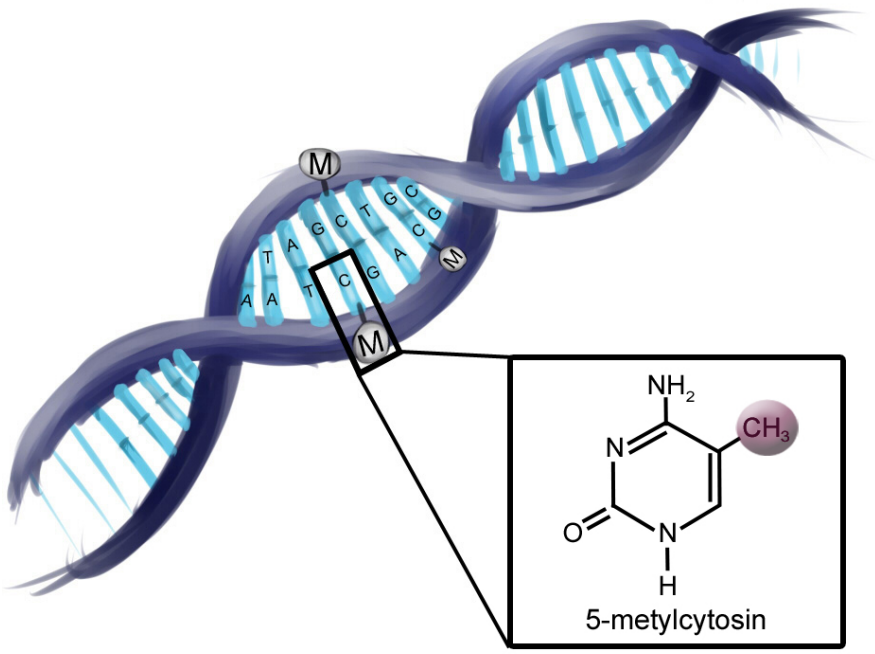
UPPSALA
UNIVERSITET

Verkan av demetylerande ämnen vid cancerbehandling



Helena Dahlén

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, vårterminen 2015
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Sammandrag
Epigenetik innebär att genuttrycket förändras utan att DNA-sekvensen i sig påverkats. Metylering av DNA är en av de mest studerade epigenetiska förändringarna och specifika mönster av metylering kan antingen tysta eller aktivera gener. Metyleringsmönstren hos cancerceller skiljer sig i hög utsträckning från dem som ses hos friska celler. Flera studier har visat att cancerceller tenderar att ha en ökad grad av metylering i vissa promotorregioner medan det övriga genomet ofta uppvisar en minskning i metyleringsgrad. Då promotorer blir överdrivet metylerade leder det i regel till att genuttrycket tystas. Sker detta hos tumörsuppressorgener kan resultatet bli en ökad risk för okontrollerad celldelning och därmed uppkomst av cancertumörer. En minskad metyleringsgrad av det övriga genomet kan leda till överaktivering av proto-onkogener samt en instabilitet av genomet i stort, vilket även detta kan ge en ökad risk för tumörbildning.

Eftersom epigenetiska förändringar är reversibla har studier gjorts för att undersöka om en återställning av metyleringsmönstren kan användas som cancerbehandling. Demetylerande ämnen verkar genom att inhibera de enzym som är involverade i metyleringsprocessen och därmed återuttrycka tystade tumörsuppressorer. De mest studerade demetylerande substanserna är azacitidin (AZA) och decitabin (DAC). Dessa molekyler har mycket likartad struktur och verkningsmekanism, men eftersom AZA är en ribonukleosid kan molekylen i aktiv form inkorporeras både i DNA och RNA medan DAC, en deoxyribonukleosid, endast kan inkorporeras i DNA. Vid låga koncentrationer verkar både DAC och AZA genom att reducera metyleringsgraden. Vid högre koncentrationer av AZA kan substansen också inhibera proteinsyntesen. Både AZA och DAC används i dagsläget vid behandling av vissa typer av leukemi hos äldre människor. Resultatet av behandlingen har varierat mellan olika studier och forskning pågår i dagsläget för att undersöka om ämnena kan kombineras med andra cytostatika på ett framgångsrikt sätt.

Inledning
Cancer är en sjukdom som påverkar många, antingen för att man själv drabbas eller då någon närstående insjuknar. Enligt Socialstyrelsens statistik är tumörsjukdomar den näst vanligaste dödsorsaken i Sverige, endast hjärt- kärlsjukdomar orsakar fler dödsfall (Baatz & Johansson 2015). Eftersom efterfrågan är stor på en behandlingsmetod som är så effektiv som möjligt mot cancercellerna och samtidigt så skonsam som möjligt mot kroppens övriga celler är cancerforskning en mycket aktuell fråga.

På senare tid har mycket pekat på att epigenetiska förändringar, bland annat metylering av DNA:t, kan ha stor påverkan på bildandet av cancertumörer. Begreppet epigenetik syftar till påverkan på genomstabilitet eller genuttryck som inte förändrar sekvensen i sig (He *et al*. 2013). Epigenetisk påverkan är reversibel, i motsats till förändringar som sker i DNA-sekvensen. Detta innebär att det är möjligt att återställa de epigenetiska förändringarna (Yoo *et al*. 2007), något som varit av stort intresse för forskning på en effektiv cancerbehandling. Min uppsats åsyftar att redogöra för hur DNA-metylering påverkar uppkomsten av tumörer samt förklara hur analoger till nukleosiden cytidin verkar som demetylerande ämnen och hur dessa är tänkta att fungera som cancerterapi.

DNA-metylering innebär att en metylgrupp adderas till en nukleotid i DNA-sekvensen. Hos däggdjur sker additionen till cytosin. Metylgruppen tas ifrån molekylen S-Adenosylmetionin (SAM) och binds till 5'-änden på cytosinmolekylen genom en reaktion katalyserad av DNA-metyltransferaser (DNMT-transferaser) (Kho *et al.* 1998). Det finns fem identifierade

DNMT-transferaser hos däggdjur, varav tre är ansvariga för metyleringsprocessen; DNMT1, DNMT3a och DNMT3b (Gowher *et al*. 2005).

Det cytosin som oftast blir metylerat förekommer i så kallade CpG-positioner. Med CpG-positioner menas att cytosin är placerad intill guanin i DNA-sekvensen. CpG-positioner tenderar att vara ojämnt fördelade i genomet och påträffas främst i vissa sekvenser, omtalade som CpG-öar. Dessa är ofta placerade i promotorregionen och förekommer i ungefär 40 % av genomets promotorer (Weisenberger *et al*. 2005). Metylering av CpG-positioner i promotorregioner tenderar att leda till en reducering av genuttrycket. Denna typ av genreglering används i många sammanhang, det medverkar bland annat för att tysta gener på X-kromosomen (Jair *et al*. 2006).

Hur sker DNA-metylering?

Det finns i huvudsak två olika processer för DNA-metylering, vilka utförs av olika enzym (tabell 1). Den ena processen har som funktion att metylera DNA som är hemimetylerat, det vill säga då ena strängen är metylerad och den andra ometylerad. Den andra processen metylerar istället DNA *de novo*, vilket betyder metylering av DNA som är ometylerat på båda strängarna (Jair *et al*. 2006).

DNMT1

DNA-metyltransferas 1 (DNMT1) metylerar främst hemimetylerat DNA (Jair *et al*. 2006). Enzymet har som huvudsaklig funktion att bibehålla metyleringsmönstren på den nysyntetiserade DNA-strängen under replikationen, vilket bland annat är viktigt för formationen att av heterokromatin ska ske på rätt sätt (Scott *et al*. 2014).

Strukturellt består DNMT1 av 1620 aminosyror, varav ca 500 ingår i C-terminalen och omkring 1000 förkommer i N-terminalen. I C-terminalen finns den delen av enzymet som har katalyserande effekt (Fatemi *et al*. 2001). I N-terminalen finns bland annat en sekvens som används för att känna igen replikationsgaffeln. Nedströms från denna sekvens finns en kort "zinc binding domain" som har betydelse för att avgöra om den aktuella sekvensen är ometylerad eller hemimetylerad. Denna del av enzymet interagerar också med det katalytiska området (Fatemi *et al*. 2001). DNMT1 har dock i även visat sig metylera DNA *de novo* i vissa specifika CpG-öar, vilket iakttogs i en studie med genmodifierade cancerceller som saknade DNMT3a och DNMT3b (Jair *et al*. 2006).

DNMT3a och DNMT3b

DNMT3a och DNMT3b är de enzym som i huvudsak metylerar DNA *de novo*, vilket bland annat sker i embryonala stamceller (Jair *et al*. 2006). Liksom DNMT1 har både DNMT3a och DNMT3b enzymets katalyserande del belägen i C-terminalen (van Emburgh *et al*. 2011). DNMT3a i sig förekommer i två olika isoformer, DNMT3a och DNMT3a2. DNMT3a2 saknar 219 animosyror i proteinets N-terminal jämfört med DNMT3a och har dessutom en något lägre enzymaktivitet (Suetake *et al*. 2011). Mutationer i genen för DNMT3b orsakar ICF (Immunodeficiency–centromeric instability–facial anomalies syndrome), en sällsynt sjukdom där regioner nära centromeren är hypometylerade (van Emburgh *et al*. 2011).

Övriga metyltransferaser

Förutom ovanstående enzym finns även DNMT2 och DNTM3L (tabell 1). Dessa klassas båda som DNA-metyltransferaser trots att ingen av dem metylerar DNA. DNTM3L verkar som en reglerande faktor genom att binda till DNMT3a och DNMT3b och öka deras

enzymaktivitet (Gowher *et al*. 2005). DNMT2 är en homolog till DNMT1 och DNMT3, men detta enzym har inte setts metylera DNA *in vivo* utan endast tRNA (Goll *et al*. 2006).

Tabell 1. Lista över de fem identifierade metyltransferasen och deras främsta funktion.

Enzym	**Funktion**
DNMT1	Metylerar hemimetylerat DNA
DNMT2 (TRDMT1)	Metylerar tRNA
DNMT3a	Metylerar DNA *de novo*
DNMT3b	Metylerar DNA *de novo*
DNMT3L	Ökar enzymaktiviteten av DNMT3a och DNMT3b

Metyleringsmönster i normala celler jämfört med cancerceller

I normala celler är CpG-positioner i promotoregionen ofta ometylerade medan majoriteten av CpG-positionerna i övriga genomet är metylerade (Bird *et al*. 1985). Tumörceller kan däremot uppvisa flera typer av avvikande metyleringsmönster. Vilka gener som påverkas varierar något mellan olika cancertyper.

Hypermetylering tystar tumörsuppressorgener

Många cancertyper uppvisar en ökad grad av metylering, så kallad hypermetylering, i promotorregionen till olika tumörsuppressorgener (He *et al*. 2013). Hypermetyleringen av promotorregioner leder i regel till att genens aktivitet inhiberas. Om en tumörsuppressorgen blir tystad genom hypermetylering medför detta en ökad risk för okontrollerad celldelning, och därav ökad risk för bildning av tumörer. Inaktiveringen av genen kan antingen bero på att transkriptionsfaktorer inte längre har möjlighet att binda eller genom verkan av enzymer som orsakar andra epigenetiska förändringar, så som histondeacetylaser (Campos *et al*. 2007). Histondeacetylaser är enzymer som tar bort acetylgrupper från histoner, vilket gör att DNA-molekylen binder hårdare till histonen och generna blir därför mindre benägna att uttryckas (Burke *et al.* 2014).

Hypermetylering av andra promotorregioner

Förutom tumörsuppressorgener kan även andra gener tystas och verka som en bidragande faktor till tumörbildning. Genen *hMLH1* kodar för ett protein involverat i MisMatch Repair, ett system som används av både prokaryoter och eukaryoter för att reparera fel i DNA-sekvensen som sker under replikationen (Rajan *et al*. 2014). Denna gen har setts vara hypermetylerad hos cancerceller i flera typer av cancer, bland annat i mag- tarmkanalerna (Nakajima *et al*. 2001) och i äggstockarna (Strathdee *et al*. 1999). Studier på patienter med tjocktarmscancer visade att promotorregionen hos *hMLH1* var hypermetylerad i 20,3 % av cancerfallen (Li *et al*. 2013).

Även gener involverade i apoptos, exempelvis gener som kodar för kaspaser eller “apoptotic protease activating factor” (APAF), kan ibland bli hypermetylerade hos cancerceller. *APAF-1* har setts vara metylerad i cellinjer av humana leukemiceller, där metyleringen resulterade i något lägre nivåer av APAF-1 (Fu *et al*. 2003). I en studie utförd av Christoph *et al*. (2006) undersöktes metyleringsgraden hos ett flertal gener, bland annat *APAF-1*, i celler från 90 patienter med njurcancer. Vid analys av resultatet kunde man konstatera att 97 % av cellinjerna hade en hypermetylering av promotorregionen till *APAF-1*. Man såg också att 41 % hade en hypermetylering av promotorn till genen *DAPK-1*, vilken kodar för ett kinas som

också är involverat i apoptos (Christoph *et al.* 2006). En annan studie visade att promotorregionen av genen *CASP8*, som kodar för kaspas-8, var metylerad i varierande utsträckning hos 52 av 70 testade neuroblastom (Kamimatsuse *et al*. 2009). Uttrycket av *CASP8* sågs i studien också vara signifikant lägre hos celler metylerade i CpG-positioner i nukleotid nr 840 och 854, jämfört med tumörceller som inte var metylerade i dessa positioner. Detta indikerade att specifikt dessa två positioner var av betydelse för huruvida genen tystades eller inte (Kamimatsuse *et al*. 2009).

Global hypometylering

I motsats till promotorregionerna uppvisar genomet i stort ofta en minskning i metyleringsgrad, så kallad hypometylering, hos cancerceller jämfört med normala celler i samma vävnad (He *et al*. 2013). Hypometyleringen är ofta koncentrerad i repetitiva sekvenser, vilka upptar omkring 45 % av det mänskliga genomet (Weisenberger *et al*. 2005). Majoriteten av de repetitiva sekvenserna är muterade versioner av en typ av retrotransposoner. Av dessa står "long interspersed nucleotide element-1" (LINE-1) för ca 20 %, och dessa områden är de som oftast ses vara hypometylerade hos cancerceller (Weisenberger *et al*. 2005).

Den globala hypometyleringen tenderar att resultera i flera parallella effekter, inklusive instabilitet av genomet samt en ökad risk för uttryck av onkogener. *MET* är en proto-onkogen som setts överaktiverad genom hypometylering vid flera olika cancertyper, bland annat kronisk myeloisk leukemi (Roman-Gomez *et al.* 2005). Då sju cellinjer från humana tjocktarmstumörer undersöktes *in vitro* konstaterades att hypometyering av vissa LINE-1 element var kopplat med överdriven aktivering av proto-onkogener som annars var tystade genom metylering. De aktuella proto-onkogenerna var *MET*, *RAB3IP* och *CHRM3* (Hur *et al*. 2014).

Möjliga orsaker till avvikande metyleringsmönster

Precis vad som orsakar de avvikande mönstren i metylering hos cancerceller är ännu oklart, men beror troligen på flera faktorer som samverkar. Det förekommer ett flertal teorier gällande omständigheter som på olika sätt kan påverka metyleringsgraden, varav några presenteras nedan.

Genuttryck av metyltransferaser i cancerceller

En teori gäller huruvida hypermetyleringen i promotorregionerna beror på ett ökat genuttryck av gener som kodar för DNA metyltransferaser (DNMT-transferaser). Studier på cancer i flera vävnader, bland annat i bukspottskörtel, har visat att DNA metyltransferas 1 (DNMT1) ofta är mer uttryckt i cancerceller jämfört med normala celler i samma vävnad (Peng *et al*. 2005). Cancerceller som saknar gener för DNMT1 och DNMT3b saknar även i hög utsträckning metylering av DNA-sekvensen, vilket antyder att dessa två enzym har stor betydelse för processen (Jair *et al*. 2006).

Graden av genuttryck av DNMT3b tycks variera något mellan cancertyper i olika vävnader. I studier på celler från gastric signet ring cell carcinoma (SRC) sågs ingen förändring i genuttryck för DNMT3b vid jämförelse mellan tumörceller och normala celler (He *et al*. 2013). Studier på cancerceller i centrala nervsystemet uppvisade däremot ett signifikant ökat genuttryck av DNMT3b (Rajendran *et al*. 2011). I en studie med celler från akut myeloisk leukemi identifierades drygt 20 transkript av genen *DNMT3b* som visade sig ha en avvikande splicing i 5'-änden. Den förändrade splicingen resulterade i att genen kodade för ett förkortat

protein som helt eller delvis saknade enzymets katalytiska del av C-terminalen (Ostler *et al*. 2007). Den vanligast förekommande isoformen var DNMT3B7 som kodades av 40 - 50 % av *DNMT3b*-transkripten från cancercellerna. Denna form av enzymet var endast 40 kDa jämfört med normalt DNMT3b på 96 kDa (Ostler *et al*. 2007). För att undersöka om förekomsten av förkortade enzym bidrog till ett avvikande metyleringsmönster uttryckets *DNMT3B7* i 293 cellinjer, vilka därefter jämfördes med cellinjer som inte uttryckte trunkerat enzym. Då cellinjerna som uttryckte förkortat enzym undersöktes, konstaterades att metyleringsmönstren hos fyra gener överensstämde med mönster som iakttagits i cancerceller. Dessa inkluderade bland annat en ökad grad av metylering i promotorregionen för tumörsuppressorgenen *E-cadherin* (Ostler *et al*. 2007).

DNMT3a verkar ha en mindre betydelse för avvikande metyleringsmönster jämfört med DNMT1 och DNMT3b. För DNMT3a sågs en minskning av genuttryck för cancerceller från gastric signet ring cell carcinoma (SRC) i jämförelse med normala celler från samma vävnad (He *et al*. 2013). DNMT3a tycks dock ändå ha viss påverkan på metyleringsprocessen hos tumörer. Studier på celler hos möss med lungcancer har visat att cancerceller med mindre mängder DNMT3a har en något lägre metyleringsgrad än cancerceller med normal mängd enzym (Raddatz *et al.* 2012).

Sammantaget kan sägas att ett ökat genuttryck setts för både DNMT1 och DNMT3b i cancerceller jämfört med normala celler. Mycket tyder på att uttrycket av dessa två enzym har stor betydelse cancercellers avvikande metyleringsmönster medan DNMT3a tycks ha en något mindre betydelse (Jair *et al*. 2006).

Reaktiva syreföreningar

Reaktiva syreföreningar, så som fria syreradikaler eller föreningar som lätt övergår till radikaler, är en biprodukt av mitokondriernas respiration (Nohl *et al*. 2003). Dessa tenderar att orsaka cellskador genom en process kallad oxidativ stress. Alla som lever i en syrerik miljö riskerar att utsättas för oxdiativ stress och måste därför ha mekanismer för att handskas med detta. Skador på DNA-sekvensen orsakat av oxidativ stress är ofta omtalad som en bidragande orsak till uppkomst av tumörer och ett flertal studier har visat att oxidativ stress kan inducera både hypermetylering och hypometylering (Wongpaiboonwattana *et al.* 2013). Hypometyleringen tros orsakas av flera olika faktorer, men ett av de mest omtalade skälen är förekomst av 8-oxo-2'-deoxyguanosin (8-OHdG) i DNA-sekvensen. 8-OHdG är en oxiderad form av kvävebasen guanin bunden till deoxyribos, vilken kan förhindra bindning av metyltranseraser och på så sätt hindra metylering av närliggande cytosin i DNA-sekvensen (Weitzman *et al*. 1994).

Hur reaktiva syreföreningar orsakar hypermetylering av DNA är ännu inte fastställt men ett flertal studier har visat att detta förekommer. Studier på celler från matstrupen hos människa har visat tecken på att väteperoxid, H_2O_2, kan inducera hypermetylering hos *p16*, vilket är en tumörsuppressorgen som ofta är hypermetylerad vid matstrupscancer (Hong *et al*. 2010). Även studier på tumörceller från levervävnad visade en ökad grad av metylering, denna gång i promotorregionen på tumörsupressorgenen *E-cadherin*, efter behandling med väteperoxid. I studien iakttogs också bindning av både DNMT1 och histondeacetylaser till den undersökta promotorregionen. Ingen påverkan sågs dock på mängden DNMT3a eller DNMT3b vid behandlingen (Lim *et al*. 2008).

Metyleringsmönster och åldrande
Då en människa åldras ökar både frekvensen av avvikande metyleringsmönster och risken för att cancertumörer uppstår (Rakyan *et al*. 2010). Att förstå kopplingen mellan avvikande metylering och åldrande relaterat till avvikande metylering och cancer kan alltså vara viktigt för att förklara uppkomsten av cancertumörer. När blodprov från 93 friska kvinnor i åldern 49 - 75 år undersöktes iakttogs i stort sett samma metyleringsmönster som ofta ses hos cancerceller (Rakyan *et al*. 2010). I studien användes 28 av de 29 tumörsuppressorgener som Ohm *et al*. (2007) studerat metyleringsmönstren i hos humana cancerceller. En jämförelse gjordes sedan för att se hur mönstren överensstämde med varandra. Man fann då att metyleringsmönstren hos cancerceller signifikant liknade de mönster som sågs i metyleringen hos åldrade celler (Rakyan *et al*. 2010). Liknande studier har även gjorts på metyleringsmönster i andra vävnader. Johnson *et al.* (2014) analyserade relationen mellan metyleringsgrad och åldrande i normala celler från bröstvävnad, för att sedan jämföra resultaten med metyleringsmönstren hos tumörceller från samma vävnad. Man kunde konstatera att 204 CpG-positioner uppvisade åldersrelaterade metyleringsmönster. Av dessa 204 positioner uppvisade 97 % en ökning i metyleringsgrad (Johnson *et al.* 2014). Då en jämförelse gjordes mellan metyleringsmönster i åldrande celler och cancerceller observerades liknande mönster i 24 av de 204 loci som tidigare uppvisat åldersrelaterad metylering. Bland annat iakttogs hypermetylering av ett flertal tumörsuppressorgener (Johnson *et al.* 2014).

Liksom i cancerceller har ett förändrat genuttryck för DNMT-transferaser setts i åldrande celler. Då mängden mRNA för DNMT1, DNMT3a och DNMT3b undersöktes i celler från lungvävnad konstaterades en minskning av DNMT1 och DNMT3a i åldrande celler medan en signifikant ökning sågs av DNMT3b (Casillas *et al*. 2003).

Samband mellan hypermetylering och resistens mot cytostatika
Förutom att tysta gener involverade i celldelning och apoptos har hypermetyleringen i sig också setts minska effektiviteten hos vissa cytostatika som används för att behandla tumörerna. I en studie utförd av Grövdal *et al*. (2007) sågs att metyleringsmönsten hos vissa gener signifikant påverkade effekten av cytostatika (daunorubicin och cytarabin) som vanligen används vid behandling av akut myeloisk leukemi. Studien inkluderade 60 patienter med antingen akut myeloisk leukemi eller myelodysplastiskt syndrom. Metyleringsstatus hos tumörsuppressorgenerna *p15* och *E-cadherin* analyserades innan dess att behandling med daunorubicin och 1-β-D-arabinofuranosylcytosin inleddes. Därefter undersöktes andelen patienter som fullständigt återhämtat sig och om andelen återhämtade hade någon signifikant koppling till den tidigare undersökta metyleringsstatusen. Inget signifikant samband kunde ses mellan metyleringsgraden hos *p15* och andelen återhämtade, däremot konstaterades en signifikant lägre grad av återhämtning hos patienter där *E-cadherin* varit hypermetylerad (Grövdal *et al*. 2007).

Användningsområden för demetylerande ämnen
För att minska metyleringen av hypermetylerade promotorregioner används demetylerande ämnen, vilka inhiberar verkan av metyltransferaser (Yoo *et al*. 2007). Några av de mest studerade demetylerande substanserna är analoger till nukleosiden cytidin. Två av dessa är azacitidin (AZA) och decitabin (DAC) (Yoo *et al*. 2007). Dessa ämnen är strukturellt sett mycket lika, den enda skillnaden är att AZA är en ribonukleosid och DAC är en deoxyribonukleosid (Aimiuwu *et al.* 2012). Båda substanser används i dagsläget vid behandling av benmärgssjukdomen myelodysplastiskt syndrom (MDS) samt vid kronisk

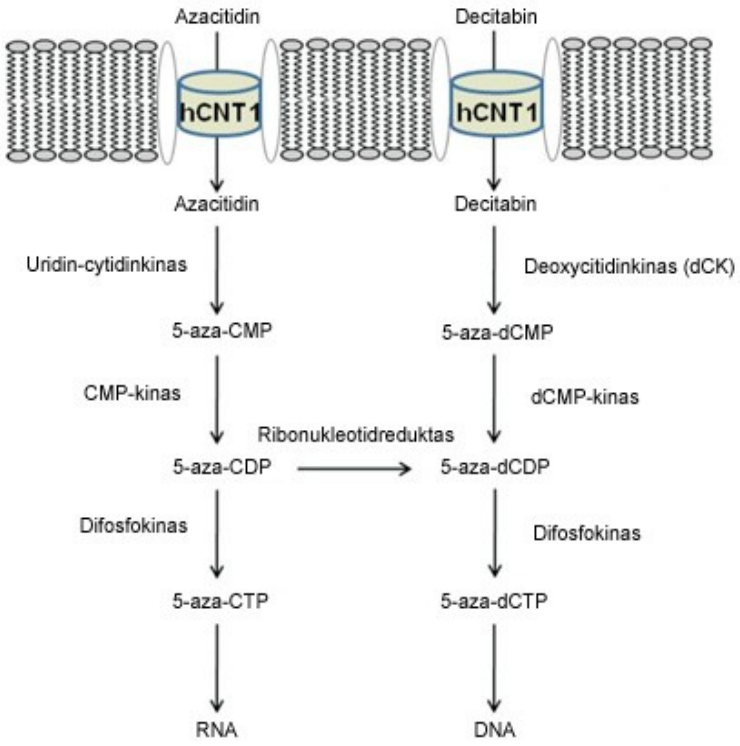
myelomonocytär leukemi (CMML) och akut myeloisk leukemi (ALM) hos äldre personer (Marcucci *et al*. 2013). Forskning görs också på möjligheten att använda cytidinanaloger vid behandling av andra typer av cancer som påverkar blodbildande celler, exempelvis myelom (Maes *et al*. 2014).

Zebularin
Förutom AZA och DAC förekommer även studier på en annan analog till cytidin, substansen zebularin, vilken i dagsläget ej används vid cancerbehandling. Från början var zebularin tänkt att förhindra deaminering av cytosin till uracil eftersom ämnet saknar en aminogrupp på pyrimidinringen (Cheng *et al*. 2003). Senare visade sig substansen även vara effektiv för demetylering. Studier *in vitro* har visat att starka komplex formas mellan zebularin och metyltransferaser hos *Escherichia coli*, vilket indikerade att ämnet eventuellt skulle gå att använda för demetylering (Hurd *et al.* 1999). Zebularin har senare setts aktivera gener hos svamparten *Neurospora crassa* som blivit tystade genom hypermetylering (Cheng *et al*. 2003). Studier har även gjorts på humana cellinjer från cancerceller i urinblåsan där zebularin förhindrade metylering av 5'-änden på *p16* (Cheng *et al*. 2004).

Verkningsmekanism hos AZA och DAC

Eftersom AZA och DAC strukturellt sett skiljer sig något ifrån varandra förekommer också vissa skillnader i processen som sker från att substansen tas upp av cellen tills inkorporering sker i DNA-sekvensen (figur 1). I klinisk behandling används med fördel analoger till nukleosider och inte nukleotider, detta eftersom nukleotider har en negativt laddad fosforgrupp som gör att cellen inte effektivt kan ta upp molekylen (Yoo *et al*. 2007). Nukleosider kan däremot tas in i cellen, vilket görs med hjälp av "equilibrative nucleoside transporters" (hENT-proteiner) och "concentrative nucleoside transporters" (hCNT-proteiner). Därefter sker en fosforylering där deoxycytidinkinaser (dCK) adderar en fosfatgrupp till DAC som då blir 5-aza-dCMP. Molekylen fosforlyleras därefter ytterligare och blir slutligen 5-aza-dCTP, vilket är aktiva formen (Qin *et al*. 2009). 5-aza-dCTP kan sedan bli inkorporerad i DNA-sekvensen som ett substitut till nukleotiden cytosin. Verkan består i att molekylen kovalent binder till DNMT1 och på så sett inhiberar fortsatt metylering. Metyltransferaset blir så småningom degraderat (Yoo *et al*. 2007).

För AZA förekommer två aktiva former; 5-aza-dCTP som blir inkorporerad i DNA och aza-CTP som blir inkorporerad i RNA (Aimiuwu *et al.* 2012). Efter att molekylen kommit in i celler blir denne först fosforlyrerad av uridin-cytidinkinas och därefter av difosfatkinas. Den senare fosforlyleringen ger 5-aza-CTP som slutprodukt. En intermediär produkt är dock 5-aza-CDP, och en liten andel (uppskattningsvis 10 – 20 %) av dessa molekyler blir konverterade till 5-aza–dCDP istället för att omvandlas till aza-CTP (Aimiuwu *et al.* 2012). Konverteringen från en ribonukleotid (5-aza-CDP) till en deoxiribonukleotid (aza-dCDP) görs av enzymet ribonukleotidreductas. 5-aza–dCDP kan sedan i sin tur bli fosforylerad till 5-aza-dCTP som därefter inkorporeras i DNA-sekvensen (Aimiuwu *et al.* 2012).



Figur 1. Schematisk bild över processen från upptag till inkorporering av AZA och DAC där ingående enzym visas, översatt till svenska efter Yang *et al*. (2010) med tillstånd från upphovsrättsinnehavaren.

Effekter av AZA och DAC vid cancerbehandling

Både AZA och DAC har ett flertal olika effekter på cellerna då substanserna används som cancerbehandling. I regel påverkar både AZA och DAC metyleringsgraden vid lägre koncentrationer medan AZA vid högre koncentrationer också har påverkan på proteinsyntesen. Vid behandling förekommer även en del negativa effekter, inkluderat ökad risk för global hypometylering, vilket i sig kan öka risken för cancer (Hollenbach *et al.* 2010).

Skillnader i potens

Hollenbach *et al*. publicerade 2010 en studie *in vitro* där två cellinjer från personer med akut myeloisk leukemi användes för att jämföra effekterna från DAC och från AZA. Vid en jämförelse av EC_{50} (koncentration som krävs för att uppnå hälften av maximal effekt) för de båda substanserna visade sig AZA vara betydligt mer potent vid högre koncentrationer (>1 µM). Detta skulle kunna bero på att halveringstiden för både AZA och DAC är mycket kort i cellkulturer, vilket kan ha betydelse i sammanhanget då AZA har möjlighet verka i alla delar av cellcykeln i och med inkorporering i RNA-sekvensen, medan DAC bara är effektiv under S-fasen. Då denna hypotes testades ytterligare kunde slutsatsen dras att det krävdes en högre en koncentration av DAC än av AZA för att uppnå samma effekt (Hollenbach *et al.* 2010).

Påverkan på proteinsyntesen

Förutom demetylering av DNA kan vissa demetylernade ämnen också verka mot tumörer genom inhibering av proteinsyntesen. AZA och DAC visade sig i studien av Hollenbach *et al*. (2010) ha väsentliga skillnader i effekten på translationen. Vid behandling med AZA (2 µM) iakttogs en inhibering av proteinsyntesen med 51 % i den ena cellinjen och 58 % i den andra

testade cellinjen. DAC däremot visade ingen signifikant påverkan på proteinsyntesen, varken vid koncentrationer av 2 µM eller av 5 µM (Hollenbach *et al.* 2010).

Orsaken till dessa skilda resultat är att AZA, till skillnad från DAC, inkorporeras i RNA-sekvensen vilket är nödvändigt för att substansen ska kunna påverka translationen. Eftersom 80 – 90 % av all inkorporering av AZA sker i RNA-sekvensen leder detta till kraftig påverkan på translationen, vilket kan leda till apoptos (Aimiuwu *et al.* 2012). AZA iakttogs också orsaka celldöd vid behandling med koncentrationer över 1 µM i högre grad än DAC (Hollenbach *et al.* 2010).

Ökad global hypometylering

Eftersom DAC och AZA verkar genom att hypometylera DNA och inte specifikt ersätter cytosin enbart i promotorregionen leder användningen även till en ökad hypometylering av det övriga genomet. I studien utförd av Hollenbach *et al.* (2010) användes metyleringsgraden i LINE-1 hos cellinjerna som mått för att undersöka hur substanserna påverkade den globala hypometyleringen. En minskning av metyleringsgraden iakttogs då cellinjerna behandlades med AZA vid koncentration 0,3–1 µM och för DAC vid koncentration 0,03–1 µM. Vid behandling med AZA uppmättes maximal hypometylering vid 1 µM medan behandling med DAC resulterade i maximal hypometylering av LINE-1 i båda testade cellinjer vid 0,3 µM (Hollenbach *et al.* 2010). Slutsatsen är att DAC orsakar global hypometylering vid lägre koncentrationer än AZA, båda orsakar dock global hypometylering vid kliniskt relevanta koncentrationer (Hollenbach *et al.* 2010).

Resistens mot AZA och DAC

Resistens är ett problem vid behandling med både DAC och AZA, mekanismen bakom resistensen tycks dock skilja sig åt. Hos både DAC och AZA tycks resistensen dock vara kopplad till mutationer i gener som kodar för de kinas som fosforylerar substanserna innan inkorporering i DNA-sekvensen. Qin *et al*. (2009) genomförde en studie *in vitro* där cellinjer från humana cancerceller med både naturligt uppkommen DAC-resistens samt med inducerad resistens användes för att undersöka mekanismen bakom resistensen. Man såg att nivåerna av deoxycytidinkinaser (dCK) var mycket låga i celler som var resistenta mot DAC jämfört med celler som inte var resistenta. Detta berodde på lågt uttryck av dCK-mRNA och var även korrelerat med låga nivåer av mRNA för hENT-proteiner. Höga nivåer av mRNA för CDA, vilket är ett enzym som inaktiverar DAC, iakttogs också i de resistenta cancercellerna (Qin *et al*. 2009). Majoriteten av de mest resistenta cellinjerna uppvisade även avvikelser i gener för CDA, hENT-proteiner eller dCK medan detta inte förekom i någon av de cellinjer som hade en högre känslighet för DAC. Man kunde även konstatera att nivåer av DNMT-transferaser inte hade någon synbar koppling till DAC-resistens. Ingen koppling kunde ses mellan resistens mot DAC och resistens mot AZA, vilket antogs bero på att AZA inte fosforyleras av dCK och berörs därför inte av brist på enzymet (Qin *et al*. 2009).

Studier har även gjorts för att försöka utröna mekanismen bakom resistens mot AZA. Sripayap *et al*. (2014) skapade två cellinjer från humana leukemiceller där man inducerade resistens mot AZA med syftet att undersöka resistensensmekanismen. För att undersöka om resistensen berodde på en minskad aktivitet av AZA jämfördes mängderna av DNMT1, DNMT3a och DNMT3b mellan känsliga och resistenta celler. Då konstaterades att resistenta celler hade signifikant reducerade nivåer av samtliga tre enzym jämfört med de känsliga cellinjerna (Sripayap *et al*. 2014). Hypotesen var då att resistensen berodde på rubbningar i aktiveringsprocessen av AZA, vilket skulle kunna bero på UCK2, ett uridin-cytidinkinas som är essentiellt för AZAs aktivering. Inga förändringar sågs i proteinnivåerna för UCK2,

däremot iakttogs ett flertal mutationer i två exoner hos genen *UCK2* (Sripayap *et al*. 2014). Efter att ytterligare studerat effekten av dessa mutationer kunde slutsats dras att mutationerna troligtvis påverkade aktiviteten hos UCK2 och att detta sannolikt hade betydelse för cellernas resistensutveckling (Sripayap *et al*. 2014).

Resultat av kliniska studier

Ett flertal kliniska studier har utförts där man undersökt hur AZA och DAC fungerar vid behandling av leukemi. Benton *et al*. (2014) analyserade verkan av DAC då 14 patienter med akut myeloisk leukemi behandlades med olika doser av substansen efter att tidigare ha genomgått minst en annan cancerbehandling. Man undersökte metyleringsgraden och kunde konstatera att DAC var mest effektiv som demetylerande substans vid koncentrationen 60 mg/m^2 kroppsyta. Då metyleringsgraden av LINE-element undersöktes iakttogs att låga koncentrationer (10 – 80 mg/m^2) inducerade global hypometylering. Hypometyleringen var inte lika förekommande hos patienter som behandlades med högre doser (100 – 120 mg/m^2) (Benton *et al*. 2014). Kliniska studier har även gjorts på patienter som behandlats med AZA. Pleyer *et al.* (2014) utförde en studie som inkluderade 302 patienter med akut myeloisk leukemi som behandlades med AZA. Av dessa patienter svarade 48 % på behandlingen och första responsen skedde med ett median på 3 månader (Pleyer *et al.* 2014).

DAC kombinerat med inhibering av histondeacetylaser

Utöver vanlig cytostatika har DAC har även kombinerats med andra substanser som också påverkar epigenetiska förändringar. DAC har bland annat kombinerats med vorinostat, vars effekt är att inhibera histondeacetylaser och därmed återställa acetyleringen av histonerna (Burke *et al*. 2014). Behandling med en kombination av DAC och vorinostat skedde hos patienter med akut lymfatisk leukemi mellan 2009 och 2012. Man kontrollerade där genomets metyleringsgrad efter 0 och 5 dagars behandling och en jämförelse gjordes mellan fyra patienter som svarat och fyra patienter som inte svarat på behandlingen. En signifikant skillnad sågs mellan grupperna, där gruppen som svarat på behandling uppvisade en lägre metyleringsgrad än de som inte svarat på behandling (Burke *et al*. 2014). En av de gener som uppvisade en väsentligt lägre metyleringsgrad efter 5 dagars behandling var *APAF-1*. Man såg också en signifikant lägre grad av metylering hos patienter som fullständigt återhämtade sig efter behandling jämfört med patienter som inte gjorde det (Burke *et al*. 2014).

AZA och DAC i kombination med andra cytostatika

Eftersom hypermetylering visat sig påverka känsligheten för cytostatikabehandling har det varit aktuellt att kombinera demetylerande ämnen med andra cytostatika. Tanken är att ämnena då, förutom sin egen verkan, också ska öka effekten av de andra läkemedlen (Glasspool *et al*. 2014). Denna hypotes har testats med varierande resultat. Både positiva och negativa effekter har iakttagits då DAC kombinerats med andra cytostatika. Ingen av studierna har dock uppvisat något som tyder på att den minskade metyleringsgraden i sig kunnat öka effekten av andra cytostatika (Leonard *et al*. 2014).

Hos patienter med äggstockscancer gjordes en jämförelse mellan effekterna av behandling med enbart karboplatin och en kombination av både karboplatin och DAC. Baserat på resultaten i studien kunde man dock bara konstatera att DAC i detta fall snarare verkade reducera än öka effekten av karboplatin (Glasspool *et al*. 2014). Vid försök *in vitro* där celler från akut myeloisk leukemi behandlades med en kombination av DAC och cytarabin iakttogs dock en ökad effekt då substanserna kombinerades jämfört med behandling med substanserna var för sig (Leonard *et al*. 2014). Eftersom effekten ökade oavsett i vilken ordning

läkemedlen användes iakttogs dock inget som antydde att demetyleringen bidrog till en ökad verkan av cytarabin (Leonard *et al*. 2014).

Även AZA har kombinerats med andra cytostatika i kliniska studier. Strathdee *et al*. (1999) visade att *hMLH1* är hypermetylerad i många fall av resistens mot cytostatikan cisplatin vid äggstockscancer. Eftersom genuttryck av *hMLH1* tros vara viktig för utvecklingen av resistensen uppstod frågeställningen om en minskad metyleringsgrad skulle påverka resistensutvecklingen (Strathdee *et al*. 1999). Då AZA och cisplatin kombinerades uppvisade cancercellerna en högre känslighet för cisplatin och därmed iakttogs en ökad påverkan på tumörtillväxten. Denna ökade känslighet var dock ej relaterad till det ökade uttrycket av *hMLH1*, utan kunde endast förklaras av en interaktion mellan AZA och cisplatin (Strathdee *et al*. 1999).

Diskussion

När tumörer uppstår beror detta ofta av ett flertal faktorer som samverkar och cancerceller skiljer sig i många avseenden från normala celler. Det kan därför vara svårt att avgöra precis vad som orsakar cancern och vilka förändringar som uppkommit senare. Flera studier har visat en signifikant skillnad mellan metyleringsmönstren i DNA:t hos cancerceller och normala celler i samma vävnad. Vad som orsakar denna skillnad är dock oklart och ett flertal teorier förekommer. Då studier gjorts på friska åldrande celler har man iakttagit att deras metyleringsmönster i hög utsträckning liknar de mönster som cancerceller uppvisar. Detta väcker frågan om de aktuella metyleringsmönstren verkligen är unika för just cancerceller eller om orsaken till att mönstren ses hos dessa är att cancer främst uppstår vid hög ålder. Mycket tyder dock på att metylering, åtminstone i viss utsträckning, påverkar uppkomsten av cancer. Detta eftersom metylering av promotorregioner till tumörsuppressorgener leder till att dessa tystas, vilket ökar risken för okontrollerad celldelning. Även den globala hypometyleringen verkar på flera sätt vara en bidragande orsak till uppkomsten av tumörer. Att friska åldrande celler i vissa avseenden uppvisar ett liknande metyleringsmönster skulle därmed kunna antyda att dessa är på väg att utveckla cancer. Noteras bör dock att metylering av vissa specifika CpG-positioner är mer avgörande än andra för inhibering av genuttryck, något som Kamimatsuse *et al.* (2009) iakttog i studier på celler från patienter med njurcancer. En ökad grad av metylering i sig medför därför inte alltid en ökad cancerrisk utan metylgruppens placering är också betydelsefull.

Eftersom så många olika faktorer spelar in vid bildandet av tumörer medför detta stora svårigheter vid forskning på en effektiv cancerbehandling och ingen nuvarande behandlingsmetod kan ses som fullständigt heltäckande. Även om både azacitidin och decitabin visat sig minska metyleringsgraden av hypermetylerade promotorregioner finns ett flertal negativa effekter. Ett av de mest uppenbara problemen är att substanserna inte bara minskar metyleringsgraden av promotorregioner utan även av det övriga genomet. Forskningen i dagsläget är till stor del inriktad på vilka möjligheter som finns att kombinera demetylerande ämnen med andra cytostatika med förhoppningen att den minskade metyleringsgraden ska öka effekten av dessa. Även om flera studier har visat att en större effekt kan uppnås då demetylerande ämnen kombinerats med andra cytostatika kan man i dagsläget inte slå fast precis vad den ökade responsen beror på. I de flesta studier verkar den ökade effekten endast vara orsakad av att substanserna var för sig minskar tumörtillväxten.

Att dra någon klar slutsats kring hur demetylerande ämnen faktiskt fungerar som cancerbehandling är mycket svårt i dagsläget. Dels för att många studier inkluderar ganska få

individer, vilket gör att resultaten blir något osäkra, men också för att resultaten i olika studier varit mycket varierande. Uppkomsten av cancertumörer är dessutom en tämligen komplex process och kunskap saknas om många involverade faktorer. Fastställas kan dock att demetylerande ämnen i viss utsträckning verkar begränsa tillväxten av tumörer och därefter får vidare forskning avgöra hur denna kunskap bäst kan användas för att skapa en så effektiv cancerterapi som möjligt.

Tack

Stort tack till Lage Cerenius för handledning samt till Annie Hammare, Emil Östholm, Pauline Bergström och Sofia Sjöberg för återkoppling.

Referenser

Aimiuwu J, Wang H, Chen P, Xie Z, Wang J, Liu S, Klisovic R, Mims A, Blum W, Marcucci G, Chan KK. 2012. RNA-dependent inhibition of ribonucleotide reductase is a major pathway for 5-azacytidine activity in acute myeloid leukemia. Blood **119**: 5229 - 5238.

Baatz K, Johansson LA. 2015. Dödsorsaker 2013. Socialstyrelsen, Stockholm.

Benton CB, Thomas DA, Yang H, Ravandi F, Rytting M, O'Brien S, Franklin AR, Borthakur G, Dara S, Kwari M, Pierce SR, Jabbour E, Kantarjian H, Garcia-Manero G. 2014. Safety and clinical activity of 5-aza-2′-deoxycytidine (decitabine) with or without Hyper-CVAD in relapsed/refractory acute lymphocytic leukaemia. British Journal of Haematology **167**: 356 - 365.

Bird A, Taggart M, Frommer M, Miller OJ, Donald M. 1985. A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. Cell **40**: 91–99.

Burke MJ, Lamba JK, Pounds S, Cao X, Ghodke-Puranik Y, Lindgren BR, Weigel BJ, Verneris MR. 2014. A therapeutic trial of decitabine and vorinostat in combination with chemotherapy for relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. American Journal of Hematology **89**: 889 - 895.

Campos ACE, Molognoni F, Melo FHM, Galdieri LC, Carneiro CRW, D'Almeida V, Correa M, Jasiulionis MG. 2007. Oxidative stress modulates DNA methylation during melanocyte anchorage blockade associated with malignant transformation. Neoplasia **9**: 1111 - 1121.

Casillas MA, Lopatina N, Andrews LG, Tollefsbol TO. 2003. Transcriptional control of the DNA methyltransferases is altered in aging and neoplastically-transformed human fibroblasts. Molecular and Cellular Biochemistry **252**: 33 - 43

Cheng JC, Matsen CB, Gonzales FA, Ye W, Greer S, Marquez VE, Selker EU. 2003. Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine. Journal of the National Cancer Institute **95:** 399 - 409.

Cheng JC, Weisenberger DJ, Gonzales FA, Liang G, Xu GL, Hu YG, Marquez VE, Jones PA. 2004. Continuous zebularine treatment effectively sustains demethylation in human bladder cancer cells. Molecular and Cellular Biology **24**: 1270 - 1278.

van Emburgh BO, Robertson KD. 2011. Modulation of Dnmt3b function in vitro by interactions with Dnmt3L, Dnmt3a and Dnmt3b splice variants. Nucleic Acids Research **39**: 4984–5002.

Fatemi M, Hermann A, Pradhan S, Jeltsch A. 2001. The activity of the murine DNA methyltransferase Dnmt1 is controlled by interaction of the catalytic domain with the N-terminal part of the enzyme leading to an allosteric activation of the enzyme after binding to methylated DNA. Journal of Molecular Biology **309**: 1189 - 1199.

Fu WN, Bertoni F, Kelsey S, McElwaine SM, Cotter FE, Newland AC, Jia L. 2005. Role of DNA methylation in the suppression of Apaf-1 protein in human leukaemia. Oncogene **22**: 451 - 455.

Glasspool RM, Brown R, Gore ME, Rustin GJS, McNeish IA, Wilson RH, Pledge S, Paul J, Mackean M, Hall GD, Gabra H, Halford SER, Walker J, Appleton K, Ullah R, Kaye S. 2014. A randomised, phase II trial of the DNA-hypomethylating agent 5-aza-2′-deoxycytidine (decitabine) in combination with carboplatin vs carboplatin alone in patients with recurrent, partially platinum-sensitive ovarian cancer. British Journal of Cancer 110: 1923 - 1929.

Goll MG, Kirpekar F, Maggert KA, Yoder JA, Hsieh CL, Zhang X, Golic KG, Jacobsen SE, Bestor TH. 2006. Methylation of tRNAAsp by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. Science **311**: 395 - 398.

Gowher H, Liebert K, Hermann A, Xu G, Jeltsch A. 2005. Activity of Dnmt3A and Dnmt3B DNA-(cytosine-C5)-methyltransferases by Dnmt3L. The Journal of Biological Chemistry **280**: 13341 - 13348.

Grövdal M, Khan R, Aggerholm A, Antunovic P, Astermark J, Bernell P, Engström L, Kjeldsen L, Linder O, Nilsson L, Olsson A, Wallvik J, Tangen JM, Öberg G, Jacobsen SE, Hokland P, Porwit A, Hellström-Lindberg E. 2007. Negative effect of DNA hypermethylation on the outcome of intensive chemotherapy in older patients with high-risk myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia following myelodysplastic syndrome. Clinical Cancer Research **13**: 7107 – 7112.

He M, Fan J, Jiang R, Tang WX, Wang ZW. 2013. Expression of DNMTs and genomic DNA methylation in gastric signet ring cell carcinoma. Molecular Medicine reports **8**: 942-948.

Hollenbach PW, Nguyen AN, Brandy H, Williams M, Ning Y, Richard N, Krushel L, Sukerman SL, Heise C, MacBeth KJ. 2010. A comparison of azacitidine and decitabine activities in acute myeloid leukemia cell lines. PLoS One, doi: 10.1371/journal.pone.0009001

Hong J, Resnick M, Behar J, Wang LJ, Wands J, DeLellis RA, Souza RF, Specher SJ, Cao W. 2010. Acid-induced p16 hypermethylation contributes to development of esophageal adenocarcinoma via activation of NADPH oxidase NOX5-S. American Journal of Physiology Gastrointestal and Liver Physiology **299**: 697 - 706.

Hur K, Cejas P, Feliu J, Moreno-Rubio J, Burgos E, Boland CR, Goel A. 2014. Hypomethylation of long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) leads to activation of proto-oncogenes in human colorectal cancer metastasis. Gut **63**: 635-646

Hurd PJ, Whitmarsh AJ, Baldwin GS, Kelly SM, Waltho JP, Price NC, Connolly BA, Hornby DP. 1999. Mechanism-based inhibition of C5-cytosine DNA methyltransferases by 2-H pyrimidinone. Journal of Molecular Biology **286**: 389 - 401.

Jair KW, Bachman KE, Suzuki H, Ting AH, Rhee I, Chiu Yen RW, Baylin SB, Schuebel KE. 2006. De novo CpG island methylation in human cancer cells. Cancer Research **66**: 682 -692.

Johnson KC, Koestler DC, Cheng C, Christensen BC. 2014. Age-related DNA methylation in normal breast tissue and its relationship with invasive breast tumor methylation. Epigenetics **9**: 268-275.

Kamimatsuse A, Matsuura K, Moriya S, Fukuba I, Yamaoka H, Fukuda E, Sueda T, Hiyama E. 2009. Detection of CpG island hypermethylation of caspase-8 in neuroblastoma using an oligonucleotide array. Pediatric Blood & Cancer **52**: 777 - 783.

Kho MR, Baker DJ, Laayoun A, Smith SS. 1998. Stalling of human DNA (cytosine-5) methyltransferase at single-strand conformers from a site of dynamic mutation. Leukemia Research **275**: 67 - 79.

Leonard SM, Perry T, Woodman CB, Kearns P. 2014. Sequential treatment with cytarabine and decitabine has an increased anti-leukemia effect compared to cytarabine alone in xenograft models of childhood acute myeloid leukemia. PLoS One, doi: 10.1371/journal.pone.0087475.

Li X, Yao X, Wang Y, Hu F, Wang F, Jiang L, Liu Y, Wang D, Sun G, Zhao Y. 2013. MLH1 Promoter methylation frequency in colorectal cancer patients and related clinicopathological and molecular features. PLoS One, doi: 10.1371/journal.pone.0059064

Lim SO, Gu JM, Kim MS, Kim HS, Park YN, Park CK, Cho JW, Park YM, Jung G. 2008. Epigenetic changes induced by reactive oxygen species in hepatocellular carcinoma: methylation of the E-cadherin promoter. Gastroenterology **135**: 2128 - 2140.

Marcucci G, Silverman L, Eller M, Lintz L, Beach CL. 2013. Bioavailability of azacitidine subcutaneous versus intravenous in patients with the myelodysplastic syndromes. The Journal of Clinical Pharmacology **45**: 597 - 602.

Nakajima T, Akiyama Y, Shiraishi J, Arai T, Yanagisawa Y, Ara M, Fukuda Y, Sawabe M, Saitoh K, Kamiyama R, Hirokawa K, Yuasa Y. 2001. Age-related hypermethylation of the hMLH1 promoter in gastric cancers. International Journal of Cancer **94**: 208 - 211.

Nohl H, Kozlov AV, Gille L, Staneik K. 2003. Cell respiration and formation of reactive oxygen species: facts and artefacts. Biochemical Society Transactions **31**: 1308 - 1311.

Ohm JE, McGarvey KM, Yu X, Cheng L, Schuebel KE, Cope L, Mohammed HP, Chen W, Daniel VC, Berman DM, Jenuwein T, Pruitt K, Sharkis SJ, Watkins DN, Herman JG, Baylin SB. 2007. A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and silencing in adult cancers. Nature Genetics, doi: 10.1038/ng1972.

Ostler KR, Davis EM, Payne SL, Gosalia BB, Exposito-Cespedes J, Le Beau MM, Godley LA. 2007. Cancer cells express aberrant DNMT3B transcripts encoding truncated proteins. Oncogene **26**: 5553 – 5563.

Pleyer L, Burgstaller S, Girschikofsky M, Linkesch W, Stauder R, Pfeilstocker M, Schreder M, Tinchon C, Sliwa T, Lang A, Sperr WR, Krippl P, Geissler D, Voskova D, Schlick K, Thaler J, Machherndl-Spandl S, Theiler G, Eckmüllner O, Greil R. 2014. Azacitidine in 302 patients with WHO-defined acute myeloid leukemia: results from the Austrian azacitidine registry of the AGMT-study group. Annals of Hematology **93**: 1825 - 1838.

Peng DF, Kanai Y, Sawada M, Ushijima S, Hiraoka N, Kosuge T, Hirohashi S. 2005. Increased DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein expression in precancerous conditions and ductal carcinomas of the pancreas. Cancer Science **96**: 403 - 408.

Qin T, Jelinek J, Si J, Shu J, Issa JPJ. 2009. Mechanisms of resistance to 5-aza-2′-deoxycytidine in human cancer cell lines. Blood **113**: 659 - 667.

Raddatz G, Gao Q, Bender S, Jaenisch R, Lyko F. 2012. Dnmt3a Protects Active Chromosome Domains against cancer-associated hypomethylation. PLoS Genetics, doi: 10.1371/journal.pgen.1003146

Rajan KD A, Burris C, Iliff N, Grant M, Eshleman JR, Eberhart CG. 2014. DNA mismatch repair defects and microsatellite instability status in periocular sebaceous carcinoma. American Journal of Ophthalmology **157**: 640 - 647.

Rajendran G, Shanmuganandam K, Bendre A, Mujumdar D, Goel A, Shiras A. 2011. Epigenetic regulation of DNA methyltransferases: DNMT1 and DNMT3B in gliomas. Journal of Neuro-Oncology **104**: 483 - 494.

Rakyan VK, Down TA, Maslau S, Andrew T, Yang TP, Beyan H, Whittaker P, McCann OT, Valdes RD, Deloukas P, Spector TD. 2010. Human aging-associated DNA hypermethylation occurs preferentially at bivalent chromatin domains. Genome Research **20**: 434 - 439.

Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, Cervantes F, Sanchez J, Garate L, Barrios M, Castillejo A, Navarro G, Colomer D, Prosper F, Heiniger A, Torres A. 2005. Promoter hypomethylation of the LINE-1 retrotransposable elements activates sense/antisense transcription and marks the progression of chronic myeloid leukemia. Oncogene **24**: 7213 - 7223.

Scott A, Song J, Ewing R, Wang Z. 2014. Regulation of protein stability of DNA methyltransferase 1 by post-translational modifications. Acta Biochimica et Biophysica Sinica **46**: 199 - 203.

Sripayap P, Nagai T, Uesawa M, Kobayashi H, Tsukahara T, Ohmine K, Muroi K, Ozawa K. 2014. Mechanisms of resistance to azacitidine in human leukemia cell lines. Experimental Hematology **42**: 294 - 306.

Strathdee G, MacKean MJ, Illand M, Brown R. 1999. A role for methylation of the hMLH1 promoter in loss of hMLH1 expression and drug resistance in ovarian cancer. Oncogene **18**: 2335 - 2341

Suetake I, Mishima Y, Kimura H, Lee YH, Goto Y, Takeshima H, Ikegami T, Tajima S. 2011. Characterization of DNA-binding activity in the N-terminal domain of the DNA methyltransferase Dnmt3a. Biochemical Journal **437**: 141 - 148.

Weisenberger DJ, Campan M, Long TI, Kim M, Woods C, Fiala E, Ehrlich M, Laird PW. 2005. Analysis of repetitive element DNA methylation by MethyLight. Nucleic Acids Research **33**: 6823 - 6836.

Weitzman SA, Turk PW, Milkowski DH, Kozlowski K. 1994. Free radical adducts induce alterations in DNA cytosine methylation. Proceedings of the National Academy of Sciences USA **91**: 1261 – 1264

Wongpaiboonwattana W, Tosukhowong P, Dissayabutra T, Mutirangura A, Boonla C. 2013. Oxidative stress induces hypomethylation of LINE-1 and hypermethylation of the RUNX3 promoter in a bladder cancer cell line. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention **14**: 3773-3778

Yang X, Lay F, Han H, Jones PA. 2010. Targeting DNA methylation for epigenetic therapy. Trends in Pharmacological Sciences **31**: 536–546.

Yoo CB, Jeong S, Egger G, Liang G, Phiasivongsa P, Tang C, Sanjeev R, Jones PA. 2007. Delivery of 5-Aza-2′-Deoxycytidine to cells using oligodeoxynucleotides. Cancer Research **67**: 6400 - 6408.