

Teoretický prehľad epigenetických zmien a ich možné využitie pri liečbe duktálneho adenokarcinómu pankreasu

Bc. Mária Urbanová¹, MUDr. Peter Dubovan², MUDr. Miroslav Tomáš, PhD.², Mgr. Marína Cihová, PhD.³, RNDr. Soňa Čierniková, PhD.³, Mgr. Božena Smolková, PhD.^{3*}

¹Katedra genetiky, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava

²Klinika chirurgickej onkológie, Slovenská zdravotnícka univerzita a Národný onkologický ústav, Bratislava

³Ústav experimentálnej onkológie, Biomedicínske centrum Slovenskej akadémie vied, Bratislava

Duktálny adenokarcinóm pankreasu patrí medzi najagresívnejšie nádorové ochorenia so zlou prognózou a vysokou mierou úmrtnosti. Prispievajú k tomu najmä nešpecifické príznaky, neskorá diagnostika, ale aj vysoká miera rezistencie nádorových buniek na podávanú liečbu. Epigenetika je relatívne nová oblasť výskumu, ktorá sa významnou mierou podieľa na pochopení molekulárnych mechanizmov súvisiacich s tumorigenézou a metastázovaním. Reverzibilita epigenetických zmien ponúka možnosti ich preprogramovania ako novú liečebnú stratégiu. Inhibícia DNA metyltransferáz a histón deacetyláz, ktoré sú vysoko exprimované v malígnych bunkách, vykazuje v predklinických štúdiách sľubné protinádorové účinky. Patria k nim indukcia apoptózy, zastavenie bunkového cyklu, zníženie migrácie nádorových buniek a zvýšenie ich citlivosti na liečbu. V súčasnosti prebieha niekoľko klinických štúdií fázy I a II zameraných na zistenie účinnosti a znášanlivosti epigenetických inhibítorov v monoterapii alebo kombinovanej terapii solídnych nádorov. Aj keď inhibítory prvej a druhej generácie zatiaľ pre karcinóm pankreasu nepriniesli očakávané výsledky, využitie inhibítorov tretej generácie spolu s identifikáciou nových prediktívnych biomarkerov by mohlo prispieť k zlepšeniu prežívania pacientov s týmto zákerným ochorením.

Kľúčové slová: epigenetika, duktálny adenokarcinóm pankreasu, metylácia DNA, modifikácie histónov, mikroRNA

Targeting epigenetic modifications in pancreatic ductal adenocarcinoma

Pancreatic ductal adenocarcinoma ranks among the most aggressive cancers with a dismal prognosis and high mortality rate. Nonspecific symptoms, intricate diagnostics, and strong resistance to antitumor therapy hinder the path to successful treatment. Epigenetics, a relatively new research area, is capable to identify key tumorigenic pathways and metastasis-related molecular mechanisms. The reversibility of epigenetic changes harbors a great potential for epigenetic reprogramming as a new therapeutic strategy. Inhibition of DNA methyltransferases and histone deacetylases, which are highly expressed in malignant cells, shows various antitumor effects in preclinical settings, such as induction of apoptosis, cell cycle arrest, reduction of cell migration and sensitization of resistant tumor cells towards treatment. Several phase I and II clinical trials address the efficacy and tolerability of epigenetic drugs in monotherapy or combination regimens for the treatment of solid tumors. Although first- and second-generation inhibitors resulted rarely in promising response rates for pancreatic cancer, third-generation inhibitors together with the identification of new predictive biomarkers could contribute to improving the survival of patients with this insidious disease.

Key words: epigenetics, pancreatic ductal adenocarcinoma, DNA methylation, histone modifications, microRNA

Onkológia (Bratisl.), 2020;15(5):324-328

Úvod

Duktálny adenokarcinóm pankreasu (PDAC) patrí medzi nádorové ochorenia s veľmi rýchlou progresiou a vysokou mierou úmrtnosti. Je zvyčajne diagnostikovaný až v neskorom štádiu, kedy sú príznaky špecifickejšie, ale chirurgické odstránenie nádoru, ktoré je jedinou potenciálne kuratívnu liečbou, vo väčšine prípadov už nie je možné. Epigenetika je nový, progresívne sa rozvíjajúci odbor genetiky, ktorý sa zaoberá predovšetkým štúdiom mechanizmov regulujúcich génovú expresiu bez zmeny primárnej genetickej informácie – genetického kódu. Podobne ako mutácie, epigenetické zme-

ny opísané pri nádorových ochoreniach vedú často k patologickej expresii génov alebo k nestabilite genómu. Tým umožňujú nádorovým bunkám získať invazívny fenotyp a založiť metastázy. Keďže epigenetické zmeny sa na rozdiel od klinicky manifestných metastáz objavujú oveľa skôr, môžu byť využité ako nádorovo-špecifické biomarkery alebo nové terapeutické ciele pre personalizovanú liečbu.

Duktálny adenokarcinóm pankreasu

PDAC je exokrinný nádor vznikajúci z epitelového tkaniva vývodných ciest pankreasu. Vznik ochorenia je charak-

terizovaný premenou normálnych epitelových buniek pankreatického ductu na pre-invazívne prekurzorové lézie známe ako pankreatické intra-epiteliálne neoplázie (PanIN), ktoré môžu v konečnom štádiu viesť k vzniku invazívnej formy PDAC. Pokročilé PanIN lézie sa vyznačujú zvýšenou genetickou nestabilitou, proliferáciou, schopnosťou invadovať do okolitého tkaniva a metastázovať (1). Vzhľadom na nešpecifické klinické príznaky s prerušovaným priebehom a aj neexistenciou bezpečného a efektívneho skriningu je toto ochorenie takmer u 80 % pacientov v čase stanovenia diagnózy v III. alebo IV. klinickom štádiu. Tomu

zodpovedá celkové prežívanie s mediám menej ako 5 mesiacov od stanovenia diagnózy, kedy v mnohých prípadoch je možné pacientom poskytnúť len podpornú liečbu s cieľom zmiernenia príznakov ochorenia bez možnosti kurabilného zásahu (2). PDAC je celosvetovo podľa svetového fondu na výskum rakoviny 12. najčastejšou malignitou u mužov a 11. najčastejším maligným ochorením u žien, pričom Slovensku patrí 6. priečka v počte prípadov na 100 000 obyvateľov (3).

Metastázovanie a epiteliálno-mezenchymálny prechod

Na agresívnu povahu, zlú prognózu a vysokú rezistenciu nádorov PDAC vplýva predovšetkým ich vysoký metastatický potenciál a skorý nástup metastatickej choroby. Metastázovanie je nenáhodný, biologicky heterogénny patofyziologický proces, ktorý zahŕňa disemináciu nádorových buniek z primárneho nádoru do anatomicky vzdialených orgánov a ich postupnú adaptáciu na mikroprostredie tohto cudzieho tkaniva (4). Za dereguláciu vnútorných a vonkajších signalizačných dráh, ktoré sú zodpovedné za jednotlivé kroky metastatickej kaskády a umožňujú vznik iniciačnej mikrometastázy zodpovedajú rovnako genetické, ako aj epigenetické zmeny (5). Nádorové bunky sa šíria hlavne cez lymfatické a krvné cievy, a to často dokonca skôr, ako je nádor možné klinicky detegovať, čo dokazuje vysoký metastatický potenciál PDAC (5). Metastatické kolónie pochádzajúce z primárnej lézie nesú okrem vedúcich („driver“) mutácií aj ďalšie pasívne („passenger“) genetické mutácie (6). Celogenómové sekvenovanie primárneho a metastatického nádorového tkaniva neukázalo žiadne špecifické genetické profily zodpovedné za metastázovanie buniek (7). To naznačuje možnú úlohu epigenetických zmien v tomto procese, ktorý je významne asociovaný s epiteliálno-mezenchymálnym prechodom (EMT). Ide o reverzibilný proces dediferenciácie epitelových buniek nádoru, pre ktorý je charakteristická strata medzibunkových spojení a epiteliálnych povrchových markerov (8). Nádorové bunky, ktoré prešli EMT, získavajú vlastnosti nádorových kmeňových buniek, čím sa stávajú odol-

nejšími proti negatívnym vplyvom prostredia, imunitným reakciám organizmu a získavajú vyšší metastatický potenciál spojený s rezistenciou na liečbu. Vykazujú zvýšenú motilitu a invazívnosť, čo je asociované so zvýšenou expresiou mezenchymálnych bunkových markerov (9).

Epigenetická regulácia expresie génov

Epigenetika je veda zaoberajúca sa mitoticky alebo meioticky dedičnými fenotypovými zmenami vo funkcii génov, ktoré nie sú spôsobené zmenami na úrovni sekvencie DNA (10). V súčasnosti sa epigenetika venuje hlavne zmenám, ktoré ovplyvňujú expresiu génov tým, že aktivujú transkripčne neaktívne oblasti, alebo, naopak, zoslabia expresiu aktívne prepisovaných génov. Epigenetický status jednotlivých buniek toho istého tkaniva sa môže výrazne líšiť. Tento jav je často pozorovaný v nádorových tkanivách, kde sa bunky nezávisle prispôbujú podmienkam nádorového mikroprostredia (11). Medzi bunkovo-špecifické epigenetické znaky ovplyvňujúce génovú expresiu patrí modifikácia DNA prostredníctvom metylácie CpG dinukleotidov a modifikácie histónov, ktoré podmieňujú zbalovanie DNA. Posttranskripčná regulácia expresie je zabezpečená malými nekódujúcimi RNA, spomedzi ktorých sú najlepšie preštudované mikroRNA (miRNA) (12).

Metylácia DNA

Metylácia DNA predstavuje chemickú modifikáciu DNA, výsledkom ktorej je zmena - zníženie alebo zvýšenie expresie génov (13). Táto môže viesť k zvýšenej aktivite bežne neaktívnych génov (onkogénov) alebo, naopak, k inhibícii expresie potrebných génov (tumor-supresorov a iných) (14). Pri PDAC boli zmeny metylácie DNA pozorované už v skorých léziách, t. j. PanIN-1A. Približne pri 80 % karcinómov pankreasu bola popísaná nadmerná expresia enzýmu DNMT1, ktorý zohráva kľúčovú úlohu pri metylačných reakciách (15). Pri týchto nádoroch bola pozorovaná nadmerná metylácia promótorov kľúčových tumor-supresorových génov, ako sú *p16*, *PENK* a *RASSF1* (16). Zvýšenie expresie DNMT1 bolo popísané aj pri nádorových

kmeňových bunkách PDAC (17). Zníženie globálnej metylácie DNA bolo asociované so zvýšením expresie génov *SERPINB5*, *CLDN4*, *SFN*, *LCN2*, *TFF2* a *S100P*, ktoré viedlo k početným zmenám v progresii bunkového cyklu, proliferácii, diferenciácii alebo adhézii (18).

Modifikácie histónov

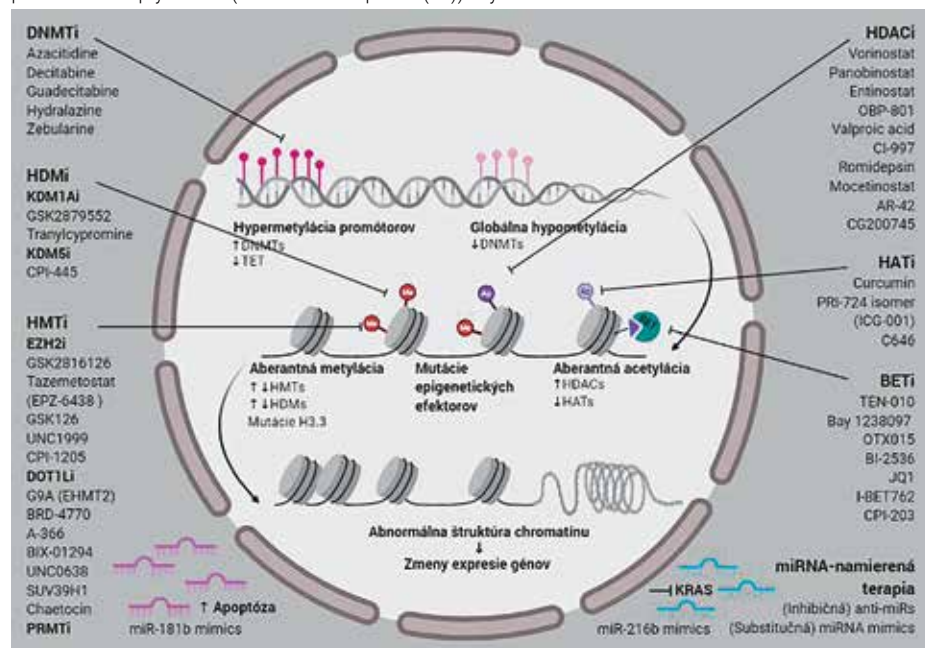
Históny sú kladne nabité proteíny, ktoré sa podieľajú na špiralizácii a zbalovaní DNA tým, že viažu záporne nabitú DNA. V bunkách cicavcov sa na históny pripájajú rôzne sekvencie prostredníctvom posttranslačných modifikácií, ktoré ovplyvňujú náboj a tvar výsledného proteínu (12). Jednou z týchto modifikácií je metylácia histónu, ktorá spôsobí kompaktnejšie zbalenie DNA a jej protikladom je acetylácia, ktorá uvoľňuje usporiadanie nukleozómov. Výsledkom je dynamický a reverzibilný chromatinový systém, ktorý je schopný regulovať transkripciu génov v odpovedi na environmentálne vplyvy (19).

Histón acetyltransferázy (HAT) sú skupinou enzýmov, ktoré sú klasifikované ako transkripčné aktivátory, naopak, histónové deacetylázy (HDAC) sú považované za transkripčné represory (20). Faktory, ktoré reaktivujú aberantné zmeny chromatinu charakteristické pre tumorigenézu, ako napríklad HDAC inhibítory (HDACi), sú v rastúcej miere využívané na liečbu hematologických malignít, ale aj metabolických alebo imunitných porúch (21, 22). Tazemetostat je prvým z tejto skupiny liečiv schváleným na liečbu solídneho nádoru, konkrétne pokročilého epiteloidného sarkómu (23).

MikroRNA

MikroRNA (miRNA) sú malé, 20 až 30 nukleotidov dlhé, nekódujúce RNA, ktoré sa zúčastňujú na posttranskripčnom utlmanní expresie génov (12). miRNA dokáže inhibovať prepis mRNA tým, že sa priamo naviaže na cieľovú sekvenciu daného génu a vytvorí dvojvláknový komplex s RNA, ktorý je následne degradovaný (24). Jedna molekula miRNA má zvyčajne množstvo cieľových mRNA, ktorých sekvencie rozpoznáva a každá mRNA môže byť regulovaná viacerými miRNA (12). Produkcia miRNA môže byť tiež kontrolovaná prostredníctvom me-

Obrázok. Epigenetické zmeny asociované s tumorigenézou a progresiou PDAC a možnosti ich terapeutického ovplyvnenia (modifikované podľa (42)). Vytvorené v BioRender.com.



tylácie alebo modifikácie histónov danej sekvencie DNA, čo dokazuje vzájomnú interakciu jednotlivých epigenetických mechanizmov.

Pri PDAC bolo popísané veľké množstvo aberantne exprimovaných miRNA. Patria k nim miR-20a, miR-21, miR-27a, miR-29c, miR-34, miR-96, miR-141, miR-146a, miR-155, miR-196a, miR-221 a miR-222, miR-200a, miR200b, miR-200c, miR-205, miR-217 alebo miR-429 (25 – 30). Špecifické profily expisie miRNA môžu korelovať s rôznymi štádiami ochorenia a pre ich stabilitu sa miRNA stávajú sľubnými diagnostickými, resp. prognostickými markermi. Pri skorých štádiách PDAC preukázali niektoré z nich lepšiu diagnostickú presnosť ako CA19-9 (31).

Možnosti terapeutického ovplyvnenia epigenetických zmien

Aj keď sa pri liečbe mnohých solídnych nádorov dosiahlo významné zlepšenie, PDAC stále patrí medzi ťažko liečiteľné ochorenia. Medzi hlavné príčiny patrí okrem nedostatku spoľahlivých skorých biomarkerov, nešpecifickej symptomatiky a neexistujúceho skríningu aj hustá, rozptýlená dezmozplastická stróma, heterogenita nádorov so širokým mutačným spektrom, ktorého následkom je nadmerná aktivácia viacerých signálnych dráh. Jedinou potenciálne kurabil-

nou intervenciou je chirurgická liečba s následnou adjuvantnou terapiou, pri ktorej dosahuje miera 5-ročného prežívania 25 % v porovnaní s prežívaním 6 – 10 mesiacov pri konvenčnej liečbe pokročilého ochorenia (32). Štandardná liečba v zmysle samostatnej chemoterapeutickej alebo kombinovanej chemoterapeutickej a rádioterapeutickej intervencie uplatňovanej predovšetkým u pacientov s lokálne pokročilým ochorením alebo metastatickým postihnutím ponúkajú dnes len marginálne riešenia. Väčšina takýchto pacientov reaguje minimálne, alebo dokonca nereaguje na aktuálne aplikované režimy.

Gemcitabín používaný v monoterapii neponúka pacientom výrazné zlepšenie prežívania. V posledných rokoch vyvinutý kombinovaný chemoterapeutický režim FOLFIRINOX (kombinácia kyseliny folínovej, 5-fluorouracilu, irinotekanu, oxaliplatinu) a nab-paklitaxel (paklitaxel naviazaný na albumínové nanočastice) mierne zlepšili prežívanie pacientov s PDAC a kvalitu ich života, avšak ich účinnosť zostáva stále relatívne nízka a používanie týchto režimov je spojené s výraznými nežiaducimi účinkami (33, 34).

Zlyhanie prvej línie chemoterapie vedie navyše k vzniku rezistencie na liečbu (35). Hoci pri niektorých druhoch nádorov vrátane melanómu, urotelového karcinómu, karcinómov hlavy a krku

alebo pľúc dosiahla presvedčivý úspech imunoterapia, v prípade PDAC doteraz všetky snahy o jej úspešné využitie zlyhali (36). Preto pretrvávajú naliehavá potreba vyvinúť nové stratégie na zvýšenie prežívania pacientov s PDAC.

Pri ich navrhovaní predstavuje významné výzvy heterogenita nádorov. Lomberk et al. (13) poskytli prvé poznatky o špecifických zmenách epigenómu spojených s heterogenitou nádorov pacientov s PDAC. Podľa výsledkov tejto štúdie sa zdá, že biológia PDAC je regulovaná špecifickými kombináciami histónových značiek a metylácie DNA v génoch, ktoré sa podieľajú na hlavných karcinogénnych signálnych dráhach vrátane regulácie proliferácie, kontroly apoptózy, bunkového cyklu alebo opravy DNA (napr. RB a TP53, ErbB, IGF, RAS, TGF). Pribúdajúce poznatky z epigenetiky a reverzibilita epigenetických zmien dávajú nádej na reaktiváciu aberantne zníženej expisie tumor-supresorových génov použitím epigenetických inhibítorov (19). Inhibitory DNMT (DNMTi) a HDACi boli pôvodne schválené Úradom pre kontrolu potravín a liečiv (FDA) a Európskou liekovou agentúrou (EMA) na liečbu vybraných hematologických malignít. Vzhľadom na sľubné výsledky boli do nich vkladané značné nádeje aj pre liečbu solídnych nádorov. Napriek pozitívnym výsledkom predklinických štúdií však epigenetické liečivá prvej generácie, predovšetkým DNMTi azacytidín a decitabín a HDACi vorinostat a romidepsín, dosiahli neuspokojivo nízku účinnosť v klinických štúdiách (37). Jedným z možných vysvetlení ich zlyhania je skutočnosť, že viac diferencované solídne nádory s terminálne diferencovanými bunkami majú zníženú schopnosť epigenetického reprogramovania.

Väčšina týchto liečiv je cieleňá na metyláciu DNA a modifikácie histónov prostredníctvom inhibície jednotlivých epigenetických regulátorov. Okrem DNMT a HDAC sú to HAT, HMT a ďalšie proteíny (19). Boli testované v klinických štúdiách v rámci širokého spektra solídnych nádorov vrátane PDAC (obrázok). Aj keď druhá generácia epigenetických liečiv vrátane DNMTi zebularínu a guadecitabínu a HDACi belinostatu, panobinostatu, tucidinostatu (chidamid) a ky-

seliny valproovej preukázala zlepšené chemické vlastnosti, ich nízka účinnosť a značné vedľajšie účinky zabránili ich širšiemu využitiu na liečbu solídnych nádorov.

V súčasnosti však do klinických štúdií vstupuje nová, tretia generácia selektívnych epigenetických liečiv. Túto skupinu tvoria inhibítory brómodomény a extraterminálnej domény (BETi), inhibítory histón metyltransferáz (HMTi) vrátane inhibítora EZH2 a DOT1L, inhibítory histón demetyláz (HDMi) ako napr. KDM1Ai a PRMTi (37). Jedným zo súčasných trendov v liečbe solídnych nádorov je testovanie ich potenciálu modulovať citlivosť nádorov na iné protinádorové látky, ako sú genotoxická a/alebo cytotoxická chemo- a rádioterapia, cieľená terapia, hormonálna terapia a imunoterapia (38).

Primárna a získaná rezistencia na liečbu, fenomén, ktorý je charakteristickým znakom PDAC, môže vzniknúť v dôsledku dynamických a reverzibilných epigenetických zmien, známych ako epigenetická plasticita, ktoré prepožičiavajú nádorovým bunkám selekčnú výhodu (36). V predklinických bunkových modeloch HATi ICG-001 a C646 znížili tumorigénosť buniek PDAC (39, 40). Izomér PRI-724 (ICG-001) sa testuje v klinickom skúšaní pre pokročilý a metastatický PDAC (NCT01764477). Pri hodnotení prínosu inhibície HAT v liečbe pacientov s PDAC sa však dosiahol len malý pokrok. V klinických štúdiách fázy I/II bol testovaný účinok viacerých epigenetických liečiv u pacientov s PDAC, konkrétne EZH2i EPZ-6438, GSK2816126, HATi curcumin, BETi TEN-010, bay 1238097, OTX015 a BI-2536, HDACi vorinostat, panobinostat, entinostat, OBP-801, kyselina valproová, CI-997, romidepsín a moctinostat (obrázok). Hoci monoterapie neboli úspešné, kombinovaná terapia zameraná na rôzne regulátory chromatinu (napr. BETi a HDACi) predstavuje v súčasnosti najslubnejšiu koncepciu pre liečbu PDAC (41).

V súčasnosti existuje aj niekoľko terapeutických prístupov zacielených na miRNA. Antagonisty miRNAs tzv. anti-miRs sú vytvárané s cieľom tlmieť endogénne miRNA, pri ktorých došlo v nádorovom tkanive k patologickému

aktivácii. Najviac používaná stratégia je založená na aplikácii jednovláknových oligonukleotidov s komplementárnou sekvenciou k cieľovej miRNA. Vzhľadom na to, že pri nádorových ochoreniach často pozorujeme globálne zníženie hladín miRNA, pre terapiu je významná druhá, tzv. substitučná stratégia tzv. miRNA mimics. Liečebné prístupy zacielené na miRNA boli študované pri PDAC zatiaľ len experimentálne. Kým miR-216b mimics umožnili potlačenie expície protoonkogénu KRAS v bunkách PDAC *in vitro* (43), miR-181b mimics boli využité na senzitivizáciu nádorových buniek PDAC na liečbu gemcitabínom *in vivo* (44).

Využitie novej generácie epi-liečiv, ich správna kombinácia, dávkovanie a postupnosť by mohli zlepšiť ich doteraz nízku účinnosť a znášanlivosť dosiahnutú v kombinácii s inými typmi protinádorovej terapie v klinických štúdiách. Pre úspech epigenetickej terapie v liečbe PDAC je dôležitá aj identifikácia vysoko-senzitívnych a špecifických biomarkerov potrebná na stratifikáciu pacientov a následnú implementáciu personalizovaných terapeutických stratégií.

Záver

V súčasnosti sa výskum v oblasti nádorových ochorení pankreasu presunul zo skúmania genetických príčin karcinogenézy k štúdiu vonkajších faktorov a regulačných zmien, ktoré neovplyvňujú samotný genóm. Epigenetika ponúka nové prístupy skúmania nádorových ochorení, ktoré zahŕňajú aj interakciu a pôsobenie vonkajších faktorov na vznik a progresiu nádorov. Hlbšie pochopenie úlohy epigenetickej deregulácie v procese tumorigenézy a progresie PDAC by mohlo priniesť objavenie nových, dostatočne senzitivných nádorovo-špecifických epigenetických biomarkerov. Tieto by umožnili detekciu karcinogenézy v skorom, premalígnom štádiu a uplatnili by sa aj pri predikcii invazívnosti a progresie ochorenia. Epigenetické zmeny majú potenciál slúžiť aj ako nové terapeutické ciele pre epigenetické inhibítory zamerané na reaktiváciu aberantnej expície onkogénov a tumor-supresorových génov. Vzhľadom na vysokú chemorezistenciu nádorov PDAC na dostupné terapeutické režimy synergia epi-

genetickej liečby s inou protinádorovou terapiou predstavuje jeden z možných personalizovaných prístupov na zvýšenie prežívania a liečbu pacientov s PDAC.

Podakovanie

Práca bola podporená grantom vedeckej grantovej agentúry VEGA 2/0052/18, projektom Horizont 2020 VISION No. 857381 a projektom NEXt, ERA-NET TRANSCAN-2.

Literatúra

1. Ying H, Dey P, Yao W, et al. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev.* 2016;30(4):355-385.
2. Ducreux M, Cuhna AS, Caramella C, et al. Cancer of the pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2015;26(Suppl 4):56-68.
3. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424.
4. Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell.* 2011;147(2):275-292.
5. Du Y, Liu Z, You L, et al. Advances in understanding the molecular mechanism of pancreatic cancer metastasis. *Hepato-biliary Pancreat Dis Int.* 2016;15(4):361-370.
6. Ramakrishnan S. Sno(RNA)wing and pancreatic cancer metastasis. *Gastroenterology.* 2017;153(1):12-14.
7. Makohon-Moore A, Iacobuzio-Donahue CA. Pancreatic cancer biology and genetics from an evolutionary perspective. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(9):553-565.
8. Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM, et al. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell.* 2012;148(1-2):349-361.
9. Zhang X, Zhang J, Fan H, et al. Risk factors related to metastasis of para-aortic lymph nodes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Medicine.* 2018;97(40):12370.
10. Riggs JE. Differential survival and natural selection: their impact upon aging and cancer mortality. *Mech Ageing Dev.* 1996;92(2-3):111-120.
11. Lu C, Thompson CB. Metabolic regulation of epigenetics. *Cell Metab.* 2012;16(1):9-17.
12. Tammen SA, Friso S, Choi S. Epigenetics: the link between nature and nurture. *Mol Aspects Med.* 2013;34(4):753-764.
13. Lomber G, Blum Y, Nicolle R, et al. Distinct epigenetic landscapes underlie the pathobiology of pancreatic cancer subtypes. *Nat Commun.* 2018;9(1):1978.
14. McCleary-Wheeler AL, Lomber GA, Weiss FU, et al. Insights into the epigenetic mechanisms controlling pancreatic carcinogenesis. *Cancer Lett.* 2013;328(2):212-221.
15. Li A, Omura N, Hong SM, et al. Pancreatic cancer DNMT1 expression and sensitivity to DNMT1 inhibitors. *Cancer Biol Ther.* 2010;9(4):321-329.
16. Hong L, Sun G, Peng L, et al. The interaction between miR-148a and DNMT1 suppresses cell migration and invasion by reactivating tumor suppressor genes in pancreatic cancer. *Oncol Rep.* 2018;40:2916-2925.
17. Zagorac S, Alcalá S, Fernandez Bayon G, et al. DNMT1 Inhibition Reprograms Pancreatic Cancer Stem Cells via Upregulation of the miR-17-92 Cluster. *Cancer Res.* 2016;76(15):4546-4558.
18. Hong SM, Park JY, Hruban RH, et al. Molecular signatures of pancreatic cancer. *Arch Pathol Lab. Med.* 2011;135(6):716-727.
19. Zhao L, Duan Y, Lu P, et al. Epigenetic Targets and their Inhibitors in Cancer Therapy. *Curr Top Med Chem.* 2018;18(28):2395-2419.
20. Du Q, Bert SA, Armstrong NJ, et al. Replication timing and epigenome remodelling are associated with the nature

- of chromosomal rearrangements in cancer. *Nat Commun.* 2019;10(1):416.
21. Kinnaird A, Zhao S, Wellen KE, et al. Metabolic control of epigenetics in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(11):694.
22. Hamamoto R, Nakamura Y. Dysregulation of protein methyltransferases in human cancer: An emerging target class for anticancer therapy. *Cancer Sci.* 2016;107(4):377-384.
23. Bates SE. Epigenetic Therapies for Cancer. *N Engl J Med* 2020;383:650-663.
24. Winter J, Jung S, Keller S, et al. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat cell bio.* 2019;11(3):228-234.
25. Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103(7):2257-2261.
26. Hampton T. MicroRNAs linked to pancreatic cancer. *J Am Med Assoc.* 2007;297:937.
27. Szafranska AE, Davison TS, John J, et al. MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene.* 2007;26:4442-4452.
28. Kawaguchi T, Komatsu S, Ichikawa D, et al. Clinical impact of circulating miR-221 in plasma of patients with pancreatic cancer. *Br J Cancer.* 2013;108(2):361-369.
29. Hong, TH, Park, IY. MicroRNA expression profiling of diagnostic needle aspirates from surgical pancreatic cancer specimens. *Ann Surg Treat Res.* 2014;87(6):290-297.
30. Diaz-Riascos ZV, Ginesta MM, Fabregat J, et al. Expression and Role of MicroRNAs from the miR-200 Family in the Tumor Formation and Metastatic Propensity of Pancreatic Cancer. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2019;17:491-503.
31. Madhavan B, Yue S, Galli U, et al. Combined evaluation of a panel of protein and miRNA serum-exosome biomarkers for pancreatic cancer diagnosis increases sensitivity and specificity. *Int J Cancer.* 2015;136(11):2616-2627.
32. Tomáš M, Pavlendová J, Dolník J, et al. Súčasný trendy chirurgickej liečby karcinómu pankreasu. *Onkológia.* 2015;10(5):291-329.
33. Orth M, Metzger P, Gerum S, et al. Pancreatic ductal adenocarcinoma: Biological hallmarks, current status, and future perspectives of combined modality treatment approaches. *Radiat Oncol.* 2019;14:141.
34. Adamska A, Domenichini A, Falasca M. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Current and Evolving Therapies. *Int J Mol Sci.* 2017;18(7):1338.
35. Juiz, NA, Iovanna J, Dusetti N. Pancreatic Cancer Heterogeneity Can Be Explained Beyond the Genome. *Front Oncol.* 2019;9:246.
36. Kruger S, Ilmer M, Kobold S, et al. Advances in cancer immunotherapy 2019 – Latest trends. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2019;38:268.
37. Grasso C, Jansen G, Giovannetti E. Drug resistance in pancreatic cancer: Impact of altered energy metabolism. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2017;114:139-152.
38. Wilson CL, Mann DA, Borthwick LA. Epigenetic reprogramming in liver fibrosis and cancer. *Adv Drug Deliv Rev.* 2017;121:124-132.
39. Ono H, Basson MD, Ito H. P300 inhibition enhances gemcitabine-induced apoptosis of pancreatic cancer. *Oncotarget.* 2016;7(32):51301-51310.
40. Manegold P, Lai KKY, Wu Y, et al. Differentiation Therapy Targeting the β -Catenin/CBP Interaction in Pancreatic Cancer. *Cancers.* 2018;10(4):95.
41. Hessmann E, Johnsen SA, Siveke JT, et al. Epigenetic treatment of pancreatic cancer: Is there a therapeutic perspective on the horizon? *Gut.* 2017;66(1):168-179.
42. Ciernikova S, Earl J, García Bermejo ML, et al. Epigenetic Landscape in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: On the Way to Overcoming Drug Resistance?. *Int J Mol Sci.* 2020;21(11):4091.
43. Ferino A, Miglietta G, Picco R, et al. MicroRNA therapeutics: design of single-stranded miR-216b mimics to target KRAS in pancreatic cancer cells. *RNA Biol.* 2018;15(10):1273-1285.
44. Cai B, An Y, Lv N, et al. miRNA-181b increases the sensitivity of pancreatic ductal adenocarcinoma cells to gemcitabine in vitro and in nude mice by targeting BCL-2. *Oncol Rep.* 2013;29(5):1769-1776.

*Korešpondujúci autor:

Mgr. Božena Smolková, PhD.

Ústav experimentálnej onkológie, BC SAV
Dúbravská cesta 9, 841 04 Bratislava
bozena.smolkova@savba.sk