

METILASI CPG ISLAND GEN DAPK PADA LEUKEMIA LIMFOBLASTIK AKUT

Fidianingsih, I.¹

¹Departemen Histologi Fakultas Kedokteran UII

ABSTRAK

Metilasi *CpG island* atau hipermetilasi pada promotor gen adalah penambahan gugus metil pada basa sitosin yang mendahului basa guanin yang menyebabkan penurunan ekspresi *Tumor Suppressor Gen* (TSG) sehingga menimbulkan kejadian kanker. DAPK adalah Serin-Treonin kinase yang tergantung pada Calsium atau Calmodulin yang berpartisipasi dalam berbagai jalur signal kehidupan, autofagi dan apoptosis. Pada kasus Leukemia Limfoblastik Akut (LLA) terdapat metilasi *CpG island* gen DAPK. Meskipun frekuensinya tidak tinggi, tetapi hal ini menunjukkan adanya keterlibatan proses epigenetik (DNA metilasi) dalam proses perkembangan terbentuknya leukemia.

ABSTRACT

Methylation of promoter-associated cytosine-guanin (CpG) islands or hypermethylation is the addition of a methyl group on the cytosine bases that precedes guanine bases. It causes a decrease in the expression of tumor suppressor gene (TSG) giving rise to the incidence of cancer. DAPK is Serine-Threonine kinase-dependent calcium or Calmodulin participating in various signaling pathways of life, autophagy and apoptosis. In the case of Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) contained CpG island methylation of genes DAPK. Although the frequency is not high, but this indicates the involvement of epigenetic (DNA methylation) in the process of formation of the development of leukemia.

PENDAHULUAN

Pada keadaan normal, *CpG island* dalam promotor gen tidak termetilasi, namun adanya metilasi atau penambahan gugus metil pada basa sitosin yang mendahului basa guanin pada daerah ini pada gen tumor supresor, gen *DNA repair* telah dihubungkan dengan tidak terjadinya transkripsi dan inaktivasi dari gen ini

sehingga menimbulkan kejadian kanker.¹

Metilasi *CpG island* telah berperan seperti mutasi dalam hipotesis *Knudson's two hits* untuk terjadinya kanker.² Kanker merupakan penyebab kematian nomer lima di Indonesia. Data statistik Sistem Informasi Rumah Sakit(SIRS) tahun 2006 menunjukkan 5,93% adalah kasus Leukemia (DepKes RI, 2009). Di Amerika,

insidensi Leukemia Limfoblastik Akut (LLA) adalah 1 – 1,5 per 100 ribu orang dengan puncak awal pada umur sekitar 4 tahun dan puncak kedua pada umur sekitar 50 tahun. Sebesar 80% kasus LLA terjadi pada anak-anak, dan 20% pada dewasa.³ Metilasi Cpg *island* telah banyak dihubungkan dengan prognosis dan respon terapi kanker.⁴ dan dengan prognosis pada LLA.⁵ Translokasi kromosom mempunyai peran penting dalam diagnosis dan prognosis LLA tetapi hal ini dideteksi hanya pada angka yang rendah pada sub tipe morfologi spesifik. Sementara onkogen dan gen supresor tumor pada tumor solid seperti p53 dan RAS tidak sering mengalami mutasi pada LLA sehingga metilasi CpG *island* juga merupakan hal penting untuk terjadinya leukemia. Sebanyak 70% sampai 90% kasus LLA, setidaknya mempunyai 1 gen yang mengalami metilasi dan antara 25% sampai 40% kasus LLA mempunyai 3 atau lebih gen yang mengalami metilasi pada saat diagnosis.⁶

DAPK (*Death-associated protein kinase*) adalah gen yang berpartisipasi dalam berbagai jalur signal kehidupan, autofagi dan apoptosis. Metilasi promoter DAPK telah dihubungkan dengan menurunnya ekspresi dari DAPK. Pemeriksaan terhadap metilasi dari gen

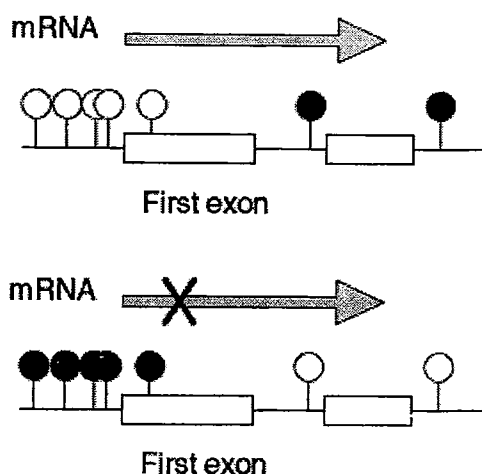
DAPK telah dihubungkan dengan prognosis dan respon pemberian kemoterapi pada kanker gaster.⁷ Kondisi ini mungkin dapat digunakan dalam klinik untuk menentukan prognosis suatu kanker misalnya pada kasus kanker paru.⁸ (Pemeriksaan adanya metilasi promoter gen ini pada LLA mungkin bermanfaat dalam klinik untuk mengetahui diagnosis, prognosis maupun efek terapi dari kasus LLA.

METILASI DNA

Metilasi DNA adalah penambahan gugus metil pada rantai karbon nomor 5 pada cincin dari basa sitosin yang diikuti oleh basa guanin pada urutan sekuens 5'-CG-3'. Gugus metil ini berasal dari *S-Adenosyl.L.methionin*(SAM) yang dipindahkan ke sitosin dikatalisis oleh enzim *DNA Methyltransferase*(DNMT) selama replikasi. Metilasi DNA dapat diturunkan dan dapat mengubah aktivitas gen tanpa mengubah urutan gen.⁹

Lokasi metilasi dikenal dengan *CpG site*(p berarti fosfat). *CpG site* ada sebanyak 5-10% yang tersebar pada genom manusia, utamanya di urutan ulangan diluar *CpG island* dan mengalami metilasi sebanyak 70-80%. *CpG island* adalah daerah genom yang mempunyai banyak CpG(60-70%), yang umumnya atau normalnya tidak

mengalami metilasi dan terdapat pada daerah promotor atau disekitar promotor kecuali pada kromosom X yang inaktif dan gen autosom yang tidak tercetak dari satu alel orang tua. Setengah dari seluruh gen pada manusia berisi *CpG island*.¹⁰



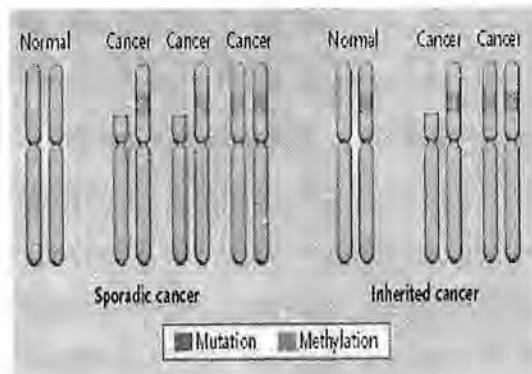
Gambar 1. Inaktivasi gen pada metilasi promotor.⁴

Metilasi DNA berfungsi dalam pengaturan gen, menyebabkan gen menjadi tidak terekspresi. Gambar 1 menunjukkan dot hitam adalah CpG yang termetilasi, pada daerah promotor menyebabkan gen tidak terekspresi. Proses ini terjadi pertama, melalui mekanisme yang menyebabkan hambatan secara langsung ikatan faktor transkripsi seperti AP-2, c-Myc, E2F maupun NF κ B, sehingga proses transkripsi tidak terjadi. Kedua, metilasi mengikat protein-protein seperti MeCP (*Methyl CpG binding protein*) dan MBD (*Methyl-CpG-*

binding domain protein) yang dapat menghambat ikatan dengan faktor transkripsi. Ketiga, CpG *island* dengan metilasi akan berikatan dengan kompleks Histon Deasetilasi (HDAC).¹ sehingga berada dalam konfigurasi nukleosom dan dibungkus oleh histon sehingga tidak terdapat akses terhadap faktor transkripsi, menghasilkan kondensasi kromatin akhirnya menekan proses transkripsi.⁹

Kondisi metilasi dapat merupakan kondisi fisiologi seperti penuaan atau memfasilitasi adaptasi sel terhadap lingkungan. Hipermetilasi mengacu pada adanya penambahan gugus metil pada *CpG island*, yang normalnya tidak termetilasi. Proses penghambatan transkripsi oleh karena metilasi CpG pada promotor menyebabkan gen tersebut tidak terekspresi, sepadan dengan perubahan genetik seperti delesi atau mutasi. Jika gen tumor supresor yang penting dalam proses pengaturan pertumbuhan, siklus sel, diferensiasi, apoptosis maupun perbaikan DNA, tidak terekspresi, menyebabkan hipermetilasi mempunyai peran sentral dalam tumorigenesis. Hipermetilasi telah berperan seperti mutasi dalam hipotesis *Knudson's two hits* untuk terjadinya kanker. Metilasi dapat terjadi pada kedua alel atau satu alel. Metilasi pada satu alel yang

bersamaan dengan perubahan genetik seperti mutasi akan menghasilkan kehilangan komplit produk gen dan metilasi pada kedua alel juga dapat menyebabkan inaktivasi gen secara komplit.¹¹



Gambar 2. Hipotesis Knudson's two hits.¹¹

METILASI DAN KANKER

Tumorigenesis dapat terjadi karena peningkatan ekspresi onkogen atau sebaliknya kehilangan gen tumor supresor. Kanker terjadi karena sel mampu menyediakan faktor pertumbuhan sendiri, adanya gangguan ekspresi faktor pertumbuhan serta perubahan struktur faktor pertumbuhan. Sel kanker dan sel leukemia mengalami ketidakpekaan terhadap sinyal anti pertumbuhan, sehingga mengganggu proses diferensiasi, mampu menghindari dari apoptosis, mempunyai potensi replikasi yang tidak terbatas, kemampuan angiogenesis serta kemampuan invasi dan metastasis.¹² Metilasi pada promotor gen tumor supresor yang penting

dalam pengaturan proses diatas, siklus sel, *DNA repair*, interaksi sel, menyebabkan ekspresi gen ini tidak terjadi sehingga berkembang kanker.

Metilasi CpG *island* atau hipermetilasi telah terbukti berhubungan dengan kejadian kanker. Gen-gen yang ditemukan mengalami metilasi pada kanker antara lain yang terlibat dalam pengaturan siklus sel (p16, p15, p14ARF, Rb), gen perbaikan DNA (MGMT, BRCA1, MLH1), dan apoptosis (DAPK, TMS1). Gen yang mengalami metilasi pada kanker umumnya adalah gen yang tidak ada perubahan atau lesi genetika. Pada tumorigenesis kolorektal, delesi untuk gen INK4a/ARF tidak umum terjadi, tetapi telah diteliti adanya metilasi p16INK4a dan p14ARF pada tumor ini. Mutasi somatik gen APC sangat sering pada tumor kolorektal tetapi metilasi APC diamati rendah pada tumor ini. Kejadian sebaliknya terjadi pada kasus tipe tumor gastrointestinal yang lain.¹³

Banyak tumor menunjukkan metilasi pada satu atau lebih gen. Metilasi dari gen-gen telah menunjukkan pola tertentu pada kanker. Profil metilasi CpG island untuk gen-gen tertentu berbeda pada tiap jenis kanker. Pada kanker payudara banyak mengalami metilasi pada gen BRCA1, E-Caderin, TMS-1 dan ER,

sementara kanker prostat pada gen GSTP1. Hipermetilasi dimungkinkan menjadi biomarker diagnosis, prognosis, prediksi efek kemoterapi dan potensi metastase pada kanker. Hipermetilasi pada gen GSTP1 telah dapat digunakan untuk diagnosis membedakan antara kanker prostat dan prostat jinak. Hipermetilasi pada MGMT telah dihubungkan dengan respon terapi terhadap temozolomide pada pasien glioma^{1,13,14} Penggunaan obat demetilasi DNA telah diakui dan disetujui untuk keganasan hematologi Sindrom Mielodisplastik.¹⁵

Lokasi terjadinya mutasi pada satu tipe kanker sering berbeda, sebaliknya metilasi terjadi pada regio yang sama pada tiap bentuk kanker. Pemeriksaan terhadap adanya hipermetilasi menjadi lebih mudah, bahkan dapat dideteksi hipermetilasi dengan sampel serum, sputum ataupun urin.¹³

METILASI *CPG ISLAND* PADA LLA

Beberapa hipermetilasi gen (metilasi CpG island) telah diidentifikasi pada leukemia. Gen yang mengalami hipermetilasi terutama gen yang dikenal berperan dalam pengaturan siklus sel, imortalitas sel, dan transformasi kanker. Gutierrez *et al.*¹⁶ melaporkan adanya

jumlah metilasi yang lebih banyak dihubungkan dengan anak yang berumur lebih dari 10 tahun dan jumlah leukosit yang lebih dari 50.000/mm³. Roman-Gomez *et al.*⁵ (melaporkan adanya metilasi banyak gen yaitu NES1, LATS1, CDH1, CDH13, p16, APAF1, DKK3, p15, PARKIN, PTEN, p57, p73, DAPK, TMS-1, dan p14 yaitu sebanyak 55%, 30%, 32%, 32%, 32%, 35%, 32%, 20%, 30%, 20%, 2%, 18%, 10%, 10%, dan 5%. Tidak ada hubungan bermakna antara jumlah metilasi dengan jenis kelamin, umur, dan jumlah leukosit, tetapi berhubungan bermakna dengan ketahanan hidup. Metilasi dapat menjadi faktor prognosis. Canalli *et al.*¹⁷ melaporkan adanya metilasi pada gen p15, p73, yaitu sebanyak 20% dan 15%. Metilasi lebih banyak terjadi pada usia dewasa dan dihubungkan dengan lama ketahanan hidup yang lebih pendek. Yang *et al.*¹⁸ melaporkan adanya metilasi lebih tinggi pada pasien dewasa daripada anak-anak.

METILASI *CpG ISLAND* GEN DAPK

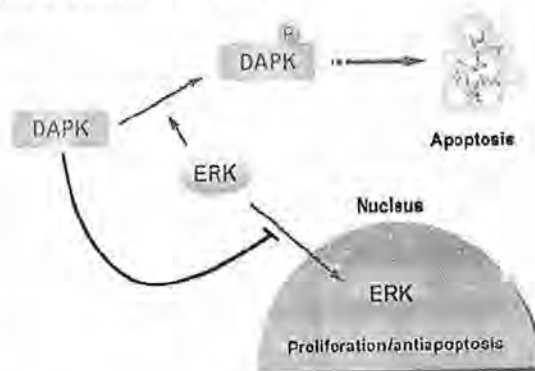
DAPK adalah Serin-Treonin kinase yang tergantung pada Calcium atau Calmodulin yang berpartisipasi dalam berbagai jalur signal kehidupan, autofagi dan apoptosis. Strukturnya paling tidak terdiri atas domain yang memediasi

interaksi dengan protein lain seperti ankyrin, domain kematian, yang berlokasi pada gugus terminal COOH, domain kinase, dan motif yang berikatan dengan calmodulin. Protein ini diinduksi oleh berbagai stimuli seperti Fas, TNF α , TGF- β dan ceramide melalui FADD/MORT1. DAPK nantinya ke jalur caspase 8 selanjutnya ke caspase lain.¹⁹

Ekspresi DAPK sering menghilang pada sel kanker, sebaliknya, overekspresi dari DAPK telah bermakna menginduksi apoptosis. Pada studi lain mekanisme peran DAPK adalah menekan c-Myc dan E2F dengan mengaktifkan p53 melalui p19ARF. DAPK dapat berperan dalam apoptosis karena DAPK mempunyai peran menekan aktivitas integrin. Aktivitas integrin diperlukan oleh sel untuk proses adesi sel ke matrik ekstraseluler. Sel yang tidak melakukan adesi cenderung untuk apoptosis.²⁰ (Aktivitas Integrin dihambat oleh DAPK oleh karena DAPK menghambat ikatan talin dengan $\beta 1$ integrin. Pada proses gerakan atau migrasi sel, sel memerlukan aktivitas dan reorganisasi sitoskeleton aktin, melalui pembentukan polarisasi sel dengan mengaktifkan cdc42. Cdc42 akan menyebabkan polarisasi golgi dan reorientasi dari mikrotubulus kearah

gerakan yang dituju. DAPK berfungsi menghambat migrasi dan invasi sel melalui mekanisme penghambatan tersebut.²¹

ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) diaktifkan oleh mitogen yang nantinya melakukan translokasi ke nukleus untuk menyebabkan transkripsi gen untuk mitosis. Translokasi ERK ditentukan oleh status adesi dan integrin. ERK mempunyai domain kematian yang berikatan dengan DPAK menyebabkan DAPK terfosforilasi dan mengaktifkan jalur apoptosis. Akhirnya juga menyebabkan penghambatan signaling ERK dalam nukleus.²²



Gambar 3. Mekanisme Apoptosis oleh DAPK melalui ERK.²²

Telah dilaporkan hilangnya atau menurunnya ekspresi DAPK pada berbagai sel *line* tumor dan menyebabkan sel-sel tumor terhindar dari apoptosis.²³ Metilasi CpG island atau hipermetilasi dari DAPK telah dihubungkan dengan menurunnya ekspresi dari DAPK. DAPK juga berhubungan dengan aktivitas metastasis

tumor. Ekspresi yang menurun dari DAPK telah dihubungkan secara bermakna dengan tumor stadium lanjut dan invasi tumor.²⁴

Pemeriksaan terhadap metilasi dari gen DAPK telah dihubungkan dengan prognosis dan respon pemberian kemoterapi pada kanker gaster.⁷ Hipermetilasi pada DAPK mungkin dapat digunakan dalam klinik untuk menentukan prognosis suatu kanker misalnya pada kasus kanker paru. Pasien kanker paru dengan hipermetilasi DAPK mempunyai angka harapan hidup yang lebih pendek.⁸ Gen DAPK mempunyai fungsi dalam pencegahan terjadinya kanker melalui 2 jalur yaitu jalur proapoptosis dan pencegahan terhadap invasi dan metastase.

METILASI CpG ISLAND GEN DAPK PADA LLA

Metilasi CpG island atau hipermetilasi gen DAPK (Tabel 1) pada Leukemia cukup tinggi pada sampel yang besar antara 7% - 35% (rata-rata 15%), tetapi beberapa penelitian tidak terdapat hipermetilasi gen DAPK karena jumlah sampel yang sedikit. Frekuensi hipermetilasi pada gen DAPK pada kelompok LLA tipe B tampak lebih tinggi dibanding kelompok LLA tipe T. Perbedaan ini mungkin dapat merefleksikan perbedaan etiologi dan faktor resiko serta

implikasi klinik yang dapat menentukan keberhasilan terapi dengan agen demetilasi.^{16,25,26}

Pada penelitian oleh Gutierrez *et al.*¹⁶ terdapat hubungan antara metilasi gen DAPK dengan metilasi gen p16. Hal ini selaras dengan fungsi gen p16. DAPK melalui penghambatan terhadap c-Myc akan mengaktifkan inhibitor CDK(*cyclin dependent kinase*) seperti misalnya p16. Selanjutnya p16 akan menghambat kompleks cyclin D dan CDK 4/6, sehingga siklus sel pada fase G1 berhenti, proliferasi sel tidak terjadi. Penelitian Roman-Gomez *et al.*⁵ terdapat hubungan antara metilasi gen DAPK dengan E-Chaderin dan H-Chaderin dimana frekuensi E-Chaderin cukup tinggi pada LLA. DAPK juga berfungsi dalam penghambatan invasi dan metastase, selaras dengan Chaderin yang berfungsi untuk adesi sel dengan sel yang lain sehingga sel cenderung berada dalam kelompoknya dan tidak melakukan invasi dan metastase.

Hipermetilasi gen DAPK pada LLA ini berbeda dengan pada Limfoma. Pada Limfoma frekuensi hipermetilasi DAPK frekuensinya paling tinggi dibanding dengan gen lain lebih dari 70%. Frekuensi metilasi gen DAPK pada Leukemia masih lebih rendah dibanding gen lain yaitu p15,

p73 dan CDH1. Hal ini mungkin dapat digunakan untuk diagnosis membedakan antara Leukemia dan Limfoma.⁸

gen DAPK antara anak dan dewasa belum dapat dibedakan. Frekuensi metilasi LLA tipe tipe B lebih besar frekuensinya dari pada LLA tipe sel T. Hipermetilasi gen DAPK berhubungan dengan prognosis pada

Tabel 1. metilasi CpG island gen DAPK pada beberapa penelitian

Kelompok LLA	Jumlah sampel	Persentase hipermetilasi	Referensi	P
LLA anak	124	10%	Roman-Gomez <i>et al.</i> , 2004 ⁵	Ns
LLA dewasa	127	17%		
		13%		
LLA anak	10	0%	Yang <i>et al.</i> , 2006 ¹⁸	Ns
LLA dewasa	9	0%		
LLA anak LLA tipe T	129	30%	Gutierrez <i>et al.</i> , 2003 ¹⁶	
LLA tipe B		3%		
LLA anak (kambuh)	9	35%	Matsushita <i>et al.</i> , 2004. ²⁷	
LLA tipe T	50	0%		
LLA tipe B	286	7%	Roman-Gomez <i>et al.</i> , 2005 ²⁵	Ns
LLA tipe B	21	12%		
LLA tipe B	21	14,2%	Rossi <i>et al.</i> , 2004 ²⁸	
LLA tipe T	10	0%		
LLA tipe B	20	0%	Katzenellenbogen <i>et al.</i> , 1999 ²⁶	
LLA (semua)	25	15%		
Leukemia	25	16%	Chim <i>et al.</i> , 2008 ²⁹	
	27 ALL	35%		
	11 AML		Takahashi <i>et al.</i> , 2004 ³⁰	
	9 CML			
	1 CLL			

Ns: tidak berbeda bermakna

KESIMPULAN

Pada kasus Leukemia Limfoblastik Akut terdapat metilasi CpG island gen DAPK. Meskipun frekuensinya tidak tinggi, tetapi hal ini menunjukkan adanya keterlibatan proses epigenetik (DNA metilasi) dalam proses perkembangan terbentuknya leukemia. Metilasi CpG island

kanker gaster dan paru tetapi belum dihubungkan dengan prognosis LLA.

DAFTAR PUSTAKA

1. Das PM, Singal R, DNA Methylation and Cancer, *Journal of Clinical Oncology*, 2004;22(22):4632-40.
2. Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetic comes of age, *Nat Genet*, 1999;21.

3. Jabbour EJ, Faderi S, Kantarjian HM. Adult Acute Lymphoblastic Leukemia, Mayo Clin Proc, 2005;90(11):1517-27.
4. Miyamoto K, Ushijima T. Diagnostic and Therapeutic Application of Epigenetics, Jpn.J.Clin.Oncol 2005;35(6):293-301.
5. Roman-Gomez J, Jimenez Velasco A, Castillejo JA, Agirre X, Barrios M, Navarro G, et al. Promoter hypermethylation of cancer-related genes: a strong independent prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia, Blood, 2004;104(8):2492-8.
6. Roman-Gomez J, Jimenez Velasco A, Barrios M, Prosper F, Heiniger A, Torres A, et al. Leukemia & Lymphoma 2007;48(7):1269-82.
7. Kato K, Iida S, Ueteke H, Takagi Y, Yamashita T, Inokhuchi M, et al. Methylated TMS1 and DAPK genes predict prognosis and response to chemotherapy in gastric cancer, Int. J. Cancer 2008;22:603-8.
8. Tang X, Khuri FR, Lee JJ. Hypermethylation of the death-associated protein (DAP) kinase promoter and aggressiveness in stage I non-small-cell lung cancer. J Natl Cancer Inst 2000;92:1511-6.
9. Singal R dan Ginder GD. DNA Methylation. Blood 1999;93:4059-70.
10. Antiquera F, Bird A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. Proc Natl Acad Sci USA, 1993;90:11995-9.
11. Herman JG, Baylin SB. Gene Silencing in Cancer in Association with Promoter Hypermethylation, N Engl J Med 2003;349:2042-54.
12. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmark of Cancer. Cell 2000;100:57-70.
13. Esteller M. Profiling aberrant DNA methylation in hematologic neoplasms: a view from the tip of the iceberg. Clinical Immunology, 2003;109: 80-88
14. Esteller M. Epigenetics in Cancer. N Engl J Med 2008;358:1148-59.
15. Mack GS. Epigenetic cancer therapy. J Natl Cancer Inst 2006;98:1443-4.
16. Gutierrez MI, Siraj AK, Bhargava M, Ozbek U, Banavali S, Chaudhary MA, et al. Concurrent methylation of multiple genes in childhood ALL: Correlation with phenotype and molecular subgroup. Leukemia, 2003;17:1845-50.
17. Canalli AA, Yang H, Jeha S, Hoshino K, Sanchez-Gonzalez B, Bbrandt M, et al. Aberrant DNA methylation of a cell cycle regulatory pathway composed of p73, p15, and p57KIP2, is a rare event in children with acute lymphocytic leukemia, Leukemia Research, 2005;29: 881-5.
18. Yang Y, Takeuchi S, Hofmann WK, Ikezoe T, Van Dongen JJM, Szczepanski T, et al. Aberrant methylation in promoter-associated CpG islands of multiple genes in acute lymphoblastic leukemia, Leukemia Research; 2006;30: 98-102.
19. Cohen O, Inbal B, Kissil JL, Raveh T, Berissi H, Krizaman TS, et al. DAP-kinase Participates in TNF α - and Fas-induced Apoptosis and Its Function Requires the Death Domain. The Journal of Cell Biology, 1999;146(1):141-8.
20. Wang WJ, Kuo JC, Yao CC, Chen RH. DAP-kinase induces apoptosis by suppressing integrin activity and disrupting matrix survival signals. The Journal of Cell Biology 2002;159(1):169-79.
21. Kuo JC, Wang WJ, Yao CC, Wu PR, Chen RH. The tumor suppressor DAPK inhibits cell motility by blocking the integrin-mediated polarity pathway. The Journal of Cell Biology, 2006;172(4):619-31.
22. Chen CH, Wang WJ, Kuo JC., Tsai HC, Lin JR, Chang ZF, et al. Bidirectional signals transduced by DAPK-ERK interaction promote the apoptotic effect of DAPK. The EMBO Journal, 2005;4(2):294-305.
23. Matsumoto H, Nagao M, Ogawa S, Kanehiro H, Hisanaga M, Ko S, et al. Prognostic significance of death-associated protein-kinase expression in hepatocellular carcinomas, Anticancer Res, 2003;23(2B):1333-41.
24. Kuester D, Dar AA, Moskaluk CC, Krueger S, Meyer F, Hartig R, et al. Early Involvement of Death-Associated Protein Kinase Promoter Hypermethylation in the Carcinogenesis of Barrett's Esophageal Adenocarcinoma and Its Association with

- Clinical Progression. Neoplasia 2007;9(3):236-45.
25. Roman-Gomez J., Jimenez Velasco, A., Agirre, X., Prosper, F., Heiniger, A., Lack of CpG Island Methylator Phenotype Defines a Clinical Subtype of T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Associated With Good Prognosis, *Journal of Clinical Oncology*, 2005;23(28):7043-7049
 26. Katzenellenbogen RA, Baylin SB, Herman JG. Hypermethylation of the DAP-kinase CpG island is a common alteration in B-cell malignancies. *Blood* 1999;93:4347-53.
 27. Matsushita C, Yang Y, Takeuchi S, Matsushita M, Van-Dongen JJ, Szczepanski T, et al. Aberrant methylation in promoter-associated CpG islands of multiple genes in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia, *Oncol Rep*, 2004;12(1):97-9.
 28. Rossi D, Capello D, Gloghini A, Franceschtti S, Paulli M, Bhatia K, et al. Aberrant promoter methylation of multiple genes throughout the clinico-pathologic spectrum of B-cell neoplasia. *Haematologica*, 2004;89:154-64.
 29. Chim CS, Chan WWL, Kwong Y L. Epigenetic dysregulation of the DAP kinase/p14/HDM2/p53/Apaf-1 apoptosis pathway in acute leukaemias. *Journal of Clinical Pathology* 2008;61:844-7.
 30. Takahashi T, Shivapurkar N, Reddy J, Shigematsu H, Miyajima K, Suzuki M, et al. Methylation Profiles of Lymphoid and Hematopoietic Malignancies *Clin Cancer Res*. 2004; 10: 2928-35.