

## Παθогένεια των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων III: Ο ρόλος της επιγενετικής τροποποίησης

Ελευθερία Χατζημιχαήλ<sup>1</sup>, Λεωνίδα Μπενετάτος<sup>1</sup>, Ευάγγελος Μπριασούλης<sup>1</sup>

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ:** Τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (ΜΔΣ), μια από τις πιο συχνές αιματολογικές κακοήθειες, είναι ετερογενή κλωνικά νεοπλάσματα του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου, που χαρακτηρίζονται από μη αποτελεσματική αιμοποίηση, δυσπλασία σε μία ή περισσότερες αιμοποιητικές σειρές στο μυελό των οστών και αυξημένο κίνδυνο μετάπτωσης σε οξεία μυελογενή λευχαιμία (ΟΜΛ). Παρόλη την πρόοδο στη γενετική των ΜΔΣ, η αιτιοπαθογένεια, οι μοριακοί μηχανισμοί και η παράδοξη πολλές φορές κλινική συμπεριφορά της νόσου σε ορισμένους ασθενείς παραμένουν σε μεγάλο βαθμό αδιευκρίνιστες. Επιγενετικές τροποποιήσεις είναι κλωνικά μεταβιβαζόμενες αλλαγές που αφορούν στο μηχανισμό μεταγραφικής έκφρασης γονιδίων χωρίς να συνοδεύονται από αλλαγές στην αλληλουχία του DNA. Κυριότεροι μηχανισμοί που μεταφέρουν επιγενετική πληροφορία και επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση είναι η μεθυλίωση του DNA και η ακετυλίωση των ιστονών. Τα ΜΔΣ χαρακτηρίζονται από επιγενετικές διαταραχές, κυρίως διαταραχές μεθυλίωσης του DNA και φαίνεται να είναι μια τόσο γενετική όσο και επιγενετική κλωνική νόσος του αιμοποιητικού ιστού. Μελέτες μεθυλίωσης μεμονωμένων γονιδίων διακρίνουν υποομάδες ασθενών με κοινό υπερμεθυλιωμένο φαινότυπο, ενώ μελέτες μεθυλίωσης του γονιδιώματος (genome wide) υποδεικνύουν διαφορετικό πρότυπο μεθυλίωσης σε ΜΔΣ και ΟΜΛ που σχετίζεται με ΜΔΣ, σε σχέση με *de novo* ΟΜΛ, άρα η μεθυλίωση συμβαίνει στα αρχικά στάδια της νόσου ενώ η εξέλιξη της σχετίζεται με τη συσσώρευση επιπρόσθετων επιγενετικών διαταραχών. Η μελέτη των επιγενετικών διαταραχών μπορεί να συμβάλει στον καλύτερο καθορισμό της πρόγνωσης και του κινδύνου μετάπτωσης αυτών των ασθενών σε οξεία λευχαιμία (ΟΛ). Δεδομένου, ότι πολλοί από αυτούς τους ασθενείς ανταποκρίνονται σε αγωγή με υπομεθυλιωτικούς παράγοντες απαιτούνται εργασίες για την ανεύρεση προγνωστικών βιοδεικτών απόκρισης στην υπομεθυλιωτική αγωγή.

Haema 2011; 2(2): 169-176 Copyright EAE

---

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (ΜΔΣ), μια από τις πιο συχνές αιματολογικές κακοήθειες, είναι ετερογενή κλωνικά νεοπλάσματα του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου, που χαρακτηρίζονται από μη αποτελεσματική αιμοποίηση, δυσπλασία σε μία ή περισσότερες αιμοποιητικές σειρές στο μυελό των οστών και αυξημένο κίνδυνο μετάπτωσης σε οξεία μυελογενή λευχαιμία (ΟΜΛ)<sup>1</sup>. Πολλές προσπάθειες έχουν γίνει για την ανάπτυξη συστημάτων σταδιοποίησης και ταξινόμησης των ασθενών με ΜΔΣ, ωστόσο κανένα από αυτά δεν αντικατοπτρίζει πλήρως και επαρκώς την ετερογένεια της νόσου<sup>2-4</sup>. Διά-

φορες κυτταρογενετικές διαταραχές όπως η έλλειψη του χρωμοσώματος 5 ή 7, η μεμονωμένη έλλειψη του βραχέος σκέλους του χρωμοσώματος 5 (del 5q), ή η τρισωμία 8 έχουν περιγραφεί σε υλικό μυελού των οστών ασθενών με πτωχή πρόγνωση<sup>5</sup>. Έχουν επίσης περιγραφεί μεταλλάξεις σε διάφορα γονίδια, όπως αυτές των *RAS*<sup>6</sup>, *TET2*<sup>7</sup> και *RUNX1*<sup>8</sup> που χαρακτηρίζουν άλλες υποομάδες ΜΔΣ. Παρόλη όμως την πρόοδο στη γενετική των ΜΔΣ, η αιτιοπαθογένεια, οι μοριακοί μηχανισμοί και η παράδοξη πολλές φορές κλινική συμπεριφορά της νόσου σε ορισμένους ασθενείς παραμένουν σε μεγάλο βαθμό αδιευκρίνιστες. Οι επιγενετικές διαταραχές έχουν αναγνωριστεί την τελευταία δεκαετία ως σημαντικός παράγοντας που συμβάλει στον νεοπλασματικό φαινότυπο<sup>4,9</sup>. Επιγενετικές τροποποιήσεις είναι κλωνικά μεταβιβαζόμενες αλλαγές που αφορούν στο μηχανισμό μεταγραφικής έκφρασης

<sup>1</sup>Πανεπιστημιακή Αιματολογική Κλινική Ιωαννίνων  
Διεύθυνση Αλληλογραφίας: Ελευθερία Χατζημιχαήλ, Αιματολογική Κλινική Ιωαννίνων, Λ. Στ. Νιάρχου, 45 500 Ιωάννινα, ehatzim@cc.uoi.gr

γονιδίων χωρίς να συνοδεύονται από αλλαγές στην αλληλουχία του DNA<sup>10</sup>. Κυριότεροι μηχανισμοί που μεταφέρουν επιγενετική πληροφορία και επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση είναι η μεθυλίωση του DNA και η ακετυλίωση των ιστονών<sup>11,12</sup>. Η μελέτη των επιγενετικών τροποποιήσεων στα ΜΔΣ έχει ιδιαίτερη σημασία γιατί πολλοί από αυτούς τους ασθενείς ανταποκρίνονται σε φαρμακευτικούς παράγοντες που επηρεάζουν τη μεθυλίωση του DNA ή/και την ακετυλίωση των ιστονών<sup>13</sup>. Στην παρούσα ανασκόπηση, περιγράφονται οι κυριότερες επιγενετικές τροποποιήσεις και πώς αυτές εμπλέκονται στην παθογένεια των ΜΔΣ, ενώ γίνεται αναφορά και στην πρόοδο που έχει σημειωθεί σε αυτό το πεδίο ιατροβιολογικής έρευνας.

## ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ

Έχει αναγνωριστεί εδώ και πολλά χρόνια ότι η καρκινογένεση είναι μία διαδικασία που περιλαμβάνει πολλαπλές γενετικές διαταραχές, όπως γονιδιωματικές μεταλλάξεις, ελλείψεις και μεταθέσεις, οι οποίες συμβάλλουν στον προοδευτικό μετασχηματισμό φυσιολογικών κυττάρων προς νεοπλασματικό φαινότυπο<sup>14</sup>. Οι γενετικές διαταραχές δεν μπόρεσαν ωστόσο να εξηγήσουν την εκτεταμένη φαινοτυπική πολυπλοκότητα σε δεδομένο κυτταρικό πληθυσμό, ούτε και τη διαφορετική προδιαθέση σε λοιμώξεις ή καρκίνους που παρουσιάζουν κλωνοποιημένοι οργανισμοί ή μονοζυγωτικά δίδυμα, που έχουν πανομοιότυπη αλληλουχία DNA<sup>9,15</sup>. Μερική εξήγηση στα βιολογικά αυτά φαινόμενα έχει δώσει τα τελευταία χρόνια η επιγενετική. Ο όρος επιγενετική αναφέρεται στη μελέτη των αλλαγών της γονιδιακής έκφρασης με μηχανισμούς που δεν επηρεάζουν την γονιδιακή αλληλουχία του DNA<sup>16</sup>. Οι αλλαγές αυτές παραμένουν κατά την κυτταρική διαίρεση, δηλαδή κληρονομούνται, είναι δυνατικά αναστρέψιμες και συμβάλλουν στη φαινοτυπική πολυπλοκότητα κατά τη μορφογένεση. Οι επιγενετικοί μηχανισμοί είναι απόλυτα καθοριστικοί στο να επιτρέπουν στα κύτταρα να χρησιμοποιούν από το σύνολο της γονιδιωματικής πληροφορίας επιλεκτικά μόνο αυτή που χρειάζονται για τη φυσιολογική λειτουργία του συγκεκριμένου κυττάρου<sup>9,17</sup>. Οι επιγενετικές αλλαγές λειτουργούν σαν ένα είδος «διακόπτη» ο οποίος ενεργοποιεί μόνο όσα γονίδια πρέπει να εκφραστούν σε κάθε κυτταρικό τύπο<sup>18</sup>. Επιπροσθέτως, αποτελούν ένα είδος μνήμης, η οποία κληρονομείται από το ένα κύτταρο στο θυγατρικό του: έτσι τα νέα κύτταρα ενός ιστού διατηρούν την ταυτότητα του ιστού στον οποίο ανήκουν<sup>19,20</sup>.

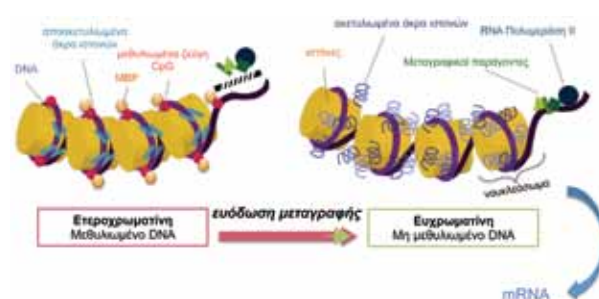
## Βασικές έννοιες- επιγενετικές τροποποιήσεις

Στον πυρήνα των κυττάρων το DNA, μήκους 2 περπίτου μέτρων, απαντά με τη μορφή χρωματίνης, στην

οποία συμπλέκεται με δομικές πρωτεΐνες και οργανώνεται σε νουκλεοσώματα. Κάθε νουκλεοσώμα αποτελείται από DNA μήκους 147 ζευγών βάσεων το οποίο είναι διπλά περιτυλιγμένο γύρω από ένα οκταμερές ιστονών (2 μόρια από κάθε μια από τις ιστόνες H2A, H2B, H3, H4)<sup>17</sup>. Η ανοικτή δομή της χρωματίνης, γνωστή ως ευχρωματίνη είναι μεταγραφικά ενεργή, αντίθετα η ετεροχρωματίνη είναι μεταγραφικά ανενεργή. Η αλλαγή στη δομή της χρωματίνης (από ετεροχρωματίνη σε ευχρωματίνη) αποτελεί προϋπόθεση για να επιτραπεί σε μεταγραφικούς παράγοντες αλλά και στην RNA πολυμεράση να αλληλεπιδράσουν με τον υποκινητή του γονιδίου και να ξεκινήσει η μεταγραφή. Για να διατηρήσει η χρωματίνη την ανοικτή της δομή (ευχρωματίνη) θα πρέπει το DNA να μην είναι μεθυλιωμένο και οι ιστόνες να είναι ακετυλιωμένες<sup>21</sup> (Εικόνα 1).

## Ι. Μεθυλίωση του DNA

Η μεθυλίωση του DNA είναι ένας τύπος χημικής τροποποίησης που μπορεί να κληρονομηθεί, όπως προαναφέρθηκε αλλά δεν επιφέρει αλλαγή στην αλληλουχία του DNA. Η μεθυλίωση του DNA περιλαμβάνει την προσθήκη μιας μεθυλ-ομάδας στη θέση 5 του άνθρακα του δακτυλίου της κυτοσίνης με τη δράση μεθυλοτρανσφερασών (DNMTs)<sup>22</sup>. Στον ανθρώπινο οργανισμό τη μεθυλίωση του DNA καταλύουν οι DNMT1, DNMT3a και η DNMT3b<sup>20</sup>. Αυτή η τροποποίηση λαμβάνει χώρα μόνο όταν η κυτοσίνη ακολουθείται από μία βάση γουανίνης, δηλαδή μόνο το δινουκλεοτίδιο CpG μπορεί να είναι μεθυλιωμένο (όπου p φωσφοδιεστερικός δεσμός μεταξύ γουανίνης και κυτοσίνης)<sup>9</sup>.



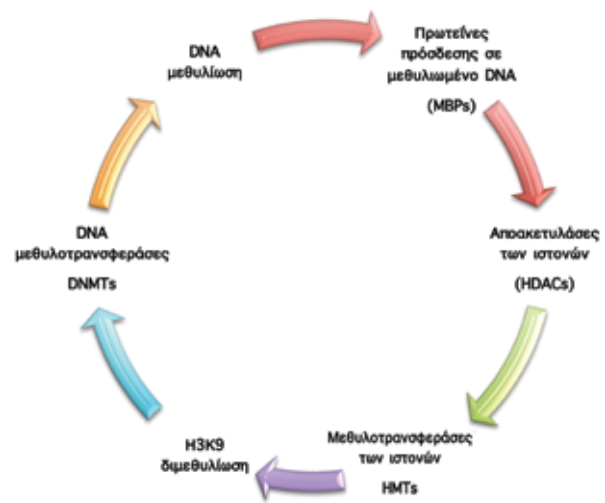
**Εικόνα 1.** Η ετεροχρωματίνη (αριστερά) χαρακτηρίζεται από μεθυλιωμένο DNA και αποακετυλιωμένες ιστόνες, που της προσδίδει μια σφικτή δομή και την καθιστά μεταγραφικά ανενεργή. Αντίθετα, η ανοικτή δομή της χρωματίνης, γνωστή ως ευχρωματίνη (δεξιά) είναι μεταγραφικά ενεργή. Η αλλαγή στη δομή της χρωματίνης (από ετεροχρωματίνη σε ευχρωματίνη) αποτελεί προϋπόθεση για να επιτραπεί σε μεταγραφικούς παράγοντες, αλλά και στην RNA πολυμεράση να αλληλεπιδράσουν με τον υποκινητή του γονιδίου και να ξεκινήσει η μεταγραφή. Στην ευχρωματίνη το DNA δεν είναι μεθυλιωμένο ενώ οι ιστόνες είναι ακετυλιωμένες.

Οι περιοχές που είναι πλούσιες σε CpG δινοκυλεοτίδια, ονομάζονται «CpG νησίδες». Περίπου το 70% των γονιδιακών υποκινητών στον άνθρωπο περιλαμβάνουν CpG νησίδες. Η υπερμεθυλίωση των CpG νησίδων που βρίσκονται σε περιοχές υποκινητών ογκοκατασταλτικών γονιδίων έχει καθιερωθεί πλέον ως ένας σημαντικός μηχανισμός γονιδιακής αδρανοποίησης<sup>4</sup>. Η σχέση μεταξύ CpG μεθυλίωσης και αποσιώπησης της γονιδιακής μεταγραφής είναι πιο έκδηλη σε δύο φυσιολογικές καταστάσεις: στην αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X και στη γονιδιακή αποτύπωση (imprinting)<sup>23</sup>. Και στις δύο καταστάσεις, το ένα από τα δύο αντίγραφα του εμπλεκόμενου γονιδίου είναι μεταγραφικά ανενεργό λόγω μεθυλίωσης του υποκινητή του, ενώ το μη μεθυλιωμένο αλληλίο εκφράζεται κανονικά. Απόδειξη του άμεσου ρόλου της μεθυλίωσης στη διατήρηση μεταγραφικής αποσιώπησης προέρχεται από μελέτες όπου άρση της μεθυλίωσης μέσω φαρμακολογικής ή γενετικής μείωσης της δραστηριότητας των DNMTs, είχε ως αποτέλεσμα αποκατάσταση της έκφρασης, σε συνδυασμό με μειωμένη μεθυλίωση των υπό μελέτη υποκινητών<sup>24</sup>.

Ο μηχανισμός με τον οποίο η CpG μεθυλίωση καταστέλλει την γονιδιακή έκφραση, έγινε πρόσφατα καλύτερα κατανοητός, τουλάχιστον *in vitro*. Οι μεθυλιωμένες CpG νησίδες αποτελούν εξαιρετικές θέσεις πρόσδεσης για πρωτεΐνες πρόσδεσης σε μεθυλιωμένο DNA (MBP: methylated DNA-binding proteins), οι οποίες έχουν συχνά ιδιότητες μεταγραφικής καταστολής, όπως η πρωτεΐνη MeCP2<sup>25</sup>. Η πρόσδεση της MeCP2 έχει ως αποτέλεσμα την προσέλκυση στην περιοχή ενός συμπλέγματος πρωτεϊνών που περιλαμβάνει και τις αποακετυλάσες των ιστονών (HDACs: histone deacetylases). Η μεθυλίωση του DNA, σε συνδυασμό με την αποακετυλίωση των ιστονών, οδηγεί στο σχηματισμό ετεροχρωματίνης. Η ετεροχρωματίνη δεν επιτρέπει την πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων οπότε και εξασφαλίζεται καταστολή της μεταγραφής. Επιγενετική αποσιώπηση μέσω μεθυλίωσης σχετίζεται επίσης και με τη μεθυλίωση της λυσίνης 9 στην ιστόνη H3 (H3K9)<sup>12</sup>. Μελέτες έχουν δείξει ότι η H3K9 μεθυλίωση είναι μία ακόμη σημαντική τροποποίηση που σχετίζεται με κλειστή δομή χρωματίνης, και ότι ένας καταρράκτης γεγονότων ακολουθεί τη μεθυλίωση του DNA (πρόσδεση της MeCP2, αποακετυλίωση της H3K9, μεθυλίωση της H3K9) και εξασφαλίζει μεταγραφική καταστολή<sup>26-28</sup> (Εικόνα 2).

## II. Κώδικας των ιστονών

Οι ιστόνες είναι μικρές πρωτεΐνες γύρω από τις οποίες περιτυλίσσεται το DNA για το σχηματισμό του νουκλεοσώματος. Οι ιστόνες H2A και H2B έχουν κυρίως δομικό ρόλο, ενώ οι ιστόνες H3 και H4 φαίνεται να έχουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής μεταγραφής<sup>29</sup>. Συγκεκριμένα, οι ιστόνες αυτές έχουν αμινοτελικά άκρα



**Εικόνα 2.** Πρωτεινόμενο μοντέλο των γεγονότων που ακολουθούν τη μεθυλίωση του DNA. Στο μεθυλιωμένο DNA, προσδένονται οι πρωτεΐνες πρόσδεσης σε μεθυλιωμένο DNA (MBP: methyl binding proteins). Αυτές προσελκύουν τις αποακετυλάσες των ιστονών και τις μεθυλάσες των ιστονών (HMTs), με αποτέλεσμα την H3K9 μεθυλίωση, που είναι μία ακόμη σημαντική τροποποίηση που σχετίζεται με κλειστή δομή χρωματίνης, εξασφαλίζοντας μεταγραφική καταστολή.

τα οποία έρχονται σε επαφή με το DNA και μπορούν να υποστούν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως ακετυλίωση, μεθυλίωση, ομπικουτινιλίωση, φωσφορυλίωση και άλλες. Το σύνολο αυτών των τροποποιήσεων αποτελούν τον «κώδικα των ιστονών»<sup>12</sup>. Η ακετυλίωση των ιστονών H3 και H4 σχετίζεται χαρακτηριστικά με ενεργοποίηση της μεταγραφικής δραστηριότητας<sup>30</sup>. Αντίθετα, η μεθυλίωση των ιστονών μπορεί να σχετίζεται με ενεργοποίηση της μεταγραφής [H3 λυσίνη 4 (H3K4)] ή αποσιώπηση (H3K9 ή H3K27)<sup>31,32</sup>.

## ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΣΤΑ ΜΔΣ

### ΜΔΣ και μεθυλίωση του DNA

Το κατά πόσο τα ΜΔΣ αντιπροσωπεύουν επιγενετικά νοσήματα είναι ακόμα υπό διερεύνηση. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις της χρωματίνης καθορίζουν ωστόσο σημαντικά τη μεταγραφική δραστηριότητα των κυττάρων και μελέτες έχουν δείξει ότι σε ασθενείς με ΜΔΣ, αποτελούν πιο συχνές διαταραχές στα αιμοποιητικά μυελικά κυττάρια, σε αντιπαράβολη με γενετικές ελλείψεις ή μεταλλάξεις<sup>33</sup>. Οι πιο πολλές μελέτες επιγενετικής στα ΜΔΣ έχουν μέχρι στιγμής επικεντρωθεί κυρίως στη μεθυλίωση του DNA.

Πολλά γονίδια έχουν βρεθεί αποσιωπημένα λόγω DNA μεθυλίωσης των υποκινητών τους σε τέτοιους ασθενείς (πίνακας 1). Σε αυτά συμπεριλαμβάνονται γο-

νίδια που θεωρούνται ογκοκατασταλτικά<sup>34,35</sup>, γονίδια που συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (*CDKN2B*), της απόπτωσης (*DAPK*, *RIL*)<sup>36,37</sup>, της αγγειογένεσης, της κυτταρικής προσκόλλησης (*CDH1*)<sup>37</sup> και σε διάφορα άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια όπως των wnt και MAPK<sup>38</sup>, με αποτέλεσμα τη διαταραχή της φυσιολογικής αιμοποίησης (Εικόνα 3).

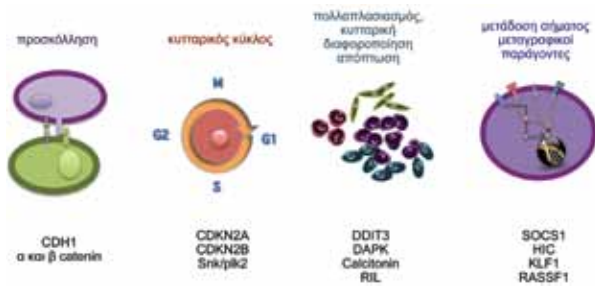
Στα ΜΔΣ, το γονίδιο *CDKN2B* έχει μελετηθεί περισσότερο, όσον αφορά την κατάσταση μεθυλίωσης του. Το ογκοκατασταλτικό αυτό γονίδιο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p15, που είναι μια κινάση που εξαρτάται από τις κυκλίνες. Μεθυλίωση του *CDKN2B* έχει περιγραφεί σε 30-80% των ασθενών με ΜΔΣ. Σε αντίθεση, άλλα γονίδια που κωδικοποιούν κινάσες που εξαρτώνται από τις κυκλίνες, όπως

το *CDKN1C*, δεν έχουν βρεθεί μεθυλιωμένα<sup>39</sup>. Το εύρος του ποσοστού μεθυλίωσης του *CDKN2B* σε ασθενείς με ΜΔΣ πιθανόν να οφείλεται στην ετερογένεια μεταξύ των δειγμάτων πληθυσμού που μελετήθηκαν, στη χρήση διαφορετικής μεθόδου μελέτης της μεθυλίωσης, ή ακόμα και αν έχει χρησιμοποιηθεί η ίδια μέθοδος, στη χρήση διαφορετικών εκκινητών για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Έτσι το *CDKN2B* έχει περιγραφεί μεθυλιωμένο με την ίδια συχνότητα σε ασθενείς με χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία, με ανθεκτική αναμία με περίσσεια βλαστών και με ΟΜΛ μετά από ΜΔΣ<sup>40-44</sup>. Σε πειραματικό μοντέλο επίμυος, απώλεια του *CDKN2B* συσχετίστηκε με αύξηση των προγονικών κυττάρων μυελικής σειράς, αλλά και με μείωση του αριθμού των προγονικών κυττάρων

**Πίνακας 1.** Γονίδια που έχουν βρεθεί μεθυλιωμένα σε ασθενείς με ΜΔΣ και συσχέτιση της κατάστασης μεθυλίωσής τους με κλινικές παραμέτρους, (TSG: tumor suppressor gene).

Γονίδιο	Συχνότητα (%)	Λειτουργία	Σημειώσεις
<b>Snk/plk2</b>	85	ρύθμιση κυτταρικού κύκλου	τάση συσχέτισης με πρόγνωση <sup>62</sup>
<b>CDKN2B (p15)</b>	23-80	αναστολή κυκλινών, ρύθμιση κυτταρικού κύκλου	TSG, συσχέτιση με πτωχή πρόγνωση, μη απόκριση σε ΧΜΘ εφόδου <sup>35,46,47</sup>
<b>DAPK1</b>	15-62	προαποπτωτική κινάση	συσχέτιση με κυτταρογενετικές ανωμαλίες <sup>37,63,64</sup>
<b>calcitonin</b>	50	διαφοροποίηση	καμία συσχέτιση με κλινικές παραμέτρους <sup>65</sup>
<b>FHIT</b>	47	μεταβολισμός πουρινών	συσχέτιση με πτωχή πρόγνωση <sup>66</sup>
<b>RIL</b>	36	προαποπτωτική πρωτεΐνη	συσχέτιση με πτωχή πρόγνωση και εξέλιξη σε ΟΜΛ <sup>36</sup>
<b>SNRPN</b>	35	αποτυπωμένο γονίδιο	καμία συσχέτιση με κλινικές παραμέτρους <sup>53</sup>
<b>MEG3</b>	35	αποτυπωμένο γονίδιο	καμία συσχέτιση με κλινικές παραμέτρους <sup>53</sup>
<b>CTNNA1 (alpha catenin)</b>	10	σύνδεση σε cadherins, προσκόλληση, κυτταρική διαφοροποίηση	σε ασθενείς υψηλού ρίσκου κατά IPSS <sup>67</sup>
<b>DDIT3</b>	32	μέλος της οικογένειας C/EBP	καμία συσχέτιση με κλινικές παραμέτρους <sup>68</sup>
<b>HIC</b>	32	καταστολή μεταγραφής	TSG, μη απόκριση σε ΧΜΘ εφόδου <sup>46</sup> , πτωχή πρόγνωση <sup>35</sup>
<b>CDH1 (e cadherin)</b>	29	προσκόλληση	συσχέτιση με πτωχή πρόγνωση, μη απόκριση σε ΧΜΘ εφόδου <sup>35,46</sup>
<b>SOCS1</b>	11-47	αναστολέας του σηματοδοτικού μονοπατιού STAT	TSG, συσχέτιση με Nras μετάλλαξη και αυξημένο κίνδυνο μετάπτωσης σε οξεία λευχαιμία <sup>69</sup>
<b>Estrogen R</b>	19	ενεργοποίηση μεταγραφής	συσχέτιση με πτωχή πρόγνωση <sup>35</sup>
<b>KLF5, KLF11</b>	7-15	μεταγραφικοί παράγοντες	καμία συσχέτιση με κλινικές παραμέτρους <sup>70</sup>
<b>RASSF1</b>	9	αρνητικός ρυθμιστής του σηματοδοτικού μονοπατιού RAS	TSG <sup>34</sup>
<b>CDKN2A (p16)</b>	8	αναστολή κυκλινών, ρύθμιση κυτταρικού κύκλου	TSG <sup>52</sup>





**Εικόνα 3.** Η μεθυλίωση του DNA σε υποκινητές γονιδίων οδηγεί σε μεταγραφική καταστολή. Σε ασθενείς με ΜΔΣ έχει περιγραφεί μεθυλίωση σε υποκινητές γονιδίων που εμπλέκονται στο φαινόμενο της προσκόλλησης, στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης αλλά και στη μεταφορά διαφόρων μηνυμάτων.

της ερυθράς σειρά, υποδηλώνοντας ότι η αδρανοποίηση του παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια των ΜΔΣ<sup>45</sup>. Η μεθυλίωση του *CDKN2B* έχει συσχετισθεί και με κλινικές παραμέτρους όπως η προχωρημένη ηλικία, η έλλειψη των 5q και 7q<sup>43</sup>, πτωχή ανταπόκριση σε χημειοθεραπεία εφόδου<sup>46</sup>, αλλά και με πτωχή πρόγνωση<sup>40,41,43,46,47</sup>. Η μεθυλίωση του *CDKN2B* επηρεάζει πολλές αιμοποιητικές σειρές, από τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα έως τα κυκλοφορούντα μονοκύτταρα<sup>48</sup>.

Σε πρόσφατη μελέτη αναφέρεται υψηλός επιπολασμός μεθυλίωσης όχι μόνο για το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *CDKN2B*, αλλά και για τα e-cadherin (*CDH-1*), death associated protein kinase (*DAPK*), και suppressor of cytokine signaling (*SOCS*)-1 με συχνότητα μεθυλίωσης 79, 48, 28 και 62% αντίστοιχα<sup>49</sup>. Για τα γονίδια *BIRC5* (survivin), *CDKN2A*, checkpoint homolog (*CHK2*) και Wilms tumor (*WT1*) έχει αναφερθεί συσχέτιση της κατάστασης μεθυλίωσής τους με τους υποτύπους κατά IPSS<sup>50</sup>. Όπως και στην ΟΜΑ, οι επιγενετικές διαταραχές σε γονίδια όπως το *CDKN2B*, *SOCS-1*, small heterodimer partner1 (*SHP1*), hypermethylated in cancer 1 (*HIC1*), maternally expressed gene 3 (*MEG3*) και small ribonucleoprotein N (*SNRPN*) έχουν αναφερθεί σε ασθενείς με ΜΔΣ και ιδιαίτερα σ' αυτούς που παρουσιάζουν αυξημένο ποσοστό βλαστών και σχετίζονται και με πτωχή πρόγνωση στα αρχικά στάδια της νόσου<sup>22,51-53</sup>. Σε μία πρόσφατη μελέτη οι Benetatos et al<sup>53</sup>, διερεύνησαν τόσο σε ΟΜΑ όσο και σε ΜΔΣ το επιγενετικό προφίλ δύο αποτυπωμένων γονιδίων (*MEG3* και *SNRPN*) που εμπλέκονται τόσο σε διαταραχές ανάπτυξης όσο και στην καρκινογένεση. Από τη μελέτη αυτή προκύπτει ότι η μεθυλίωση των γονιδίων αυτών ενδεχομένως να συμβάλλει στην παθογένεια των ΜΔΣ, αφού οι ασθενείς με δευτεροπαθείς ΟΜΑ, παρουσίασαν διαταραγμένο προφίλ μεθυλίωσης σε ποσοτό 50% και 63% για τα *MEG3* και *SNRPN* αντίστοιχα, σε σχέση με το 35% των ασθενών με ΜΔΣ. Επιπρόσθετα,

σε άλλη μελέτη με τη χρήση τεχνικών μελέτης μεθυλίωσης όλου του γονιδιώματος (genome wide methylation analysis) αναφέρεται αυξημένο ποσοστό μεθυλίωσης υποκινητών γονιδίων σε ασθενείς με ΜΔΣ και σε ακόμα μεγαλύτερο ποσοστό σε ασθενείς με δευτεροπαθή ΟΜΑ, σε σχέση με ασθενείς με *de novo* ΟΜΑ<sup>33,38</sup>, υποδηλώνοντας ότι οι επιγενετικές διαταραχές αθροίζονται με την πρόοδο της νόσου και να παίζουν σημαντικό ρόλο για την μετάπτωση σε ΟΜΑ.

Όσον αφορά στην προγνωστική αξία της μεθυλίωσης, σε μία πρόσφατη μελέτη που επικεντρώθηκε στην ποσοτική ανάλυση της κατάστασης μεθυλίωσης 10 γονιδίων σε ασθενείς με ΜΔΣ, η υπερμεθυλίωση βρέθηκε να σχετίζεται με πτωχότερη πρόγνωση. Αυτό το φαινόμενο, που πρωτοπεριγράφηκε για τον καρκίνο του παχέος εντέρου, έχει ως αποτέλεσμα την αδρανοποίηση πολλών γονιδίων με ένα ανεξήγητο μέχρι σήμερα μηχανισμό. Σε πολυπαραγοντική ανάλυση αυτή η κατάσταση υπερμεθυλίωσης βρέθηκε να σχετίζεται με ταχεία εξέλιξη σε ΟΜΑ και πτωχότερη πρόγνωση<sup>54</sup>. Αυτή η διαπίστωση βρίσκεται σε συμφωνία και με το γεγονός ότι η μεθυλίωση πολλών γονιδίων (πίνακας 1) έχει περιγραφεί να έχει προγνωστική αξία. Σε κάθε περίπτωση, γίνεται φανερό ότι στα ΜΔΣ μια σημαντική υποομάδα των ασθενών χαρακτηρίζεται από πολλαπλή γονιδιακή υπερμεθυλίωση των μυελικών αιμοποιητικών κυττάρων.

Η αυξανόμενη χρήση των τεχνικών μελέτης μεθυλίωσης όλου του γονιδιώματος (genome wide methylation analysis) έχει προσφέρει σημαντικές πληροφορίες όσον αφορά την παθοφυσιολογία των ΜΔΣ. Εκτός από το ότι έχουν αναφερθεί μεθυλιωμένα από εκατοντάδες<sup>33</sup> έως χιλιάδες γονίδια<sup>38</sup>, φαίνεται ότι η μεθυλίωση του DNA είναι πιο συχνή από τις κυτταρογενετικές ανωμαλίες<sup>33</sup>, σχετίζεται με πτωχή πρόγνωση και αυξημένο κίνδυνο μετάπτωσης σε οξεία λευχαιμία και διαφέρει ανάλογα με το στάδιο της νόσου<sup>38</sup>.

### ΜΔΣ και τροποποιήσεις των ιστονών

Τροποποιήσεις των ιστονών εμπλέκονται στην καρκινογένεση με πολλούς τρόπους. Έμμεσα, πολλά γονίδια στον καρκίνο επηρεάζουν τη γονιδιακή μεταγραφική έκφραση με την προσέλκυση ενζύμων που τροποποιούν τις ιστόνες. Για παράδειγμα η χιμαιρική πρωτεΐνη PML-RARa στην οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία, στρατολογεί αποακετυλάσες των ιστονών για να αναστείλει την έκφραση γονιδίων στόχων, συμβάλλοντας έτσι στον νεοπλασματικό φαινότυπο<sup>55</sup>. Πιο άμεσα, πολλά γονίδια, που κωδικοποιούν ένζυμα που τροποποιούν τις ιστόνες, είναι διαταραγμένα σε νεοπλασίες. Για παράδειγμα η ακετυλο-τρανσφεράση των ιστονών *CBP* είναι μεταλλαγμένη σε ορισμένες λευχαιμίες<sup>31</sup>, το γονίδιο *MLL*, που κωδικοποιεί την H3K4 μεθυλάση έχει υποστεί επίσης ανακατα-

νομή σε ένα σημαντικό ποσοστό οξείων λευχαιμιών<sup>56</sup>, το γονίδιο *RIZ1*, που κωδικοποιεί μια πιθανή μεθυλάση των ιστονών είναι επίσης αποσιωπημένο σε ορισμένες νεοπλασίες<sup>57</sup> και το γονίδιο *EZH2* μία H3K27 τριμεθυλάση υπερεκφράζεται σε διάφορες κακοήθειες<sup>58</sup>, όπου παρατηρείται επιγενετική αποσιώπηση λόγω H3K27triM<sup>59</sup>.

Όσον αφορά τα ΜΔΣ, σε αντίθεση με τη μεθυλίωση του DNA, δεν υπάρχουν ακόμα μελέτες που να διερευνούν άμεσα τις διαταραχές του κώδικα των ιστονών. Έχουν περιγραφεί ωστόσο, διαταραχές σε γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα που τροποποιούν τις ιστόνες. Συγκεκριμένα, πρόσφατα περιγράφηκαν μεταλλάξεις του γονιδίου *ASXL1*, της οικογένειας των polycomb σχετιζόμενων γονιδίων, στο 10% ασθενών με ΜΔΣ<sup>60</sup> και μεταλλάξεις του γονιδίου *EZH2*<sup>61</sup>. Δεν είναι ακόμα γνωστό κατά πόσο οι ασθενείς που φέρουν αυτές τις μεταλλάξεις έχουν και διαταραγμένο επιγενετικό προφίλ, σε επίπεδο ακετυλίωσης των ιστονών.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα ΜΔΣ χαρακτηρίζονται από επιγενετικές διαταραχές, κυρίως διαταραχές μεθυλίωσης του DNA και φαίνεται να είναι μια τόσο γενετική όσο και επιγενετική κλωνική νόσος του αιμοποιητικού ιστού. Μελέτες μεθυλίωσης μεμονωμένων γονιδίων διακρίνουν υποομάδες ασθενών με κοινό υπερμεθυλωμένο φαινότυπο, ενώ μελέτες μεθυλίωσης του γονιδιώματος (genome wide) υποδεικνύουν δι-αφορετικό πρότυπο μεθυλίωσης σε ΜΔΣ και ΟΜΛ που σχετίζεται με ΜΔΣ, σε σχέση με de novo AML, άρα η μεθυλίωση συμβαίνει στα αρχικά στάδια της νόσου ενώ η εξέλιξη της σχετίζεται με τη συσσώρευση επιπρόσθετων επιγενετικών διαταραχών. Η μελέτη των επιγενετικών διαταραχών μπορεί να συμβάλει στον καλύτερο καθορισμό της πρόγνωσης και του κινδύνου μετάπτωσης αυτών των ασθενών σε ΟΛ. Δεδομένου, ότι πολλοί από αυτούς τους ασθενείς ανταποκρίνονται σε αγωγή με υπομεθυλιωτικούς παράγοντες απαιτούνται εργασίες για την ανεύρεση προγνωστικών βιοδεικτών απόκρισης στην υπομεθυλιωτική αγωγή.

---

## Pathogenesis of MDS III: The role of epigenetic modifications

by Eleftheria Hatzimichael, Leonidas Benetatos, Evangelos Briasoulis

*Department of Haematology, University Hospital of Ioannina*

**ABSTRACT:** The myelodysplastic syndromes (MDS), one of the most common hematopoietic malignancies are a group of diverse and heterogeneous syndromes characterized by clonal proliferation, bone marrow failure, dysplasia in one or more lineages and an increased risk of development of acute myelogenous leukemia (AML). Despite advances in the genetics that accompany the disease, the molecular causes of MDS and its peculiar clinical features remain poorly understood. Epigenetics refers to the study of clonally inherited changes in gene expression without accompanying changes in DNA sequence. Epigenetic changes have been recognized in the past decade as major drivers of the malignant phenotype. There are two main mechanisms carrying epigenetic information and altering gene expression: DNA methylation and histone modifications. MDS are characterized by epigenetic changes and are now considered to be an epigenetic as well as a genetic clonal disease. Studies of individual genes are pointing to a group of patients affected by the hypermethylator phenotype, while genome wide methylation analysis studies have shown that DNA methylation is abnormal early on in MDS and that progression of the disease is associated with accumulation of additional epigenetic events. Understanding the epigenetic changes in MDS may help determine prognosis and risk progression to AML. More studies are also needed in order to identify biomarkers that will discriminate patients that will respond to treatment with hypomethylating agents.

---

## Βιβλιογραφία

1. Steensma DP, Tefferi A. The myelodysplastic syndrome(s): a perspective and review highlighting current controversies. *Leuk Res.* 2003;27:95-120.
2. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 1997;89:2079-2088.
3. Kantarjian H, O'Brien S, Ravandi F, et al. Proposal for a new risk model in myelodysplastic syndrome that accounts for events not considered in the original International Prognostic Scoring System. *Cancer.* 2008;113:1351-1361.
4. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell.* 2007;128(4):683-692.

5. Haase D. Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol.* 2008;87:515-526.
6. Padua RA, West RR. Oncogene mutation and prognosis in the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol.* 2000;111:873-874.
7. Langemeijer SM, Kuiper RP, Berends M, et al. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet.* 2009;41:838-842.
8. Rocquain J, Carbuccia N, Trouplin V, et al. Combined mutations of ASXL1, CBL, FLT3, IDH1, IDH2, JAK2, KRAS, NPM1, NRAS, RUNX1, TET2 and WT1 genes in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. *BMC Cancer.* 2010;10:401.
9. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med.* 2008;358:1148-1159.
10. Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev.* 2009;23:781-783.
11. Cedar H. DNA methylation and gene activity. *Cell.* 1988;53(1):3-4.
12. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science.* 2001;293(5532):1074-1080.
13. Santini V, Kantarjian HM, Issa JP. Changes in DNA methylation in neoplasia: pathophysiology and therapeutic implications. *Ann Intern Med.* 2001;134:573-586.
14. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100(1):57-70.
15. Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet.* 2000;16:168-174.
16. Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet.* 1999;21:163-167.
17. Rodriguez-Paredes M, Esteller M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat Med.* 2011;17:330-339.
18. Futscher BW, Oshiro MM, Wozniak RJ, et al. Role for DNA methylation in the control of cell type specific maspin expression. *Nat Genet.* 2002;31:175-179.
19. Meshorer E, Misteli T. Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7:540-546.
20. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 2002;16:6-21.
21. Li B, Carey M, Workman JL. The role of chromatin during transcription. *Cell.* 2007;128:707-719.
22. Wu SC, Zhang Y. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11:607-620.
23. Li E, Beard C, Jaenisch R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature.* 1993;366:362-365.
24. Jones PA. Altering gene expression with 5-azacytidine. *Cell.* 1985;40:485-486.
25. Cedar H, Bergman Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet.* 2009;10:295-304.
26. Fahrner JA, Eguchi S, Herman JG, Baylin SB. Dependence of histone modifications and gene expression on DNA hypermethylation in cancer. *Cancer Res.* 2002;62:7213-7218.
27. Kondo Y, Shen L, Issa JP. Critical role of histone methylation in tumor suppressor gene silencing in colorectal cancer. *Mol Cell Biol.* 2003;23:206-215.
28. Nguyen CT, Weisenberger DJ, Velicescu M, et al. Histone H3-lysine 9 methylation is associated with aberrant gene silencing in cancer cells and is rapidly reversed by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res.* 2002;62:6456-6461.
29. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet.* 2007;8:286-298.
30. Barski A, Cuddapah S, Cui K, et al. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell.* 2007;129:823-837.
31. Lehrmann H, Pritchard LL, Harel-Bellan A. Histone acetyltransferases and deacetylases in the control of cell proliferation and differentiation. *Adv Cancer Res.* 2002;86:41-65.
32. Rosenfeld JA, Wang Z, Schones DE, Zhao K, DeSalle R, Zhang MQ. Determination of enriched histone modifications in non-genic portions of the human genome. *BMC Genomics.* 2009;10:143.
33. Jiang Y, Dunbar A, Gondek LP, et al. Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. *Blood.* 2009;113:1315-1325.
34. Johan MF, Bowen DT, Frew ME, Goodeve AC, Reilly JT. Aberrant methylation of the negative regulators RASSF1A, SHP-1 and SOCS-1 in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2005;129:60-65.
35. Aggerholm A, Holm MS, Guldborg P, Olesen LH, Hokland P. Promoter hypermethylation of p15INK4B, HIC1, CDH1, and ER is frequent in myelodysplastic syndrome and predicts poor prognosis in early-stage patients. *Eur J Haematol.* 2006;76:23-32.
36. Bumber YA, Kondo Y, Chen X, et al. RIL, a LIM gene on 5q31, is silenced by methylation in cancer and sensitizes cancer cells to apoptosis. *Cancer Res.* 2007;67:1997-2005.
37. Greco M, D'Alo F, Scardocci A, et al. Promoter methylation of DAPK1, E-cadherin and thrombospondin-1 in de novo and therapy-related myeloid neoplasms. *Blood Cells Mol Dis.* 2010;45:181-185.
38. Figueroa ME, Skrabanek L, Li Y, et al. MDS and secondary AML display unique patterns and abundance of aberrant DNA methylation. *Blood.* 2009;114:3448-3458.
39. Hatzimichael E, Dasoula A, Benetatos L, et al. The absence of CDKN1C (p57KIP2) promoter methylation in myeloid malignancies also characterizes plasma cell neoplasms. *Br J Haematol.* 2008;141:557-558.
40. Uchida T, Kinoshita T, Nagai H, et al. Hypermethylation of the p15INK4B gene in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 1997;90:1403-1409.
41. Quesnel B, Guillerm G, Vereecque R, et al. Methylation of the p15(INK4b) gene in myelodysplastic syndromes is frequent and acquired during disease progression. *Blood.* 1998;91:2985-2990.
42. Au WY, Fung A, Man C, et al. Aberrant p15 gene promoter methylation in therapy-related myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukaemia: clinicopathological and karyotypic associations. *Br J Haematol.* 2003;120:1062-

- 1065.
43. Christiansen DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J. Methylation of p15INK4B is common, is associated with deletion of genes on chromosome arm 7q and predicts a poor prognosis in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2003;17:1813-1819.
  44. Tien HF, Tang JH, Tsay W, et al. 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*. 2001;112:148-154.
  45. Rosu-Myles M, Taylor BJ, Wolff L. Loss of the tumor suppressor p15Ink4b enhances myeloid progenitor formation from common myeloid progenitors. *Exp Hematol*. 2007;35:394-406.
  46. Grovdal M, Khan R, Aggerholm A, et al. Negative effect of DNA hypermethylation on the outcome of intensive chemotherapy in older patients with high-risk myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia following myelodysplastic syndrome. *Clin Cancer Res*. 2007;13:7107-7112.
  47. Kim M, Oh B, Kim SY, et al. p15INK4b methylation correlates with thrombocytopenia, blast percentage, and survival in myelodysplastic syndromes in a dose dependent manner: quantitation using pyrosequencing study. *Leuk Res*. 2010;34:718-722.
  48. Aoki E, Uchida T, Ohashi H, et al. Methylation status of the p15INK4B gene in hematopoietic progenitors and peripheral blood cells in myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2000;14:586-593.
  49. Fandy TE, Herman JG, Kerns P, et al. Early epigenetic changes and DNA damage do not predict clinical response in an overlapping schedule of 5-azacytidine and entinostat in patients with myeloid malignancies. *Blood*. 2009;114:2764-2773.
  50. Hopfer O, Komor M, Koehler IS, et al. DNA methylation profiling of myelodysplastic syndrome hematopoietic progenitor cells during in vitro lineage-specific differentiation. *Exp Hematol*. 2007;35:712-723.
  51. Cheng LC, Tavazoie M, Doetsch F. Stem cells: from epigenetics to microRNAs. *Neuron*. 2005;46:363-367.
  52. Boultonwood J, Wainscoat JS. Gene silencing by DNA methylation in haematological malignancies. *Br J Haematol*. 2007;138:3-11.
  53. Benetatos L, Hatzimichael E, Dasoula A, et al. CpG methylation analysis of the MEG3 and SNRPN imprinted genes in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 2010; 34: 148-153.
  54. Shen L, Kantarjian H, Guo Y, et al. DNA methylation predicts survival and response to therapy in patients with myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*. 2010;28:605-613.
  55. Mistry AR, Pedersen EW, Solomon E, Grimwade D. The molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukaemia: implications for the clinical management of the disease. *Blood Rev*. 2003;17:71-97.
  56. Armstrong SA, Golub TR, Korsmeyer SJ. MLL-rearranged leukemias: insights from gene expression profiling. *Semin Hematol*. 2003;40:268-273.
  57. Du Y, Carling T, Fang W, Piao Z, Sheu JC, Huang S. Hypermethylation in human cancers of the RIZ1 tumor suppressor gene, a member of a histone/protein methyltransferase superfamily. *Cancer Res*. 2001;61:8094-8099.
  58. Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, et al. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature*. 2002;419:624-629.
  59. Kondo Y, Shen L, Cheng AS, et al. Gene silencing in cancer by histone H3 lysine 27 trimethylation independent of promoter DNA methylation. *Nat Genet*. 2008;40:741-750.
  60. Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adelaide J, et al. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2009;145:788-800.
  61. Nikoloski G, Langemeijer SM, Kuiper RP, et al. Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet*. 2010;42:665-667.
  62. Benetatos L, Dasoula A, Hatzimichael E, et al. Polo-like kinase 2 (SNK/PLK2) is a novel epigenetically regulated gene in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes: genetic and epigenetic interactions. *Ann Hematol*. 2011.
  63. Qian J, Yao DM, Lin J, et al. Methylation of DAPK1 promoter: frequent but not an adverse prognostic factor in myelodysplastic syndrome. *Int J Lab Hematol*. 2010;32(1 Pt 2):74-81.
  64. Wu X, Liu W, Tian Y, Xiao M, Wu Y, Li C. Aberrant methylation of death-associated protein kinase 1 CpG islands in myelodysplastic syndromes. *Acta Haematol*. 2011;125:179-185.
  65. Ihalainen J, Pakkala S, Savolainen ER, Jansson SE, Palotie A. Hypermethylation of the calcitonin gene in the myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 1993;7:263-267.
  66. Lin J, Yao DM, Qian J, et al. Methylation status of fragile histidine triad (FHIT) gene and its clinical impact on prognosis of patients with myelodysplastic syndrome. *Leuk Res*. 2008;32:1541-1545.
  67. Ye Y, McDevitt MA, Guo M, et al. Progressive chromatin repression and promoter methylation of CTNNA1 associated with advanced myeloid malignancies. *Cancer Res*. 2009;69:8482-8490.
  68. Lin J, Wang YL, Qian J, et al. Aberrant methylation of DNA-damage-inducible transcript 3 promoter is a common event in patients with myelodysplastic syndrome. *Leuk Res*. 2010;34:991-994.
  69. Wu SJ, Yao M, Chou WC, et al. Clinical implications of SOCS1 methylation in myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol*. 2006;135:317-323.
  70. Potapova A, Hasemeier B, Romermann D, et al. Epigenetic inactivation of tumour suppressor gene KLF11 in myelodysplastic syndromes\*. *Eur J Haematol*. 2010;84:298-303.