



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Acta Haematologica Polonicajournal homepage: www.elsevier.com/locate/achaem**Praca poglądowa/Review****Znaczenie modyfikacji epigenetycznych w patogenezie białaczek***Role of epigenetic modifications in pathogenesis of leukemia*

Sylwester Głowacki*, Janusz Błasiak

Katedra Genetyki Molekularnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Kierownik: dr hab. Katarzyna Woźniak, Poland

INFORMACJE O ARTYKULE

Historia artykułu:

Otrzymano: 12.09.2012

Zaakceptowano: 20.12.2012

Dostępne online: 21.02.2013

Słowa kluczowe:

- białaczka
- epigenetyka
- metylacja DNA
- modyfikacje histonów
- miRNA

Keywords:

- Leukemia
- Epigenetics
- DNA methylation
- Histone modifications
- miRNA

A B S T R A C T

Relations between genetic alterations and different types of leukemia lead to understanding that leukemogenesis is a mainly genetic-based phenomenon. However recently role of factors of epigenetic nature is highlighted in research on oncogenic transformation. Epigenetic regulation is defined as heritable patterns that are not related to DNA sequence. There are three major forms of epigenetic regulation: DNA methylation, histone modifications – methylation and acetylation – and regulation through small non-coding RNAs. Epigenetic regulation is important in development of different types of leukemia. Changes in DNA methylation patterns as well as in histone methylation and acetylation were detected in samples from patients with leukemia. In addition different profiles of miRNA, one subtype of noncoding RNAs, were associated with this disease. What is more, alteration in activity of enzymes involved in regulation of DNA and histone modification can also be detected in leukemic cells. Current knowledge of epigenetic regulation allows for better diagnostic of leukemia and better understanding of mechanism involved in its therapy. It also allowed for development of new forms of therapies targeted specifically on mechanisms involved in epigenetic regulation.

© 2013 Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów, Instytut Hematologii i Transfuzjologii. Published by Elsevier Urban & Partner Sp. z o.o. All rights reserved.

Wstęp

Białaczki należą do chorób rozrostowych układu krwionośnego. Współcześnie, zgodnie z klasyfikacją WHO z 2008 roku, wyróżnia się kilka typów białaczek różniących się

pochodzeniem i przebiegiem [1]. Wiele z nich powiązanych zostało z określonymi zmianami genetycznymi. Przykładowo, przewlekła białaczka szpikowa (CML) wywoływana jest translokacją chromosomową t(9;22) (q34;q11), w wyniku której powstaje gen fuzyjny BCR-ABL kodujący onkogeną, konstytutywnie aktywną kinazę tyrozynową [2]. Choroba

* Adres do korespondencji: Katedra Genetyki Molekularnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska ul. Pomorska 141/143 90-236 Łódź. Tel.: +0 4842 635 47 76; fax: +0 48 42 635 44 84.

Adres email: sglowa@biol.uni.lodz.pl (S. Głowacki).

zaczyna się fazą przewlekłą, która następnie przechodzi w fazę ostrą i/lub kryzę blastyczną [3]. Podobnie różne podtypy ostrej białaczki szpikowej (AML) są powiązane ze specyficznymi aberracjami chromosomowymi i powstającymi w ich wyniku fuzyjnymi onkogenami, takimi jak PML-RARA, MLLT3-MLL czy DEK-NUP214 [4, 5]. Także w obrębie białaczek limfoblastycznych B istnieje podgrupa, której etiologia związana jest z wystąpieniem zaburzeń chromosomowych oraz powstaniem takich onkogenów, jak rearanżowane geny białka MLL czy geny fuzyjnego białka EL-AML1 (przegląd przedstawiają Vardiman i wsp. [4]).

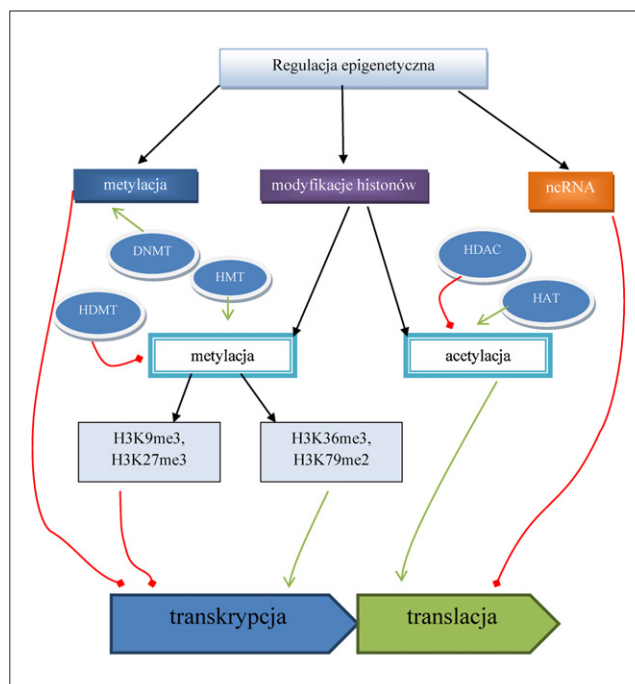
W ostrych białczkach limfoblastycznych oraz o zróżnicowanym pochodzeniu obserwuje się genetyczne zmiany o charakterze fuzji i translokacji, między innymi t(9;22)/BCR-ABL, t(4;11)/MLL-AF4, t(12;21)TEL-AML1 oraz t(1;19)E2A-PBX, w komórkach progenitorowych limfocytów T i B, które prowadzą do ich transformacji nowotworowej i zwiększonej proliferacji [6].

Związki między występowaniem opisanych zaburzeń genetycznych a zapadalnością na białaczki doprowadziły do poglądu, że nowotwory krwi są chorobami o genetycznym podłożu, jednakże w ostatnich latach zwraca się uwagę na istotną rolę regulacji epigenetycznej w rozwoju tych schorzeń.

Mechanizmy regulacji epigenetycznej

Definicje epigenetyki i epigenetycznej regulacji ekspresji genów są kontrowersyjne i nieprecyzyjne. Na potrzeby tego przeglądu przyjmujemy uproszczone ujęcie, zgodnie z którym epigenetyczna modyfikacja ekspresji genów oparta jest na dziedzicznych wzorcach, niezwiązanych ze zmianami w sekwencji DNA [7]. Obejmują one takie zjawiska jak metylacja DNA, modyfikacje histonów oraz niekodujące RNA (ncRNA) (Ryc. 1) [8]. Wspomniane modyfikacje tworzą sieć wzajemnie oddziałujących na siebie czynników, które umożliwiają precyzyjną kontrolę ekspresji genów i są podstawą takich zjawisk, jak różnicowanie się komórek w trakcie rozwoju osobniczego [9].

Metylacja DNA zachodzi u ssaków głównie w obrębie wysp CpG, aczkolwiek stwierdzono ją także poza tymi obszarami [10]. Metylacja reszt cytozyn przeprowadzana jest przez enzymy z grupy metylotransferaz DNA (DNMT). Metylację *de novo* przeprowadzają DNMT3A i DNMT3B, zaś metylacja zachowawcza przeprowadzana jest przez DNMT1 [11]. Metylacja DNA prowadzi do hamowania ekspresji genów poprzez co najmniej dwa mechanizmy. Metylowane sekwencje słabiej wiążą czynniki transkrypcyjne, co prowadzi do osłabienia transkrypcji i w efekcie wyciszenia ekspresji genu, którego sekwencja uległa hipermetylacji [12]. Z drugiej strony metylacja może indukować związanie innych, specyficznych czynników regulatorowych, takich jak MeCP-1 (białko wiążące metylo-CpG) osłabiających ekspresję informacji genetycznej [13]. Wykazano także, że metylacja DNA może prowadzić do zwiększenia stopnia upakowania chromatyny. Współdziałanie enzymów metylujących *de novo* i metylotransferaz zachowawczych prowadzi do utworzenia i dziedziczenia wzorców metylacji DNA w genomie ssaków. Wykazano, że zjawiska metylacji DNA są kluczowe dla



Ryc. 1 – Schemat przedstawiający różne typy modyfikacji epigenetycznych i ich wpływ na ekspresję genów. DNMT – metylotransferazy DNA; HMT – metylotransferazy histonów; HDMT – demetylazy histonów; HAT – acetylotransferazy histonów; HDAC – deacetylazy histonów; ncRNA – niekodujące RNA

Fig. 1 – Diagram showing the different types of epigenetic modifications and their influence on gene expression. DNMT – DNA methyltransferase; HMT – histone methyltransferase; HDMT – histone demethyltransferase; HAT – histone acetyltransferase; HDAC – histone deacetylase; ncRNA – non-coding RNA

właściwego przebiegu rozwoju zarodkowego [14]. Metylacja wysp CpG jest mechanizmem zapewniającym wyciszenie między innymi sekwencji retrotranspozonowych stanowiących znaczącą część genomów ssaków [15]. Proces ten pozwala również na inaktywację jednego z dwóch chromosomów X w komórkach żeńskich, a także ekspresję monoalliczną opartą na piętnowaniu rodzicielskim [11, 16].

Przez długi czas za jedyny powszechnie akceptowany mechanizm demetylacji DNA u ssaków uznawana była pasywna demetylacja wynikająca z replikacji DNA. W ostatnich latach odkryto jednak enzymy z rodziny TET odpowiedzialne za przekształcenia 5-metylocytozyny do 5-hydroksymetylocytozyny i zapoczątkowujące szlak reakcji prowadzących do aktywnej demetylacji DNA [17].

Modyfikacje histonów następują poprzez kowalencyjne wiązanie różnych grup chemicznych do ich N-końców. Dwie najczęstsze modyfikacje to metylacja i acetylacja. Metylacja przeprowadzana jest przez metylotransferazy histonów (HMT), które przyłączają jedną lub więcej grup metylowych do reszt lizyny lub arginy [18]. Metylacja histonów jest procesem przynajmniej częściowo odwracalnym przez demetylazy histonów (HDM), takie jak JHDM1 czy JMJD2 [19].

Efekty metylacji histonów obejmują rozluźnienie struktury chromatyny wynikające ze zmian w strukturze nukleosomów, a także utworzenie miejsc wiążących różne białka regulatorowe, w tym czynniki transkrypcyjne [18, 19]. Proces ten może jednak prowadzić zarówno do hamowania, jak i stymulacji ekspresji genów, w zależności od tego, które aminokwasy ulegają metylacji oraz ile reszt metylowych jest do nich przyłączanych. Trimetylacje H3K9me3, H3K27me3 wiąże się zazwyczaj z wyciszaniem genów, zaś metylacje H3K4me2/3, H3K36me3, H3K79me2 promują proces transkrypcji [20]. Także metylacja argininy może prowadzić do wyciszenia jak i zwiększenia ekspresji genów na drodze modyfikacji powinowactwa metylowanych regionów chromatyny do czynników transkrypcyjnych [21].

Acetylacja histonów przeprowadzana jest przez acetylotransferazy histonów (HAT), które przyłączają pojedyncze grupy acetylowe do zachowanych ewolucyjnie reszt lizynowych zawartych w ogonach N-końcowych histonów, zaś deacetylacja – przez deacetylasy histonów (HDAC) [22]. Wyróżnia się trzy główne grupy acetylotransferaz histonów: rodzina N-acetylotransferaz powiązanych z Gcn-5, rodzina CBP/p300 i rodzina MYST oraz cztery klasy deacetylaz histonów [22, 23]. Deacetylasy należące do klas I, II i IV wykorzystują jony Zn^{2+} jako kofaktor, zaś przedstawiciele klasy III wykorzystują NAD^+ [23]. Ponieważ enzymy te mogą także deacetylować reszty lizyny w białkach innych niż histony, obecnie często określa się je jako deacetylasy lizyny (KDAC) [24]. Zwiększając wypadkowy ładunek ujemny histonów, acetylacja prowadzi do osłabienia wiązania z DNA i ułatwia wiązanie się czynników transkrypcyjnych [19]. Stwierdzono także, że efektem acetylacji jest osłabienie oddziaływań między nukleosomami [25]. Współdziałanie procesów metylacji i acetylacji histonów nie jest do końca jasne. Sugeruje się, że acetylacja określonych histonów może promować ich metylację i efekty te mogą synergistycznie prowadzić do podwyższenia poziomu ekspresji genów [26].

Opisane modyfikacje histonów składają się na system regulacji opisywany czasami jako kod histonowy. Podstawą jego działania jest aktywność białek zaangażowanych w jego odczyt [27]. Przyjmuje się, że odczyt wzorców związanych z acetylacją przeprowadzany jest przez białka zawierające bromodomeny, zaś modyfikacje związane z metylacją odczytywane są przez białka wyposażone w chromodomeny [27]. Modyfikacje te funkcjonują w kontekście aktywności antagonistycznie działających kompleksów białek z grupy Polycomb i Trithorax [28]. Białka z grupy Polycomb są związane z wyciszaniem ekspresji genów, podczas gdy białka z grupy Trithorax z aktywacją ekspresji, zaś ich współdziałanie może utrzymywać wzorzec regulacji związany z kodem histonowym w trakcie replikacji DNA i podziałów komórkowych [29]. Mutacje w genach tych białek, na przykład ASXL1, są jednymi z charakterystycznych zaburzeń występujących w różnych chorobach związanych z hematopoezą [30]. Co więcej, ostatnio uzyskane wyniki sugerują, że regulacja ta odbywa się także przy współdziałaniu ncRNA [31].

Istnieje szereg różnych form ncRNA. Przykładem, który opisujemy dalej, są mikroRNA (miRNA) – cząsteczki RNA długości około 22 nukleotydów, które regulują aktywność mRNA [32]. Regulacja mRNA odbywa się na drodze

sparowania sekwencji miRNA z fragmentem mRNA. miRNA funkcjonują w kompleksach z białkami, tworząc miRNP. Dojrzewanie miRNA obejmuje procesy katalizowane częściowo przez te same enzymy co w przypadku małych interferujących RNA. W przypadku wystąpienia znacznej komplementarności między cząsteczkami miRNA a danym transkrypcyjnym dochodzi do jego degradacji. Przy mniejszej komplementarności miRNP wywołac może inhibicję translacji we współdziałaniu z białkiem z rodziny Argonaute, ale szczegóły tego procesu nie są znane (przeгляд u Stefani i Slacka [33]). W genomie człowieka zidentyfikowano ponad 800 genów miRNA, które mogą wpływać na ekspresję ponad połowy białek w organizmie, regulując aktywność większości fundamentalnych procesów, takich jak wzrost, rozwój i różnicowanie się, cykl komórkowy czy programowana śmierć komórki (przeгляд u Stefani i Slacka [33]). Deregulacja aktywności miRNA jest jednym z charakterystycznych przejawów wielu transformacji nowotworowych [34].

Metylacja DNA w białaczkach

Metylacja wysp CpG może wpływać na proces transformacji nowotworowej na trzy sposoby. Po pierwsze demetylacja onkogenów prowadzi do ich aktywacji, umożliwia transkrypcję ich sekwencji poprzez zniesienie mechanizmów wyciszających wykorzystujących metylację i w efekcie sprzyja transformacji nowotworowej. Po drugie, nieprawidłowa metylacja genów supresorowych nowotworów prowadzi do ich inaktywacji, co może odblokować szlaki aktywne w trakcie transformacji nowotworowej. Po trzecie metylowane sekwencje częściej ulegają mutacjom, które mają potencjalnie onkogeny charakter (przeгляд przedstawiają Gonzalzo i Jones [35]). Stwierdzono, że inaktywacja u komórek nowotworowych enzymów kontrolujących poziom i wzór metylacji DNA prowadzi do ich śmierci [36]. Podobnie jak inne nowotwory, komórki białaczek wykazują liczne odchylenia we wzorcach metylacji DNA w porównaniu z komórkami zdrowymi [37]. Przykładowo, badania z użyciem mikromacierzy wykazały u pacjentów z dziecięcą formą ALL zwiększoną metylację pięciu genów: PPP2R3A (pojednostka regulatorowa fosfatazy 2), THRB (β receptor hormonu tarczycy), FBLN2 (fibuliny 2), BNC1 (bazonukliny 1) oraz MSX1 (homeoboksu msh 1). Co więcej, wykazano różnice w statusie metylacji tych genów między białaczkami ALL typu T i B [38]. Stwierdzono, że niektóre z tych zmian mogą funkcjonować jako wyznaczniki w diagnostyce białaczek, a także w określaniu rokowania dla pacjentów. Jako przykład służyć może hipermetylacja i inaktywacja genów HOXA, która jest związana ze złymi rokowaniami, zarówno w białaczkach szpikowych jak i limfocytarnych [39]. Przykłady genów hipermetylowanych w różnych białaczkach zawiera tabela I.

Zauważono, że w przypadku zaburzeń wzorców metylacji w AML częściej obserwuje się globalny wzrost poziomu metylacji różnych genów w porównaniu z komórkami prawidłowymi, chociaż u niektórych pacjentów obserwuje się hipometylację, zawsze jednak wzorzec metylacji jest zmieniony w stosunku do wzorca obecnego u osób zdrowych

Tabela I – Wybrane geny hipermetylowane w poszczególnych typach białaczek (na podstawie [44], zmienione, cytowania tamże)**Table I – Selected genes hipermetylowane in different types of leukemia (based on [44], as amended, quoted *ibid*)**

Gen	Funkcja	CML (%)	AML (%)	ALL (%)	CLL (%)
c-ABL	Kinaza tyrozynowa	20–81			
Kalcytonina	Resorpcja Ca ²⁺	20–80	50–90	>70	
E-kadheryna	Adhezja międzykomórkowa		32–78	53–100	60
ER	Receptor estrogenu	20–50	70–90	60–90	
MDR1	Oporność wielolekowa		10–31		
MyoD	Różnicowanie komórek mięśniowych		50–80	50–80	
p15 ^{INK4B}	Inhibitor kinaz cyklino-zależnych	24	30–90	38–80	<10
RARβ	Receptor kwasu retinowego		>50		

[40]. U chorych na AML i CML stwierdzono także wzmożoną ekspresję genów metylotransferaz DNA DNMT1, -3A, i -3B [41]. W zespołach mieloproliferacyjnych, które mogą prowadzić do rozwoju AML, stwierdzono występowanie mutacji TET2 kodującej enzym demetylujący DNA [42]. W ostatnich latach stwierdzono związek między hipermetylacją w AML a występowaniem zmutowanych wariantów genów IDH1/2 kodujących cytozoolową i mitochondrialną dehydrogenazę izocytynianu. Zasugerowano, że związek ten wynikać może z wpływu wytwarzanego przez IDH1/2 α -ketoglutaranu na aktywność enzymów regulujących poziom metylacji DNA (przegląd u Fathi i Abdel-Wahab [43]).

Badania globalnych profili metylacji DNA pozwoliły między innymi zidentyfikować pięć nowych podtypów AML, a także specyficzne wzorce metylacji towarzyszące formom fuzyjnych onkogenów występujących w AML, takim jak AML1-ETO, CBF β -MYH11 i PML-RARA [40]. Wzorec metylacji DNA w AML zmienia się w trakcie przebiegu choroby – w późnym okresie rozwoju choroby obserwuje się hipermetylację w promotorze genu HIC1 i jest to skorelowane z nawrotem choroby po zastosowaniu chemioterapii. Co więcej, 100% hipermetylacji tego genu obserwuje się także u pacjentów w fazie kryzy blastycznej CML [44]. Pacjenci chorzy na AML wykazują także bardzo niejednolite wzorce metylacji genów inhibitorów kinaz cyklino-zależnych, w tym CDKN2B [45, 46]. Metylacja CDKN2B skorelowana jest z nadekspresją metylaz DNMT1 i DNMT3B, która z kolei może być przyczyną dalszych zaburzeń we wzorcach metylacji DNA [41].

W ALL istotne znaczenie prognostyczne może mieć stan metylacji promotora genu białka p21 (CDKN1A) oraz genu kalcytoniny CALC1. Hipermetylacja tych sekwencji pozwala prognozować nieskuteczność terapii [47, 48]. Brak nieprawidłowej metylacji CDKN1A jest z kolei pozytywnym prognostykiem zarówno w ostrych białaczkach mieloblastycznych, jak i limfoblastycznych [46]. W przypadku CLL stwierdzono istotne relacje między mutacjami w genie IgVH będącym głównym markerem dla tego typu białaczek, a stanem metylacji takich genów, jak ZAP-70 kodujący inny marker dla białaczek CLL czy gen czynnika transkrypcyjnego TWIST2, oraz prognozami dla leczenia. Wyciszenie ZAP-70 koreluje z jego metylacją i mutacją w IgVH, zaś pacjenci z metylovanym ZAP-70 charakteryzują się znacząco dłuższym oczekiwanym czasem przeżycia, którego mediana wynosi 211 miesięcy w porównaniu z 81 miesięcy dla pacjentów, u których nie stwierdzono metylacji tego genu [49]. Z kolei dla czynnika transkrypcyjnego TWIST2

obserwuje się korelację między brakiem mutacji w IgVH a metylacją tego genu oraz złymi prognozami dla leczenia [50]. Metylacja niektórych genów może upośledzić wrażliwość komórek białaczkowych na chemoterapeutyki stosowane w terapiach. Przykładem takiej relacji jest hipermetylacja promotora PTEN prowadząca do inaktywacji tego genu, która powiązana jest z opornością na leki, w tym inhibitora kinaz tyrozynowych – imatynibu (IM) [51]. W ALL obserwuje się także hipometylację, która prowadzi między innymi do aktywacji protoonkogenu HOX11 [52].

W CML badano zmiany we wzorcach metylacji w kolejnych stadiach rozwoju tej choroby. W trakcie przejścia od fazy przewlekłej do kryzy blastycznej obserwuje się wzrost poziomu metylacji takich genów, jak ABL1, CALC1, HIC1, oraz receptora estrogenów [44, 53–55]. Ponadto wykazano, że rozwojowi CML towarzyszy utrata piętnowania rodzicielskiego, co prowadzić może do patologicznej biallelicznej ekspresji genów, które normalnie ulegają ekspresji monoallelicznej [56]. Stwierdzono także, że przejście od fazy przewlekłej do fazy kryzy blastycznej skorelowane jest ze wzrostem globalnej aktywności metylotransferaz [41]. Niedawno odkryto, że hipermetylacja genu czynnika transkrypcyjnego PU.1 prowadzi do wyciszenia jego ekspresji i może być istotnym markerem zmian nowotworowych – utrzymuje się w komórkach szpiku nawet po całkowitej remisji choroby pod wpływem terapii IM [57]. Zarazem przy przejściu od fazy przewlekłej do fazy ostrej i/lub kryzy blastycznej obserwuje się hipometylację niektórych sekwencji, na przykład promotora retrotranspozonu LINE1, co prowadzi do aktywacji transkrypcji sensownej prowadzącej do ekspresji ORF1 i transkrypcji antysensownej skutkującej ekspresją protoonkogenu MET. Aktywację LINE1 skorelowano także z wysokimi poziomami transkryptu BCR-ABL [58]. Hipometylacja jest też przyczyną nadekspresji antygeny CD7 będącego jednym z istotnych markerów prognostycznych w CML [59]. Globalna demetylacja indukowana działaniem deoksy-5-azacytydyny (DAC) skutkuje różnicowaniem się i autofagią w komórkach białaczkowych [60]. Zmiany we wzorcach metylacji odpowiadać mogą też za nabywanie w przebiegu CML lekooporności. Stwierdzono, że metylacja genu mediatora interakcji z Bcl-2 (BIM) jest skorelowana z opornością na działanie IM [61].

W komórkach białaczki CLL obserwuje się nadekspresję onkogenu TCL-1 wynikającą z demetylacji jego promotora. Gen ten pełni prawdopodobnie rolę w blokowaniu różnicowania komórek hematopoetycznych, rozwoju guzów i działaniu antyapoptotycznym [62]. W CLL obserwuje się

także nadekspresję kilku innych genów, która może być wywołana hipometylacją ich promotorów, między innymi Bcl-2 i DNMT3B, którego nadekspresja skorelowana jest z hipometylacją LINE1 [58].

Szereg wyników wskazuje, że odpowiednie poziomy metylacji DNA związane są z potencjałem prawidłowego różnicowania się komórek macierzystych. Także białaczkowe komórki macierzyste, u których indukowano hipometylację, przejawiają znacznie obniżony potencjał do odnowy i rozwoju (przegląd przedstawiają Vocentanz i wsp. [63]).

Metylacja histonów w białaczkach

Zaburzenia wzoru metylacji histonów mogą mieć związek z rozwojem różnych nowotworów [64]. Zmiany te odgrywają także istotną rolę w rozwoju białaczek. W przypadku ALL i AML stwierdzono, że częste w ich przebiegu chromosomowe rearanżacje prowadzą do powstania patologicznych, chimericznych białek zawierających fragmenty białka MLL o aktywności metylotransferazy H3K4, które jest ludzkim homologiem białka Trithorax. Zaproponowano kilka mechanizmów, według których warianty te modyfikują ekspresję genów, w tym rekrutację HDAC, rekrutację koaktywatorów czy oligomeryzację białka MLL. W konsekwencji dochodzi do nadekspresji genu HOX i blokady różnicowania się komórek hematopoetycznych [65]. Dalsze badania pozwoliły stwierdzić, że chimericzne warianty MLL nie wykazują aktywności metylotransferazy, lecz muszą współdziałać z innymi czynnikami, takimi jak DOT1L, by móc wpływać na proces leukemogenezy [66]. W badaniach nad mysim i ludzkim modelem białaczek z rearanżacjami MLL stwierdzono, że białko to wywołuje rekrutację DOT1L do rejonów zawierających geny HOX, co prowadzi do metylacji H3K79 w obrębie ich promotorów i wzmocnienia ekspresji tych genów [67]. Z kolei komórki immortalizowane genami chimericznych wariantów białka MLL ulegają apoptozie po wyciszeniu ekspresji DOT1L [68]. Wpływ na aktywność genów HOX mają także procesy metylacji H3K36 i H4K20 przeprowadzane przez białka chimericzne występujące w AML, w skład których wchodzi fragment metylotransferazy NSD1 połączony z nukleoporyną 98. NUP98-NSD1 indukuje AML na drodze inaktywacji represji genu *Hox-A* przez represor EZH2 [69]. EZH2 jest metylotransferazą metylującą histon H3 w pozycji K27, która wchodzi w skład kompleksu regulatorowego Polycomb [70]. W niektórych typach białaczek zidentyfikowano warianty EZH2 zawierające mutację inaktywującą aktywność metylotransferazową, co podkreśla rolę EZH2 jako represora nowotworów [71]. Aktywacja genów HOX może też wynikać z demetylacji przeprowadzonej przez HDMT, jak to jest w przypadku demetylazu KDM2b, istotnej w transformacji nowotworowej w przebiegu AML [72].

W przypadku białaczek typu CLL zidentyfikowano także zjawisko represji genu RELB, którego aktywność związana jest z wrażliwością na terapię zależną od płci. RELB jest elementem szlaku przekazywania sygnałów NF- κ B. Gen tego białka jest poddany represji w komórkach opornych na terapię męzczyzn, lecz u kobiet ulega wzmocnionej ekspresji [73].

Rola acetylacji histonów w białaczkach

Wzory acetylacji histonów ulegają zmianom w transformacji nowotworowej i mogą być pomocne w prognozowaniu przebiegu choroby. Stwierdzono pozytywną korelację między acetylacją histonu H4 a odsetkiem całkowitych remisji i przeżyć w przebiegu ALL [74]. Niektóre HAT są identyfikowane jako składniki onkogennych białek chimericznych w białaczkach. Przykładem może być spotykane w AML z translokacją t(8;16)(p11,p13) białko MOZ-CBP, które powstaje w wyniku połączenia dwóch białek o funkcji acetylotransferaz: CBP i MOZ [75]. Przypuszcza się, że nieprawidłowe formy chimericznych acetylotransferaz wywołują zaburzoną acetylację histonów skutkującą niepożądaną aktywacją ekspresji genów [76].

Deacetylazy histonów odgrywają rolę w patogenezie niektórych białaczek. Typowym przykładem jest białaczka typu APL, podtyp AML, gdzie białko receptora kwasu retinowego (RAR) w wyniku rearanżacji chromosomowych często ulega fuzji z białkiem PML [77]. Białka chimericzne PML-RAR indukują leukemogenezę, zaburzając prawidłową regulację genów, w tym powiązanych z metabolizmem kwasu retinowego (RA), co zachodzi między innymi na drodze rekrutacji metylotransferaz i HDAC. Stwierdzono także, że chimericzne białko PML-RAR oddziałuje z innymi enzymami aktywnymi w regulacji epigenetycznej, w tym JMJD3 (deme-tylaza H3K27me3), SETDB1, JMJD1A (deme-tylaza H3K9), HDAC-4 i -9, oraz DNMT3A [77]. Sugeruje to, że PML-RAR pełni rolę w szerszym spektrum modyfikacji epigenetycznych, nie tylko w acetylacji histonów. Fragment PML indukuje oligomeryzację RAR, co umożliwia oddziaływanie z kompleksem korepresorowym NCoR/SMRT, skutkujące wzmocnioną rekrutacją HDAC i permanentną represją genów metabolizmu kwasu retinowego (RA) [78, 79]. Blokując to prawidłowe różnicowanie się komórek hematopoetycznych i nowotworzenie. W konsekwencji u wielu pacjentów z APL można doprowadzić do remisji choroby, wykorzystując RA i odblokowując prawidłowe szlaki różnicowania [80].

Podobne zjawiska obserwuje się w innych typach białaczek. Przykładowo białko chimericzne AML1-ETO, charakterystyczne dla białaczek typu AML, współdziała z podobnym mechanizmem rekrutacji HDAC blokującym prawidłowe różnicowanie komórek hematopoetycznych [79]. Co więcej, aktywność tego genu jest z kolei zależna od acetylacji specyficznych reszt lizynowych przeprowadzanej przez białko p300. Przypuszcza się, że p300 nie tylko acetyluje AML1-ETO, ale także jest przez nie rekrutowane do chromaty-ny i funkcjonuje jako typowa HAT [81]. W AML stwierdzono zaś zaburzenia dystrybucji HDAC1. Wśród 10 000 przebadanych promotorów w blastach AML obserwuje się, w porównaniu z prawidłowymi komórkami progenitorowymi, silniejsze wiązanie HDAC1 w 130 promotorach, zaś osłabione w 66 [82].

Oprócz białek chimericznych zawierających fragmenty o aktywności HDAC w różnych białaczkach stwierdzono także zaburzenia ekspresji prawidłowych form deacetylaz. W próbkach pobranych od pacjentów cierpiących na ALL wykryto nadekspresję HDAC6 i SIRT1 przy jednoczesnym hamowaniu ekspresji HDAC5, a także selektywne zmiany

aktywności tych enzymów pod wpływem inhibitorów [83]. W próbkach pochodzących od dziecięcych pacjentów z ALL wykryto z kolei nadekspresję HDAC-2, -3, -6, -7 i -8 w porównaniu z próbkami szpiku od zdrowych osób. Nadaktywność HDAC7 i -9 stanowi wyznacznik złej prognozy w rozwoju ALL u dzieci [84].

Rola ncRNA w białaczkach

Zaburzona ekspresja miRNA może prowadzić do nowotworzenia, co wskazuje, że geny niektórych miRNA funkcjonują jako supresory lub onkogeny [85]. Jednym z pierwszych zidentyfikowanych przykładów miRNA pełniących funkcję supresorów w rozwoju białaczek były miR-15a i miR-16-1, które wyciszą ekspresję genu Bcl-2, ulegały one słabszej ekspresji u ponad połowy pacjentów cierpiących na CLL, ponadto poziom ich ekspresji korelował z przewidywanymi efektami terapii. Zmniejszona aktywność tych miRNA skutkuje nadekspresją antyapoptotycznego białka Bcl-2 [86, 94]. Spadek aktywności miR-15a i miR-16-1 jest wynikiem delecji del13(q14) obejmującej obszar, na którym leżą geny tych miRNA [87]. Korelacja między delecjami i zmianami profili aktywności miRNA jest typową cechą patogenezы CLL (przeгляд u Zhao i wsp. [88]). Zmienione profile miRNA w wielu przypadkach mogą być skutecznie użyte w prognozowaniu rozwoju choroby [89]. Zmiany profilów aktywności miRNA korelują też z podatnością na różne formy terapii. Powiązania takie odkryte zostały na przykład w kontekście wrażliwość pacjentów CLL na terapię opartą na analogu nukleozydów purynowych – flaudarabinę. Stwierdzono, że u pacjentów opornych na działanie tego leku często dochodzi do delecji genu p53 [90]. Później zidentyfikowano także specyficzne profile aktywności miRNA związane z opornością na ten lek, w których obserwuje się zwiększoną aktywność miR-181a i miR-221 oraz zmniejszoną aktywność miR-29a [91]. Aktywność tych miRNA powiązano z szlakiem przekazywania sygnałów związanym z p53. Wynika z tego, że zmieniona aktywność miRNA może być jedną z przyczyn zaburzonej regulacji białka odpowiedzialnego za podatność na terapię flaudarabiną. Wyniki te, wraz z innymi, pozwoliły opracować testy wykorzystujące profile aktywności miRNA w prognozowaniu przebiegu różnych podtypów CLL [92, 93].

Znacznie mniej znana jest rola miRNA w patogenezы CML. Wykazano na przykład, że grupa genów miR-17-92, których ekspresja regulowana jest przez białka MYC i BCR-ABL, ulega wzmożonej aktywacji u pacjentów w fazie przewlekłej, ale nie w fazie kryzy blastycznej. Ponadto uzyskane za pomocą transformacji lentiwirusem zwiększenie poziomu ekspresji policistronowego miRNA obejmującego wymienione geny prowadzi do zwiększenia wrażliwości na IM [94]. Ponadto CML powiązana jest z wyciszeniem miR-203. Dochodzi do niego w wyniku hipermetylacji tego genu w komórkach nowotworowych. Wyciszenie miR-203 skutkuje zwiększeniem aktywności ABL1, które jest jednym ze składników chimerycznej kinazy tyrozynowej BCR-ABL [95, 102]. Badanie profilów miRNA chorych na CML pozwoliło także wykryć zmiany wywołane terapią. Podanie IM skutkuje u pacjentów chorych na CML wzrostem ekspresji miR-150 i miR-146a, które połączone jest ze spadkiem ekspresji

miR-142, -199b i -145 [96]. Podobnie jak w przypadku CLL, specyficzne profile miRNA mogą służyć w przebiegu CML jako prognostyki efektów terapii. Badania pacjentów otrzymujących IM pozwoliły zidentyfikować 19 miRNA o innym poziomie ekspresji u pacjentów wrażliwych i opornych na działanie IM. Ekspresja osiemnastu z nich była hamowana, ekspresja jednego, hsa-miR-191, wzrastała u pacjentów opornych na IM [97].

Jeśli chodzi o białaczki ostre, większość badań nad rolą miRNA dotyczyła AML. W przypadku ALL stwierdzono zamianę aktywności tylko kilku miRNA (przeгляд przedstawiają Florean i wsp. [98]). Zidentyfikowano między innymi specyficzne profile aktywności miRNA skorelowane z różnymi formami rearanzacji chromosomowych występujących w AML, wykazano także, że deregulacja aktywności miRNA jest czynnikiem wpływającym na przebieg choroby [99]. Także w przypadku tych form białaczek zmiany w ekspresji miRNA mogą służyć w prognozowaniu rozwoju choroby lub powodzeniu terapii. Przykładem takich zastosowań jest miR-181, którego ekspresja była odwrotnie skorelowana z ekspresją białek związanych z mechanizmami odporności wrodzonej i wskazywała na wysokie ryzyko negatywnych wyników postępowania klinicznego [100]. Nie zawsze oporność na dany chemoterapeutyk znajduje odbicie w odrębnej sygnaturze miRNA. Mimo że w trakcie terapii winkrystyną i daunarubicyną w ALL dzieci stwierdzono odmienne profile miRNA między pacjentami wrażliwymi i opornymi na terapię, nie stwierdzono takowych przy terapii prednizolonem [101]. Z kolei leczenie kwasami transretinowymi wywołuje u pacjentów mających chimeryczne białko PML-RAR modyfikację ekspresji szeregu miRNA wchodzących w skład systemów regulujących szlaki przekazywania sygnałów powiązane z czynnikiem NF- κ B, co sugeruje, że miRNA mogą także wchodzić w skład ścieżek odpowiedzialnych za prawidłowe funkcjonowanie terapeutyków [102].

Regulacja epigenetyczna jako cel terapii białaczek

Odkrycie, że wiele kluczowych aspektów nowotworzenia zależy od procesów podlegających regulacji epigenetycznej, pozwoliło przyjąć nową strategię w opracowywaniu terapii antynowotworowych obejmujących modyfikację aktywności enzymów biorących udział w utrzymaniu i zmianie wzorów metylacji DNA oraz metylacji i acetylacji histonów, jak również bezpośrednią modyfikację stanu metylacji DNA (przeгляд przedstawiają Florean i wsp. [98]). Badano możliwość zastosowania czynników demetylujących jako terapeutyków. Przykładowo DAC indukuje apoptozę w komórkach CML. Towarzyszy temu indukcja aktywności kalpajny, białka o aktywności proteazy zaangażowanej w procesy, takie jak cykl komórkowy czy ruchliwość komórek, przy jednoczesnym osłabieniu działania białek antyapoptotycznych. Ponadto, synergistyczne zastosowanie DAC wraz z tradycyjnymi chemoterapeutykami lub inhibitorami HDAC prowadzi do silnego synergistycznego uwrażliwienia komórek na sygnały apoptotyczne [60].

W przypadku modyfikacji histonów jednym z obiecujących kierunków jest zastosowanie inhibitorów aktywności HDAC. Do użytku w terapii antynowotworowej dopuszczono już

Varinostat. Jest to związek wiążący się z miejscem aktywnym HDAC, co skutkuje akumulacją acetylowanych białek, w tym histonów, oraz odblokowaniem ekspresji wielu genów, w tym odpowiedzialnych za prawidłowe różnicowanie się komórek [103]. Z kolei fenylomaślan sodu wykazuje toksyczność wobec komórek białaczkowych przy ogólnej niskiej toksyczności nawet po długotrwałym stosowaniu, przejawia także zdolność wspomagania indukcji różnicowania się komórek, co czyni go obiecującym kandydatem na lek wspomagający w terapiach CML [104]. Synergistyczne współdziałanie terapeutyków wydaje się być istotnym elementem w planowaniu terapii wykorzystujących regulację epigenetyczną. Jednoczesne zastosowanie panobinostat, inhibitora HDAC, z DZNep, inhibitorem HMT chroniącym przed metylacją H3K27 pozwoliło uzyskać selektywną apoptozę komórek AML, pozostawiając komórki progenitorowe CD34+, zaś efekty opisanej wcześniej terapii APL z użyciem RA mogą być znacząco wzmocnione dzięki synergistycznemu zastosowaniu tranilcyprominy, inhibitora demetylaz histonów LSD1 i LSD2 [105, 106].

Kolejnym obiecującym kierunkiem jest użycie związków wpływających na odczyt kodu histonowego, takich jak inhibitory bromodomen. Niedawno otrzymane wyniki sugerują, że niektóre z tych inhibitorów mogą być skuteczne w leczeniu różnych nowotworów, w tym AML (przegląd u Cowaya [107]).

Podsumowanie

Tradycyjne wyjaśnienia genezy białaczek skupiały się na przyczynach natury genetycznej obejmujących takie zjawiska, jak mutacje punktowe, delecje i rearanżacje chromosomowe, prowadzące do indukcji patologicznych, proliferacyjnych szlaków sygnałowych lub blokady prawidłowych procesów różnicowania się komórek hematopoetycznych. W ostatnich latach zwrócono jednak uwagę, że wiele zjawisk związanych z etiologią białaczek jest powiązanych z procesami regulacji epigenetycznej. Przebieg choroby, jak i przewidywany efekt terapii może zależeć od takich zjawisk jak zaburzona metylacja DNA, nieprawidłowa aktywność enzymów modyfikujących histony czy zmienione profile aktywności miRNA. Większość mechanizmów, dzięki którym różne aspekty nowotworzenia znajdują się pod kontrolą epigenetyczną, jest wciąż nieznaną i wymaga dalszych wyjaśnień. Jednak już teraz badania tych procesów pozwoliły na lepsze zrozumienie wielu aspektów rozwoju choroby, a także mechanizmów działania terapii jak i nabywania lekooporności. Rola mechanizmów epigenetycznych pozwala także żywić nadzieję na opracowanie nowych, efektywnych form terapii wpływających na procesy, takie jak metylacja DNA czy modyfikacje histonów i remodelowanie chromatyny.

Wkład autorów/Authors' contributions

Według kolejności.

Konflikt interesu/Conflict of interest

Nie występuje.

Finansowanie/Financial support

Praca realizowana w ramach Grantu Narodowego Centrum Nauki nr 2001/03/B/NZ2/01396.

Etyka/Ethics

Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

Badania własne zostały przeprowadzone zgodnie z zasadami Dobrej Praktyki Klinicznej i zaakceptowane przez lokalną Komisję Bioetyki, a ich uczestnicy wyrazili pisemną zgodę na udział.

PIŚMIENNICTWO / REFERENCES

- [1] Tefferi A, Thiele J, Vardiman JW. The 2008 World Health Organization classification system for myeloproliferative neoplasms: order out of chaos. *Cancer* 2009;115: 3842–3847.
- [2] Sattler M, Salgia R. Activation of hematopoietic growth factor signal transduction pathways by the human oncogene BCR/ABL. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997;8:63–79.
- [3] Perrotti D, Jamieson C, Goldman J, et al. Chronic myeloid leukemia: mechanisms of blastic transformation. *J Clin Invest* 2010;120:2254–2264.
- [4] Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009;114:937–951.
- [5] Martens JHA, Stunnenberg HG. The molecular signature of oncofusion proteins in acute myeloid leukemia. *FEBS Letters* 2010;584:2662–2669.
- [6] Pui C-H, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2008;371:1030–1043.
- [7] Holliday R. Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics* 2006;1:76–80.
- [8] Tollervy J, Lunyak VV. Epigenetics: Judge, jury and executioner of stem cell fate. *Epigenetics* 2012;7:823–840.
- [9] Artyomov MN, Meissner A, Chakraborty AK. A model for genetic and epigenetic regulatory networks identifies rare pathways for transcription factor induced pluripotency. *PLoS Comput Biol* 2010;6:e1000785.
- [10] Yan J, Zierath JR, Barrès R. Evidence for non-CpG methylation in mammals. *Exp Cell Res* 2011;317: 2555–2561.
- [11] Wilkins JF. Genomic imprinting and methylation: epigenetic canalization and conflict. *Trends Genet* 2005;21:356–365.
- [12] Watt F, Molloy PL. Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev* 1988;2:1136–1143.
- [13] Boyes J, Bird A. DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein. *Cell* 1991;64:1123–1134.
- [14] Takebayashi S-I, Tamura T, Matsuoka C, et al. Major and essential role for the DNA methylation mark in mouse embryogenesis and stable association of DNMT1 with newly replicated regions. *Mol Cell Biol* 2007;27:8243–8258.

- [15] Ichiyanagi K, Li Y, Watanabe T, et al. Locus- and domain-dependent control of DNA methylation at mouse B1 retrotransposons during male germ cell development. *Genome Res* 2011;21:2058–2066.
- [16] Basu R, Zhang L-F. X chromosome inactivation: a silence that needs to be broken. *Genesis* 2011;49:821–834.
- [17] Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 2009;324:930–935.
- [18] Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell* 2007;128:693–705.
- [19] Vettese-Dadey M, Grant PA, Hebbes TR, et al. Acetylation of histone H4 plays a primary role in enhancing transcription factor binding to nucleosomal DNA *in vitro*. *EMBO J* 1996;15:2508–2518.
- [20] Hublitz P, Albert M, Peters AHFM: Mechanisms of transcriptional repression by histone lysine methylation. *Int J Dev Biol* 2009;53:335–354.
- [21] Di Lorenzo A, Bedford MT. Histone arginine methylation. *FEBS Letters* 2011;585:2024–2031.
- [22] Sterner DE, Berger SL. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000;64:435–459.
- [23] Hildmann C, Riester D, Schwienhorst A. Histone deacetylases—an important class of cellular regulators with a variety of functions. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007;75:487–497.
- [24] Choudhary C, Kumar C, Gnad F, et al. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* 2009;325:834–840.
- [25] Lee JY, Lee T-H. Effects of histone acetylation and CpG methylation on the structure of nucleosomes. *Biochim Biophys Acta* 2012;1824:974–982.
- [26] Annunziato AT, Eason MB, Perry CA. Relationship between methylation and acetylation of arginine-rich histones in cycling and arrested HeLa cells. *Biochemistry* 1995;34:2916–2924.
- [27] Wang Y, Fischle W, Cheung W, et al. Beyond the double helix: writing and reading the histone code. *Novartis Found Symp* 2004;259:3–17.
- [28] Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature* 2007;447:396–398.
- [29] Bantignies F, Cavalli G. Polycomb group proteins: repression in 3D. *Trends Genet* 2011;27:454–464.
- [30] Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adélaïde J, et al. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2009;145:788–800.
- [31] Hekimoglu B, Ringrose L. Non-coding RNAs in polycomb/trithorax regulation. *RNA Biol* 2009;6:129–137.
- [32] Wienholds E, Plasterk RHA. MicroRNA function in animal development. *FEBS Letters* 2005;579:5911–5922.
- [33] Stefani G, Slack FJ. Small non-coding RNAs in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:219–230.
- [34] Iorio MV, Croce CM. microRNA involvement in human cancer. *Carcinogenesis* 2012;33:1126–1133.
- [35] Gonzalgo ML, Jones PA. Mutagenic and epigenetic effects of DNA methylation. *Mutat Res* 1997;386:107–118.
- [36] Chen T, Hevi S, Gay F, et al. Complete inactivation of DNMT1 leads to mitotic catastrophe in human cancer cells. *Nat Genet* 2007;39:391–396.
- [37] Foltankova V, Legartova S, Kozubek S, et al. Tumor-specific histone signature and DNA methylation in multiple myeloma and leukemia cells. *Neoplasia* 2012;59:450–462.
- [38] Dunwell TL, Hesson LB, Pavlova T, et al. Epigenetic analysis of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Epigenetics* 2009;4:185–193.
- [39] Strathdee G, Holyoake TL, Sim A, et al. Inactivation of HOXA genes by hypermethylation in myeloid and lymphoid malignancy is frequent and associated with poor prognosis. *Clin Cancer Res* 2007;13:5048–5055.
- [40] Figueroa ME, Lugthart S, Li Y, et al. DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2010;17:13–27.
- [41] 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* 2001;97:1172–1179.
- [42] Tefferi A. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. *Leukemia* 2010;24:1128–1138.
- [43] Fathi AT, Abdel-Wahab O. Mutations in epigenetic modifiers in myeloid malignancies and the prospect of novel epigenetic-targeted therapy. *Adv Hematol* 2012;2012:469592.
- [44] Issa JP, Zehnbaauer BA, Kaufmann SH, et al. HIC1 hypermethylation is a late event in hematopoietic neoplasms. *Cancer Res* 1997;57:1678–1681.
- [45] Cameron EE, Baylin SB, Herman JG. p15(INK4B) CpG island methylation in primary acute leukemia is heterogeneous and suggests density as a critical factor for transcriptional silencing. *Blood* 1999;94:2445–2451.
- [46] Wong IH, Ng MH, Huang DP, et al. Aberrant p15 promoter methylation in adult and childhood acute leukemias of nearly all morphologic subtypes: potential prognostic implications. *Blood* 2000;95:1942–1949.
- [47] Román-Gómez J, Castillejo JA, Jimenez A, et al. 5' CpG island hypermethylation is associated with transcriptional silencing of the p21(CIP1/WAF1/SD11) gene and confers poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;99:2291–2296.
- [48] Roman J, Castillejo JA, Jimenez A, et al. Hypermethylation of the calcitonin gene in acute lymphoblastic leukaemia is associated with unfavourable clinical outcome. *Br J Haematol* 2001;113:329–338.
- [49] Corcoran M, Parker A, Orchard J, et al. ZAP-70 methylation status is associated with ZAP-70 expression status in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2005;90:1078–1088.
- [50] Raval A, Lucas DM, Matkovic JJ, et al. TWIST2 demonstrates differential methylation in immunoglobulin variable heavy chain mutated and unmethylated chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2005;23:3877–3885.
- [51] Montiel-Duarte C, Cordeu L, Agirre X, et al. Resistance to Imatinib Mesylate-induced apoptosis in acute lymphoblastic leukemia is associated with PTEN down-regulation due to promoter hypermethylation. *Leuk Res* 2008;32:709–716.
- [52] Watt PM, Kumar R, Kees UR. Promoter demethylation accompanies reactivation of the HOX11 proto-oncogene in leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;29:371–377.
- [53] Asimakopoulos FA, Shteper PJ, Krichevsky S, et al. ABL1 methylation is a distinct molecular event associated with clonal evolution of chronic myeloid leukemia. *Blood* 1999;94:2452–2460.
- [54] Mills KI, Guinn BA, Walsh VA, et al. Increasing methylation of the calcitonin gene during disease progression in sequential samples from CML patients. *Leuk Res* 1996;20:771–775.
- [55] Issa JP, Zehnbaauer BA, Civin CI, et al. The estrogen receptor CpG island is methylated in most hematopoietic neoplasms. *Cancer Res* 1996;56:973–977.
- [56] Randhawa GS, Cui H, Barletta JA, et al. Loss of imprinting in disease progression in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1998;91:3144–3147.

- [57] Yang H, Liang H, Yan J-S, et al. Down-regulation of hematopoiesis master regulator PU.1 via aberrant methylation in chronic myeloid leukemia. *Int J Hematol* 2012;96:65-73.
- [58] Román-Gómez J, Jiménez-Velasco A, Agirre X, et al. Promoter hypomethylation of the LINE-1 retrotransposable elements activates sense/antisense transcription and marks the progression of chronic myeloid leukemia. *Oncogene* 2005;24:7213-7223.
- [59] Rogers SL, Zhao Y, Jiang X, et al. Expression of the leukemic prognostic marker CD7 is linked to epigenetic modifications in chronic myeloid leukemia. *Mol Cancer* 2010;9:41.
- [60] Schnekenburger M, Grandjenette C, Ghelfi J, et al. Sustained exposure to the DNA demethylating agent, 2'-deoxy-5-azacytidine, leads to apoptotic cell death in chronic myeloid leukemia by promoting differentiation, senescence, and autophagy. *Biochem Pharmacol* 2011;81:364-378.
- [61] San José-Eneriz E, Agirre X, Jiménez-Velasco A, et al. Epigenetic down-regulation of BIM expression is associated with reduced optimal responses to imatinib treatment in chronic myeloid leukaemia. *Eur J Cancer* 2009;45:1877-1889.
- [62] Narducci MG, Pescarmona E, Lazzeri C, et al. Regulation of TCL1 expression in B- and T-cell lymphomas and reactive lymphoid tissues. *Cancer Res* 2000;60:2095-2100.
- [63] Vockentanz L, Bröske A-M, Rosenbauer F. Uncovering a unique role for DNA methylation in hematopoietic and leukemic stem cells. *Cell Cycle* 2010;9:640-641.
- [64] Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 2007;8:286-298.
- [65] Hess JL. MLL: a histone methyltransferase disrupted in leukemia. *Trends Mol Med* 2004;10:500-507.
- [66] Okada Y, Feng Q, Lin Y, et al. hDOT1L links histone methylation to leukemogenesis. *Cell* 2005;121:167-178.
- [67] Krivtsov AV, Feng Z, Lemieux ME, et al. H3K79 methylation profiles define murine and human MLL-AF4 leukemias. *Cancer Cell* 2008;14:355-368.
- [68] Chang M-J, Wu H, Achille NJ, et al. Histone H3 lysine 79 methyltransferase Dot1 is required for immortalization by MLL oncogenes. *Cancer Res* 2010;70:10234-10242.
- [69] Wang GG, Cai L, Pasillas MP, et al. NUP98-NSD1 links H3K36 methylation to Hox-A gene activation and leukaemogenesis. *Nat Cell Biol* 2007;9:804-812.
- [70] Kuzmichev A, Jenuwein T, Tempst P, et al. Different EZH2-containing complexes target methylation of histone H1 or nucleosomal histone H3. *Mol Cell* 2004;14:183-193.
- [71] Ernst T, Chase AJ, Score J, et al. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet* 2010;42:722-726.
- [72] He J, Nguyen AT, Zhang Y. KDM2b/JHDM1b, an H3K36me2-specific demethylase, is required for initiation and maintenance of acute myeloid leukemia. *Blood* 2011;117:3869-3880.
- [73] Marteau J-B, Rigaud O, Brugat T, et al. Concomitant heterochromatinisation and down-regulation of gene expression unveils epigenetic silencing of RELB in an aggressive subset of chronic lymphocytic leukemia in males. *BMC Med Genomics* 2010;3:53.
- [74] Advani AS, Gibson SE, Douglas E, et al. Histone H4 acetylation by immunohistochemistry and prognosis in newly diagnosed adult acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients. *BMC Cancer* 2010;10:387.
- [75] Rozman M, Camós M, Colomer D, et al. Type I MOZ/CBP (MYST3/CREBBP) is the most common chimeric transcript in acute myeloid leukemia with t(8;16)(p11;p13) translocation. *Genes Chromosomes Cancer* 2004;40:140-145.
- [76] Deguchi K, Ayton PM, Carapeti M, et al. MOZ-TIF2-induced acute myeloid leukemia requires the MOZ nucleosome binding motif and TIF2-mediated recruitment of CBP. *Cancer Cell* 2003;3:259-271.
- [77] Martens JHA, Brinkman AB, Simmer F, et al. PML-RARalpha/RXR Alters the Epigenetic Landscape in Acute Promyelocytic Leukemia. *Cancer Cell* 2010;17:173-185.
- [78] Di Croce L, Raker VA, Corsaro M, et al. Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science* 2002;295:1079-1082.
- [79] Minucci S, Nervi C, Coco Lo F, et al. Histone deacetylases: a common molecular target for differentiation treatment of acute myeloid leukemias? *Oncogene* 2001;20:3110-3115.
- [80] Mandelli FF, Diverio DD, Avvisati GG, et al., Gruppo Italiano-Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto and Associazione Italiana di Ematologia ed Oncologia Pediatrica Cooperative Groups. Molecular remission in PML/RAR alpha-positive acute promyelocytic leukemia by combined all-trans retinoic acid and idarubicin (AIDA) therapy. *Blood* 1997;90:1014-1021.
- [81] Wang L, Gural A, Sun X-J, et al. The leukemogenicity of AML1-ETO is dependent on site-specific lysine acetylation. *Science* 2011;333:765-769.
- [82] Tickenbrock L, Klein H-U, Trento C, et al. Increased HDAC1 deposition at hematopoietic promoters in AML and its association with patient survival. *Leuk Res* 2011;35:620-625.
- [83] Bradbury CA, Khanim FL, Hayden R, et al. Histone deacetylases in acute myeloid leukaemia show a distinctive pattern of expression that changes selectively in response to deacetylase inhibitors. *Leukemia* 2005;19:1751-1759.
- [84] Moreno DA, Scrideli CA, Cortez MAA, et al. Differential expression of HDAC3 HDAC7 and HDAC9 is associated with prognosis and survival in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2010;150:665-673.
- [85] Winter J, Diederichs S. MicroRNA biogenesis and cancer. *Methods Mol Biol* 2011;676:3-22.
- [86] Barbarotto E, Schmittgen TD, Calin GA. MicroRNAs and cancer: profile, profile, profile. *Int J Cancer* 2008;122:969-977.
- [87] Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:15524-15529.
- [88] Zhao H, Wang D, Du W, et al. MicroRNA and leukemia: tiny molecule, great function. *Crit Rev Oncol Hematol* 2010;74:149-155.
- [89] Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005;353:1793-1801.
- [90] Ricci F, Tedeschi A, Morra E, et al. Fludarabine in the treatment of chronic lymphocytic leukemia: a review. *Ther Clin Risk Manag* 2009;5:187-207.
- [91] Moussay E, Palissot V, Vallar L, et al. Determination of genes and microRNAs involved in the resistance to fludarabine *in vivo* in chronic lymphocytic leukemia. *Mol Cancer* 2010;9:115.
- [92] Rossi S, Shimizu M, Barbarotto E, et al. microRNA fingerprinting of CLL patients with chromosome 17p deletion identify a miR-21 score that stratifies early survival. *Blood* 2010;116:945-952.
- [93] Stamatopoulos B, Meuleman N, Haibe-Kains B, et al. microRNA-29c and microRNA-223 down-regulation has *in vivo* significance in chronic lymphocytic leukemia

- and improves disease risk stratification. *Blood* 2009;113:5237-5245.
- [94] Venturini L, Battmer K, Castoldi M, et al. Expression of the miR-17-92 polycistron in chronic myeloid leukemia (CML) CD34+ cells. *Blood* 2007;109:4399-4405.
- [95] Bueno MJ, Pérez de Castro I, Gómez de Cedrón M, et al. Genetic and epigenetic silencing of microRNA-203 enhances ABL1 and BCR-ABL1 oncogene expression. *Cancer Cell* 2008;13:496-506.
- [96] Flamant S, Ritchie W, Guilhot J, et al. Micro-RNA response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 2010;95:1325-1333.
- [97] San José-Eneriz E, Román-Gómez J, Jiménez-Velasco A, et al. MicroRNA expression profiling in Imatinib-resistant Chronic Myeloid Leukemia patients without clinically significant ABL1-mutations. *Mol Cancer* 2009;8:69.
- [98] Florean C, Schnekenburger M, Grandjette C, et al. Epigenomics of leukemia: from mechanisms to therapeutic applications. *Epigenomics* 2011;3:581-609.
- [99] Li Z, Lu J, Sun M, et al. Distinct microRNA expression profiles in acute myeloid leukemia with common translocations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:15535-15540.
- [100] Marcucci G, Radmacher MD, Maharry K, et al. MicroRNA expression in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2008;358:1919-1928.
- [101] Schotte D, De Menezes RX, Moqadam FA, et al. MicroRNA characterize genetic diversity and drug resistance in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2011;96:703-711.
- [102] Garzon R, Pichiorri F, Palumbo T, et al. MicroRNA gene expression during retinoic acid-induced differentiation of human acute promyelocytic leukemia. *Oncogene* 2007;26:4148-4157.
- [103] Richon VM. Cancer biology: mechanism of antitumour action of vorinostat. *Br J Cancer* 2006;95:S2-S6.
- [104] Gore SD, Weng L-J, Figg WD, et al. Impact of prolonged infusions of the putative differentiating agent sodium phenylbutyrate on myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2002;8:963-970.
- [105] Fiskus W, Wang Y, Sreekumar A, et al. Combined epigenetic therapy with the histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A and the histone deacetylase inhibitor panobinostat against human AML cells. *Blood* 2009;114:2733-2743.
- [106] Binda C, Valente S, Romanenghi M, et al. Biochemical, structural, and biological evaluation of tranlycypromine derivatives as inhibitors of histone demethylases LSD1 and LSD2. *J Am Chem Soc* 2010;132:6827-6833.
- [107] Conway SJ. Bromodomains: Are Readers Right for Epigenetic Therapy? *ACS Med Chem Lett* 2012;3:691-694.