

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra genetiky a mikrobiologie

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Karolína Šeborová

Metylace DNA u hematologických onemocnění

DNA methylation in haematological malignancies

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce

Mgr. Monika Belíčková

Praha 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 13. 5. 2015

.....
Karolína Šeborová

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala především své školitelce Mgr. Monice Belíčkové za cenné připomínky, korekturu a věnovaný čas. Velké díky patří i mé rodině a přátelům za podporu ve všem, co dělám.

Abstrakt

Metylace DNA je jednou z nejčastějších epigenetických modifikací, při které dochází k přenosu metylové skupiny z donorové molekuly S-adenosyl-L-metioninu na 5' pozici cytosinu za vzniku 5-metylcytosinu. Tato reakce je katalyzována DNA metyltransferázami.

Epigenetická modifikace hraje důležitou roli v regulaci transkripce, genomovém imprintingu, inaktivaci X-chromozómu a vývoji organismu. Právě její role v regulaci transkripce je důležitá u nádorových onemocnění. Zejména její aberantní formou, hypermetylací, může docházet k umlčení transkripce tumor supresorových genů vedoucí k progresi nádorového onemocnění.

Klíčová slova: metylace DNA, demetylační léčba, hematologická onemocnění, metody detekce, myelodysplastický syndrom

Abstract

DNA methylation is one of the most common epigenetics modifications, during which a methyl group from the donor molecule S-adenosyl-L-methionine is transferred to the 5' position of the cytosine ring to create 5-methylcytosine. This reaction is catalyzed by DNA methyltransferases.

Epigenetics modification plays an important role in the regulation of the transcription, genomic imprinting, X-chromosome inactivation and the development of the organism. This role in the regulation of transcription is important for the cancer. Especially the aberrant forms, like hypermethylation, which leads to transcriptional silencing of the tumor suppressing genes leading to the tumor progression, or hypomethylation causing genomic instability.

Key words: DNA methylation, demethylating drugs, haematological malignancies, methods of detection, myelodysplastic syndrome

Obsah

Abstrakt	4
Abstract	4
Seznam zkratk	7
1 Úvod	9
2 Metylace DNA	10
2.1 CpG ostrůvky	10
2.2 DNA metyltransferázy	11
2.2.1 DNMT1 (DNA-methyltransferase 1)	11
2.2.2 DNMT3 metyltransferázy	12
2.2.3 DNMT2	13
2.3 Metylace DNA a její funkce	13
2.3.1 Represe transkripce	13
2.3.2 Genomový imprinting	14
2.3.3 Inaktivace X-chromozómu	14
2.3.4 Transponovatelné elementy	14
2.3.5 Vývoj organismu	14
2.4 Aberantní formy metylace DNA	15
2.4.1 Hypomethylace	15
2.4.2 Hypermethylace	15
2.5 Hydroxymethylace	16
3 Metylace DNA ve vztahu k hematooonkologickým malignitám	16
3.1 Tumor supresorové geny	17
3.1.1 FHIT	17
3.1.2 SOCS1	17
3.1.3 CTNNA1	18
3.1.4 p57 ^{KIP2}	18
3.1.5 DAPK	18
3.1.6 CDKN2B/ p15 ^{INK4B}	19
3.1.7 HIC1	19
3.1.8 ER	19
3.1.9 CDH1	20
3.1.10 CALC1	20
3.2 Mutace DNA metyltransferáz	20
3.2.1 DNMT3a	20

3.2.2 DNMT3b.....	21
3.2.3 Mutace TET2	21
4 Demetylační léčba	21
4.1 Nukleosidové inhibitory	22
4.1.1 5-azacytidin.....	22
4.1.2. 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine)	22
4.1.3 Zebularin	22
4.1.4 5-fluoro-2'-deoxycytidine (FdCyd)	23
4.2 Non-nukleosidové inhibitory	23
4.2.1 Procainamid	23
4.2.2 Hydralazin.....	23
4.2.3 RG108.....	24
4.2.4 Procaine.....	24
4.3 Demetylační léčba u MDS.....	24
5 Metody detekce	25
5.1 Sekvenčně nespecifické.....	25
5.1.1 HPLC (high performance liquid chromatography)	25
5.1.2 HPCE (high performance capillary electrophoresis)	25
5.1.3 MeDIP (Methylated DNA immunoprecipitation).....	25
5.2 Sekvenčně specifické metody.....	26
5.2.1 HELP assay (HpaII tiny fragment Enrichment by Ligation-mediated PCR).....	26
5.2.2 Metody založené na modifikaci sodium bisulfitem	26
5.2.3 Pyrosekvenování	27
6 Závěr.....	27
7 Seznam použité literatury.....	28
Seznam internetových zdrojů	41

Seznam zkratek

5-hmC	5-hydroxymethyl cytosin
5-mC	5-methylcytosin
A, C, T, G	Adenin, cytosin, thymin, guanin
AML	Akutní myeloidní leukémie
ATP	Adenosintrifosfát
bMLH1	Mismatch repair gene
CALC1	Calcitonin gene
CDH1	E-cadherin gene
CDKN2B/p15 ^{INK4b}	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B
CG dinukleotid	Cytosin-Guanin dinukleotid
CNS	Centrální nervová soustava
COBRA	Combined bisulfite restriction analysis
CpG ostrůvek	Cytosin – fosfát- guaninový ostrůvek
CTF	CTF transkripční faktor
CTNNA1	Catenin (cadherin-associated protein), α 1
DAPK	Death-associated protein kinase
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Nukleotidtrifosfáty
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DNMT	DNA methyl transferase
E2F	E2F transkripční faktor
ER	Estrogen receptor
FHIT	Fragile histidine triad
HDAC1	Histone deacetylase 1
HIC1	Hypermethylated in cancer 1
HpaII, MspI	Restrikční endonukleázy
HPCE	Vysokoúčinná kapilární elektroforéza
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
CHK2	Checkpoint kinase 2

ICF	Immunodeficiency, Centromere instability and Facial anomalies syndrome
IPSS	International Prognostic Scoring System
MDS	Myelodysplastický syndrom
MeCP-1, MeCP-2	Methyl-CpG-binding domain protein 1-2
MeDip	Methylated DNA immunoprecipitation
MSP	Methylation-specific PCR
p57 ^{kip2}	Cyklin-dependent kinase inhibitor
PCR	Polymerase chain reaction
PPi	Pyrofosfát
RaRb	Retinoic acid receptor, beta
Rb gen	Retinoblastomový gen
RNA	Ribonukleová kyselina
SAM	S-adenosyl-L-methionin
SOCS1	Suppressor of cytokine signaling 1
Sp1	Sp1 transkripční faktor
Tet protein	Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase
TSGs	Tumor supresorové geny
WT1 gen	Wilms tumor 1 gene
Xist	X-inactive specific transcript

1 Úvod

Náplní této práce je podat všeobecný a ucelený náhled na roli metylace DNA v mnoha procesech, s důrazem na její funkci v regulaci transkripce, která má roli v patogenezi hematologických onemocnění. Práce se dále věnuje vybraným příkladům aberantní metylace DNA u tumor supresorových genů v hematologických malignitách a možnostem její detekce. Nejvíce prostoru je věnováno výskytu aberantní metylace DNA u myelodysplastického syndromu, a to z důvodu budoucího zaměření mé vědecké práce. Závěr je věnován hypometylačním agentům používaným při demetylační léčbě.

Metylace je proces, při němž dochází k přenosu $-CH_3$ skupiny z donorové molekuly S-adenosyl-L-metioninu na 5' C cytosinu za katalýzy DNA metyltransferázami. Je jednou z nejstudovanějších epigenetických modifikací v patogenezi nádorových onemocnění. Právě metylace DNA a její aberantní modifikace hrají důležitou roli ve vzniku nádorů. Zejména hypermetylací CpG ostrůvků v promotorových oblastech tumor supresorových genů (TSGs) dochází k inhibici jejich transkripce, a tím často k progresi nádorového onemocnění.

Hypermetylované TSGs se používají jako upřesňující prognostické faktory při určení stádia nemoci. Tyto umlčené geny mají vliv na dobu přežití pacienta a vývoj nemoci. Proces metylace je reverzibilní, a právě na této skutečnosti je založena tzv. demetylační léčba, při které hypometylační látky obnovují transkripční aktivitu umlčených genů. V této práci je uveden přehled vybraných hypometylačních látek a jejich funkcí v rámci demetylační léčby.

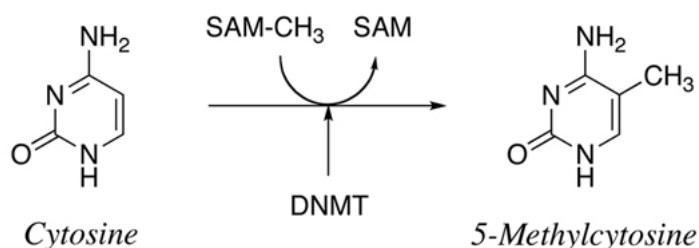
Poslední část práce obsahuje přehled vybraných a nepoužívanějších metod detekce metylace DNA. Metod detekce je mnoho variant a stále se vyvíjejí nové. Díky velkému množství metod je vždy možné zvolit tu nejvhodnější. Mezi nepoužívanější metody pro detekci metylace DNA patří metody založené na bisulfitové konverzi a metylačně-specifická PCR.

2 Metylace DNA

Metylace DNA je kovalentní a vysoce konzervovaná modifikace, která spočívá v přenosu metylové skupiny do 5' pozice pyrimidinového kruhu cytosinu v CG dinukleotidu (Razin et al., 1980). Donorem metylové skupiny pro metylaci je S-adenosyl-L-metionin (SAM) (Chiang et al., 1996). Metylová skupina je přenesena DNA-metyltransferázou za vzniku 5-metylcytosinu (5-mC). Metylace DNA probíhá krátce po replikaci DNA (Razin et al., 1977). Přítomnost 5 - metylcytosinu byla poprvé prokázána pomocí papírové chromatografie v roce 1948 v thymu (Hotchkiss et al., 1948).

Metylace DNA se dá rozdělit do dvou kategorií: *de novo metylace*, která probíhá na dosud nemodifikovaných vláknech DNA za katalýzy DNMT3a a DNMT3b, nebo *udržovací metylace*, která obnovuje metylační vzorec při dělení buněk v návaznosti na replikaci DNA a je katalyzována DNMT1.

V DNA se tedy kromě běžných bází jako adenin (A), thymin (T), cytosin (C) a guanin (G) vyskytuje i modifikovaná báze, 5 – metylcytosin,



Obr.1 – Schéma metylace DNA, kdy dochází k přenosu $-CH_3$ skupiny z SAM na 5' pozici cytosinu za vzniku 5-metylcytosinu. Reakce je katalyzována DNMT.
(Převzato z http://www-medchem.ch.cam.ac.uk/lab_rotations/murrell.php)

2.1 CpG ostrůvky

CG dinukleotidy se v genomu shromažďují v malých úsecích DNA, zvaných CpG ostrůvky, které dosahují velikosti 0,5-5kb. Na 100kb genomu se vyskytuje přibližně 5 až 10 CpG ostrůvků (Bird, 1995). Tyto úseky jsou bohaté na dinukleotidy CG, které tvoří 60-70 % obsahu úseku (Baylin et al., 1998). CpG ostrůvky se hojně vyskytují na 5' konci genu (Antequera et al., 1993). Většina CpG ostrůvků ztratila schopnost konverze pomocí deaminace 5-metylcytosinu na thymin (Bird et al., 1980).

I přes velkou úroveň metylace dinukleotidů zůstávají v genomu nemetylované úseky (Gruenbaum et al., 1981). Celkový obsah metylovaných CpG ostrůvků se v genomu pohybuje

mezi 60 - 90 % (Bird, 1980). Eukaryotický genom není metylován rovnoměrně, ale obsahuje metylované úseky, které se střídají s nemetylovanými úseky (Bird, 1986). Během evoluce je počet CpG dinukleotidů progresivně eliminován (Antequera et al., 1993).

V lidském genomu se nachází okolo 32 % CpG ostrůvků z původní predikce 45 000 CpG ostrůvků na haploidní genom (Antequera et al., 1993), což je tedy asi 29 000 CpG ostrůvků na genom (Lander et al., 2001). Z celkové počtu genů v genomu se přibližně v polovině nacházejí CpG ostrůvky (Antequera et al., 1993).

Úroveň metylace DNA je lineárně závislá na počtu CpG ostrůvků v DNA a je také tkáňově specifická (Gruenbaum et al., 1981).

2.2 DNA metyltransferázy

DNA metyltransferázy katalyzují přenos metylové skupiny z donoru S-adenosyl-L-methioninu (SAM) na akceptor cytosin. DNA metylace probíhá po replikaci DNA (Razin et al., 1977). DNA metyltransferázy se dělí na: de novo metyltransferázy (DNMT3 rodina, DNMT3L) a udržovací metyltransferázy (DNMT1 a DNMT2).

2.2.1 DNMT1 (DNA-methyltransferase 1)

DNMT1 je enzym skládající se z 1620 aminokyselinových zbytků (Gaudet et al., 1998). C-terminální doména má katalytickou funkci (Bestor et al., 1988). Katalytická doména je alostericky kontrolována N-terminální doménou (Fatemi et al., 2001). N-terminální doména se skládá z enzymů obsahujících jaderný lokalizační signál (Bestor et al., 1994) a oblasti, která enzym směřuje do míst, kde probíhá replikace (Leonhardt et al., 1992). N-terminální doména obsahuje dále zinc-binding doménu typu CXXC zinc-finger. Zinc-finger se skládá z 8 konzervovaných cysteinových zbytků, které se vážou do zinc (L.S.-H.Chuang et al., 1996). N-terminální doména interaguje např. s histonovou deacetylázou HDAC1 či Rb tumor supresorovým proteinem (Robertson et al., 2000).

DNMT1 je alostericky aktivována k metylaci cílových úseků tím, že se naváže na metylovanou DNA. Alostericky aktivní je zinc-doména, která zprostředkovává přímou interakci protein-protein s katalytickou doménou enzymu (Fatemi et al., 2001).

Je zodpovědná za udržování DNA metylace během replikace DNA. Při replikaci se vytváří hemimetylované úseky, které jsou preferovány DNMT1 a přenášejí metylační vzorec pouze na nově syntetizovaná vlákna DNA (Song et al., 2011).

Také se účastní kontroly buněčného cyklu (Bakin et al., 1999), p53 řízenou apoptózou (Stancheva et al., 2001) či inhibicí replikace DNA (Knox et al., 2000).

2.2.2 DNMT3 metyltransferázy

DNMT3 metyltransferázy byly objeveny roku 1998. Jsou hodně exprimovány v zárodečných tkáních, zatímco u diferencovaných buněk je hladina exprese nízká. Podílejí se na de novo metylaci a nepreferují hemimetylované úseky DNA jako DNMT1 (Okano et al., 1998). DNMT3a a DNMT3b si jsou velice podobné, ale liší se cílovými specifikacemi a vzory pro expresi (Watanabe et al., 2002).

DNMT3a i DNMT3b obsahují cystein bohatý region, který je podobný ATRX zinc-finger doméně. Dále mají PWWP doménu¹, která interaguje s chromatinem za možnosti vazby transkripčních represorů (Qiu et al., 2002).

2.2.2.1 DNMT3a (DNA-methyltransferase 3 alpha)

DNMT3a je exprimována v pozdějším stádiu embryonálního vývoje a v diferencovaných buňkách. Je zodpovědná zejména za ustanovení metylačního vzorce během dospívání gamet (Kaneda et al., 2004). Cystein bohatý region homologní ATRX na N-terminální doméně asociuje s histonovou deacetylázou HDAC1 (Fuks et al., 2001).

DNMT3a interaguje s RP58, DNA-vázaným transkripčním represorem, který umlčuje heterochromatin (Fuks et al., 2001).

2.2.2.2 DNMT3b (DNA-methyltransferase 3 beta)

V brzkém embryonálním vývoji je vyšší hladina exprese DNMT3b. Je to hlavní enzym, zodpovědný za získávání DNA metylace během implantace (Borgel et al., 2010). U mnoha nádorových onemocnění byla prokázána zvýšená exprese DNMT3b a korelace mezi zvyšující se expresí a postupem nemoci (Robertson et al., 1999).

2.2.2.3 DNMT3L (DNA-methyltransferase 3-like)

DNMT3L je sekvenčně příbuzný k DNMT3a a DNMT3b, ale nemá funkční katalytickou doménu. Díky nefunkční katalytické doméně nemá vlastní DNA metyltransferázovou aktivitu a metylaci reguluje pomocí interakce s DNMT3a a DNMT3b. Váže se s nimi v jádře buněk. Jako kofaktor s DNMT3a/DNMT3b stimuluje de novo metylaci. Také je důležitá pro založení metylačního vzorce v oocytech (Hata et al., 2002).

¹ PWWP doména je konzervovaná doména, složená z prolin-tryptofan-tryptofan-prolin (Stec et al., 1998).

2.2.3 DNMT2

DNMT2 je exprimována pouze v buňkách a tkáních, které jsou aktivní v de novo metylaci. Skládá se z 391 aminokyselinových zbytků. Má nedostatek velkých N-terminálních domén, které jsou přítomné v DNMT1 a DNMT3 rodině metyltransferáz (Yoder et al., 1998).

2.3 Metylace DNA a její funkce

2.3.1 Represe transkripce

Metylace CG míst v promotorech genů vede k represí transkripce, která je příčinou redukce exprese genů. Represe genové exprese se dá rozdělit do tří skupin.

2.3.1.1 *Specifické transkripční faktory*

Přerušení transkripce je možné pomocí specifických transkripčních faktorů, z nichž jsou některé citlivé na metylované CG úseky na vlákne DNA, na které se váží. Tímto dojde k přerušení iniciace transkripce daného vlákna úseku, protože tyto specifické transkripční faktory se do těchto míst nemohou vázat.

Mezi tyto specifické transkripční faktory patří například AP-2 (Comb, 1990), cAMP dependentní aktivátor CREB (Iguchi-Arigo et al., 1989), c-Myc/Myn (Prendergas et al., 1991) nebo E2F rozpoznávající sekvence obsahující CpG místa (Kovesdi et al., 1987). Ne všechny transkripční faktory jsou ale citlivé na metylované promotory, jako Sp1 a CTF (Ben-Hattar et al., 1989).

2.3.1.2 *Metyl CpG vázající proteiny*

Metylace posiluje 5-metylcytosin ve vazbě proteinů, aby se chovaly jako genové represory. MeCP-1 a MeCP-2 (methyl CpG binding protein 1/ 2) byly identifikovány jako proteiny vázající se na metylové CpG místa. (Boyes et al., 1991).

MeCP-1 se váže na DNA, která obsahuje několikanásobné množství symetrických metylovaných CpG míst (Meehan et al., 1989). MeCP-1 po navázání inhibuje transkripci, ale buňky, kde se MeCP-1 nevyskytuje, vykazují sníženou represí metylovaných genů (Boyes et al., 1991). MeCP-1 může vytvářet komplexy s MBD2 doménou, histonovou deacetylázou HDAC1/HDAC2 za zvýšení funkčnosti represe (Feng et al., 2001).

MeCP-2 je schopen se vázat i na jednotlivé metylované CpG páry, na rozdíl od MeCP-1 (Lewis et al., 1992). Má dvě domény: metyl-CpG doménu a transkripční represivní doménu (TRD), která dokáže na dálku inhibovat transkripci z promotoru (Nan et al., 1997).

2.3.1.3 *Deacetylase histonů*

Metylace DNA spouští deacetylaci histonů, která indukuje kondenzaci chromatinu, vedoucí ke genové represi (shrnutí Kass et al., 1997).

2.3.2 Genomový imprinting

Geny nesou otisk od obou rodičů (paternitní i maternální). Při imprintingu je vtisk od jednoho rodiče imprintován, je utlumena jeho exprese na úkor vtisku od druhého rodiče.

Existují de novo metyltransferázy (DNMT3a, DNMT3L), které mohou vytvářet primární záznam imprintu při gametogenezi. Imprint poté udržovací metyltransferázy předávají při buněčném dělení. Metylace DNA u imprintingu zajišťuje specifickou značku k odlišení maternální a paternitní kopie chromozómu nebo funguje jako signál pro genovou expresi (shrnutí Delaval et al., 2004).

2.3.3 Inaktivace X-chromozómu

U savců mají samice dva chromozómy X, samci pak jeden chromozóm X. Kompenzace je zřízena inaktivací jednoho maternálního chromozómu X. O inaktivaci chromozómu X se rozhoduje už v brzké embryogenezi. Klíčovým regulátorem inaktivace je X-chromosome-inactivation centre (XIC), obsahující Xist, který je nutný pro inaktivaci a podílí se funkcí XIC (Avner et al., 2001). Metylace promotoru Xist je klíčová pro inaktivaci chromozómu X (Panning et al., 1996).

2.3.4 Transponovatelné elementy

Více než 40 % lidského genomu je tvořeno transponovatelnými elementy, jako jsou transpozony, retrotranspozony či částice virů. Jsou to krátké repetitivní sekvence DNA, bohaté na CG sekvence - ty jsou právě cílem metylace (Jeltsch, 2002 podle Smit et al., 1999).

Metylace CG sekvencí těchto elementů zabraňuje transkripci elementů, a tím atakům genomu a jejich pohybu po něm (Yoder et al., 1997).

2.3.5 Vývoj organismu

Myšlenka o ovlivňování vývoje organismu metylací DNA byla poprvé vyslovena v roce 1975 (Holliday et al., 1975). Role metylace DNA ve vývoji je stále studována.

DNA v oocytech a spermiích je metylována, ale po oplození je před prvním dělením otcovská DNA rychle demetylována a mateřská je demetylována až po prvním dělení. Demetylace je způsobena tím, že DNMT1 je jádrem exprimována až po prvním dělení.

Metylační vzorec je v této fázi udržován DNMT1o (specifická forma DNMT1). V pozdější fázi embryogeneze je metylace DNA obnovena de novo metyltransferázami DNMT3a a DNMT3b (shrnutí Smith et al., 2013), pokud nejsou na DNA navázány specifické proteiny, které zabraňují de novo metylaci DNA (Lin et al., 2001).

Pokud je umlčena DNMT1, embryonální kmenové buňky vykazují redukci metylace DNA a umřou po zahájení diferenciace. Umlčením DNMT3a dochází ke smrti myši po narození. Umlčením DNMT1 a DNMT3a u myši dochází ke smrti během časně embryogeneze zárodku (Li et al., 1992).

2.4 Aberantní formy metylace DNA

2.4.1 Hypometylace

Hypometylace je aberantní forma metylace DNA, dochází k nahrazení 5-metylcytosinu nemetylovanými cytosinovými zbytky. Poprvé byla popsána v roce 1983 (Feinberg et al., 1983). Může vznikat vypnutím DNMTs, což může mít za následek abnormality ve stavbě chromozómů a jejich nestabilitu (Dodge et al., 2005).

U pacientů s ICF syndromem (Immunodeficiency-centromeric instability-facial anomalies syndrome), který je způsoben mutací genu DNMT3b vedoucí k redukci její enzymatické aktivity a ovlivnění aktivity DNMT3L (Xie et al., 2006)

Globální hypometylací genomu nalézáme u pokročilých forem nádorového onemocnění. Hypometylace vede ke genomové nestabilitě a k dalším genetickým změnám a chromozomálními aberacím. Hypometylace DNA je spojena se zvýšenou genovou expresí protoonkogenů (Gaudet et al., 2003; Wilson et al., 2007).

Hypometylace také koreluje se změnami chromatinu, zejména tedy acetylací a trimetylací histonů (Fraga et al., 2005). Hypometylace roztroušených elementů a tandemových elementů zesiluje formaci tumorů (Gaudet et al., 2003).

2.4.2 Hypermetylace

Hypermetylace je proces opačný hypometylací, dochází ke zvýšení 5mC v genomu. Hypermetylace je zejména spojována s umlčováním transkripce tumor supresorových genů. Tuto myšlenku poprvé vyslovil (Herman et al., 1994).

U mnoha genů bylo prokázáno umlčení transkripce pomocí hypermetylace promotorových oblastí daných genů. Jednotlivé příklady této aberantní formy metylace DNA jsou ve 3. kapitole: Methylace DNA ve vztahu k hematologickým malignitám.

2.5 Hydroxymethylace

Hydroxymethylace je modifikace DNA, kdy je bázi 5-metylcytosin přidávána ještě hydroxylová skupina, též do 5' pozice pyramidového kruhu. Vzniká tak 5-hydroxymetylcytosin (5-hmC), který byl poprvé identifikován u bakteriofágů (Wyatt et al., 1952). U savců byl poprvé identifikován v roce 1972 (Penn et al., 1972), ale potvrzení jejich objevu u savců bylo až v roce 2009, kdy byl lokalizován v Purkyňových buňkách lidského mozku (Kriaucionis et al., 2009) a zárodečných kmenových buňkách (Tahialini et al., 2009).

5-hydroxymetylcytosin je v největším množství lokalizován v centrální nervové soustavě (Globisch et al., 2010).

Hydroxymethylace 5-metylcytosinu je katalyzována rodinou Tet proteinů (ten-eleven methylcytosine dioxygenases); tyto proteiny katalyzují oxidaci 5-metylcytosinu na 5-hydroxymetylcytosin. U savců se vyskytují 3 Tet proteiny: Tet1, Tet2 a Tet3, které sdílejí stejnou konzervovanou cystein bohatou doménu (Ito et al., 2010).

Nejdiskutovanější rolí hydroxymethylace je její role v demethylaci DNA. Konverze 5-metylcytosinu na 5-hydroxymetylcytosin se podílí na pasivní demethylaci, protože DNMT1 není schopna se vázat na hydroxymetylované úseky a není tak možno předat metylační vzorec. Nebo může být 5-hydroxymetylcytosin konvertován na cytosin pomocí 5-hmC-specifickou DNA – glykolázou (5-hmC-DG), což vede k aktivní demethylaci DNA (shrnuto Zhu, 2009).

3 Methylace DNA ve vztahu k hematologickým malignitám

U nádorových onemocnění se úroveň metylace DNA pohybuje ve velkém rozmezí, od hypometylace, vedoucí ke chromozomální nestabilitě až k hypermethylaci, které má důležitou roli v umlčování transkripce tumor supresorových genů (TSGs) (Eden et al., 2003).

Skupina hematologických malignit je široká skupina onemocnění zahrnující leukémie, lymfomy, mnohonásobný lymfom, imunoproliferativní neoplazmy a v neposlední řadě i myeloproliferativní onemocnění a myelodysplastický syndrom.

Myelodysplastický syndrom (MDS) je heterogenní skupina chorob, charakterizovaná klonální poruchou krvetvorby a dysplasií kostní dřeně, vedoucí k neúčinné hematopoéze a zvýšenému riziku progresu myelodysplastického syndromu do akutní myeloidní leukémie (AML). (Steensma, D.P.; Tefferi, A.; 2003)

U myelodysplastického syndromu (MDS) byla prokázána inhibice transkripce tumor supresorových genů de novo metylací DNA (Jones et al., 2007). Inhibice transkripce spočívá ve specifické metylaci promotorů těchto genů. Mezi studované geny v patologii MDS patří geny podílející se na apoptóze (p73, survivin, DAPK), opravě DNA (bMLH1), kontrole buněčného cyklu (p14, p15, p16, CHK2) a diferenciaci (RARb, WT1). Aberantní metylace promotorů těchto genů a exprese DNMTs byly nalezeny u vysoce rizikového MDS. (Hopfer et al., 2009)

3.1 Tumor supresorové geny

3.1.1 FHIT

Ohta et al., 1996 poprvé izoloval FHIT gen (fragile histidine triad gene) z regionu chromozómu 3p14.2. Je to tumor supresorový gen, který inhibuje proliferaci nádorových buněk, zahajuje apoptózu a spouští přechod z G0 fáze do G1. Abnormální metylace tohoto genu byla nalezena u mnoha typů nádorů.

Ve studii Lin et al., 2008 identifikovali hypermetylací FHIT genu u 47,2 % pacientů s MDS. Objevili také vztah mezi frekvencí hypermetylace FHIT genu a zvýšeným rizikem v rámci prognostického systému (IPSS) MDS. Pacienti s hypermetylací FHIT genu vykazovali kratší dobu přežití, než pacienti bez aberantní metylace promotoru FHIT genu. Iwai et al., 2005 prokázali aberantní metylaci FHIT genu u 55 % pacientů s MDS. Podle jejich poznatků koreluje frekvence a hustota hypermetylace genu s postupným stádiem MDS, což vede k názoru, že hypermetylace FHIT genu se hromadí během progresu nemoci z MDS do AML.

3.1.2 SOCS1

SOCS1 (supresor of cytokine signalling-1) je supresor cytokinové signalizace, který se podílí na negativní regulaci JAK-STAT signalizace (Brakensiek et al., 2005 podle Alexander, 2002).

Ve studii Brakensiek et al., 2005 prokázali v 31% vzorků aberantní metylaci SOCS1 genu, jehož exprese tím byla umlčena. U pacientů s hypermetylací SOCS1 genu byla

prokázána zvýšená aktivita JAK-STAT dráhy. Největší metylační úroveň prokázali u RAEB podskupiny MDS a AML.

3.1.3 CTNNA1

CTNNA1 (alpha-catenin, α – catenin) je lokalizován na chromozómu 5q31, který je u MDS často deletován, a proto je exprimován v malém množství. Analýza HL – 60 buněk ukázala, že promotor genu CTNNA1 je umlčován metylací a deacetylací vedoucí k MDS či AML. Obnovení exprese CTNNA1 vede k omezené proliferaci a apoptotické smrti (Liu et al., 2007).

Ztráta exprese CTNNA1 genu se častěji vyskytuje u del(5q) typu MDS. Během analýzy 31 pacientů s MDS našli aberantní metylaci CTNNA1 genu u vysoce rizikového MDS, ale ne u nízko rizikového. Je možné, že metylace CTNNA1 je důležitá pro přechod MDS do AML (Ye et al., 2009).

3.1.4 p57^{KIP2}

Gen p57^{KIP2} (cyklin-dependent kinase inhibitor) je lokalizován na chromozómu 11p15.5 (Matsuoka et al., 1995). Li et al., 2002 prokázali nepřítomnost exprese genu p57^{KIP2} v různých krevních buněčných liniích a že po přidání 5-aza-2'-deoxycytidinu došlo k obnovení exprese genu. Pomocí metylačně-specifické PCR prokázali častý výskyt metylace DNA v primárních difúzních B-buněčných lymfomech, ale ne příliš častý výskyt u MDS.

V jedné studii sledovali 9 hematopoetických buněčných linií 67 pacientů s MDS a 11 kontrol. Metylaci genu p57^{KIP2} prokázali ve 4 z 9 buněčných linií, ale žádný vzorek nebyl aberantně metylovaný (Brakensiek et al., 2005).

3.1.5 DAPK

DAPK (death-associated protein kinase) je pro-apoptický kalcium/kalmodulin – regulační serin/threoninová kináza. První, kdo studoval metylační úroveň DAPK byl Voso et al., 2004. U 47 % pacientů s MDS a 27,5 % pacientů s AML identifikovali hypermetylací DAPK genu, která odpovídala ztrátě jeho exprese.

Hypermetylace DAPK byla spojena s cytogenetickými abnormalitami. Vyšší frekvenci hypermetylace našli v 60 % případů u nepříznivé cytogenetické rizikové skupiny, zatímco u příznivé rizikové skupiny to bylo v 26,3 % případů (Wu et al., 2011).

3.1.6 CDKN2B/p15^{INK4B}

CDKN2B je regulátor buněčného cyklu, zejména inhibitor G1 fáze. Spolupracuje s D-CDK4/6 komplexem a inhibuje tím kinázovou aktivitu komplexu (shrnuto v Reynisdóttir et al., 1997). Funguje také jako efektor při TGF- β zprostředkovaného zastavení buněčného cyklu (Sandhu et al., 1997 podle Hannon et al., 1994).

V několika studiích byla prokázána inaktivace genu metylací CpG ostrůvků v promotoru genu v ALL (Herman et al., 1996). Ve studii Quesnel et al., 1998 našli ve 38 % případech metylaci CDKN2B genu a pozitivní korelaci s progresem MDS do AML. Tien et al., 2001 našel v 69 % metylaci CDKN2B u pacientů, u nichž MDS transformovalo do AML. Ve studii Kim et al., 2010 prokázali častější metylaci CDKN2B genu u vysoce rizikového MDS a zkrácenou dobu přežití.

Re-exprese genu je možná po léčbě 5-aza-2'-deoxycytidinem. (Berg et al., 2007)

3.1.7 HIC1

HIC1 (hypermethylated gene in cancer-1) je lokalizován v 17p13.3 chromozomálním regionu, který bývá často hypermetylován nebo deletován v lidských nádorech. Jeho funkcí je regulace růstu.²

Aggerholm et al., 2006 identifikovali u 32 % vzorků hypermetylací HIC1 genu, která byla spojena s hypermetylací P15^{INK4B} genu u MDS.

Zvýšená metylace tohoto genu byla také prokázána v 50 % případů chronické fáze CML (chronická myeloidní leukémie). (Issa et al., 1997)

Tento gen je často hypermetylován u ALL (akutní lymfoidní leukémie). U až 55 % případů hypermetylace HIC1 byla nalezena u recidivujících pacientů s ALL (Issa et al., 1997).

3.1.8 ER

ER (estrogen receptor) je lokalizován na chromozómu 6q25.1 (Menasce et al., 1993). Je to negativní regulátor normální hematopoézy, má též růstovou a metastatickou supresorovou aktivitu v mnoha různých buněčných typech (Issa et al., 1996).

Ve studii Aggerholm et al., 2006 hypermetylací prokázali v 19 % případů. Issa et al., 1996 našli aberantní metylaci promotorů u 86% hematopoetických tumorů.

² Převzato z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3090>.

Issa et al., 1996 našel aberantní metylaci u 50 % pacientů v chronické fázi CML a u 100 % pacientů ve fázi blastické krize.

3.1.9 CDH1

CDH1 (E-cadherin gene) je lokalizován na chromozomálním úseku 16q22.1.³ Je označován za metastatický supresorový gen. Hypermetylací promotoru genu CDH1 identifikovali u 56 % pacientů s AML (Shimamoto et al., 2005).

Aggerholm et al., 2006 prokázali hypermetylací CDH1 genu u 27 % pacientů s MDS.

Ve studii Galm et al., 2009 identifikovali aberantní metylaci u 56 % pacientů s mnohonásobným lymfomem.

3.1.10 CALC1

CALC1 (CALCA, calcitonin gene) leží v úseku chromozómu 11p15.2 a kóduje peptidový hormon kalcitonin.⁴

Ve studii Dhodapkar et al., 1995 upozorovali hypermetylací CALC1 genu u 65 % pacientů. Podle studie Vidal et al., 2007 je aberantní metylace CALC1 častá u dětské MDS našli ji u 85,7 % případů.

Nelkin et al., 1991 prokázal, že s postupující progresí nemoci z chronické fáze do fáze blastické krize se zvyšuje hladina DNA metylace genu CALCA u CML.

Ve studii Thomas et al., 1999 prokázali hypermetylací tohoto genu u 77 % pacientů s ALL.

3.2 Mutace DNA metyltransferáz

3.2.1 DNMT3a

Mutace DNMT3a byla identifikována u pacientů s MDS. Bylo identifikováno 13 heterozygotních mutací. Nejčastějším mutovaným úsekem DNMT3a byl úsek aminokyseliny R882. Tito pacienti měli zkrácenou dobu přežití a rychlejší progres do AML (Walter et al., 2011). Dochází-li k arginin – histidin substituci právě v pozici 882, vede to ke snížení enzymatické aktivity DNMT3a in-vitro v AML, kterou našli ve 20,5 % případů (Yan et al., 2011).

³ Převzato z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/999>.

⁴ Převzato z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/796>

V kódujícím regionu DNMT3a byly nalezeny missense, nonsense, frameshift i loss-function mutace (Ley et al., 2010).

3.2.2 DNMT3b

Mutace v genu DNMT3b je hlavní příčinou ICF syndromu (immunodeficiency, centromeric instability and facial anomalies). V takovém případě se jedná o missense mutaci (Hansen et al., 1999).

3.2.3 Mutace TET2

TET2 je nejčastěji mutovaný gen u MDS a AML (Bejar et al., 2011; Ko et al., 2011). Použití mutovaného TET2 jako prognostického faktoru pro MDS je zatím nejisté (Bejar et al., 2011; Langemeijer et al., 2009; Smith et al., 2010).

Ve studiích, kde byl nalezen mutovaný TET2 gen, byla zjištěna nízká hladina 5-hmC v genomu, což ukazuje na sníženou aktivitu TET2 proteinu (Ko et al., 2010). Efekt inaktivace TET2 v hematopoéze je stále studován. Myši s TET2 delecí vykazují podobné hematopoetické abnormality jako myeloidní malignity (Ko et al., 2010; Quivoran et al., 2011; Li et al., 2011; Moran-Crusio et al., 2011).

4 Demetylační léčba

Princip demetylační léčby spočívá ve schopnosti specifických molekul ovlivňovat úroveň metylace DNA. Je využívána k léčbě nádorových onemocnění, zejména onemocnění leukemického typu a solidních nádorů, u kterých byla prokázána hypermetylace promotorů tumor supresorových genů, které jsou tím neaktivní a je potřeba obnovit jejich funkci. V mnoha studiích byla prokázána jejich demetylační funkce, která spočívá v inhibici DNA metyltransferáz a následné reaktivaci umlčených genů hypermetylací promotorových oblastí příslušného genu. Většina těchto molekul je účinná jak in vitro tak in vivo.

Inhibice metylace DNA po demetylační léčbě byla prokázána u mnoha tumor supresorových genů lidských nádorových onemocnění, jako např. p16 (Gonzales-Zulueta et al., 1995), E-cadherin (Yoshirua et al., 1995), hMLH 1 (Herman et al., 1998) a p15 (Daskalakis et al., 2002).

Inhibitory se dají rozdělit na dvě hlavní skupiny: *nukleosidové analogy cytidinu*, kam řadíme 5-azacytidin, 5-aza-2'-deoxycytidine, 5-fluoro-2'-deoxycytidin, zebularin a *non-nukleosidové analogy* jako procainamid, hydralazin, RG108 a procain.

4.1 Nukleosidové inhibitory

4.1.1 5-azacytidin

5-azacytidin byl poprvé syntetizován českými vědci v roce 1964. Je to nukleosidový analog cytidinu, kde v pátém místě pyrimidinového kruhu je místo uhlíku dusík (Zielinski et al., 1984 podle Pískala et al., 1964). Je schopný se funkčně vázat do DNA i RNA (Creusots et al., 1982). Inkorporace 5-azacytidinu do DNA vede ke kovalentní vazbě s DNMT1 a následné hypometylaci DNA (Jones et al., 1980). Tímto dochází k inhibici de-novo metylace DNA (Bhagwat et al., 1987). Je vysoce toxický pro buňku, která se nachází v S fázi buněčného cyklu, což 5-aza-2'-deoxycytidine není (Leone et al., 2002 podle Covey et al., 1984).

Mononukleosid 5-azacytidinu je nejdříve metabolizován na trifosfát, který už se může stát substrátem pro replikaci DNA a následné inkorporace do její struktury, kde dojde k výměně cytosinu za azacytosin. Azacytosin vytvoří dinukleotid s guaninem - jakožto substrát pro DNMT, která s tímto dinukleotidem vytvoří kovalentní vazbu, a tím dochází k její inhibici (Santi et al., 1984; Chen Li et al., 1991). Po připojení kovalentního proteinu je DNMT1 degradována (Ghoshal et al., 2005).

4.1.2. 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine)

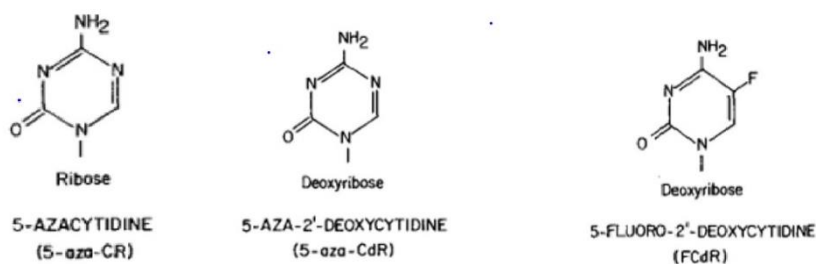
Byl poprvé syntetizován v roce 1964. (Pliml et al., 1964). Stejně jako 5-azacytidin se jedná o analog cytidinu s dusíkem na pátém místě pyrimidinového kruhu. Ale liší se tím, že decitabine je deoxyribóza, ale 5-azacytidin je ribóza. Fosforylovaná deoxyribóza decitabinu umožňuje přímou inkorporaci do molekuly DNA, která se poté může spojit s DNMT1 kovalentní vazbou skrz dusík v pozici 5 modifikovaného pyrimidinu. DNMT1 bude degradována proteasomem (shrnuto v Momparler, 2005). Decitabine je aktivován deoxycytidin kinázou (Momparler et al., 1979).

4.1.3 Zebularin

Zebularin je 1- β -D-ribofuranosyl-2(1H)-pyrimidine, charakteristický nepřítomností amino skupiny na C4 pyrimidinového kruhu (Champion et al., 2010). Je aktivní in vitro, i in vivo (Burchenal et al., 1976). Inhibici metylace provádí vytvoření kovalentního komplexu s DNA a DNMT. (Zhou et al., 2002). Byl objeven jako inhibitor cytidin deamináz; až poté se objevila i funkce inhibitoru metylace DNA. V probíhajících studiích se jeví jako méně toxický a stabilnější než 5-azacytidin a decitabine. Funkční metabolismus je stejný jako u 5-azacytidinu (shrnuto Ren et al., 2011).

4.1.4 5-fluoro-2'-deoxycytidine (FdCyd)

Jedná se rovněž o analog cytidinu, který byl poprvé syntetizován v roce 1961 (Wempen et al., 1961). V několika studiích byla prokázána demetylační aktivita u buněk rakoviny prsu či plic. FdCyd se váže do DNA, což vede k inhibici DNMT1 beta-eliminací fáze přenosu metylové skupiny (Jones et al., 1980). DNA metyltransferáza 1 zůstane zachycena v kovalentním komplexu s DNA, podobně jako 5-azacytidin či decitabin (Reither et al., 2003). Stále probíhají klinické testy pro použití v léčbě různých typů nádorů.



Obr. 2 – Nukleosidové inhibitory: 5-azacytidin, 5-aza-2'-deoxycytidine a 5-fluoro-2'-deoxycytidin (upraveno a převzato z Jones et al., 1980)

4.2 Non-nukleosidové inhibitory

Tyto inhibitory nejsou analogy cytidinu. Jsou to menší molekuly než analogy cytidinu. Jejich hlavní výhodou je větší stabilita molekuly, než u cytidinových analogů, které jsou méně stabilní díky dusíku v 5'pozici pyrimidinového kruhu.

4.2.1 Procainamid

U této malé molekuly byla prokázána schopnost inhibice metylace v lidských T buňkách, která je následována expresí antigenu I, jenž učiní T buňky autoreaktivními (Yung et al., 1997). Je schopen inhibovat DNMT1, a tím demetylovat hypermetylované a hemimetylované geny (Lee et al., 2005). DNMT1 inhibuje stejně jako hydralazin. Schopnost obnovy exprese tumor supresorových genů umlčených hypermetylací promotorových úseků byla prokázána např. u genu p16 (Segura-Pacheco et al., 2003).

4.2.2 Hydralazin

Jeho hlavní úkol je fungovat jako antiaritmický lék a vazodilatátor, ale byla také prokázána jeho demetylační funkce, která vede k obnovení exprese několika tumor supresorových genů, jako např. p15 (Segura-Pacheco et al., 2003). Demetylační aktivita spočívá ve schopnosti N atomů interagovat s Lys162 a Arg240 na DNMT1 (Arce et al., 2006)

podle Angeles et al., 2005). Je také klinicky testován jako demetylační pro myelodysplastický syndrom (Candelaria et al., 2011) a nádorová onemocnění.

4.2.3 RG108

RG108 byl první inhibitor uměle syntetizovaný jako demetylační. Jeho hlavní předností je zatím žádná detekovatelná toxicita. Také se liší postupem inhibice; RG108 přímo blokuje katalytickou kapsu DNMT (Brueckner et al., 2005).

4.2.4 Procaine

Procaine je používán zejména jako lokální anestetikum, ale má taky funkci inhibice DNMT1 v buňkách rakoviny prsu, způsobuje globální demetylaci genomu DNA a reaktivaci genu TSCs. Váže se do CpG bohatých sekvencí a tam blokuje vazbu DNMT s DNA (Villar-Garea et al., 2003).



Obr. 3 – Non-nukleosidové inhibitory (procaine, procainamide, hydralazin, RG108) (upraveno a převzato z Medina-Franco et al., 2014)

4.3 Demetylační léčba u MDS

Některé z výše uvedených látek se používají k léčbě vysoce rizikového MDS (Silverman et al., 2002), a to zejména 5-azacytidin a decitabine. U dalších demetylačních látek probíhají klinické testy.

Při léčbě 5 - azacytidinem se medián přežití prodlužuje z 15 na 24 měsíců - při denních dávkách 75mg/m², 7 dnů každé 4 týdny. Oddaluje také progres do akutní myeloidní leukémie (Fenaux et al., 2009). Medián odpovědi pacientů na léčbu je 13 měsíců, tedy 15 léčebných cyklů (Gore et al., 2013).

Léčba decitabinem je stejně účinná jako 5-azacytidinem při menších dávkách léku: 15mg/m², 3x denně po dobu 3 dnů, každý 6. týden. Stačí také méně cyklů léčby (3-4 cykly léčby). Má menší účinnost u pacientů starších 65-ti let než 5-azacytidin (Lübbert et al., 2011).

5 Metody detekce

Pro studium metylace DNA existuje mnoho metod a stále se vyvíjejí nové. Díky velkému množství metod je proto možné vždy zvolit tu nejvhodnější variantu pro daný zkoumaný vzorek. Metody pro studium se dají rozdělit do dvou hlavních skupin, a to *sekvenčně nespecifické*, které nám určí celkovou úroveň metylace DNA (HPLC, HPCE a imunoprecipitace) a *sekvenčně specifické*, které podají informaci o stupni metylace konkrétního cytosinu (např. metody založené na bisulfitové modifikaci DNA, metody používající restriční endonukleázy, či pyrosekvenování).

5.1 Sekvenčně nespecifické

5.1.1 HPLC (high performance liquid chromatography)

Vysokotlaká kapalinová chromatografie je metoda, která určí celkové množství metylovaných cytosinů v genomu.

DNA je nejdříve hydrolyzována, a to buď chemicky, či enzymaticky. Chemická hydrolyza se provádí kyselinou mravenčí, která ale způsobuje deaminaci cytosinu i metylcytosinu (Eick et al., 1983), proto se spíše používá kyselina fluorovodíková, která deaminaci nezpůsobuje (Catania et al., 1987). Hydrolyzovaná DNA je separována pomocí chromatografie. Stupeň metylace jednotlivých deoxyribonukleosidů je určen spektrofotometrií, kdy je absorbance zkoumaného vzorku srovnávána se standardním vzorkem, kde známe obsah metylcytosinu a cytosinu (Kuo et al., 1980).

5.1.2 HPCE (high performance capillary electrophoresis)

Vysokoučinná kapilární elektroforéza je rychlejší než HPLC a také levnější na provedení. DNA je hydrolyzována nukleázou P1, vzniklé deoxyribonukleosidy jsou separovány kapilární elektroforézou.

Stupeň metylace DNA je stanovován spektrofotometrií (Li et al., 2009).

5.1.3 MeDIP (Methylated DNA immunoprecipitation)

Molekula DNA je ultrazvukem rozštěpena na fragmenty, které jsou po denaturaci inkubovány s primární monoklonální protilátkou proti 5 - methylcytosinu. Na primární protilátku se váže sekundární protilátka (anti-5-methylcytosin), která označuje metylované úseky. Ke vzorku se přidává magnetická kulička, aby se při vymývání nemetylované DNA nevymyla i DNA metylovaná. DNA se dále analyzuje, např. za pomoci microarrays (Weber et al., 2005).

Tato metoda má další varianty. Při první z nich - MeDIP-Chip, se kombinuje metoda MeDIP s microarray technologií a vzniká tak celogenomový metylační profil DNA. Při druhé variantě - MeDIP-seq se získaný vzorek navíc podrobí sekvenování nové generace (Weber et al., 2007).

5.2 Sekvenčně specifické metody

5.2.1 HELP assay (HpaII tiny fragment Enrichment by Ligation-mediated PCR)

Tato metoda je založena na použití restričních enzymů HpaII a MspI s tím, že HpaII je metyl-senzitivní enzym, který štěpí pouze nemetylované úseky DNA a MspI štěpí stejná místa bez ohledu na stav metylace DNA. Metoda porovnává zastoupení fragmentů DNA, vzniklých štěpením restričních enzymů, následovanou ligací - zprostředkovanou PCR (Khulan et al., 2006).

5.2.2 Metody založené na modifikaci sodium bisulfitem

5.2.2.1 *Modifikace DNA bisulfitem a MSP (Methylation – specific PCR)*

Modifikace bisulfitem (hydrogen siřičitan sodný) je založena na schopnosti bisulfitu konvertovat nemetylované cytosiny na uracil, metylované cytosiny nechává nezměněné (Furuichi et al., 1970).

DNA modifikovaná bisulfitem sodným je následně amplifikována pomocí metylačně-specifické PCR, která obsahuje metyl-specifické primery, jež rozeznají metylované a nemetylované úseky (Herman et al., 1996).

5.2.2.2 *Přímé bisulfitové sekvenování*

Tato metoda je založena na modifikaci DNA bisulfitem, která je následně amplifikována PCR se specifickými primery, s tím že uracil a thymin je amplifikuje jako thymin a 5-metylcytosin jako cytosin. Získané PCR produkty jsou dále sekvenovány a tak se vytvoří metylační mapa daného úseku DNA s informací o metylačním stavu na úrovni jednoho nukleotidu (Frommer et al., 1992).

5.2.2.3 *COBRA (combined bisulfite restriction analysis)*

COBRA je kvantitativní metoda schopná určit metylační úroveň v malém množství genomové DNA. DNA je modifikovaná bisulfitem a následně amplifikována PCR, kde dochází ke konverzi nemetylovaných cytosinů na thymin a metylované cytosiny zůstávají nezměněné. Amplifikovaná DNA je štěpena metylačně citlivými restričními enzymy (Sadri

et al., 1996). Produkty jsou odděleny gelovou elektroforézou. Stupeň metylace odpovídá množství naštěpených a nenaštěpených úseků (Xiong et al., 1997).

5.2.3 Pyrosekvenování

Pyrosekvenování je založeno na schopnosti DNA polymerázy během přidávání komplementárního nukleotidu (dATP, dTTP, dGTP a dCTP) uvolňovat pyrofosfát (PPi). Sulfuryláza tento pyrofosfát konvertuje na ATP. ATP je poté za pomoci luciferázy převeden na světelný signál, který je detekován a vyhodnocen. Zároveň apyráza odstraní neinkorporované nukleotidy a zbylé ATP (Ronaghi et al., 1998).

6 Závěr

Cílem bakalářské práce bylo podat přehledný souhrn role metylace DNA v hematologických malignitách, zejména myelodysplastického syndromu, shrnout možnosti její detekce a demetylační léčby.

Role metylace DNA u těchto nádorových onemocnění spočívá zejména v umlčování tumor supresorových genů, čímž dochází ke snížení doby přežití pacienta a zkracuje se doba progresu myelodysplastického syndromu do akutní myeloidní leukémie.

Hypermetylované geny se prozatím nepoužívají pro všeobecnou diagnostiku nemoci z důvodu nespecifického zařazení hypermetylovaných genů k nějakému subtypu MDS, kvůli ne vždy jasnému prognostickému faktoru a drahé detekci. Proto se současné studie orientují na hledání genu vhodného pro všeobecnou diagnostiku.

Studie zaměřující se na demetylační léčbu ukazují obnovení transkripční aktivity tumor supresorových genů. Mezi schválené demetylační léky v České republice patří 5-azacytidin (Vidaza) a 5-aza-2'-deoxycytidine (Dacogen) (<http://www.sukl.cz/>). U pacientů, kteří byli léčeni těmito léky byla prokázána delší doba přežití a zpomalení progresu nemoci. Stále se hledají nové hypometylační látky s lepším účinkem (např. Yoo et al., 2013).

Studium metylačních profilů tumor supresorových genů je důležité pro diagnostiku, objasnění patogeneze vzniku onemocnění a zlepšení léčebných postupů - s cílem zlepšení života pacientů.

7 Seznam použité literatury

- Aggerholm A, Holm MS, Guldborg P, Olesen LH & Hokland P (2006) Promoter hypermethylation of p15INK4B, HIC1, CDH1, and ER is frequent in myelodysplastic syndrome and predicts poor prognosis in early-stage patients. *Eur. J. Haematol.* **76**: 23–32
- Antequera F & Bird A (1993) Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**: 11995–9
- Arce C, Segura-Pacheco B, Perez-Cardenas E, Taja-Chayeb L, Candelaria M & Dueñas-gonzalez A (2006) Hydralazine target : From blood vessels to the epigenome. *J. Transl. Med.* **16**: 1–16
- Avner P & Heard E (2001) X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat. Rev. Genet.* **2**: 59–67
- Bakin A V & Curran T (1999) Role of DNA 5-methylcytosine transferase in cell transformation by fos. *Science* **283**: 387–90
- Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM & Issa JP (1998) Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv. Cancer Res.* **72**: 141–96
- Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, Galili N, Nilsson B, Garcia-Manero G, Kantarjian H, Raza A, Levine RL, Neuberg D & Ebert BL (2011) Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N. Engl. J. Med.* **364**: 2496–506
- Ben-Hattar J, Beard P, Jiricny J (1989) Cytosine methylation in CTF and Sp1 recognition sites of an HSV tk promoter: effects on transcription in vivo and on factor binding in vitro. *Nucleic Acids Res.* **17**: 10179–10190
- Berg T, Guo Y, Abdelkarim M, Fliegauf M & Lübbert M (2007) Reversal of p15/INK4b hypermethylation in AML1/ETO-positive and -negative myeloid leukemia cell lines. *Leuk. Res.* **31**: 497–506
- Bestor TH, Laudano A, Mattaliano R & Ingram V (1988) Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. *J. Mol. Biol.* **203**: 971–83
- Bestor TH., Verdine GL (1994) DNA methyltransferases. *Curr. Opin. Cell Biol.* **380–389**
- Bhagwat AS & Roberts RJ (1987) Genetic analysis of the 5-azacytidine sensitivity of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **169**: 1537–46
- Bird AP (1980) DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. *Nucleic Acids Res.* **8**: 1499–1504
- Bird AP (1986) CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* **321**: 209–213

- Bird AP (1995) Gene number, noise reduction and biological complexity. *Trends Genet.* **11**: 94–100
- Borgel J, Guibert S, Li Y, Chiba H, Schübeler D, Sasaki H, Forné T & Weber M (2010) Targets and dynamics of promoter DNA methylation during early mouse development. *Nat. Genet.* **42**: 1093–100
- Boyes J & Bird A (1991) DNA Methylation Inhibits Transcription Indirectly via a Methyl-CpG Binding Protein. *Cell* **64**: 1123–1134
- Brakensiek K, Länger F, Kreipe H & Lehmann U (2005a) Absence of p21(CIP 1), p27(KIP 1) and p 57(KIP 2) methylation in MDS and AML. *Leuk. Res.* **29**: 1357–60
- *Brakensiek K, Länger F, Schlegelberger B, Kreipe H & Lehmann U (2005b) Hypermethylation of the suppressor of cytokine signalling-1 (SOCS-1) in myelodysplastic syndrome. *Br. J. Haematol.* **130**: 209–17
- Brueckner B, Garcia Boy R, Siedleck P, Musch T, Kliem H-Ch, Zielenkiewicz P, Suhai S, Wiessler M, Lyko F (2005) Epigenetic Reactivation of Tumor Suppressor Genes by a Novel Small-Molecule Inhibitor of Human DNA Methyltransferases. *Cancer Res.*: 6305–6311
- Burchenal JH, Ciovacco K, Kalaher K, O'Toole T, Kiefner R, Dowling MD, Chu CK, Watanabe KA, Wempen I, Fox JJ (1976) Antileukemic Effects of Pseudoisocytidine , a New Synthetic Pyrimidine C-Nucleoside. *Cancer Res.*: 1520–1523
- Candelaria M, Herrera A, Labardini J, González-Fierro A, Trejo-Becerril C, Taja-Chayeb L, Pérez-Cárdenas E, de la Cruz-Hernández E, Arias-Bofill D, Vidal S, Cervera E & Dueñas-Gonzalez A (2011) Hydralazine and magnesium valproate as epigenetic treatment for myelodysplastic syndrome. Preliminary results of a phase-II trial. *Ann. Hematol.* **90**: 379–87
- Catania J, Keenan BC, Margison GP & Fairweather DS (1987) Determination of 5-methylcytosine by acid hydrolysis of DNA with hydrofluoric acid. *Anal. Biochem.* **167**: 347–51
- Comb M & Goodman HM (1990) CpG methylation inhibits proenkephalin gene expression and binding of the transcription factor AP-2. *Nucleic Acids Res.* **18**: 3975–82
- Creusot F, Acs G & Christman JK (1982) Inhibition of DNA methyltransferase and induction of Friend erythroleukemia Cell Differentiation by 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine. *J. Biol. Chem.*: 2041–2048
- Daskalakis M, Nguyen TT, Nguyen C, Gulberg P, Köhler G, Wijermans P, Jones PA, Lübbert M (2002) Demethylation of a hypermethylated P15/INK4B gene in patients with myelodysplastic syndrome by 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) treatment. *Blood* **100**: 2957–64
- Delaval K & Feil R (2004) Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **14**: 188–95

- Dhodapkar M, Grill J & Lust JA (1995) Abnormal regional hypermethylation of the calcitonin gene in myelodysplastic syndromes. *Leuk. Res.* **19**: 719–726
- Dodge JE, Okano M, Dick F, Tsujimoto N, Chen T, Wang S, Ueda Y, Dyson N & Li E (2005) Inactivation of Dnmt3b in mouse embryonic fibroblasts results in DNA hypomethylation, chromosomal instability, and spontaneous immortalization. *J. Biol. Chem.* **280**: 17986–91
- Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, Danenberg P V & Laird PW (2000) MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res.* **28**: E32
- Eden A, Gaudet F, Waghmare A & Jaenisch R (2003) Chromosomal Instability and Tumors Promoted by DNA Hypomethylation. *Science (80-.).* **300**: 455
- Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang L-H, Midgett RM, Kenneth C, Mccune RA & Gehrke C (1982) Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA different types of tissues or cells. *Nucleic Acids Res.* **10**: 2709–2721
- Eick D, Fritz HJ & Doerfler W (1983) Quantitative Determination of 5-Methylcytosine in DNA by Liquid Chromatography. *Anal. Biochem.* **135**: 165–171
- Fatemi M, Hermann A, Pradhan S & Jeltsch A (2001) The activity of the murine DNA methyltransferase Dnmt1 is controlled by interaction of the catalytic domain with the N-terminal part of the enzyme leading to an allosteric activation of the enzyme after binding to methylated DNA. *J. Mol. Biol.* **309**: 1189–99
- Feinberg AP & Vogelstein B (1983) Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **111**: 47–54
- Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Finelli C, Giagounidis A, Schoch R, Gattermann N, Sanz G, List A, Gore SD, Seymour JF, Bennett JM, Byrd J, Backstrom J, Zimmerman L, McKenzie D, Beach C & Silverman LR (2009) Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol.* **10**: 223–32
- Feng Q, Zhang Y (2001) The MeCP1 complex represses transcription through preferential binding, remodeling, and deacetylating methylated nucleosomes. *Genes Dev.* **15**: 827–832
- Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C, Ropero S, Petrie K, Iyer NG, Pérez-Rosado A, Calvo E, Lopez J a, Cano A, Calasanz MJ, Colomer D, Piris MA, Ahn N, Imhof A, et al (2005) Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat. Genet.* **37**: 391–400
- Fraga MF and Esteller M (2002) Review DNA Methylation : A Profile of Methods. *Biotechniques* **33**: 632–649

- Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL & Paul CL (1992) A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**: 1827–31
- Fuks F, Burgers WA, Godin N, Kasai M & Kouzarides T (2001) Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription. *EMBO J.* **20**: 2536–2544
- Furuichi Y, Wataya Y, Hayatsu H. and Ukita T (1970) Chemical modification of tRNATyr/yeast with bisulfite. A new method to modify isopentenyladenosine residue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **41**: 1185–1191
- Galm O, Wilop S, Reichelt J, Jost E, Gehbauer G, Herman JG & Osieka R (2004) DNA methylation changes in multiple myeloma. *Leukemia* **18**: 1687–92
- Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, Jackson-Grusby L, Dausman J, Gray JW, Leonhardt H & Jaenisch R (2003) Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science* (80-.). **300**: 489–92
- Gaudet F, Talbot D, Leondart H & Jaenisch R (1998) A Short DNA Methyltransferase Isoform Restores Methylation In Vivo. *J. Biol. Chem.* **273**: 32725–32729
- Ghoshal K, Datta J, Majumder S, Bai S, Kutay H, Motiwala T & Jacob ST (2005) 5-Aza-Deoxycytidine Induces Selective Degradation of DNA Methyltransferase 1 by a Proteasomal Pathway That Requires the KEN Box , Bromo-Adjacent Homology Domain , and Nuclear Localization Signal. *Mol. Cell. Biol.*: 4727–4741
- Globisch D, Münzel M, Müller M, Michalakakis S, Wagner M, Koch S, Brückl T, Biel M & Carell T (2010) Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates. *PLoS One* **5**: e15367
- Gonzalez-Zulueta M, Bender CM, Yang AS, Nguyen T, Beart RW, Tornout JM Van & Jones PA (1995) Methylation of the 5' CpG Island of the p16 / CDKN2 Tumor Suppressor Gene in Normal and Transformed Human Tissues Correlates with Gene Silencing Normal and Transformed Human Tissues Correlates with Gene Silencing '. *Cancer Res.*: 4531–4535
- Gore SD, Fenaux P, Santini V, Bennett JM, Silverman LR, Seymour JF, Hellström-Lindberg E, Swern AS, Beach CL & List AF (2013) A multivariate analysis of the relationship between response and survival among patients with higher-risk myelodysplastic syndromes treated within azacitidine or conventional care regimens in the randomized AZA-001 trial. *Haematologica* **98**: 1067–72
- Gruenbaum Y, Stein R, Cedar H & Razin A (1981) Methylation of CpG sequences in eukaryotic DNA. *FEBS Lett.* **124**: 67–71
- Guillerm G, Gyan E, Wolowiec D, Facon T, Avet-Loiseau H, Kuliczowski K, Bauters F, Fenaux P & Quesnel B (2001) Brief report p16 INK4a and p15 INK4b gene methylations in plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* **98**: 244–247

- Hansen RS, Wijmenga C, Luo P, Stanek AM, Canfield TK, Weemaes CM & Gartler SM (1999) The DNMT3B DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 14412–7
- Hata K, Okano M, Lei H & Li E (2002) Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development* **129**: 1983–93
- Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD & Baylin SB (1996) Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 9821–6
- Herman JG, Jen J, Merlo A & Baylin SB (1996) Hypermethylation-associated Inactivation Indicates a Tumor Suppressor Role for p15 INK4B. *Cancer Cell*: 722–727
- Herman JG, Latif F, Weng Y, Lerman MI, Zbar B, Liu S, Samid D, Duan DS, Gnarr JR & Linehan WM (1994) Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**: 9700–4
- Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, Markowitz S, Willson JK, Hamilton SR, Kinzler KW, Kane MF, Kolodner RD, Vogelstein B, Kunkel T a & Baylin SB (1998) Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 6870–5
- Holliday R & Pugh JE (1975) DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* **187**: 226–32
- Hopfer O, Komor M, Koehler IS, Freitag C, Schulze M, Hoelzer D, Thiel E & Hofmann W-K (2009) Aberrant promotor methylation in MDS hematopoietic cells during in vitro lineage specific differentiation is differently associated with DNMT isoforms. *Leuk. Res.* **33**: 434–42
- Hotchkiss RD (1948) The Quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *J. Biol. Chem.* **175**: 315–332
- Champion C, Guianvarc’h D, Sénamaud-Beaufort C, Jurkowska RZ, Jeltsch A, Ponger L, Arimondo PB & Guieysse-Peugeot A-L (2010) Mechanistic insights on the inhibition of c5 DNA methyltransferases by zebularine. *PLoS One* **5**: e12388
- Chen L, MacMillan M, Chang W, Ezaz-Nikpay K, Lane WS, Verdine GL (1991) Direct Identification of the Active-Site Nucleophile in a DNA (Cytosine-5)-methyltransferase. *Biochemistry* **30**: 11018–11025
- Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K, McCann PP (1996) S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB J.* **10**: 471–480
- Chuang LS, Ng HH, Chia JN & Li BF (1996) Characterisation of independent DNA and multiple Zn-binding domains at the N terminus of human DNA-(cytosine-5) methyltransferase: modulating the property of a DNA-binding domain by contiguous Zn-binding motifs. *J. Mol. Biol.* **257**: 935–48

- Iguchi-Arigo SM & Schaffner W (1989) CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. *Genes Dev.* **3**: 612–619
- Issa J-PJ, Zehnbauer BA, Civin CI, Issa J, Zehnbauer A, Civin I, Sharkis SJ, Davidson E, Kaufmann SH & Baylin SB (1996b) The Estrogen Receptor CpG Island Is Methylated in Most Hematopoietic Neoplasms. *Cancer Res.*: 973–977
- Issa J-PJ, Zehnbauer BA, Kaufmann SH, Biel MA & Baylin SB (1997) HIC1 Hypermethylation Is a Late Event in Hematopoietic Neoplasms. *Cancer Res.* **57**: 1678–1681
- Ito S, D'Alessio AC, Taranova O V, Hong K, Sowers LC & Zhang Y (2010) Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* **466**: 1129–33
- Iwai M, Kiyoi H, Ozeki K, Kinoshita T, Emi N, Ohno R & Naoe T (2005) Expression and methylation status of the FHIT gene in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Leukemia* **19**: 1367–75
- Jeanpierre M, Turleau C, Aurias a, Prieur M, Ledest F, Fischer a & Viegas-Pequignot E (1993) An embryonic-like methylation pattern of classical satellite DNA is observed in ICF syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **2**: 731–5
- *Jeltsch A (2002) Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases. *Chembiochem* **3**: 274–93
- Jones PA & Baylin SB (2007) The epigenomics of cancer. *Cell* **128**: 683–92
- Jones PA & Taylor SM (1980) Cellular differentiation, Cytidine analogs and DNA methylation. *Cell* **20**:85-93
- Kaneda M, Okano M, Hata K, Sado T, Tsujimoto N, Li E & Sasaki H (2004) Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature* **429**: 900–3
- Kass SU, Pruss D & Wolffe AP (1997) How does DNA methylation repress transcription? *TIG Novemb.* **13**: 444–449
- Khulan B, Thompson RF, Ye K, Fazzari MJ, Suzuki M, Stasiak E, Figueroa ME, Glass JL, Chen Q, Montagna C, Hatchwell E, Selzer RR, Richmond TA, Green RD, Melnick A & Grealley JM (2006) Comparative isoschizomer profiling of cytosine methylation : The HELP assay. *Genome Res.*: 1046–1055
- Kim M, Oh B, Kim S-Y, Park H-K, Hwang SM, Kim TY, She CJ, Yang I, Yoon SS, Yoon JH & Lee DS (2010) p15INK4b methylation correlates with thrombocytopenia, blast percentage, and survival in myelodysplastic syndromes in a dose dependent manner: quantitation using pyrosequencing study. *Leuk. Res.* **34**: 718–22

- Knox JD, Araujo FD, Bigey P, Slack AD, Price GB, Zannis-Hadjopoulos M & Szyf M (2000) Inhibition of DNA methyltransferase inhibits DNA replication. *J. Biol. Chem.* **275**: 17986–90
- Ko M, Bandukwala HS, An J, Lamperti ED, Thompson EC, Hastie R, Tsangaratou A, Rajewsky K, Korralov SB & Rao A (2011) Ten-Eleven-Translocation 2 (TET2) negatively regulates homeostasis and differentiation of hematopoietic stem cells in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: 14566–71
- Ko M, Huang Y, Jankowska AM, Pape UJ, Tahiliani M, Bandukwala HS, An J, Lamperti ED, Koh KP, Ganetzky R, Liu XS, Aravind L, Agarwal S, Maciejewski JP & Rao A (2010) Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature* **468**: 839–43
- Kovesdi I, Reichel R & Nevins JR (1987) Role of an adenovirus E2 promoter binding factor in E1A-mediated coordinate gene control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**: 2180–4
- Kriaucionis S & Heintz N (2009) The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science* **324**: 929–30
- Kuo KC, McCune RA & Gehrke CW (1980) Quantitative reversed-phase high performance liquid chromatographic determination of major and modified deoxyribonucleosides in DNA. *Nucleic Acids Res.* **8**: 4763–4776
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Aincough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissoe SL, Wendl MC, Dehaunty KD, Miner TL, Delahaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Hujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguanave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Batistat M, Dedhia N, Blöcker H, Hornischer K, Norsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglou S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti

- L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JGR, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Steven Johnson L, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, James Kent W, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schlutz J, Slater G, Smit AFA, Stupka E, Szustakowki J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**: 860–921
- Langemeijer SMC, Kuiper RP, Berends M, Knops R, Aslanyan MG, Massop M, Stevens-Linders E, van Hoogen P, van Kessel AG, Raymakers R a P, Kamping EJ, Verhoef GE, Verburch E, Hagemeijer A, Vandenberghe P, de Witte T, van der Reijden B a & Jansen JH (2009) Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nat. Genet.* **41**: 838–42
- Lee BH, Yegnasubramanian S, Lin X & Nelson WG (2005) Procainamide is a specific inhibitor of DNA methyltransferase 1. *J. Biol. Chem.* **280**: 40749–56
- *Leone G, Teofili L, Voso MT, Lubbert M (2002) DNA methylation and demethylating drugs in myelodysplastic syndromes and secondary leukemias. *Haematologica* **87**: 1324–1341
- Leonhardt H, Page AW, Weier HU & Bestor TH (1992) A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell* **71**: 865–73
- Lewis JD, Meehan RR, Henzel WJ, Maurer-Fogy I, Jeppesen P, Klein F & Bird A (1992) Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell* **69**: 905–14
- Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, Ph D, Kandoth C, Payton JE, Baty J, Welch J, Harris CC, Lichti CF, Townsend RR, Fulton RS, Dooling DJ, Koboldt DC, Schmidt H, Zhang Q, Osborne JR, et al (2010) DNMT3A Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.*: 2424–2433
- Li E, Bestor TH & Jaenisch R (1992) Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* **69**: 915–26
- Li M, Hu S, Shen Z, He X, Tao S, Dong L & Zhu Y (2009) High-performance capillary electrophoretic method for the quantification of global DNA methylation: application to methotrexate-resistant cells. *Anal. Biochem.* **387**: 71–5
- Li Y, Nagai H, Ohno T, Yuge M, Hatano S, Ito E & Mori N (2002) Aberrant DNA methylation of p57 KIP2 gene in the promoter region in lymphoid malignancies of B-cell phenotype. *Blood* **100**: 2572–2577
- Li Z, Cai X, Cai C-L, Wang J, Zhang W, Petersen BE, Yang F-Ch & Xu M (2011) Deletion of Tet2 in mice leads to dysregulated hematopoietic stem cells and subsequent development of myeloid malignancies. *Blood* **118**: 4509–18

- Lin IG & Hsieh CL (2001) Chromosomal DNA demethylation specified by protein binding. *EMBO Rep.* **2**: 108–12
- Lin J, Yao D, Qian J, Wang Y, Han L, Jiang Y, Fei X, Cen J & Chen Z (2008) Methylation status of fragile histidine triad (FHIT) gene and its clinical impact on prognosis of patients with myelodysplastic syndrome. *Leuk. Res.* **32**: 1541–5
- Liu TX, Becker MW, Jelinek J, Wu W-S, Deng M, Mikhalkovich N, Hsu K, Bloomfield CD, Stone RM, DeAngelo DJ, Galinsky I a, Issa J-P, Clarke MF & Look a T (2007) Chromosome 5q deletion and epigenetic suppression of the gene encoding alpha-catenin (CTNNA1) in myeloid cell transformation. *Nat. Med.* **13**: 78–83
- Lübbert M, Suciú S, Baila L, Rüter BH, Platzbecker U, Giagounidis A, Selleslag D, Labar B, Germing U, Salih HR, Beeldens F, Muus P, Pflüger K-H, Coens C, Hagemeyer A, Eckart Schaefer H, Ganser A, Aul C, de Witte T & Wijermans PW (2011) Low-dose decitabine versus best supportive care in elderly patients with intermediate- or high-risk myelodysplastic syndrome (MDS) ineligible for intensive chemotherapy: final results of the randomized phase III study of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Leukemia Group and the German MDS Group. *J. Clin. Oncol.* **29**: 1987–96
- Matsuoka S, Edwards MC, Bai C, Parker S, Zhang P, Baldini A, Harper JW & Elledge SJ (1995) p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev.* **9**: 650–662
- Medina-Franco JL, Méndez-Lucio O & Yoo J (2014) Rationalization of activity cliffs of a sulfonamide inhibitor of DNA methyltransferases with induced-fit docking. *Int. J. Mol. Sci.* **15**: 3253–61
- Meehan RR, Lewis JD, McKay S, Kleiner EL & Bird AP (1989) Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs. *Cell* **58**: 499–507
- Menasce LP, White GRM, Harrison CJ and Boyle JM (1993) Localization of the Estrogen Receptor Locus (ESR) to Chromosome 6q25.1 by FISH and a Simple Post. *Genomics*: 263–265
- *Momparker RL (2005) Pharmacology of 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine). *Semin. Hematol.* **42**: S9–S16
- Momparker RL & Derse D (1979) Kinetics of phosphorylation of 5-aza-2'-deoxyycytidine by deoxycytidine kinase. *Biochem. Pharmacol.* **28**: 1443–4
- Moran-Crusio K, Reavie L, Shih A, Abdel-Wahab O, Ndiaye-Lobry D, Lobry C, Figueroa ME, Vasanthakumar A, Patel J, Zhao X, Perna F, Pandey S, Madzo J, Song C, Dai Q, He C, Ibrahim S, Beran M, Zavadil J, Nimer SD, et al (2011) Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. *Cancer Cell* **20**: 11–24
- Nan X, Campoy FJ & Bird A (1997) MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell* **88**: 471–81

- Nelkin BD, Przepiorka D, Burke PJ, Thomas ED & Baylin SB (1991) Abnormal Methylation of the Calcitonin Gene Marks Progression of Chronic Myelogenous Leukemia. *Blood* **77**: 2431–2434
- Ohta M, Inoue H, Cotticelli MG, Kastury K, Baffa R, Palazzo J, Siprashvili Z, Mori M, McCue P, Druck T, Croce CM & Huebner K (1996) The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. *Cell* **84**: 587–97
- Okano M, Xie S & Li E (1998) Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat. Genet.* **19**: 219–220
- Panning B & Jaenisch R (1996) DNA hypomethylation can activate Xist expression and silence X-linked genes. *Genes Dev.* **10**: 1991–2002
- Penn NW, Suwalski R, O’Riley C, Bojanowski K & Yura R (1972) The presence of 5-hydroxymethylcytosine in animal deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.* **126**: 781–90
- Pliml J and Šorm F (1964) Synthesis of a 2-deoxy-d-ribofuranosyl-s-azacytosine. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **7**: 2576–2578
- Prendergast GC, Lawe D & Ziff EB (1991) Association of Myn, the murine homolog of max, with c-Myc stimulates methylation-sensitive DNA binding and ras cotransformation. *Cell* **65**: 395–407
- Qiu C, Sawada K, Zhang X & Cheng X (2002) The PWWP domain of mammalian DNA methyltransferase Dnmt3b defines a new family of DNA-binding folds. *Nat. Struct. Biol.* **9**: 217–24
- Quesnel B, Guillermin G, Vereecque R, Wattel E, Preudhomme C, Bauters F, Vanrumbeke M & Fenaux P (1998) Methylation of the p15(INK4b) gene in myelodysplastic syndromes is frequent and acquired during disease progression. *Blood* **91**: 2985–90
- Quivoron C, Couronné L, Della Valle V, Lopez CK, Plo I, Wagner-Ballon O, Do Cruzeiro M, Delhommeau F, Arnulf B, Stern M-H, Godley L, Opolon P, Tilly H, Solary E, Duffourd Y, Dessen P, Merle-Beral H, Nguyen-Khac F, Fontenay M, Vainchenker W, et al (2011) TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis. *Cancer Cell* **20**: 25–38
- Razin A & Cedar H (1977) Distribution of 5-methylcytosine in chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**: 2725–8
- Razin A & Riggs A (1980) DNA Methylation and Gene Function. *Science* (80-.). **210**: 604–610
- Reither S, Li F, Gowher H & Jeltsch A (2003) Catalytic Mechanism of DNA-(cytosine-C5)-methyltransferases Revisited: Covalent Intermediate Formation is not Essential for Methyl Group Transfer by the Murine Dnmt3a Enzyme. *J. Mol. Biol.* **329**: 675–684

- *Ren J, Singh BN, Huang Q, Li Z, Gao Y, Mishra P, Hwa YL, Li J, Dowdy SC & Jiang S-W (2011) DNA hypermethylation as a chemotherapy target. *Cell. Signal.* **23**: 1082–93
- Reynisdóttir I & Massagué J (1997) The subcellular locations of p15(Ink4b) and p27(Kip1) coordinate their inhibitory interactions with cdk4 and cdk2. *Genes Dev.* **11**: 492–503
- Robertson KD, Ait-Si-Ali S, Yokochi T, Wade PA, Jones PL & Wolffe AP (2000) DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat. Genet.* **25**: 338–42
- Robertson KD, Uzvlogyi E, Liang G, Talmadge C, Sumegi J, Gonzales FA, Jones PA (1999) The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Research.* **27**: 2291–2298
- Ronaghi M, Uhlén M and Nyrén P (1998) DNA SEQUENCING: A Sequencing Method Based on Real-Time Pyrophosphate. *Science (80-.).* **281**: 363–365
- Sadri R & Hornsby PJ (1996) Rapid analysis of DNA methylation using new restriction enzyme sites created by bisulfite modification. *Nucleic Acids Res.* **24**: 5058–9
- *Sandhu C, Garbe J, Bhattacharya N, Dakis J, Pan CH, Koh J, Slingerland JM & Stampfer MR (1997) Transforming growth factor beta stabilizes p15INK4B protein, increases p15INK4B-cdk4 complexes, and inhibits cyclin D1-cdk4 association in human mammary epithelial cells. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 2458–2467
- Santi D V, Norment A & Garrett CE (1984) Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**: 6993–7
- Segura-Pacheco B, Trejo-Becerril C, Perez-Cardenas E, Taja-Chayeb L, Mariscal I, Chavez A, Acun C, Salazar AM & Lizano M (2003) Reactivation of Tumor Suppressor Genes by the Cardiovascular Drugs Hydralazine and Procainamide and Their Potential Use in Cancer Therapy. *Clin Cancer Res*: 1596–1603
- Shimamoto T, Ohyashiki JH & Ohyashiki K (2005) Methylation of p15(INK4b) and E-cadherin genes is independently correlated with poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Leuk. Res.* **29**: 653–9
- Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, Kornblith AB, Holland JC, Odchimar-Reissig R, Stone RM, Nelson D, Powell BL, DeCastro CM, Ellerton J, Larson RA, Schiffer CA & Holland JF (2002) Randomized Controlled Trial of Azacitidine in Patients With the Myelodysplastic Syndrome: A Study of the Cancer and Leukemia Group B. *J. Clin. Oncol.* **20**: 2429–2440
- Smith AE, Mohamedali AM, Kulasekararaj A, Lim Z, Gäken J, Lea NC, Przychodzen B, Mian S a, Nasser EE, Shooter C, Westwood NB, Strupp C, Gattermann N, Maciejewski JP, Germing U & Mufti GJ (2010) Next-generation sequencing of the TET2 gene in 355 MDS and CMML patients reveals low-abundance mutant clones with early origins, but indicates no definite prognostic value. *Blood* **116**: 3923–32

- Smith ZD & Meissner A (2013) DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* **14**: 204–20
- Song J, Rechkoblit O, Bestor TH & Patel DJ (2011) Structure of DNMT1-DNA complex reveals a role for autoinhibition in maintenance DNA methylation. *Science* **331**: 1036–40
- Stancheva I, Hensey C & Meehan RR (2001) Loss of the maintenance methyltransferase, xDnmt1, induces apoptosis in *Xenopus* embryos. *EMBO J.* **20**: 1963–73
- Stec I, Wright TJ, van Ommen G-J, de Boer PAJ, van Haeringen A, Moorman AFM, Altherr MR, den Dunnen JT (1998) WHSC1, a 90kb SET domain-containing gene, expressed in early development and homologous to a *Drosophila* dysmorphia gene maps in the Wolf-Hirschhorn syndrome critical region and is fused to IgH in t(4;14) multiple myeloma. *Human Molecular Genetics* **7**: 1071–1082
- Steensma D & Tefferi A (2003) The myelodysplastic syndrome (s): a perspective and review highlighting current controversies. *Leuk. Res.* **27**: 95–120
- Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor W a, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L & Rao A (2009) Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* **324**: 930–5
- Taylor PAJ and SM (1985) Cellular differentiation, Cytidine Analogs and DNA Methylation. *Int. J. Obes.* **9 Suppl 1**: 15–21
- Thomas X, Teillon M, Belhabri A, Rimokh R, Fiere D, Magaud JP & Archimbaud E (1999) Hypermethylation of calcitonin gene in adult acute leukemia at diagnosis and during complete remission. *Hematol. cell Ther* **41**: 19–26
- Tien HF, Tang JH, Tsay W, Liu MC, Lee FY, Wang CH, Chen YC & Shen MC (2001) Methylation of the p15(INK4B) gene in myelodysplastic syndrome: it can be detected early at diagnosis or during disease progression and is highly associated with leukaemic transformation. *Br. J. Haematol.* **112**: 148–54
- Uchida T, Kinoshita T, Nagai H, Nakahara Y, Saito H, Hotta T, Murate T (1997) Hypermethylation of the p15INK4B Gene in Myelodysplastic Syndromes. *Blood* **90**: 1403–1409
- Vidal DO, Paixão VA, Brait M, Souto EX, Caballero OL, Lopes LF & Vettore AL (2007) Aberrant methylation in pediatric myelodysplastic syndrome. *Leuk. Res.* **31**: 175–81
- Villar-Garea A, Fraga MF, Espada J, Esteller M (2003) Procaine Is a DNA-demethylating Agent with Growth-inhibitory Effects in Human Cancer Cells. *Cancer Res.*: 4984–4989
- Voso MT, Scardocci A, Guidi F, Zini G, Mario A Di, Pagano L, Hohaus S & Leone G (2004) Aberrant methylation of DAP-kinase in therapy-related acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Blood* **103**: 698–700
- Walter MJ, Ding L, Shen D, Shao J, Grillot M, McLellan M, Fulton R, Schmidt H, Kalicki-Weizer J, O’Laughlin M, Kandath C, Baty J, Westervelt P, DiPersio JF, Mardis ER,

- Wilson RK, Ley TJ & Graubert T a (2011) Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* **25**: 1153–8
- Watanabe D, Suetake I, Tada T & Tajima S (2002) Stage- and cell-specific expression of Dnmt3a and Dnmt3b during embryogenesis. *Mech. Dev.* **118**: 187–90
- Weber M, Davies JJ, Wittig D, Oakeley EJ, Haase M, Lam WL & Schübeler D (2005) Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat. Genet.* **37**: 853–62
- Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Pääbo S, Rebhan M & Schübeler D (2007) Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat. Genet.* **39**: 457–66
- Wempen I, Duschinsky R, Kaplan L and Fox JJ (1961) Thiation of Nucleosides.IV.The Synthesis of 5-Fluoro-2'-deoxycytidine and Related Compounds. *Org. Biol. Chem.* **83**: 4755–4766
- Wilson AS, Power BE & Molloy PL (2007) DNA hypomethylation and human diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **1775**: 138–162
- Wu X, Liu W, Tian Y, Xiao M, Wu Y & Li C (2011) Aberrant methylation of death-associated protein kinase 1 CpG islands in myelodysplastic syndromes. *Acta Haematol.* **125**: 179–85
- Wyatt GR, Cohen SS (1952) A New Pyrimidine Base from Backteriophage Nuclei Acids. *Nature.* **170** (4338): 1072-1073
- Xie Z-H, Huang Y-N, Chen Z-X, Riggs AD, Ding J-P, Gowher H, Jeltsch A, Sasaki H, Hata K & Xu G-L (2006) Mutations in DNA methyltransferase DNMT3B in ICF syndrome affect its regulation by DNMT3L. *Hum. Mol. Genet.* **15**: 1375–85
- Xiong Z & Laird PW (1997) COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res.* **25**: 2532–4
- Yan X-J, Xu J, Gu Z-H, Pan C-M, Lu G, Shen Y, Shi J-Y, Zhu Y-M, Tang L, Zhang X-W, Liang W-X, Mi J-Q, Song H-D, Li K-Q, Chen Z & Chen S-J (2011) Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia. *Nat. Genet.* **43**: 309–15
- Ye Y, McDevitt M a, Guo M, Zhang W, Galm O, Gore SD, Karp JE, Maciejewski JP, Kowalski J, Tsai H-L, Gondek LP, Tsai H-C, Wang X, Hooker C, Smith BD, Carraway HE & Herman JG (2009) Progressive chromatin repression and promoter methylation of CTNNA1 associated with advanced myeloid malignancies. *Cancer Res.* **69**: 8482–90
- Yoder J A & Bestor TH (1998) A candidate mammalian DNA methyltransferase related to pmt1p of fission yeast. *Hum. Mol. Genet.* **7**: 279–84

- Yoder J A, Soman NS, Verdine GL & Bestor TH (1997a) DNA (cytosine-5)-methyltransferases in mouse cells and tissues. Studies with a mechanism-based probe. *J. Mol. Biol.* **270**: 385–95
- Yoder J A, Walsh CP & Bestor TH (1997b) Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet.* **13**: 335–40
- Yoo J, Choi S & Medina-Franco JL (2013) Molecular modeling studies of the novel inhibitors of DNA methyltransferases SGI-1027 and CBC12: implications for the mechanism of inhibition of DNMTs. *PLoS One* **8**: e62152
- Yoshiura K, Kanai Y, Ochiai A, Shimoyama Y, Sugimura T, Hirosashi S (1995) Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**: 7416–7419
- Yung R, Chang S, Hemati N, Johnson K & Richardson B (1997) Mechanisms of drug-induced lupus. IV. Comparison of procainamide and hydralazine with analogs in vitro and in vivo. *Arthritis Rheum.* **40**: 1436–43
- Zhou L, Cheng X, Connolly B a., Dickman MJ, Hurd PJ & Hornby DP (2002) Zebularine: A Novel DNA Methylation Inhibitor that Forms a Covalent Complex with DNA Methyltransferases. *J. Mol. Biol.* **321**: 591–599
- *Zhu J-K (2009) Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. *Annu. Rev. Genet.* **43**: 143–66
- Zielinski WS & Sprinzl M (1984) Chemical synthesis of 5-azacytidine nucleotides and preparation of tRNAs containing 5-azacytidine in its 3'-terminus. *Nucleic Acids Res.* **12**: 5025–5036

* označení sekundárních citací

Seznam internetových zdrojů

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3090>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/999>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/796>

http://www.medchem.ch.cam.ac.uk/lab_rotations/murrell.php