

*Opšti pregledi/
General reviews*

OSNOVNI EPIGENETSKI MEHANIZMI
KANCERA

BASIC EPIGENETIC MECHANISMS
OF CANCER

Correspondence to:

Gordana Šupić, PhD,
Molecular Biologist, Assistant Professor,
Military Medical Academy School for Advanced
Studies, Researcher, Institute for Medical
Research, Military Medical Academy,
Crnotravska 17, 11002 Belgrade, Serbia
tel. +381 11 3608447; fax. +381 11 2662722
E-mail: gogasupic@sezampro.rs

Gordana Šupić¹, Zvonko Magić¹

¹Institute for Medical Research, Military Medical Academy,
Crnotravska 17, 11002 Belgrade, Serbia

Abstract

Epigenetic modifications are heritable changes in gene expression that are not coded in the DNA sequence. Recently investigations showed that the number of cancer-related genes that are inactivated by epigenetic modifications equals or even exceeds the number of genes inactivated by mutations. Major mechanisms of epigenetic control in mammals are DNA methylation, histone modifications and RNA interference (RNA silencing). The key epigenetic modification in mammals is the DNA methylation of cytosine located 5' to guanosine in a CpG dinucleotide. Cytosine methylation of "CpG islands" in the promoters of tumor suppressor genes, causes their inactivation, transcriptional silencing and malignant transformation. Posttranslational modifications of histones are important in transcriptional regulation. Different combinations of histone modifications and histone variants modulate chromatin structure and transcription, and this epigenetic information is referred as "histone code". Newer investigations revealed an emerging role of non-coding RNAs in epigenetic regulation of the gene expression in translational inhibition or degradation of the mRNA. Since epigenetic changes are early events in malignant transformation, perspectives of epigenetic researches in molecular medicine are focused toward early and non-invasive cancer diagnostics, as well as prediction and introduction of epigenetic therapy.

Ključne reči

Epigenetika, Kancer,
DNK metilacija,
modifikacije histona,
regulatorne RNK

Key words

Epigenetics, Cancer,
DNA methylation,
Histone modifications,
regulatory RNAs

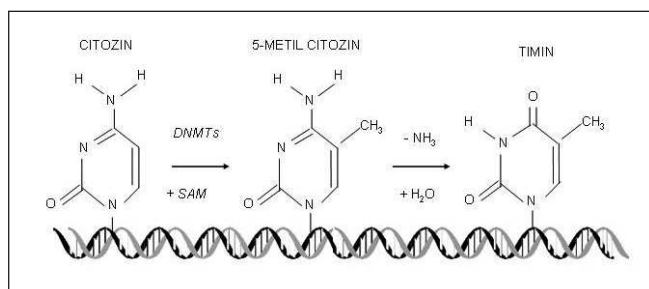
*MEHANIZMI EPIGENETSKE REGULACIJE
GENSKE EKSPRESIJE*

Poslednjih godina istraživanja kancerogeneze su utvrdila da je broj gena koji podležu epigenetskoj inaktivaciji čak i veći od broja gena koji su inaktivisani mutacijama (1, 2). Epigenetske promene su stabilne promene genske ekspresije, bez promena primarne nukleotidne sekvence (3, 4). Ove promene su mitotski nasledne i potencijalno reverzibilne, što otvara velike mogućnosti za uvođenje epigenetske terapije.

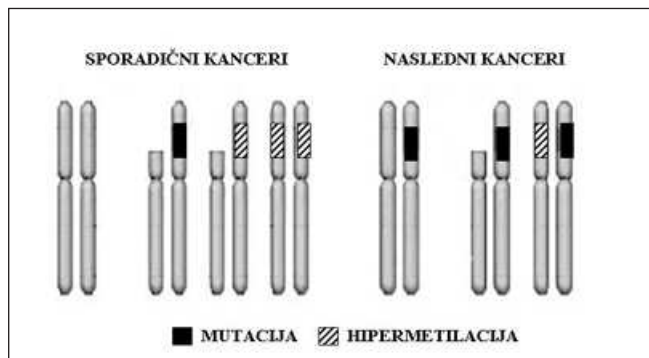
Glavni mehanizmi epigenetske regulacije su metilacija DNK, modifikacije histona i uticaj regulatornih nekodirajućih RNK na gensku ekspresiju (5). Po prvobitnoj hipotezi DNK metilacija je smatrana prvim i neophodnim uslovom za epigenetsko utišavanje gena, međutim, novija saznanja o učešću modifikacije histona u regrutovanju DNK metiltransferaza, sugerišu da je inicijacija epigenetskog utišavanja kompleksno regulisana i da se mehanizmi međusobno prepliću.

DNK METILACIJA

DNK metilacija održava veliki deo nekodirajuće DNK u ćelijama viših organizama u transkripciono inertnom stanju i osigurava kasnu replikaciju. Na ovaj način DNK metilacija sprečava transkripciju velikih delova genoma koji bi mogli narušiti integritet ćelije (repetitivne sekvence, insertovane virusne sekvence, transpozoni), omogućava inaktivaciju jednog X hromozoma kod ženskog pola, omogućava alelsku ekskluziju kod B limfocita i imprinting gena kod kojih je samo jedan alel ekspimiran u normalnom tkivu. Ključna epigenetska modifikacija kod sisara je DNK metilacija citozina lociranog uzvodno (5') od guanina u CpG dinukleotidu, do koje dolazi nakon replikacije. U reakciji kovalentne modifikacije citozina u metil-citozin donor metil grupe je S-adenozil metionin (3), a enzimi koji katalizuju ovu reakciju je familija enzima DNK-metiltransferaza (DNMT) (Slika 1).



Slika 1. Mehanizam metilacije citozina i deaminacije u timin.



Slika 2. Genetski i epigenetski mehanizmi koji inaktiviraju tumor supresorske gene.

Učestalost CpG dinukleotida u genomu je daleko ređa nego što bi se moglo matematički predvideti, oko 2-5%. Tokom evolucije dolazilo je do progresivne eliminacije CpG dinukleotida, jer je metilovan citozin podložan spontanoj hidrolitičkoj deaminaciji u timidin. Ako ova mutacija ne bude otklonjena reparacionim mehanizmima dolazi do nukleotidne tranzicije i C→T tranzicija je najčešći vid genetskog polimorfizma u humanoju populaciji. Time je hipermetilacija i predispozicija za mutacije, pa se često i označava kao paramutacija. Distribucija CpG dinukleotida u genomu je neravnomerna i ovi dinukleotidi su grupisani u takozvana CpG ostrvca (engl. "CpG islands"), regione dužine 0.5 do 4 kb. Ovi regioni su najčešće zastupljeni na mestima početka transkripcije, gde oko 50% gena u okviru promotora ima CpG ostrvca. Većina, oko 80% CpG dinukleotida koji nisu u okviru ostrvaca su metilovani, dok su u okviru ostrvca promotora gena CpG dinukleotidi nemetilovani, bez obzira na to da li je taj gen transkribovan (4, 6).

Po Knudsonovom "two-hit" modelu do narušene funkcije tumor supresorskog gena i maligne transformacije ćelije dolazi pri gubitku obe kopije gena. Kod naslednih karcinoma do mutacija u kodirajućem regionu jednog alela dolazi u germinativnim ćelijama, a kod sporadičnih karcinoma u somatskim ćelijama (Slika 2.). Drugi događaj, kojim će biti isključen drugi alel, može biti genska mutacija, delecija čime dolazi do gubitka heterozigotnosti (loss of heterozygosity, LOH), ili epigenetska promena metilacija. Epigenetske promene su veoma čest događaj (7, 8) i mogu dovesti do inaktivacije jedne ili obe kopije gena nezavisno od drugih genetskih promena. Dok je verovatnoća pojave bialelne mutacije veoma mala, bialelna metilacija je relativno čest događaj (4) (Slika 2).

Epigenetske promene imaju skoro identične biološke efekte i obrazac genske ekspresije kao genetske promene. *Microarray* studije su pokazale da je profil genske ekspresije sporadičnih kancera dojke sa hipermetilovanim promotorom gena BRCA1 identičan sa naslednim karcinomima kod kojih je BRCA1 mutiran (9, 10).

Pokazano je da je hipermetilacija jedan od osnovnih vidova inaktivacije DNK reparacionih gena (*hMLH1*, *MGMT*, *VHL*, *WRN*, *BRCA1*), gena regulatora ćelijskog ciklusa (*p16INK4a*, *p15INK4b*, *p14ARF*, *Rb*), gena odgovornih za adheziju ćelija (*CDH1 (E-kadherin)*, *CDH13*, *APC*), apoptozu (*DAPK*), detoksifikaciju (*GSTP1*), hormonalni odgovor (*RARB2*, *ER*) (11).

Za svaki tip kancera može se definisati set gena koji su podložni metilaciji, tzv. metilacioni profil, *metilotip* (12). Obrazac hipermetilacije CpG ostrvaca promotora tumor supresorskih gena je opisan kod svih tipova tumora i pokazuje specifičnost vezanu za tip tumora i tkiva (13). Tokom procesa kancerogeneze dolazi do simultane globalne hipometilacije i regionalne hipermetilacije, što se označava kao *metilacioni paradoks* (1). *Globalna hipometilacija* može dovesti do aktivacije latentnih virusa ili onkogeni. Prvobitno je smatrano da hipometilacija CpG ostrvaca u promotorima onkogeni dovodi do njihove aktivacije, međutim utvrđeno je da su u normalnim ćelijama promotori protoonkogeni nemetilovani, a da tokom kancerogeneze dolazi do hipometilacije na izolovanim CpG dinukleotidima rasutim duž genoma, dok CpG ostrvca podležu hipermetilaciji (14). Utvrđena je hipometilacija onkogeni H-ras, K-ras i c-myc kod različitih tipova tumora, bcl-2 u B-ćelijskoj hroničnoj limfocitnoj leukemiji, R-ras kod karcinoma želuca (1, 2). Globalna hipometilacija genoma može aktivirati repetitivne elemente, retrotranspozone (Line-1, Alu), mikrosatelitnu DNK ili pericentromerni region hromozoma, što narušava stabilnost genoma i dovodi do hromozomskih rearanžmana (2). *Regionalna hipermetilacija* tumor supresorskih gena dovodi do njihove inaktivacije, transkripcionog utišavanja i maligne transformacije (1). U odnosu na DNK hipermetilaciju može se reći da postoje dve vrste promotora tumor supresorskih gena: promotori sa retkim i pojedinačnim CpG dinukleotidima i promotori sa CpG ostrvcima. Za razliku od CpG-siromašnih promotora, kod gena čiji promotori imaju CpG ostrvca u normalnim, fiziološkim stanjima metilacija ne učestvuje u regulaciji genske transkripcije, bez obzira da li su geni aktivno transkribovani ili ne. Ova ostrvca leže u regionima hromatina sa neregularno i razučeno postavljenim nukleozomima, koji sadrže acetilovane histone i metilovan lizin 4 na histonu H3 (K4H3). Ovakvo stanje hromatina i acetilacija histona olakšava pristup promotoru kompleksima aktivacije transkripcije. Kompleks aktivacije transkripcije sadrži transkripcioni faktor, koaktivator i histon acetiltransferaze (HAT), koje vrše acetilaciju histona, karakteristiku aktivnog hromatina (15).

Kod ćelija kancera aktivnošću DNK metiltransferaza dolazi do metilacije CpG ostrvaca, što dovodi do vezivanja metil-citozin vezujućih proteina (MBP, MeCP). MBP prepoznaju i vezuju se za metilovanu DNK preko metil-vezujućeg domena (methyl-binding domain, MBD), a preko drugog domena (transcriptional repression domain, TRD) inhibiraju transkripciju. Vezivanjem za hipermetilovanu DNK MBP regrutuju druge proteine na mesta represije transkripcije, kao što su histon deacetilaze (HDAC) i specifične histon metiltransferaze (HMT), familiju enzima koja reprimira transkripciju metilacijom lizina 9 na H3. Formiranjem kompleksa MBP sa hromatin-remodelujućim proteinima dolazi do dugotrajne represije transkripcije tumor supresorskih gena kod ćelija kancera. Deacetilaze his-

tona deacetiluju rezidue lizina u histonskim repovima, što dovodi do kompaktnijeg postavljanja nukleozoma. Time je sprečeno vezivanje kompleksa aktivacije transkripcije, usled čega samo metilacija u promotoru može dovesti do utišavanja gena, dok metilacija unutar gena nema uticaja na transkripciju (4).

DNK METILTRANSFERAZE

DNK-metiltransferaze (DNMT) su familija enzima koji katalizuju metilaciju citozina u okviru CpG dinukleotida. DNMT1 je nukleusni protein koji je difuzno lokalizovan u nukleoplazmi tokom G1 i G2 faze ćelijskog ciklusa, dok je tokom S faze povezan sa mestima replikacije, što ukazuje na povezanost metilacije i replikacije. Dok su DNMT3A i DNMT3B uglavnom uključeni u aktivnu *de novo* metilaciju, DNMT1 je uključena u održavanje DNK metilacije nakon replikacije. DNMT1 ima 5 do 50 puta veći afinitet za vezivanje za hemimetilovanu DNK i katališe transfer metil grupe na novonastali lanac DNK, 'ćerka' lanac (3). DNMT3a i DNMT3b i dovode do *de novo* metilacije novo integrisanih parazitskih DNK sekvenci, katalizuju *de novo* metilaciju tokom embriogeneze ili tumorigeneze (11, 13). Knockout vrste za bilo koju od DNMT su letalne. Nekoliko studija je pokazalo veću ekspresiju DNMT u većem broju tipova kancera (13, 9, 10). Kod karcinoma pluća nivo prekomerne ekspresije DNMT1 direktno korelira sa lošom prognozom (16). Analiza različitih tipova DNMT u knockout ćelijskim kulturama je pokazala da ovi enzimi interaguju i međusobno (2, 17), kao i sa drugim enzimima koji mogu modifikovati hromatin, kao što su deacetilaze histona i metil-citozin vezujući proteini.

MODIFIKACIJE HISTONA I "HISTONSKI KOD"

Histoni imaju dinamičku ulogu u regulaciji strukture hromatina i genske aktivnosti. Oni mogu biti modifikovani acetilacijom, metilacijom, fosforilacijom, sumoilacijom, ubikvitinizacijom, poli poly-ADP ribozilacija i glikolizacija, čime je omogućena fina regulacija strukture hromatina i njegova dostupnost transkripcionim faktorima (3). DNK metilacija i modifikacije histona nisu nezavisni događaji, već su koordinisani i visoko organizovani mahanizmi regulacije. Metilacija citozina u okviru CpG ostrvaca dovodi do vezivanja metil-citozin vezujućih proteina (MBP), regrutovanja histon deacetilaza (HDAC) i histon metiltransferaza (HMT) i modifikacija histona. Modifikacioni status histonskih repova je ključan za regrutovanje faktora koji dovode do organizovanja heterohromatina. Specifične kombinacije modifikacija histona u regionu hromatina određuju interakciju između histona i DNK, kao i ne-histonskih proteina sa hromatinom i ova epigenetska informacija se označava kao "histonski kod" (18). Još uvek nije precizno utvrđeno kako regioni koji okružuju CpG ostrvaca predstavljaju funkcionalnu granicu širenja metilacije, međutim novija istraživanja pokazuju da i *histonski kod* učestvuje u "usmeravanju" metilacije na određene regione DNK i razlikovanje i razdvajanje transkripciono aktivnog od inaktivnog hromatina (15, 3). Ovo ukazuje da postoji sinergija između mehanizama DNK metilacije i modifikacija histona, odnosno *histonskog koda*.

Acetilacija histona

Acetilacija N-kraja rezidua histona, koje vrše histon-acetilaze (HAT), je dovedena u vezu sa regionima sa aktivnom transkripcijom. Acetilacija neutrališe naelektrisanje lizina i oslobađa histonski rep od heliksa DNK, što omogućava dostupnost transkripcionim faktorima. Transkripcionalna aktivacija je indukovana acetilacijom lizina na histonima H2A (K5), H2B (K5, 12, 15, 20), H3 (K4, 14, 18, 23, 27), H4 (K5, 8, 12, 16) (3). Suprotan proces deacetilacije histona, koju katališe histon deacetilaze HDAC, dovodi do kondenzacije hromatina i supresije transkripcije DNK. U deacetilovanom stanju, amino grupe lizina su pozitivno naelektrisane i omogućavaju histonskim repovima da čvrsto interaguju sa negativno naelektrisanim DNK lancem (3).

Narušena acetilacija i deacetilacija ima ulogu u narušenoj regulaciji genske ekspresije u različitim tipovima kancera (19). Narušen nivo HDAC koji dovodi do smanjene genske ekspresije opisan je kod leukemija i limfoma (20), kao i u ćelijskim linijama pacijenata sa akutnom promijelocitnom leukemijom (21). Pokazano je da deacetilacija histona može biti mehanizam utišavanja tumor supresorskih gena, kao što je p53 (22) i gena inhibitora ciklin-zavisnih kinaza, kao što su p21 i p16 (23).

Metilacija histona

Za razliku od acetilacije histona koja dovodi do aktivacije, metilacija histona može imati aktivirajući ili reprimirajući efekat u zavisnosti od tipa aminokiseline koja je modifikovana, kao i od njene pozicije na histonskom repu. Metilacija rezidua četvrtog lizina na histonu H3 (H3K4) i sedamnaestog arginina na histonu H3 (H3R17) i trećeg arginina na histonu H4 (H4R3) dovodi do transkripcionalne aktivacije. Metilacija devetog lizina na histonu H3 (H3K9) dovodi do transkripcionalne represije, kao i H3K27, H3K36, H4K20, H4K59. Metilacija histona ne dovodi do promene naelektrisanja histonskog repa, već utiče na hemijske osobine histona i afinitet vezivanja za transkripcione faktore i druge regulatorne molekule (3).

Histon metiltransferaze (HMT) su enzimi koji specifično vrše prenos metil grupe sa S-adenozilmetionina (SAM) na residue arginina ili lizina histona. Suprotan proces demetilacije histona katalizuju specifične histon demetilaze (HDM). Većina HMT najverovatnije ima funkciju tumor supresora, dok većina demetilaza deluje kao onkogeni, mada se precizna uloga pojedinačnih proteina ovih velikih familija još uvek utvrđuje (14, 3).

NEKODIRAJUĆE RNK

Novija istraživanja pokazuju veoma važnu ulogu nekodirajućih RNK (non-coding RNA, ncRNA) u epigenetskoj regulaciji genske ekspresije. Eukariotske nekodirajuće RNK predstavljaju veoma heterogenu grupu transkripata koje se razlikuju kako po veličini, tako i po biogenezi i mehanizmima aktivnosti. Dužina "zrelih" ncRNA variraju od oko 18 nukleotida, kolike mogu biti mikro RNK, do preko 100 kb dugih transkripata, koji su uključeni u regulaciju imprintinga kod sisara (3). Nekodirajuće RNK mogu biti transkribovane sa nezavisnih transkripcionih jedinica, ali mogu nastati i isecanjem tokom obrade primarnog transkripta, odnosno

isecanja intronskih sekvenci (3, 14). Nekodirajuće RNK sa regulatornom aktivnošću, gde pripadaju mikro RNK (miRNA), short interfering (siRNA), small hererochromatic (shRNA), small temporal RNA (stRNA), imaju ključnu ulogu u inaktivaciji gena inhibicijom translacije ili degradacijom transkripta (*RNA interference*, *RNA silencing*) (3). Duže siRNA se potpuno sparuju sa ciljnom iRNK na osnovu komplementarnosti baza, što dovodi do degradacije iRNK. Sa druge strane, parcijalnim sparivanjem miRNA sa ciljnom iRNK pokreće se mašinerija koja će dovesti do translacione inhibicije (24, 25). Nekodirajuće RNK igraju ključnu ulogu i u metilaciji DNK, modifikaciji histona i hromatina i imprintingu gena. Pokazano je da neke ncRNA imaju visok afinitet vezivanja za CpG ostrvca i da svojim vezivanjem mogu dovesti bilo do demetilacije ostrvca, ili do njegove metilacije, u zavisnosti od stadijuma razvića ili od tipa tkiva (3).

Analiza nivoa ekspresije miRNA u više tipova kancera je pokazala narušenu regulaciju, pri čemu miRNK mogu imati ulogu bilo tumor supresora, bilo onkogeno, u zavisnosti koja je ciljna iRNK (26). Geni za miRNK koji imaju ulogu tumorsupresora mogu biti inaktivirani usled delecija, snižene ekspresije transkripcionog faktora (26) ili usled hipermetilacije (27). Za razliku od siRNK koje uglavnom dovode do degradacije transkripta, mikro RNK vezivanjem za target sekvence dovode do translacione represije (24), što otvara mogućnost za primenu anti-miRNK terapije (28).

KLINIČKE IMPLIKACIJE EPIGENETSKIH PROMENA KOD KANCERA

Kako su epigenetske promene rane promene u kancerogenezi i potencijalno reverzibilne promene, poslednjih godina se otvaraju mogućnosti primene metilacije DNK u detekciji, dijagnozi, predikciji i prognozi (4), kao i primena demetilujuće terapije u lečenju tumora (28).

Dijagnostički značaj epigenetskih promena

Razvojem PCR metode za detekciju metilovane DNK metilaciono-specifičnog PCR-a (29), može biti detektovana metilacija 1 alela od 50 000 nemetilovanih (30), kako u tumorima tako i u telesnim tečnostima. Ovo je pružilo široke mogućnosti za korišćenje metilacije DNK u ranoj detekciji i dijagnozi karcinoma (4). Utvrđeno je da u sputumu pušača prekancerogene promene mogu biti detektovane na osnovu hipermetilacije *p16* i *MGMT* gena i do tri godine pre kliničkih manifestacija karcinoma pluća (30). Osim toga, razvojem Real-time tehnologija za kvantitativno određivanje nivoa metilacije (*Methyl Light*), na osnovu kvantifikacije metilacije gena za glutation sintetazu GST1 kod tumora prostate moguće je razlikovati benigne od malignih promena (31).

Prognoistički značaj epigenetskih promena

Hipermetilacija više tumorsupresorskih gena je dovedena u vezu sa lošom prognozom kod više tipova karcinoma. Hipermetilacija promotora *DAPK* gena je dovedena u vezu sa agresivnošću i lošom prognozom kod tumora pluća (32). Hipermetilacija promotora gena za *E-kadherin* je prognostički marker lošeg ishoda kod difuznog karcinoma želuca (33), ne-sitnoćelijskog karcinoma pluća (34) i oralnog planocelularnog karcinoma (8). Hipermetilacija *p16* je dove-

dena u vezu sa lošom prognozom kod karcinoma glave i vrata (35), a *APC* metilacioni status je doveden u vezu sa lošom prognozom kod karcinoma jednjaka (36). Kod karcinoma pluća nivo prekomerne ekspresije DNMT1 direktno korelira sa lošom prognozom (16).

Prediktivni značaj epigenetskih promena i farmakoepigenomika

Epigenetske promene kao što je DNK metilacija mogu biti marker odgovora karcinoma na hemioterapiju. Pokazano je da hipermetilacija *MGMT* je prognostički faktor dobrog odgovora na alkilirajuću hemioterapiju kod glioma (37) i oralnog planocelularnog karcinoma (38), kao i na terapiju ciklofosamidom kod difuznog B-ćelijskog limfoma (39). Stečena hipermetilacija DNK repair gena hMLH1 (detektovana u perifernoj krvi pacijenta) tokom alkilirajuće carbo-platinum/taxane terapije ovarijalnog karcinoma je marker lošeg ishoda bolesti (40). Hipermetilacija promotora *WRN* gena je dovedena u vezu sa hipersenzitivnošću na inhibitor topoizomerase irinotekan kod primarnog karcinoma kolona (41). Epigenetski profil u predviđanju odgovora pojedinačnih karcinoma na hemioterapiju bi u budućnosti mogao doprineti individualnoj terapiji kancera (42).

Epigenetska terapija

Epigenetske promene su potencijalno reverzibilne promene, što je omogućilo prve primene demetilujuće i terapije inhibitorima histon deacetilaza (28), kao i istraživanje mikro-RNK terapije, gde su prvi rezultati postignuti na ćelijskim linijama (43, 28). Demetilujući agensi, nukleozidni, ne-nukleozidni i dizajnirani inhibitori deluju na DNK metiltransferazu 1, dolazi do degradacije enzima i demetilacije. Najveće dostignuće u ovom vidu terapije je terapija akutne mijeloidne leukemije (AML) i mijelodisplastičnog sindroma (MDS). Prvi nukleozidni inhibitor odobren od strane FDA (Food and Drug Administration) 5-azacitidin (Vidaza) dovede do povećanog preživljavanja pacijenata sa mijelodisplastičnim sindromom (44). Takođe, 5-aza-2-deoksicitidin (Decitabine) je odobren za lečenje akutne mijeloidne leukemije i mijelodisplastični sindrom (45) i dovodi produženja vremena do transformacije u akutnu limfoblastnu leukemiju (46). Vorinostat (SuberoylAnilide Hydroxamic Acid, SAHA), je inhibitor deacetilaza histona odobren za lečenje T-ćelijskog limfoma kože (47).

Perspektive epigenetskih istraživanja u molekularnoj medicini idu u pravcu primene u ranoj i neinvazivnoj dijagnostici, kao i u predikciji odgovora na hemioterapiju i uvođenja epigenetske terapije. Epigenetska terapija deluje nespecifično, čime može doći do aktivacije onkogeno, reaktiviranja inkorporisanih virusa, inhibitori DNK metiltransferaza imaju toksičan efekat, a terapija koja deluje na modifikacije histona deluje i na nehistske proteine, receptore i narušava signalne puteve u ćeliji. Dalja istraživanja i projekat dešifrovanja humanog epigenoma (Human Epigenome Project, HEP) koji je započeo 2003. godine, doprineće boljem razumevanju epigenetskih promena u procesima razvića, diferencijacije, starenja i kancera, njegove dijagnoze i terapije.

Apstrakt

Epigenetske promene su nasledne promene genske ekspresije bez promene primarne nukleotidne sekvence. Poslednjih godina istraživanja kancerogeneze su utvrdila da je broj gena koji podležu epigenetskoj inaktivaciji čak i veći od broja gena koji su inaktivisani mutacijama. DNK metilacija je oblik epigenetske modifikacije, gde hipermetilacija CpG ostrvaca u okviru promotora tumor supresor gena dovodi do njihove inaktivacije, utišavanja tumor supresor gena i do maligne transformacije ćelije. Posttranslacione modifikacije histona imaju važnu ulogu u regulaciji transkripcije. Specifične kombinacije modifikacija histona u hromatinu određuju interakciju između histona, ne-histonskih proteina i DNK, a ova epigenetska informacija se označava kao 'histonski kod'. Novija istraživanja pokazuju veoma važnu ulogu nekodirajućih RNK (non-coding RNA, ncRNA) u epigenetskoj regulaciji genske ekspresije inhibicijom translacije ili degradacijom transkripta. Kako su epigenetske promene rani događaji u malignoj transformaciji, perspektive epigenetskih istraživanja u molekularnoj medicini su u primeni u ranoj i neinvazivnoj dijagnostici kancera, kao i u predikciji odgovora na hemioterapiju i uvođenju epigenetske terapije.

LITERATURA

- Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* 2002; 21:5400-5413.
- Liang G, Chan MF, Tomigahara Y, Tsai YC, Gonzales FA, Li E, Laird PW, Jones PA. Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements. *Mol Cell Biol* 2002; 22:480-91.
- Tollefsbol, T. (Ed). *Cancer Epigenetics*. CRC Press, 2009.
- Herman J, Baylin S. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Eng J Med* 2003; 349:2042-2054.
- Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001; 61:3225-3229.
- Esteller M. (Ed). *DNA Methylation, Epigenetics and Metastasis*. in *Cancer Metastasis Biology and Treatment Vol 7*, Springer, Madrid, 2005.
- Costello J and Plass C. Methylation matters. *J Med Genet* 2001;38:285-303.
- Šupić G, Kozomara R, Branković-Magić M, Jović N, Magić Z. Gene Hypermethylation in Tumor Tissue of Advanced Oral Squamous Cell Carcinoma Patients. *Oral Oncol*, 2009; 45:1051-1057.
- Agoston A, Argani P, Yegnasubramanian S et al. Increased protein stability causes DNA methyltransferase 1 dysregulation in breast cancer. *J Biol Chem* 2005; 280:18302-18310.
- Girault, I, Tozlu, S, Lidereau, R, Bieche I. Expression Analysis of DNA Methyltransferases 1, 3A, and 3B in Sporadic Breast Carcinomas. *Clin Cancer Res* 2003; 9:4415-4422.
- Szyf M. (Ed). *DNA Methylation and Cancer Therapy*. Kluwer, Academic/Plenum Publishers, 2005.
- Jacinto FV and Esteller M. Mutator pathways unleashed by epigenetic silencing in human cancer. *Mutagenesis* 2007; 22:247-253.
- Miremadi A, Oestergaard M, Pharoah P, Caldas C. Cancer genetics of epigenetic genes. *Hum Mol Gen* 2007;16:28-49.
- Esteller M. (Ed). *Epigenetics in Biology and Medicine*. CRC Press, 2009.
- Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature* 2002; 3:415-428.
- Lin RK, Hsu HS, Chang JW, Chen CY, Chen JT, Wang YC. Alteration of DNA methyltransferases contributes to CpG methylation and poor prognosis in lung cancer. *Lung Cancer* 2007; 55, 205-13.
- Rhee I, Bachman KE, Park BH et al. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature* 2002;416:552-556.
- Margueron R, Trojer P, Reinberg D. The key to development: interpreting the histone code? *Curr Opin Gen Dev* 2005;15:163-176.
- Mahlknecht U, Hoelzer D. Histone acetylation modifiers in the pathogenesis of malignant disease. *Mol Med* 2000;6:623-644.
- Arts J, de Schepper S, Van Emelen K. Histone deacetylase inhibitors: from chromatin remodeling to experimental cancer therapeutics. *Curr Med Chem* 2003; 10:2343-2350.
- Lin RJ, Nagy L, Inoue S, Shao W, Miller WH Jr, Evans RM. Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia. *Nature* 1998;391:811-814.
- Harms KL, Chen X. Histone Deacetylase 2 Modulates p53 Transcriptional Activities through Regulation of p53-DNA Binding Activity. *Cancer Res* 2007; 67:3145-3152.
- Majid S, Kikuno N, Nelles J, Noonan E, Tanaka Y, Kawamoto K, et al. Genistein Induces the p21WAF1/CIP1 and p16INK4a Tumor Suppressor Genes in Prostate Cancer Cells by Epigenetic Mechanisms Involving Active Chromatin Modification. *Cancer Res* 2008;68(8):2736-44
- Shivdasani RA. MicroRNAs: regulators of gene expression and cell differentiation. *Blood* 2006;108:3646-3653.
- Negrini M, Ferracin M, Sabbioni S, Croce C. MicroRNAs in human cancer: from research to therapy. *J Cell Sci* 2007;120:1833-1840.
- Croce CM. Oncogenes and Cancer. *N Engl J Med* 2008;358:502-11.
- Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, Fraga M Cerrato C, Setien F, et al. Genetic Unmasking of an Epigenetically Silenced microRNA in Human Cancer Cells. *Cancer Res* 2007;67(4):1424-9.
- Magić Z, Šupić G, Branković-Magić M. Towards targeted epigenetic therapy of cancer. *Journal of Buon* 2009, 14:S79-S88.
- Herman J, Graff J, Myohanen S, Nelkin B, Baylin S. Methylationspecific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9821- 9826.
- Palmisano W, Divine K, Saccomanno G, Gilliland F, Baylin S, Herman J, Belinsky S. Predicting Lung Cancer by Detecting Aberrant

Promoter Methylation in Sputum. *Canc Res* 2000; 60:5954–5958.

31. Jeronimo C, Usadel H, Henrique R, et al. Quantitation of GSTP1 methylation in non-neoplastic prostatic tissue and organconfined prostate adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93:1747–52.

32. Inbal B, Cohen O, Polak-Charcon S, Kopolovic J, Vadai E, Eisenbach L, et al. DAP kinase links the control of apoptosis to metastasis. *Nature* 1997; 390:180–4.

33. Graziano F, Arduini F, Ruzzo A, Bearzi., Humar B, More H, et al. Prognostic Analysis of E-Cadherin Gene Promoter Hypermethylation in Patients with Surgically Resected, Node-Positive, Diffuse Gastric Cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10:2784–2789.

34. Nakata S, Sugio K, Uramoto H, Oyama T, Hanagiri T, Morita M, Yasumoto K. The methylation status and protein expression of CDH1, p16(INK4A), and fragile histidine triad in nonsmall cell lung carcinoma: epigenetic silencing, clinical features, and prognostic significance. *Cancer* 2006;106(10):2190–2199.

35. Koscielny S, Dahse R, Ernst G, von Eggeling F. The prognostic relevance of p16 inactivation in head and neck cancer. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2007; 69:30–36.

36. Zare M, Rastgar Jazii F, Reza Alivand M, Karimi Nasser N, Malekzadeh R, Yazdanbod M. Qualitative analysis of Adenomatous Polyposis Coli promoter: Hypermethylation, engagement and effects on survival of patients with esophageal cancer in a high risk region of the world, a potential molec-

ular marker. *BMC Cancer* 2009, 9:24 doi:10.1186/1471-2407-9-24.

37. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman S, Hidalgo O, Vanaclocha V, Baylin S, Herman J. Inactivation Of The DNA-Repair Gene MGMT And The Clinical Response Of Gliomas To Alkylating Agents. *N Engl J Med* 2000; 343:1350–1354.

38. Zuo C, Ai L, Ratliff P, Suen J, Hanna E, Brent T, Fan C. O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase Gene: Epigenetic Silencing and Prognostic Value in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:967–975.

39. Esteller M, Gaidano G, Goodman S, Zagonel V, Capello D, Botto B, et al. Hypermethylation of the DNA Repair Gene O6-Methylguanine DNA Methyltransferase and Survival of Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:26–32.

40. Gifford G, Paul J, Vasey PA, Kaye SB, Brown R. The acquisition of MLH1 methylation in plasma DNA after chemotherapy predicts poor survival for ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 2004; 10:4420–4426.

41. Agrelo R, Cheng W, Satien F, Ropero S, Espada J, Fraga M, et al. Epigenetic inactivation of the premature aging Werner syndrome gene in human cancer *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:8822–27.

42. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman J, Baylin S, Issa, JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:8681–8686.

43. Lu Y, Xiao J, Lin H, Bai Y, Luo X, Wang Z, Yang B. A single anti-microRNA antisense oligodeoxynucleotide (AMO) targeting multiple microRNAs offers an improved approach for microRNA interference. *Nucleic Acids Research*, 2009;37:e24.

44. Silverman L, Demakos E, Peterson B, Kornblith A, Holland J, Odchimar-Reissig R, et al. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol*. 2002;20(10):2429–40.

45. Ghoshal K, Bai S. DNA methyltransferases as targets for cancer therapy. *Drugs Today (Barc)* 2007; 43:395–422.

46. Kantarjian H, Issa JP, Rosenfeld CS, Bennett JM, Albitar M, DiPersio J, et al. Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study. *Cancer* 2006, 106:1794–1803.

47. Mann BS, Johnson JR, Cohen MH, Justice R, Pazdur R. FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma *Oncologist*. 2007;12(10):1247–52.