

EPIGENÉTICA: UM NOVO CAMPO DA GENÉTICA

EPIGENETICS: A NEW GENETIC FIELD

HENRIQUE REICHMANN MULLER¹, KARIN BRAUN PRADO²

¹ Acadêmico do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Positivo, Curitiba -PR.

² Professora da Disciplina de Imunologia do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Positivo, Doutora em Genética pela UFPR.

RESUMO

Epigenética é definida como modificações do genoma, herdável durante a divisão celular, que não envolve uma mudança na sequência do DNA. Mecanismos epigenéticos atuam para mudar a acessibilidade da cromatina para regulação transcricional pelas modificações do DNA e pela modificação ou rearranjo de nucleossomos. Estes mecanismos são componentes críticos no desenvolvimento normal e no crescimento das células. A regulação epigenética do gene colabora com as alterações genéticas do desenvolvimento do câncer. Nesta revisão, examinamos os princípios básicos dos mecanismos epigenéticos e suas contribuições para o controle do ciclo celular, assim como as consequências clínicas dos erros epigenéticos. Além disso, direcionamos nossa pesquisa para o uso das vias epigenéticas em ensaios para tratamentos contra o câncer e para os resultados do Projeto Epigenoma Humano (PEH).

Palavras-chave: Metilação do DNA; Modificações das histonas; Ilhas CpG.

1 INTRODUÇÃO

O termo epigenética origina-se do prefixo grego *epi*, que significa “acima ou sobre algo”⁽¹⁾ e estuda as mudanças herdadas nas funções dos genes, observadas na genética, mas que não alteram as sequências de bases nucleotídicas da molécula de DNA⁽²⁾. Os padrões epigenéticos são sensíveis a modificações ambientais que podem causar mudanças fenotípicas que serão transmitidas aos descendentes.⁽¹⁾

Segundo Tang e Ho⁽³⁾, a epigenética é definida como as mudanças herdáveis na expressão do gene que não alteram a sequência do DNA, mas que são herdáveis pela mitose e ao longo das gerações.

Feinberg⁽⁴⁾ define a epigenética como modificações no genoma que são herdadas durante

a divisão celular e que não estão relacionadas com a mudança na sequência do DNA.

Existem algumas características que distinguem a epigenética dos mecanismos da genética convencional: a reversibilidade, os efeitos de posicionamento, a habilidade de agir em distâncias não esperadas maiores do que um único gene.⁽⁴⁾

Existem dois mecanismos principais envolvidos na epigenética: alterações nas histonas e padrão de metilação do DNA, que envolve modificações na estrutura das ligações covalentes do DNA.⁽⁵⁾ Esses mecanismos atuam modificando a acessibilidade da cromatina para a regulação da transcrição localmente ou globalmente, pelas modificações no DNA e pelas modificações ou rearranjos dos nucleossomos.⁽⁶⁾ Além desses principais mediadores epigenéticos,

¹ Rua Prof. Pedro Viriato Parigot de Souza, 5300- Bloco Marrom- Laboratório de Genética Campo Comprido, Curitiba- Paraná, CEP 81280-330. Tel: (41) 3317-3296

² E-mail: kbraun@up.edu.br

há também a presença de RNAs não codificadores, que podem atuar interferindo na transcrição de genes.⁽³⁾

Esses mecanismos regulam funções celulares cruciais como a estabilidade do genoma, a inativação do cromossomo X, o imprinting gênico, a reprogramação de genes não imprintados, e atuam no desenvolvimento da plasticidade como as exposições a fatores endógenos ou exógenos durante os períodos críticos, que alteram permanentemente a estrutura e a função específica de sistemas de órgãos.⁽³⁾

Os nucleossomos e as histonas são estruturas associadas ao DNA com a função de organização da cromatina. Tal organização está intimamente associada à expressão gênica. Mudanças na estrutura da cromatina influenciam a expressão dos genes, sendo que, estão inativos quando a cromatina está condensada e os genes são expressos quando a cromatina estiver aberta, ou seja, não condensada.⁽⁷⁾ Esses estados dinâmicos da cromatina são controlados por padrões epigenéticos reversíveis de metilação do DNA e de modificações das histonas.⁽⁸⁾

A metilação do DNA é indispensável para as funções do genoma dos vertebrados e está relacionada com processos de regulação gênica, estabilidade cromossômica e imprinting parental.⁽⁹⁾

Existe uma forte correlação entre a cromatina inativa com a metilação do DNA⁽¹⁰⁾, ou seja, a metilação silencia a expressão dos genes. Quando o DNA estiver hipometilado, a cromatina estará ativa, permitindo a transcrição dos genes. Porém, quando o DNA estiver hipermetilado a cromatina estará inativa, impedindo a expressão dos genes.⁽⁵⁾

Ao contrário do genoma, que é idêntico nos diferentes tipos celulares, o epigenoma é dinâmico e varia de uma célula para outra, pois, o epigenoma corresponde à cromatina, às proteínas associadas e aos padrões de modificações covalentes do DNA obtidos pela metilação e que permitem a organização e manutenção dos programas de expressão dos genes.⁽⁵⁾

Nesta revisão, analisamos os principais mecanismos epigenéticos e o modo como esses atuam na regulação da expres-

são dos genes. Verificamos também, como as modificações epigenéticas atuam na promoção e/ou desencadeamento do câncer. Além disso, descrevemos algumas terapias que se utilizam do conhecimento da epigenética para o tratamento do câncer. Relatamos também os avanços nas pesquisas realizadas no estudo do Projeto Epigenoma Humano (PEH).

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Mecanismos epigenéticos

Eventos epigenéticos incluindo a metilação do DNA e as modificações das histonas apresentam um importante papel para o desenvolvimento normal e são cruciais para estabelecer a programação correta da expressão dos genes.⁽¹¹⁾ Para melhor compreensão do leitor, as Tabelas 1 e 2 descrevem as enzimas e as regiões do genoma envolvidas nos mecanismos epigenéticos e um resumo de suas funções.

2.1.1 Metilação do DNA

Os padrões de metilação são estabelecidos e mantidos nos dinucleotídeos CpG (pares de Citosina-fosfato-Guanina) por uma família de enzimas, as DNA metiltransferases (DNMTs) que reconhecem os dinucleotídeos CpG hemimetilados, depois da replicação do DNA.⁽⁴⁾ A metilação do DNA em células humanas é restrita às adições covalentes do grupamento metil na posição 5' do anel da citosina e também nos dinucleotídeos CpG, em uma porção menor no CpNpG.⁽¹²⁾ As ilhas CpG são localizadas, em sua maioria, nas regiões promotoras de genes e apresentam tamanho igual ou superior à 200 pares de bases (pb) sendo que há pelo menos 10 vezes mais metilação nessa região do que em outras regiões do genoma com CpG.⁽⁹⁾

O processo de metilação é mediado, ao menos, por três DNA metiltransferase (DNMT1, DNMT3a, DNMT3b), que catalizam e transferem o grupamento metil da S-adenosyl-L-metionina (doador de metil) para as bases de citosina ou adenina na molécula de DNA.⁽¹³⁾ Acredita-se

Tabela 1 - Enzimas envolvidas no processo epigenético do DNA.

Nome da enzima	Abreviação	Função	Consequências
DNA metil-transferase	DNMT	Catalisa a transferência de grupos metil para o DNA	Metilação do DNA-silenciamento de genes
	DNMT1	Mantêm os padrões de metilação normais da célula	
	DNMT3a e DNMT3b	Promovem uma nova metilação no DNA, principalmente nas ilhas CpG	
Histona desacetilase	HDAC	Promove a desacetilação das histonas.	Retirada de grupos acetila: inativa cromatina
	HDAC2		
Demetilases de histonas:	Amino-oxigenases dependentes de FAD: LSD1 e JmjC	Retiram o grupo metil das histonas através de um processo oxidativo: LSD1- reação de oxidação com liberação de formaldeído; JmjC- reação de oxidação com α -cetoglutarato e Fe ⁺² com liberação de formaldeído. JHDM1- demetila o amino-ácido Lisina da posição 36 da histona H3.	Retira grupos metil nas histonas.
	JHDM1 (demetilase-1 de histonas contendo domínios de demetilação)		
Histona acetil-transferase	HAT		Acetilação das histonas: ativação da cromatina
Histona Metil-transferase	HMT	Ex: SUV39	

Fonte: Adaptação de D'Alessio A C & Szyf M. 2006.

Tabela 2 - Regiões do genoma e suas funções na epigenética.

Regiões do DNA/histona	Siglas	Funções
Domínio de ligação da metilação	MBD	Local de ligação das proteínas ligadoras de DNA metilado, ex; MeCp2 e recruta proteínas modificadoras de histona para os genes metilados.
	MBD2	MBD2- demetila DNA "in vitro" e "in vivo". Tem ação em genes demetilados endogenamente.
Membro do complexo multiproteico policomb PRC2	EZH2	Recrutamento de DNMTs e localizar no DNA o ponto de metilação.

Fonte: D'Alessio A C & Szyf M. 2006.

que os padrões de metilação do DNA são relativamente baixos durante o desenvolvimento da célula e são realizados pelas DNMT3a e DNMT3b, que catalizam a metilação de novo, principalmente nas ilhas CpG.⁽¹⁴⁾ Esses padrões são mantidos nas células somáticas ao serem copiados para as células-filhas pela DNMT1, que replica os padrões de metilação de gerações parentais metiladas para as gerações seguintes ainda não metiladas.⁽¹⁵⁾

A metilação do DNA interfere na expressão dos genes por meio de mecanismos diretos e indiretos. Primeiro, a metilação de ilhas CpG presentes nas regiões promotoras dos genes impede diretamente, através de uma barreira física, o seu reconhecimento pelos fatores de transcrição, resultando na inativação do gene.^(16,17) Segundo, a metilação ocorre em uma região que apresenta domínios de ligação para a metilação (MBD), que se localiza ao redor de um sítio de regulação da transcrição e atrai de forma indireta as proteínas de domínio de ligação de metilação, como as MeCp2, que recrutam correpressores e desacetilases de histonas (HDACs) inativando a configuração da cromatina ao redor do gene, desligando-o.^(18,19)

As ilhas CpG são alvos de proteínas que se combinam com os CpG não metilados e iniciam a transcrição do gene. Tipicamente as regiões não metiladas dos pares CpG são localizadas em genes de tecido-específico e em genes essenciais, como os de manutenção, que estão envolvidos na preservação da rotina celular e são expressos na maioria dos tecidos.⁽⁷⁾ Em contraste, as regiões CpG metiladas são geralmente associadas ao DNA silencioso, pois apresentam as regiões MBD, que podem bloquear as proteínas sensíveis à metilação⁽⁷⁾

A metilação do DNA também é controlada pela cromatina, através de uma interação bi-direcional entre ambas.⁽⁵⁾ Os mecanismos epigenéticos atuam na mudança da acessibilidade da cromatina para a regulação da transcrição local e globalmente, através de modificações na molécula de DNA, via metilação, e também através das modificações ou rearranjos dos nucleossomos.⁽⁶⁾ O DNA hipometilado está associado

com a cromatina ativa, acetilada e o DNA hipermetilado é associado com a cromatina inativa, isto é, hipoacetilada.⁽⁵⁾

2.1.2 Modificações nas histonas

O DNA nuclear encontra-se associado às proteínas histonas. Ambos encontram-se sob a forma da estrutura básica de condensação do DNA, o nucleossomo. Este⁽²⁰⁾ é a unidade básica da cromatina e é composto por dois complexos idênticos, cada um constituído de 4 proteínas histonas, que formam um octâmero. As proteínas histonas presentes em cada nucleossomo são: a H2A, H2B, H3 e H4.⁽²¹⁾ Duas voltas da molécula de DNA incorporam-se a esta estrutura, que tem também a proteína histona H1 associada ao DNA, contribuindo para sua condensação.

As modificações das histonas regulam as funções da cromatina alterando a acessibilidade do DNA aos diferentes fatores que atuam em trans, como as enzimas de transcrição, ou pelo recrutamento de proteínas específicas que reconhecem as modificações ocorridas nas histonas.⁽²²⁾

Acredita-se que a acetilação das histonas H3 e H4 nas caudas N-terminais seja um sinal predominante para a ativação da cromatina, aumentando a acessibilidade da maquinaria de transcrição. Esse sinal é removido pela ação das desacetilases de histonas (HDAC), que promovem a condensação da cromatina.^(5,23)

2.1.3 Acetilação de histonas e demetilação de DNA

O fluxo da informação epigenética pode ser realizado em ambas as direções: da cromatina para o DNA ou vice-versa. Essa bilateralidade é um mecanismo de autorreforço para a manutenção da informação epigenética.⁽⁵⁾ A perda indevida de modificações da cromatina associada ao DNA metilado será rapidamente corrigida pelo recrutamento de enzimas modificadoras de cromatina.^(18, 19) E a perda aberrante de metilação do DNA será corrigida pelo recrutamento de DNMTs pela cromatina

modificada.⁽⁵⁾ Existe uma interação entre as enzimas DNMTs e HDAC e também entre as DNMTs e metiltransferases de histonas para a manutenção de certos padrões de metilação do DNA que marcam a cromatina inativa.^(24, 25)

As enzimas DNMTs interagem com as histonas metiltransferases como Suv39 e o complexo multiproteico Polycomb PRC2, EZH2, que promovem a metilação das histonas. As enzimas DNMTs são as responsáveis pela manutenção e geração de padrões de metilação na célula.⁽⁵⁾ Evidências da importância da sua função nesse processo surgiram dos estudos em camundongos que apresentavam os genes EZH2 silenciados. Nestes, ocorriam a perda de metilação do DNA em locais que estavam marcados para serem metilados e, mesmo assim, a metilação era efetivada, devida a presença de DNMTs nos locais demarcados, demonstrando que ocorria não somente a metilação de novo, mas também era mantido o padrão da metilação pré-existente.⁽²⁵⁾

A existência da programação da expressão de genes baseadas na alteração da estrutura da cromatina, em organismos em que o genoma não contém citosinas metiladas sugere que, em uma perspectiva evolutiva, as modificações da cromatina precederam a metilação do DNA.⁽⁵⁾ Essa noção de que a inativação da cromatina é anterior ao processo de metilação do DNA foi observada em estudos em mamíferos, que demonstraram que a quebra da cromatina influencia na metilação de DNA.⁽⁵⁾ Em camundongos, a deleção do gene LSH, que codifica a helicase SNF2, cujo produto está envolvido na remodelagem da cromatina, produz uma perda significativa de metilação nas ilhas CpG pelo genoma⁽²⁶⁾, sugerindo que essa atividade de remodelação da cromatina pelo gene LSH é crucial para manter os padrões de metilação do DNA.⁽⁵⁾

A estrutura da cromatina ativa pode promover a demetilação do DNA, ou seja, a remoção dos grupamentos metil. A acetilação das histonas é uma reação catalizada pela enzima histona acetiltransferase (HAT) e é um evento primordial para a ocorrência da demetilação do DNA. Estudos realizados com inibidores de desacetilases, como a tricostatina, indicaram a ocorrência de demetilação nos segmentos de DNA metilados.^(27, 28)

Os mecanismos propostos para a ação da acetilação das histonas atuando como fator de demetilação do DNA são os seguintes: em uma visão mais simplista do processo epigenético, as histonas com caudas não acetiladas bloqueariam o acesso das DNAs metil-transferases para a cromatina condensada, e assim evitariam a metilação do DNA.⁽²⁹⁾ Um segundo mecanismo propõe que a demetilação não ocorreria imediatamente após a acetilação das histonas, mas seria dependente da interação com a enzima de transcrição RNA polimerase II com o promotor metilado do gene. Para movimentação da RNA pol II ao longo do gene a ser transcrito, ocorreria inicialmente uma fraca interação entre RNA pol II e a maquinaria de transcrição com o promotor metilado e parcialmente acetilado. Essa interação aumentaria, à medida que ocorresse demetilação no DNA provocada pela acetilação das histonas. Na região de ligação de metilação, poderá ocorrer o recrutamento pela enzima RNA pol II, da demetilase de DNA, MBD2. Assim, a quantidade dessa demetilase é um fator limitante para o processo de demetilação do DNA.⁽⁵⁾

2.2 Epigenética e Câncer

Eventos epigenéticos incluindo as modificações de histonas e a metilação do DNA são cruciais para estabelecer a programação correta da expressão dos genes e erros nestes processos podem levar a uma expressão aberrante de genes e a uma perda de check-points anticâncer.⁽¹¹⁾

O evento epigenético mais bem estudado e que afeta diretamente o DNA é a metilação. Tanto a hipermetilação das ilhas CpG, localizadas nos promotores de genes de supressão tumoral, e a hipometilação global aparentam apresentar um importante papel no desenvolvimento de câncer.⁽¹¹⁾ Ocorre um padrão aberrante de metilação nos tumores em relação aos tecidos normais. Os genes supressores tumorais atuam normalmente reprimindo o crescimento celular e metilações nestes genes levam ao seu silenciamento

e, por conseguinte, a sua perda de função. Os genes conhecidos como protooncogenes atuam favorecendo o crescimento celular de forma ordenada. A hipometilação nesses genes promove o crescimento desordenado da célula e a formação de tumores.⁽⁵⁾

O balanço entre a acetilação das histonas e a sua desacetilação é fundamental para regulação da proliferação das células. Mutações no gene que codifica a enzima HAT, ou translocações de partes cromossômicas que envolvem esse gene, estão relacionadas com o desenvolvimento de câncer.⁽⁵⁾

O aumento anormal da atividade da HDAC pode resultar na inativação de transcrição de genes supressores tumorais, provocando a inibição de sua transcrição devido a desacetilação das histonas seguida da metilação do DNA, inativando o gene.⁽⁵⁾

Na transformação maligna da célula são observadas importantes modificações, como a perda da metilação em oncogenes e em genes pro-metastáticos, hipometilação global dos elementos repetitivos e hipermetilação em um conjunto de genes, tais como: genes supressores tumorais, genes de moléculas de adesão, genes do reparo do DNA e em genes inibidores de metástases.

A hipometilação de genes específicos talvez seja secundária para as mudanças locais da cromatina, marcadas pelos fatores de transcrição reconhecendo sequências específicas. As mudanças globais na cromatina que ocorrem no câncer são devidas à ativação das HAT, bem como da expressão acima do normal de metiltransferase das histonas que desencadeia a demetilação global do DNA nas células cancerosas. Poderá ocorrer também um aumento na atividade da DNA demetilase, acarretando uma demetilação global do DNA.⁽⁵⁾

Hipometilação leva à instabilidade genômica, que provoca quebras cromossômicas, servindo como um mecanismo de ativação de genes prometastáticos em estágios avançados de câncer. A hipermetilação serve como um mecanismo para um crescimento descontrolado dessas células metastáticas.⁽⁵⁾

2.2.1 Terapias epigenéticas para o câncer

O câncer é um processo em que erros genéticos e epigenéticos se acumulam e transformam uma célula normal em células invasivas ou em células tumorais metastáticas. As alterações nos padrões de metilação do DNA mudam a expressão de genes associados ao câncer, entre esses, os genes supressores tumorais e os oncogenes.⁽⁷⁾

Poucas são as terapias em vigência que se utilizam da epigenética.^(2,30,31) Entre essas, tem-se aquelas que se utilizam de nucleosídeos análogos aos do DNA, como o medicamento Azacitidina, um análogo a nucleosídeos que incorpora-se no DNA que está em replicação e inibe a metilação, reativando os genes silenciados previamente. Essa terapia está em estudo, principalmente para doenças em que ocorre hipermetilação de genes, como as síndromes mielodisplásicas e leucemias.⁽³¹⁾

O oligonucleotídeo antisense MG98 que abaixa os níveis de DNMT1 está apresentando resultados promissores na fase 1 das triagens clínicas e marcando tumores sólidos e células cancerosas dos rins.⁽³²⁾ As análises moleculares de biópsias de cânceres de cabeça e pescoço, seguidas do tratamento de MG98, revelaram a demetilação de genes de supressão tumoral que se encontram metilados e também de oncogenes que se encontravam metilados anteriormente ao tratamento.⁽⁷⁾

Pequenas moléculas como o ácido valpróico que reduzem os níveis de HDACs estão sendo usadas para induzir a morte das células tumorais e conter o crescimento do tumor.⁽⁷⁾

Combinações de terapias epigenéticas (agentes demetiladores associados com inibidores de HDACs) ou terapias epigenéticas seguidas de quimioterapias convencionais (ou imunoterapias), talvez sejam mais efetivas, porque elas podem reativar genes silenciados, incluindo genes de supressão tumoral, que favorecem a ativação de células para agirem de acordo com estas terapias, matando as células cancerosas.^(2, 29, 33)

O grande desafio para o futuro será limitar os efeitos tóxicos em células normais e assegurar que os efeitos inéditos destas drogas atinjam os genes marcados nas células tumorais.⁽⁷⁾

2.3 Projeto Epigenoma Humano

Após a concretização e término do Projeto do Genoma Humano no ano de 2001, foi criado no mesmo ano o Projeto Epigenoma Humano (HEP), de iniciativa pública-privada. Este tem como objetivo identificar, catalogar e interpretar a importância gênica dos padrões de metilação em todos os genes, na maioria dos tecidos.⁽³⁴⁾

Em 2004, foram publicados os primeiros resultados de um estudo piloto desse projeto envolvendo uma região do genoma altamente densa em genes, a região do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC). Tal complexo está localizado no cromossomo 6, cujas funções são extremamente diversas, sendo muitas relacionadas com o sistema imune inato e adaptativo e estão associados com a rejeição de transplantes, doenças autoimunes, doenças relacionadas a imunodeficiências, entre outras.⁽³⁴⁾

Metilações diferenciadas nas citosinas possibilitam evidenciar as diferenças nos padrões de metilação ao longo do genoma, que se acreditava ser específica para as ativações de genes, para os tipos de tecido e para os estados da doença. A identificação dessas variações nas posições de metilação irá melhorar de forma significativa a compreensão sobre a biologia do genoma e auxiliar nos diagnósticos de doenças.⁽³⁴⁾

Foram identificadas posições variáveis de metilação (MVP) nas proximidades dos promotores dos genes e em outras regiões relevantes de aproximadamente 150 loci contendo o MHC em diversos tecidos (cerebral, mamário, hepático, pulmonar, muscular e prostático) de uma grande quantidade de indivíduos.⁽³⁴⁾

Para o projeto-piloto, foram desenvolvidas tecnologias para a análise dos estudos epigenéticos, envolvendo

tratamentos utilizando bissulfito de sódio e também uma ampla utilização de PCR, para analisar e quantificar os padrões de metilação do genoma.⁽³⁴⁾

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A epigenética desponta como uma nova fronteira a ser alcançada e transposta no cenário médico-científico. A compreensão dos mecanismos envolvidos no silenciamento e ativação de genes, além daqueles conhecidos pela genética molecular, permite a criação de modelos para tratamento de doenças como o câncer. Sob esse aspecto, este trabalho possibilitou uma análise criteriosa dos mecanismos epigenéticos, dos padrões de metilação usuais do genoma e forneceu informações importantes sobre essa nova face da Genética, que é a epigenética. O estudo de revisão permitiu reconhecer a complexidade dessa nova área da Genética, que recentemente vem despontando como uma forma de terapia mais eficiente e menos agressiva para o tratamento do câncer, principalmente. Além disso, permitiu vislumbrar uma nova área de aplicação dos conhecimentos da epigenética no que se refere ao câncer: o diagnóstico e o acompanhamento clínico da doença, por ensaios que identifiquem o grau de metilação de genes relacionados com o desenvolvimento e progressão do câncer.

ABSTRACT

Epigenetics is defined as modifications of the genome, heritable during cell division, that do not involve a change in the DNA sequence. Epigenetics mechanisms act to change the accessibility of chromatin to transcriptional regulation via modifications of the DNA and by modification or rearrangement of nucleosomes. These mechanisms are critical components in the normal development and growth of cells. Epigenetic gene regulation collaborates with genetic alterations in cancer development. In this review, we had examined the basic

principles of epigenetic mechanisms and their contribution to cell cycle control, as well as, the clinical consequences of epigenetics errors. In addition, we addressed our approach to epigenetic pathways in the treatments against cancer and the results of the Human Epigenome Project (HEP).

Key words: DNA methylation; modifications of histones; CpG islands.

4 REFERÊNCIAS

- 1 Pray L A. Epigenetics: Genome Meet your environment. *The Scientist*. 2004 July 5: 14-20.
- 2 Egger G, Liang G, Aparicio A et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*. 2004;429:457-63.
- 3 Tang W Y, Ho S M. Epigenetic reprogramming and imprinting in origins of disease. *Rev Endocr Metab Disord*. 2007;8:173-82.
- 4 Feinberg A P. Cancer epigenetics take center stage. *PNAS*. 2001;98(2):392-94.
- 5 D'Alessio A C, Szyf M. Epigenetic tête-à-tête: the bilateral relationship between chromatin modifications and DNA methylation. *Biochem Cell Biol*. 2006;84:463-76.
- 6 Lund A H, Lohuizen M V. Epigenetics and cancer. *Genes Dev*. 2004;18:2315-35.
- 7 Rodenhiser D, Mann M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *CAMJ*. 2006;174(3):341-48.
- 8 Feinberg A P, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer*. 2004;4: 143-53.
- 9 Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*. 2002;16:6-21.
- 10 Razin A & Cedar H. Distribution of 5-methylcytosine in chromatin. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1977;74:2725-28.
- 11 Rothhammer T, Bosserhoff A K. Epigenetic events in malignant melanoma. *Pigment Cell Res*. 2007;20:92-111.
- 12 Bird A. The essentials of DNA methylation. *Cell* 1992;70:5-8.
- 13 Garinis G A, Patrinos G P, Spanakis N E, Menounos P G. DNA hipermethylation: when tumour suppressor genes go silent. *Hum Genet*. 2002; 111:115-27.
- 14 Okamoto M, Bell D W, Haber D A, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a e Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 1999; 99:247-57.
- 15 Razin A, Szyf M. DNA methylation patterns. Formation and function. *Biochem Biophys Acta*. 1984;782:331-42.
- 16 Comb M, Goodman H M. CpG Methylation inhibits proenkephalin gene expression and binding of the transcriptional factor AP-2. *Nucleic Acids Res*. 1990;18:3975-82.
- 17 Prendergast G C, Law D, Ziff E B. Association of myn, the murine homolog of max, with c-myc stimulates methylation-sensitive DNA binding and ras cotransformation. *Cell*. 1991;65:395-07.
- 18 Nan X, Cross S, Bird A. Gene silencing by methyl-CpG-binding proteins. *Novartis Found Symp*. 1998a;214:6-16.
- 19 Nan X, Ng H H, Johnson C A, Laherty C D, Turner B M, Eisenman R N, et al. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*. 1998b;393:386-89.

- 20 Peterson CL, Lainé MA. Histones and histone modifications. *Curr Biol.* 2004;14: 546-51.
- 21 Pruss D, Hayes JJ & Wolffe AP. Nucleosomal anatomy – where are the histones? *Bioessays.* 1995;17:161-70.
- 22 Strahl B D, Allis C D. The language of covalent histone modifications. *Nature.* 2000;403:41-45.
- 23 Kuo M H, Allis C D. Role of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays.* 1998; 20:615-26.
- 24 Rountree M R, Bachman K E, Baylin S B. DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet.* 2000;25:269-77.
- 25 Fuks F, Hurd P J, Deplus R & Kouzarides T. The DNA methyltransferases associate with HP-1 and SUV39H1 histone methyltransferases. *Nucleic Acids Res.* 2003;31: 2305-12.
- 26 Yan Q, Huang J, Fan T, Zhu H, Muegge K. Lsh, a modulator of CpG methylation, is crucial for normal histone methylation. *EMBO J.* 2003;22:5154-62.
- 27 Cervoni N, Szyf M. Demethylase activity is directed by histone acetylation. *J Biol Chem.* 2001;276:40778-87.
- 28 Detich N, Bovenzi V, Szyf M. Valproate induces replication: independent active DNA demethylation. *J. Biol Chem.* 2003;278:27586-92.
- 29 Balch C, Montgomery J S, Paik H H, Kim S, Huang IHM. New anti – cancer strategies: epigenetic therapies and biomarkers. *Front Biosci.* 2005;10:1897-31.
- 30 Laird P W. Cancer epigenetics. *Hum Mol. Genet.* 2005;14(Supl I):R65-76.
- 31 Esteller M. DNA methylation and cancer therapy: new developments and expectations. *Curr Opin Oncol.* 2005;17:55-60.
- 32 Davis A J, Gelmon K A, Siu LL, et al. Phase I and pharmacologic study of the human DNA methyltransferase antisense oligodeoxynucleotide MG98 given as a 21-day continuous infusion every 4 weeks. *Invest New Drugs.* 2003;21:85-97.
- 33 Mongan N P, Gudas L J. Valproic acid in combination with all - trans retinoic acid and 5 – aza – 2´ - deoxycytidine, restores expression of silenced RAR beta 2 in breast cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2005;4:477-86.
- 34 Raykan V K, Hildmann T, Novik K L, Lewin J, Tost J, Cox A V, et al. DNA methylation profiling of the human major histocompatibility complex: a pilot study for the human Epigenome Project *Plos Biology.* 2004;2(12):2170-82.