 624–629, doi: 10.1038/nature01075, indexed in Pubmed: 12374981.
18. Morin RD, Johnson NA, Severson TM, et al. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. Nat Genet. 2010; 42(2): 181–185, doi: 10.1038/ng.518, indexed in Pubmed: 20081860.
19. van Haaften G, Dalgliesh GL, Davies H, et al. Somatic mutations of the histone H3K27 demethylase gene UTX in human cancer. Nat Genet. 2009; 41(5): 521–523, doi: 10.1038/ng.349, indexed in Pubmed: 19330029.
20. McCabe MT, Graves AP, Ganji G, et al. Mutation of A677 in histone methyltransferase EZH2 in human B-cell lymphoma promotes hypertrimethylation of histone H3 on lysine 27 (H3K27). Proc Natl Acad Sci USA. 2012; 109(8): 2989–2994, doi: 10.1073/pnas.1116418109, indexed in Pubmed: 22323599.
21. Kim KH, Roberts CWM. Targeting EZH2 in cancer. Nat Med. 2016; 22(2): 128–134, doi: 10.1038/nm.4036, indexed in Pubmed: 26845405.
22. Yamagishi M, Uchimaru K. Targeting EZH2 in cancer therapy. Curr Opin Oncol. 2017; 29(5): 375–381, doi: 10.1097/CCO.0000000000000390, indexed in Pubmed: 28665819.
23. Majer CR, Jin L, Scott MP, et al. A687V EZH2 is a gain-of-function mutation found in lymphoma patients. FEBS Lett. 2012; 586(19): 3448–3451, doi: 10.1016/j.febslet.2012.07.066, indexed in Pubmed: 22850114.
24. Kadoch C, Hargreaves DC, Hodges C, et al. Proteomic and bioinformatic analysis of mammalian SWI/SNF complexes identifies extensive roles in human malignancy. Nat Genet. 2013; 45(6): 592–601, doi: 10.1038/ng.2628, indexed in Pubmed: 23644491.
25. Wilson BG, Wang Xi, Shen X, et al. Epigenetic antagonism between polycomb and SWI/SNF complexes during oncogenic transformation. Cancer Cell. 2010; 18(4): 316–328, doi: 10.1016/j.ccr.2010.09.006, indexed in Pubmed: 20951942.
26. Dubois S, Mareschal S, Picquenot JM, et al. Immunohistochemical and genomic profiles of diffuse large B-cell lymphomas: implications for targeted EZH2 inhibitor therapy? Oncotarget. 2015; 6(18): 16712–16724, doi: 10.18632/oncotarget.3154, indexed in Pubmed: 25762637.
27. Bödör C, Grossmann V, Popov N, et al. EZH2 mutations are frequent and represent an early event in follicular lymphoma. Blood. 2013; 122(18): 3165–3168, doi: 10.1182/blood-2013-04-496893, indexed in Pubmed: 24052547.
28. Huet S, Xerri L, Tesson B, et al. EZH2 alterations in follicular lymphoma: biological and clinical correlations. Blood Cancer J. 2017; 7(4): e555, doi: 10.1038/bcj.2017.32, indexed in Pubmed: 28430172.
29. Tian X, Pelton A, Shahsafaei A, et al. Differential expression of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) protein in small cell and aggressive B-cell non-Hodgkin lymphomas and differential regulation of EZH2 expression by p-ERK1/2 and MYC in aggressive B-cell lymphomas. Mod Pathol. 2016; 29(9): 1050–1057, doi: 10.1038/modpathol.2016.114, indexed in Pubmed: 27282353.
30. Sashida G, Harada H, Matsui H, et al. Ezh2 loss promotes development of myelodysplastic syndrome but attenuates its predisposition to leukaemic transformation. Nat Commun. 2014; 5: 4177, doi: 10.1038/ncomms5177, indexed in Pubmed: 24953053.
31. Cabrero M, Wei Y, Yang H, et al. Down-regulation of EZH2 expression in myelodysplastic syndromes. Leuk Res. 2016; 44: 1–7, doi: 10.1016/j.leukres.2016.02.009, indexed in Pubmed: 26970171.

32. McGraw K, Nguyen J, Al Ali NH, et al. Association of EZH2 protein expression by immunohistochemistry in myelodysplasia related neoplasms with mutation status, cytogenetics and clinical outcomes. Br J Haematol. 2018; 184(3): 450–455, doi: 10.1111/bjh.15099.
33. Pawlyn C, Bright MD, Buros AF, et al. Overexpression of EZH2 in multiple myeloma is associated with poor prognosis and dysregulation of cell cycle control. Blood Cancer J. 2017; 7(3): e549, doi: 10.1038/bcj.2017.27, indexed in Pubmed: 28362441.
34. Chase A, Cross NCP. Aberrations of EZH2 in cancer. Clin Cancer Res. 2011; 17(9): 2613–2618, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2156, indexed in Pubmed: 21367748.
35. Pourakbar S, Pluard TJ, Accurso AD, et al. Ezh2, a novel target in detection and therapy of breast cancer. Onco Targets Ther. 2017; 10: 2685–2687, doi: 10.2147/OTT.S138777, indexed in Pubmed: 28579806.
36. Chen Z, Yang P, Li W, et al. Expression of EZH2 is associated with poor outcome in colorectal cancer. Oncol Lett. 2018; 15(3): 2953–2961, doi: 10.3892/ol.2017.7647, indexed in Pubmed: 29435024.
37. Vilorio-Marqués L, Martín V, Diez-Tascón C, et al. The role of EZH2 in overall survival of colorectal cancer: a meta-analysis. Sci Rep. 2017; 7(1): 13806, doi: 10.1038/s41598-017-13670-z, indexed in Pubmed: 29061982.
38. Changchien YC, Tátrai P, Papp G, et al. Poorly differentiated synovial sarcoma is associated with high expression of enhancer of zeste homologue 2 (EZH2). J Transl Med. 2012; 10: 216, doi: 10.1186/1479-5876-10-216, indexed in Pubmed: 23110793.
39. Tang SH, Huang HS, Wu HU, et al. Pharmacologic down-regulation of EZH2 suppresses bladder cancer in vitro and in vivo. Oncotarget. 2014; 5(21): 10342–10355, doi: 10.18632/oncotarget.1867, indexed in Pubmed: 25431950.
40. Jiang X, Lim CZ, Li Z, et al. Functional characterization of D9, a novel deazaneplanocin a (DZNep) analog, in targeting acute myeloid leukemia (AML). PLoS One. 2015; 10(4): e0122983, doi: 10.1371/journal.pone.0122983, indexed in Pubmed: 25928216.
41. Knutson SK, Wigle TJ, Warholic NM, et al. A selective inhibitor of EZH2 blocks H3K27 methylation and kills mutant lymphoma cells. Nat Chem Biol. 2012; 8(11): 890–896, doi: 10.1038/nchembio.1084, indexed in Pubmed: 23023262.
42. Qi W, Chan H, Teng L, et al. Selective inhibition of Ezh2 by a small molecule inhibitor blocks tumor cells proliferation. Proc Natl Acad Sci USA. 2012; 109(52): 21360–21365, doi: 10.1073/pnas.1210371110, indexed in Pubmed: 23236167.
43. Konze KD, Ma A, Li F, et al. An orally bioavailable chemical probe of the lysine methyltransferases EZH2 and EZH1. ACS Chem Biol. 2013; 8(6): 1324–1334, doi: 10.1021/cb400133j, indexed in Pubmed: 23614352.
44. Xu B, On DM, Ma A, et al. Selective inhibition of EZH2 and EZH1 enzymatic activity by a small molecule suppresses MLL-rearranged leukemia. Blood. 2015; 125(2): 346–357, doi: 10.1182/blood-2014-06-581082, indexed in Pubmed: 25395428.
45. Grinshtein N, Rioseco CC, Marcellus R, et al. Small molecule epigenetic screen identifies novel EZH2 and HDAC inhibitors that target glioblastoma brain tumor-initiating cells. Oncotarget. 2016; 7(37): 59360–59376, doi: 10.18632/oncotarget.10661, indexed in Pubmed: 27449082.
46. Knutson SK, Warholic NM, Wigle TJ, et al. Durable tumor regression in genetically altered malignant rhabdoid tumors by inhibition of methyltransferase EZH2. Proc Natl Acad Sci USA. 2013; 110(19): 7922–7927, doi: 10.1073/pnas.1303800110, indexed in Pubmed: 23620515.
47. Campbell JE, Kuntz KW, Knutson SK, et al. EPZ011989, a potent, orally-available ezh2 inhibitor with robust in vivo activity. ACS Med Chem Lett. 2015; 6(5): 491–495, doi: 10.1021/acsmedchemlett.5b00037, indexed in Pubmed: 26005520.
48. Song X, Gao T, Wang N, et al. Selective inhibition of EZH2 by ZLD1039 blocks H3K27 methylation and leads to potent anti-tumor activity in breast cancer. Sci Rep. 2016; 6: 20864, doi: 10.1038/srep20864, indexed in Pubmed: 26868841.
49. Lu B, Shen X, Zhang L, et al. Discovery of EBI-2511: a highly potent and orally active EZH2 inhibitor for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma. ACS Med Chem Lett. 2018; 9(2): 98–102, doi: 10.1021/acsmedchemlett.7b00437, indexed in Pubmed: 29456795.
50. Honma D, Kanno O, Watanabe J, et al. Novel orally bioavailable EZH1/2 dual inhibitors with greater antitumor efficacy than an EZH2 selective inhibitor. Cancer Sci. 2017; 108(10): 2069–2078, doi: 10.1111/cas.13326, indexed in Pubmed: 28741798.
51. Mellini P, Marrocco B, Borovika D, et al. Pyrazole-based inhibitors of enhancer of zeste homologue 2 induce apoptosis and autophagy in cancer cells. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2018; 373(1748), doi: 10.1098/rstb.2017.0150, indexed in Pubmed: 29685965.
52. Miele E, Valente S, Alfano V, et al. The histone methyltransferase EZH2 as a druggable target in SHH medulloblastoma cancer stem cells. Oncotarget. 2017; 8(40): 68557–68570, doi: 10.18632/oncotarget.19782, indexed in Pubmed: 28978137.
53. Bradley WD, Arora S, Busby J, et al. EZH2 inhibitor efficacy in non-Hodgkin's lymphoma does not require suppression of H3K27 monomethylation. Chem Biol. 2014; 21(11): 1463–1475, doi: 10.1016/j.chembiol.2014.09.017, indexed in Pubmed: 25457180.
54. Gehling VS, Vaswani RG, Nasveschuk CG, et al. Discovery, design, and synthesis of indole-based EZH2 inhibitors. Bioorg Med Chem Lett. 2015; 25(17): 3644–3649, doi: 10.1016/j.bmcl.2015.06.056, indexed in Pubmed: 26189078.
55. Vaswani RG, Gehling VS, Dakin LA, et al. Identification of (R)-N-((4-methoxy-6-methyl-2-oxo-1,2-dihydropyridin-3-yl)methyl)-2-methyl-1-(1-(1-(2,2,2-trifluoroethyl)piperidin-4-yl)ethyl)-1H-indole-3-carboxamide (CPI-1205), a potent and selective inhibitor of histone methyltransferase EZH2, suitable for phase I clinical trials for B-cell lymphomas. J Med Chem. 2016; 59(21): 9928–9941, doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b01315, indexed in Pubmed: 27739677.