

# Metilasyon ve Kanser

## Methylation and Cancer: Review

Dr. Derya Beyza SAYIN<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Tıbbi Biyoloji AD, Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kırıkkale

Geliş Tarihi/Received: 11.12.2007  
Kabul Tarihi/Accepted: 21.03.2008

Yazışma Adresi/Correspondence:  
Dr. Derya Beyza SAYIN  
Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Tıbbi Biyoloji AD, Kırıkkale  
TÜRKİYE/TURKEY  
dsayin@yahoo.com

**ÖZET** CpG dinükleotidlerinde gözlenen DNA metilasyonu, memelilerdeki epigenetik değişikliklerin başında gelir. Normal hücrelerde, tekrar dizilerindeki CpG dinükleotidleri metileyken, genlerin %50'sinin promotor bölgelerinde bulunan CpG adacıkları demetiledir. Epigenetik mutasyon, DNA dizisinde değişiklik olmaksızın, gen ifadesini kalıtılabilir şekilde değiştirir ve kanser oluşumunda genetik değişiklikler kadar etkilidir. Kanseri hücrelerinde genomda yaygın hipometilasyonla birlikte, promotor bölgelerdeki CpG adacıklarında hipermetilasyon gözlenir. Promotor bölge hipermetilasyonu, devamındaki genin susturulmasına neden olur, özellikle tümör baskılayıcı genlerin etkisizleştirilmesinde önemlidir. *hMLH1* ve O<sup>6</sup>-MGMT genleri farklı kanserlerde en fazla metilasyonu çalışılan genler arasındadır. Kanseri gelişimi için en klasik teori Knudson'un iki vuruş hipotezidir ve bu vuruşlardan birisi epigenetik olabilir. Genomda gözlenen yaygın hipometilasyon ise genomik kararsızlığa yol açarak ya da susturulmuş parazitik dizilerin ifade bulmasına neden olarak kanseri gelişimine katkıda bulunabilir. Promotor bölge metilasyonunun; kanserden kansere, ya da aynı kanserin tipine göre farklı kalıplar göstermesi ve idrar, balgam ya da serum gibi primer kanser dokusu dışında da kanser için tarama testi olarak kullanılması gündemdedir. Epigenetik mutasyonlar, genetik mutasyonların aksine geri dönüşlüdür ve promotor bölge metilasyonu normal hücrelerde gözlenmediği için kullanılacak kemoterapötik, sadece kanser hücrelerine etki edecek seçicilikte olacaktır. Kanseri hücrelerinde gözlenen epigenetik değişikliklerin saptanması, konuyla ilgili bilgilerin artması hem kanseri önlenmesi hem prognozunun belirlenmesi hem de tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi açısından giderek önem kazanmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Metilasyon; neoplazi; epigenetik; gen susturulması; kromatin yeniden düzenlenmesi

**ABSTRACT** DNA methylation is the major epigenetic modification in mammals, and is seen in CpG dinucleotides. In normal cells, the CpG dinucleotides in repetitive DNA are methylated, and CpG islands, which are found in the promotor region in 50% of genes, are demethylated. Epigenetic modifications may be defined as inheritable gene expression changes, without altering the primary sequence of DNA. It is well established that epigenetic modifications are as important as genetic changes in cancer development. Cancer cells show genomic hypomethylation and gene promotor hypermethylation. Both are independent from each other, but are effective in cancerogenesis in different ways. Hypermethylation of the promotor has a suppressive effect on the downstream gene, and is important in tumour suppressor gene inactivation. *hMLH1* and O<sup>6</sup>-MGMT gene methylations are the most studied among different cancer types. Knudson's two hit hypothesis is the most common hypothesis for cancer development, and one of these hits may be epigenetic. Genomewide hypomethylation may favor for genomic instability and reactivation of parasitic sequences. Promotor hypermethylation may show different patterns in different cancers, or different types of the same cancer, and methylation patterns may be useful as a cancer biomarker or a prognostic marker. Epigenetic mutations are reversible, and there is sparse promotor hypermethylation in normal cells, which makes demethylating agents highly specific for cancer cells. Increasing our knowledge on the methylation changes in cancer cells will improve our approaches to the treatment, diagnosis and prevention of cancer.

**Key Words:** Methylation; neoplasms; epigenesis, genetic; gene silencing; chromatin assembly and disassembly

**M**etilasyon, memeli DNA'sında gerçekleştiği bilinen tek kovalan olaydır ve yalnızca CG (CpG) dinükleotidlerinde bulunan sitozinlerde meydana gelir.<sup>1</sup> 1950 yılından beri varlığı bilinen 5-metilsitozin (5 mC), modifiye bir bazdır ve genomdaki bazların yaklaşık %4'ünü oluşturur.<sup>2</sup> Metile CpG dinükleotidlerinin çoğu; sentromerik tekrarlar, satellit dizileri ve tekrarlayan genler gibi dizilerde yer alır.<sup>3</sup> Tüm genomun yaklaşık %2'sini ve CpG'lerin yaklaşık %15'ini oluşturan CpG adacıkları ise; 0.2-1kb uzunluktadır ve insan genomundaki genlerin yaklaşık %50'sinin promotor bölgelerinde bulunur.<sup>4</sup>

DNA metilasyonu memeli genomunda transkripsiyonel baskılama, kromatin yapının değiştirilmesi, X kromozomu inaktivasyonu, genomik imprinting, tekrarlayan ve parazitik DNA dizilerinin baskılanması gibi önemli etkilere sahiptir.<sup>5</sup> Normal hücrelerde ekstragenik DNA (CpG dinükleotidleri) metileyken, gen promotorlarında bulunan CpG adacıkları demetiledir, bunun istisnası X inaktivasyonuna ve genomik imprintinge uğrayan genlerdir; bunlar, normal hücrelerde de tek alelden ekspresyonun sağlanması için sadece bir alelde metiledir.<sup>6</sup> Normal dokularda imprintinge ve X inaktivasyonuna uğrayan genler dışında da ender olarak CpG adacık metilasyonu gözlenir ve sıklıkla genin susturulmasına yol açar. Promotor bölgeden çok gen içindeki CpG adacıklarında saptanır, promotorda olması durumunda ise; CpG içeriği az olan promotor bölgelerde CpG yoğun olanlara göre daha fazla gözlenir. Promotor, bir genin 5' ucunda bulunan ve transkripsiyon faktörleri ile RNA polimeraza bağlanma bölgesi oluşturan DNA dizisidir ve gen ekspresyonunun kontrolünde önemli role sahiptir. Normal hücrelerde gözlenen promotor bölge metilasyonunun hücre farklılaşmasında, dokuya özgü genlerin ekspresyonunu düzenleyerek etkili olduğu düşünülmektedir.<sup>7</sup>

Metilasyon kalıbı dokulara özgüdür ve tek bir hücre klonunda bile farklılık gösterebilir.<sup>6</sup> CpG adacıklarında doku ve gene özgü metilasyon derecesinin yaşla arttığı bilinmektedir. Bu artışın rastgele olmadığı ve yaşlanmaya bağlı oluşan kanserlerde metilasyonun etkili olduğu düşünülmektedir.<sup>8</sup> Normal kolon mukozasında ilerleyen

yaşa bağlı olarak CpG adacık metilasyonunda artışla birlikte, LINE tekrar dizilerindeki metilasyonun azalması da bu görüşü desteklemektedir.<sup>9</sup>

Epigenetik, en basit şekliyle çevre ve genetik arasındaki etkileşimdir; aynı genotipin nasıl olup da farklı fenotiplere yol açtığıın en iyi açıklamasını sunar.<sup>10</sup> Gen nükleotid dizisinde değişiklik olmaksızın, gen ifadesinde kalıtılabilir değişimler gözlenmesi olarak tanımlanabilir. Epigenetik mutasyon olarak adlandırılabilen CpG adacıklarındaki metilasyon kalıbı değişikliği; her hücre bölünmesinde pasif olarak kalıtılan mutasyonların aksine, aktif olarak kalıtılır ve gen ifadesini değiştirebilir.<sup>3,11</sup> Epigenetiğin gen ifadesi kontrolündeki en temel etkisi transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya ulaşmasını engelleyecek mekanik değişiklikler yaratmasıdır. Bu mekanik etki, geri dönüşlü olması açısından DNA dizisinde gözlenen mutasyonlardan farklılık gösterir.<sup>3</sup> Epigenetik değişiklikler sonucunda kromozomal kararsızlık ile kendini gösteren birtakım sendromlar (ICF; immün yetmezlik, kromozomal kararsızlık ve yüzde dismorfik bulgular gibi), tümör oluşumu ve nörolojik hastalıklar gözlenebilir.<sup>3</sup> Klonlanmış hayvanlarda epigenetik programlamanın eksik olmasına bağlı olarak (imprinting kusuru) gelişme farklılıkları gözlendiği ve hayvanların erken dönemde öldüğü saptanmıştır. Yardımcı üreme teknikleri ile de, Beckwith-Wiedemann Sendromu, Angelman Sendromu ve retinoblastoma (*Rb*) gibi epigenetik kusurlara bağlı hastalıkların artış gösterdiği bildirilmiştir.<sup>10</sup>

Kanser oluşumu; bir hücrenin, genetik yapısında ardı ardına oluşan kalıtılabilir değişikliklerin birikmesi sonucu, büyüme avantajı kazanması ile açıklanabilir. Bu süreçte etkili iki sınıf genden bahsedilir, bunlar onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdir. İlki hücre büyümesini ve yaşama süresini arttırma yönünde çalışırken, ikincisinin tam tersi bir etkisi vardır. Her iki grup gende gözlenen değişiklikler kansere yol açabilir. Bunlar, genin nükleotid dizisini değiştirerek hatalı protein yapımına neden olan, genin kopya sayısını değiştiren ya da transkripsiyonunu arttıran/azaltan değişiklikler olabilir. Onkogenlerde gözlenen değişiklikler onların normalden fazla ifade bulmasına neden olurken, tümör baskılayıcı genlerde gözlenenler

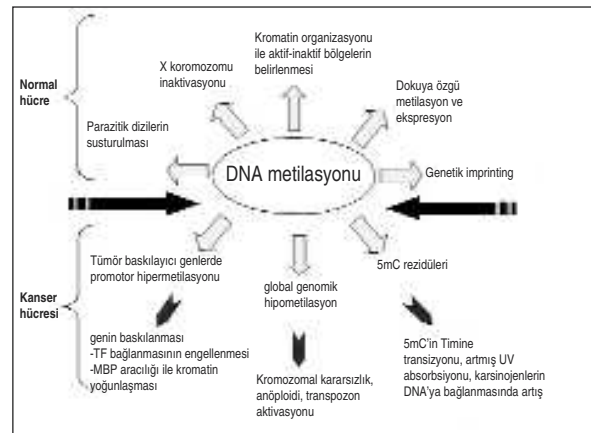
sıklıkla ekspresyon azalmasına yol açar. Kanser oluşumunda bir başka hipotez de Knudson'un iki vuruş hipotezidir. Bu hipoteze göre, malign dönüşümün oluşabilmesi için organizmada tümör baskılayıcı genlerin iki alelinin de işlev kaybetmesi gereklidir. Bugün, bu iki vuruşun birinin genetik (nokta mutasyonu, delesyon, çerçeve kayma mutasyonu...) diğerinin epigenetik (promotor metilasyonu) ya da her ikisinin de genetik veya epigenetik olabileceği bilinmektedir.<sup>12</sup>

Kanser oluşum süreci ile genomik metilasyon kalıbı değişiklikleri arasındaki ilişki 1980'li yılların başından beri bilinmektedir.<sup>13</sup> Kanser hücrelerinde, genomda genel hipometilasyonun yanı sıra, bazı özel genlerin promotor bölgelerindeki CpG adacıklarında hipermetilasyon gözlenmektedir.<sup>14</sup> CpG adacık metilasyonunun, o genin transkripsiyonunu önlediği bilinmektedir.<sup>15</sup> Genel olarak bakıldığında, gemondaki yaygın hipometilasyon ile bölgesel hipermetilasyon arasında bir bağlantı olmadığı görülmektedir. Bu nedenle, ikisinin birbirinden bağımsız olaylar olarak ele alınması gerektiği, kanser oluşum sürecinde metilasyon kalıbı değişikliğinin farklı yollarla etki ettiği düşünülmektedir.<sup>16</sup> Metilasyonun kanser oluşumuna neden olma mekanizmalarından ilki, 5 mC'nin kendisinin, mutasyon oluşturma riskidir. Normalde DNA'da bulunan sitozin, en sık gözlenen mutasyon mekanizmalarından biri olan deaminasyon sonucu urasile dönüşür ve bir RNA bazı olması nedeniyle onarım mekanizmalarınca (urasil glikozilazlar) kolayca tanınarak onarılır. Buna karşılık metilsitozinin spontan deaminasyonu sonucu oluşan timin, normalde de DNA'da bulunan bir baz olduğu için onarım mekanizmalarından kaçır.<sup>17</sup> Tüm genomdaki nokta mutasyonlarının yaklaşık üçte birinden fazlasının CpG adacıklarında gözlenmesi bu etkinin en açık belirtisidir.<sup>15</sup> Meme kanserine yakınlık yaratan *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde gözlenen binden fazla mutasyonun CpG/CpNpG motiflerinde saptanmış olması da 5 mC'in artmış mutasyon riski oluşturduğunu desteklemektedir.<sup>18</sup> İkinci yol ise; özellikle tümör baskılayıcı genlerin ya da imprintinge uğrayan genlerin promotor bölgelerindeki hipermetilasyonun, ilgili genin normalden farklı ifade bulmasına yol açmasıdır. Bu şekilde

normalden farklı düzeyde çalışan genler, kanser oluşumuna katkıda bulunur. Üçüncü yol ise, genomda gözlenen yaygın hipometilasyonun, tekrar bölgelerindeki rekombinasyon oranında artışa ve genomda kararsızlığa neden olmasıdır. Sitozin metilasyonunun normal hücrede ve kanser hücreindeki etkileri Şekil 1'de açıklanmıştır.

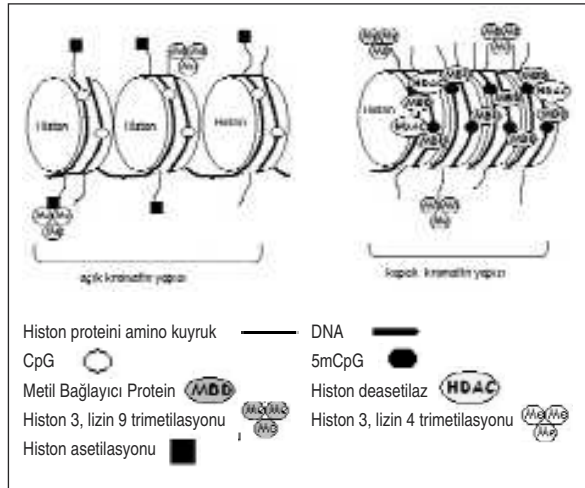
Bunların dışında DNA metilasyonu; kanserjenlerin DNA'ya bağlanmasını artırarak, DNA'nın ultraviyole ışınlarını daha fazla emmesine neden olarak da mutasyon hızını artırır ve gen inaktivasyonuna neden olur.<sup>19</sup>

CpG adacıklarındaki metilasyonun yanı sıra, histon proteinlerinin metillendiği yaklaşık 35 yıldır bilinmektedir. Histon proteinleri, DNA'nın kromatin halinde paketlenmesinde etkili ve bu nedenle DNA ile yakın ilişkide olan, bazık yapıda proteinlerdir. Amino uçlarında meydana gelen değişik modifikasyonlar (asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon gibi) kromatin paketlenmesini sıkıştırarak ya da gevşeterek, transkripsiyon faktörlerinin bölgeye ulaşmasını etkiler ve bu şekilde gen ifadesinin değişmesinde rol alır. Histon proteinlerindeki asetilasyon kromatin yapının gevşemesine, histon deasetilazlar tarafından gerçekleştirilen deasetilasyon ise sıkılaşmasına neden olur. Histon metilasyonu sıklıkla histon 3'te gözlenir. Hangi amino asidin metillendiğine göre açık ya da kapalı kromatin yapısı gözlenir: Lizin 4 trimetilasyonu kapalı, lizin 9 trimetilasyonu ise açık kromatin ile ilişkilidir.<sup>12</sup> Şekil 2'de açık ve kapalı kromatin yapılan-



ŞEKİL 1: DNA metilasyonunun normal hücrede ve kanser hücreinde etkileri. Uyarlandığı makale: J Pathol 2002;196:1-7.

5mC: 5 metil sitozin; TF: Transkripsiyon faktörü; MBP: Metil bağlayıcı protein.



**ŞEKİL 2:** Aktif ve inaktif kromatin yapısı, histon proteinleri etrafına sarılmış DNA. Transkripsiyonel olarak aktif kromatin, açık kromatin yapısındadır, demetile sitozinler, asetile histon kuyrukları ve histon 3, lizin 4 trimetilasyonu ile karakterizedir. Kapalı kromatin yapısında metile sitozinler MBD'ler ile bağlanır ve histon kuyruklarındaki asetilasyonu kaldıran HDAC'leri bölgeye çeker, histon 3, lizin 9 trimetilasyonu ile de kapalı kromatin yapısı desteklenir. Uyarlandığı makale: APMIS 2007;115:1039-59.

ması açıklanmıştır. Histon metilasyonunun, promotor bölgelerde DNA metilasyonundan ve histon asetilasyonundan bağımsız olarak transkripsiyonu baskılayabileceği öne sürülmektedir.<sup>20</sup> Yapılan bazı çalışmalarda demetile edici ajanların kullanımı,

metilasyon yoluyla inhibe olmuş genlerin tamamının tekrar etkinlik kazanması için yeterli olmamış, gen ifadesinin baskılanmasında histon metilasyonunun da etkili olduğu görüşü desteklenmiştir.<sup>21</sup> Histon asetilasyonunun dinamik yapısının aksine, histon metilasyonu oldukça sabittir. Sabit bir epigenetik işaret olarak histon proteinlerinin metilasyonu; transkripsiyon düzenlenmesinden, heterokromatin oluşumuna kadar değişik basamaklarda rol alır. Bunu; DNA metilasyonu gibi, kromatinle ilişkili proteinlerin bölgeye çekilmesini sağlayarak gerçekleştirdiği düşünülmektedir.

### GENLERİN PROMOTOR BÖLGELERİNDEKİ METİLYASYONUN KANSER OLUŞUM SÜRECİNDEKİ ÖNEMİ NEDİR?

Kanser hücrelerinde tümör baskılayıcı genlerin, hücre döngüsünü kontrol eden ve apoptozisi önleyen genlerin, DNA onarım genlerinin ve gelişim sürecinde etkili yolların normal işlemlerini sağlayan genlerin hipermetilasyon ile susturulduğu bilinmektedir.<sup>4</sup> Bugüne kadar kanserlerde hipermetilasyonu saptanan 90 kadar gen bulunmaktadır.<sup>6</sup> Farklı kanserlerde metilasyona uğrayan genler ve işlevleri Tablo 1'de verilmiştir. DNA metilasyonu izole bir olay değildir ve aynı anda yüzlerce pro-

**TABLO 1:** Kanserlerde metillendiği gösterilmiş genlerden bazıları.

Gen	İşlev	Tümör tipi
<i>hMLH1</i>	DNA yanlış eşleşme onarımı	Kolorektal kanser, mide kanseri
<i>O<sup>6</sup>-MGMT</i>	DNA'da alkile guaninlerin onarımı	Beyin, kolon ve akciğer kanseri
<i>BRCA1</i>	DNA onarımı	Meme, over kanseri
<i>E-kaderin</i>	Hücre adezyonu	Mide, meme ve prostat kanseri
<i>CDH13</i>	Hücre adezyonu	Endometrial kanser
<i>RAR-beta</i>	Retinoik asit reseptörü	Prostat, akciğer, serviks, böbrek kanseri
<i>ESR1</i>	Östrojen reseptörü	Meme kanseri, kolorektal kanser
<i>DAPK</i>	Apoptozis	Akciğer, serviks, meme kanseri
<i>Kaspaz-8</i>	Apoptotik proteaz	Nöroblastoma
<i>Rb</i>	Hücre döngüsü kontrolü	Retinoblastoma,
<i>p14ARF</i>	Hücre döngüsü kontrolü, MDM2 inhibitörü	Kolorektal kanser, meme, böbrek ve mesane kanseri
<i>p16INK4a</i>	Hücre döngüsü kontrolü, siklin bağımlı kinaz inhibitörü	Akciğer kanseri, meme, böbrek, mesane kanseri ve lenfoma
<i>APC</i>	Wnt sinyal iletimi	Kolorektal kanser,
<i>GSTP1</i>	Biyotransformasyon	Meme, böbrek kanseri
<i>VHL</i>	Anjiyogenez	Renal hücreli kanser
<i>TIMP3</i>	Tümör invazyonu ve metastaz	Gastrointestinal kanserler ve özofagus kanseri
<i>THBS1</i>	Anjiyogenez	T-hücreli lenoma, nöroblastoma, endometrial kanser

*hMLH1*: Human MutL protein homolog 1; *O<sup>6</sup>-MGMT*: O<sup>6</sup> Metil Guanin Metiltransferaz; *BRCA1*: Breast Cancer 1; *CDH13*: Cadherin 13; *RAR-beta*: Retinoik Asit Reseptörü-beta; *ESR1*: Östrojen Reseptörü 1; *DAPK*: Death-associated protein kinase; *Rb*: Retinoblastoma; *APC*: Adenomatöz Polipozis Koli; *GSTP1*: Glutatyon S-transferaz 1; *VHL*: Von Hippel Lindau; *TIMP3*: Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 3; *THBS1*: Trombospondin 1)

motor bölgeyi etkiler.<sup>22</sup> Epigenetik değişiklikler çevresel etkenlere genetik değişikliklerden daha yatkındır ve kanserojenlerin büyük bir kısmının genotoksik olmadığı bilinmektedir.<sup>4</sup>

Kanserleşme sürecinde, promotör bölge hipermetilasyonu erken bir olay gibi görünmektedir. Kanser hücrelerinde gen inaktivasyon mekanizması olarak promotör bölge hipermetilasyonu, *i.* sonraki kuşaklara aktarılabilmesi, *ii.* ilgili gende, kodlayan bölgede mutasyon olmaksızın genin ifadesini baskılayabilmesi, *iii.* gen ifadesini baskılamada, kodlayan bölge mutasyonları ile aynı etkinlikte olması ile önem taşımaktadır.<sup>20,23</sup> Ancak, kodlayan bölge mutasyonları kadar kısa sürede genin etkinliğini ortadan kaldırması beklenemeyebilir. Sadece tek bir replikasyon sırasında oluşabilecek nokta mutasyonunun, başka değişiklik olmaksızın sonraki hücrelerde genin ifadesini baskılayabileceği; aksine metilasyon yolu ile gen ifadesinin baskılanmasında, metilasyonun kritik bir düzeye ulaşması için, belli bir süreye gereksinim olacağı öngörülebilir.<sup>24</sup>

Promotör bölge hipermetilasyonu, transkripsiyon faktörlerinin promotora bağlanmasını önleyerek genin susturulmasında etkili olur. Bunu doğrudan yapabileceği gibi dolaylı olarak, metilsitozine bağlanan proteinleri bölgeye çekerek de gerçekleştirebilir.<sup>3,19</sup> Doğrudan baskılamada metilsitozindeki metil grubu, DNA'nın büyük oluşuna doğru çıkıntı yaparak tanıma bölgesini tanınmaz hale getirirken; dolaylı yolda, promotora bağlanacak transkripsiyon faktörlerinin tanıyacağı bölgeler, metilsitozine bağlanan proteinlerle maskelenir.<sup>25</sup> İlk mekanizmanın, pek çok transkripsiyon faktörünün, CpG bölgelerine bağlanacak diziler taşıması nedeniyle çok yaygın olmadığı düşünülmektedir.<sup>5</sup>

Bu etkilerin dışında biyokimyasal olarak metil grubu eklenmesinin, 5mC'in yüksek polaritesi nedeniyle, RNA polimerazların daha yüksek enerjili transkripsiyon başlangıç noktasına ulaşabilmesine yol açtığı ve bu şekilde genin ifadesini baskıladığı düşünülmektedir. Ayrıca, DNA'nın büyük oluşuna doğru uzanmış olan metil gruplarının, histonların yerleşimlerini değiştirerek daha kapalı bir

kromatin yapısına neden olduğu ve gen ifadesini bu şekilde baskıladığı da öne sürülmüştür.<sup>11</sup>

CpG adacıklarının metilasyon derecesi, farklı tümör tiplerinde değişebildiği gibi aynı tümöre sahip kişilerde de, çevresel etmenlere, genetik yatkınlığa ve epigenetik kontrolü etkileyen diğer faktörlere bağlı farklılık göstermektedir.<sup>16</sup> Metilasyon profili tümöre ve gene özgüdür.<sup>14</sup> Meme, baş-boyun, testis kanserlerinde hipermetilasyon az görülürken, kolon kanserinde, gliyomada ve AML'de (akut miyelositer lösemi) yüksek oranda hipermetilasyon gözlenir. Metilasyon değişiklikleri hem düşük hem de yüksek evre tümörlerde görülebilir, bu da metilasyon değişikliğinin tümör oluşumunun erken evrelerinde oluştuğunun bir göstergesidir. Ayrıca CpG adacık metilasyonu rastgele de gerçekleşmemekte ve bazı bölgelerde 'de novo' metilasyona yatkınlık görülmektedir.<sup>26</sup> Kansere özgü metilasyon kalıpları işlevsel ya da yapısal nedenlerden kaynaklanabilir. Baz dizisinin özellikleri yapısal, genin metilasyonla susturulmasının hücreye büyüme avantajı sağlaması ise işlevsel yatkınlıktan sorumlu olabilir.<sup>27</sup>

Farklı kanserlere özgü epigenetik mutasyonlar tanımlanmıştır: Kolorektal kanserlerde gözlenen mikrosatellit instabilitesinden, yanlış eşleşme ortamında görev yapan "human MutL protein homolog 1 (*hMLH1*)" geninin; kolon, meme, beyin akciğer kanserlerinde, alkile edici ajanların yol açtığı mutasyonun tamirinde etkinliği olan O<sup>6</sup> Metil Guanin Metiltransferaz (O<sup>6</sup>-MGMT) geninin promotör bölgesinin hipermetilasyonunun etkili olduğu bildirilmiştir.<sup>28,29</sup>

DNA metilasyonu, kapalı kromatin yapıyı, ilgili genin transkripsiyonel olarak baskılanması için bir aracı olarak kullanmaktadır.<sup>30</sup> Burada metilasyon ve histon deasetilasyonu birlikte iş görmektedir. 1999 yılında Cameron ve ark. yaptıkları bir çalışmada *hMLH1*, *p15*, *p16*, "(tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (*TIMP-3*))" genleri hipermetilasyon yolu ile inaktive edilmiş hücre serilerine histon deasetilaz inhibitörü trikostatın A (TSA) uygulamasından sonra, hipermetilasyon ile inaktive olan genlerin ifadelerinde belirgin artış gözlenirken, hipermetilasyonla inaktive olmayan

genlerin ifadelerinde artış saptamışlardır. TSA öncesinde bir demetilasyon ajanı olan deoksi-azasiti-din (DAZ) verilmiş hücrelerde ise hipermetilasyon ile inaktive olmuş genlerin ifadelerinde belirgin artış saptanmıştır. Bu çalışma ile metilasyon ve demetilasyonun kanser oluşum sürecinde birlikte rol aldığı gösterilmiştir.<sup>31</sup>

Helikobakter pilori enfeksiyonunun, mide mukozasındaki hücrelerde promotör bölge hipermetilasyonuna yol açtığı ve bu şekilde kanserleşme sürecine katkıda bulunduğu bildirilmiştir.<sup>32</sup>

Kanserin ilerlemesinde mitokondrial DNA (mtDNA) miktarının azalmasının etkili olduğu bilgisi üzerine Xie ve ark.nın yaptığı çalışma ile mtDNA'sı çıkarılmış prostat kanseri hücre serilerinde, DNMT1 ekspresyon artışı ile birlikte, çekirdek DNA'sında endotelin B reseptör (*EDNRB*), *E-kaderin*, *O<sup>6</sup>-MGMT* genlerinin promotör bölgelerinde hipermetilasyon gözleendiği ortaya konmuştur.<sup>33</sup>

Önceden değinildiği gibi bazı genlerin promotör bölgelerindeki CpG adacıkları, olağanın aksine, normal hücrelerde de metiledir ve kanser hücrelerinde (lösemi, melanoma, teratokarsinoma, mesane, meme, beyin, over, kolon, karaciğer, akciğer, prostat, böbrek ve cilt kanserleri) hipometilasyona uğrayarak ekspresyonlarının arttığı saptanmıştır. Hipometilasyonla aktive olan genler arasında potasyum voltaj bağımlı kanal proteini (*KCNE4*), mitokondrial ferritin (*FTMT*), “*developmental pluripotency associated 5 (DPPA5)*”, “*mesoderm specific transcript isoform b (MEST)*”, “*insulin-like 6 precursor (INSL6)*” yer almaktadır. Bu genlerin, metile CpG'lerin yaklaşık üçte birini barındıran Alu tekrar dizileri ile benzerlikleri olduğu gözlenmiştir.<sup>7</sup>

Tümörlerde anormal hipermetilasyon sadece promotör bölgelere sınırlı değildir, örneğin bir çalışmada, kronik miyelositer lösemi (KML)'de, “*B cell leukemia 3 (BCL3)*” geninin 5' ucundaki adacıkta metilasyon saptanmazken 3' ucundaki CpG adacığında metilasyon saptanmıştır.<sup>34</sup> Ancak, 3' ucundaki adacık metilasyonunun, transkripsiyon üzerindeki etkisi açık değildir.<sup>32,34</sup> Promotör bölge CpG adacık metilasyonu sıklıkla gen ekspresyonunda azalmaya neden olurken, kodlayan bölgede

ya da birinci egzonun dışındaki CpG dinükleotidlerindeki metilasyonun gen ekspresyonu üzerine fazla etkisi yoktur.<sup>6</sup>

## KANSERDE İMPRİNTİNGİN ROLÜ

İmprinting, embriyonik ve plasental gelişim ya da erişkin metabolizmasında etkili yaklaşık 50-80 kadar gende gözlenen, ebeveyne özgü monoalelik gen ekspresyonunu tanımlar. Gametogenez sırasında, sıklıkla metilasyonu kapsayan parental işaretler ile belirlenir. İmprinting kaybı “*Loss of Imprinting (LOI)*”, monoalelik ekspresyon kalıbının bozulmasına yol açar ve kanserde en fazla gözlenen değişiklik olarak tanımlanır. LOI ile, normalde bir kopyası baskılanmış büyümeyi uyarıcı bir genin aktive olması (ör. “*insulin like growth factor 2 (IGF2)*” ya da normalde bir kopyası aktif olan büyümeyi önleyici bir genin baskılanması (ör. *p57<sup>KIP2</sup>*) gözlenebilir.<sup>35</sup>

Memeli gelişiminde hücre sayısını belirlemede görevli bir gen olan *IGF2*, kanserde en fazla LOI saptanan genidir. Normalden daha fazla çalışmasının, proliferasyon artışı ile giden hastalıklara yol açtığı bilinmektedir. KML, over tümörü, Wilms' tümörü, kolorektal kanser, renal hücreli karsinom, özefageal kanser, akciğer adenokarsinomu, meninjiyoma, rabdomyosarkoma, hepatoblastoma, Ewing sarkomu, gliyoma ve laringeal skuamöz hücreli karsinomada *IGF2* geninde LOI bildirilmiştir.<sup>35,36</sup>

İmprintingin oluşturulmasında çinko parmak motife sahip proteinler önemlidir, imprinting kusu-ru ile gelişen kanserlerin tedavisinde de sentetik çinko parmak proteinler denenerek tedavi özgüllüğü artırılmaya çalışılmaktadır. Demetile edici ajanların kullanımı seçici olmamasından dolayı LOI ile gelişen kanserlerde tercih edilmemektedir.<sup>35</sup>

## GENOMDAKİ GENEL HİPOMETİLASYONUN KANSERLEŞME SÜRECİNDEKİ ETKİSİ NASILDIR?

Kanser hücrelerinde genel hipometilasyon ile bölgesel hipermetilasyon aynı hücrede oluşabilir. Malign hücrede normal hücreye göre %20-60 oranda daha az 5mC gözlenir. Bunun nedeni, genlerin intronlarında ve kodlayan bölgelerinde bulunan CpG dinükleotidlerinin ve genomun %20-30'unu oluş-

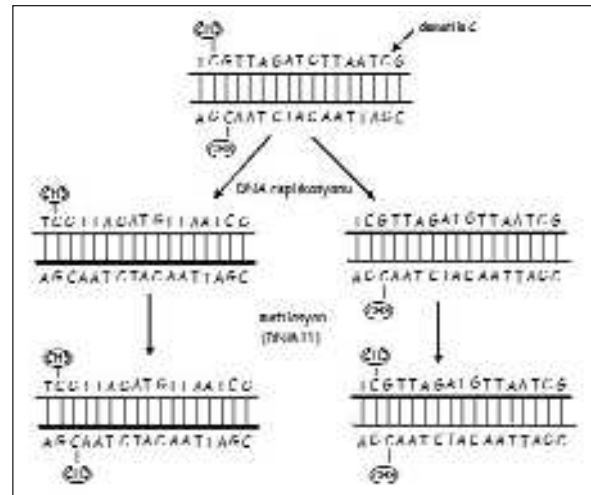
turan ve normalde hipermetile olan tekrarlayıcı (LINE ve ALU gibi) DNA bölgeleri ile parazitik DNA dizilerinin demetile olmasıdır.<sup>9,37</sup> Parazitik DNA dizileri; genoma girmiş viral DNA ya da transpozonlar gibi kodlamayan, transkripsiyonu yapılmayan, pasif olarak kuşaktan kuşağa aktarılan ve DNA'da yayılma eğilimi gösteren, organizmanın yaşamsal hiçbir basamağında görev almayan DNA dizileridir. Tekrar dizilerinde DNA metilasyonunun azalması, tümör oluşumunun erken evrelerinde gözlenir. Hipometilasyonun kanser oluşum sürecindeki etkileri için değişik görüşler vardır. Bunlardan bir tanesi, artan mitotik rekombinasyonlarla, genomda heterozigozite kaybı oluşmasıdır. Tahmin edilebileceği gibi heterozigozite kaybı, özellikle tümör baskılayıcı genlerde her iki kopyanın birden etkisini yitirmesine yol açarak ve LOI'ya neden olarak kanser gelişimine katkıda bulunacaktır. Tekrar dizilerinde gözlenen metilasyon, diziler arasında rekombinasyon oluşmasını önleyerek genomun kararlılığını artırır. Bununla birlikte karyotipik olarak saptanabilen kromozomal değişikliklere, aynı zamanda sentromerik bölgelerde rekombinasyon ile anöploidi oluşumuna neden olabilir. Olası mekanizmalardan bir diğeri ise şu şekildedir: Parazitik DNA dizileri normalde metile olmaları nedeniyle transkribe edilmez, ancak hipometile olursa transkripsiyonu yapılır. Bunların transkripsiyonunun yapılması mevcut transkripsiyon faktörlerinin seviyesini değiştirerek, kompetitif inhibisyona benzer bir mekanizma ile, normalde çalışması gereken başka genlerin ifadesinin değişmesine neden olabilir. Alternatif olarak, yer değiştiren transpozonlar, hem kodlayan hem de kodlamayan bölgelere girerek, antisens bir transkriptin oluşumuna neden olur ya da transkripsiyonun intron gibi farklı bir bölgeden başlamasını sağlayarak etkili olabilir.<sup>38</sup> Transpozonlar hedef lokus ile ilişkisi olmaksızın kendini genomda yeni bir yere yerleştirebilen DNA dizileridir. Antisens transkript ise transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunu düzenleyen mekanizmalardan biri olup, sens (anlamlı) transkripte bağlanarak onun ifade bulmasını engelleyen RNA molekülüdür. Ayrıca, invazyon ve metastazdan sorumlu genlerde gözlenen hipometilasyon bu genlerde etkinlik artışına neden olarak da kanserleşmeye katkıda bulunur.<sup>3</sup>

Solid tümörlerde sıklıkla gözlenen hipoksinin de hipometilasyon oluşumuna katkıda bulunduğu saptanmıştır. Ancak, hipoksinin hipometilasyon yapıcı özelliği normal hücrelerde kanser hücrelerine göre daha fazladır. Metastatik hücrelerin genomu, primer hücrelere göre daha hipometile olmasına karşın, hipoksi ile daha az oranda demetilasyona uğradığı saptanmıştır. Buradan yola çıkarak hipoksi ile demetile olan sınırlı sayıda CpG bölgesi olduğu öne sürülmüştür. Ayrıca hipoksinin metil grubu vericisi olan S-adenozil metiyonin (SAM) oluşumunu azalttığı da ortaya konmuştur.<sup>39</sup>

Sigaranın, alkol tüketiminin ve kanser progresyonunun; skuamöz hücreli baş ve boyun kanserlerinde genomdaki yaygın hipometilasyona katkıda bulunduğu bildirilmiştir.<sup>40</sup>

## METİLASYON-DEMETİLASYON

Memeli gelişimi boyunca metilasyon kalıbı, bir dizi metilasyon ve demetilasyon sonucu meydana gelir.<sup>1</sup> DNMT'ler, demetilazlar ve DNA metilasyon merkezleri metilasyon kalıbının oluşturulmasında belirleyicidir.<sup>39</sup> Hücrede iki tip metilasyon gözlenir: Bunlar 'de novo' metilasyon ve sürdürme (*maintenance*) metilasyonudur. Sürdürme metilasyonu Şekil 3'te açıklanmıştır. Memelilerde metilasyon DNA metil transferaz (DNMT) adı verilen bir grup enzim tarafından gerçekleştirilir. Bugüne kadar ta-



**ŞEKİL 3:** DNA metilasyon kalıbının devamı: DNMT1 sadece metile CpG'ler ile tümleyici olan CpG'lerdeki sitozinleri metiller. Bu şekilde metilasyon kalıbı DNA replikasyonu boyunca korunur. Uyarlandığı makale: Folia Histochem Cytobiol 2007;45:149-58.

nımlanmış 5 sınıf DNMT vardır. Ortak özellikleri düzenleyici bir amino uç ile katalitik bir karboksü uç taşımalarıdır. Bunlardan DNMT1 somatik hücrelerde yoğun bir şekilde ifade bulur, replikasyon çatalını hedef alır ve temel olarak mevcut metilasyon kalıbının sürdürülmesinden sorumludur. DNMT3A ve DNMT3B genellikle 'de novo' metilasyondan sorumludur. DNMT3B özellikle embriyonik kök hücrelerde ifade bulur, klasik alfa satelitlerin metilasyonundan sorumludur, ifade düzeyi farklılaşma arttıkça azalır.<sup>41</sup> DNMT2'nin çok az miktarda katalitik aktivitesi olduğu bilinmektedir ve diğer DNMT'lerin aksine düzenleyici amino ucu yoktur.<sup>42</sup> En son tanımlanan DNMT3L'nin ise katalitik aktivitesi bilinmemektedir, 'de novo' metiltransferazlara eşlik ederek onların DNA afinitesini arttırdığı düşünülmektedir.<sup>6,43</sup>

Yapılan fare deneylerinde yalnızca DNMT1 ya da DNMT3B yokluğunun metilasyon derecesini fazla etkilemediği, aksine her ikisinin de olmadığı durumda metilasyonun azaldığı gözlenmiştir. Buradan yola çıkarak metilasyon kalıbının düzenlenmesinde, gen susturulmasında, epigenetik düzenlemede farklı DNMT'lerin birbirleri ile etkileşerek görev yaptıkları düşünülmüştür.<sup>44</sup>

DNMT'ler, hedef sitozin molekülünün altıncı pozisyonundaki karbon atomu ile kovalan bir bağ oluşturarak kofaktörleri olan SAM'dan aldığı metil grubunu beşinci pozisyonundaki karbon atomuna aktarır ve bu şekilde DNA'yı metiller. DNA'da demetilasyon ise, sadece metil grubunun çıkarılması veya tüm bazın ya da nükleotidin çıkarılmasının ardından yeniden sentez yoluyla yapılabilir.<sup>11</sup> DNMT inhibisyonu, yeni sentezlenen zincirde eski zincirin metilasyon kalıbının oluşturulmasını engelleyerek pasif demetilasyona neden olurken, DNA demetilazlar aktif demetilasyondan sorumludur.<sup>6</sup>

Tümör hücrelerinde uygunsuz metilasyonun olası nedenleri arasında en çok üzerinde durulan konu, DNMT ifadesinin artışıdır. Kanselerde DNMT ifade düzeylerini saptamaya yönelik çalışmalarda elde edilen sonuçlar; çalışılan kanser türüne, yöntem ve hasta gruplarına göre farklılık göstermektedir. Özellikle DNMT1 ve DNMT3B ol-

mak üzere DNMT'lerin ifadelerinin kanser hücrelerinde farklı seviyelerde arttığı, bazı çalışmalarda ise azaldığı saptanmıştır.<sup>45-47</sup> Bazı çalışmalarda ise DNMT ifadesinin hücre proliferasyon artışına bağlı olarak değiştiği ortaya konmuştur.<sup>48</sup> Kansere hücrelerinde normal dokulara göre genellikle DNMT ekspresyonu artışı gözlenmesine karşın, DNMT mutasyonlarına rastlanmamaktadır.<sup>49</sup>

## TÜMÖR BELİRTECİ OLARAK DNA METİLASYONUNUN KULLANIMI

Günümüzde tarama testi olarak, akciğer kanseri için bilgisayarlı tomografi, meme kanseri için mamografi ve meme muayeneleri, kolon kanseri için gaitada gizli kan ve kolonoskopi, mide kanseri için endoskopi gibi yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar, çoğunun pahalı ve invaziv olması nedeniyle, geniş toplum taramaları için elverişli değildir.<sup>27</sup>

Kanser hücrelerindeki metilasyon kalıbı değişiklikleri doku ve tümör tipine özgü olmalarının verdiği avantajla kanser saptanması ve sınıflandırmasında önemli yere sahip olabilir. Ancak aynı kökene sahip tümör hücrelerinde bile çevresel etmenlere, genetik altyapıya ve epigenetik kontrolü etkileyen diğer etmenlere bağlı olarak farklı metilasyon kalıpları gözlenebilmektedir. DNA metilasyon değişikliklerine bağlı tarama metodlarının tamamı, kanser tipine özgü promotör metilasyon panellerinin tümüyle saptanmamış olması ve klinik çalışmaların azlığı nedeniyle henüz tam anlamıyla kullanıma hazır değildir.<sup>4</sup> Ayrıca düşük duyarlılık/özellik oranları nedeniyle diğer tanı yöntemleri ile birlikte kullanılmaları etkinliklerini arttırmaktadır.<sup>50</sup>

Hipermetile promotör bölgelerinin tümör belirleyicisi olarak kullanımı rutin olarak kullanılmasa da pek çok yönden uygundur:

Kanser türlerinin çoğunda, CpG adacık hipermetilasyonu tümör tipine özgü izlenmektedir. Ayrıca, promotör hipermetilasyonu kanserlerin erken döneminde oluştuğu için erken tanıya da olanak sağlamaktadır.<sup>38</sup> Yapılan bir çalışmada, tükürük DNA'sında *MGMT* hipermetilasyonu akciğer kanseri tanısı konmadan 35 ay önce saptanmıştır, bu nedenle asemptomatik bireylerde erken tanı aç-



sından metilasyon önemli bir belirteç olarak kullanılabilir.<sup>51</sup> Tokumaru ve ark.nın 2004 yılında yaptıkları bir çalışmada, prostat kanserinin saptanmasında glutatyon S-transferaz pi (*GSTPI*), retinoik asit reseptör, beta (*RARβ*) ve adenomatöz polipozis koli (*APC*) genlerinin hipermetilasyonu histoloji ile birlikte değerlendirildiğinde prostat adenokarsinomlarının % 97'si saptanmıştır. Sadece histolojik yönden değerlendirildiğinde ise bu sayı % 64'le sınırlı kalmıştır.<sup>52</sup>

Metilasyon değişiklikleri primer tümör bölgesi dışında da saptanabilmektedir. Örneğin, kanser hastalarının serum, idrar ve balgamlarında da anormal CpG metilasyonu saptanmıştır.<sup>51,53,54</sup> Yapılan çalışmalarda, akciğer kanserinde bronkoalveolar lavaj sıvısından, endometriyal kanserde vajinal tamponlardan elde edilen vajinal sekresyondan, böbrek ve mesane kanserlerinde idrardan, kolorektal kanserde feçesten, prostat ve mesane kanserlerinde serumdan elde edilen DNA örneklerinde promotör metilasyonuna bakılarak bu yöntemlerin erken tanı için elverişli olduğu sonucuna varılmıştır.<sup>55-61</sup> Kanser hastalarının plazmasında muhtemelen artmış apoptotik ve nekrotik hücre artıklarına bağlı olarak normalden daha fazla oranda serbest DNA bulunur, bu da metilasyon değişikliklerinin saptanması için kanın da kullanılmasına olanak sağlar.<sup>50</sup>

Metastatik dokularda, primer tümörden farklı metilasyon dereceleri saptanabilmektedir. Mide kanseri ve metastatik lenf nodlarında genel olarak DNA metilasyon derecesinin değiştiği ve metastazdan sorumlu protein tirozin fosfataz, reseptör tip G (*PTPRG*) geninin metastatik lenf nodlarında daha fazla metile olduğu saptanmıştır.<sup>62</sup>

Farklı tümör tiplerinde metile olan genlere bakıldığında, bir kısmının ortak olduğu gözlenmektedir, bu özellik pek çok kanser için aynı genlerin metilasyon derecelerine bakarak kanser tarama metodlarının geliştirilmesine olanak tanımaktadır. Özellikle "basonuclin 1 (*BNC1*)" ve "msh homeobox1 (*MSX1*)" metilasyonunun, tümör saptanması için özgül ve duyarlı olduğu gözlenmiştir.<sup>27</sup> Gene pek çok kanserde, hücre döngüsü kontrolü ve apoptoziste etkili *p14*, *p15*, *p16*, *Rb*, "death-associated protein kinase1 (*DAPK*)"; DNA onarımında etkili

*MGMT*, *hMLH1*; adezyon ve metastazda etkili *CDH1*, *CDH13*; biyotransformasyonda etkili *GSTPI* ve sinyal iletiminde görevli *RARβ*, *APC* genlerinin metile olduğu saptanmıştır.<sup>50</sup>

Metilasyon, sıklıkla DNA üzerindeki belli bölgelerde gözlenmesi nedeniyle de, DNA dizisi değişikliklerinden daha kolay saptanabilmektedir. Mutasyonlar genin herhangi bir yerinde gözlenmesi nedeniyle daha geniş çaplı araştırmalarla belirlenebilmektedir.<sup>50</sup>

PCR'ye dayalı, metilasyon tanımlayıcı, yeterli özgüllüğe sahip yöntemlerin geliştirilmiş olması metilasyon değişikliklerinin saptanmasını pratikleştirmektedir.<sup>23</sup>

Kanser hücrelerinin DNA'sında genel hipometilasyon saptanmasına rağmen bunun tanısal açıdan bir önemi belirlenememiştir.<sup>50</sup>

## KANSERDE EPİGENETİK TEDAVİ

Genetik mutasyonların aksine epigenetik mutasyonların geri dönüşlü olması ve CpG adacık metilasyonunun normal hücrelerde çok ender gözlenmesi kanser tedavisinde demetile edici ajanların kullanımı gündeme getirmiştir.<sup>2,63</sup> Normal hücrelerde promotör metilasyonunun çok az gözlenmesi, metilasyonu, kemoterapötikler için özgül bir hedef haline getirmektedir. Ancak epigenetik tedavide kullanılan ilaçların genel sitotoksik etkileri de göz ardı edilememektedir.

5-azasitidin, 5-aza-2'deoksitidin ve zebularin bugüne kadar kullanılmakta olan sitozin analogu demetile edici ajanlardan üçüdür, metabolize ve fosforile edildikten sonra sitozinin yerine DNA yapısına katılır. DNMT'ler bunları normal substratları olarak kabul eder, ancak oluşturdukları kovalan bağdan ayrılamazlar, bu şekilde enzimin parçalanarak ortamdan uzaklaşması sağlanır, DNA'da hasar oluşturma potansiyeli de vardır.<sup>44</sup> Bunların dışında nükleozid analogu olmayan DNMT inhibitörleri de bulunmaktadır, bunların etki mekanizması ise prokainde olduğu gibi DNMT'lerin hedef bölge ile etkileşimini önlemek ya da hidralazinde ve yeşil çayda bulunan "epigallocatechin-3-gallate'da olduğu gibi doğrudan DNMT1'in katalitik bölgesini bloke etmek şeklindedir. Demetilasyon

yapmak amacıyla DNMT1 mRNA'sı ile bağlanan antisens oligonükleotidler de kullanılmaktadır. Bunlar, DNMT1 translasyonunu önleyerek ve mRNA'sını yıkararak, genomda hipometilasyona yol açmaktadır.<sup>64</sup>

Demetile edici ajanların kullanılması düşünülenin aksine, hipermetilasyonla susturulan genlerde tahmin edildiği kadar aktivasyona neden olmamıştır.<sup>44</sup> Bu nedenle de kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılmamaktadır. Ancak, özellikle hematolojik malignitelerde, demetile edici ajanların idame tedavisi olarak düşük dozlarda kullanılması önemli bir yere sahiptir.<sup>31</sup>

Metile DNA'nın, histon deasetilazları bölgeye çektiği bilinmektedir. Genomda ifade bulan genlerin promotor bölgeleri sıklıkla demetiledir ve DNA'nın bağlı olduğu histon proteini de asetiledir (Şekil 2). Bunun tam tersi durum genin susturulmasına neden olur. Bu nedenle demetile edici ajanlarla birlikte histon deasetilaz inhibitörlerinin (örneğin fenilbütirat, TSA kullanımının daha etkili olacağı düşünülebilir.<sup>23</sup> Bu şekilde DAZ'ın yüksek dozlarda kullanımı ile ortaya çıkan toksik etkilerinin de azaltılması mümkün olacaktır.<sup>38</sup>

Epigenetik tedavide ele alınması gerekli konular, tedavi yanıtını değerlendirecek biyobelirteçlerin bulunması, hücre toksisitesi daha az ve daha seçici yeni demetile edici ajanların bulunması, histon metilasyonu gibi farklı epigenetik değişikliklere yönelik tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi olarak değerlendirilebilir.<sup>65</sup> Ancak kanser tedavisinde başarıyı arttıracak en önemli etmen, kanser hücrelerinde oluşan temel değişikliklerin (genetik ya da epigenetik) hastalara göre ortaya konması olacaktır.<sup>3</sup>

### ■ DNA METİLASYONUNUN KANSER PROGNOZUNU BELİRLEMEDEKİ ÖNEMİ

Promotor bölge hipermetilasyonu hem kanser hücrelerinin büyüme avantajını hem de malign potansiyelini yansıtmaları nedeniyle prognostik belirleyici olarak kullanılabilir. Yapılan çalışmalarda *E-kaderin* geninin mide ve dil kanserinde; *laminin-5* geninin prostat kanserinde; *p16*, "Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein (*IGFBP-3*)" ve *APC* genlerinin küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerin-

de; *kalsitonin* ve *p21* genlerinin ALL'de hipermetilasyonunun kötü prognoz göstergesi olduğu saptanmıştır.<sup>7</sup>

Gene akciğer kanserinde, oligodendrosit transkripsiyon faktör (*OLIG1*) metilasyonu ne kadar fazla ise, protein ürününün o kadar az ve prognozunda o kadar kötü olduğu bildirilmiştir.<sup>66</sup> *APC*, *GSTP1* ve "*Tazarotene-induced gene 1 (TIG1)*" genlerinin promotor hipermetilasyonunun ise mesane kanserinde kötü prognoz göstergesi olduğu ifade edilmiştir.<sup>61</sup>

Kanser hücreleri kanser tipine göre farklı metilasyon kalıpları gösterebilir, bu nedenle metilasyon kalıbına bakarak kanser tiplendirmesi yapmak mümkündür. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde, metilasyon kalıpları incelenerek tiplendirme yapılabilmektedir.<sup>66</sup>

### ■ DNA HİPERMETİLASYONU VE KEMOTERAPİYE YANITIN ÖNGÖRÜLMESİ

Promotor hipermetilasyonu tedaviye yanıtı etkileyen genlerde de gözlenebilir. Bunlar arasında en sık çalışılanlar alkile guaninlerin onarımında çalışan *O<sup>6</sup>-MGMT* geni ile yanlış eşleşme onarımında görev yapan *hMLH1* genidir. *O<sup>6</sup>-MGMT*, *O<sup>6</sup>-metilguanin*deki metil rezidülerini kaldırır ve bu şekilde DNA polimerazın hatalı çalışarak transversiyon (pürinden (A,G) pirimidine (C,T) ya da pirimidinden pürine dönüşüm) mutasyonları oluşturmaya engel olur. Metilasyonla inaktive olması durumunda kanser hücresi alkile edici ajanların etkisine daha duyarlı hale gelir.<sup>14</sup>

Özellikle gliyoblastoma hastalarında, *O<sup>6</sup>-MGMT* hipermetilasyonu alkile edici ilaçlara karşı iyi yanıt gelişmesine neden olurken, diğer kanserlerde her zaman aynı yanıt geçerli görünmemektedir. *hMLH1* geni hipermetilasyonu ise sisplatin, karboplatin gibi ilaçlara direnç gelişiminde etkilidir.<sup>16</sup> Östrojen ve progesteron reseptörlerinin hipermetilasyonu kanser hücrelerinin steroid hormonlara yanıtınlığına yol açacaktır. Benzer şekilde retinoik asit reseptöründe hipermetilasyon olan kanserlerde, retinoik asidin farklılaştırıcı özelliği gözlenemeyecektir.<sup>38</sup> DNA onarımında etkili

“*ataxia telangiectasia mutated (ATM)*” geni metilasyonunun kolorektal kanser hücre serilerinin radyoduyarlılığını arttırdığı, “*estrogen receptor 1 (ESR1)*” geni metilasyonunun ise tamoksifene yanıtın belirlenmesinde önemli olduğu bildirilmiştir.<sup>50</sup>

## SONUÇ

DNA metilasyonunun, genom organizasyonunda önemli ve karmaşık bir role sahip olduğu, her geçen gün biraz daha anlaşılmaktadır. Genomun işlevindeki farklılıklar ise kanserin en önemli

nedenidir. Bu bilgiler göz önüne alındığında, çok basamaklı kanser oluşum sürecinde, metilasyonun da, genomik değişiklikler kadar etkili olduğu açıkça ortaya çıkmaktadır. Metilasyon değişikliklerinin nasıl oluştuğu ve gen ifadesi üzerindeki etkileri daha net bir şekilde ortaya konduğunda kanserle başa çıkmak kolaylaşacaktır. Kanserde mortalitenin düşürülmesinde en önemli basamak erken tanıdır, metilasyon değişikliklerinin de kanser oluşumunun erken basamaklarında oluştuğu düşünülürse, metilasyon kalıbı değişikliklerinin incelenmesi mortalitenin azaltılması yönünden umut vericidir.

## KAYNAKLAR

- Szyf M, Knox DJ, Milutinovic S, Slack AD, Araujo FD. How does DNA methyltransferase cause oncogenic transformation? *Ann N Y Acad Sci* 2000;910:156-74.
- Baylin SB. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2005;2 (Suppl) 1:S4-11.
- Ducasse M, Brown MA. Epigenetic aberrations and cancer. *Mol Cancer* 2006 ;5:60.
- Zhu J, Yao X. Use of DNA methylation for cancer detection and molecular classification. *J Biochem Mol Biol* 2007;40:135-41.
- Robertson KD. DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene* 2001;20:3139-55.
- Sulewska A, Niklinska W, Kozlowski M, Minarowski L, Naumnik W, Niklinski J, et al. DNA methylation in states of cell physiology and pathology. *Folia Histochem Cytobiol* 2007;45:149-58.
- Shen L, Kondo Y, Guo Y, Zhang J, Zhang L, Ahmed S, et al. Genome-wide profiling of DNA methylation reveals a class of normally methylated CpG island promoters. *PLoS Genet* 2007;3:2023-36.
- Kang GH, Lee HJ, Hwang KS, Lee S, Kim JH, Kim JS. Aberrant CpG island hypermethylation of chronic gastritis, in relation to aging, gender, intestinal metaplasia, and chronic inflammation. *Am J Pathol* 2003;163:1551-6.
- Iacopetta B, Grieco F, Phillips M, Ruskiewicz A, Moore J, Minamoto T, et al. Methylation levels of LINE-1 repeats and CpG island loci are inversely related in normal colonic mucosa. *Cancer Sci* 2007;98:1454-60.
- Esteller M. The necessity of a human epigenome project. *Carcinogenesis* 2006;27:1121-5.
- Schmutte C, Fishel R. Genomic instability: first step to carcinogenesis. *Anticancer Res* 1999;19:4665-96.
- Grønbaek K, Hother C, Jones PA. Epigenetic changes in cancer. *APMIS* 2007;115: 1039-59.
- Warnecke PM, Bestor TH. Cytosine methylation and human cancer. *Curr Opin Oncol* 2000;12:68-73.
- Park SY, Kim BH, Kim JH, Cho NY, Choi M, Yu EJ, et al. Methylation profiles of CpG island loci in major types of human cancers. *J Korean Med Sci* 2007;22:311-7.
- Bird AP. The relationship of DNA methylation to cancer. *Cancer Surv* 1996;28:87-101.
- Ballestar E, Esteller M. The impact of chromatin in human cancer: linking DNA methylation to gene silencing. *Carcinogenesis* 2002;23:1103-9.
- Robertson KD, Jones PA. DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis* 2000;21:461-7.
- Cheung LW, Lee YF, Ng TW, Ching WK, Khoo US, Ng MK, et al. CpG/CpNpG motifs in the coding region are preferred sites for mutagenesis in the breast cancer susceptibility genes. *FEBS Lett* 2007;581:4668-74.
- Baylin SB. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2005;2 (Suppl) 1:S4-11.
- Rice JC, Allis CD. Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13:263-73.
- McGarvey KM, Fahrner JA, Greene E, Martens J, Jenuwein T, Baylin SB. Silenced tumor suppressor genes reactivated by DNA demethylation do not return to a fully euchromatic chromatin state. *Cancer Res* 2006;66:3541-9.
- Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001;61:3225-9.
- Herman JG, Baylin SB. Promoter-region hypermethylation and gene silencing in human cancer. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000;249:35-54.
- Hsieh CL. Dependence of transcriptional repression on CpG methylation density. *Mol Cell Biol* 1994;14:5487-94.
- Moss TJ, Wallrath LL. Connections between epigenetic gene silencing and human disease. *Mutat Res* 2007;618:163-74.
- Costello JF, Frühwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, et al. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet* 2000;24:132-8.
- Brena RM, Plass C, Costello JF. Mining methylation for early detection of common cancers. *PLoS Med* 2006;3:e479.
- Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:6870-5.
- Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res* 1999;59:793-7.
- Ballestar E, Esteller M. The impact of chromatin in human cancer: linking DNA methylation to gene silencing. *Carcinogenesis* 2002;23:1103-9.

31. Cameron EE, Bachman KE, Myöhänen S, Herman JG, Baylin SB. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet* 1999;21:103-7.
32. Ushijima T. Epigenetic field for cancerization. *J Biochem Mol Biol* 2007;40:142-50.
33. Xie CH, Naito A, Mizumachi T, Evans TT, Douglas MG, Cooney CA, et al. Mitochondrial regulation of cancer associated nuclear DNA methylation. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;364:656-61.
34. McKeithan TW, Ohno H, Dickstein J, Hume E. Genomic structure of the candidate proto-oncogene BCL3. *Genomics* 1994;24:120-6.
35. Jelinic P, Shaw P. Loss of imprinting and cancer. *J Pathol* 2007;211:261-8.
36. Byun HM, Wong HL, Birnstein EA, Wolff EM, Liang G, Yang AS. Examination of IGF2 and H19 loss of imprinting in bladder cancer. *Cancer Res* 2007;67:10753-8.
37. Rodriguez J, Vives L, Jordà M, Morales C, Muñoz M, Vendrell E, et al. Genome-wide tracking of unmethylated DNA Alu repeats in normal and cancer cells. *Nucleic Acids Res* 2008;36:770-84.
38. Esteller M, Herman JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol* 2002;196:1-7.
39. Shahrzad S, Bertrand K, Minhas K, Coomber BL. Induction of DNA hypomethylation by tumor hypoxia. *Epigenetics* 2007;2:119-25.
40. Smith IM, Mydlarz WK, Mithani SK, Califano JA. DNA global hypomethylation in squamous cell head and neck cancer associated with smoking, alcohol consumption and stage. *Int J Cancer* 2007;121:1724-8.
41. Xie S, Wang Z, Okano M, Nogami M, Li Y, He WW, et al. Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene* 1999;236:87-95.
42. Jeltsch A. Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases. *ChemBiochem* 2002;3:274-93.
43. Aapola U, Kawasaki K, Scott HS, Ollila J, Vihinen M, Heino M, et al. Isolation and initial characterization of a novel zinc finger gene, DNMT3L, on 21q22.3, related to the cytosine-5-methyltransferase 3 gene family. *Genomics* 2000;65:293-8.
44. Mund C, Brueckner B, Lyko F. Reactivation of epigenetically silenced genes by DNA methyltransferase inhibitors: basic concepts and clinical applications. *Epigenetics* 2006;1:7-13.
45. Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang G, Talmadge C, Sumegi J, Gonzales FA, et al. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res* 1999;27:2291-8.
46. Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Danenberg PV, Laird PW. CpG island hypermethylation in human colorectal tumors is not associated with DNA methyltransferase overexpression. *Cancer Res* 1999;59:2302-6.
47. Xiong Y, Dowdy SC, Xue A, Shujuan J, Eberhardt NL, Podratz KC, et al. Opposite alterations of DNA methyltransferase gene expression in endometrioid and serous endometrial cancers. *Gynecol Oncol* 2005;96:601-9.
48. Choi MS, Shim YH, Hwa JY, Lee SK, Ro JY, Kim JS, et al. Expression of DNA methyltransferases in multistep hepatocarcinogenesis. *Hum Pathol* 2003;34:11-7.
49. Esteller M. Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes. *Br J Cancer* 2006;94:179-83.
50. Paluszczak J, Baer-Dubowska W. Epigenetic diagnostics of cancer--the application of DNA methylation markers. *J Appl Genet* 2006;47:365-75.
51. Palmisano WA, Divine KK, Saccomanno G, Gilliland FD, Baylin SB, Herman JG, et al. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. *Cancer Res* 2000;60:5954-8.
52. Tokumaru Y, Harden SV, Sun DI, Yamashita K, Epstein JI, Sidransky D. Optimal use of a panel of methylation markers with GSTP1 hypermethylation in the diagnosis of prostate adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:5518-22.
53. Sanchez-Cespedes M, Esteller M, Wu L, Nawroz-Danish H, Yoo GH, Koch WM, et al. Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients. *Cancer Res* 2000;60:892-5.
54. Battagli C, Uzzo RG, Dulaimi E, Ibanez de Caceres I, Krassenstein R, Al-Saleem T, et al. Promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in urine from kidney cancer patients. *Cancer Res* 2003;63:8695-9.
55. Topaloglu O, Hoque MO, Tokumaru Y, Lee J, Ratovitski E, Sidransky D, et al. Detection of promoter hypermethylation of multiple genes in the tumor and bronchoalveolar lavage of patients with lung cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:2284-8.
56. Fiegl H, Gatttringer C, Widschwendter A, Schneitter A, Ramoni A, Sarlay D, et al. Methylated DNA collected by tampons--a new tool to detect endometrial cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:882-8.
57. Hoque MO, Begum S, Topaloglu O, Jeronimo C, Mambo E, Westra WH, et al. Quantitative detection of promoter hypermethylation of multiple genes in the tumor, urine, and serum DNA of patients with renal cancer. *Cancer Res* 2004;64:5511-7.
58. Dulaimi E, Uzzo RG, Greenberg RE, Al-Saleem T, Cairns P. Detection of bladder cancer in urine by a tumor suppressor gene hypermethylation panel. *Clin Cancer Res* 2004;10:1887-93.
59. Huang ZH, Li LH, Yang F, Wang JF. Detection of aberrant methylation in fecal DNA as a molecular screening tool for colorectal cancer and precancerous lesions. *World J Gastroenterol* 2007;13:950-4.
60. Ellinger J, Haan K, Heukamp LC, Kahl P, Büttner R, Müller SC, et al. CpG island hypermethylation in cell-free serum DNA identifies patients with localized prostate cancer. *Prostate* 2008;68:42-9.
61. Ellinger J, El Kassem N, Heukamp LC, Matthews S, Cubukluoz F, Kahl P, et al. Hypermethylation of cell-free serum DNA indicates worse outcome in patients with bladder cancer. *J Urol* 2008;179:346-52.
62. Wang JF, Dai DQ. Metastatic suppressor genes inactivated by aberrant methylation in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2007;13:5692-8.
63. Szyf M. Towards a pharmacology of DNA methylation. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22:350-4.
64. Sigalotti L, Fratta E, Coral S, Cortini E, Covre A, Nicolay HJ, et al. Epigenetic drugs as pleiotropic agents in cancer treatment: biomolecular aspects and clinical applications. *J Cell Physiol* 2007;212:330-44.
65. Garcia-Manero G. Modifying the epigenome as a therapeutic strategy in myelodysplasia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007;2007:405-11.
66. Brena RM, Morrison C, Liyanarachchi S, Jarjoura D, Davuluri RV, Otterson GA, et al. Aberrant DNA methylation of OLIG1, a novel prognostic factor in non-small cell lung cancer. *PLoS Med* 2007;4:e108.