

Epigenetikai szabályozó mechanizmusok és zavarai leukémiában

Gaál Zsuzsanna, Oláh Éva

Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum, Általános Orvostudományi Kar, Gyermekgyógyászati Intézet, Klinikai Genetikai Központ, Debrecen

A vizsgálatot finanszírozó pályázatok: A kutatás az Európai Unió és Magyarország támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú „Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program” című kiemelt projekt keretei között valósult meg.

A közlemény az Astellas Pharma Kft. – Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum pályázati támogatásával készült.

Az epigenetika a génexpressziót a DNS szekvenciájának megváltozása nélkül szabályozó mechanizmusokkal foglalkozik. Tárgykörébe tartozik a DNS-metiláció, a hisztonmodifikáció és a kis, nem kódoló RNS-ek csoportja. A DNS-metiláció a génexpresszió repressziójához vezet. A hisztonmodifikáció a módosítás típusától és az érintett oldalláncától függően a transzkripció aktivációját és gátlását egyaránt eredményezheti. E szabályozó mechanizmusok zavarai igazoltan szerepet játszanak a leukémia kialakulásában. A leukémia különböző altípusaiban a DNS-metilációs mintázat, a hisztonkód és a mikro-RNS expressziós szintek jellegzetes eltéréseit figyelték meg, melyek jelentősége lehetséges klinikai alkalmazásukban rejlik. A terápiás eredmények javításához a prognosztikai klasszifikációs rendszer pontosítása szükséges. Az epigenetikai eltérések segítségével egy adott prognosztikai csoporton belül további alcsoportok elkülönítése válhat lehetségessé. A DNS metilációs mintázatában, a hisztonkódban, illetve a mikro-RNS-ek expressziós szintjében bekövetkező változások sok esetben korrelálnak az alkalmazott terápia eredményességével, bizonyos esetekben pedig segítséget nyújthatnak a kemorezisztencia előrejelzésében vagy a kemoterápiát követően a minimális reziduális betegség felismerésében. A kromatin szerkezetét befolyásoló, az epigenetikai módosításokért felelős enzimek potenciális terápiás célpontokként szolgálhatnak. Előzetes eredmények szerint az epigenetikai terápia különböző típusai egymással és a konvencionális kemoterápiával egyaránt sikeresen kombinálhatók lehetnek a jövőben a leukémia terápijában. Magyar Onkológia 58:99–107, 2014

Kulcsszavak: epigenetika, leukémia, DNS-metiláció, hisztonmodifikáció, prognózis

The term epigenetics includes regulatory mechanisms that influence gene expression without any changes in the sequence of the DNA, namely DNA methylation, histone modification and small, non-coding RNAs. Methylation of the DNA leads to the repression of gene expression, while histone modification can result in both activation and inhibition of the transcription depending on the type and site of modification. These mechanisms are confirmed to have important pathogenetic role during the process of leukemogenesis. In distinct subtypes of leukemia specific alterations of the DNA methylation profile, histone code and typical changes of the microRNA expression levels have been observed. The importance of them is inhered in their promising potential clinical applications. In order to achieve further improvement in the therapeutic results of leukemia, prognostic classification has to be further improved. With the help of the epigenetic alterations, subgroups could be differentiated within the known prognostic groups. Changes in the DNA methylation pattern, histone code and microRNA expression levels correlate with the success of the treatment in many cases, moreover they could provide help to predict chemoresistance or detect the minimal residual disease following chemotherapy. Enzymes influencing the structure of chromatin form a wide variety of new potential therapeutic targets. Based on preliminary results, sorts of epigenetic therapy may be combined successfully either with each other or with conventional chemotherapeutic drugs in the treatment of leukemia.

Gaál Z, Oláh É. Epigenetic regulatory mechanisms and their disorders in leukemia. Hungarian Oncology 58:99–107, 2014

Keywords: epigenetics, leukemia, DNA methylation, histone modification, prognosis

Levelezési cím: Prof. Dr. Oláh Éva, 4032 Debrecen, Nagyerdei krt. 98.
Tel.: 06-52-255-072, fax: 06-52-255-446, e-mail: eolah@med.unideb.hu

Közlésre érkezett: 2013. november 20. • Elfogadva: 2014. január 3.

BEVEZETÉS

Az epigenetika azon mechanizmusokkal foglalkozik, melyek a génexpressziót a DNS szekvenciájának megváltozása nélkül szabályozzák. Ide tartozik a DNS-metiláció, a hisztonmodifikáció és a kis, nem kódoló RNS-ek csoportja (1). A nem kódoló RNS-ek közül a mikro-RNS-ek és azok malignus hematológiai kórképek kialakulásában betöltött szerepe egy korábban benyújtott közlemény témáját képezi (2), funkciójuk zavarait ezért itt nem tárgyaljuk részletesen.

A sejtek tulajdonságait specifikus génexpressziós mintázatok hozzák létre (3), melyek biztosítják a sejtfunkciók zavartalan ellátását. Mindezt a DNS szekvenciájának módosulása és a benne kódolt információ érvényre jutását szabályozó rendszer hibája egyaránt lehetetlenné teheti, hasonlóan ahhoz, ahogyan a kottában szereplő hangjegyek sem elegendőek önmagukban egy zenemű tökéletes megszólalásához, hanem ahhoz számos más tényező (hangszerek, előadóművészek, karmester...) összhangja is nélkülözhetetlen.

Az epigenetikai mechanizmusok a jelenleg ismert összes biológiai folyamatot befolyásolják (4). Kisiklásuk következményeit a különböző betegségekben egyre szélesebb körben kutatják. Közülük az egyik legintenzívebben fejlődő terület az onkohematológiai kórképekben előforduló szabályozási zavarok tanulmányozása.

A rák kialakulásának többlépcsős folyamata során genetikai és epigenetikai változások együttesen vezetnek a betegség kialakulásához (1). Az epigenetikai szabályozás kisiklása – a genetikai változásokhoz hasonlóan – a karcinogenezis bármely szakaszában bekövetkezhet (5). A genetikai és epigenetikai mechanizmusok közötti további hasonlóság, hogy a környezeti tényezők mutációt és a génexpresszió szabályozásának zavarát egyaránt kiválthatják. Míg azonban a DNS-metilációs mintázat és a hisztonkód eltérései visszafordíthatók, a genetikai változások – jóllehet egy részüket a reparációs mechanizmusok kijavítják – jelen tudásunk szerint irreverzibilisek. Ugyanakkor fontos, hogy az epigenetikai eltérések öröklődhetnek, így az egyedet ért környezeti ártalmak hatása következményes mutációk nélkül is generációkon keresztül érvényesülhet. A szekvencia változásai, amennyiben szomatikus sejtekben következnek be, nem örökítődnek át az utódokba.

Mára elfogadott nézetté vált, hogy a leukémia patogenezisének a genetikai eltérések mellett a DNS-metilációs

mintázat és a hisztonkód megváltozása, valamint a mikro-RNS-expressziós szintek eltérései is elengedhetetlenül fontos elemei (6). Egyre több összefüggést fedeznek fel a betegség típusa és stádiuma, illetve az epigenetikai szabályozási zavarok természete között. Ezek ismerete fontos lehet a differenciáldiagnózisban és a betegség prognosztikai megítélésében, emellett új terápiás célpontokként is szolgálhatnak.

A DNS-METILÁCIÓ FOLYAMATA

A DNS-metiláció fontos szerepet játszik a szövetspecifikus és differenciációs stádiumnak megfelelő génexpressziós mintázat fenntartásában, az imprinting folyamatában, illetve az X kromoszóma inaktivációja során. Emellett védi a genomot a mobilis és a repetitív elemek reaktivációjával szemben (7).

A DNS-metiláció során DNS-metiltranszferáz (DNMT) enzimek a citozin 5-ös pozícióban lévő szénatomjához kapcsolnak metilcsoportot az ún. CpG-szigetekben. A CpG-szigetek a gének mintegy felének promoter régiójában megtalálhatók (8). Metilációjuk a génexpresszió gátlását eredményezi, ugyanakkor bizonyos esetekben a transzkripció más okból bekövetkező inaktivációja is előidézhetheti a CpG-szigetek metilációját (9).

Gerincesekben a DNS-metilációt katalizáló enzimeknek két fő családja van (10). A DNMT1 a fenntartó metilációért felelős a replikáció során, a DNMT3A és a DNMT3B pedig a de novo metiláció enzimjei (4). A DNMT3L fehérje a DNMT3A és a DNMT3B enzimek katalitikus aktivitását stimulálja (10). A DNMT2 enzim, bár rendelkezik gyenge DNS-metiltranszferáz-aktivitással, alapvetően tRNS-metiltranszferázként funkcionál a sejtekben (11).

A különböző szabályozó fehérjék számára a metilált, illetve nem metilált CpG-szigetek felismerését meghatározott szerkezetű domének teszik lehetővé. A CXXC domént tartalmazó fehérjék a nem metilált CpG-szigeteket tartalmazó DNS-szakaszokhoz kötődnek. A metilált CpG-szigetekhez kötődő, ún. MBD domént tartalmazó fehérjék családjának öt tagja van, ezek a MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3 és az MBD4 (12, 13).

A DNS-metiláció folyamatának reverzibilis voltát a demetiláció lehetősége biztosítja. Demetiláció létrejöhet a szénatomok közötti kötés felszakadásával vagy egy repairhez hasonló mechanizmus révén, melynek során az 5-metil-citozin-tartalmú nukleozid citozintartalmúra cserélődik (3).

PATOLÓGIÁS VÁLTOZÁSOK A DNS METILÁCIÓS MINTÁZATÁBAN LEUKÉMIÁS MEGBETEGEDÉSBEN

A DNS globális hipometilációja volt az első, malignusan elfajult sejtekben leírt epigenetikai eltérés (7). Következménye a genom instabilitása, mobilis elemek reaktivációja

A szövegben előforduló rövidítések:

ALL: akut limfoid leukémia, **AML:** akut mieloid leukémia, **CLL:** krónikus limfoid leukémia, **CML:** krónikus mieloid leukémia, **DNMT:** DNS-metiltranszferáz, **HAT:** hiszton-acetiltranszferáz, **HDAC:** hiszton-deacetiláz, **HDM:** hiszton-demetiláz, **HMT:** hiszton-metiltranszferáz

1. táblázat. Hisztonacetilációért és -deacetilációért felelős enzimek

HAT enzimek			HDAC enzimek				
GNAT család	MYST család	p300/CBP	I-es család	IIa család	IIb család	III-as család „sirtuin”-ok	IV-es család
ELP3, GCN5, HAT1, HPA2, PCAF	MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2, Tip60, ESA1	p300, CBP	HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8	HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9	HDAC6, HDAC10	SIRT1-7	HDAC11

és az imprinting mintázat elvesztése is lehet (8). CLL-ben számos onkogén, például a bcl-2, a ras és a TCL1 promotor hipometiláció általi aktiválódását megfigyelték (6).

A globális hipometiláció mellett bizonyos gének, főleg a tumorsuppresszorok promotorének hipermetilációja szintén gyakori eltérés (14). Leukémiákban a p15, limfómákban pedig a p16 fehérje hipermetiláció általi down-regulációja jellegzetes (8). A HIC1 tumorsuppresszor gén a CML krónikus fázisában a betegek 50%-ában, blasztos krízisben pedig a betegek közel 100%-ában hipermetilált (6).

Egyéb malignus betegségekhez hasonlóan, leukémiában a DNMT enzimek expressziós szintje a betegség típusára és stádiumára jellemző módon változik meg (6). AML-ben és a CML blasztos krízisében a DNMT1, DNMT3A és a DNMT3B enzimek expressziós szintje egyaránt emelkedett (9, 15). CLL-ben a DNMT3B down-regulációját tapasztalták (16).

A MeCP2 és az MBD2 fehérjék expressziós szintjének párhuzamos megnövekedését a B-sejtek fokozott proliferációjával hozták összefüggésbe (16). CLL-ben néhány gén metilációs mintázatának és az immunglobulin nehézlánc mutációs státuszának korrelációját igazolták (6).

HISZTONMODIFIKÁCIÓ ÉS A HISZTONKÓD ISMERT ELTÉRÉSEI LEUKÉMIÁBAN

A hisztonfehérjéknek két nagy csoportját különböztetjük meg a szintetizálódás jellemző ideje, a kódoló régiók elhelyezkedése és az mRNS szerkezete alapján. A replikációfüggő hisztonok expressziója közvetlenül az S-fázis előtt fokozódik, majd a replikációt követően lecsökken. Kódoló régiók klasztereket alkotnak, az mRNS 3' végén pedig egy „stem-loop”-nak nevezett struktúrát találunk. A replikációfüggő hisztonok közé az oktamerekben két-két példányban megtalálható H2A, H2B, H3 és H4, valamint a nukleoszmák között elhelyezkedő „linker” H1 hisztonfehérje tartozik. A másik nagy csoportot a replikációfüggetlen hisztonok képezik, melyek a sejtciklus aktuális fázisától függetlenül, konstitutív módon expresszálódnak. Kódoló génjeik elszórtan helyezkednek el a genomban. Az mRNS 3'

végén a hagyományos poli-A farokszerkezet található. A replikációfüggetlen csoportba a H3.3, H2AX, H2AZ és a makroH2A hisztonfehérjék tartoznak (1, 17, 18).

A sejtek kromatinállományának alapegysége a nukleoszóma, amely egy hiszton oktamerből és a köré csavarodó, átlagosan 147 bázispár hosszúságú kettős szálú DNS-szakaszból épül fel (19). Az oktamereket alkotó hisztonok N-terminális végén elhelyezkedő 20–35 aminosav változatos kovalens módosítások színterül szolgál, amelyek összességét hisztonkódnak nevezzük (20). A hisztonmodifikációnak a következő típusai ismeretesek: acetiláció, metiláció, foszforiláció, ubikvitináció, szumoiláció, ADP-riboziláció, prolinizomerizáció és biotiniláció (21).

Ezek a módosítások a kromatinállomány struktúráját és hozzáférhetőségét szabályozzák, továbbá kötőhelyet jelentenek transzkripciós faktorok és egyéb, hisztonmodifikációt végző enzimek számára (22). Az elmúlt években számos összefüggést fedeztek fel a hisztonmodifikációban szerepet játszó enzimek expressziós szintjének kóros eltérései és a leukémia különböző típusai között (6).

Acetiláció

Az acetiláció során semlegesítődik a hisztonfehérjék lizin oldalláncainak pozitív töltése. Ennek következtében gyengül a DNS és a hisztonfehérjék közötti elektrosztatikus kapcsolat, ami a transzkripció aktivációjának irányában hat (1). A folyamatot hiszton-acetiltranszferáz (HAT) enzimek katalizálják. Az acetilációval szemben a deacetiláció a transzkripció represszióját eredményezi. A deacetilációért a hiszton-deacetiláz (HDAC) enzimek felelősek (19). A HAT és a HDAC enzimek jellemzően multiprotein komplexek alkotóelemeiként fejtik ki aktivitásukat (7, 20). Mindkét enzimcsaládon belül több alcsoport különíthető el (1. táblázat).

¹A hiszton oldalláncok jelölésében a hisztonfehérje nevét az adott aminosav egybetűs rövidítése és a hisztonfehérjén belüli sorszáma követi. Pl.: H3K4=a H3 hisztonfehérje 4-es pozícióban található lizin oldallánca.

A HAT enzimek többféle szempont szerint is csoportosíthatók. Sejten belüli elhelyezkedésük alapján megkülönböztetünk a sejtmagban található, A típusú, illetve a citoplazmában jelen lévő, B típusú enzimeket. Elterjedtebb a fehérjék doménszerkezet szerinti rendszerezése, ami alapján a HAT enzimek a GNAT, MYST és a p300/CBP nevű alcsoportokba oszthatók (7, 23).

Az emberben azonosított, összesen tizenhét HDAC enzim négy csoportba sorolható, melyeket római számokkal jelölünk. Az I-es csoport tagjai ubikviter módon, minden szövetben expresszálódnak. Ide tartozik a HDAC1, 2, 3 és 8. A II-es csoport a IIa (HDAC4, 5, 7, 9) és a IIb (HDAC6, 10) alcsoportokra tagolódik. A csoport tagjaira szövetspecifikus kifejeződés jellemző. A III-as csoportba az ún. „sirtuin” enzimek (SIRT1-7) tartoznak, melyeknek jellegzetes megoszlását figyelték meg a különböző celluláris kompartmentek között. A IV-es csoportnak mindössze egyetlen tagja ismert, a HDAC11 (6, 24, 25).

ALL-ben az egészséges csontvelőmintákhoz viszonyítva emelkedett HDAC2, -3, -6 és -8 szinteket találtak, ezenkívül T-sejtes ALL-ben a HDAC1 és -4, B-sejtes ALL-ben pedig a HDAC5 szintje is magasabbnak bizonyult (6). CLL-ben a tumorsuppresszor tulajdonságú E-cadherin gén hipoacetiláció miatt bekövetkező funkcióvesztésének jelentőségét igazolták (26). A HDAC3 delécióna vércépző rendszeri őssejtekben hipocelluláris csontvelőhöz és anémiához vezet (27).

Metiláció

A hisztonfehérjék metilációja végbemehet lizin és arginin oldalláncokon, mely a génexpressziót aktiváló és gátló hatású egyaránt lehet. A lizin oldalláncokon mono-, di- és trimetiláció lehetséges. Arginin oldalláncokon a módosítás mono- és dimetiláció formájában mehet végbe (1, 6).

A hiszton-metiltranszferáz (HMT) és a hiszton-demetiláz (HDM) enzimeknek számtalan képviselőjét ismerjük (2. táblázat). Az arginin-metiltranszferázok mellett megkülönböztetjük az ún. SET domént tartalmazó, illetve nem tartalmazó lizin-metiltranszferáz enzimeket.

A hisztondemetilációért felelős fehérjék szintén több különböző családba sorolhatók (1, 6, 19, 28–30).

Néhány jellegzetes eltérést akut és krónikus leukémiában is megfigyeltek a hiszton oldalláncok metilációs szintjében és a módosításokért felelős enzimek aktivitásában. Primer akut leukémiában a H3K4 oldalláncok mérhetetlenül alacsony, míg a H3K9 oldalláncok szignifikánsan megnövekedett metilációs szintjét észlelték (31). Az EZH2 overexpresszióját B-sejtes ALL-ben a betegség progressziójával hozták összefüggésbe a p21 és PTEN tumorsuppresszor gének inaktivációjában betöltött szerepe miatt (32). Az MLL hiszton-metiltranszferáz aktivitásáért felelős SET domént az MLL fehérje génjének transzlokációja révén képződő fúziós proteinek nem tartalmazzák (33). Az izocitrát-dehidrogenáz enzim mutációja a JHDM1 nevű lizin-demetiláz gátlásához vezet, ami az AML-es betegek 15–30%-ában megfigyelhető (6, 34).

Ubikvitináció, szumoiláció, foszforiláció, ADP-riboziláció, prolinizomerizáció, biotiniláció

Ubikvitináció során a 76 aminosav hosszúságú ubikvitin fehérje C-terminális része kovalensen kapcsolódik a hisztonfehérjék lizin oldalláncainak ε-aminocsoportjához (19). Egy adott oldallánc ubikvitinációja a génexpresszió aktivációjához és repressziójához is vezethet (19). Erre feltehetően a hisztonmetilációért és az ubikvitinációért felelős enzimek későbbi fejezetben részletezett kölcsönhatása szolgáltat magyarázatot.

A SUMO körülbelül 100 aminosav hosszúságú, az ubikvitinhez hasonló fehérje, mely számos hiszton oldallánchoz hozzákapcsolódhat. Az esetek többségében a szumoiláció a transzkripció repressziójához vezet, amit részben HDAC enzimek toborzásán keresztül idéz elő (19, 35).

Foszforiláció a hisztonfehérjék szerin, treonin és tirozin oldalláncain lehetséges (19, 33, 36). A transzkripció szabályozásában betöltött szerepéről ellentmondásos eredményeket közöltek. Annyi bizonyos, hogy a hisztonfehérjék oldalláncainak megfelelő foszforiláltsági állapota szükséges a DNS-repair folyamatok zavartalan végbemeneteléhez (20).

2. táblázat. Hisztonmetilációért és -demetilációért felelős enzimek

Arginin- metil- transzferáz	Lizin-metiltranszferáz		Hiszton-lizin-demetiláz			Hiszton- arginin- demetiláz
	SET-domént tartalmazó	SET-domént nem tartalmazó	JMD2 család	JARID1 család	Egyéb	
CARM1, PRMT1, PRMT2, PRMT5, PRMT6	EZH2, G9a, MLL1, SUV39H1	DOT1L, NSD1	JHDM3A/JMJD2A, JMJD2C/GASC1, JMJD2B, JMJD2D, JHDM1, UTX	PLU1, RBP2, SMCX, SMCY	KDM1A, LSD1, PHF8	JMJD6, Pad4

Az ADP-riboziláció ismert funkciója a sejtek különböző károsodásokra adott megfelelő válaszának elősegítése. Poli-ADP-ribozilációt követően először rövid időre kompaktabbá válik a kromatinállomány, mely feltehetőleg a sejtek védelmét szolgálja a további károsodásokkal szemben. Ezt a szerkezet fellazulása követi, ami hozzájárulóvá teszi az adott kromatinszakaszt a DNS-repair folyamatok számára (19, 37).

Az izomerizáció spontán is végbemenő folyamat. A prolin-izomerázok felgyorsítják az oldallancok cisz és transz konformációs állapota közötti átmenetet.

A hisztonfehérjék biotinilációjában részt vevő enzimek a biotinidáz és a holokarboxiláz-szintetáz (20). A módosítás biológiai jelentősége nem ismert.

Poszttranszlációs hisztonmódosítások közötti összefüggések

A modifikációs helyek közötti kis távolságok következtében egy-egy oldallánc kovalens módosítása gyakran hatással van más enzimek által katalizált folyamatokra is (20).

A hiszton-metiltranszferáz MLL fehérje génje fuzionálhat a HAT-aktivitású CBP és p300 fehérjék génjével, továbbá a nukleoszómákat pozicionáló Swi/Snf komplex valamelyik tagjával is (33). A H3P38 prolin oldallánc bizonyos konformációja meggátolja a H3K36 oldallánc metilációját. A H2BK123 oldallánc ubikvitinációja a H3K4 és a H3K79 oldallancok metilációjának szükséges feltétele. A hisztonmodifikációban fontos szerepet játszó ún. PRC komplexek különböző típusai között is leírtak kölcsönhatást. A H3K27 oldallánc PRC2 általi metilációja a PRC1-es komplex toborzásához és a H2A hisztonfehérje következményes ubikvitinációjához vezet (19).

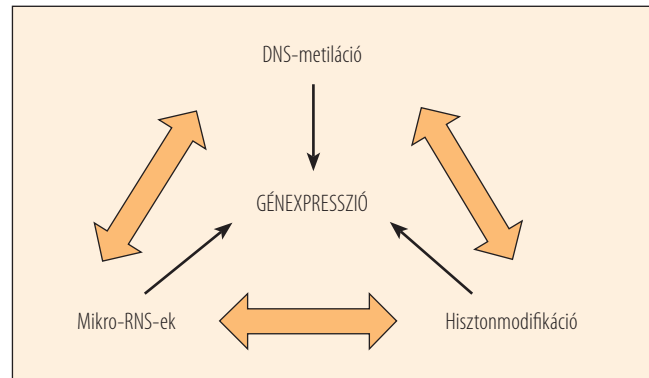
Nemcsak különböző, hanem azonos típusú hisztonmódosítások is befolyásolhatják egymás végbemenetelét. Például a H3R2 és H3K4 oldallancok metilációja egymást kölcsönösen kizárja (38).

EPIGENETIKAI SZABÁLYOZÓ MECHANIZMUSOK KÖZÖTTI KÖLCSÖNHATÁSOK

A DNS-metiláció, hisztonmodifikáció és a mikro-RNS-ek egymást kölcsönösen befolyásoló mechanizmusok, melyek a génexpressziós mintázatot együttesen, közös szabályozó hálózatként határozzák meg (1. ábra). A következőkben e kölcsönhatások közül ismertetünk néhányat. A különböző típusú hisztonmodifikációk közötti összefüggésekről egy korábbi fejezetben számoltunk be, így ezekre itt nem térünk ki.

Leukémiában gyakori a tumorszuppresszor tulajdonságú mikro-RNS-ek expressziós szintjének lecsökkenése a kódoló régió promoterének hipermetilációja következtében.

1. ábra. Epigenetikai szabályozó mechanizmusok közötti kölcsönhatások



A miR-124 down-regulációja a limfoid és mieloid eredetű hematológiai malignus betegségek közös jellemzője (21, 39).

Bizonyos hiszton oldallancok módosítása változásokat idéz elő a DNS metilációs mintázatában (13), emellett ismert a metilált CpG-szigetekhez kötődő fehérjék hisztonmodifikációra kifejtett hatása is (9). A kölcsönhatások jelentőségét tükrözi, hogy az EZH2 hiszton-metiltranszferáz interakcióját a DNMT enzimek valamennyi típusával leírták (34).

Számos, a hisztonmodifikáció és a mikro-RNS-ek közötti kapcsolat ismert. Például ALL-ben a miR-22 down-regulációjához a H3K27 oldallánc represszív hatású metilációja jelentősen hozzájárul (40). További érdekesség, hogy a HDAC enzimek és a mikro-RNS-ek kölcsönösen befolyásolják egymás szintjét. CLL-ben a HDAC enzimek overexpressziója is elősegíti a tumorszuppresszor tulajdonságú miR-15, miR-16 és miR-29b szintjének lecsökkenését (41).

A DNS-metiltranszferáz enzimek és a mikro-RNS-ek szintén kölcsönösen befolyásolják egymás kifejeződését. Például a DNMT1 szabályozza a miR-370 expresszióját (11), a miR-152-nek pedig a DNMT1 az egyik targetje (42).

EPIGENETIKAI SZABÁLYOZÓ MECHANIZMUSOK ÉS FÚZIÓS ONKOPROTEINEK KÖZÖTTI INTERAKCIÓK

Az epigenetikai mechanizmusok közötti számtalan kölcsönhatás mellett a genetikai eltérések is eredményezhetnek változásokat az epigenomban. Bizonyítékok növekvő sora igazolja, hogy a leukémiában transzlokáció révén képződő fúziós fehérjék a betegség kialakulását részben különböző epigenetikai szabályozási zavarok előidézésével okozzák.

A PML/RARα fúziós fehérje kromatinremodelláló enzimek toborzása által a DNS metilációs mintázatára és a hisztonkódra egyaránt hatással van, és a target gének

kifejeződését konstitutív transzkripció represszorként működve gátolja meg (14, 43). A RARB2 génnek az említett mechanizmussal megvalósuló, PML/RAR α általi inaktivációja volt az első bizonyíték genetikai eltérés által előidézett epigenetikai változásra malignusan transzformálódott sejtekben (8). Az AML1/ETO fúziós protein kromatinremodelláló fehérjék toborzásán keresztül járul hozzá a miR-223 szintjének lecsökkenéséhez (44, 45). A H3K79 oldallánc metilációját katalizáló DOT1L szerepét a közelmúltban igazolták az MLL/AF9 transzlokációval járó leukémia iniciációjában és progressziójában (46). A TEL/AML1 fúziós protein közvetve a hisztondeacetilációra és a hisztonmetilációra is hatást gyakorol (33). Az E2A/PBX1 fúziós fehérje direkt interakciója a p300/CBP nevű HAT-család tagjaival a fúziós fehérje onkogén hatását erősíti (47). A CML-ben képződő BCR/ABL fúziós fehérje transzaktiváció révén megnöveli a miR-17-92 klaszter expressziós szintjét (48). A mikro-RNS-ek egy másik típusa, a miR-203 viszont éppen a BCR/ABL kifejeződését szabályozza (44).

ÖSSZEFÜGGÉSEK A KEMOTERÁPIA EREDMÉNYESSÉGÉVEL ÉS A BETEGSÉG PROGNÓZISÁVAL

A leukémia prognosztikai klasszifikációs rendszerének újabb szempontokkal való bővítése a betegség kimenetelének pontosabb előrejelzésében és a legmegfelelőbb terápia kiválasztásában nyújt segítséget. Az epigenetikai eltérések alapján a jelenleg ismert prognosztikai csoportokon belül további alcsoportok különíthetők el, bizonyos esetekben pedig előrejelezhető lehet a kemoterápiás szerekek szembeni rezisztencia is.

Az utóbbi években sikerrel azonosítottak a genetikai eltérésekkel korreláló DNS-metilációs mintázatokat. A t(8;21), inv(16), illetve t(15;17) szerkezeti eltérésekkel társuló AML-ben specifikus DNS-metilációs profilokat mutattak ki, az NPM1 gén mutációját hordozó csoport tagjait pedig az eltérő metilációs mintázatok alapján négy külön alcsoportba sorolták (49, 50). Mielodiszplázias szindrómában és szekunder AML-ben a DNMT3A enzim mutációja, ALL-ben a CALC1 gén promoterének hipermetilációja a betegség kedvezőtlen kimenetelével társul (6, 34). Bizonyos gének hipermetilációjának kimutatása segítheti a minimális reziduális betegség felismerését az akut leukémia kemoterápiáját követően (9).

A hisztonmodifikációban részt vevő enzimek megváltozott expressziós szintje szintén összefügghet a leukémia prognózisával. CLL-ben a HDAC7 és HDAC10 enzimek szintjének megemelkedése, valamint a HDAC6 és a SIRT3 down-regulációja kedvezőtlen kimenetellel társul (51). A mielodiszplázias szindrómában szenvedő, EZH2-

mutációt hordozó betegek prognózisa rosszabbnak bizonyult a mutációt nem hordozó csoporthoz képest (34).

Korrelációt igazoltak bizonyos epigenetikai eltérések és a kemorezisztencia között is. Előzetes eredmények szerint a PHF8 hiszton-demetiláz enzim expressziós szintjének növekedése az ATRA-rezisztens sejtek reszenzitivációját eredményezi promielocitás leukémiában (29). CML-ben az imatinibrezisztenciát összefüggésbe hozták a proapoptotikus BID és BIM gének promoterének hipermetilációjával, továbbá a hiszton-metiltranszferáz EZH2 és a deacetiláz aktivitású SIRT enzimek megváltozott expressziós szintjével is (6, 52). A H2AXS139 oldallánc foszfatidil-inozitol-3-kináz általi foszforilációjának gátlása in vitro kísérletek során a sejtek adriamicinnel szembeni érzékenységének fokozódásához vezetett (53).

AZ EPIGENETIKAI TERÁPIA NÉHÁNY LEHETŐSÉGE

Az epigenetikai módosításokért felelős enzimeket célzó gyógyszerek terápiás alkalmazását összefoglalóan epigenetikai terápiának nevezzük (7). Legfőbb csoportjait a DNMT, HAT, HDAC, HMT és a HDM enzimek gátlószerei képezik (3. táblázat). Többségüket a mindennapi gyakorlatban még nem alkalmazzák, hatékonyságukat egyre növekvő számú preklinikai és klinikai vizsgálat során tanulmányozzák.

3. táblázat. Az epigenetikai terápia lehetőségei

DNMT-inhibitor	5-azacitidin, 5-aza-2-deoxicitidin, 5,6-dihidro-5-azacitidin, decitabin, RG108, SGI-1027, zebularin
HAT-inhibitor	C646
HDAC-inhibitor	AN-9, belinostat, depsipeptide, entinostat, mocetinostat, nátrium-butirát, nátrium-fenilbutirát, panobinostat, pracinostat, SAHA, SelSA, trichostatin A, valproát
HMT-inhibitor	3-deazaneplanocin A, AzaAdoMet, BIX-01294, chaetocin, Sinefungin, UNC0224, UNC0321
HDM-inhibitor	2-fenilciklopropilamin, N-oxalilglicin

A DNMT-inhibitorok a sejtekben trifoszfáttá alakuló nukleozidanalógok, melyek a replikáció során inkorporálódnak a DNS-be (7, 34, 54, 55). A biztató előzetes eredmények ellenére fontos szem előtt tartanunk, hogy a genom általános hipometilációja következtében előre nem megjósolható betegségek alakulhatnak ki mellékhatásként (54).

Jóval kevesebb HAT-inhibitor molekulát ismerünk. A C646 lehetséges alkalmazásáról az AML1/ETO fúziós protein képződésével társuló leukémiában számoltak be (56).

A HDAC-inhibitorokat kémiai szerkezetük szerint csoportosítjuk. Megkülönböztetünk rövid szénláncú zsírsavakat, észtereket, ciklikus tetrapeptideket és a benzamidok családjába tartozó molekulákat (1, 6, 7, 57). A pracinostat újonnan azonosított, nagy hatékonyságú HDAC-inhibitor. AML-ben a JAK2-FLT3-inhibitor pacritinibbel szinergista terápiás hatást fejt ki a JAK2 és az FLT3 fehérjék szignalizációs útvonala aktivitásának csökkentésén keresztül (58). CLL-ben a hipoacetilált E-cadherin gén expressziós szintjének megnövekedését érték el HDAC-inhibitor alkalmazásával (26). Terápiás dózisban a HDAC-inhibitorok érzékenyebbé teszik a sejteket az ionizáló sugárzás, a topoizomerázok és a ciszplatin hatásával szemben (59). Mellékhatásaik közé tartozik az anémia, a trombocitopénia és a limfopénia (27).

HMT-inhibitorok a 3-deazaneplanocin A, chaetocin és a Sinefungin, HDM-inhibitorokra példa a 2-fenilciklopropilamin és az N-oxalilglicin (4, 6).

Számos vizsgálat eredménye utal arra, hogy a jövőben lehetőség lesz az epigenetikai terápia különböző csoportjaiba tartozó szereket mind egymással, mind konvencionális kemoterápiás gyógyszerekkel kombinációban alkalmazni (7). In vitro kísérletek szerint a HDAC és HMT enzimek egyidejű gátlása sikerrel alkalmazható lehet a leukémia terápiajában (60). Szintén biztató eredményeket értek el a DNMT és HDAC enzimek egyidejű gátlása során promielocitás leukémia (HL-60) sejtvonalon, az inhibitorok all-transz-reténsavval történő együttes alkalmazásakor (61).

Az epigenetikai terápia a lehetőségek mellett komoly veszélyeket is hordoz, melyeknek egy jelentős része a nem kellő mértékű szelektivitásból adódik. Bekövetkezhet normálisan „csendes” gének reaktivációja, illetve más gyógyszerekhez hasonlóan ezekkel szemben is kialakulhat rezisztencia (7, 62).

A konvencionális gyógyszerekre adott reakciókhoz hasonlóan az itt felsorolt szerekek esetében is jelentős egyéni különbségek várhatók ugyanazon betegcsoporton belül is. Ezért feltétlenül szükséges olyan biomarkerek azonosítása, melyek segítségével kiválasztható az epigenetikai terápiával sikeresen kezelhető csoport (49).

MEGBESZÉLÉS

Az DNS szekvenciájának módosulása és a kódolt információ kifejeződését meghatározó rendszer hibái egyaránt a fiziológiai körülmények között jellemző génexpressziós mintázat megváltozását, végeredményben pedig betegségek kialakulását okozzák. A karcinogenezis régóta ismert etiológiai tényezői mellett (pl. tumorszuppresszor gének és protoonkogének mutációi, környezeti hatások) mára elfogadott nézetté vált, hogy a malignus betegségek, köztük a leu-

kémia patogenezisének az epigenetikai szabályozó mechanizmusok kisiklása is nélkülözhetetlen elemét jelenti.

A vérképző rendszeri sejtek megfelelő differenciálódásához a transzkripció faktorok, mikro-RNS-ek és a kromatinállomány megfelelő hozzáférhetőségeért felelős enzimek összehangolt, zavartalan működése szükséges (43, 63). Leukémiában e tényezők mindegyikének érintettségét igazolták.

A gének promoter régiójában található CpG-szigetek metilációja a génexpresszió gátlását eredményezi (54). A hisztonmodifikáció a transzkripciót aktiválhatja vagy gátolhatja, a módosítás természetétől és az érintett oldallánctól függően (19). A génexpressziót szabályozó epigenetikai mechanizmusok egymással és a transzlokációk révén képződő fúziós onkoproteinekkal is sokszoros kölcsönhatásban állnak, ami az ismert genetikai eltéréseket is új megvilágításba helyezi.

A leukémia különböző altípusaiban a DNS-metilációs mintázat és a hisztonkód jellegzetes eltéréseit figyelték meg (22, 64). Az epigenetikai módosításokért felelős enzimek, illetve a mikro-RNS-ek megváltozott expressziós szintje szintén nagyon gyakran fellelhető. Sok esetben azonban további vizsgálatok szükségesek annak tisztázására, hogy egy adott eltérés a betegség patogenezisének pontosan mely szakaszával áll összefüggésben.

A leukémia egyes altípusaira jellemző epigenetikai eltérések ismerete új szempontokkal bővítheti a prognosztikai klasszifikációs rendszert, ami a betegség kimenetelének pontosabb előrejelzését segíti elő. A kromatin szerkezetét befolyásoló gyógyszerek a potenciális terápiás lehetőségek újonnan felfedezett, bőséges tárházát képezik (27). Az epigenetikai terápiába vetett reményt növeli, hogy a genetikai változásokkal szemben a DNS-metilációs mintázat és a hisztonkód eltérései reverzibilisek. Emellett a mikro-RNS-ek expressziós szintjének növelése, illetve csökkentése is lehetséges.

Az epigenetikai eltérések említett klinikai alkalmazásai hozzájárulhatnak az onkohematológiai kórképekben szenvedő betegek egyre inkább személyre szabott kezelésének megvalósulásához, ezáltal a túlélők számának és életminőségének javulásához.

IRODALOM

1. Brait M, Sidransky D. Cancer epigenetics: above and beyond. *Toxicol Mech Methods* 21:275–288, 2011
2. Gaál Zs, Oláh É. Mikro-RNS-ek és szerepük hematológiai malignus betegségekben. *Orv Hetil* 153:2051–2059, 2012
3. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16:6–21, 2002
4. Popovic R, Shah MY, Licht JD. Epigenetic therapy of hematological malignancies: where are we now? *Ther Adv Hematol* 4:81–91, 2013

5. Ting AH, McGarvey KM, Baylin SB. The cancer epigenome – components and functional correlates. *Genes Dev* 20:3215–3231, 2006
6. Florean C, Schnekenburger M, Grandjettette C, et al. Epigenomics of leukemia: from mechanisms to therapeutic applications. *Epigenomics* 3:581–609, 2011
7. Taby R. Cancer epigenetics. *CA Cancer J Clin* 60:376–392, 2010
8. Esteller M. Profiling aberrant DNA methylation in hematologic neoplasms: a view from the top of the iceberg. *Clin Immunol* 109:80–88, 2003
9. Melki JR, Clark SJ. DNA methylation changes in leukemia. *Semin Cancer Biol* 12:347–357, 2002
10. Suetake I, Shinozaki F, Miyagawa J, et al. DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of DNMT3a and DNMT3b through a direct interaction. *J Biol Chem* 279:27816–27823, 2004
11. Rouhi A, Mager DL, Humphries K, et al. MiRNAs, epigenetics, and cancer. *Mamm Genome* 19:517–525, 2008
12. Miremadi A, Oestergaard MZ, Pharoah PD, et al. Cancer genetics of epigenetic genes. *Hum Mol Genet* 16 Spec No 1:R28–49, 2007
13. Hashimoto H, Vertino PM, Cheng X. Molecular coupling of DNA methylation and histone methylation. *Epigenomics* 2:657–669, 2010
14. Villa R, De Santis F, Gutierrez A, et al. Epigenetic gene silencing in acute promyelocytic leukemia. *Biochem Pharmacol* 68:1247–1254, 2004
15. Mizuno S, Chijiwa T, Okamura T, et al. Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. *Blood* 97:1172–1179, 2001
16. Kn H, Bassal S, Tikellis C, et al. Expression analysis of the epigenetic methyltransferases and methyl-CpG binding protein families in the normal B-cell and B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Cancer Biol Ther* 3:989–994, 2004
17. Singh R, Mortazavi A, Telu KH, et al. Increasing the complexity of chromatin: functionally distinct roles for replication-dependent histone H2A isoforms in cell proliferation and carcinogenesis. *Nucleic Acids Res* 41:9284–9295, 2013
18. Morgan BA, Mittman BA, Smith MM. The highly conserved N-terminal domains of histones H3 and H4 are required for normal cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 11:4111–4120, 1991
19. Herceg Z, Murr R. Mechanisms of histone modifications. In: *Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics*. Academic Press, London-Burlington-San Diego, 2011, pp 25–37
20. Munshi A, Shafi G, Aliya N, et al. Histone modifications dictate specific biological readouts. *J Genet Genomics* 36:75–88, 2008
21. Agirre X, Martínez-Climent JA, Otero MD, et al. Epigenetic regulation of miRNA genes in acute leukemia. *Leukemia* 26:395–403, 2012
22. Linggi BE, Brandt SJ, Sun ZW, et al. Translating the histone code into leukemia. *J Cell Biochem* 96:938–950, 2005
23. Pelletier N, Champagne N, Lim H, et al. Expression, purification, and analysis of MOZ and MORF histone acetyltransferases. *Methods* 31:24–32, 2003
24. Barneda-Zahonero B, Parra M. Histone deacetylases and cancer. *Mol Oncol* 6:579–589, 2012
25. Mascarenhas J, Roper N, Chaurasia P, et al. Epigenetic abnormalities in myeloproliferative neoplasms: a target for novel therapeutic strategies. *Clin Epigenet* 2:197–212, 2011
26. Jordaan G, Liao W, Sharma S. E-cadherin gene re-expression in chronic lymphocytic leukemia cells by HDAC inhibitors. *BMC Cancer* 13:88. DOI: 10.1186/1471-2407-13-88, 2013
27. Summers AR, Fischer MA, Stengel KR, et al. HDAC3 is essential for DNA replication in hematopoietic progenitor cells. *J Clin Invest* 123:3112–3123, 2013
28. Son HJ, Kim JY, Hahn Y, et al. Negative regulation of JAK2 by H3K9 methyltransferase G9a in leukemia. *Mol Cell Biol* 32:3681–3694, 2012
29. Arteaga MF, Mikesch JH, Qiu J, et al. The histone demethylase PHF8 governs retinoic acid response in acute promyelocytic leukemia. *Cancer Cell* 23:376–389, 2013
30. Harris WJ, Huang X, Lynch JT, et al. The histone demethylase KDM1A sustains the oncogenic potential of MLL-AF9 leukemia stem cells. *Cancer Cell* 21:473–487, 2012
31. Zou Y, Ma X, Huang Y, et al. Effect of phenylhexyl isothiocyanate on aberrant histone H3 methylation in primary human acute leukemia. *J Hematol Oncol* 5:36. DOI: 10.1186/1756-8722-5-36, 2012
32. Chen J, Li J, Han Q, et al. Enhancer of zeste homolog 2 is overexpressed and contributes to epigenetic inactivation of p21 and phosphatase and tensin homolog in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Exp Biol Med* 237:1110–1116, 2012
33. Di Croce L. Chromatin modifying activity of leukaemia associated fusion proteins. *Hum Mol Genet* 14 Spec No 1:R77–84, 2005
34. Fathi AT, Abdel-Wahab O. Mutations in epigenetic modifiers in myeloid malignancies and the prospect of novel epigenetic-targeted therapy. *Adv Hematol* 2012:469592. DOI: 10.1155/2012/469592, 2012
35. Liu HW, Zhang J, Heine GF, et al. Chromatin modification by SUMO-1 stimulates the promoters of translation machinery genes. *Nucleic Acids Res* 40:10172–10186, 2012
36. Dawson MA, Bannister AJ, Göttgens B, et al. JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1alpha from chromatin. *Nature* 461:819–822, 2009
37. Martinez-Zamudio R, Ha HC. Histone ADP-ribosylation facilitates gene transcription by directly remodeling nucleosomes. *Mol Cell Biol* 32:2490–2502, 2012
38. Guccione E, Bassi C, Casadio F, et al. Methylation of histone H3R2 by PRMT6 and H3K4 by an MLL complex are mutually exclusive. *Nature* 449:933–937, 2007
39. Lujambio A, Roper S, Ballestar E, et al. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res* 67:1424–1429, 2007
40. Li X, Liu J, Zhou R, et al. Gene silencing of MIR22 in acute lymphoblastic leukaemia involves histone modifications independent of promoter DNA methylation. *Br J Haematol* 148:69–79, 2010
41. Sampath D, Liu C, Vasan K, et al. Histone deacetylases mediate the silencing of miR-15a, miR-16a, and miR-29b in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 119:1162–1172, 2012
42. Lopez-Serra P, Esteller M. DNA methylation-associated silencing of tumor-suppressor microRNAs in cancer. *Oncogene* 31:1609–1622, 2011
43. Nervi C, Fazi F, Grignani F. Oncoproteins, heterochromatin silencing and microRNAs. *Epigenetics* 3:1–4, 2008
44. Zhang H, Chen Y. New insight into the role of miRNAs in leukemia. *Sci China C Life Sci* 52:224–231, 2009
45. Babashah S, Sadeghizadeh M, Tavirani MR, et al. Aberrant microRNA expression and its implications in the pathogenesis of leukemias. *Cell Onkol* 35:317–334, 2012
46. Nguyen AT, Taranova O, He J, et al. DOT1L, the H3K79 methyltransferase, is required for MLL-AF9-mediated leukemogenesis. *Blood* 117:6912–6922, 2011
47. Bayly R, Chuen L, Currie RA, et al. E2A-PBX1 interacts directly with the KIX domain of CBP/p300 in the induction of proliferation in primary hematopoietic cells. *J Biol Chem* 279:55362–55371, 2004
48. Fabbri M, Croce CM, Calin GA. MicroRNAs in the ontogeny of leukemias and lymphomas. *Leuk Lymphoma* 50:160–170, 2009
49. McDevitt MA. Clinical applications of epigenetic markers and epigenetic profiling in myeloid malignancies. *Semin Oncol* 39:109–122, 2012
50. Figueroa ME, Lugthart S, Li Y, et al. DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 17:13–27, 2010

51. Van Damme M, Crompot E, Meuleman N, et al. HDAC isoenzyme expression is deregulated in chronic lymphocytic leukemia B-cells and has a complex prognostic significance. *Epigenetics* 7:1403–1412, 2012
52. Bozkurt S, Ozkan T, Ozmen F, et al. The roles of epigenetic modifications of proapoptotic BID and BIM genes in imatinib-resistant chronic myeloid leukemia cells. *Hematology* 18:217–223, 2013
53. Zhou F, Mei H, Wu Q, et al. Expression of histone H2AX phosphorylation and its potential to modulate adriamycin resistance in K562/A02 cell line. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci* 31:154–158, 2011
54. Li XQ, Guo YY, De W. DNA methylation and microRNAs in cancer. *World J Gastroenterol* 18:882–888, 2012
55. Jurkowski TP, Meusburger M, Phalke S, et al. Human DNMT2 methylates tRNA(Asp) molecules using a DNA methyltransferase-like catalytic mechanism. *RNA* 14:1663–1670, 2008
56. Gao XN, Lin J, Ning QY, et al. A histone acetyltransferase p300 inhibitor C646 induces cell cycle arrest and apoptosis selectively in AML1-ETO-positive AML cells. *PLoS One* 8:e55481, 2013
57. Desai D, Salli U, Vrana KE, et al. SelSA, selenium analogs of SAHA as potent histone deacetylase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 20:2044–2047, 2010
58. Novotny-Diermayr V, Hart S, Goh KC, et al. The oral HDAC inhibitor pracinostat (SB939) is efficacious and synergistic with the JAK2 inhibitor pacritinib (SB1518) in preclinical models of AML. *Blood Cancer J* 2:e69, 2012
59. Bhaskara S, Knutson SK, Jiang G, et al. Hdac3 is essential for the maintenance of chromatin structure and genome stability. *Cancer Cell* 18:436–447, 2011
60. Tran HT, Kim HN, Lee IK, et al. Improved therapeutic effect against leukemia by a combination of the histone methyltransferase inhibitor chaetocin and the histone deacetylase inhibitor trichostatin A. *J Korean Med Sci* 28:237–246, 2013
61. Savickiene J, Treigyte G, Borutinskaite VV, et al. Antileukemic activity of combined epigenetic agents, DNMT inhibitors zebularine and RG108 with HDAC inhibitors, against promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Cell Mol Biol Lett* 17:501–525, 2012
62. Hackanson B, Rimmele L, Benkiser M, et al. HDAC6 as a target for antileukemic drugs in acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 36:1055–1062, 2012
63. Saeed S, Logie C, Francoijs KJ, et al. Chromatin accessibility, p300, and histone acetylation define PML-RAR α and AML1-ETO binding sites in acute myeloid leukemia. *Blood* 120:3058–3068, 2012
64. Melki JR, Vincent PC, Clark SJ. Concurrent DNA hypermethylation of multiple genes in acute myeloid leukemia. *Cancer Res* 59:3730–3740, 2006