

Epigenetic-Based Cancer Therapy

Ali Noroozi Aghide^{1*}, Najme Lashgari²

¹ Department of Laboratory Sciences, Faculty of Paramedicine, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran

² Faculty of Medicine, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Introduction: Epigenetics involves the study of heritable changes in the regulation of gene activity and expression that are not dependent on gene sequence. Main mechanisms of epigenetic modifications are DNA methylation, Histone modification and Nucleosome positioning. Several studies have shown that these modifications are related to cancer initiation, progression or tumor metastasis. In contrast to genetic mutations, most epigenetic modifications may be reversible and preventable. Therefore, the resetting of aberrant epigenetic states in neoplastic cells is an expanding therapeutic approach to treat or prevent cancer.

Methods and Materials: The current study is a kind of review study in which the crucial data have been collected; in addition, keywords have been used systematically to search for related articles in reputable site.

Results: It is now clear that the disorders of epigenetic mechanisms can affect and compound with oncogenic mutation and cause to promote tumor growth. So, the management of aberrant epigenetic states as a way to target the formation and progression of cancer is a logical and effective therapeutic approach. An understanding of the link between epigenetic deregulation and cancer is applicable to prognosis as well as treatment.

Discussion and Conclusion: It seems that many aspects of epigenetics are still unknown; moreover, various studies are ongoing to explore other epigenetic mechanisms, their relationship with each other as well as the development, and progression of various diseases especially cancer.

Keywords: Epigenetics, Cancer, Epigenetic therapy

*(Corresponding author) Department of Laboratory Sciences, Faculty of Paramedicine, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran
E-mail address: Noroozi_1895@yahoo.com

درمان سرطان بر پایه اپی ژنتیک

علی نوروزی عقیده^{۱*}، نجمه لشگری^۲

^۱ عضو گروه علوم آزمایشگاه، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آجا، تهران، ایران

^۲ دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آجا، تهران، ایران

چکیده

مقدمه: امروزه اپی ژنتیک به معنی مطالعه تغییراتی در بیان و یا عملکرد ژن است که به سلول نسل بعد قابل توارث بوده بدون اینکه تغییری در توالی DNA ایجاد شده باشد. مکانیسم‌های اصلی اپی ژنتیک شامل متیلاسیون DNA، تغییرات هیستونی و تغییر در وضعیت قرارگیری نوکلئوزوم می‌باشند. مطالعات مختلف، ارتباط تغییرات اپی ژنتیک را با بروز و یا پیشرفت و متاستاز انواع مختلف سرطان‌ها نشان داده است. برخلاف جهش‌های ژنتیکی، اکثر تغییرات اپی ژنتیکی ممکن است قابل برگشت یا پیشگیری باشند. لذا، بازگرداندن وقایع اپی ژنتیک نابجا در سلول‌های نئوپلاستیک، یک روش درمانی رو به گسترش در درمان یا پیشگیری سرطان است.

مواد و روش‌ها: این مطالعه از نوع مروری بوده که بطور سیستماتیک با استفاده از کلیدواژه‌های مربوطه به جستجوی مقالات مرتبط در سایت‌های معتبر پرداخته و اطلاعات لازم جمع‌آوری شده است.

یافته‌ها: امروزه مشخص شده که اختلال در مکانیسم‌های اپی ژنتیک می‌تواند با تاثیر و همکاری با جهش‌های سرطانزا موجب پیشرفت رشد تومور شود. بنابراین مدیریت وقایع اپی ژنتیکی نابجا بعنوان راهی برای هدف قرار دادن شکل‌گیری و یا پیشرفت سرطان، یک روش درمانی منطقی و موثر است. فهم ارتباط بین اپی ژنتیک و سرطان در تعیین پیش‌آگهی نیز همانند درمان دارای استفاده‌های کاربردی است.

بحث و نتیجه‌گیری: به نظر می‌آید که بسیاری از جنبه‌های اپی ژنتیک هنوز ناشناخته بوده و مطالعات مختلف برای کشف دیگر مکانیسم‌های اپی ژنتیک و ارتباط آنها با یکدیگر و همچنین با بروز و یا پیشرفت بیماری‌های مختلف خصوصاً سرطان ادامه دارد.

کلمات کلیدی: اپی ژنتیک - سرطان - درمان‌های اپی ژنتیک

مقدمه

جهت توصیف چگونگی میانکنش ژنها با عوامل محیطی برای تولید یک فنوتیپ بکار برد. وی سرنوشت سلول در حال تکامل را به توپ شیشه‌ای توصیف کرد که در یک سرایشی پر فراز و نشیب حرکت می‌کند (۳). امروزه این توصیف Waddington تحت عنوان وضعیت پویا (Dynamic State) در مطالعه سرنوشت سلولی تعبیر می‌شود (۴). Robin Holliday اپی ژنتیک را «مطالعه مکانیسم‌های کنترل موقتی فعالیت ژن در طی تکامل ارگانیسم کامل» توصیف کرد. بنابراین اپی ژنتیک می‌تواند جهت توصیف هر چیزی به غیر از توالی DNA

اصطلاح اپی ژنتیک (نمای اپی ژنتیک) Epigenetic Landscape برای اولین بار در سال ۱۹۴۲ توسط Conrad Waddington از ترکیب دو واژه اپی ژنیز و ژنتیک بکار برده شد (۱). اپی ژنیز کلمه‌ای قدیمی است که جهت توصیف تمایز سلولها از حالت چندقابلیته Totipotency اولیه خود در طی تکامل رویانی استفاده می‌شود (۲). در آن زمان هنوز ماهیت فیزیکی ژنها و نقش آنها در توارث مشخص نشده بود. لذا، Waddington این اصطلاح را بعنوان یک مدل تجسمی

* (نویسنده مسئول) عضو گروه علوم آزمایشگاه، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آجا - تهران - ایران
آدرس الکترونیک: Noroozi_1895@yahoo.com

DNA Methylation DNA، تغییرات هیستونی (Histone Modification) و وضعیت قرارگیری نوکلئوزوم (Nucleosome Positioning) (۹).

متیلاسیون DNA

متیلاسیون باز سیتوزین بیش از سایر موارد تغییرات اپی ژنتیک در انسان مورد مطالعه قرار گرفته است. این مسئله تقریباً بصورت انحصاری در نوکلئوتیدهای CpG رخ می دهد. دی نوکلئوتیدهای CpG تمایل به تجمع در نواحی تحت عنوان جزایر CpG (CpG Islands) دارند. جزایر CpG، نواحی با طول بیش از ۲۰۰ bp با محتوای G+C بیشتر یا مساوی ۵۰ درصد و فراوانی Observed/expected CpG بیشتر یا مساوی ۰/۶ می باشند. دی نوکلئوتیدهای CpG در ژنوم پستانداران نادر می باشند (حدود یک درصد) (۱۰). (شکل شماره ۱) حدود ۶۰ درصد پروموتورهای ژن های انسانی با جزایر CpG مرتبط بوده و در سلول های طبیعی معمولاً بصورت غیر متیله می باشند. اگر چه که برخی از آنها (حدود ۶ درصد) در بافت های خاص در طی دوره تکامل یا در بافت های تمایز یافته، متیله می باشد (۱۱). (شکل شماره ۲)

بطور کلی متیلاسیون جزایر CpG، با خاموشی ژن مرتبط است. متیلاسیون DNA نقش کلیدی در پدیده Genomic Imprinting دارد که در آن، هاپرمتیلاسیون یکی از دو آل والدین موجب بیان تک آلی در فرزندان می گردد. پدیده مشابه با آن در غیر فعال شدن کروموزوم X در جنس ماده مشاهده می گردد (۱۲).

متیلاسیون DNA با مکانیسم های مختلف می تواند بیان ژن را مهار کند. از آن جمله می تواند پروتئین های دامین متصل شونده به متیل CpG (Methyl-CpG-binding Domain) (MBD) را به محل فراخوانده و اعضای خانواده MBD نیز به نوبه خود کمپلکس های تغییر دهنده هیستون و کروماتین را در نقاط متیله گردآوری کنند. متیلاسیون DNA همچنین می تواند با جلوگیری از اتصال پروتئین های خاص به جایگاه های هدفشان، مستقیماً بیان ژن را مهار می نمایند (۱۳). برعکس، جزایر CpG غیر متیله با فراخواندن Cfp1 که مرتبط با هیستون متیل ترانسفراز Setd1 است نواحی غنی از H3K4 تری متیله (H3K4me3) بعنوان نشانه هیستونی ساخته و از این طریق ساختار کروماتینی مطلوب را جهت بیان ژن فراهم می سازند (۱۴). متیلاسیون DNA مختص جزایر CpG نیست. اصطلاح سواحل جزایر

که تکامل ارگانیزم را تحت تاثیر قرار می دهد بکار رود (۵). چند سال بعد، Arthur Riggs و همکارانش توصیف دقیق تری ارائه دادند. بدین ترتیب که اپی ژنتیک به معنی مطالعه تغییراتی در عملکرد ژن است که از طریق تقسیم میوز و یا میتوز به نسل بعدی قابل توارث بوده، بدون اینکه تغییری در توالی DNA رخ دهد (۶). پیشوند یونانی "Epi" در اپی ژنتیک، در بر دارنده ویژگی هایی در بالا و یا علاوه بر ژنتیک است. بنابراین صفات اپی ژنتیکی در بالا و یا علاوه بر پایه مولکولی توارث قرار دارند.

پروژه اپی ژنومیکس NIH در سال ۲۰۱۳ این توصیف را بکار برد: اپی ژنتیک شاخه ای از علم است که شامل مطالعه تغییرات در تنظیم فعالیت و بیان ژن بوده و مستقل از توالی ژن است. بر اساس اهداف این پروژه، اپی ژنتیک هم تغییرات قابل توارث (به سلول و یا نسل بعد) در فعالیت و بیان ژن را شامل می شود و هم تغییرات ثابت و طولانی مدت در پتانسیل رو نویسی یک سلول را که الزاماً قابل توارث نیستند. اپی ژنتیک مربوط به مطالعه یک ژن واحد و یا دسته ای از ژنها است در حالی که اپی ژنومیکس اشاره به آنالیز تغییرات اپی ژنتیکی در ژنوم کامل دارد (۷). در همایش cold spring harbor در سال ۲۰۰۸، یک توصیف توافقی از صفات اپی ژنتیک تحت عنوان « فنوتیپ وراثتی پایدار ناشی از تغییرات کروموزومی، بدون تغییر در توالی DNA » ارائه شد (۸).

شباهت اصطلاح اپی ژنتیک به کلمه ژنتیک، اصطلاحات موازی زیادی را ایجاد کرده است. «اپی ژنوم» بصورت موازی با «ژنوم» اشاره به وضعیت کلی اپی ژنتیک یک سلول دارد. به همین ترتیب، «کد اپی ژنتیکی» جهت توصیف گروهی از ویژگی های اپی ژنتیکی بکار می رود که فنوتیپ های مختلفی را در سلول های مختلف ایجاد می کنند.

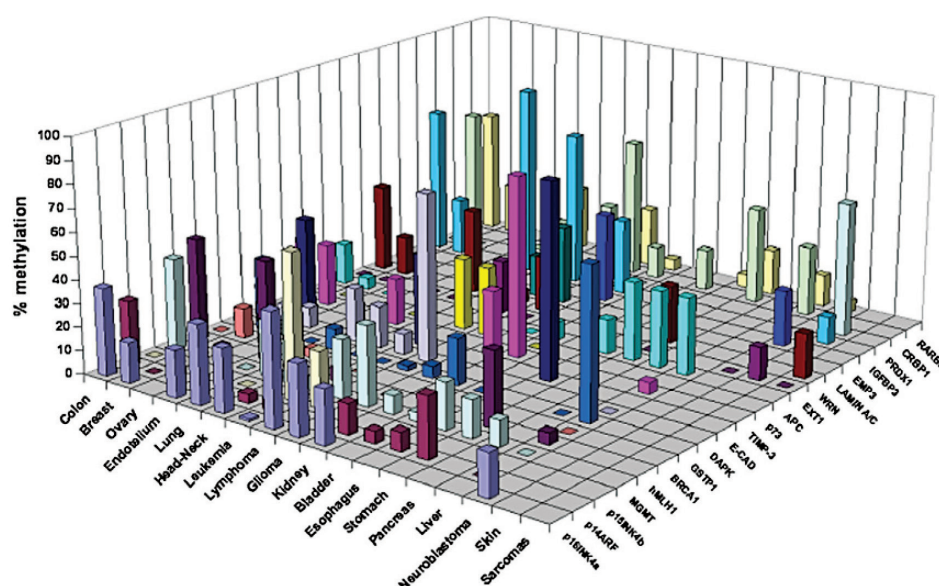
مواد و روش ها

این مطالعه از نوع مروری بوده که بطور سیستماتیک با استفاده از کلیدواژه های مربوطه به جستجوی مقالات مرتبط در سایت های معتبر پرداخته و اطلاعات لازم جمع آوری شده است.

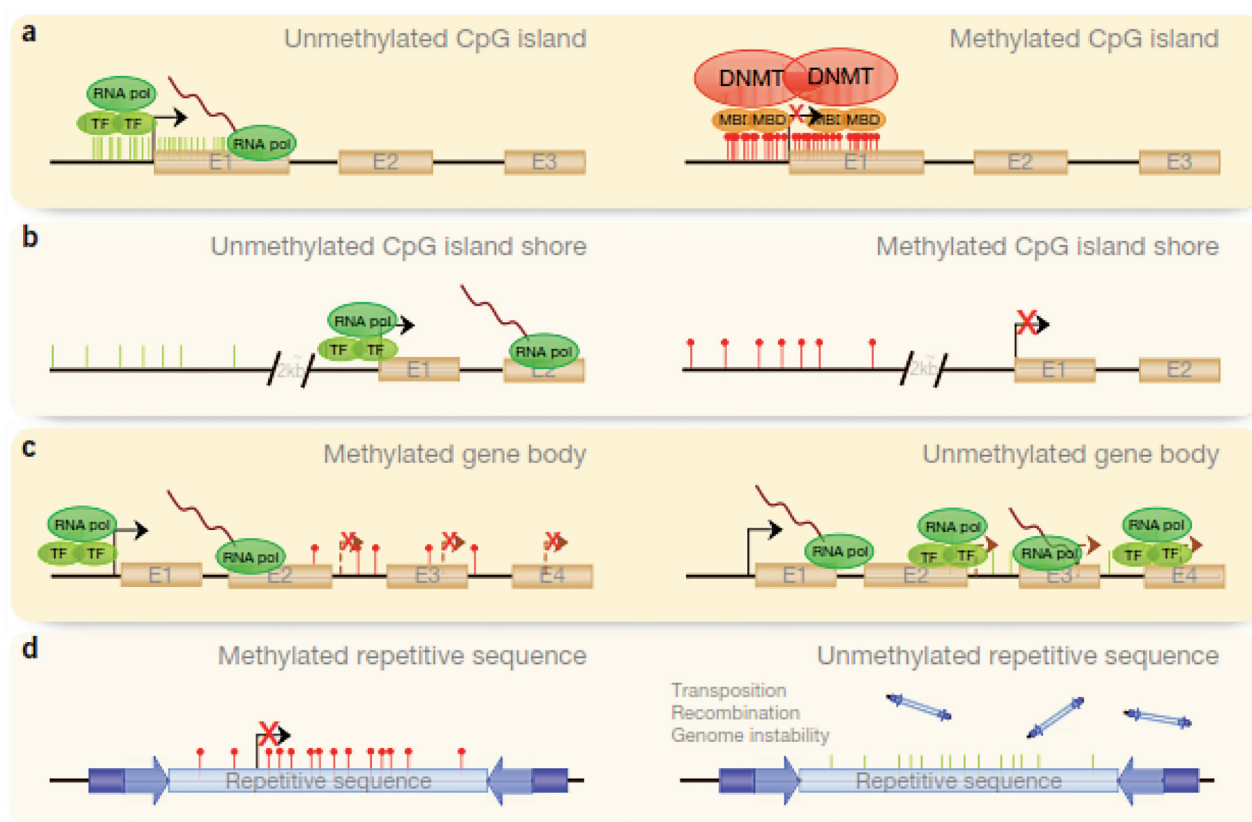
یافته ها

تغییرات اپی ژنتیک و مکانیسم ها

این تغییرات را می توان به سه گروه عمده تقسیم بندی کرد: متیلاسیون



شکل ۱- الگوی هایپرمتیلاسیون جزایر CpG در سرطان‌های انسانی. محور Y، فراوانی هایپرمتیلاسیون برای هر ژن



شکل ۲- الگوهای متیلاسیون DNA. الگوی طبیعی در سمت چپ و تغییرات غیر طبیعی در سمت راست

بلکه در سواحل این جزایر صورت می‌گیرد. سواحل متیله جزایر CpG، جهت افتراق بین بافت‌های خاص بوده و بین انسان و موش به صورت حفاظت شده می‌باشند (۱۵). (شکل شماره ۲)

CpG که به تازگی استفاده می شود اشاره به نواحی با تراکم کم CpG در نزدیکی جزایر CpG (با فاصله حدود ۲ kb) دارد. متیلاسیون این سواحل به شدت با مهار بیان ژن مرتبط است. به نظر می رسد که بسیاری از موارد متیلاسیون DNA مخصص یافت، نه در جزایر CpG

تمامی هیستون‌ها هدف تغییرات موسوم به تغییرات پس از رونویسی (Post-transcriptional) می‌باشند. تغییرات پس از رونویسی مختلفی در ناحیه دنباله هیستون رخ می‌دهند: استیلایسیون، متیلایسیون، فسفریلاسیون، یوبی‌کویتیناسیون Ubiquitination، سومویلاسیون SUMOylation و ADP-ریبوزیلاسیون. تغییرات هیستونی نقش‌های مهمی در تنظیم رونویسی، ترمیم DNA، همانندسازی DNA و متراکم‌سازی کروموزوم دارند (۱۹-۲۱).

ژنوم انسان بر اساس وضعیت رونویسی خود به یوکروماتین فعال و هتروکروماتین غیر فعال تقسیم بندی می‌شود. یوکروماتین با میزان زیاد استیلایسیون و تری متیلایسیون $H3K4$ ، $H3K36$ و $H3K79$ و هتروکروماتین با میزان کم استیلایسیون و میزان زیاد متیلایسیون $H3K9$ ، $H3K27$ و $H4K20$ مشخص می‌گردند. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که سطوح تغییرات هیستونی، پیش بینی کننده میزان بیان ژن هستند. ژنهای فعال از نظر رونویسی با میزان زیاد $H3K4me3$ ، $H3K27ac$ ، $H3K9ac$ و $H4K20me1$ در ناحیه پروموتور و $H3K9me3$ و $H4K20me1$ در طول بدنه ژن مشخص می‌گردند. اگرچه که توصیف هتروکروماتین بعنوان ناحیه غیر فعال از نظر رونویسی با کشف RNAهای غیر کد کننده (ncRNAs) مشتق از هتروکروماتین به چالش کشیده شده است (۲۲).

همانطور که پیشتر ذکر شد، بازیگران اپی ژنتیک با یکدیگر میانکنش دارند. یک مثال جالب از میانکنش بین تغییرات هیستونی و متیلایسیون DNA، ارتباط بین $DNMT3L$ و $H3K4$ است. $DNMT3L$ بطور اختصاصی با ناحیه دنباله هیستون $H3$ واکنش داده و با فراخوانی $DNMT3A$ موجب متیلایسیون DNA می‌شود. اگرچه که این واکنش، با قدرت توسط $H3K4me3$ مهار می‌شود. علاوه بر طبق این گزارشات، متیل ترانسفرازهای هیستونی مختلفی فرایند متیلایسیون DNA را به سمت اهداف ژنومی اختصاصی هدایت کرده و از این طریق به حفظ وضعیت خاموشی ژن کمک می‌کنند. همچنین متیل ترانسفرازها و دمتیلازهای هیستونی می‌توانند پایداری پروتئین‌های $DNMT$ را تعدیل نمایند. به عبارتی دیگر، متیلایسیون DNA می‌تواند تغییرات هیستونی را نیز هدایت نماید. بطور مثال، DNAی متیله، $H3K9me3$ را از طریق فراخوانی $MeCP2$ وساطت می‌کند. بسیاری از آنزیم‌های کاتالیز کننده تغییرات پس از رونویسی توصیف شده و بدلیل پویا بودن این تغییرات، آنزیم‌های برطرف کننده این تغییرات

مرتبط است. بعنوان مثال می‌توان متیلایسیون بدنه ژن را نام برد. این شکل از متیلایسیون در مورد ژن‌هایی که از بیان بالائی برخوردارند رخ داده و ارتباط مثبت با بیان ژن دارد. بنا بر فرضیات ارائه شده، متیلایسیون بدنه ژن ممکن است با کارایی طولیل شدن (Elongation Efficiency) رونویسی و جلوگیری از شروع نابجای رونویسی مرتبط باشد (۱۶). (شکل شماره ۲).

اگرچه متیلایسیون DNA در پستانداران عمدتاً در نوکلئوتیدهای CpG رخ می‌دهد، متیلایسیون در نواحی غیر CG نیز اخیراً در انسان در جایگاههای CHG و CHH توصیف شده است (که در آن H بیانگر بازهای A، C یا T است). متیلایسیون CHG و CHH در سلولهای بنیادی یافت شده و به نظر می‌آید که با افزایش در بدنه ژن، مستقیماً با بیان ژن مرتبط می‌باشد (۱۷).

سطوح متیلایسیون نواحی غیر CpG در طی تمایز سلولی کاهش و در سلول‌های پرتوان القاء شده (iPS Induced Pluripotent Stem Cell) افزایش دارد که این مسئله یک نقش کلیدی در منشا و حفظ وضعیت پرتوانی (Pluripotency) سلول پیشنهاد می‌کند. مکانیسم‌های متیلایسیون نواحی غیر CpG هنوز مشخص نیست (۱۸).

متیلایسیون DNA توسط خانواده آنزیم‌های DNMT انجام می‌گیرد که انتقال یک گروه متیل از S-آدنوزیل متیونین به DNA را کاتالیز می‌نمایند. در پستانداران، پنج عضو از خانواده DNMT شناسائی شده است: $DNMT1$ ، $DNMT2$ ، $DNMT3a$ ، $DNMT3b$ و $DNMT3L$ که فقط $DNMT1$ ، $DNMT3a$ و $DNMT3b$ فعالیت متیل ترانسفرازی دارند (۱۳).

تغییرات هیستونی

هیستون‌ها بازیگران کلیدی در اپی ژنتیک هستند. هیستون‌های مرکزی شامل $H2A$ ، $H2B$ ، $H3$ و $H4$ بصورت دو دایمر $H2A-H2B$ و یک تترامر $H3-H4$ تجمع می‌یابند تا نوکلئوزوم را شکل دهند. یک قطعه DNA با طول ۱۴۷ bp، ۱/۶۵ دور حول این هشت تایی هیستونی (Histone octamer) پیچیده شده و نوکلئوزوم‌های مجاور توسط یک قطعه DNA با طول حدود ۵۰ bp از یکدیگر جدا می‌شوند. هیستون‌های مرکزی به جز قسمت دنباله انتهای آمینی (N-terminal Tail) به شکل گلولار هستند. هیستون $H1$ به DNA رابط بین دو نوکلئوزوم متصل بوده و از این رو هیستون رابط (Linker Histone) نامیده می‌شود (۱۹).

DNA است. آنها از این جهت از هیستون‌های مرکزی قابل افتراق هستند. واریته‌های هیستونی همچنین در ناحیه دنباله و ساختار دامین‌ها و تعدادی از آمینو اسیدهای کلیدی با هیستون‌های مرکزی تفاوت دارند. این واریته‌های هیستونی، وضعیت قرارگیری نوکلئوزوم و بیان ژن را تنظیم می‌کنند. بطور مثال، الحاق واریته هیستونی H2A.Z، ژن‌ها را در برابر متیلاسیون DNA محافظت می‌نماید (۲۹). از این رو میانکشی بین فاکتورهای اپی ژنتیکی مختلف آشکارتر می‌شود. میکروRNAها (miRNAs) نیز می‌توانند قرارگیری واریته‌های هیستونی را تنظیم کرده و یا با واکنش با کمپلکس‌های تغییر دهنده حالت کروماتین، تغییر زیرواحدهای اختصاصی را میانجیگری کنند (۳۰).

تغییرات اپی ژنتیک در سرطان

متیلاسیون DNA

سلولهای سرطانی با کاهش وسیع متیلاسیون DNA مشخص می‌شوند (۵-۶ درصد کاهش در میزان کلی ۵-متیل سیتوزین). در همین زمان، کسب الگوهای اختصاصی هایپرمتیلاسیون در جزایر CpG پروموتورهای خاص به میزان فراوانی مشاهده می‌شود. هایپرمتیلاسیون سرتاسری عمدتاً در توالی‌های تکرار شونده رخ داده و موجب پیشرفت ناپایداری کروموزومی و جابجایی‌ها و شکست‌های ژنی می‌شود (۳۱). L1 از خانواده LINE مثال بارزی است که هایپرمتیلاسیون آن در طیف وسیعی از سرطان‌ها از جمله تومورهای سینه، ریه، مثانه و کبد نشان داده شده است (۳۲).

هایپومتیلاسیون در پروموتورهای خاص می‌تواند بیان انکوژن‌های نابجا را فعال نماید. بطور مثال، MASPIN که بعنوان یک ژن سرکوبگر تومور در سلول‌های سینه و اپی تلیال پروستات به شکل هیپرمتیله است، در سایر انواع تومور به شکل هیپومتیله درآمده و بیان آن افزایش می‌یابد. S100P در سرطان پانکراس، SNCG در سرطان سینه و تخمدان و MAGE و DPP6 در ملانوماها موارد مطالعه شده دیگری از ژن‌های هیپومتیله در سرطان هستند (۳۳).

برخلاف هایپومتیلاسیون سرتاسری، هایپرمتیلاسیون در جزایر CpG اختصاصی صورت می‌گیرد. غیرفعال شدن رونویسی ناشی از هایپرمتیلاسیون پروموتور، ژن‌های دخیل در مسیرهای اصلی

نیز گزارش شده‌اند (۲۳ و ۲۴).

از بین آنزیم‌های تغییر دهنده هیستون، متیل ترانسفرازها، دمتیلازها و کینازها نسبت به زیرواحدها و بقایای هیستونی Histone Residue اختصاصی‌تر عمل می‌کنند. برعکس، بیشتر استیل ترانسفرازهای هیستونی Histone Acetyl Transferase (HATs) و داستیلازهای هیستونی Histone Deacetylase (HDACs) چندان اختصاصی نبوده و بیش از یک باقی مانده هیستونی را هدف قرار می‌دهند (۲۵).

وضعیت قرارگیری نوکلئوزوم

نوکلئوزوم‌ها سدی در برابر رونویسی بوده و دسترسی فعال کننده‌ها و فاکتورهای رونویسی به جایگاه هدف بر روی DNA را مهار کرده، بطور همزمان طویل‌سازی نسخه در حال رونویسی توسط آنزیم‌های پلی‌مرازی را مهار می‌نماید. به نظر می‌آید که بسته بندی DNA در قالب نوکلئوزوم‌ها تمامی مراحل رونویسی را تحت تاثیر قرار داده و بنابراین، بیان ژن را تنظیم نماید. بطور خاص، وضعیت دقیق قرارگیری نوکلئوزوم‌ها در اطراف منطقه جایگاه شروع رونویسی (Transcription Start Sites (TSSs) تاثیر قابل توجهی بر شروع رونویسی داشته و جابجایی اندک نوکلئوزوم به میزان ۳۰ bp در نقاط TSS در تغییرات فعالیت RNA پلی‌مراز ۲ نقش دارد. از دست رفتن نوکلئوزوم در بالادست TSS به شدت با فعال شدن ژن مرتبط بوده از طرفی دیگر، مسدود شدن TSS توسط نوکلئوزوم با سرکوب شدن ژن ارتباط دارد (۲۶ و ۲۷).

وضعیت قرارگیری نوکلئوزوم نه تنها میزان دسترسی فاکتورهای رونویسی به توالی هدف روی DNA را تعیین می‌کند بلکه گزارش شده که نقش مهمی در شکل دهی نمای متیلاسیون (Methylation Landscape) دارد. کمپلکس‌های تغییر دهنده حالت نوکلئوزوم با عملکرد وابسته به ATP و مداخله در میانکشی بین DNA و هیستون، توپولوژی کروماتین را تغییر داده و لذا جابجایی نوکلئوزوم و دسترسی فاکتورهای رونویسی به DNA را تسهیل می‌نمایند (۲۸).

واریته‌های هیستونی

عملکرد دقیق نوکلئوزوم‌ها تحت تاثیر الحاق واریته‌های مختلف هیستونی است. واریته‌های هیستونی خارج از فاز S چرخه سلولی بیان شده و الحاق آنها به کروماتین بصورت مستقل از همانندسازی

سلولی از جمله ترمیم WRN، DNA (BBRCA1 و Hmlh1)، پاسخ ویتامین (RARβ و CRBP1)، پیامدهی Ras (RASSF1A و NORE1A)، کنترل چرخه سلولی (P16INK4a و P16INK4b)، شبکه P14ARF (P53 و P73) و آپوپتوز (SFRP1، WIF-1، DAPK1 و TMS1) را تحت تاثیر قرار می دهد (۳۴).

پروموتورهای هایپرمتیله می توانند بعنوان بیومارکرهای جدید در تشخیص و تعیین پیش آگهی مورد توجه قرار گیرند. باوجود اینکه توجه اغلب مطالعات بر روی جزایر CpG در نواحی پروموتور است، اما یافته های اخیر پیشنهاد می کنند که اکثر متیلاسیون های نابجا در سرطان در سواحل جزایر CpG رخ می دهند که از آن جمله می توان به HOXA2 و GATA2 اشاره کرد (۳۵). قابل توجه این که اغلب تغییرات در سواحل جزایر CpG (۴۵-۶۵ درصد) مرتبط با نواحی است که در طی تمایز طبیعی بافتی به شکل هایپرمتیله در می آیند (مانند PAX5 و TGF-β1) (۳۶).

تغییرات هیستونی

کاهش کلی در H4K16 منواسیتیل اکثريت تغییرات هیستونی را در سلول های سرطانی تشکیل می دهد (۴۲). داستیلاسیون توسط HDAC ها انجام می گیرد که در تومورهای مختلف دچار افزایش بیان و یا جهش شده اند. پروتئین های خانواده Sirtuin، کلاس اصلی از آنزیم های HDAC در این فرایند هستند (۴۳). افزایش بیان و فعالیت داستیلازی SirT1 (از اعضای این خانواده) در انواع مختلف سرطان ها نشان داده شده است. علاوه بر این، SirT1 با DNMT1 واکنش داده و بر متیلاسیون DNA تاثیر می گذارد (۴۴). بیان HDAC ها می تواند توسط میکرو RNA ها تنظیم شود. بطور مثال miR-449a با سرکوب بیان HDAC-1 در سلول های سرطانی پروستات، رشد و بقای سلولی را تنظیم می نماید. علاوه بر تغییر در بیان HDAC، در بسیاری از سرطان ها (مانند سرطان کولون، ریه و لوسمی ها) جابجایی های ژنی رخ می دهند که منجر به شکل گیری پروتئین های ترکیبی نابجا، جهش ها و حذف هایی در HAT ها و ژن های مرتبط با HAT ها شده، از این طریق در اختلال استیلاسیون هیستون شرکت می کنند (۴۵).

سلول های سرطانی علاوه بر H4K16ac، هیستون های H3K4me3، H3K27me3 و H4K20me3 را نیز بطور سرتاسری از دست می دهند (۴۶). تغییر در توزیع متیلاسیون هیستون ها عمدتاً ناشی از بیان هیستون متیل ترانسفرازها و همچنین هیستون دمتیلازها می باشد. جهش های غیرفعال کننده در هیستون متیل ترانسفراز SETD2 و هیستون دمتیلاز UTX در کارسینوم کلیه، مثال هایی از این موارد هستند (۴۷). در لوسمی ها، حضور آنکو پروتئین MLL منجر به الگوهای غیر طبیعی از متیلاسیون H3K4 و H3K27 و نهایتاً تغییر در بیان ژن های هدف MLL می شود (۴۸).

سلولی از جمله ترمیم WRN، DNA (BBRCA1 و Hmlh1)، پاسخ ویتامین (RARβ و CRBP1)، پیامدهی Ras (RASSF1A و NORE1A)، کنترل چرخه سلولی (P16INK4a و P16INK4b)، شبکه P14ARF (P53 و P73) و آپوپتوز (SFRP1، WIF-1، DAPK1 و TMS1) را تحت تاثیر قرار می دهد (۳۴).

پروموتورهای هایپرمتیله می توانند بعنوان بیومارکرهای جدید در تشخیص و تعیین پیش آگهی مورد توجه قرار گیرند. باوجود اینکه توجه اغلب مطالعات بر روی جزایر CpG در نواحی پروموتور است، اما یافته های اخیر پیشنهاد می کنند که اکثر متیلاسیون های نابجا در سرطان در سواحل جزایر CpG رخ می دهند که از آن جمله می توان به HOXA2 و GATA2 اشاره کرد (۳۵). قابل توجه این که اغلب تغییرات در سواحل جزایر CpG (۴۵-۶۵ درصد) مرتبط با نواحی است که در طی تمایز طبیعی بافتی به شکل هایپرمتیله در می آیند (مانند PAX5 و TGF-β1) (۳۶).

تومورهای انسانی همچنین با کاهش میکرو RNA ها که اغلب ناشی از هایپرمتیلاسیون در پروموتور miRNA است مشخص می شوند. بطور مثال، miR-124a توسط هایپرمتیلاسیون سرکوب شده و فعال شدن CDK6 و فسفریلاسیون Rb را موجب می شود (۳۷). جالب اینکه سرکوب بیان miRNA توسط هایپرمتیلاسیون نه تنها با وقوع سرطان بلکه با متاستاز آن نیز مرتبط است. خاموشی miR-148، miR-34b/ c و miR-9 توسط هایپرمتیلاسیون پروموتور، انتشار تومور از محل اولیه را تسریع می نماید (۳۸).

الگوهای هایپرمتیلاسیون مختص نوع تومور بوده و هنوز مشخص نیست که چرا نواحی خاص هایپرمتیله شده در حالیکه نواحی دیگر به شکل هیپومتیله باقی می ماندند. یک احتمال این است که غیرفعال شدن برخی ژن های خاص موجب یک قابلیت رشد و در نهایت یک انتخاب کلونال شود. فرضیه دیگر این است که متیلاسیون نابجای جزایر CpG می تواند ناشی از فراخوانی DNMT ها و HDAC ها به سمت ژن های هدف خاص توسط پروتئین های ادغامی (Fusion Protein) باشد، مانند پروتئین ادغامی PML-RARA در برخی لوسمی ها (۳۹). احتمال دیگر، انتشار متیلاسیون از نواحی هایپرمتیله به نواحی اطراف است. طبق گزارشات، خاموشی اپی ژنتیکی توسط متیلاسیون DNA می تواند نواحی به بلندی ۱-mb از یک کروموزوم را پوشش داده و حالتی شبیه از دست رفتن هتروزیگوسیتی Loss

علاوه بر وضعیت قرارگیری نوکلئوزوم، واریته‌های هیستونی نیز با سرطان مرتبط هستند (بطور مثال افزایش بیان MacroH2A در فرایند پیری Senescence نقش دارند). بنابراین تومورهای ریه همراه با افزایش بیان MacroH2A بدلیل کاهش میزان تکثیر سلولی و عود (Recurrence) کمتر دارای پیش‌آگهی (Prognosis) بهتری می‌باشند (۵۴).

اپی ژنتیک RNA و سرطان

در طی سالهای اخیر توجه زیادی به اهمیت RNA در فرایندهایی مانند پویایی کروماتین Chromatin Dynamics و خاموش شدن ژن، بخصوص با شناسایی گروه بزرگ RNAهای کوچک تنظیمی، شده است (۵۵). مدت طولانی است که نقش RNAهای غیر کد کننده در فرایندهای پایه مانند عملکرد Xist در آغاز غیرفعال شدن کروموزوم X مشخص شده است (۵۶).

RNAهای غیرکد کننده Antisense در فرایند Imprinting نقش داشته و این مسئله پیشنهاد کننده الگویی است که در آن Antisense RNA می‌تواند خاموشی ژن را القا کرده و از این طریق بیان ژن را در سلول‌های طبیعی و سرطانی تنظیم نماید (۵۷). قابل ذکر است که Antisense RNA خاموشی رونویسی ژن گلوبینی آلفا را از طریق متیلاسیون جزایر CpG در ژن α -گلوبین القا می‌نماید (۵۸).

میکروRNAها، RNAهای کوچک غیر کد کننده هستند که بیان ژن را از طریق مکانیسم‌های پس از رونویسی تنظیم کرده و بر اساس نتایج پیش‌بینی‌های کامپیوتری می‌توانند بسیاری از ژن‌های کنترل کننده چرخه سلولی را تنظیم کنند (۵۹).

افزایش بیان miR-۱۵۵/BIC در لنفوم هوچکین Hodgkin Lymphoma گزارش شده است. نشان داده شده که جایگاه ژنی Bic بطور اختصاصی با ورود ویروس فعال شده و با C-MYC در شکل‌گیری لنفوم همکاری دارد. با وجود اینکه هنوز مطالعه مرتبط بر روی مدل حیوانی انجام نشده اما به نظر می‌رسد که miR-۱۵۵ کاندیدی برای بیان نقش میکروRNAها در پیشرفت سرطان باشد (۶۰). کاهش بیان miR۱۵ و miR۱۶ نیز در دوسوم موارد مطالعه شده لوسمی لنفوسیتی مزمن Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) گزارش شده است (۶۱).

یک بررسی انجام شده بر روی ۱۸۶ ژن میکروRNA انسانی نشان

با وجود نیاز به انجام مطالعات بیشتر به نظر می‌رسد که فسفریلاسیون هیستون نیز با سرطان مرتبط باشد. فسفریلاسیون هیستون در پاسخ ترمیمی به آسیب DNA، پایداری کروموزوم و آپوپتوز نقش دارد. اخیراً گزارش شده که JAK۲ که از جمله پروتئین‌های پیام‌دهی درون سیتوپلاسمی است در هسته نیز حضور داشته و مستقیماً H۳Y۴۱ را فسفریله می‌کند. H۳Y۴۱ph نیز از اتصال Heterochromatin Protein ۱α (HP-۱α) به H۳ Heterochromatin Protein ۱α ممانعت کرده و بیان ژن‌های آن منطقه از جمله Imo۲ را افزایش می‌دهد. فعال شدن JAK۲ در اثر جابجایی‌ها و یا جهش‌های نقطه‌ای ژنی در بدخیمی‌های خونی شایع است (۴۹).

تغییر وضعیت قرارگیری نوکلئوزوم

تمامی خانواده‌های پروتئین‌های تغییر دهنده شکل کروماتین با سرطان مرتبط هستند، اگرچه که در اغلب موارد، مکانیسم‌های مولکولی زمینه‌ساز عملکرد آنها ناشناخته باقی مانده است. بطور مثال BRG۱ و BRM که زیرواحدهای ATP‌آزی کمپلکس‌های SWI/SNF هستند بعنوان سرکوبگرهای توموری شناخته شده و در حدود ۲۰-۱۵ درصد از موارد سرطان ریه خاموش شده‌اند. جالب اینکه یک نقش انکوژنی برای BRG۱ بعنوان ناپایدار کننده P۵۳ پیشنهاد شده است. کمپلکس SWI/SNF بیان ژن را بصورت موضعی تنظیم کرده و بررسی انواع جهش یافته آن در مخمر نشان داده که حدود ۵ درصد ژن‌های مخمر تحت تاثیر آن هستند. SWI/SNF با بسیاری از پروتئین‌های دخیل در شکل‌گیری سرطان از قبیل RB، p۵۳، MYC، MLL، BRCA۱ و β -catenin واکنش داشته و بنابراین غیرفعال شدن آن، بسیاری از مسیرهای کنترل رشد سلول را مختل می‌سازد (۵۰ و ۵۱).

تغییر وضعیت قرارگیری نوکلئوزوم همچنین در سرکوب رونویسی توسط هیپرمتیلاسیون پروموتور شرکت دارند. هیپرمتیلاسیون پروموتور موجب اشغال TSS توسط نوکلئوزوم شده که این مسئله برای MLH۱ در سرطان کولون گزارش شده است (۵۲). ژن‌های کد کننده زیرواحدهای کمپلکس‌های تغییر وضعیت کروماتین (مانند CHD۵)، خود نیز هدف هیپرمتیلاسیون جزایر CpG در سرطان بوده که این مسئله موجب کاهش بیان آنها و اختلال در فرایند تغییر ساختار طبیعی کروماتین می‌شود (۵۳).

مزمن Chronic Myelocytic Leukemia (CML) می باشد (۶۵-۶۳).
Hydralazine نیز بعنوان داروی ضد فشار خون مورد تایید بوده و اخیرا
اثر مهارى آن بر متیلاسیون DNA و فعال کردن مجدد سرکوبگرهای
سرطان گزارش شده است (۶۶).

مهار فارماکولوژیک متیلاسیون DNA موجب به دام افتادن آنزیم های
DNMT شده و با تخریب هدفمند آنها موجب بیان مجدد ژن هایی
می شود که در اثر هایپرمتیلاسیون نابجا خاموش شده بودند و بطور
همزمان، مانع تکثیر کلونال و رشد سلول توموری، القاء تمایز سلولی
و مرگ سلول سرطانی می شود (۶۴).

اینکه چگونه مهارکننده های DNMT (DNMTi) بطور اختصاصی بر
روی سلول های توموری اثر می کنند هنوز بخوبی شناخته نشده
است. اما چنانچه این عوامل وارد DNA تازه تکثیر یافته شوند فقط
سلول های به سرعت تکثیر شونده مانند سلول های توموری را مورد
هدف قرار خواهند گرفت.

مطالعات بالینی گسترده نشان می دهند که مهارکننده های DNMT،
عوارض جانبی کوتاه مدت و قابل کنترل را در دوزهای با اثربخشی
مناسب دارند. با این حال، می بایست اثرات بلند مدت مهار مداوم
فعالیت آنزیم های DNMT بررسی گردد (۶۴ و ۶۷).

مهارکننده های داستیلاز هیستونی

تعداد گسترده ای از مهارکننده های داستیلاز هیستونی (HDACi) از

داده که توزیع ژن های میکرو RNA ها در طول ژنوم بصورت تصادفی
نبوده و عمدتا در نواحی شناخته شده شکننده و جایگاههای مرتبط
با سرطان قرار دارند (۶۲).

مطالعات بیشتر در آینده نقش های بیولوژیک و مهم RNA های مهار
کننده (RNAi) در شکل گیری سرطان را آشکار خواهد ساخت.

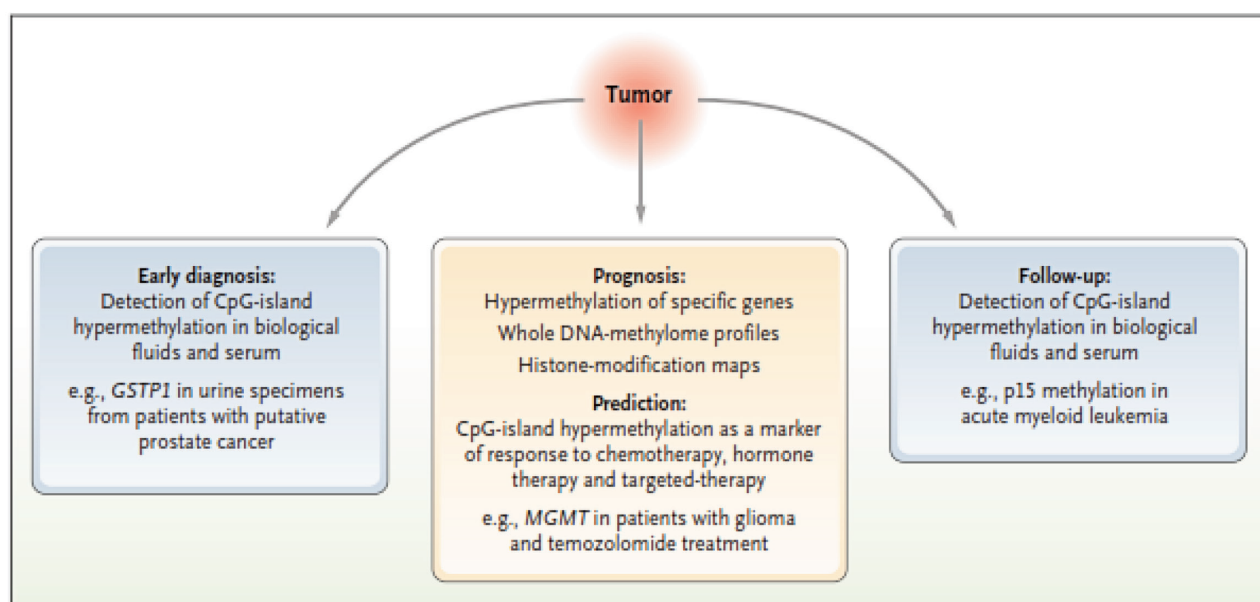
هدفگیری سرطان با درمان بر پایه اپی ژنتیک

برخلاف جهش های ژنتیکی، اکثر تغییرات اپی ژنتیکی ممکن است
قابل برگشت یا پیشگیری باشند. لذا، بازگرداندن وقایع اپی ژنتیک
نابجا در سلول های نوپلاستیک، یک روش درمانی رو به گسترش
در درمان یا پیشگیری سرطان است (شکل شماره ۳).

امروزه هدفگیری فارماکولوژیک متیلاسیون DNA و استیلاسیون و
متیلاسیون هیستونی امکانپذیر است: (جدول شماره ۱)

مهار کننده های متیلاسیون DNA

تعدادی از مهار کننده های متیلاسیون DNA تحت مطالعه بوده و
عبارتند از: azacitidine (Vidaza, decitabine (Dacogen, SuperGen)
azacitidine و decitabine. (جدول شماره ۱). hydralazine و Gelgene)
مورد تایید FDA جهت درمان برخی از زیرگروه های سندرم های
میلودیس پلاستیک Myelodysplastic Syndrome (MDS) مانند آنمی
مقاوم Refractory Anemia (RA) و همچنین لوسمی میلوستیتی



شکل ۳- مدیریت سرطان بر اساس اپی ژنتیک

جدول ۱- داروهای بر پایه اپی ژنتیک و مراحل بالینی آنها

Epigenetic target	Compound	Developmental stage
HDACs (class I, IIa, IIb, IV)	Vorinostat (SAHA)	FDA approved for CTCL
	Panobinostat (LBH589)	Phase I/II
	Belinostat (PXD101)	Phase I/II
	ITF2357	Phase I
HDACs (class I, IIa)	PCI-24781	Phase I
	Phenylbutyrate	Phase I/II
	VPA	Phase I/II
HDACS 1, 2	Romidepsin (depsipeptide)	Phase I/II
	SK-7041	Experimental
	SK-7068	Experimental
HDACs 1, 3	MS-275	Phase I/II
	CI-994	Phase I
	MGCD0103	Phase I/II
	Apicidin	Experimental
HDACs 2, 3	Tubacin	Experimental
HDAC 6	SB-379872A	Experimental
HDAC8	PCI-34051	Experimental
DNMT	Vidaza (5-azacytidine)	FDA approved for myelodysplastic syndromes
	Decitabine (5-aza-2'-deoxycytidine)	Experimental
	Zebularine	Experimental
	RG108	Experimental
	Procaine	Experimental
	Hydralazine	Phase I
	(-)-epigallocatechin-3-gallate noncovalent enzyme (EGCG)	Experimental
SIRT1-7	Nicotinamide	Experimental
SIRT1, 2	Tenovin-1-3, 5-6	Experimental
	Sirtinol	Experimental
	Splitomycin	Experimental
	Cambinol	Experimental
	SRT1720	Experimental
SIRT1	EX-527	Experimental
	NF657	Experimental
	AGK2	Experimental
SIRT2	Suramin	Experimental
SIRT5	BIX-01294	Experimental
HMT (G9a)	Chaetocin	Experimental
HMT (SU(VAR)3-9, G9a)	DZNep	Experimental
Polycomb group proteins	Polyamine analogs	Experimental
LSD1		

منابع طبیعی تخلیص شده و یا سنتز شده‌اند و بسیاری از آنها نیز تا مراحل مطالعه بالینی پیش رفته‌اند. بیشتر HDACiهای مورد مطالعه، HDACهای کلاس‌های I، II و IV و گروه‌های خاصی از آنها کلاس III (Sirtuins) را هدف قرار می‌دهند (۶۸). (جدول شماره ۱).

HDACi اثرات ضد توموری خود را با میانجی‌گری تعدادی از پاسخ‌های بیولوژیک مانند القاء مرگ سلول توموری، مهار پیشرفت چرخه سلولی، سرکوب رگ‌زایی Angiogenesis و افزایش پاسخ ایمنی اعمال می‌کند (۶۸). مدل اولیه برای توصیف اثرات بیولوژیک HDACi شامل تغییرات در بیان ژن بعنوان یک نتیجه مستقیم ناشی

از هایپراستیلایسیون در یک جایگاه ژنی خاص است. بررسی‌ها نشان داده که بیش از ۵ درصد ژن‌ها بدنبال استفاده از HDACi دچار تغییر در بیان می‌شوند (۶۸). اما می‌دانیم که هیستون‌ها تنها اهداف آنزیم HDAC نبوده و یک طیفی از پروتئین‌های غیرهیستونی مورد هدف آنزیم‌های HDAC قرار گرفته که عملکرد آنها با استیلایسیون تنظیم می‌شود (۶۹). این پروتئین‌ها عبارتند از: فاکتورهای رونویسی مانند NF- κ B، p53 و E2F1 که نقش‌های مهمی در شکل‌گیری تومور و پاسخ‌های ضد توموری دارند (۶۹ و ۷۰). همچنین پروتئین‌هایی که در ترمیم DNA (مانند Ku70)، پایداری

بحث و نتیجه گیری

توجه به نقش مهم نقایص اپی ژنتیک در بروز و پیشرفت سرطان بطور قابل توجهی در طی سالهای اخیر افزایش یافته است. اکنون مشخص شده که اختلال در مکانیسم های اپی ژنتیک می تواند با تاثیر و همکاری با جهش های سرطانزا موجب پیشرفت رشد تومور شود. بنابراین مدیریت وقایع اپی ژنتیکی نابجا بعنوان راهی برای هدف قرار دادن شکل گیری و یا پیشرفت سرطان، یک روش درمانی منطقی و موثر است.

تاثیرگذاری درمان های اپی ژنتیک در درمان سندرم های میلودیس پلاستیک و پیشگیری از تغییرات لوسمیک، نشانگر تقدم اختلالات اپی ژنتیک بر شروع سرطان است. از اینرو درمان اپی ژنتیک، راهی امیدبخش برای پیشگیری و درمان بدخیمی ها است. یکی از جنبه های جالب توجه درمان اپی ژنتیک، توانایی آن در تقویت اثربخشی و همچنین نحوه پاسخ به درمان های کنونی است. فهم ارتباط بین اپی ژنتیک و سرطان در تعیین پیش آگهی نیز همانند درمان دارای استفاده های کاربردی است.

به نظر می آید که بسیاری از جنبه های اپی ژنتیک هنوز ناشناخته بوده و مطالعات مختلف برای کشف دیگر مکانیسم های اپی ژنتیک و ارتباط آنها با یکدیگر و همچنین با بروز و یا پیشرفت بیماری های مختلف خصوصا سرطان ادامه دارد.

پروتئین (مانند Hsp90) و اسکلت سلولی (مانند توبولین) و سایر پروتئین هایی که ارتباط مستقیمی با تنظیم بیان ژن ندارند، می توانند مستقیما استیل شوند (۶۸).

لذا HDACi ممکن است با تاثیر بر عملکرد این پروتئین ها موجب کاهش رشد و بقای تومور شوند. تنظیم کننده های فعالیت Sirtuin می توانند فعالیت آنزیم را القا و یا سرکوب کنند (جدول شماره ۱). با توجه به نقش Sirtuin ها در سرکوب تومور در برخی شرایط خاص، فعال کننده های Sirtuin ممکن است بعنوان عوامل شیمیایی مهار میفید باشند (مانند SIRT1 و SIRT2) (۷۱).

مهارکننده های متیلاسیون هیستونی

نقش آنزیم های هیستون متیل ترانسفراز (HMT) در تومورزایی منجر به تولید تنظیم کننده های مولکولی کوچک علیه این آنزیم ها شده است (جدول شماره ۲). Chaetocin اولین مهار کننده HMT تولید شده بوده و به نظر می آید که داری اثرات انتخابی بر علیه کلاس Suv39 از آنزیم های HMT باشد. این عامل موجب مرگ سلول های سرطانی در شرایط *in vitro* شده در حالی که سلول های طبیعی نسبت به آن غیر حساس می باشند (۷۲). Chaetocin همچنین اثر ضد توموری قوی در شرایط *in vivo* دارد (۷۳).

References

- Waddington CH. The epigenotype. Endeavour. 1942; 1: 18-20.
- Waddington CH. The Epigenetics of birds. Cambridge University Press. 1953.
- Hall BK. In search of evolutionary developmental mechanisms: the 30-year gap between 1944 and 1974. J Exp Zool B Mol Dev Evol. 15 January 2004; 302 (1): 5-18.
- Álvarez-Buylla ER, Chaos Á, Aldana M, Benítez M, Cortes-Poza Y, et al. Floral Morphogenesis: Stochastic Explorations of a Gene Network Epigenetic Landscape. PLoS ONE 2008; 3 (11): 36265.
- Holliday R. DNA Methylation and Epigenetic Inheritance. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences. 1990; 326 (1235): 329-338.
- Riggs AD, Russo VEA, Martienssen RA. Epigenetic mechanisms of gene regulation. Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1996.
- NIH Roadmap Epigenomics Project Overview.
- Berger SL, Kouzarides T, Shiekhhattar R, Shilatifard A, Kouzarides, Shiekhhattar, Shilatifard. An operational definition of epigenetics. Genes Dev. 2009; 23 (7): 781-3.
- Portela A and Esteller A. Epigenetic modifications and human disease. Nature biotechnology 2010; 28.
- Esteller, M. Epigenetics in evolution and disease. Lancet. 2008; 372: S90-S96.
- Straussman, R. et al. Developmental programming of CpG island methylation profiles in the human genome. Nat. Struct. Mol. Biol. 2009; 16: 564-571.
- Reik, W, Lewis, A. Co-evolution of X-chromosome inactivation and imprinting in mammals. Nat. Rev. Genet. 2005; 6: 403-410.
- Lopez-Serra L, Esteller, M. Proteins that bind methylated DNA and human cancer: reading the wrong words. Br. J. Cancer. 2008; 98: 1881-1885.
- Thomson J.P. et al. CpG islands influence chromatin structure via the CpG-binding protein Cfp1. Nature. 2010;

464: 1082-1086.

- 15- Irizarry R A. et al. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hyper-methylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat. Genet.* 2009; 41: 178-186.
- 16- Hellman A. & Chess A. Gene body-specific methylation on the active X chromosome. *Science* 2007; 315: 1141-1143.
- 17- Lister R. et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 2009; 462: 315-322.
- 18- Laurent L. et al. Dynamic changes in the human methylome during differentiation. *Genome Res.* 2010; 20: 320-331.
- 19- Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell.* 2007; 128: 693-705.
- 20- Rando O.J. & Chang H.Y. Genome-wide views of chromatin structure. *Annu. Rev. Biochem.* 2009; 78: 245-271.
- 21- 55. Huertas D, Sendra R. & Munoz P. Chromatin dynamics coupled to DNA repair. *Epigenetics.* 2009; 4: 31-42.
- 22- Li B, Carey, M. & workman J L. The role of chromatin during transcription. *Cell.* 2007;128: 707-719.
- 23- Ooi S K. et al. DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature.* 2007; 448: 714-717.
- 24- Fuks F. et al. The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 4035-4040.
- 25- Chi P, Allis, C D. & wang G G. Covalent histone modifications-miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers. *Nat. Rev. Cancer.* 2010; 10: 457-469.
- 26- Schones D E. et al. Dynamic regulation of nucleosome positioning in the human genome. *Cell.* 2008; 132: 887-898.
- 27- Cairns B R. The logic of chromatin architecture and remodelling at promoters. *Nature.* 2009; 461: 193-198.
- 28- Getun LV WU ZMK, Khalil A.M. & Bois P.R. Nucleosome occupancy landscape and dynamics at mouse recombination hotspots. *EMBO Rep.* 2010; 11: 555-560.
- 29- Zilberman D, Coleman-Derr D, Ballinger T & Henikoff S. Histone H2A.Z and DNA methylation are mutually antagonistic chromatin marks. *Nature.* 2008; 456: 125-129.
- 30- Yoo A S, Staahl B T, Chen L & Crabtree, G R. MicroRNA-mediated switching of chromatin-remodelling complexes in neural development. *Nature.* 2009; 460: 642-646.
- 31- Goelz S E, Vogelstein B, Hamilton S R & Feinberg A P. Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. *Science.* 1985; 228: 187-190.
- 32- Wilson A S, Power B E & Molloy P L. DNA hypomethylation and human diseases. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007; 1775: 138-162.
- 33- Futscher B W. et al. Aberrant methylation of the maspin promoter is an early event in human breast cancer. *Neoplasia.* 2004; 6: 380-389.
- 34- Esteller M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum. Mol. Genet.* 2007; 1: 50-59.
- 35- Li M. et al. Sensitive digital quantification of DNA methylation in clinical samples. *Nat. Biotechnol.* 2009; 27: 858-863.
- 36- Doi A. et al. Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat. Genet.* 2009; 41: 1350-1353.
- 37- Lujambio A. et al. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res.* 2007; 67: 1424-1429.
- 38- Lujambio A. et al. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 2008; 105: 13556-13561.
- 39- Di Croce L. et al. Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science.* 2002; 295: 1079-1082.
- 40- Frigola J. et al. Epigenetic remodeling in colorectal cancer results in coordinate gene suppression across an entire chromosome band. *Nat. Genet.* 2006; 38: 540-549.
- 41- Miremadi A, Oestergaard M Z, Pharoah P D, & Caldas C. Cancer genetics of epigenetic genes. *Hum.Mol.Genet.* 2007; 1: 28.
- 42- Fraga M F. et al. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat. Genet.* 2005; 37: 391-400.
- 43- Vaquero A, Sternglanz R, & Reinberg D. NAD⁺-dependent deacetylation of H4 lysine 16 by class III HDACs. *Oncogene* 2007; 26: 5505-5520.
- 44- Espada J. et al. Epigenetic disruption of ribosomal RNA genes and nucleolar architecture in DNA methyltransferase1 (Dnmt1) deficient cells. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35: 2191-2198.
- 45- Noonan E.J. et al. miR-449a targets HDAC-1 and induces growth arrest in prostate cancer. *Oncogene.* 2009; 28: 1714-1724.
- 46- Kondo Y. et al. Alterations of DNA methylation and histone modifications contribute to gene silencing in hepatocellular carcinomas. *Hepatol. Res.* 2007; 37: 974-983.
- 47- Dalglish G L. et al. Systematic sequencing of renal carcinoma reveals inactivation of histone modifying genes. *Nature* 2010; 463: 360-363.
- 48- Wang P. et al. Global analysis of H3K4 methylation defines MLL family member targets and points to a role for MLL1-mediated H3K4 methylation in the regulation of transcriptional initiation by RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* 2009; 29: 6074-6085.
- 49- Shi Y. Histone lysine demethylases: emerging roles in development, physiology and disease. *Nat. Rev. Genet.* 2007; 8: 829-833.
- 50- Anders H. Lund and Maarten van Lohuizen. *Epigenetics and cancer.* *Genes. Dev.* 2004; 18: 2315-2335.
- 51- Naidu S R, Love L M, Imbalzano A N, Grossman S R, &

- Androphy E J. The SwI/ SNF chromatin remodeling subunit BRG1 is a critical regulator of p53 necessary for proliferation of malignant cells. *Oncogene* 2009; 28: 2492-2501.
- 52- Lin J C. et al. Role of nucleosomal occupancy in the epigenetic silencing of the MLH1 CpG island. *Cancer Cell* 2007; 12: 432-444.
- 53- Mulero-Navarro S, & Esteller M. Chromatin remodeling factor CHD5 is silenced by promoter CpG island hypermethylation in human cancer. *Epigenetics* 2008; 3: 210-215.
- 54- Sporn J C. et al. Histone macroH2A isoforms predict the risk of lung cancer recurrence. *Oncogene* 2009; 28: 3423-3428.
- 55- Bartel D P. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-297.
- 56- Plath K, Mlynarczyk-Evans S, Nusinow D A, and Panning B. Xist RNA and the mechanism of X chromosome inactivation. *Annu. Rev. Genet.* 2002; 36: 233-278.
- 57- Rougeulle C and Heard E. Antisense RNA in imprinting: Spreading silence through air. *Trends Genet.* 2002; 18: 434-437.
- 58- Tufarelli C, Stanley J A, Garrick D, Sharpe, J A, Ayyub H, Wood W G, and Higgs, D R. Transcription of antisense RNA leading to gene silencing and methylation as a novel cause of human genetic disease. *Nat. Genet.* 2003; 34: 157-165.
- 59- Lewis B P, Shih, L H, Jones-Rhoades M W, Bartel D P, and Burge C B. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 2003; 115: 787-798.
- 60- Tam W, Hughes, S H, Hayward WS, and Besmer P. Avian bic, a gene isolated from a common retroviral site in avian leukemia virus-induced lymphomas that encodes a noncoding RNA, cooperates with c-myc in lymphomagenesis and erythroleukemogenesis. *J. Virol.* 2002; 76: 4275-4286.
- 61- Calin G A, Dumitru C D, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Alder H, Rattan S, Keating M, Rai K, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002; 99: 15524-15529.
- 62- Calin G A, Sevignani C, Dumitru C D, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004; 101: 2999-3004.
- 63- Jones PA, Baylin S B. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007; 128: 683-92.
- 64- Issa JP. DNA methylation as a therapeutic target in cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 1634-7
- 65- Gal-Yam EN, Saito Y, Egger G, Jones PA. Cancer epigenetics: modifications, screening, and therapy. *Annu Rev Med* 2008; 59: 267-80.
- 66- Candelaria M, Gallardo-Rincon D, Arce C, et al. A phase II study of epigenetic therapy with hydralazine and magnesium valproate to overcome chemotherapy resistance in refractory solid tumors. *Ann Oncol* 2007; 18: 1529-38.
- 67- Jabbour E, Issa JP, Garcia-Manero G, Kantarjian H. Evolution of decitabine development: accomplishments, ongoing investigations, and future strategies. *Cancer* 2008; 112: 2341-51
- 68- Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 769-84.
- 69- Johnstone RW, Licht JD. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: is transcription the primary target? *Cancer Cell* 2003; 4: 13-8.
- 70- Johnstone RW, Ruefli A A, Lowe SW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 2002; 108: 153-64.
- 71- Leigh Ellis, Peter W. Atadja and Ricky W. Johnstone. Epigenetics in cancer: Targeting chromatin modifications *Mol Cancer Ther* 2009; 8: 1409-1420.
- 72- Greiner D, Bonaldi T, Eskeland R, Roemer E, Imhof A. Identification of a specific inhibitor of the histone methyltransferase SU (VAR) 3-9. *Nat Chem Biol* 2005; 1: 143-5.
- 73- Isham CR, Tibodeau JD, Jin W, Xu R, Timm MM, Bible KC. Chaetocin: a promising new antimyeloma agent with in vitro and in vivo activity mediated via imposition of oxidative stress. *Blood* 2007; 109: 2579-88.