

MECCANISMI DI MALATTIA

L'ATEROSCLEROSI È (ANCHE) UNA MALATTIA EPIGENETICA

Atherosclerosis is (also) an epigenetic disease

MAURIZIO ROMANO¹, FRANCISCO ERNESTO BARALLE²¹Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Trieste;²Fondazione Italiana Fegato-Onlus, Bldg. Q, AREA Science Park, Trieste**SUMMARY**

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease that leads to acute cardiovascular events. Despite the efforts to characterize the underlying mechanisms, understanding its complex pathogenesis remains a crucial point for the prevention of cardiovascular diseases (CVDs), still leading cause of mortality worldwide. The crucial role of epigenetic changes in controlling gene expression has been demonstrated in several diseases, such as cancer and inflammatory disorders. Over the last decade, overwhelming evidence support the implication of epigenetic processes (such as DNA methylation, histone modifications and non-coding RNAs) in the development, progression and vulnerability of plaque. Altogether these studies highlight the potential application of epigenetic drugs for the treatment of atherosclerosis.

Keywords: *Atherosclerosis, inflammation, epigenetics, DNA methylation, histone modification, epigenetic drugs.*

Introduzione

Lo sviluppo e la rottura delle placche intimali (ateromi) nelle arterie di medio e grosso calibro sono correlati con l'insorgenza delle patologie coronarica e cerebrovascolare e rappresenta la principale causa di morbilità e mortalità in tutto il mondo (43, 44, 54). È ormai assodato che l'aterosclerosi è una malattia infiammatoria cronica (32, 45). L'alterazione della

permeabilità endoteliale favorisce l'accumulo di lipidi ossidati nella tonaca intima che richiama in quella sede macrofagi ed altre cellule che attivano una risposta infiammatoria cronica che influenza la crescita e l'evoluzione delle placche (52). La comprensione dei meccanismi che regolano comparsa ed evoluzione dell'ateroma è cruciale per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche (33). In questo ambito, è interessante notare come un numero crescente di studi stia dimostrando il coinvolgimento di meccanismi epigenetici nella patogenesi dell'aterosclerosi (28, 38, 56, 62).

L'epigenetica è una branca della biologia molecolare che studia le modificazio-

Indirizzo per la corrispondenza

Francisco E. Baralle, MD, PhD
E-mail: baralle@fegato.it

Maurizio Romano, Ph.D.
E-mail: mromano@units.it

ni dell'espressione genica dipendenti da eventi che non modificano il patrimonio genomico individuale in maniera permanente. Essa è coinvolta nella regolazione di molti processi cellulari come l'inattivazione del cromosoma X nei mammiferi euteriani e nei marsupiali, nel differenziamento cellulare e nel silenziamento dei transposoni (11, 16). I meccanismi epigenetici responsabili della regolazione dell'espressione genica sono la metilazione del DNA, la metilazione ed acetilazione degli istoni, e gli RNA non codificanti. Nell'uomo, sono stati identificati un centinaio di geni sottoposti ad *imprinting genomico* (5). Questo viene prima cancellato nelle cellule germinali, e poi ristabilito principalmente in base al sesso dell'individuo (5). È interessante notare come i fenomeni epigenetici possano essere attivati in risposta a stimoli ambientali, nutrizionali o cronologici, come ritmo circadiano ed invecchiamento. Infine, i meccanismi epigenetici possono causare anche l'insorgenza di malattie genetiche come la Sindrome di Prader-Willi oppure la Sindrome di Angelman (19, 27). Quindi, l'epigenetica permette di adattare la risposta cellulare agli eventi fisiologici in maniere dinamica e reversibile, aprendo la possibilità di identificare farmaci o trattamenti per modificarli. Un numero crescente di ricerche suffraga l'ipotesi che questi processi epigenetici siano coinvolti nell'inizio e nella progressione dell'aterosclerosi. Inoltre, i processi epigenetici, in particolare la modificazione del DNA e degli istoni, hanno specifici "writers" ("scrittori", che introducono segni epigenetici), ed "erasers" ("gomme per cancellare", che rimuovono i segni epigenetici) che modulano l'espressione genica. Poiché i processi epigenetici sono dinamici e reversibili, rappresentano una nuova frontiera di bersagli terapeutici anche per il trattamento dell'aterosclerosi (*Figura 1*).

Meccanismi epigenetici nell'aterosclerosi

Il complesso DNA ed istoni (H2A, H2B, H2B, H3 e H4) forma la cromatina, che è l'unità di base critica per la trascrizione/silenziamento genico, la trasduzione del segnale, la riparazione del DNA, la replicazione del DNA (30). La cromatina può subire un processo di rimodellamento passando da uno stato di condensazione molto compatto (eterocromatina) ad uno stato di conformazione aperta (eucromatina), permettendo ai fattori di trascrizione nucleare oppure alle proteine di accedere al DNA e quindi di alterare l'espressione genica (30). Le modificazioni della cromatina, come la metilazione del DNA e la modificazione degli istoni, sono comuni nelle cellule dei mammiferi. La metilazione del DNA è un evento epigenetico che trasferisce covalentemente un gruppo metilico alle citosine, principalmente sul sito del dinucleotide CpG, causando la repressione trascrizionale. Al contrario, l'ipometilazione del DNA è comunemente osservata nei corpi genici e nelle regioni potenzianti dei geni con trascrizione attiva (28). La modificazione istonica è un altro meccanismo importante di modificazione dello stato della cromatina che regola l'espressione genica a seconda degli effetti equilibrati di "scrittori" e "gomme" epigenetici (28). Studi recenti suggeriscono che la metilazione del DNA e le modificazioni istoniche (in particolare, metilazione ed acetilazione) giocano un ruolo importante nello sviluppo di varie forme di malattie cardiovascolari (18).

È ormai stato assodato che stimoli patologici e fattori di rischio multipli contribuiscono alla complessità dell'aterosclerosi (*Figura 1*). Questi fattori includono i classici fattori di rischio cardiovascolare (iperlipidemia, iperglicemia, iperomoci-

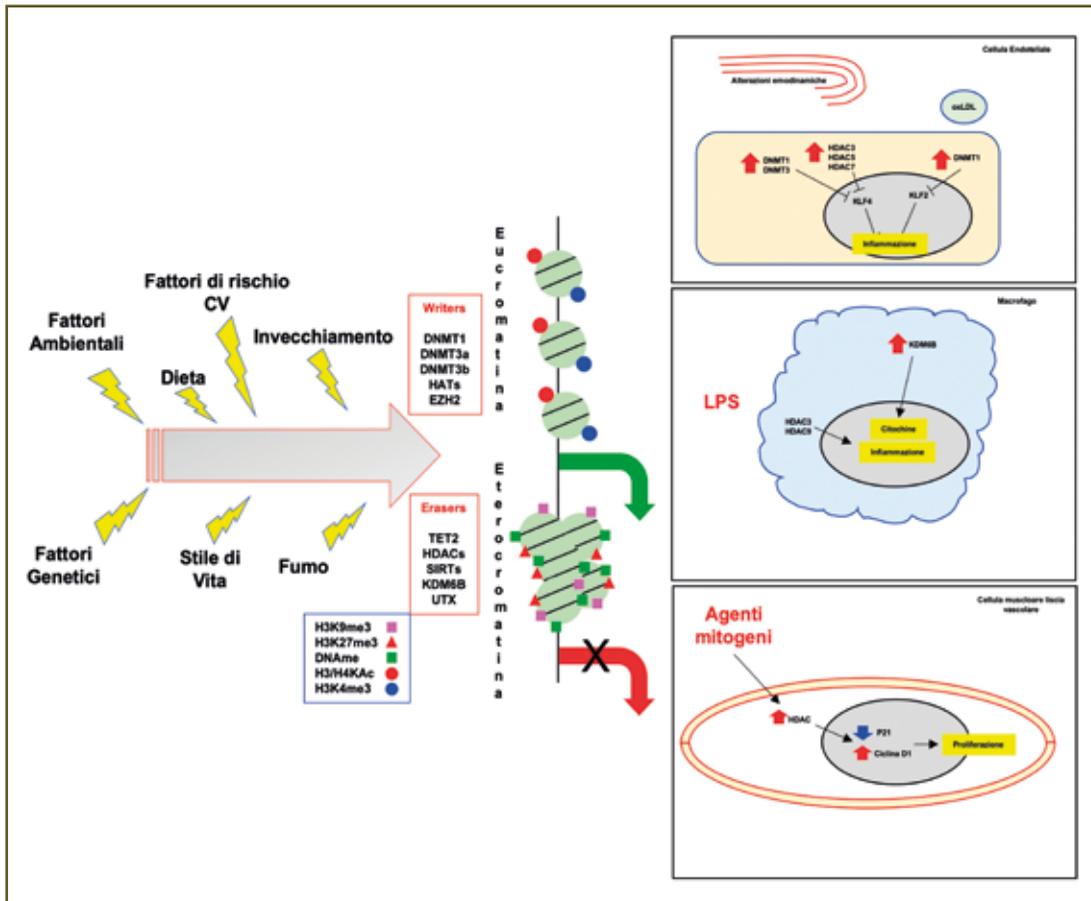


Figura I - Meccanismi e bersagli epigenetici nell'aterosclerosi. I meccanismi epigenetici, come la metilazione del DNA, la metilazione degli istoni e l'acetilazione degli istoni, sono coinvolti nello sviluppo dell'aterosclerosi. Altre forme di modificazioni degli istoni, come fosforilazione, SUMOilazione, ubiquitinazione, e ADP-ribosilazione, così come RNA non codificanti non sono descritti in questa figura. Molteplici stimoli fisiologici, patologici e fattori di rischio (alterazione delle forze emodinamiche, i fattori di rischio cardiovascolare, fumo di sigaretta, fattori alimentari, ambientali, e l'invecchiamento) sono noti regolatori epigenetici che contribuiscono allo sviluppo dell'aterosclerosi. Le modificazioni del DNA e degli istoni vengono esercitate attraverso gli effetti combinati di specifici "writers" (scrittori) ed "erasers" (gomme) dei marcatori epigenetici. Azioni combinate dei writers ed erasers epigenetici determinano lo stato di "apertura" (eucromatina) o "chiusura" (eterocromatina) della cromatina ed il risultato finale dell'espressione genica.

Nelle cellule endoteliali vascolari, l'alterazione del flusso sanguigno laminare e le lipoproteine ossidate a bassa densità (oxLDL) regolano le metiltransferasi del DNA (DNMTs) e le deacetilasi dell'istone (HDACs), che poi reprimono l'espressione dei fattori trascrizionali KLF4 e KLF2.

Il Lipopolisaccaride (LPS) induce nei macrofagi l'espressione del gene KDM6B, che poi stimola la produzione di diverse citochine. Inoltre, le HDAC hanno molteplici ruoli nel controllo dell'infiammazione macrofagica. La regolazione della proliferazione vascolare delle cellule muscolari lisce è controllata dalle HDACs. In seguito all'esposizione ad agenti mitogeni, i livelli di HDAC si elevano e stimolano la proliferazione aumentando i livelli di Cyclin D1 e diminuendo i livelli di P21.

Abbreviazioni: CV, cardiovascolare; DNAm, metilazione del DNA; DNMT, metiltransferasi del DNA; EZH2, Enhancer of zeste homolog 2; H3K4me3, istone 3 lisina 4 trimetilazione; H3K9me3, istone 3 lisina 9 trimetilazione; H3K27me3, istone 3 lisina 27 trimetilazione; HATs, istone acetiltransferasi; HDAC, istone deacetilasi; H3/H4KAc, istone 3 e istone 4 lisina acetilazione; KDM6B, Lysine Demetilasi 6B; Me3, trimetilazione; SIRT, sirtuin; TET2, Ten-Eleven Translocation 2.

steinemia e stress psicologico), alterazioni emodinamiche, e poi fattori ambientali tra cui spiccano il fumo di sigaretta, alimentazione e microbiota intestinale (13, 26, 53). Tra questi, ad esempio, il fumo ha un forte effetto sulla metilazione del DNA su scala genomica, anche dopo l'eventuale cessazione del fumo (7, 15, 40). La metilazione del DNA è catalizzata dalla metiltransferasi del DNA 1 (DNMT1), 3a (DNMT3a) e 3b (DNMT3b), ed è contrastata dalle diossigenasi della metil-citosina appartenenti alla famiglia TET (Ten-Eleven-Translocation, TET1, 2 e 3). Il ruolo della metilazione del DNA nell'aterosclerosi mediato dalle DNMT1 e DNMT3a è stato confermato a più riprese (1, 17, 23). Studi in vitro suggeriscono che la metilazione del DNA è regolata da vie di segnalazione attivate dall'infiammazione (*Figura 1*). Ad esempio, l'esposizione delle cellule endoteliali HUVEC a stimoli proinfiammatori, come le LDL ossidate (oxLDL), causa un aumento dei livelli della proteina DNMT1 ed è associato alla metilazione del promotore del gene Krüppel-like factor 2 (KLF2) (31, 41, 60). Questo gene appartiene ad una famiglia di fattori trascrizionali antinfiammatori, e la sua repressione favorisce l'infiammazione endoteliale pro-aterogena (31, 60). L'effetto delle oxLDL sulla metilazione del gene KLF2 potrebbe essere invertito trattando le cellule endoteliali con 5-azacitidina (5-AZA), un analogo chimico della citosina che blocca l'attività delle DNA-metiltransferasi. Inoltre, è stato dimostrato che l'alterazione del flusso laminare può modificare la metilazione del DNA sortendo un possibile effetto pro-aterogeno. Infatti, riproducendo le alterazioni del flusso laminare su cellule endoteliali in coltura, si è osservato un incremento dei livelli di DNMT1 e DNMT3A e, di conseguenza, ipermetilazione del loro genoma (25, 65). In particolare, la sovraespressio-

ne di DNMT3A è stata associata all'ipermetilazione del promotore del gene KLF4 ed a un aumento dell'infiammazione vascolare (25) (*Figura 1*). Inoltre, è stata osservata ipermetilazione globale del DNA nei linfociti periferici dei pazienti affetti da malattie cardiovascolari ed è stata associata alla promozione dell'attività infiammatoria delle cellule immunitarie innate (48, 49).

È stato osservato che iniezioni intraperitoneali di 5-AZA hanno ridotto il carico di lesioni aterosclerotiche in modelli murini knockout per il recettore delle LDL (Ldlr^{-/-}) (6). Pertanto, il targeting delle vie di metilazione del DNA può rappresentare una strada promettente per la terapia dell'aterosclerosi, similmente a quanto si sta verificando per il trattamento di alcune forme di leucemia con agenti ipometilanti (2, 47) (*Tabella 1*). Tuttavia, sono necessari ulteriori lavori per caratterizzare meglio le alterazioni della metilazione del DNA potenzialmente correlate con la patogenesi dell'aterosclerosi e per capire se il trattamento con gli inibitori della DNMT abbia effetti diversi in fasi distinte della malattia. D'altra parte, ci sono studi che suffragano l'ipotesi che l'enzima TET2 abbia un ruolo protettivo verso lo sviluppo di aterosclerosi, contrastando l'infiammazione attraverso la repressione dell'espressione delle citochine proinfiammatorie (14, 22). È interessante notare come il blocco dell'espressione nella linea ematopoietica o mieloide-specifica della proteina TET2 sia associato con un aggravamento dell'insufficienza cardiaca, attraverso l'attivazione della via di trasduzione del segnale dipendente da NLRP3 (46). Inoltre, uno studio recente su un modello di topi carenti di apolipoproteina E (ApoE^{-/-}) ha confermato che la sovraespressione di TET2 contrasta lo sviluppo dell'aterosclerosi (mentre il suo silenziamento la favorisce), attraverso la modulazione dell'autofagocitosi

Beclin1-dipendente (42). Questi risultati hanno suggerito che anche TET2 possa rappresentare un obiettivo per il trattamento dell'aterosclerosi. Tuttavia, è anche interessante notare come studi recenti non abbiano trovato prove di associazione tra l'emopoiesi clonale indotta da TET2/DNMT3A con malattie cardiovascolari. Va però considerato che sia l'emopoiesi clonale che le malattie cardiovascolari sono condizioni che si associano in maniera importante con l'esposizione al fumo (non sempre considerata negli studi finora pub-

blicati) e sono fortemente correlate all'età (21, 66). Il processo di invecchiamento di un individuo non rispecchia unicamente gli anni trascorsi: anche la dieta, lo stile di vita, l'ambiente e la genetica giocano ruoli importanti. Sulla base di queste considerazioni, questi risultati devono essere interpretati con la dovuta cautela in quanto il numero di individui esaminati era esiguo.

Un secondo importante meccanismo epigenetico è rappresentato dalle modificazioni istoniche (metilazione e acetilazione), che risentono, tra l'altro, del tipo

Tabella I - Farmaci epigenetici ed applicazioni cliniche attuali.

Classe		Composto	Malattia e Fase Clinical Trial
Inibitori DNA metiltransferasi (DNMT)			
	Analoghi Nucleosidici	Azacitidine	AML ^f , MDS ^f , CMML ^f , Tumori solidi ⁱ
		Decitabine	AML ^f , MDS ^f , CMML ^f , Tumori solidi ⁱ
		Guadecitabine (SGI-110)	AML ^f , MDS ^f
		Thio-2'-deoxycytidine (TdCyd)	Tumori solidi ⁱ
	Analoghi Non-Nucleosidici	Hydralazine	Ipertensione ^f , Tumori polmonari ⁱ , Rene policistico ^l
	MG98	Tumori solidi ⁱ	
Inibitori Istone Deacetilasi (HDACi)		Vorinostat (SAHA)	CTCL ^f
			Sarcomi dei Tessuti Molli (STM) ⁱⁱ
			Neimann-Pick disease ⁱⁱⁱ
		Valproate	Toxoplasmosi ^{iv} , schizofrenia ^{iv} , Glycogen storage disease tipo V ⁱⁱ , CLL ^{i/ii} , Metastasi cerebrali ⁱ
Inibitori Metilazione Istonica		Romidepsin	CTCL ^f , Tumori solidi ^f , Linfomi ⁱ
		EPZ-5676	Leucemia ^f
			AML ^f , ALL ^f
Inibitori del Bromodominio (BET)		JQ1	Tumori: polmone, seno, prostata, colon, fegato
		RVX208	Diabete ⁱⁱ , Aterosclerosi ⁱⁱ , Coronaropatie ⁱⁱ , Dislipedime ⁱⁱⁱ , Malattie cardiovascolari ⁱⁱⁱ

Abbreviazioni: f, FDA approved; I, Fase I; II, Fase II; III, Fase III; IV, Fase IV, AML, acute myeloid leukemia; MDS, myelodysplastic syndromes; CMML, chronic myelomonocytic leukemia; CTCL, cutaneous T cell lymphoma; CLL, chronic lymphocytic leukemia; MLL, mixed lineage leukemia.

cellulare (24). La di-metilazione dell'istone H3 sulla lisina 9 (H3K9me2) e la tri-metilazione sulla lisina 27 (H3K27me3) sono segni epigenetici di silenziamento, causando la formazione di eterocromatina. Al contrario, l'acetilazione dell'istone H4 sulla Lisina 16 (H4K16ac) e la trimetilazione dell'istone H3 sulla Lisina 4 (H3K4me3) favoriscono la formazione dell'eucromatina, ed attivano la trascrizione genica (50, 51, 63). Il ruolo delle acetiltransferasi e delle deacetilasi istoniche (HDAC, comprese le sirtuine) nell'aterosclerosi è stato oggetto di studi recenti (64). Sembra che il gene EZH2, coinvolto nella patogenesi delle mielodisplasie, giochi un ruolo importante anche nell'aterosclerosi. Infatti, la sovraespressione di questo gene in topi ApoE-/- favorisce lo sviluppo dell'aterosclerosi. Il meccanismo è associato alla promozione della metilazione del gene trasportatore ATP-binding cassette A1 (ABCA1) DNMT1-dipendente, che favorisce l'accumulo di colesterolo nei macrofagi, promuovendo la formazione di cellule schiumose (35, 57).

Pertanto, considerando la disponibilità di diversi inibitori specifici dell'EZH2 in studi clinici per potenziali terapie antitumorali (29), sarà interessante verificare se questi inibitori dell'EZH2 possano conferire protezione nei confronti dell'aterosclerosi nei modelli animali disponibili.

Infine, miRNA e RNA lunghi non codificanti (lncRNA) stanno emergendo come importanti regolatori epigenetici alla base delle malattie cardiovascolari. I miRNA sono coinvolti sia nella metilazione del DNA che in diverse modificazioni degli istoni (37). Diversi studi hanno dimostrato che gli lncRNA coordinano molti processi regolatori epigenetici che includono modificazioni della cromatina, la metilazione del DNA, la stabilità dell'mRNA e di altri RNA non codificanti (3, 4, 34, 55, 58), po-

tenzialmente associati con la patogenesi dell'aterosclerosi (12). Va sempre tenuto in considerazione che i meccanismi epigenetici non sono indipendenti, ma si influenzano reciprocamente e regolano cooperativamente l'espressione genica nelle cellule vascolari (9, 36).

Potenziale terapeutico cardiovascolare dei farmaci epigenetici

Il coinvolgimento dei meccanismi epigenetici dell'aterosclerosi suggerisce la possibilità di impiegare i farmaci epigenetici attualmente disponibili (o svilupparne di nuovi) per il trattamento dei vari stadi dell'aterosclerosi. Alcuni di questi farmaci epigenetici sono già ampiamente utilizzati nella terapia del cancro o in studi clinici correlati al cancro, come gli inibitori HDAC, i composti che attivano la sirtuina (come il resveratrolo), gli inibitori della metilazione del DNA (come l'azacitidina ed i suoi analoghi nucleosidici), e gli inibitori della metilazione degli istoni (come gli inibitori dell'EZH2) (Tabella 1). Tra questi farmaci epigenetici, gli inibito-

Tabella 2 - Farmaci epigenetici che contrastano l'aterosclerosi.

Farmaco	Categoria Epigenetica
Vitamina C	Attivatore TET2
Azacitidina	Inibitore DNMT
Statine	Inibitore EZH2
SAHA	Inibitore HDAC
Quercetina	Inibitore DNMT
Curcumina	Modulatore ad ampio spettro
EGCG	Inibitore DNMT
Resveratrolo	Attivatore SIRT1

Abbreviazioni: DNMT, DNA methyltransferase; EGCG, epigallocatechin gallate; EZH2, enhancer of zeste homolog 2; HDAC, histone deacetylase; SAHA, suberoylanilide hydroxamic acid; SIRT1, sirtuin 1; TET2, Tet-methylcytosine dioxygenase 2.

ri HDAC (come l'acido idrossimico suberoilamide), la decitabina, ed altri hanno già dimostrato la loro efficacia preclinica nell'attenuare l'aterosclerosi sperimentale (10,39,59). Tuttavia, bisogna tenere conto che alcuni di questi farmaci (come l'azacitidina) possono avere effetti tossici sul lungo termine, per cui andrà valutata la posologia per il trattamento di una malattia cronica come l'aterosclerosi.

Alcuni integratori nutrizionali/fitochimici antiaterosclerotici (come il resveratrolo, la curcumina e l'epigallocatechina gallato) si sono dimostrati promettenti nella modulazione degli enzimi epigenetici nelle cellule vascolari e nell'aterosclerosi (8). È stato dimostrato che le statine riducono l'espressione di EZH2 nelle cellule tumorali (20). Inoltre, è stato segnalato che la vitamina C promuove la demetilazione del DNA mediata da TET (61) (*Tabella 2*).

In conclusione, bisogna ricordare che i diversi tipi di cellule vascolari esprimono in modo diverso le varie isoforme di enzimi "writers" ed "erasers" e che la funzione dell'isoforma specifica può variare a seconda del tipo di cellule. Quindi, l'eventuale trattamento dell'aterosclerosi con farmaci epigenetici dovrà tener conto anche dell'isoforma dell'enzima specifico, nel tipo specifico di cellula endoteliale.

Conclusioni

Considerando che la metilazione del DNA appare frequentemente in sinergia con la modificazione degli istoni, e che le modifiche epigenetiche sono dipendenti da eventi ambientali, nutrizionali e sono legate anche all'invecchiamento, la caratterizzazione del ruolo dell'epigenetica nella patogenesi della aterosclerosi è ancora un processo difficile da realizzare. Fortunatamente, i progressi tecnici negli approcci di biologia dei sistemi come il sequenziamento totale dell'RNA (RNA-seq), RNA-seq a cellule singole, ChIP-seq ed il profilo di metilazione del DNA permetteranno di accumulare ulteriori informazioni e strumenti preziosi per comprendere meglio le alterazioni epigenetiche nell'aterosclerosi.

Alla luce del coinvolgimento dei meccanismi epigenetici in tutte gli stadi dell'aterosclerosi, possiamo prevedere che l'era della terapia epigenetica per questa malattia non è troppo lontana. Sarà possibile identificare terapie per l'aterosclerosi alternative o complementari a quelle esistenti. Pertanto, possiamo prevedere che, nei prossimi anni, un numero crescente di farmaci epigenetici sarà riproposto o sviluppato per il trattamento dell'aterosclerosi.

RIASSUNTO

L'aterosclerosi è una malattia infiammatoria cronica che porta ad eventi cardiovascolari acuti. Nonostante gli sforzi per caratterizzare i meccanismi coinvolti, la comprensione della sua complessa patogenesi rimane alla base della prevenzione delle malattie cardiovascolari (CVD), che restano la principale causa di mortalità a livello mondiale. Il ruolo critico dei cambiamenti epigenetici nel controllo dell'espressione genica è stato dimostrato in diverse patologie, come cancro e malattie infiammatorie. Nell'ultimo decennio, si stanno accumulando numerose evidenze relative al coinvolgimento di processi epigenetici come la metilazione del DNA, le modifiche istoniche e gli RNA non codificanti nello sviluppo, progressione e vulnerabilità della placca, evidenziando la possibilità di sviluppare e impiegare farmaci epigenetici per le terapie cardiovascolari.

Parole chiave: *Aterosclerosi, infiammazione, epigenetica, metilazione del DNA, modifica degli istoni, farmaci epigenetici.*

Bibliografía

1. Aavik E, Babu M, Ylä-Herttuala S. DNA methylation processes in atherosclerotic plaque. *Atherosclerosis*. 2019; 281: 168-179.
2. Agrawal K, Das V, Vyas P, Hajdúch M. Nucleosidic DNA demethylating epigenetic drugs - A comprehensive review from discovery to clinic. *Pharmacol Ther*. 2018; 188: 45-79.
3. Andreou I, Sun X, Stone PH, Edelman ER, Feinberg MW. miRNAs in atherosclerotic plaque initiation, progression, and rupture. *Trends Mol Med*. 2015; 21: 307-318.
4. Aryal B, Rotllan N, Fernández-Hernando C. Noncoding RNAs and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2014; 16: 407.
5. Bajrami E, Spiroski M. Genomic Imprinting. *Open Access Maced J Med Sci*. 2016; 4: 181.
6. Cao Q, Wang X, Jia L, Mondal AK, Diallo A, Hawkins GA, et al. Inhibiting DNA Methylation by 5-Aza-2'-deoxycytidine Ameliorates Atherosclerosis Through Suppressing Macrophage Inflammation. *Endocrinology*. 2014; 155: 4925-4938.
7. de Carvalho LSF. Smoking-epigenetics interaction: What do microRNAs tell us about susceptibility to atherosclerotic disease in smokers? *Atherosclerosis*. 2017; 263: 309-310.
8. Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Treatment of cardiovascular pathology with epigenetically active agents: Focus on natural and synthetic inhibitors of {DNA} methylation and histone deacetylation. *Int J Cardiol*. 2017; 227: 66-82.
9. Dunn J, Simmons R, Thabet S, Jo H. The role of epigenetics in the endothelial cell shear stress response and atherosclerosis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2015; 67: 167-176.
10. Dunn J, Thabet S, Jo H. Flow-Dependent Epigenetic {DNA} Methylation in Endothelial Gene Expression and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015; 35: 1562-1569.
11. Evsikov A V, Marín de Evsikova C. Friend or Foe: Epigenetic Regulation of Retrotransposons in Mammalian Oogenesis and Early Development. *Yale J Biol Med*. 2016; 89: 487-497.
12. Feinberg MW, Moore KJ. MicroRNA Regulation of Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016; 118: 703-720.
13. Forkosh E, Ilan Y. The heart-gut axis: new target for atherosclerosis and congestive heart failure therapy. *Open Hear*. 2019; 6 e000993.
14. Fuster JJ, MacLauchlan S, Zuriaga MA, Polackal MN, Ostriker AC, Chakraborty R, et al. Clonal hematopoiesis associated with TET2 deficiency accelerates atherosclerosis development in mice. *Science (80)*. 2017; 355: 842-847.
15. Gao X, Jia M, Zhang Y, Breitling LP, Brenner H. DNA methylation changes of whole blood cells in response to active smoking exposure in adults: a systematic review of DNA methylation studies. *Clin Epigenetics*. 2015; 7: 113.
16. Gendrel A-V, Heard E. Noncoding RNAs and Epigenetic Mechanisms During X-Chromosome Inactivation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014; 30: 561-580.
17. Greißel A, Culmes M, Napieralski R, Wagner E, Gebhard H, Schmitt M, et al. Alternation of histone and DNA methylation in human atherosclerotic carotid plaques. *Thromb Haemost*. 2015; 114: 390-402.
18. van der Harst P, de Windt LJ, Chambers JC. Translational Perspective on Epigenetics in Cardiovascular Disease. *J Am Coll Cardiol*. 2017; 70: 590-606.
19. Iglesias-Platas I, Monk D. Nongenomic regulation of gene expression. *Curr Opin Pediatr*. 2016; 28: 521-528.
20. Ishikawa S, Hayashi H, Kinoshita K, Abe M, Kuroki H, Tokunaga R, et al. Statins inhibit tumor progression via an enhancer of zeste homolog 2-mediated epigenetic alteration in colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2014; 135: 2528-2536.
21. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, et al. Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. *N Engl J Med*. 2014; 371: 2488-2498.
22. Jaiswal S, Natarajan P, Silver AJ, Gibson CJ, Bick AG, Shvartz E, et al. Clonal Hematopoiesis and Risk of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *N Engl J Med*. 2017; 377: 111-121.
23. Jiang D, Sun M, You L, Lu K, Gao L, Hu C, Wu S, et al. DNA methylation and hydroxymethylation are associated with the degree of coronary atherosclerosis in elderly patients with coronary heart disease. *Life Sci*. 2019; 224: 241-248.
24. Jiang W, Agrawal D, Boosani C. Cell specific histone modifications in atherosclerosis (Review). *Mol Med Rep*. 2018.
25. Jiang YZ, Jiménez JM, Ou K, McCormick ME, Zhang L Di, Davies PF. Hemodynamic disturbed flow induces differential DNA methylation of endothelial Kruppel-like factor 4 promoter in vitro and in vivo. *Circ Res*. 2014; 115: 32-43.
26. Jonsson AL, Bäckhed F. Role of gut microbiota in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*. 2017; 14: 79-87.
27. Kalish JM, Jiang C, Bartolomei MS. Epigenetics and imprinting in human disease. *Int J Dev Biol*. 2014; 58: 291-298.
28. Khyzha N, Alizada A, Wilson MD, Fish JE. Epigenetics of Atherosclerosis: Emerging Mecha-

- nisms and Methods. *Trends Mol Med.* 2017; 23: 332-347.
29. Kim KH, Roberts CW. Targeting EZH2 in cancer. *Nat Med.* 2016; 22: 128-134.
 30. Kouzarides T. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell.* 2007; 128: 693-705.
 31. Kumar A, Kumar S, Vikram A, Hoffman TA, Naqvi A, Lewarchik CM, et al. Histone and DNA methylation-mediated epigenetic downregulation of endothelial Kruppel-like factor 2 by low-density lipoprotein cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013; 33: 1936-1942.
 32. Leoni M, Gorini A. [Atherosclerosis, chronic inflammation and oxidative stress in CKD]. *G Ital Nefrol.* 2017; 34 (Suppl 69): 142-149.
 33. Libby P, Tabas I, Fredman G, Fisher EA. Inflammation and its Resolution as Determinants of Acute Coronary Syndromes. *Circ Res.* 2014; 114: 1867-1879.
 34. Liu Y, Zheng L, Wang Q, Hu Y-W. Emerging roles and mechanisms of long noncoding RNAs in atherosclerosis. *Int J Cardiol.* 2017; 228: 570-582.
 35. Lv Y-C, Tang Y-Y, Zhang P, Wan W, Yao F, He P-P, et al. Histone Methyltransferase Enhancer of Zeste Homolog 2-Mediated ABCA1 Promoter DNA Methylation Contributes to the Progression of Atherosclerosis. *PLoS One.* 2016; 11 e0157265.
 36. Man H-SJ, Yan MS, Lee JJ, Marsden PA. Epigenetic determinants of cardiovascular gene expression: vascular endothelium. *Epigenomics.* 2016; 8: 959-979.
 37. Morales S, Monzo M, Navarro A. Epigenetic regulation mechanisms of microRNA expression. *Biomol Concepts.* 2017; 8: 203-212.
 38. Neele AE, Van den Bossche J, Hoeksema MA, de Winther MPJ. Epigenetic pathways in macrophages emerge as novel targets in atherosclerosis. *Eur J Pharmacol.* 2015; 763: 79-89.
 39. Nicorescu I, Dallinga GM, de Winther MPJ, Stroes ESG, Bahjat M. Potential epigenetic therapeutics for atherosclerosis treatment. *Atherosclerosis.* 2019; 281: 189-197.
 40. Nielsen CH, Larsen A, Nielsen AL. DNA methylation alterations in response to prenatal exposure of maternal cigarette smoking: A persistent epigenetic impact on health from maternal life-style? *Arch Toxicol.* 2016; 90: 231-245.
 41. Patel R, Varghese JF, Singh RP, Yadav UCS. Induction of endothelial dysfunction by oxidized low-density lipoproteins via downregulation of Erk-5/Mef2c/KLF2 signaling: Amelioration by fisetin. *Biochimie.* 2019; 163: 152-162.
 42. Peng J, Yang Q, Li A-F, Li R-Q, Wang Z, Liu L-S, et al. Tet methylcytosine dioxygenase 2 inhibits atherosclerosis via upregulation of autophagy in ApoE^{-/-} mice. *Oncotarget.* 2016; 7: 76423-76436.
 43. Rader DJ, Daugherty A. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature.* 2008;451(7181):904-913.
 44. Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Doudi M, Baradaran A, Nasri H. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *Int J Prev Med.* 2014; 5: 927-946.
 45. Raggi P, Genest J, Giles JT, Rayner KJ, Dwivedi G, Beanlands RS, Gupta M. Role of inflammation in the pathogenesis of atherosclerosis and therapeutic interventions. *Atherosclerosis.* 2018; 276: 98-108.
 46. Sano S, Oshima K, Wang Y, MacLauchlan S, Katanasaka Y, Sano M, et al. Tet2-Mediated Clonal Hematopoiesis Accelerates Heart Failure Through a Mechanism Involving the IL-1 β /NLRP3 Inflammasome. *J Am Coll Cardiol.* 2018; 71: 875-886.
 47. Sato T, Issa J-PJ, Kropf P. DNA Hypomethylating Drugs in Cancer Therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017; 7: a026948.
 48. Sharma P, Garg G, Kumar A, Mohammad F, Kumar SR, Tanwar VS, et al. Genome wide DNA methylation profiling for epigenetic alteration in coronary artery disease patients. *Gene.* 2014; 541: 31-40.
 49. Sharma P, Kumar J, Garg G, Kumar A, Patowary A, Karthikeyan G, et al. Detection of Altered Global DNA Methylation in Coronary Artery Disease Patients. *DNA Cell Biol.* 2008; 27: 357-365.
 50. Smith E, Shilatifard A. The Chromatin Signaling Pathway: Diverse Mechanisms of Recruitment of Histone-Modifying Enzymes and Varied Biological Outcomes. *Mol Cell.* 2010; 40: 689-701.
 51. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature.* 2000; 403: 41-45.
 52. Tabas I, García-Cardena G, Owens GK. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *J Cell Biol.* 2015; 209: 13-22.
 53. Tilg H, Moschen AR. Food, immunity, and the microbiome. *Gastroenterology.* 2015; 148: 1107-1119.
 54. Townsend N. Epidemiology of Atherosclerotic Cardiovascular Disease [Internet]. In R. Vasan & DS, editor. *Encyclopedia of Cardiovascular Research and Medicine.* Elsevier. 248-257.
 55. Wang Y, Song X, Li Z, Liu B. Long non-coding RNAs in coronary atherosclerosis. *Life Sci.* 2018; 211: 189-197.
 56. Wierda RJ, Geutskens SB, Jukema JW, Quax PHA, van den Elsen PJ. Epigenetics in atherosclerosis and inflammation. *J Cell Mol Med.* 2010; 14: 1225-1240.

57. Xiaoling Y, Li Z, ShuQiang L, Shengchao M, Anning Y, Ning D, et al. Hyperhomocysteinemia in ApoE^{-/-} Mice Leads to Overexpression of Enhancer of Zeste Homolog 2 via miR-92a Regulation. *PLoS One*. 2016; 11: e0167744.
58. Xu S, Kamato D, Little PJ, Nakagawa S, Pelisek J, Jin ZG. Targeting epigenetics and non-coding RNAs in atherosclerosis: from mechanisms to therapeutics. *Pharmacol Ther*. 2019; 196: 15-43.
59. Xu Y, Xu S, Liu P, Koroleva M, Zhang S, Si S, Jin ZG. Suberanilohydroxamic Acid as a Pharmacological Kruppel-Like Factor 2 Activator That Represses Vascular Inflammation and Atherosclerosis. *J Am Heart Assoc*. 2017; 6.
60. Yan Z, Deng Y, Jiao F, Guo J, Ou H. Lipopolysaccharide Downregulates Kruppel-Like Factor 2 (KLF2) via Inducing DNMT1-Mediated Hypermethylation in Endothelial Cells. *Inflammation*. 2017; 40: 1589-1598.
61. Yin R, Mao S-Q, Zhao B, Chong Z, Yang Y, Zhao C, et al. Ascorbic Acid Enhances Tet-Mediated 5-Methylcytosine Oxidation and Promotes {DNA} Demethylation in Mammals. *J Am Chem Soc*. 2013; 135: 10396-10403.
62. Zhang B-K, Lai X, Jia S-J. Epigenetics in atherosclerosis: a clinical perspective. *Discov Med*. 2015; 19: 73-80.
63. Zhang Y, Reinberg D. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev*. 2001; 15: 2343-2360.
64. Zheng X, Zhou T, Wang X-A, Tong X, Ding J. Histone deacetylases and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2015; 240: 355-366.
65. Zhou J, Li Y-S, Wang K-C, Chien S. Epigenetic Mechanism in Regulation of Endothelial Function by Disturbed Flow: Induction of DNA Hypermethylation by DNMT1. *Cell Mol Bioeng*. 2014; 7: 218-224.
66. Zink F, Stacey SN, Norddahl GL, Frigge ML, Magnusson OT, Jonsdottir I, et al. Clonal hematopoiesis, with and without candidate driver mutations, is common in the elderly. *Blood*. 2017; 130: 742-752.