

Prostat kanseri tanısında DNA metilasyonunun yeri var mı?

Has DNA methylation any impact in prostate cancer diagnosis?

Dr. Buket Kosova, Tıbbi Biy. Rukiye Özel, Tıbbi Biy. Çağdaş Aktan
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir

ÖZET

Derlemenin amacı: Günümüzde kanser, çeşitli genetik ve epigenetik değişiklikler sonucunda onkogenlerin aktif ve tümör baskılayıcı genlerin inaktif hale geldiği karmaşık bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Genetik değişikliklerden olan mutasyonlar uzun yıllardır kanser ile ilişkili olarak araştırılmalarına karşılık, epigenetik değişikliklerden DNA metilasyonu daha son 20 yıldır, fakat artan bir ilgisiyle kanser ile ilişkili olarak araştırılmaya başlanmıştır.

Yeni bulgular: DNA metilasyonunun kanser araştırmalarında bu kadar öne çıkmasının başlıca nedenleri, kanserin erken aşamalarında ve çeşitli vücut sıvılarında yüksek özgüllük ve duyarlılık ile saptanabiliyor olabilmesi ve mutasyonlardan farklı olarak çeşitli ilaçlar ile ortadan kaldırılabilesidir. Erkeklerde en sık görülen ve mortalitesi yüksek olan ürogenital sistemi kanserlerinden prostat kanserinin tanısı, halen yaygın olarak parmak ile rektal muayene ve prostat spesifik antijen bakışı ile gerçekleştirilmektedir. Artık bu yöntemlere ek olarak, prostat kanseri riski altında bulunan erkeklerin serum, plazma veya idrarlarından rutin olarak glutatyon S-transferaz pi 1 gibi genlerin DNA metilasyonuna bakılması biyopsiye oranla daha az veya non-invazif bir girişim olarak benimsenmiş; aynı zamanda, prostat kanserinin erken tanısı ve tedavisi- ne olanak sağladığı için de tercih edilir hale gelmiştir.

Sonuç: Teknolojinin ilerlemesine bağlı olarak yeni ve hızlı DNA metilasyon tanı yöntemleri geliştirilmiş ve birçok laboratuvarında rutin uygulanır hale gelmiştir. Derlememizde, prostat kanseri örneğinde DNA metilasyon alanındaki tüm bu heyecan verici gelişmeleri güncel araştırma sonuçları ile birlikte aktarmaya çalışacağız.

Anahtar kelimeler: prostat kanseri, kanser tanısı, dna metilasyonu, histon deasetilasyonu, epigenetik

İletişim (✉): buket.kosova@ege.edu.tr

Kanser tanısındaki halen en önemli konulardan biri iyi huylu olan benign tümörlerin, kötü huylu malign tümörlerden ayırt edilmesidir. Benign tümörlerin etrafları bağ dokusu ile kuşatılmış olduğundan, çevre dokuya veya vücudun uzak bölgelerine yayılım göstermezler. Buna karşılık, malign tümörler hem çevredeki normal dokuya, hem de kan ya da lenfatik sistem yoluyla vücudun diğer bölgelerine yayılarak metastaz oluşturabilmektedirler (1). Ürogenital kanserlerden prostat kanseri %14'lük bir oranla erkeklerde en sık görülen kanserler sıralamasında ikinci yeri alırken; yine, kansere

ABSTRACT

Aim of this review: Today cancer is defined as a complex disease that is caused by various genetic and epigenetic alterations resulting both in oncogene activation and tumor suppressor gene inactivation. Among the genetic alterations leading to cancer, mutations have been investigated for many years. However, DNA methylation, an epigenetic alteration, has attracted a growing attention in cancer investigations for the last 20 years.

New findings: The unique importance of DNA methylation in cancer research is that it can be specifically detected in various body fluids to diagnose cancer at its early stages. Moreover, unlike mutations, DNA methylation can be prevented and/or reversed by some agents. Prostate cancer which is the most frequently observed cancer type in men has a high mortality rate; but, its diagnosis is still largely dependent on the determination of prostate specific antigen in blood followed by a physical detection known as digital rectal examination. In addition to these methods, detection of DNA methylation as in the case of glutathione S-transferase pi 1 gene in serum, plasma or urine of suspected patients can routinely be performed due to its fast administration protocols and because it is less invasive as opposed to biopsy.

Conclusion: Owing to recent technological improvements in rapid DNA methylation detection methods, this procedure has also become routinely applicable in many laboratories. In this review, we will discuss all the exciting progressions in this DNA methylation field along with some up-to-date data on prostate cancer.

Key words: prostate cancer, cancer diagnosis, dna methylation, histone deacetylation, epigenetics

bağlı ölüm nedenleri arasında %6'lık bir oranla altıncı sırada yer almaktadır (2). Bununla birlikte, prostat kanserinin insidansı ve mortalitesi ırksal ve etnik gruplar arasında ve ülkeden ülkeye farklılıklar gösterebilmektedir (3). Hastalığın gelişiminde ileri yaş, yaşam tarzı, beslenme, bozulmuş androjen metabolizması, çevresel ve genetik faktörler gibi birkaç risk faktörü daha tanımlanmıştır (4, 5). Genetik faktörlerden mutasyon ve polimorfizmler DNA'da kalıcı nükleotid değişiklikleri oluşturmalarına karşılık, epigenetik değişimler DNA'da kalıcı gen ekspresyon değişiklikleri oluştururlar (6).

“Epigenetik değişikliklerden DNA metilasyonu ve Histon deasetilasyonu karsinogenezde önemli bir rol oynar.”

ve CpT dizilerinde de meydana gelir. Ayrıca, *Escherichia coli* bakterisinde sitozinin dışında adenin de metillenir (8). Memeli genomunda sitozin metilasyonunun önemli olduğu bölgeler CpG adaları, G+C izokorları ve CpG sıcak noktalarıdır.

CpG adaları

CpG dinükleotidlerine zengin ve 0.5 – 4 kilobaz uzunluğundaki DNA bölgeleri CpG adaları olarak tanımlanır (Şekil 1) (11, 17). Bu bölgelerin CpG içeriği %50’den fazladır ve normalde metile değildir (17-19). Buna karşılık, genom genelinde dağınık halde bulunan CpG’lerin %70’i metiledir. CpG adaları özellikle dokularda devamlı ifade edilen bazı genlerin promoter bölgeleri ve ilk ekzonlarında bulunurlar (Şekil 1A) (16, 20).

Normalde metile olmayan CpG adalarının, metile oldukları bilinen 4 durum bilinmektedir (21-25).

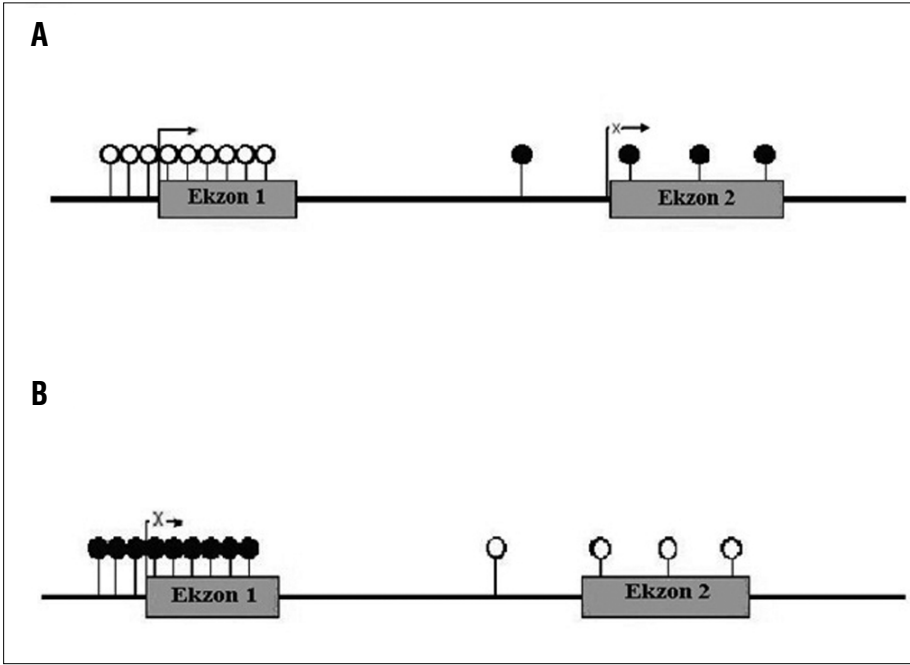
Bunlar,

- 1- Kadınlarda ikinci X kromozomu
- 2- İmprintlenmiş genler
- 3- Embriyonik gelişime özgül genler
- 4- Dokuya özgül genler’dir.

G+C izokorları

İnsan genomu G+C içeriği farklı bölgelelere, yani izokorlara ayrılabilir. İzokorlar kendi içinde benzer G+C içeriğine sahiplerken, gruplar arasında belirgin farklılıklar gösterirler (26).

Beş farklı izokor ailesi tanımlanmıştır: L1 ve L2, G+C içeriği az (%40); H1 ve H2, G+C içeriği zengin (sırasıyla %45 ve %50); ve H3, G+C içeriği çok zengin (%53). G+C içeriği ve gen yoğunluğu arasındaki doğru orantılı ilişkiden dolayı H3 izokorları en fazla gene, CpG adasına ve CG dinükleotidine sahiplerdir (8).



Şekil 1. (A) Normal hücrelerde metilasyon; (B) Kanser hücrelerinde metilasyon.

(A) Normal hücrelerde metilasyon. CpG adaları memeli genomunu oluşturan genlerin yarısının önündeki promoter bölgelerinde demetile halde bulunurlar (içi boş olan küreler) ve transkripsiyonu engellemezler (solda). Genom genelinde dağılmış halde bulunan CpG dinükleotidleri ise genellikle metile halde bulunurlar (içi dolu olan küreler) ve bazı durumlarda üzerinde buldukları genlerin transkripsiyonlarını engellerler (sağda); (B) Kanser hücrelerinde metilasyon. Kanser hücrelerinde promoter bölgeleri üzerindeki CpG adaların hipermetilasyonuna bağlı olarak transkripsiyonel susturma gerçekleşir. Buna karşılık, genom geneli CpG dinükleotidleri hipometilasyona bağlı olarak da transkripsiyonel aktivasyon gözlenir. (Şekil orijinal kaynağından alınmış (47), üzerinde değişiklikler yapılmış ve derlemeye uyarlanmıştır)

Prostat kanserinin klinik önemi ve yüksek yaygınlığına rağmen esas ortaya çıkış nedenleri, gelişimi ve ilerlemesiyle ilgili temel mekanizmalar daha tam olarak aydınlatılmamıştır ve bu nedenle yapılan çalışmalar ağırlıklı olarak ilaç ve biyokimyasal düzeydeki klinik araştırmalar ile sınırlı kalmıştır (7, 8). Ancak, multidisipliner bir yaklaşım ile ele alınması gereken prostat kanserinde genetik ve moleküler biyolojik çalışmaların önemleri de artık vazgeçilmez hale gelmiştir.

Epigenetik değişiklikler

Prostat kanserinin erken teşhisi günümüzde yaygın olarak parmak ile rektal muayene ve serum prostat spesifik antijenin (PSA) belirlenmesi ile sağlanmaktadır. Ancak, bu metotların sınırlı duyarlılığı ve özgüllüğünden dolayı prostat kanserinin erken evreleri güvenilir olarak belirlenemez (9). Bu nedenle, uygulanan klinik uygulamalara ek olarak prostat kanserinin erken teşhisi ve etkili tedavisinde genetik mutasyonların yanı sıra epigenetik değişikliklerin bakılması da artık söz konusu olmuştur (10).

Epigenetik tanımı ilk kez 1942 yılında Conrad Waddington tarafından ortaya atılmış ve

DNA dizi değişikliği olmadan mayotik ve/veya mitotik olarak kalıtılabilen gen ekspresyon değişiklikleri olarak tanımlanmıştır (11, 12). DNA metilasyonu için hipo- veya hipermetilasyon, histon modifikasyonları için asetilasyon veya deasetilasyon epigenetik değişikliklere örnek olarak verilebilir. Son onbeş yılda yapılan çalışmalar, epigenetik değişikliklerin tümör gelişiminde oldukça önemli olduklarını göstermiştir. Kanser gelişimi süresince meydana gelen epigenetik değişiklikler, tümör baskılayıcı genlerinin DNA metilasyonu ve kromatinin histon modifikasyonlarıdır (13, 14).

DNA metilasyonu

Metilasyon, memeli genomunda yalnızca CpG dinükleotidlerinde guanozine göre 5’lokalizasyon gösteren sitozin bazlarında meydana gelir (15). Sitozin bazının 5. karbonuna metil grubu (-CH₃) eklenmesiyle, 5-metilsitozin (5-MeC) oluşur (16). Genomda tüm sitozinlerin %3-4’ü metile halde bulunmaktadır. Transkripsiyon faktörleri metile olan bu bölgelere bağlanamadıklarından, DNA metilasyonu doğrudan mRNA transkripsiyonunun baskılanmasına neden olur. Memeli dışındaki canlılarda metilasyon düşük oranlarda CpNG, CC(a/t)GG, CpA

CpG sıcak noktaları

CpG bölgelerinin mutasyonlar için sıcak noktalar gibi davrandıkları gösterilmiştir: eşey hücre nokta mutasyonlarının %30'u 5-MeC'nin spontan deaminasyonu nedeniyle MeCpG → TpG transisyonu şeklinde gelişir (27).

DNA metil transferazlar

Sitozinin metillenmesi DNA replikasyonundan sonra 5. pozisyonundaki karbonuna metil donörü S-adenozilmetioninden (SAM) bir metil grubunun enzimatik transferi ile gerçekleşir. Enzimatik reaksiyon, DNA metiltransferazlar (DNMT) olarak bilinen enzimler tarafından katalize edilir (13, 14, 28-30). Memelilerde DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b ve DNMT3L olmak üzere toplam beş farklı formu tanımlanmıştır (31, 32). DNMT'ler metilasyon sinyallerinin muhafazası ve *de novo* metilasyon olmak üzere iyi karakterize edilmiş iki fonksiyona sahiptir. Ayrıca, DNA metilasyonu varlığı ve histon deasetilaz ile metil-CpG'ye bağlanan proteinlerle birlikte transkripsiyonel baskılayıcılar gibi görev görürler (12, 33).

histon deasetilazlar ve metil-CpG'YE bağlanan proteinler

Histonlar asetilasyon, metilasyon ve fosforilasyon gibi birkaç farklı şekilde modifiye olabilirler (34). Lizin aminoasidinde meydana gelen ve histon asetiltransferazlar (HAT) tarafından katalize edilen histon asetilasyonu, gen transkripsiyonunun aktivasyonuyla ilişkilidir. Histon deasetilaz (HDAC) vasıtasıyla katalize edilen histonların deasetilasyonu ise gen transkripsiyonunun susturulması ile ilişkilidir (35, 36). HDAC'lar, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonunun birbiriyile bağlantılı olduklarını kanıtlamaktadır (12).

HDAC'lar histon kuyruklarındaki lizin kalıntılarını deasetile ederek, komşu histonlar arasındaki ilişkiyi kolaylaştırırlar ve daha yoğun olarak paketlenmiş bir kromatin yapısının ortaya çıkmasını sağlarlar. Bu yoğun paketlenmiş yapı, transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanmasını engelleyerek gen ekspresyonunu baskılar.

Metil-CpG'ye bağlanan proteinlerden MECP2, metile CpG adalarına yüksek afinite gösterir; ayrıca, HDAC1'in ve transkripsiyonel korepresörlerin ortamda toplanmalarını neden olur (37). MECP2'den başka metile bağlanan proteinler (MBDs) de tanımlanmış ve MBD1-4 olarak isimlendirilmişlerdir (38).

MECP2 gibi, MBD2 ve MBD4 de transkripsiyonel baskılayıcılar olarak görev yaparlar.

Tüm bu bildiklerimizin yanında gen susturulmasında yine de hipoasetilasyonun mu, yoksa metilasyonun mu ilk gerçekleşen reaksiyon olduğu anlaşılamamıştır.

“DNA metilasyonu kanserin erken aşamalarında ve çeşitli vücut sıvılarında yüksek özgüllük ve duyarlılıkla saptanabilmektedir.”

DNA metilasyonunun fonksiyonu

DNA metilasyonunun bilinen iki önemli fonksiyonu bulunur:

1. Gen ifadesinin baskılanması
2. Genom güvenliği ve yapısal bütünlüğünün korunması

Gen ifadesinin baskılanması

5-MeC'deki metil grubu baz eşleşmesini, yani DNA replikasyonunu etkilemez; fakat, DNA'nın büyük oluşuna çıkıntı yaptığından dolayı protein-DNA etkileşmesini etkiler (16, 39). Bu nedenle, omurgalı genomundaki metilasyon transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını engelleyerek, bu yolla transkripsiyonun susturulmasına yol açar.

Genom güvenliği ve yapısal bütünlüğünün korunması

Memeli genomu, CpG adalarının dışında yer alan CpG dinükleotidleri açısından değerlendirildiğinde, bunların dağılımı şekilde buldukları ve büyük çoğunluğunun metile oldukları gözlenmektedir. Hatta, çoğu Me-CpG'nin L1- ve ALU- elemanları gibi parazitik DNA dizilerinin (retrotranspozonların) içinde yer aldıkları görülmektedir. Bu tekrarlayan diziler CpG'den zengindirler ve genomun yaklaşık %40'ını oluştururlar (40). DNA metilasyonunun retrotranspozonların ekspresyonlarını baskılayarak bir savunma mekanizması gibi de fonksiyon gördüğü ve buna bağlı olarak transkripsiyonel ünitelerdeki tekrarlayan elemanların DNA'ya entegrasyonlarını engellenmiş olduğu düşünülmektedir (41).

Tekrarlayan dizilerdeki azalmış metilasyonunun kromozomal instabiliteye neden olduğu bilinmektedir. Örneğin, perisentromik heterokromatin normal şartlarda yüksek oranda metillenmiş durumdadır; bu durumun, kromozomal konformasyonu koruduğu ve anormal rekombinasyonu önlemede önemli olduğu düşünülmektedir. Sentromerik heterokromatinin hipometilasyonu izokromozomlar, translokasyonlar ve delesyonlar gibi kromozomal bozuklukların ortaya çıkmasına neden olur (42). Burada DNA metilasyonunun görevi, rekombinasyonu başlatma bölgelerini bloke etmek veya kromatin yapısını yoğunlaştırarak homolog rekombinasyonu bastırmak olduğu düşünülmektedir (43).

Metilasyon kanserin erken teşhisi, sınıflandırılması, prognozu ve tedavisiyle ilgili önemli bilgiler verdiği için, son yıllarda kanser araştırmalarında da önemli bir yer tutmaktadır.

Metilasyon ve kanser

Kanser hücreleri normal hücrelerle karşılaştırıldıklarında DNA metilasyon desenlerindeki büyük değişiklikler hemen göze çarpmaktadır. Kanser hücrelerinde hipometilasyon çoğunlukla SINEs (*short interspersed nuclear elements*) ve LINEs (*long interspersed nuclear elements*) gibi tekrarlayan DNA dizilerinde, hipermetilasyon ise CpG adalarında görülmektedir (8). Metilasyona bağlı kanser gelişimi genom geneli hipometilasyon, CpG adalarındaki hipermetilasyon nedeniyle tümör baskılayıcı gen inaktivasyonu, ve CpG dinükleotitlerindeki mutasyonlar olmak üzere üç farklı mekanizma ile açıklanabilir.

Genom geneli hipometilasyon

Birçok farklı tümör tipinde gözlenen hipometilasyon, genellikle satellit dizilerde veya sentromerik bölgelerde yerleşim gösteren SINEs ve LINEs elemanlarında meydana gelir (42). LINEs, genomda bulunan çoğu kararsız DNA veya retrotranspozonlardır. Kararsız DNA'ların hipometilasyonu transkripsiyonel aktivasyona neden olmakta ve mesane kanseri gibi pek çok kanser çeşidinde ortaya çıkmaktadır (44). Hipometile olma durumu kromozomal instabilite, transpozabl elemanların reaktivasyonu ve imprinting kaybı yolları ile kansere yol açabilmektedir.

Genom geneli hipometilasyon hemen her insan tümörünü açıklayabilmektedir (45). Örneğin; metastatik karaciğer kanseri, servikal ve prostat kanseri gibi solid tümörlerde, B-hücreli kronik lenfositik lösemi gibi hematolojik tümörlerde hipometilasyon yaygındır

“Prostat kanseri tanısı ve takibinde DNA metilasyonuna bakılması biyopsiye oranla daha az invazif bir girişim olarak benimsenmiştir.”

(42). Kromozom 1 ve 16 üzerindeki perisentrik heterokromatin bölgeleri, bağışıklık sistemi eksikliği ve sentromerik instabiliteye sahip olan hastalarda ve pek çok kanserde hipometillenmiş durumdadırlar (46).

Tümör baskılayıcı gen hipermetilasyonu

CpG adaları memeli genomunu oluşturan genlerin promoter bölgelerinde metillenmemiş halde bulunurlar; buna karşılık, promoter bölgelerin hipermetilasyonu tümörlerde en fazla gözlenen epigenetik değişikliklerdendir (Şekil 1B). Bu nedenle, metilasyona bağlı olarak promoter bölgenin transkripsiyonel susturulması kanser gelişimi ile ilişkilidir (47).

Knudson'ın iki-vuruş hipotezine göre, belirli bir tümör baskılayıcı genin ekspresyon kaybına bağlı olarak ortaya çıkan tümör, ancak o genin her iki alelinin inaktive edilmesi sonucunda gelişir (48). Yapılan birçok çalışmada, eşey hücreleriyle kalıtılan ilk mutasyonun ardından ikinci alelin susturulmasındaki önemli mekanizmalardan birinin metilasyon olduğu görülmüştür. Yani, mutasyonlu alelin promoter bölgesinde herhangi bir değişiklik meydana gelmezken; sağlam alelde metilasyon sonucu inaktivasyon meydana gelmiştir.

Promoter bölge hipermetilasyonuna bağlı olarak susturulan ve böylece kansere neden olan aday tümör baskılayıcı genlerinin listesi gün geçtikçe uzamaktadır. Bunların arasında, önemli bir DNA tamir enzimini kodlayan O⁶- metilguanin- DNA metiltransferaz (*MGMT*) geni de bulunmaktadır. *MGMT* geninin susturulmasıyla DNA hasar tamiri uygun olarak gerçekleşemeyecek ve mutasyonlar birikecektir. Çünkü, *MGMT* geninin promoter bölge hipermetilasyonu aktif bir tamir enzimin sentezlenmesini engeller, DNA tamir görevi yerine getirilemez ve buna bağlı olarak genomda tamir edilemeyen mutasyonlar artar. Bunlar genellikle G→A değişimine neden olan mutasyonlardır. *MGMT* geni kolon, karaciğer ve lenfoid tümörlerde

Tablo 1. Prostat kanserinde %50'den yüksek sıklıkta metillen genler

Gen	Evre
Kanserojen Metabolizmasında Görevli	
<i>GSTP1</i>	HGPIN, primer & metastatik
Tümör Gelişiminde Negatif Regülatör	
<i>S100A2^b</i>	HGPIN, primer & metastatik
<i>APC^a</i>	HGPIN, primer & metastatik
Steroid Hormon Reseptörleri	
<i>ERαA^b</i>	Tüm evreler, hastalığın ilerlemesi ile artan sıklık
<i>ERαB</i>	Primer
<i>ERβ</i>	Primer, metastazda azalan sıklık
<i>RARβ2</i>	HGPIN, Tüm evreler, hastalığın ilerlemesi ile artan sıklık
'Scaffolding' Protein	
<i>Caveolin-1^a</i>	Primer
Hücre Adhezyonu	
<i>CD44</i>	Tüm evreler, hastalığın ilerlemesi ile artan sıklık
<i>TIG1</i>	Tüm evreler, hastalığın ilerlemesi ile artan sıklık
<i>PTGS2</i>	HGPIN, Primer & metastatik
Hücre Büyümesi / Çoğalması	
<i>MDR1</i>	Tüm evreler, hastalığın ilerlemesi ile artan sıklık
<i>RASSF1A^b</i>	HGPIN, primer & metastatik
<i>ZNF185</i>	Tüm evreler, hastalığın ilerlemesi ile artan sıklık
<i>NTRK2</i>	Primer
<i>HIN-1</i>	Primer & metastatik
<i>14-3-3σ</i>	Primer
<i>hSPRY2</i>	Primer
Normal Gelişim	
<i>EDNRB^{a,b}</i>	Primer, metastatik
Apoptoz	
<i>RTVP1/ GLIPR</i>	Primer
<i>CRBP1</i>	HGPIN, primer
<i>DcR1/ TRAILR3</i>	Bilinmiyor

GSTP1 (Glutathione S-transferase P1), **S100A2b** (S100 calcium-binding protein A2), **APCa** (Adenomatous polyposis coli), **ERαAb** (Estrogen receptor alpha A), **ERαB** (Estrogen receptor alpha B), **ERβ** (Estrogen receptor beta), **RARβ2** (Retinoic acid receptor β2), **Caveolin-1a**, **CD44** (CD44 molecule), **TIG1** (Tazarotene-induced gene-1), **PTGS2** (Prostaglandin endoperoxidase synthase 2), **MDR1** (Multidrug resistance 1), **RASSF1Ab** (Ras-association domain family 1A), **ZNF185** (Zinc finger protein 185), **NTRK2** (Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2), **HIN-1** (Harpin-induced 1), **14-3-3σ** (14-3-3 protein, Stratifin), **hSPRY2** (Sprouty homolog 2), **EDNRBa,b** (Endothelin receptor type B), **RTVP1/ GLIPR** (GLI pathogenesis-related 1), **CRBP1** (Cellular retinol binding protein 1), **DcR1/ TRAILR3** (Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10c).

Primer prostat kanseri sadece organa sınırlı değil ilerlemiş tümörleri de gösterir:

^aBu genler için farklı metilasyon sıklıkları rapor edilmiştir ve farklı CpG adalarının analizini yansıtır.

^bBu genlerin metilasyonu iyi ve kötü huylu tümörlerde aynı sıklıklarda meydana gelir.

promoter bölge hipermetilasyonuna bağlı olarak susturulmuştur. Susturulmuş *MGMT* alellerini içeren tümörlerde, sıklıkla *K-RAS* ve tümör protein p53 (*TP53*) gibi karsinogenezde önemli bazı genlerin mutasyonlarına da rastlanılır (49).

MGMT genine ek olarak, non-polipozis kolon kanserlerin gelişiminde rol oynayan bir

başka tamir geni de *MLH1*'dir. *MLH1* yanlış eşleşmeleri tamir eden bir enzimi kodlar ve mikrosatellit instabilitesi olan sporadik tümörlerde genellikle metilasyona bağlı olarak susturulmuştur (50).

Eşey hücrelerinde mutasyona bağlı olarak susturulmuş olan ve ailesel tip kanserlere neden olan genlerin, sporadik olarak

Tablo 2. Prostat kanserinde %50'den düşük sıklıkta metillen genler

Gen	Evre
Tümör Gelişiminde Negatif Regülatör	
<i>TIMP3</i> ^{a,b}	HGPIN, primer & metastatik
S100A6	Primer & metastatik
Hücre Adhezyonu	
<i>E-cad/ CDH-1</i> ^a	Tüm evreler, hastalığın ilerlemesi ile artan sıklık
TSLC1/ BL2/ IGSF4	Primer
LAM-A3, B3 & C3	Primer & metastatik
Hücre Büyümesi	
<i>NEP</i> ^c	Primer
CDH13	Primer & metastatik
Apoptoz	
FHIT	Primer & metastatik
DAPK	Primer & metastatik
DcR2/ TRAIL-R4	Bilinmiyor
Hücre Döngüsü Kontrolü	
Cyclin D2	Primer
COX2	Primer
p27/KIP1	Primer, metastatik
<i>p14</i> ^b	Primer
<i>p16/ CDKN2/ INK4A</i> ^{a,b}	HGPIN, primer & metastatik
Anjiyogenez	
THBS1	Primer
Steroid Hormon Reseptörleri	
AR	Tüm evreler, hastalığın ilerlemesi ile artan sıklık
DNA Tamiri	
<i>MGMT</i> ^d	HGPIN, primer & metastatik
Transkripsiyonel Düzenleme	
<i>RUNX3/ AML2</i>	HGPIN, primer

TIMP3^{a,b} (Tissue inhibitor of metalloproteinase 3), **S100A6** (Prolactin receptor-associated protein), **E-cad/ CDH-1**^a (E-cadherin), **LAM-A3, B3 & C3** (Laminin A3, B3 & C3), **NEP**^c (Neprilysin), **CDH13** (Cadherin 13, H-cadherin (heart)), **FHIT** (Fragile histidine triad gene), **DAPK** (Death-associated protein kinase 1), **DcR2/ TRAIL-R4** (Decoy receptor 2, DcR2/ TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 4), **RUNX3/ AML2** (Runt-related transcription factor 3), **THBS1** (Thrombospondin-1p180), **AR** (Androgen receptor), **MGMT**^d (6-O-methylguanine-DNA methyltransferase), **Cyclin D2** (Cyclin D2 pseudogene), **COX2** (Cytochrome c oxidase subunit II), **p27/KIP1** (Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)), **p14b, p16/ CDKN2/ INK4Aa,b** (Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A). Primer prostat kanseri sadece organa sınırlı değil ilerlemiş tümörleri de gösterir:

^aBu genler için farklı metilasyon sıklıkları rapor edilmiştir ve farklı CpG adalarının analizini yansıtır.

^bBu genlerin metilasyonu iyi ve kötü huylu tümörlerde aynı sıklıklarda meydana gelir.

^dMetilasyon sadece gen ifadesinin kaybı ile ilişkili örneklerde değerlendirilir.

ortaya çıkan formlarında da susturulmuş oldukları görülür. Fakat, genin sporadik kanserlerin %50'sinde mutasyona bağlı olarak değil de, hipermetilasyona bağlı olarak susturulmuş olduğu görülür. Von-Hippel Lindau (*VHL*), erken başlangıçlı meme kanseri 1 (*BRCA1*) ve serin/treonin kinaz 11 (*STK11*) genleri bunlara örnek olarak verilebilir (51, 52).

CpG dinükleotidlerindeki mutasyonlar

Bir genin kodlayan bölgesi içinde kalan CpG dinükleotidlerin metillenmesiyle mutasyonlar gelişebilir; çünkü, metile sitozinin kendisi mutajeniktir ve spontan hidrolitik deaminasyon ile C→T transisyonunu meydana getirerek mutasyonlar geliştirebilir (49). Somatik

“Mutasyonlardan farklı olarak DNA metilasyonu çeşitli ilaçlarla ortadan kaldırılabilmektedir.”

hücrelerdeki *TP53* tümör baskılayıcı genini kodlayan ekzon bölgelerindeki nokta mutasyonlarının %50'si metillenmiş sitozinlerden köken alır.

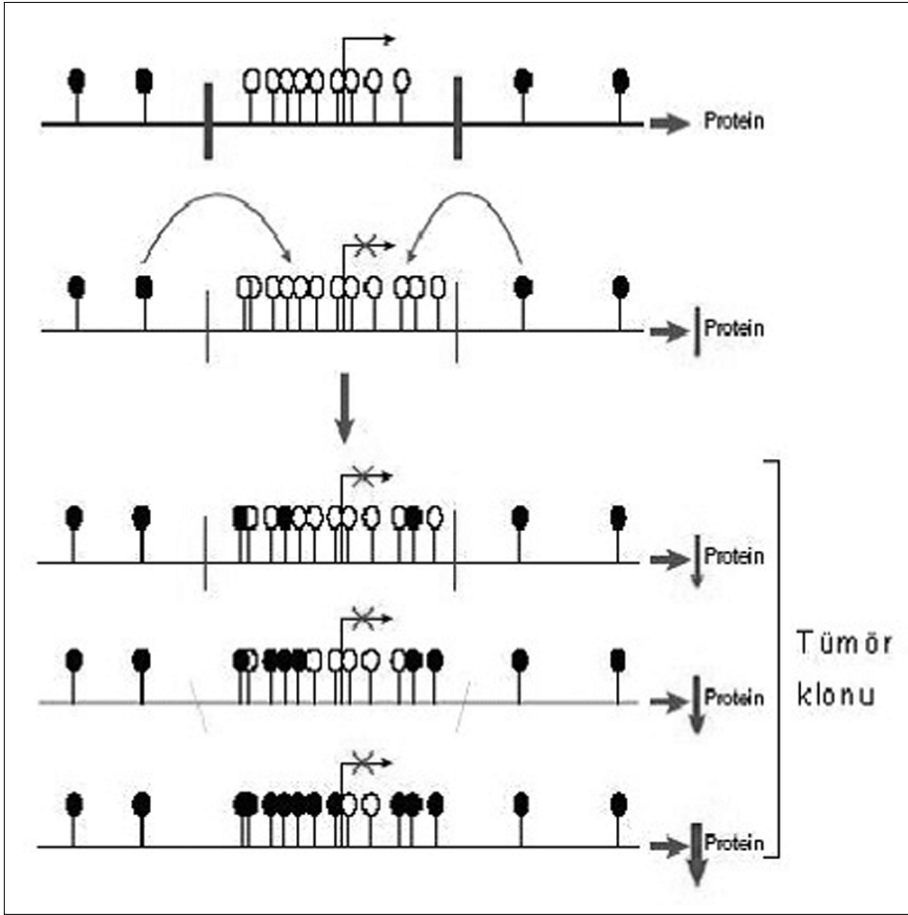
TP53 geninin ekzon bölgelerinde yerleşim gösteren CpG dinükleotidlerindeki metil gruplarının varlığı, ultraviyole ışığı (UV) ile oluşan mutasyonların oranını da arttırmaktadır (53). Çünkü, metillenmiş sitozinin soğurduğu dalga boyu değişir ve güneş ışığı aralığına kayar; CC→ TT mutasyonları gelişip, cilt kanserine yol açabilir.

Sigara dumanında bulunan benzo(a)pyrene diol epoxide ve başka karsinojenler metillenmiş sitozinlere daha yüksek afiniteyle bağlanarak bazı DNA bileşiklerini oluşturabilirler ve bunlardan sonra G→ T değişim mutasyonları gelişebilir (8).

Kısacası, kanserdeki metilasyon değişiklikleri transkripsiyonel susturma ve anahtar genlerin fonksiyon kayıpları ile ilişkilidir; ayrıca, mutasyon gelişimden de birebir sorumludurlar. DNA hipermetilasyonu, prostat kanseri dahil birçok kanserde meydana gelen yaygın ve en iyi karakterize edilmiş epigenetik değişikliklerden biridir (8).

Prostat kanserinde hipermetilasyon

Prostat kanserinde epigenetik mekanizma ile susturulmuş olan genler Tablo 1 ve 2'de özetlenmiştir. Bu genlerin belirlenmeleri prostat kanseri tanısında yararlı olduklarından her biri ayrı iyi bir moleküler belirteç sayılırlar. Özellikle, Ras onkogenine bağlanabilen RASSF1A, adenomatöz polipozis koli (*APC*), hücrel retinol bağlayıcı protein (*CRBP1*) ve retinoik asit reseptörü β2 (*RARβ2*) gibi genlerin neoplastik ve benign hücreler arasındaki metilasyon seviye farklılıkları dikkat çekicidir (3, 54). Prostat ve kolon kanserleriyle ilişkili bazı genlerdeki hipermetilasyonun yaş ile doğru orantılı olarak arttıkları görülmüştür (23). Yapılan araştırmalarda genlerdeki hipermetilasyonun morfolojik değişikliklerden önce meydana geldikleri anlaşılmıştır. Yani, promoter bölge hipermetilasyonu birçok insan tümöründe karsinogenezin



Şekil 2. Farklı metilasyon seviyelerine bağlı olarak farklı miktarlarda protein üreten hücrelerden oluşan heterojen tümör klonu.

Metilasyona bağlı gen susturulmasında, tümör gelişiminin erken aşamalarında transkripsiyon seviyesinde ve protein sentezinde küçük azalmalar olur. Azalan transkripsiyon, CpG adalarının içine yayılan metilasyon ve komşu heterokromatinden (sağ ve soldaki siyah köşeli iki ok) dolayı, CpG adalarının korunmasında bir azalma gözlenir (kırmızı dikey oklar). Korunmadaki bu azalma CpG adalarının metilasyonunda aşamalı artışlar ile sonuçlanır. Böylece, farklı hücrelerde aynı genin mRNA kopya sayılarında değişiklikler gözlenir ve bir tümör klonunda farklı düzeylerde protein üreten hücreler görülür. (Şekil orijinal kaynağından alınıp (47), üzerinde değişiklikler yapılmış ve derlemeye uyarlanmıştır)

ilk bulgusudur ve sıklıkla prostat kanserinin ön aşamalarında, yani daha büyük bir tümör kitlesi oluşmadan, metaplazi ve displazi aşamalarında saptanabilir. Ayrıca, hastalık ilerledikçe ve yüksek dereceli prostatik intraepitelial neoplazi (HGPIIN) evresi arttıkça, metilasyon sıklığının da giderek arttığı gözlenmiştir (3, 55, 56).

Epigenetik gen susturulmasında, promoter bölgesi metillenmiş olan genin transkripsiyon düzeyinde hafif bir düşüş ve buna bağlı olarak da protein sentezinde hafif bir azalma gözlenir. Transkripsiyondaki azalma CpG adaların korunmasındaki azalmayı da yanına getirerek, uzağındaki veya komşu heterokromatindeki CpG adalarının etkileri sonucunda metilasyonun artmasına neden olur. Gradyal olarak artan metilasyon nedeniyle, gelişen bir tümör klonunda farklı düzeylerde metillenmiş promoter bölgeye sahip ve farklı düzeylerde protein üreten hücreler bulunmaya başlar ve tümör heterojen

bir karakter kazanır. Bu durum, metastatik hücreler gibi farklı karakterlerdeki hücrelerin oluşumuna da sebep olur. Genetik gen susturulmasında, gende bir mutasyon oluşur ve bunun sonucunda da fonksiyonel bir protein üretilmez. Eğer bu mutasyon seçici bir üstünlüğe sahip ise ve kanser gelişimine neden oluyorsa, her hücre bölünmesinden sonra yeni oluşacak olan hücrelere aktarılacak ve yine fonksiyonel bir proteinin üretimini engelleyecektir. Sonuç olarak genetik gen susturulmasında klonalite gözlenirken, epigenetik gen susturulmasında heterojenite gözlenir (Şekil 2).

Günümüzde, prostat kanserinde sıklıkla metillenmiş olarak karşımıza çıkan gen glutatyon S-transferaz pi 1 (*GSTP1*)'dir. *GSTP1* metilasyonu tümör hücresine özgüdür; hem HGPIIN lezyonlarında hem de prostat tümörlerinde yaygın olarak gözlenir; ayrıca, kanseri daha erken safhalarında tanımlamada önemli bir belirteçdir (3, 57-60). *GSTP1* geni,

potansiyel karsinojenlerin detoksifikasyonu ve konjugasyonunda görev alan *GSTπ* enzimini kodlar (61). *GSTP1*'in hipermetilasyon sonucu inaktive olması, olguların kansinjenlere karşı hassasiyetlerini artırır ve yeni DNA hasar ve mutasyonların gelişimine neden olur (59, 60).

GSTP1 metilasyonu prostat kanserinin %90'ında, prostat kanserinin öncü evresi HGPIIN'lerin %50-70'inde ve prostat intraepitelial atrofi (PIA) lezyonlarının %6'sında saptanmıştır (50, 62-64). PIA'da *GSTP1* ekspresyon artışı görülmesine karşılık, *GSTP1* aktivite kaybında HGPIIN'e ve/veya adenokarsinomaya dönüşebilir (7, 65, 66). Ayrıca, *GSTP1*'in promoter bölgesindeki farklı CpG adalarındaki metilasyon sıklığı hastalığın ilerlemesi süresince artar (50).

GSTP1 promoter bölge hipermetilasyonu iyi bir prostat kanseri belirteçidir; çünkü, metilasyon normal ve benign prostat kanseri dokusunda seyrek gözlenir (67-69). *GSTP1* hipermetilasyonu birçok meme ve karaciğer kanserinde de teşhis edilmesine rağmen, yine ürogenital sistem tümörlerinden mesane ve böbrek kanserlerinde daha az sıklıkla teşhis edilmektedir (49, 70).

Kanser hücresi DNA'sının hastalarının vücut sıvılarında da saptanabilmesinden bu yana, *GSTP1* hipermetilasyonu önemli bir araştırma parametresini oluşturmuştur. Metilasyonunun idrar, plazma ve serum gibi çeşitli vücut sıvılarında var olan ekstraselülüler serbest DNA'da rahatlıkla gösterilebilmesi ve adı geçen sıvıların biyopsiye oranla daha az invazif girişimlerle elde edilebilmeleri avantajı, risk altındaki kişilerin periyodik taramalarına olanak vermiştir (3, 71, 72).

Kantitatif olmayan metilasyon-spesifik PCR (MSP) metoduyla prostat kanserli hastaların plazma ve serum örneklerinin %72'sinde, ejakulatin %50'sinde ve idrar örneklerinin %36'sında *GSTP1*'nin hipermetilasyonunu gösterilebilmiştir. İyi huylu prostatik hiperplazili hastaların vücut sıvılarında ise hipermetilasyona rastlanılmamıştır (72). Bu da, tümör dokusu için oldukça özgül olan bu metilasyon durumunun, hastaların plazma veya serum örneklerinde yüksek oranlarda saptanabildiğini göstermektedir (3, 58). Yapılan çalışmalarda, plazmadaki *GSTP1* metilasyon seviyesinin idrar örneğindeki metilasyona oranla daha yüksek olduğu görülmüştür. Serbest tümör DNA'sının periferik kanda prostat kanal sistemine göre daha fazla bulunmasının sebebi, kanser hücrelerin bulunduğu bölgelerden ağırlıkla kan veya lenfetik sistemle bedenin başka bölgelerine taşınmaları ile açıklanabilir.

GSTP1 promoter bölge hipermetilasyonunun prostat kanseri tanısındaki kullanımı sadece vücut sıvıları ile sınırlı değildir. Doku örnekleri ile yapılan bir çalışmada 16 farklı genin metilasyon seviyeleri ve *GSTP1*, *APC*, *RASSF1A*, *PTGS2* ve *MDR1* genlerinin çeşitli kombinasyonları çalışılmış ve %100'e yaklaşan duyarlılık ile %92'den fazla özgüllük ile iyi huylu prostat dokusu prostat kanseri dokusundan ayırt edilebilmiştir (9).

Kanser tanısında metilasyonun önemi giderek artmaktadır; çünkü, non-invazif girişimler aracılığıyla da kolayca saptanabilen hipermetile genler yeniden aktive edilebilmektedir.

DNA metilasyonunun kaldırılmasıyla ilgili tedavi stratejileri

Epigenetik değişikliklerin gen ifade değişikliklerine neden olduklarının anlaşılmasından bu yana, DNA metilasyonunun kaldırılması ile durumu eskisine çevirmeye dayalı değişik tedavi yolları aranmaya başlanmıştır. Bu amaçla yakından ilişkili olan iki ilaç, 5-azacytidine (5-aza-C) ve 5-aza-2'deoxyctidine (5-aza-dC, Decitabine), *in vitro* şartlarda susturulan çeşitli genlerin reaktivasyonunu sağlamak için kullanılmaya başlanmıştır (50, 73).

5-aza-C ve 5-aza-CdR sitozin analoglarıdır; DNMT1 aktivite yokluğunda, DNA sentezine

neden olurlar ve bu yolla demetilasyonuna da yol açarlar (74, 75). İlgili sitozin analoglarının kullanımı demetilasyonun bir sonucu olarak susturulmuş genlerin reaktivasyonları yanında, kromatinin dekondensasyonunu ve farklılaşma gibi birçok hücrel değişikliğe neden olurlar (76).

Trichostatin A ve butyrate gibi HDAC inhibitörleri, metillenmiş genlerin ifadesini aktif hale getirmek için demetile ajanlar ile birlikte kullanılmaktadırlar (77). Ancak, kanser tedavisinde metile edici ilaçların klinik yararları, toksik etkileri nedeniyle sınırlıdır (78). Günümüzde bu ajanlar başlıca hematolojik kanserlerin tedavisinde kullanılmaktadır (76).

Metilasyonun araştırılmasında kullanılan metotlar

Metilasyonun gösterilebilmesi için birçok teknik geliştirilmiş ve özellikle DNA dizisindeki 5-MeC'nin hızlı tanısına izin veren bisülfid reaksiyonuna bağlı metotlar geliştirilmiştir.

Bisülfid reaksiyonu ilk kez 1970'li yılların başında tanımlanmış ve DNA'daki sitozin ve 5-MeC'nin ayırt edilmesinde kullanılmıştır (43, 79, 80). Bu metotta, ilk olarak DNA sodyum bisülfid ile muamele edilir ve DNA'daki sitozinler urasile dönüştürülür; fakat, 5-MeC'ler sitozin şeklinde kalırlar. İncelenecek olan DNA dizisi, daha sonra

bisülfid ile muamele edilmiş DNA için özgül primerler kullanılarak PCR ile amplifiye edilir (81).

5-MeC'nin araştırılmasında bisülfid reaksiyonunun ilk defa uygulanmasından bu yana aynı prensibe dayanan Southern Blot (71), restriksiyon enzimi-PCR (81), bisülfid DNA dizi analizi, metilasyona hassas tek nükleotid primer uzaması (Ms-SnuPE), restriksiyon belirteç genomik taraması (RLGS), diferansiyel metilasyon hibridizasyonu (DMH), DNA chip ve MSP gibi birçok metot geliştirilmiştir (36).

Sonuç

DNA metilasyonunun karsinogenezde önemli bir yer tutması nedeniyle, bu durumu saptamaya yarayan metotlar günümüzde klinik tanıyı desteklemek ve metilasyon varlığında uygun tedavi yolunu seçmek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Ayrıca, olguların tedavi sonrası takiplerinde ve kanser için yüksek risk taşıyan kişilerin periyodik taramalarında da faydalı olabilmektedirler. Ülkemizde de artık yerini almaya başlayan metilasyon tanısı, yakın gelecekte vazgeçilmez kanser testlerinden biri haline gelecektir. Özellikle, prostat kanserinin erken teşhisi ve etkili tedavisinde klinik başarıyı daha da ileriye götürecektir.

Kaynaklar

- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100:57-70.
- Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011; 69-90.
- Jeronimo C, Usadel H, Henrique R, et al. Quantitation of *GSTP1* methylation in non-neoplastic prostatic tissue and organ-confined prostate adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93:1747-52.
- Deakin M, Elder J, Hendrickse C, et al. Glutathione S-transferase *GSTT1* genotypes and susceptibility to cancer: studies of interactions with *GSTM1* in lung, oral, gastric and colorectal cancers. *Carcinogenesis* 1996; 17:881-4.
- Welfare M, Monesola Adeokun A, Bassendine MFDaly AK. Polymorphisms in *GSTP1*, *GSTM1*, and *GSTT1* and susceptibility to colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 8:289-92.
- Wilson MH, Grant PJ, Kain K, et al. Association between the risk of coronary artery disease in South Asians and a deletion polymorphism in glutathione S-transferase *M1*. *Biomarkers* 2003; 8:43-50.
- De Marzo AM, Meeker AK, Zha S, et al. Human prostate cancer precursors and pathobiology. *Urology* 2003; 62:55-62.
- Novik KL, Nimmrich I, Genc B, et al. Epigenomics: genome-wide study of methylation phenomena. *Curr Issues Mol Biol* 2002; 4:111-28.
- Yegnasubramanian S, Kowalski J, Gonzalgo ML, et al. Hypermethylation of CpG islands in primary and metastatic human prostate cancer. *Cancer Res* 2004; 64:1975-86.
- Jeronimo C, Varzim G, Henrique R, et al. I105V polymorphism and promoter methylation of the *GSTP1* gene in prostate adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11:445-50.
- Bird A, Taggart M, Frommer M, et al. A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. *Cell* 1985; 40:91-9.
- Egger G, Liang G, Aparicio AJones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004; 429:457-63.
- Mompalmer RL. Cancer epigenetics. *Oncogene* 2003; 22:6479-83.
- Plass C. Cancer epigenomics. *Hum Mol Genet* 2002; 11:2479-88.
- Strathdee G, Brown R. Aberrant DNA methylation in cancer: potential clinical interventions. *Expert Rev Mol Med* 2002; 4:1-17.
- Jones PA, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* 2001; 293:1068-70.
- Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:3740-5.
- Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 1987; 196:261-82.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409:860-921.
- Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002; 16:6-21.
- Antequera F, Bird A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:11995-9.
- Goto T, Monk M. Regulation of X-chromosome inactivation in development in mice and humans. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62:362-78.
- Issa JP. CpG-island methylation in aging and cancer. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; 249:101-18.
- Li E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* 2002; 3:662-73.
- Tycko B. DNA methylation in genomic imprinting. *Mutat Res* 1997; 386:131-40.

26. Bernardi G. Isochores and the evolutionary genomics of vertebrates. *Gene* 2000; 241:3-17.
27. Cooper DN, Youssoufian H. The CpG dinucleotide and human genetic disease. *Hum Genet* 1988; 78:151-5.
28. Laird PW. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:253-66.
29. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999; 99:247-57.
30. Ramsahoye BH, Binizkiewicz D, Lyko F, et al. Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:5237-42.
31. Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 2000; 9:2395-402.
32. Margot JB, Ehrenhofer-Murray AE, Leonhardt H. Interactions within the mammalian DNA methyltransferase family. *BMC Mol Biol* 2003; 4:7.
33. Peedicayil J. Epigenetic therapy--a new development in pharmacology. *Indian J Med Res* 2006; 123:17-24.
34. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science* 2001; 293:1074-80.
35. Hake SB, Xiao A, Allis CD. Linking the epigenetic 'language' of covalent histone modifications to cancer. *Br J Cancer* 2004; 90:761-9.
36. Herman JG, Latif F, Weng Y, et al. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:9700-4.
37. Rebbeck TR, Jaffe JM, Walker AH, et al. Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:1225-9.
38. Wade PA. Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression. *Bioessays* 2001; 23:1131-7.
39. Robertson KD, Wolffe AP. DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet* 2000; 1:11-9.
40. Colot V, Rossignol JL. Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device. *Bioessays* 1999; 21:402-11.
41. Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* 1997; 13:335-40.
42. Ehrlich M. DNA methylation: Normal development, inherited diseases, and cancer. *Journal of Clinical Ligand Assay* 2000; 23:144-146.
43. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:1827-31.
44. Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 2000; 16:168-74.
45. Fryer AA, Bianco A, Hepple M, et al. Polymorphism at the glutathione S-transferase GSTP1 locus. A new marker for bronchial hyperresponsiveness and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1437-42.
46. Okano M, Xie S, Li E. Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 1998; 26:2536-40.
47. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002; 3:415-28.
48. Knudson AG. Chasing the cancer demon. *Annu Rev Genet* 2000; 34:1-19.
49. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001; 61:3225-9.
50. Nakayama M, Bennett CJ, Hicks JL, et al. Hypermethylation of the human glutathione S-transferase-pi gene (GSTP1) CpG island is present in a subset of proliferative inflammatory atrophy lesions but not in normal or hyperplastic epithelium of the prostate: a detailed study using laser-capture microdissection. *Am J Pathol* 2003; 163:923-33.
51. Esteller M, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, et al. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 2000; 60:2368-71.
52. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003; 349:2042-54.
53. Pfeifer GP, Tang M, Denissenko MF. Mutation hotspots and DNA methylation. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; 249:1-19.
54. Jeronimo C, Henrique R, Hoque MO, et al. Quantitative RARbeta2 hypermethylation: a promising prostate cancer marker. *Clin Cancer Res* 2004; 10:4010-4.
55. Kang GH, Lee S, Lee HJ, Hwang KS. Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia. *J Pathol* 2004; 202:233-40.
56. Maruyama R, Toyooka S, Toyooka KO, et al. Aberrant promoter methylation profile of prostate cancers and its relationship to clinicopathological features. *Clin Cancer Res* 2002; 8:514-9.
57. Henrique R, Jeronimo C. Molecular detection of prostate cancer: a role for GSTP1 hypermethylation. *Eur Urol* 2004; 46:660-9; discussion 669.
58. Jeronimo C, Usadel H, Henrique R, et al. Quantitative GSTP1 hypermethylation in bodily fluids of patients with prostate cancer. *Urology* 2002; 60:1131-5.
59. Lee TL, Leung WK, Chan MW, et al. Detection of gene promoter hypermethylation in the tumor and serum of patients with gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002; 8:1761-6.
60. Lee WH, Isaacs WB, Bova GS, Nelson WG. CG island methylation changes near the GSTP1 gene in prostatic carcinoma cells detected using the polymerase chain reaction: a new prostate cancer biomarker. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997; 6:443-50.
61. Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1995; 30:445-600.
62. Bastian PJ, Ellinger J, Schmidt D, et al. GSTP1 hypermethylation as a molecular marker in the diagnosis of prostatic cancer: is there a correlation with clinical stage, Gleason grade, PSA value or age? *Eur J Med Res* 2004; 9:523-7.
63. Lodygin D, Epanchintsev A, Menssen A, et al. Functional epigenomics identifies genes frequently silenced in prostate cancer. *Cancer Res* 2005; 65:4218-27.
64. Woodson K, Hanson JTangrea J. A survey of gene-specific methylation in human prostate cancer among black and white men. *Cancer Lett* 2004; 205:181-8.
65. Davis M, Sofer M, Kim SS, Soloway MS. The procedure of transrectal ultrasound guided biopsy of the prostate: a survey of patient preparation and biopsy technique. *J Urol* 2002; 167:566-70.
66. Nelson WG, De Marzo AM, Deweese TL, et al. Preneoplastic prostate lesions: an opportunity for prostate cancer prevention. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 952:135-44.
67. Brooks JD, Weinstein M, Lin X, et al. CG island methylation changes near the GSTP1 gene in prostatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7:531-6.
68. Lee WH, Morton RA, Epstein JI, et al. Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:11733-7.
69. Rountree MR, Bachman KE, Baylin SB. DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet* 2000; 25:269-77.
70. Esteller M, Corn PG, Urena JM, et al. Inactivation of glutathione S-transferase P1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia. *Cancer Res* 1998; 58:4515-8.
71. Cairns P, Esteller M, Herman JG, et al. Molecular detection of prostate cancer in urine by GSTP1 hypermethylation. *Clin Cancer Res* 2001; 7:2727-30.
72. Goessl C, Krause H, Muller M, et al. Fluorescent methylation-specific polymerase chain reaction for DNA-based detection of prostate cancer in bodily fluids. *Cancer Res* 2000; 60:5941-5.
73. Lin X, Tascilar M, Lee WH, et al. GSTP1 CpG island hypermethylation is responsible for the absence of GSTP1 expression in human prostate cancer cells. *Am J Pathol* 2001; 159:1815-26.
74. Friedman S. The irreversible binding of azacytosine-containing DNA fragments to bacterial DNA(cytosine-5)methyltransferases. *J Biol Chem* 1985; 260:5698-705.
75. Taylor SM, Jones PA. Changes in phenotypic expression in embryonic and adult cells treated with 5-azacytidine. *J Cell Physiol* 1982; 111:187-94.
76. Goffin J, Eisenhauer E. DNA methyltransferase inhibitors-state of the art. *Ann Oncol* 2002; 13:1699-716.
77. Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S, et al. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet* 1999; 21:103-7.
78. Juttermann R, Li E, Jaenisch R. Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:11797-801.
79. Hayatsu H, Wataya Y, Kai Klida S. Reaction of sodium bisulfite with uracil, cytosine, and their derivatives. *Biochemistry* 1970; 9:2858-65.
80. Wang RY, Gehrke CW, Ehrlich M. Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues. *Nucleic Acids Res* 1980; 8:4777-90.
81. Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res* 1994; 22:2990-7.