



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ ΚΑΙ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ**

**ΙΩΑΝΝΗΣ ΤΣΟΥΡΒΕΛΟΥΔΗΣ**

**ΕΠΙΜΕΛΗΤΗΣ Α' ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟΥ ΓΕΝΙΚΟΥ**  
**ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟΥ ΛΑΡΙΣΑΣ**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΑΝ/ΜΙΟΥ**  
**ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ (Επιβλέπουσα)**

**ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ, ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΠΑΝ/ΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ (Μέλος Τριμελούς Επιτροπής)**

**ΔΗΜΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΠΑΝ/ΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ (Μέλος Τριμελούς Επιτροπής)**

**ΛΑΡΙΣΑ, 2018**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

**EPIGENETICS IN MYELODYSPLASTIC SYNDROMES**

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πρόσφατη περιγραφή των επιγενετικών αλλαγών σε συνδυασμό με τις γενετικές διαταραχές που παρατηρούνται στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα αλλά και στο σύνολο των νεοπλασματικών νοσημάτων προσέφερε σημαντικές πληροφορίες στην κατανόηση των συνδρόμων, στην διερεύνηση της αιτιοπαθογένειάς τους καθώς και των μηχανισμών εξέλιξης και κλινικής εκδήλωσής αυτών. Στην παρούσα διπλωματική εργασία θα επιχειρηθεί η συσχέτιση των επιγενετικών τροποποιήσεων με την κλινική πορεία των μυελοδυσπλαστικών νοσημάτων και η διερεύνηση της αποτελεσματικότητας καινούργιων ειδικά στοχευμένων θεραπειών με την συμβολή της μοριακής βιολογίας πάντα σε συνδυασμό με την εφαρμογή εδραιωμένης χημειοθεραπευτικής αγωγής. Τέλος θα αναζητηθούν απαντήσεις στα ζητήματα της λευχαιμογένεσης, της ανάπτυξης ανθεκτικών κλώνων και της πιθανής υποστροφής του φαινομένου με την βοήθεια της επιγενετικής.

## **ABSTRACT**

Recent description of epigenetic modifications in combination with genetic alterations seen in myelodysplastic syndromes and in all clonal diseases offered important information in understanding malignant diseases by examining their pathogenesis, their mechanism of evolution and clinical expression. In the present Master's thesis a correlation of epigenetic changes to the clinical course of myelodysplastic syndromes will be presented as well as the efficacy of targeted contemporary therapies with the assistance of molecular biology and established chemotherapy. Furthermore, the contribution of epigenetics, as DNA methylation, histone modifications and small non-coding mRNAs, will be discussed regarding oncogenesis, expansion of resistant clones and possible resolution of myelodysplastic syndromes.

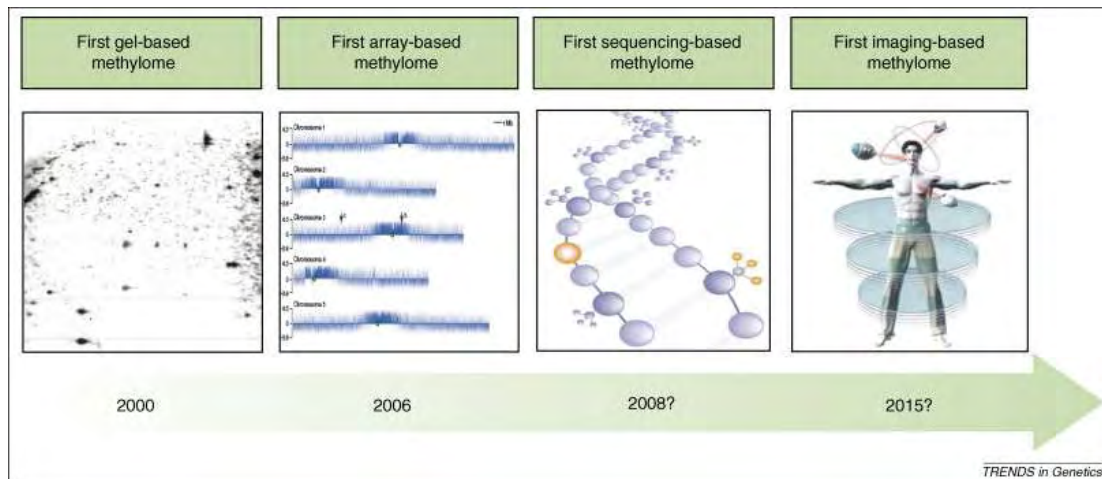
## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
1. Εισαγωγή / Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα	6
1.1 Ορισμός μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων	7
1.2 Ταξινόμηση της WHO	9
1.3 Προγνωστικοί δείκτες	12
1.4 Κυτταρογενετικά ευρήματα	13
1.5 Σωματικές μεταλλάξεις στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα	15
1.6 MDS: μοντέλο επιγενετικής ρύθμισης	17
2. Μεταλλάξεις στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα και επιγενετική	20
2.1 Μεθυλίωση του DNA	20
2.1.1 DNA μεθυλοτρανσφεράσες	21
2.1.2 Πρωτεΐνη TET2	25
2.1.3 Αφυδρογονάσες IDH1/IDH2	27
2.1.4 Μεθυλίωση του DNA και θεραπείες στα MDS	31
2.2 Τροποποιήσεις των ιστονών	35
2.2.1 Σύμπλοκο PcG	37
2.2.2 EZH1, EZH2, SUZ12	37
2.2.3 Παράγων ASXL1	38
3. Micro-RNAs	41
4. MDS del5q	44
5. Εξωσωμικά miRNAs	49
6. Νέα δεδομένα για τους επιγενετικούς μηχανισμούς στις αιματολογικές νεοπλασίες MDS	52
7. Συμπεράσματα	54
8. Βιβλιογραφία	55

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Με τον όρο επιγενετική εννοούμε το σύνολο των μηχανισμών που μεταβάλλουν τη γονιδιακή έκφραση συμβάλλοντας τόσο στη διαφοροποίηση των κυττάρων όσο και στη μεταβολή των ιδιοτήτων των ώριμων/διαφοροποιημένων σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις. Το βασικό χαρακτηριστικό των επιγενετικών μηχανισμών είναι ότι οδηγούν σε κληρονομήσιμες αλλαγές που όμως δεν περιλαμβάνουν μεταβολές στην αλληλουχία των βάσεων του DNA. Οι μηχανισμοί αυτοί βασικά περιλαμβάνουν τη μεθυλίωση του DNA και τη μετα-μεταγραφική τροποποίηση των ιστονών<sup>1</sup>.

Για την μελέτη του επιγενώματος έχουν σχεδιασθεί ειδικοί χάρτες και άτλαντες αρχέγονων κυττάρων διαφορετικών ιστών με αναλυτική καταγραφή παραμέτρων όπως το μεθύλωμα (Εικόνα 1), το *ιστωμα* (μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών και των ενζύμων που τις καταλύουν) και τα μη κωδικοποιητικά *RNAs* (*miRNAs*).<sup>2</sup>



Εικόνα 1: Μεθύλωμα 2000-2018, Beck S. et al. (2008)

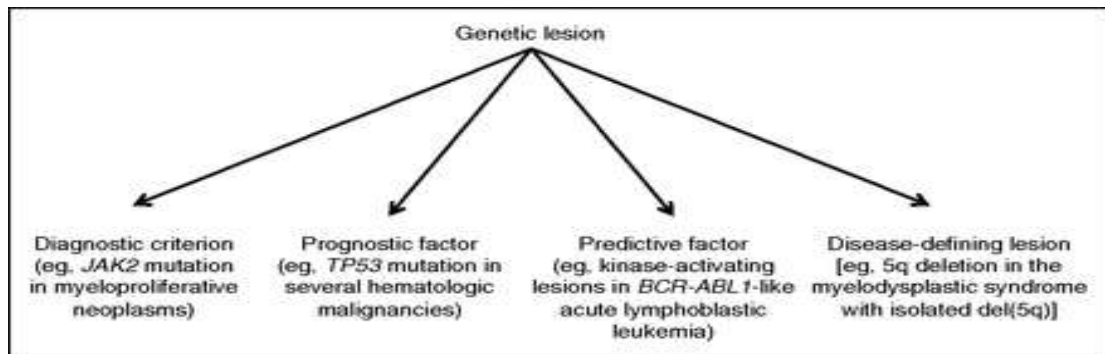
## ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ

### 1.1 Ορισμός μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων

Στον μυελό των οστών παράγονται και διαφοροποιούνται τα κύτταρα των τριών αιμοποιητικών σειρών (ερυθροκυτταρική, κοκκιώδης και μεγακαρυοκυτταρική). Τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα περιλαμβάνουν μια ομάδα κλωνικών μυελικών νοσημάτων με κυτταρογενετικές βλάβες, μη αποδοτική ερυθροποίηση, μορφολογικές και ποσοτικές διαταραχές των τριών αιμοποιητικών σειρών και μελλοντική εξέλιξη σε οξεία μυελογενή λευχαιμία ανάλογα με το στάδιο της νόσου<sup>3</sup>.

Σύμφωνα δε με τη νεότερη αναθεωρημένη ταξινόμηση MDS της WHO (2016), σημαντικές παραμέτρους αποτελούν η παρατήρηση δυσπλαστικών αλλοιώσεων στα κύτταρα του περιφερικού αίματος και του μυελού, η παρουσία καρυοτυπικών ευρημάτων, σημειακών μεταλλάξεων που ανιχνεύονται με αλληλούχιση νέας γενιάς και παθολογικών ανοσοφαινοτυπικών ευρημάτων με την κυτταρομετρία ροής. Στην ευρύτερη κατηγορία των MDS σήμερα κατατάσσονται σύνδρομα με κοινά χαρακτηριστικά με τα μυελοϋπερπλαστικά σύνδρομα (MDS/MPN), νεοπλάσματα με ανωμαλίες του PCM1-JAK2 ή των υποδοχέων PDGFRA, PDGFRB καθώς και η ξεχωριστή υποκατηγορία del(5q) με ή χωρίς την συνύπαρξη δακτυλιοειδών σιδηροβλαστών και με συγκεκριμένη θεραπευτική αντιμετώπιση<sup>4</sup>.

Η ενσωμάτωση κυτταρογενετικών ευρημάτων σε κλινικές οντότητες όπως τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα κρίθηκε αναγκαία, καθώς η ταξινόμηση με βάση την μορφολογία δεν απεδείχθη επαρκής για την διαγνωστική, προγνωστική και θεραπευτική προσέγγιση των νοσημάτων. Στο πλαίσιο αυτό η εισαγωγή δεικτών όπως η μετάλλαξη JAK2 ή το έλλειμμα 5q- (Εικόνα 2) επέφερε σημαντική πρόοδο στην ακριβέστερη κατηγοριοποίηση και αντιμετώπιση νοσημάτων όπως π.χ. τα σύνδρομα MDS/MPN που μοιράζονται τα χαρακτηριστικά τόσο των μυελοδυσπλαστικών όσο και των μυελοϋπερπλαστικών νοσημάτων<sup>5</sup>.

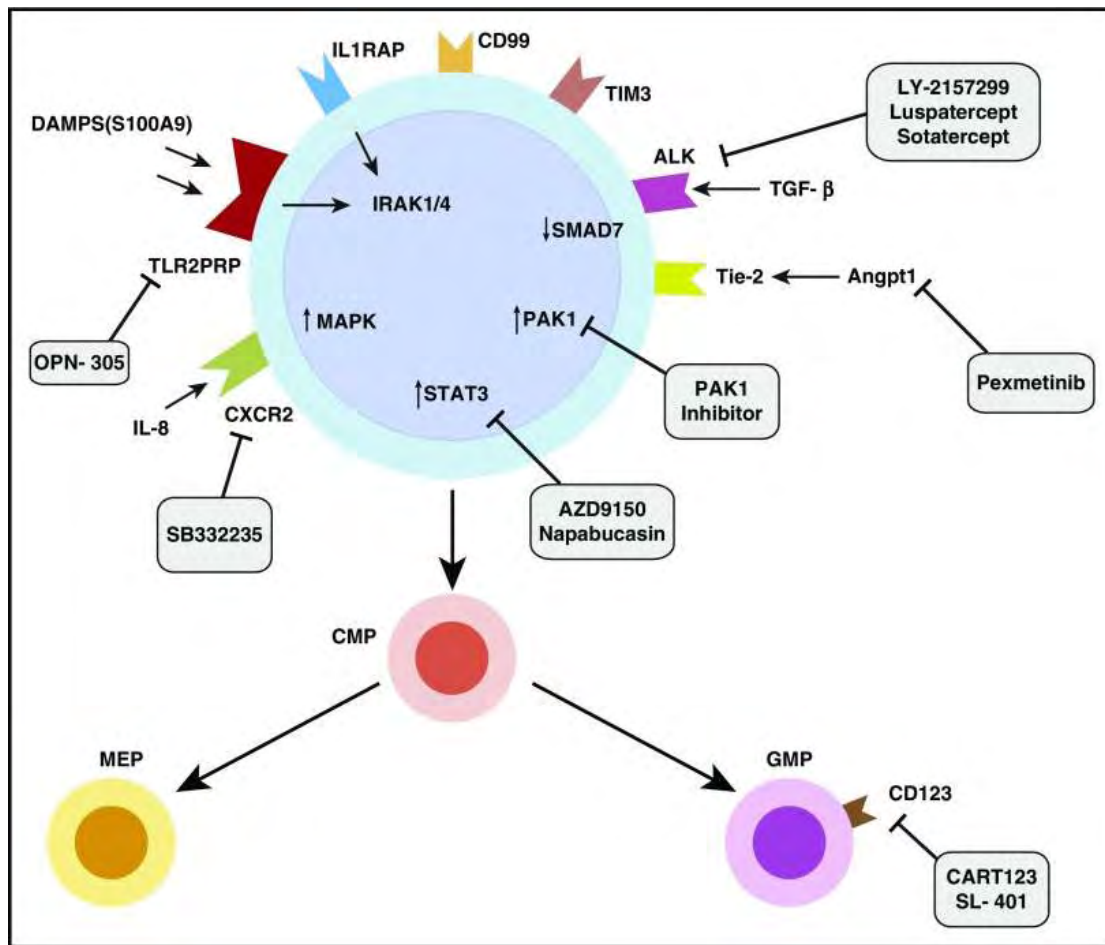


Εικόνα 2 : Νέοι δείκτες στην ταξινόμηση των MDS (Cazzola M et al. 2016)

Ιδιαίτερης αξίας κατέστη εξάλλου η προσθήκη (στην κατηγοριοποίηση των κλωνικών αιματολογικών νοσημάτων) μεταλλάξεων στα RUNX1, GATA1,2, PTPN11, SRP72, CSN1K1A1 σε επίπεδο αρχέγονων βλαστικών κυττάρων. Η παρουσία των μεταλλάξεων αυτών μπορεί να εμφανίζεται σε συγκεκριμένες ηλικιακές ομάδες ή με ιδιαίτερες κλινικές εκδηλώσεις, αν και το πλέον ξεκάθαρο πρότυπο σύνδεσης μοριακής βλάβης-μορφολογικών αλλοιώσεων-θεραπείας εκλογής αποτελεί το μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο 5q- στο οποίο απλοανεπάρκεια του RPS14 συμβάλλει στην αναιμία του συνδρόμου ενώ η παράλληλη παρουσία μεταλλάξεων του p53 επιβαρύνει την πρόγνωση και επιβάλλει την χορήγηση του φαρμάκου λεναλιδομίδη με ικανοποιητικά αποτελέσματα<sup>6</sup>.

Υπερέκφραση των υποδοχέων Toll και του σηματοδοτικού μονοπατιού IL1RAP (επικουρική πρωτεΐνη του υποδοχέα της ιντερλευκίνης 1), του μεταγραφικού ενεργοποιητή 3, της ενεργοποιημένης κινάσης p21 και του TGF-β έχουν παρατηρηθεί στα πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα των ασθενών με MDS και αποτελούν θεραπευτικό στόχο για την εφαρμογή νεότερων φαρμακευτικών επιλογών. Η διαπίστωση κυτταρογενετικών ελλειμμάτων όπως του χρωμοσώματος 7 σε συνδυασμό με την ενεργοποίηση του IL1RAP (Εικόνα 3) ή την υπερέκφραση του CD99, καθιστούν ορισμένους από τους δείκτες αυτούς αρνητικούς προγνωστικούς παράγοντες. Αναλόγως η συνύπαρξη μεταλλάξεων του CEBPA και του παράγοντα TIM3 της ανοσοσφαιρίνης του T-λεμφοκυττάρου σε επίπεδο πολυδύναμου αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου αποτελεί αντικείμενο διερεύνησης νέων προγνωστικών δεικτών τόσο για τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα όσο και για τις οξείες μυελογενείς λευχαιμίες<sup>7</sup>.





Εικόνα 3: Ανίχνευση και στόχευση διαταραχών των προδρόμων αιμοποιητικών κυττάρων, Shastri A et al. (2017).

## 1.2 Ταξινόμηση μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων

Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα-ταξινόμηση WHO 2016:

Στο πλέον πρόσφατο σύστημα ταξινόμησης MDS της WHO του 2016 (Εικόνα 4) προστίθενται οι παράμετροι:<sup>8</sup>

-μονογραμμική, διγραμμική, τριγραμμική δυσπλασία για να περιγραφεί ο βαθμός συμμετοχής των τριών κυτταρικών σειρών στην μη αποδοτική αιμοποίηση μετά από μικροσκόπηση επιχρισμάτων μυελού/περιφερικού αίματος,

-αριθμός κυτταροπενιών για να αποδοθεί ποσοτικά το έλλειμμα των τριών κυτταρικών σειρών στο περιφερικό αίμα,

- δακτυλοειδείς σιδηροβλάστες σε επίπεδο προδρόμων κυττάρων της ερυθράς σειράς,
- ποσοστο βλαστών (<1% , >5% , 2-4%) με την παρουσία ή όχι σωματίων Auer,
- del 5q με ή χωρίς την συνύπαρξη άλλων κυτταρογενετικών βλαβών, πέραν των del(7q) / -7,
- αταξινόμητα MDS.<sup>9</sup>

Proposed new MDS nomenclature	WHO 2008 translation
■ MDS with single lineage dysplasia (MDS-SLD)	= RCUD
■ MDS-SLD with ring sideroblasts	= RARS
■ MDS with multilineage dysplasia	= RCMD
– MDS-MLD with ring sideroblasts	= RCMD-RS
■ MDS with isolated* del(5q)	
■ MDS with excess blasts	
– MDS-EB1	= RAEB-1
– MDS-EB2	= RAEB-2
■ MDS, unclassifiable (MDS-U)	

Εικόνα 4: αναθεωρημένη ταξινόμηση των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων, Ankit Raiyani (2016)

Η σημαντικότερη διαφοροποίηση από την αντίστοιχη ταξινόμηση των MDS ενηλίκων του 2008 είναι η απαλοιφή του όρου *ανθεκτική αναιμία* και η αντικατάστασή του από το *MDS με την αντίστοιχη βλάβη* (μονογραμμική, διγραμμική ή τριγραμμική δυσπλασία, παρουσία δακτυλοειδών σιδηροβλαστών, περίσσεια βλαστών). Η έκφραση *ανθεκτική αναιμία* στη νέα ταξινόμηση περιορίζεται στην περιγραφή μιας υποκατηγορίας μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου της παιδικής ηλικίας<sup>10</sup>.

Εξακολουθεί να αποτελεί διαγνωστικό κριτήριο της νόσου η ανεύρεση δυσπλαστικών ευρημάτων σε ποσοστό τουλάχιστον 10% των κυττάρων του μυελού

(αν και στη νέα ταξινόμηση είναι δυνατό να χαρακτηριστεί ως μυελοδυσπλαστικό ένα σύνδρομο με ποσοστό δυσπλαστικών κυττάρων μικρότερο του 10% που όμως φέρει διαπιστωμένη γενετική βλάβη, για παράδειγμα τα αταξινόμητα MDS)<sup>11</sup>.

Μορφολογικά ευρήματα δυσερυθροποίησης όπως μεγαλοβλαστοειδείς ερυθροβλάστες, ασυγχρονία ωρίμανσης πυρήνα/πρωτοπλάσματος, δυσκοκκιοποίηση (μειωμένη κοκκίωση, στροφή της κοκκιάδους σειράς αριστερά), δυσμεγακαρυοποίηση (υπολοβωμένα μεγακαρυοκύτταρα/μικρομεγακαρυοκύτταρα) αποτελούν εξίσου σημαντικά κριτήρια δυσπλασίας και στη νέα ταξινόμηση<sup>12</sup>.

Εξάλλου η συχνή παρουσία δυσπλαστικών αλλοιώσεων σε άτυπες μορφές μυελοϋπερπλαστικών νεοπλασμάτων όπου παρατηρείται αυξημένη εκπροσώπηση μίας ή περισσοτέρων μυελικών σειρών όπως η άτυπη χρόνια μυελογενής λευχαιμία bcr-abl αρνητική, η νεανική χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία ή η θρομβοκυτταραιμία με τη συνύπαρξη δακτυλιοειδών σιδηροβλαστών οδήγησε στην συμπερίληψή τους στις υποκατηγορίες των MDS<sup>12</sup> (Πίνακας 1).

## 2016 WHO Classification of Myeloid Neoplasms

WHO Classification -- Subtypes of MDS	
MDS with single lineage dysplasia	MDS with excess blasts in transformation
MDS with ring sideroblasts	Chronic myelomonocytic leukemia (CMML-1)
MDS with multilineage dysplasia	CMML-2
MDS with excess blasts-1	Atypical chronic myeloid leukemia, <i>BCRABL1</i> negative
MDS with excess blasts-2	Chronic neutrophilic leukemia
MDS, unclassifiable	Juvenile myelomonocytic leukemia
MDS with isolated del(5q)	MDS/MPN unclassifiable
Refractory cytopenias of childhood	MDS/MPN with ring sideroblast and thrombocytosis

Arber DA, et al. *Blood*. 2016;127:2391-2405.  
NCCN Guidelines. Myelodysplastic Syndromes. V1.2017.

*Πίνακας 1 : Ταξινόμηση μυελικών νεοπλασιών της WHO, Arber et al. (2016)*

Ακολουθώντας το αναθεωρημένο προγνωστικό σύστημα IPSS-R τα MDS ταξινομούνται σε αρκετά ικανοποιητικής πρόγνωσης, καλής, ενδιάμεσης, πτωχής και ιδιαίτερα πτωχής πρόγνωσης ανάλογα με τον αριθμό και την έκταση των

κυτταροπενιών, το ποσοστό των βλαστικών κυττάρων και την παρουσία συγκεκριμένων κυτταρογενετικών ευρημάτων<sup>12</sup> (Πίνακας 2).

**Table 2: The risk score IPSS-R (International prognostic scoring system - revised)**

Characteristics	Score values						
	0	0.5	1	1.5	2	3	4
<b>Cytogenetics</b>	Very good	-	Good	-	Intermediate	Poor	Very poor
<b>Blasts BM, %</b>	≤2	-	>2 - <5	-	5-10	>10	-
<b>Hb</b>	≥10	-	8-<10	<8	-	-	-
<b>Platelets</b>	≥100	50-<100	<50	-	-	-	-
<b>Neutrophils</b>	≥0.8	<0.8	-	-	-	-	-

Risk groups		Cytogenetic risk groups			
		Prognostic subgroup	Cytogenetic Aberration	Median survival, yrs	Median AML-evolution 25%, yrs
<b>Very low</b>	≤1.5	Very good	-Y, del(11q)	5.4	NR
<b>Low</b>	>1.5 – 3	Good	Normal, del(5q), del(12p), del(20q), double including del(5q)	4.8	9.4
<b>Intermediate</b>	>3 – 4.5	Intermediate	del(7q), +8, +19, i(17q), any other single or double independent clones	2.7	2.5
<b>High</b>	>4.5 - 6	Poor	-7, inv(3)/t(3q)/del(3q), double including -7/del(7q), complex: 3 abnormalities	1.5	1.7
<b>Very high</b>	>6	Very poor	Complex: >3 abnormalities	0.7	0.7

[www.ipss-r.com/](http://www.ipss-r.com/) Greenberg P et al., Blood, 2012

Πίνακας 2: αναθεωρημένο IPSS-R, Greenberg et al. (2012)

### 1.3 Προγνωστικοί δείκτες

Η προσθήκη παραμέτρων όπως η LDH, η β2-μικροσφαιρίνη, ή η φερριτίνη ορού αποκτούν ιδιαίτερη προγνωστική αξία. Με το τροποποιημένο σύστημα IPSS-RA ενσωματώνοντας την ηλικία των ασθενών λαμβάνουμε πληροφορίες για την συνολική επιβίωσή τους<sup>13</sup>.

Με την διεύρυνση του νέου προγνωστικού συστήματος περιγράφονται πλέον πέντε καρυοτυπικές υποομάδες ασθενών έναντι τριών στο προηγούμενο προγνωστικό μοντέλο ενώ στο ποσοστό των βλαστικών κυττάρων προσετέθη και η υποκατηγορία με βλάστες 2%-4%. Ποσοστό βλαστών 10-30% (MDS με περίσσεια βλαστών 1,2 στην προηγούμενη κατηγοριοποίηση) επιταχύνει στον ίδιο βαθμό την εκτροπή σε οξεία μυελογενή λευχαιμία. Η παρουσία ίνωσης στον μυελό δεν αποτελεί ως σήμερα επίσημο προγνωστικό παράγοντα καθώς οι μελέτες που την συμπεριέλαβαν δεν κατέληξαν σε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα<sup>14</sup>.

Με το IPSS-R προσφέρεται επιπλέον η δυνατότητα να διαχωρισθούν οι ασθενείς με νοσήματα δυσμενούς πρόγνωσης σε εκείνους που θα εκδηλώσουν λευχαιμική εκτροπή/ελαττωμένη επιβίωση και σε άλλους που θα παρουσιάσουν σοβαρές και δυνητικά θανατηφόρες επιπλοκές ενός κατά τα άλλα χρονίου νοσήματος όπως αιμορραγική διάθεση ή λοιμώξεις<sup>15</sup>.

Λεπτομερέστερη είναι δε η κυτταρογενετική ανάλυση καθώς γίνεται λόγος για ασθενείς με περισσότερες των τριών χρωμοσωμικές βλάβες και ιδιαιτέρως πτωχή πρόγνωση (δυσμενέστερη όλων), για ελλείματα των χρωμοσωμάτων 3, 7, αναστροφή του χρωμοσώματος 3, παρουσία ως και τριών κυτταρογενετικών διαταραχών με δυσμενή πρόγνωση, ενώ η ανίχνευση του del(20q), του del(5q) (μόνη ή σε συνδυασμό με μία άλλη βλάβη) χαρακτηρίζουν πάσχοντες με ικανοποιητική πρόγνωση και πρόκειται για το μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών (66-72%)<sup>16</sup>.

#### 1.4 Κυτταρογενετικά ευρήματα

Κυτταρογενετικά ευρήματα (ελλείματα ή διπλασιασμοί) που συναντώνται στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα είναι<sup>17</sup>:

7q- -7  
13q- -13 +13  
9q- +9  
5q- -5  
11q- +11  
-Y  
17p- -17  
+21  
+1  
+8  
Del(12p)  
-18  
+19  
+21  
+6  
Del (11q23)

με την συχνότητά τους να αποτυπώνεται<sup>17</sup> στον Πίνακα 3:

**Table 1** Incidence of chromosome abnormalities in MDS related to 2,072 patients examined successfully

Anomaly	total, n (% of all cases)	Isolated, n (% <sup>a</sup> )	With one additional abnormality, n (% <sup>b</sup> )	As part of complex abnormalities, n (% <sup>b</sup> )
5q-	312 (15.1)	146 (47)	52 (17)	114 (36)
-7/7q-	230 (11.1)	86 (37.5)	31 (13.5)	113 (49)
+8	173 (8.4)	81 (46.8)	37 (21.4)	55 (31.8)
-18/18q-	78 (3.8)	3 (3.8)	2 (2.6)	73 (93.6)
20q-	74 (3.6)	36 (48.6)	10 (13.5)	28 (37.8)
-5	69 (3.3)	1 (1.4)	4 (5.8)	64 (92.8)
-Y	58 (2.8)	41 (70.7)	5 (8.6)	12 (20.7)
+21	45 (2.2)	5 (11.1)	18 (40)	22 (48.9)
-17/17p-	42 (2.0)	1 (2.4)	1 (2.4)	40 (95.2)
inv/t(3q)	41 (2.0)	16 (39)	8 (19.5)	17 (41.5)
-13/13q-	40 (1.9)	5 (12.5)	6 (15)	29 (72.5)
+1/+1q	37 (1.8)	3 (8.1)	6 (16.2)	28 (75.7)
-21	33 (1.6)	3 (9.1)	4 (12.1)	26 (78.8)
+11	28 (1.4)	6 (21.4)	4 (14.3)	18 (64.3)
-12	26 (1.3)	0	2 (7.7)	24 (92.3)
12p-	25 (1.2)	7 (28)	6 (24)	12 (48)
t(5q)	24 (1.2)	6 (25)	3 (12.5)	15 (62.5)
11q-	23 (1.1)	8 (34.8)	4 (17.4)	11 (47.8)
9q-	23 (1.1)	8 (34.8)	3 (13)	12 (52.2)
t(7q)	22 (1.1)	6 (27.3)	6 (27.3)	10 (45.5)
-20	22 (1.1)	0	0	22 (100)

<sup>a</sup> Of cases with the respective abnormality.

*Πίνακας 3: Χρωμοσωμικές ανωμαλίες σε ασθενείς με MDS, Haase D et al. (2008)*

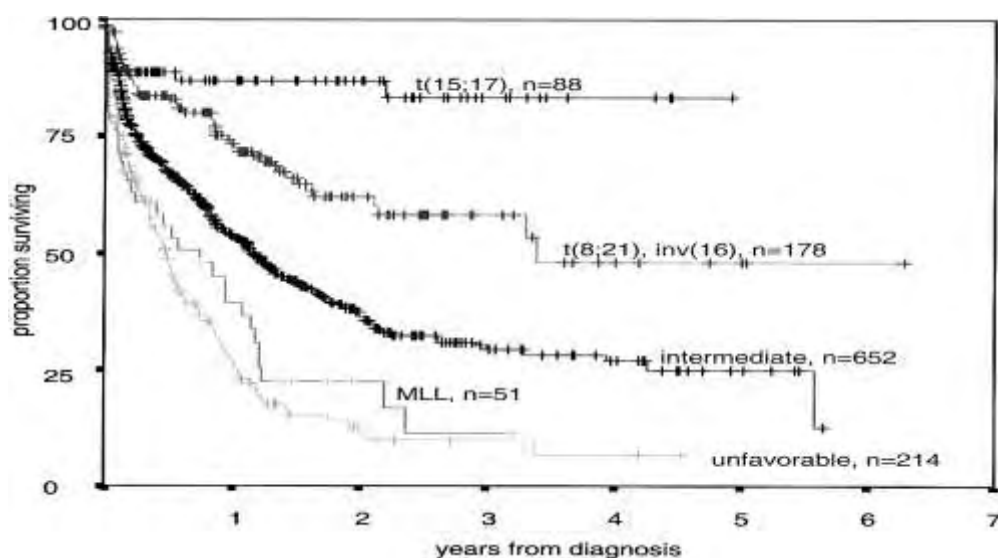
καθώς και οι ισοζυγισμένες μεταθέσεις:

- t (3;21) (q26.2;q22.1),
- t (6;9) (p23;q34),
- t (1;3) (p36.3;q21.2),
- t (5;12) (q33;p13),
- t (3;5) (q25;q34),
- t (1;15) (q11;p11),
- t (11;16) (q23;p13.3),
- t(1:16) (q11:q11)<sup>18</sup>,

κάποιες εξ' αυτών με ευνοϊκή πρόγνωση (del5q, del11q), άλλες με πτωχή (del3q, del7q) ενώ η συνεύρεση περισσότερων των τριών καρυοτυπικών ευρημάτων (σύνθετος καρυότυπος) επιβαρύνει περαιτέρω την πρόγνωση. Συχνή είναι η ανίχνευση -Y σε άρρενα άτομα στο πλαίσιο της φυσιολογικής γήρανσης ενώ το

έλλειμμα del(20q) συναντάται και στα δευτεροπαθή MDS (μετά από χορήγηση χημειοθεραπείας για άλλη κακοήθεια)<sup>19</sup>.

Ιδιαίτερη μνεία γίνεται στην αναδιάταξη της περιοχής του MLL 11q23 (Εικόνα 5) που ανιχνεύεται στα δευτεροπαθή (έπειτα από λήψη χημειοθεραπείας) μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα και στην δευτεροπαθή (μετά από εκτροπή MDS) οξεία μονοβλαστική λευχαιμία (M4/M5 κατά FAB) συχνά μαζί με ελλείματα του χρωμοσώματος 7 και δυσμενέστατη πρόγνωση<sup>20</sup>.



Εικόνα 5:Συνολική επιβίωση ασθενών με την μετάλλαξη 11q23, Schoch et al Blood (2003)

Διαταραχές του X χρωμοσώματος (Xq13) εντοπίζονται τέλος σε περιπτώσεις ανθεκτικής αναιμίας με ή χωρίς την παρουσία δακτυλιοειδών σιδηροβλαστών<sup>21</sup>.

### 1.5 Σωματικές μεταλλάξεις στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα

Λεπτομερής αλληλούχιση του γονιδιώματος ασθενών με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα ανέδειξε ένα περίπλοκο δίκτυο κυτταρικών οδών που συμβάλλουν στην γένεσή τους μέσω σωματικών μεταλλάξεων σε γονίδια ρυθμιστές των μονοπατιών

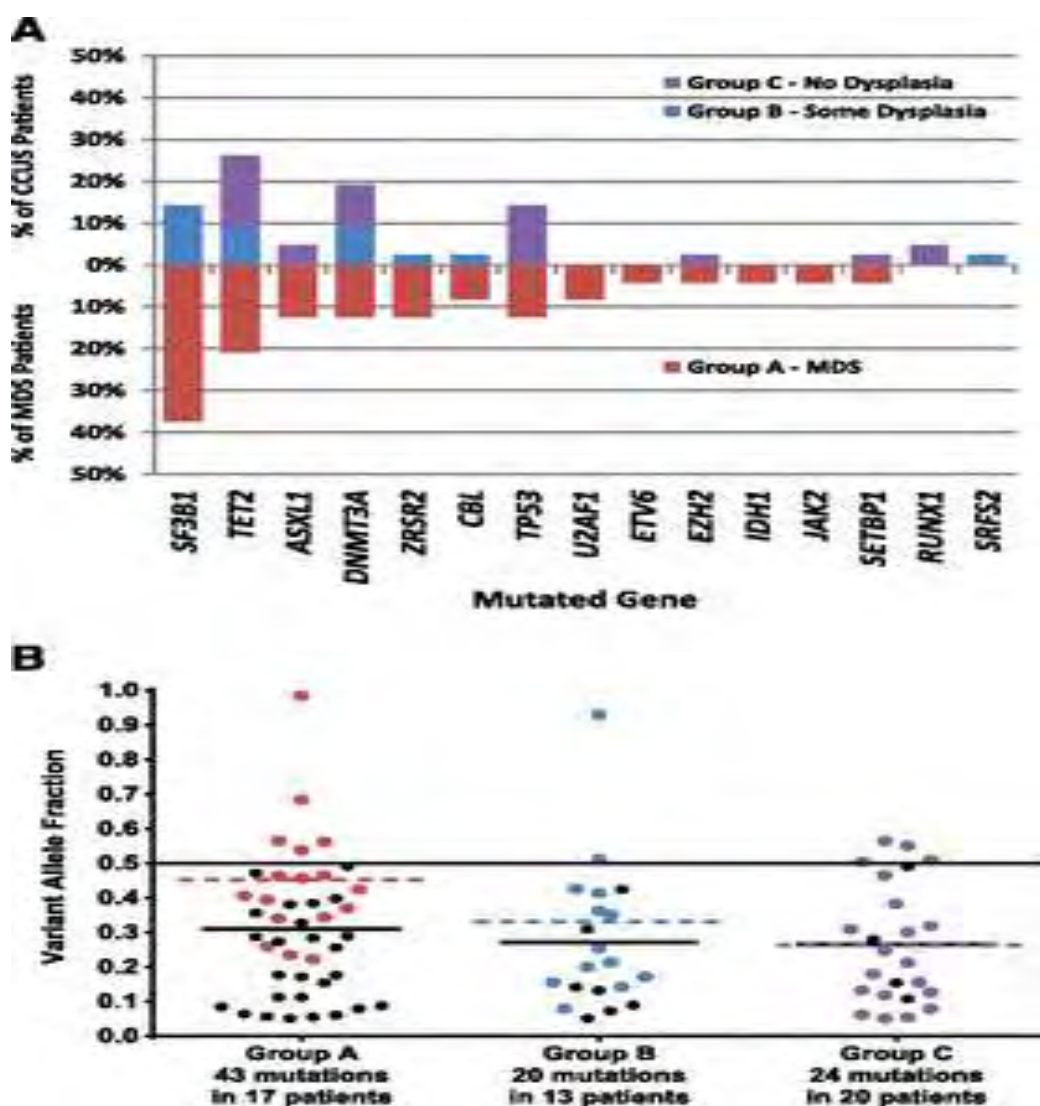
αλλά και σε γονίδια που συμμετέχουν στους επιγενετικούς μηχανισμούς<sup>22</sup>. Πρόκειται για μεταλλάξεις σε επίπεδο:

- ογκοκατασταλτικών γονιδίων (**TP53**),
- μεταγωγής σήματος μέσω των ειδικών μονοπατιών **RAS, JAK2, CBL**,
- μεταγραφικών παραγόντων (**ETV6, GATA1,2**),
- ματίσματος (splicing) (**SRSF2, U2AF1**),
- ριβοσωμικών πρωτεϊνών (**RPS14**),
- επιδιόρθωσης του DNA (**ATM, BRCC3**),
- επιγενετικών ρυθμιστών της μεθυλίωσης του DNA και αναδόμησης της χρωματίνης (**ASXL1, DNMT3A, IDH1**),
- **micro-RNAs**.

Πρόκειται για διαδικασίες που συμβαίνουν τις περισσότερες φορές πρώιμα στο στάδιο των πλέον προγονικών κυττάρων, μόνες ή συνηθέστερα σε συνδυασμούς μεταξύ τους και η ανίχνευσή τους θα βοηθήσει στην πληρέστερη ταξινόμηση και στην αποτελεσματική εφαρμογή ειδικών θεραπευτικών επιλογών. Από τις παραπάνω μεταλλάξεις οι πλέον κοινές αφορούν τις διεργασίες ματίσματος και διαπιστώνονται τουλάχιστον στους μισούς ασθενείς σε αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα και τις υπόλοιπες να ακολουθούν κατά την κυτταρική εξέλιξη<sup>23</sup>.

Μία σειρά σωματικών μεταλλάξεων έχουν διαπιστωθεί σε ασθενείς με MDS με φυσιολογικά καρυοτυπικά ευρήματα ή έλλειψη του Y χρωμοσώματος ενώ παρόμοιες σωματικές μεταλλάξεις ανιχνεύονται σε μικρότερο ποσοστό σε ασθενείς με ιδιοπαθείς κυτταροπενίες και άλλες κλωνικές διαταραχές<sup>24</sup>. Για την ανάδειξη των μεταλλάξεων αυτών διεξάγονται μελέτες με SNP μικροσυστοιχίες. Προκειμένου να διερευνηθεί η σχέση επίκτητων μεταλλάξεων με την κλωνική έκφραση των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων, ερευνητές διενήργησαν εκ παραλλήλου αλληλούχιση μυελικού DNA και DNA από τον στοματικό βλεννογόνο. Κατέληξαν μεταξύ άλλων στην διαπίστωση μονογονεϊκής δισωμίας του χρωμοσώματος 7q σε δύο ασθενείς (που δεν ανεδείχθη με τον κλασσικό καρυότυπο) και όπως προέκυψε από την μετέπειτα παρακολούθηση είχε κλινική συμπεριφορά παρόμοια με εκείνη του ελλείμματος del(7q) που ανιχνεύεται με τον κυτταρογενετικό έλεγχο. Είναι επομένως χρήσιμες νέες προοπτικές μελέτες μεγαλύτερου αριθμού ασθενών για να αποκαλύψουν αντίστοιχες μοριακές βλάβες που δεν ταυτοποιούνται με την κλασσική κυτταρογενετική<sup>25</sup>.





Εικόνα 6 : Μοριακά ευρήματα σε ασθενείς με MDS (Bejar 2016)

Η παρουσία σωματικών μεταλλάξεων είναι συχνότερη σε ασθενείς με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (Εικόνα 6) από αντίστοιχους χωρίς δυσπλασία<sup>26</sup>.

### 1.6 Τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα αποτελούν μοντέλο νοσημάτων επιγενετικής ρύθμισης

Τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα αν και κλωνικά νοσήματα χαρακτηρίζονται από ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό στον μυελό και αυξημένη απόπτωση με

αποτέλεσμα περιφερικές κυτταροπενίες<sup>27</sup>. Πρόκειται για την πλέον ιδιαίτερη περίπτωση κλωνικότητας στην οποία λόγω της υπολειπόμενης κυτταρικής διαφοροποίησης παρατηρείται σε ένα μεγάλο ποσοστό αύξηση προδρόμων κυττάρων με ελλείμματα. Με αυτόν τον τρόπο αποπίπτουν πριν φθάσουν στην κυκλοφορία του αίματος ή εάν φθάσουν δεν έχουν την αναμενόμενη λειτουργική επάρκεια. Έτσι ακόμη και σε ασθενείς που έχουν φυσιολογικό αριθμό κοκκιοκυττάρων είναι συχνές οι φλεγμονές λόγω της δυσκοκκιοποίησης και της επακόλουθης ελαττωμένης κυτταροτοξικότητας, ενώ σε άλλους με σχετικά ικανοποιητικό αριθμό αιμοπεταλίων παρατηρούνται διαταραχές της αιμόστασης λόγω της δυσμεγακαρουποίησης. Μάλιστα δεν είναι σπάνιες οι περιπτώσεις κατά τις οποίες τα μορφολογικά ευρήματα είναι λιγοστά αλλά αποκαλύπτεται μία γενετική βλάβη που προοιωνίζει την εξέλιξη σε πιο επιθετική μορφή της νόσου<sup>28</sup>.

Στην παθογένεια των MDS συμμετέχουν κυτταρογενετικές αλλοιώσεις, σωματικές μεταλλάξεις, καθώς και επιγενετικές αλλαγές όπως τροποποιήσεις του μοντέλου μεθυλίωσης (συνήθως σε προχωρημένα στάδια της νόσου και σε ηλικιωμένους ασθενείς).

Η έννοια της επιγενετικής περιλαμβάνει έναν μεγάλο αριθμό διαδικασιών που σχετίζονται με την αντιγραφή, μεταγραφή και μετάφραση γονιδίων, υφίστανται σε βάθος χρόνου παρόμοιες ή τροποποιημένες, ανεξάρτητες από τις αλληλουχίες του γονιδιώματος (που μεταβιβάζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό από γενιά σε γενιά). Η κυτταρική ανάπτυξη είναι μία επιγενετική διαδικασία και στηρίζεται στην ελεγχόμενη μεθυλίωση του DNA καθώς και στην ομαλή τροποποίηση των ιστονών αλλά και στην έκφραση των micro-RNAs<sup>29, 30</sup>.

Η μεθυλίωση του DNA που αποτελεί και τον ακρογωνιαίο λίθο της επιγενετικής τροποποίησης είναι δυνατό να συμβεί οπουδήποτε στο γονιδίωμα και κυρίως σε περιοχές πλούσιες σε νησίδια CpG με μία σχετική αστάθεια και διαφορετικού βαθμού κλινική σημασία, ενώ το πλέον ξεκάθαρο και ισχυρό πρότυπο μεθυλίωσης αποτελεί η απενεργοποίηση του X χρωμοσώματος<sup>31</sup>. Αντίστοιχα οι τροποποιήσεις των ιστονών υπόκεινται σε διαφοροποιήσεις υπό την επίδραση αναστολέων ή αυξητικών σημάτων με κυμαινόμενο χρόνο παραμονής τους με αποτέλεσμα συχνά να αμφισβητείται ο επιγενετικός τους ρόλος<sup>32</sup>.

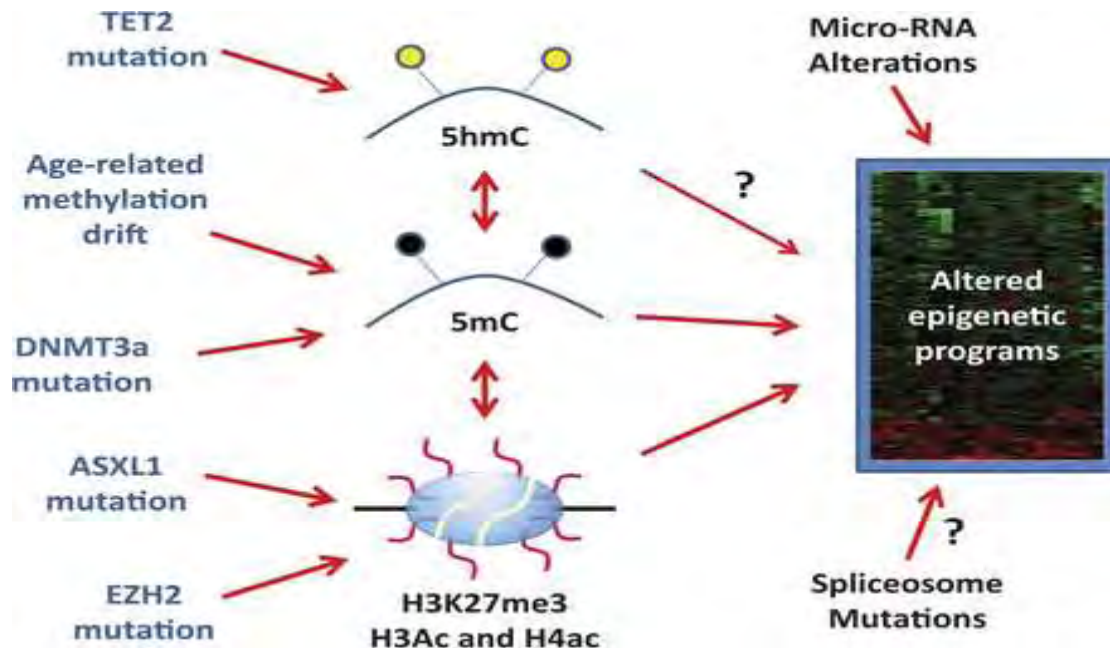
Τέλος, τα micro-RNAs οδηγούν σε αποσιώπηση της έκφρασης των γονιδίων με ποικίλους ρυθμιστικούς μηχανισμούς, ενώ η έκφρασή τους μπορεί να επηρεάζεται από άλλους επιγενετικούς μηχανισμούς όπως η μεθυλίωση του υποκινητή τους ή του

ενισχυτή τους. Και οι τρεις παραπάνω διαδικασίες είναι ιστοειδικές, ανιχνεύονται σε ένα ποσοστό των αρχέγονων βλαστικών κυττάρων και η μεταγωγή τους στις ωριμότερες κυτταρικές μορφές αποτελεί σημαντική παράμετρο της εξελικτικής διαδικασίας. Κάποιες εξ αυτών συμβάλλουν στην αιτιοπαθογένεια των κλωνικών νοσημάτων ενώ άλλες διαμορφώνονται στην πορεία της νόσου συνεπικουρώντας στην μετέπειτα γενωμική ετερογένεια (Εικόνα 7) και κλινική έκφραση<sup>33</sup>.

Τα τελευταία έτη με την βοήθεια της αλληλούχισης επόμενης γενιάς κατέστη εφικτή η ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος αλλά και επιμέρους περιοχών όπως των κωδικοποιητικών αλληλουχιών (εξώνια) και του συνολικού προτύπου μεθυλίωσης σε τέτοια έκταση που να μπορούμε να μελετήσουμε<sup>34</sup> :

- Την σχέση του γονιδιώματος με την επιγενετική.
- Τις φαινοτυπικές προεκτάσεις της επιγενετικής.
- Την εισαγωγή νέων διαγνωστικών και προγνωστικών δεικτών.
- Την στόχευση συγκεκριμένων επιγενετικών αλλοιώσεων με ενδεχόμενη υποστροφή του κλινικού συνδρόμου.

Μένει να διευκρινισθεί εάν μεμονωμένες αλλαγές στο πρότυπο μεθυλίωσης είναι αρκετές για την εκδήλωση των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων ή εάν ένα συνολικό πρότυπο μεθυλίωσης (μεθυλίωμα) δημιουργεί τις προϋποθέσεις για την κλινική έκφρασή τους. Αξίζει να αναφερθεί ότι συγκεκριμένες χρωμοσωμικές βλάβες όπως το 5q- ή -7 συνδυάζονται με ειδικά πρότυπα μεθυλίωσης/απομεθυλίωσης, ενώ τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα στο σύνολό τους αποτελούν το χαρακτηριστικότερο μοντέλο νόσου με μία τεράστια ποικιλία τέτοιων επιγενετικών ευρημάτων<sup>35</sup>. Η διερεύνησή τους έχει βοηθήσει στην κατανόηση παρόμοιων μηχανισμών που συντελούνται στις νεοπλασίες συμπαγών οργάνων αλλά και σε χρόνια νοσήματα όπως αυτά του συνδετικού ιστού.



Εικόνα 7: Επιγενετική ρύθμιση στα MDS, Issa J (2013)

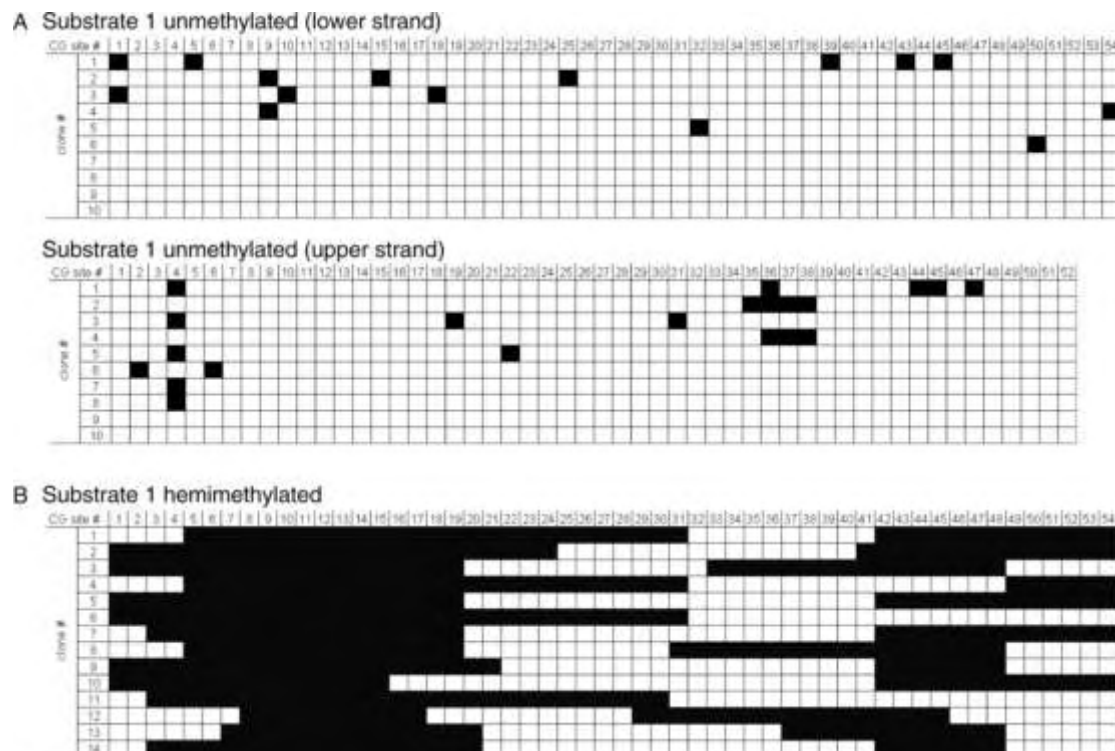
Αναλυτικά οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην γενετική και επιγενετική ρύθμιση των διεργασιών που επιτελούνται στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα παρουσιάζονται στην συνέχεια, με πρώτο τον μηχανισμό της μεθυλίωσης του DNA, το μοντέλο της οποίας παρατηρείται τροποποιημένο στα περισσότερα σηματοδοτικά μονοπάτια.

## 2.1 Μεθυλίωση του DNA-Μεταλλάξεις σε ασθενείς με MDS

Πρόκειται για έναν από τους εκτενέστερα μελετημένους μηχανισμούς επιγενετικής ρύθμισης που εμπλέκεται τόσο σε φυσιολογικές βιολογικές διεργασίες (εντύπωμα, γονιδιακή σταθερότητα), όσο και στην παθογένεια νεοπλασματικών ασθενειών. Διαταραγμένο πρότυπο μεθυλίωσης έχει συσχετισθεί πέραν των κακοηθειών και με πληθώρα άλλων παθήσεων<sup>36, 37, 38</sup>. Γονίδια που συμμετέχουν στην διαδικασία μεθυλίωσης του DNA φέρουν μεταλλάξεις σε ασθενείς με MDS, συμπεριλαμβανομένων των DNA μεθυλοτρανσφερασών, του γονιδίου TET2 και IDH1/IDH2.

### 2.1.1 DNA Μεθυλοτρανσφεράσες

Οι DNA μεθυλοτρανσφεράσες: μεθυλιώνουν εκ νέου περιοχές του DNA ή προάγουν την συντήρηση της μεθυλίωσης άλλων γενετικών περιοχών. Οι τρεις κύριοι εκπρόσωποι της οικογένειας αυτής είναι η DNMT1, η DNMT3a και η DNMT3b. Η DNMT1 μεθυλιώνει ατελώς μεθυλιωμένες CpG δινουκλεοτιδικές περιοχές του γονιδιώματος αλλά προσφέρει και εκ νέου μεθυλίωση σε ογκοκατασταλτικά γονίδια (αν και σε μικρότερη συχνότητα). Το ένζυμο προτιμά ως υποστρώματα ημιμεθυλιωμένες ζώνες του DNA που προκύπτουν μετά την αντιγραφή του γενετικού υλικού και ο στόχος του είναι να επαναφέρει το μοντέλο μεθυλίωσης που προϋπήρχε της αντιγραφής, κάτι που ιδανικά επιτυγχάνεται με την όσο το δυνατόν ισχυρότερη εξειδίκευση (Εικόνα 8). Η προσθήκη μεθυλομάδων γίνεται με τυχαίο πρότυπο, ωστόσο διάχυτα προς όλες τις κατευθύνσεις και όχι γραμμικά και με τρόπο τέτοιο ώστε να μην αγνοηθεί ούτε μία ημιμεθυλιωμένη περιοχή<sup>39</sup>. Με την παρατήρηση αυτή καταδεικνύεται η στενότερη αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με το DNA.



Εικόνα 8: Ακρίβεια του προτύπου μεθυλίωσης του DNA από την DNMT1, Goyal R et al. (2006)

Η δράση αυτή ανακόπτεται σε συγκεκριμένες θέσεις του γονιδιώματος μετά από αποδέσμευση του ενζύμου από το DNA ή μέσω της δημιουργίας συμπλέγματος που αναχαιτίζει την σύνδεση αυτή. Η ακριβής αλληλουχία στόχος της DNMT1 είναι η CCGG, γεγονός που την διαφοροποιεί από τις άλλες μεθυλοτρανσφεράσες της ίδιας οικογενείας και εγείρει ερωτήματα για τον υπεύθυνο της εκ νέου και άναρχης μεθυλίωσης άλλων περιοχών<sup>40</sup>. Η στοχευμένη ενέργεια της DNMT1 άλλωστε μπορεί να επηρεασθεί και από τροποποιητές της χρωματίνης και των ιστονών (ιστόνη H3). Τέλος ο μηχανισμός της φυσιολογικής μεθυλίωσης για λόγους ομοιοστασίας κληροδοτείται στους απογόνους μέσω αυτής καθεαυτής της πρωτεΐνης DNMT1<sup>41</sup>. Κυτταρική καταστροφή, φλεγμονές και οξειδωτικό stress δύνανται να διαταράξουν το μοντέλο μεθυλίωσης προκαλώντας μεθυλίώσεις σε μη μεθυλιωμένα υποστρώματα ή απομεθυλίώσεις σε ήδη μεθυλιωμένα, αλλαγές που επίσης μεταβιβάζονται κατά την επόμενη κυτταρική διαίρεση.

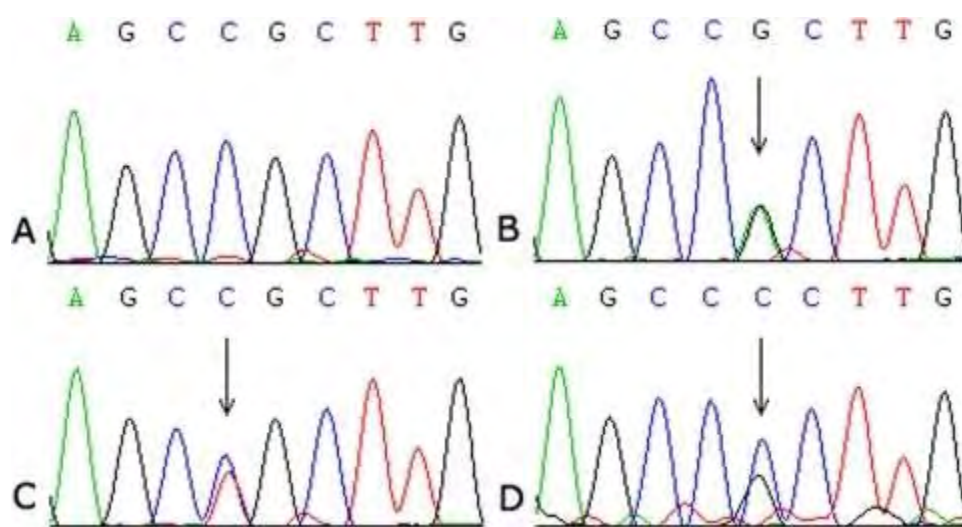
Οι τρανσφεράσες DNMT3a και DNMT3b μεθυλιώνουν de novo CpG νησίδια με προτίμηση σε συγκεκριμένες μόνο αλληλουχίες και με ρυθμό μικρότερο από τον ρυθμό της DNMT1 (που επιτελεί καθολική μεθυλίωση στο γονιδίωμα)<sup>42</sup>. Τα γονίδια τους κωδικοποιούνται αντίστοιχα από τις περιοχές 2p23 και 20q11.2, εκφράζονται φυσιολογικά σε όλα τα όργανα (αν και σε εξαιρετικά μικρότερο βαθμό από την DNMT1), με την DNMT3b να ανιχνεύεται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στο περιβάλλον του μυελού των οστών και των ενδοκρινών αδένων, ενώ ενίσχυση της έκφρασής τους παρατηρείται σε κυτταροκαλλιέργειες υπό την επίδραση ογκογενετικών παραγόντων<sup>43</sup>.

Παιδιά με ομόζυγες μεταλλάξεις του γονιδίου των μεθυλοτρανσφερασών 3a και 3b αποθνήσκουν προγεννητικά ενώ με ετερόζυγες μεταλλάξεις καταλήγουν λίγες εβδομάδες μετά την γέννηση. Μελέτες που περιελάμβαναν χορήγηση απομεθυλιωτών και παρακολούθηση των επιπέδων των μεθυλοτρανσφερασών, οδήγησαν στην παρατήρηση ότι η DNMT1, η 3a και η 3b συνδέονται με τις περιοχές του γονιδιώματος που έχουν υποστεί αλλοιώσεις υπό την επίδραση του φαρμάκου, εμφανίζοντας την μέγιστη έκφρασή τους λίγες ώρες μετά την παρέμβαση, με την DNMT3b να προωθεί ένα καθολικό μοντέλο μεθυλίωσης όπως ακριβώς συμβαίνει με την DNMT1. Έτσι αποκαλύπτεται ένα δίκτυο ενζύμων-τροποποιητών της μεθυλίωσης με ισχυρές αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους<sup>44, 45</sup>.

Αυξημένα επίπεδα μεταγραφικής έκφρασης μεθυλοτρανσφερασών έχουν περιγραφεί σε νεοπλασίες, μεταξύ αυτών και στις αιματολογικές κακοήθειες. Ειδικότερα σε ποσοστό 8% ασθενών με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα και οξείες μυελογενείς λευχαιμίες ανιχνεύονται μεταλλάξεις της DNMT3a που σχετίζονται με επιβαρυσμένη συνολική επιβίωση, συνοδεύονται από μεταλλάξεις της IDH και είναι στην πλειοψηφία τους ετερόζυγες, οδηγώντας σε ενίσχυση της δράσης τους<sup>46</sup>. Πιθανολογείται ότι τροποποιήσεις των γονιδίων τους ευθύνονται για τον υπέρμετρο κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου και γονιδιακής αποσιώπησης, ενώ απουσία ογκογενετικών παραγόντων η δράση τους υποστρέφεται<sup>47</sup>.

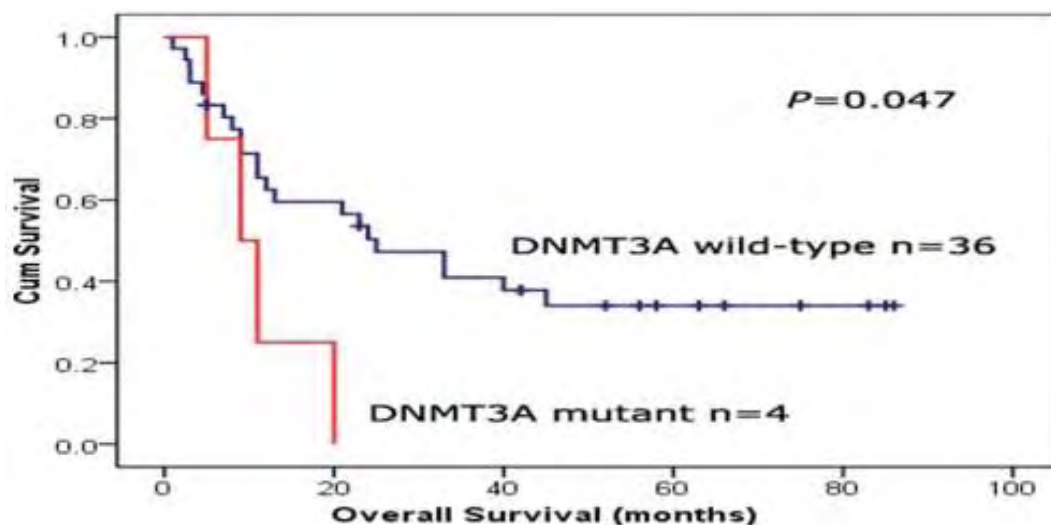
Ιδιαίτερα σημαντικός αναδεικνύεται ο ρόλος της DNMT3a στην διαφοροποίηση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, καθώς η συχνότερη μετάλλαξη της πρωτεΐνης στο αμινοξύ αργινίνη R882H, εξόνιο 23, μεταβάλλει την ενζυμική της δράση, περιορίζοντας την μεθυλίωση περιοχών πλούσιων σε κυτοσίνη και έχει συσχετισθεί με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα κακής πρόγνωσης (υψηλότερο φορτίο νόσου, εκτροπή σε επιθετικές μορφές οξείας μυελογενούς λευχαιμίας και στατιστικά σημαντική συσχέτιση με FLT3 και NPM1 μεταλλάξεις)<sup>48</sup>.

Σπανιότερες μεταλλάξεις της ίδιας περιοχής είναι η R882C και η R882P<sup>49</sup>. Στις δύο εικόνες που παρατίθενται στην συνέχεια (9,10)) απεικονίζονται αντίστοιχα αλληλουχίες του μεταλλαγμένου R882 και η συνολική επιβίωση των ασθενών που φέρουν την μετάλλαξη:



Εικόνα 9: Μεταλλάξεις του R882, Lin J et al (2011)





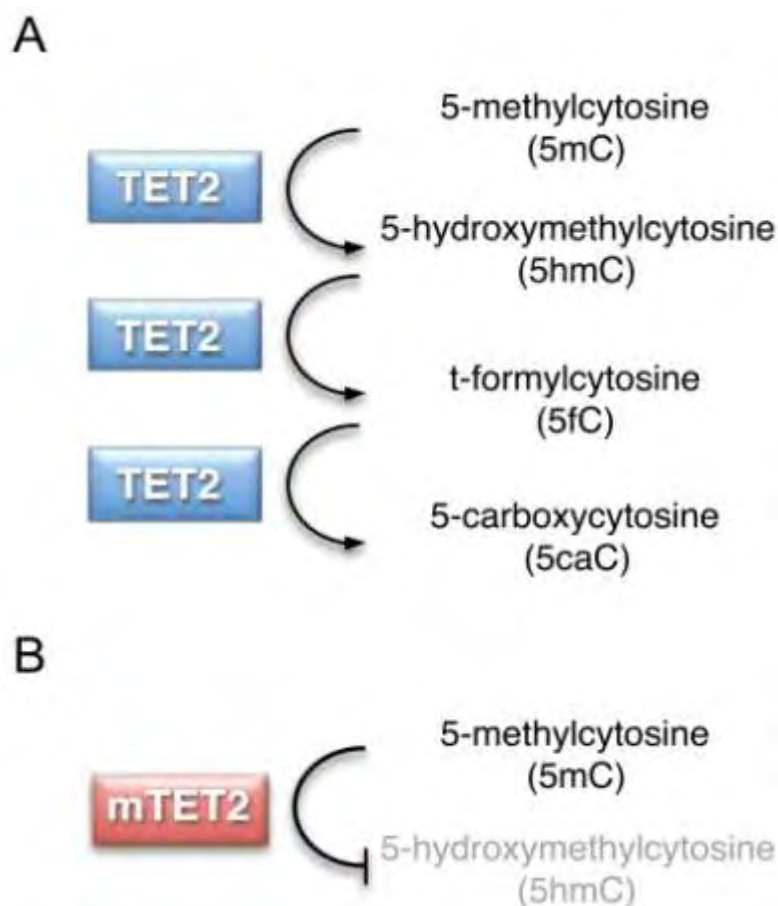
Εικόνα 10: Μεταλλάξεις DNMT3A σε ασθενείς με MDS και AML, Lin J et al (2011)

Η μετάλλαξη R882H συμβάλλει στην αναστολή της διαφοροποίησης και απόπτωσης των αρχέγονων βλαστικών κυττάρων, ενώ η μετάβαση σε οξεία λευχαιμία (μέσω υπερέκφρασης γονιδίων όπως το *Hoxa7* και το *Meis1*) επιταχύνεται όταν συνυπάρχουν μεταλλάξεις του RAS ή αναδιατάξεις του MLL<sup>50</sup>. Παράλληλα ενεργοποιούνται μηχανισμοί ακετυλίωσης των ιστονών ισχυρότεροι σε περιοχές όπου η μεθυλιωτική δραστηριότητα έχει ήδη διαταραχθεί. Χορήγηση φαρμάκων με δράση αποακετυλάσης των ιστονών αρχικά αναστρέφει την ακετυλίωση των ιστονών και σε δεύτερο χρόνο καταστέλλει την έκφραση του μεταλλαγμένου γονιδίου DNMT3a (R882H) και κατ'επέκτασιν των γονιδίων HOXA και MEIS που υποκινούν την διαδικασία της λευχαιμογένεσης. Φυσικά στο φαινόμενο της υπερίσχυσης και εξέλιξης ενός λευχαιμικού κλώνου απαιτούνται πολλαπλές διαταραχές όπως η δράση του αντιαποπτωτικού παράγοντα bcl-2 ή του FLT3, οι οποίες σε συνεργασία με το μεταλλαγμένο RAS οριοθετούν ένα εξαιρετικά πολύπλοκο δίκτυο υπό την καθοδήγηση του οποίου τα βλαστικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται άναρχα<sup>51</sup>. Μία από τις πλέον υπομεθυλιωμένες περιοχές βλαστικών αιμοποιητικών κυττάρων που δεν εκφράζουν DNMT3 είναι η περιοχή του μεταγραφικού παράγοντα RUNX1 με αποτέλεσμα την υπερέκφρασή του<sup>52</sup>.



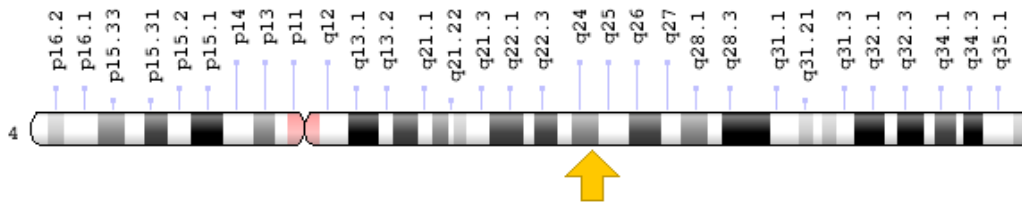
### 2.1.2 Πρωτεΐνη TET2

Η πρωτεΐνη **TET2** [μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών TET , ορισμένες εξ' αυτών προκύπτουν από την αντιμετάθεση t(10;11)] προωθεί την μετατροπή της 5-μεθυλκυτοσίνης (5mC) σε 5-υδροξυμεθυλκυτοσίνη (5hmC), οδηγώντας σε απομεθυλίωση του DNA με τελικό προϊόν την σύνθεση 5-καρβοξυκυτοσίνης (5caC). Τα παράγωγα των αλληπάλληλων οξειδώσεων (Εικόνα 11) που καταλύει η TET2 (όπως η 5hmC) προκύπτουν από επιγενετικές τροποποιήσεις και φαίνεται ότι σε συνεργασία με πυρηνικούς παράγοντες στοχεύουν στην μεταγραφική διαδικασία<sup>53</sup>.



Εικόνα 11: Προϊόντα της φυσιολογικής και μεταλλαγμένης πρωτεΐνης TET2, Lindsley R et al. (2013)

Το γονίδιο της TET2 εντοπίζεται στην θέση 4q24<sup>54</sup> (Εικόνα 12)



Εικόνα 12: το γονίδιο της TET2, O. Abdel Wahab et al. (2009)

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο είναι υπεύθυνη για την ανανέωση και την διαφοροποίηση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, λειτουργεί ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο και προκαλεί μεταγραφικές τροποποιήσεις των ιστονών. Οι μεταλλάξεις του γονιδίου της TET2 είναι στην πλειοψηφία τους αλλαγής πλαισίου και παρανοηματικές και αφορούν συχνότερα τα εξώνια 11 και 3, οδηγούν κατά κύριο λόγο σε απώλεια της λειτουργίας της, με επακόλουθη ποικιλομορφία στο επίπεδο μεθυλίωσης του DNA (παρατηρούνται σε μικρότερο βαθμό και υπερμεθυλιωμένα εκτός από υπομεθυλιωμένα πρότυπα)<sup>55</sup>. Εξάλλου οι μεταλλάξεις αυτές μπορεί να συμβούν στα πλέον άωρα πολυδύναμα μυελικά κύτταρα και στη συνέχεια να μεταφερθούν σε διαφοροποιημένες κυτταρικές σειρές όπως η μυελική αλλά και η λεμφική (B ή T αρχής). Ο ακριβής μηχανισμός κλινικής έκφρασης των μεταλλάξεων της TET2 παραμένει αδιευκρίνιστος και αποτελεί αντικείμενο έρευνας<sup>56</sup>. Πάντως σύμφωνα με ερευνητές ένα πιθανό μοντέλο της δράσης της TET2 στις αιματολογικές κακοήθειες έχει ως εξής: μία αρχική μετάλλαξη σε αρχέγονο βλαστικό κύτταρο δημιουργεί έναν προκαρκινικό πληθυσμό που θα οδηγήσει σε :

- μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο μετά από μια δεύτερη μετάλλαξη του TET2 σε επόμενο στάδιο διαφοροποίησης ή μέσω επιγενετικών τροποποιήσεων ή
- μυελοϋπερπλαστικό σύνδρομο μέσω μετάλλαξης του JAK2 ή
- οξεία μυελογενή λευχαιμία πρωτοπαθή/δευτεροπαθή μέσω τρίτης μετάλλαξης ή μέσω απωλειών τμημάτων των χρωμοσωμάτων 5 ή 7<sup>57</sup>.

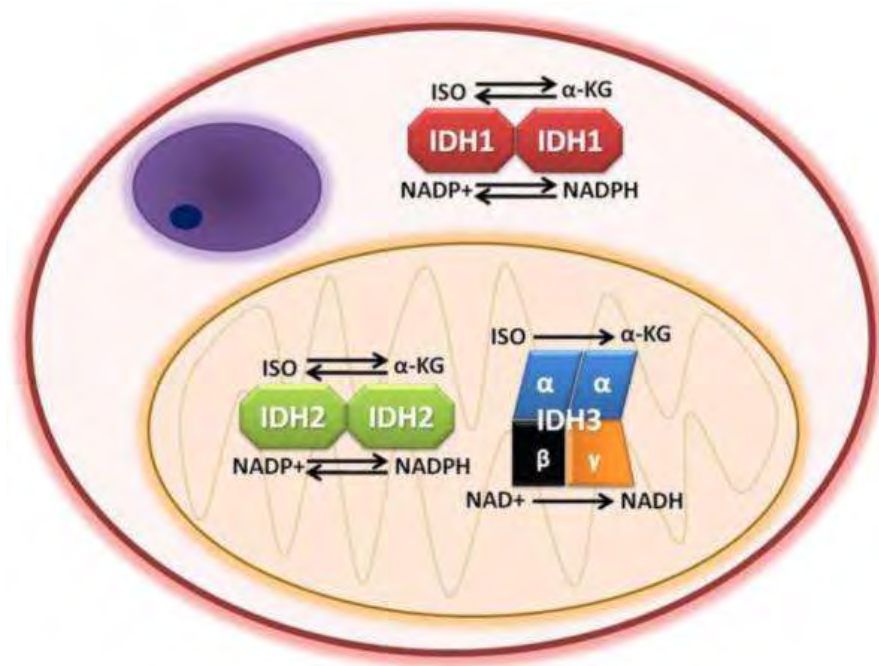
Ωστόσο σε περιορισμένο αριθμό μελετών διαπιστώνεται ότι η παρουσία της μετάλλαξης χωρίς άλλες επιβαρυντικές μεταλλάξεις, από μόνη της αποτελεί ευνοϊκό

προγνωστικό δείκτη ανεξάρτητο από το αναθεωρημένο διεθνές προγνωστικό σύστημα και σε αυτό συνηγορούν η αργή εξέλιξη των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων και η παράταση της συνολικής επιβίωσης<sup>58</sup>.

Η ανίχνευση μεταλλάξεων του γονιδίου TET σε μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα, σε μυελοϋπερπλαστικά νοσήματα και στις οξείες μυελογενείς λευχαιμίες {διαφορετικά ελλείματα της γονιδιακής περιοχής 4q24, ή αντιμετάθεση t[(10;11)(p12;q23) MLL-TET1]} ενισχύουν την άποψη ότι πρόκειται για ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο το οποίο εκφραζόμενο στα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα ρυθμίζει την κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση<sup>59</sup>. Μεταλλάξεις του TET ενισχυόμενες με τον πολλαπλασιασμό και την κυτταρική εξειδίκευση προηγούνται άλλων μεταλλάξεων όπως η μετάλλαξη W515L/K του γονιδίου του ιού της μυελοϋπερπλαστικής λευχαιμικής εκτροπής *mpl* ή η μετάλλαξη JAK2V617F<sup>60, 59</sup>. Μάλιστα κατά την εξέλιξη JAK2+ μυελοϋπερπλαστικών νοσημάτων σε οξεία λευχαιμία είναι πιθανό να μην ανιχνεύεται πλέον η μετάλλαξη JAK2 σε αντιδιαστολή με τις διαταραχές του TET. Πρόκειται επομένως για έναν κεντρικό ενορχηστρωτή σε ένα μεγάλο φάσμα αιματολογικών διαταραχών<sup>61</sup>.

### 2.1.3 Αφυδρογονάσες IDH1/IDH2

Πρόκειται για τις δυο σημαντικότερες ισοκιτρικές αφυδρογονάσες που καταλύουν την μετατροπή του ισοκιτρικού σε α-κετογλουταρικό (α-KG), τα γονίδια τους βρίσκονται στις περιοχές 2q33.3 και 15q.26.1 αντίστοιχα, με την IDH2 να αποτελεί το μιτοχονδριακό ανάλογο αφυδρογονάσης, την IDH1 να εντοπίζεται κατεξοχήν στο κυτταρόπλασμα και μία τρίτη αφυδρογονάση την IDH3 να συμμετέχει στον κύκλο του Krebs. Η οικογένεια των ισοκιτρικών αφυδρογονασών κατηγοριοποιείται σε δυο επιμέρους ομάδες ανάλογα με την χρήση NAD<sup>+</sup> ή NADP<sup>+</sup> (Εικόνα 13) για την μεταφορά ηλεκτρονίων (οι IDH1 και IDH2 χρησιμοποιούν το NADP<sup>+</sup> και η IDH3 το NADH<sup>+</sup>)<sup>62</sup>. Η IDH1 είναι η σημαντικότερη πηγή NADPH στον εγκέφαλο και βοηθά μέσω μείωσης της γλουταθιόνης στην προστασία του DNA από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου.



Εικόνα 13: Φυσιολογικές λειτουργίες των ενζύμων IDH, Horbinski C (2013)

Μεταλλάξεις των ενζύμων αυτών (στην πλειονότητά τους ετερόζυγες) προωθούν τον πολλαπλασιασμό αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων και επιδρούν αρνητικά στην ικανότητα διαφοροποίησης της μυελικής σειράς, μέσω αύξησης της παραγωγής 2-υδροξυγλουταρικού (2HG) [απευθείας μετατροπή του α-κετογλουταρικού (α-KG) σε 2HG] και μείωσης του α-KG<sup>63</sup>. Παράλληλα μέσω επιγενετικών αλλαγών και με ένα ειδικό πρότυπο υπερμεθυλίωσης διαταράσσονται οι λειτουργίες των μεθυλοτρανσφερασών, καθώς λόγω της μείωσης του α-KG καταστέλλονται παράγοντες εξαρτώμενοι του α-KG όπως ο HIF1a (παράγων 1a που εκλύεται υπό την επίδραση της υποξίας), με αποτέλεσμα την υπερμεθυλίωση των ιστονών και του DNA<sup>64</sup>. Επίσης διαταράσσεται η έκφραση της TET2 με συνέπειες ανάλογες των μεταλλάξεων του γονιδίου της TET. Μάλιστα η ενίσχυση της μεθυλίωσης λόγω μεταλλάξεων των IDH1/2 είναι παρόμοια με αυτή των μεταλλάξεων της TET2 και συμβάλλει ανάλογα στην παρεμπόδιση της κυτταρικής διαφοροποίησης και απόπτωσης. Αύξηση του D-2HG σε επίπεδα πέραν των φυσιολογικών λόγω τροποποιήσεων των ισοκιτρικών δεϋδρογονασών 1/2 παρατηρείται και στο συγγενές σύνδρομο της D-2HG οξουρίας που εκδηλώνεται με νεογνικές ανωμαλίες στην ανάπτυξη του ΚΝΣ και του κυκλοφορικού συστήματος χωρίς την παρουσία όγκων<sup>63</sup>. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει την συμμετοχή των ενζύμων στην ομαλή

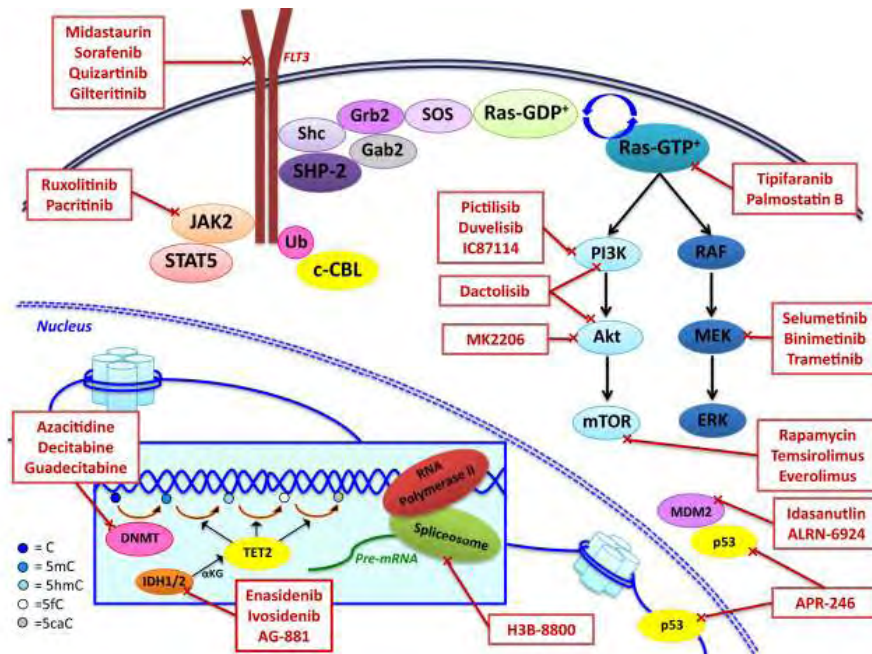
διαμόρφωση των ιστών ενώ για την έναρξη της ογκογένεσης απαιτείται η απορρύθμιση της έκφρασης και άλλων γονιδίων όπως το RAS<sup>65</sup>.

Διαταραχές επομένως της έκφρασης των γονιδίων αυτών καθιστούν τα νεοπλασματικά κύτταρα πιο ευαίσθητα στον οξειδωτικό μεταβολισμό των οξέων κάτω από συνθήκες υποξίας με επακόλουθες την μεταβολική απορρύθμιση και την κυτταρική καταστροφή. Η μέτρηση του D-2HG στον ορό και στα ούρα συνιστά διαγνωστικό δείκτη σε κακοήθειες του αιμοποιητικού και άλλων ιστών και επίσης προγνωστικό δείκτη για τον βαθμό ανταπόκρισης στην θεραπεία<sup>66</sup>.

Κλινικές μελέτες με ειδικούς αναστολείς των απορρυθμισμένων πρωτεϊνών IDH1/2 απεκατέστησαν τα επίπεδα της 2HG απομεθυλώνοντας το DNA και τις ιστόνες<sup>67</sup>. Τέλος υπό έρευνα βρίσκονται εμβόλια που στοχεύουν στις μεταλλαγμένες ισοκιτρικές δεϋδρογενάσες με ενθαρρυντικά αποτελέσματα στους όγκους του εγκεφάλου.

Στην κατηγορία των πρωτεϊνών IDH1/2 και σε επίπεδο μυελού των οστών παρατηρούνται διαταραχές σε πρόδρομα μυελικά κύτταρα στο 5%-11% των MDS ικανοποιητικής πρόγνωσης και σε υψηλότερα ποσοστά MDS σε επιταχυνόμενη φάση αλλά και στο αγγειοανοσοβλαστικό T-λέμφωμα (IDH2-R172K)<sup>68</sup>. Η συχνότερη μετάλλαξη στα MDS είναι η IDH2-R140Q με συγκριτικά καλύτερη πρόγνωση, ενώ σπανιότερα διαπιστώνεται η IDH1-R132 και οι πάσχοντες που φέρουν τις μεταλλάξεις εμφανίζουν μεγαλύτερη ηλικία εκδήλωσης της ασθένειας, ουδετεροπενία, οριακό ποσοστό βλαστών στον μυελό (5% κατά μέσο όρο), αριθμό αιμοπεταλίων >50x10<sup>9</sup>/l, αυξημένα επίπεδα γαλακτικής δεϋδρογενάσης, απώλεια του Y χρωμοσώματος και λιγότερο συχνά διαταραχές των χρωμοσωμάτων 5, 7, πολυπλοειδία ή σύνθετο καρυότυπο<sup>69</sup>. Συνύπαρξη με μεταλλάξεις όπως της TET2 ή του RAS παρατηρείται σε μικρό αριθμό νοσούντων και το χρονικό διάστημα χωρίς εξέλιξη της νόσου είναι ήπια βραχύτερο στην υποκατηγορία με τις μεταλλάξεις του IDH2. Συνεύρεση μεταλλαγμένων IDH1 και IDH2 αν και εξαιρετικά σπάνια, έχει διαπιστωθεί μόνο σε ασθενείς με δευτεροπαθή οξεία μυελογενή λευχαιμία, μετά από πιθανολογούμενη ενίσχυση του ενός κλώνου, εις βάρος του άλλου, κατά την χρόνια φάση της νόσου<sup>70</sup>. Εξαιρετικού ενδιαφέροντος είναι η διεξαγωγή μελετών με ανασταλτές των IDH1/2, δηλαδή με καταστολείς της μεθυλίωσης, για να διερευνηθεί ενδεχόμενη υποστροφή του λευχαιμικού κλώνου κι επιστροφή στην κατάσταση χρονιότητας του μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου<sup>71</sup>.

Πρόσφατα εγκρίθηκε από τον Αμερικανικό Οργανισμό φαρμάκων ο πρώτος μικρομοριακός αναστολέας του IDH2 ενασιντενίμη (Εικόνα 14) για την θεραπεία της ανθεκτικής οξείας μυελογενούς λευχαιμίας<sup>72</sup>.



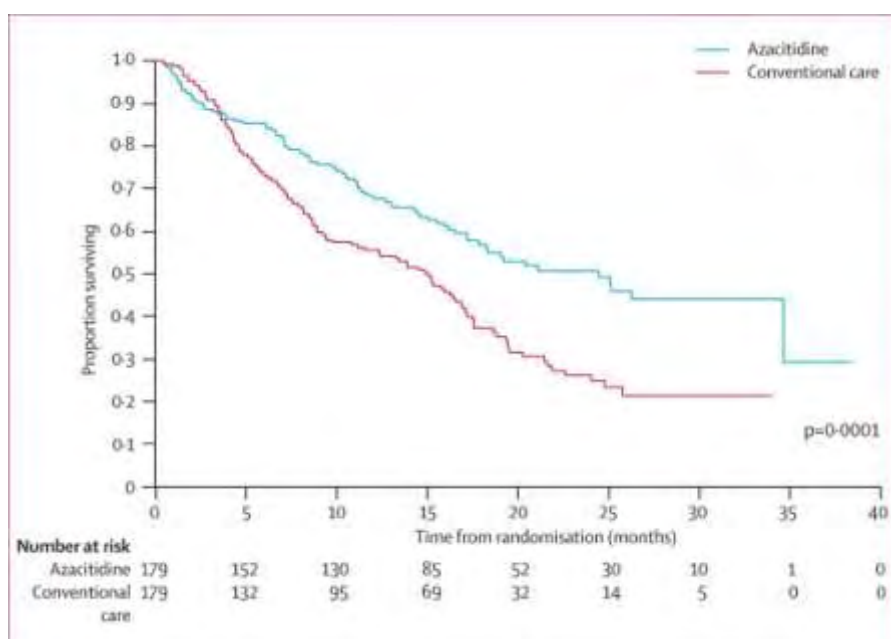
Εικόνα 14 : αναστολείς των IDH1/2 , Sallman et al. (2017)

Αξίζει επιπρόσθετα να σημειωθεί ότι μεταλλάξεις των IDH1/2 παρατηρήθηκαν εκτός από τις νεοπλασίες του ΚΝΣ (γλιώματα, γλιοβλαστώματα, αστροκυττώματα, παραγαγγλιώματα) και σε κακοήθειες του γαστρεντερικού (χολαγγειοκαρκινώματα), σε όγκους του προστάτη, του θυρεοειδούς, στο μελάνωμα και στα χονδροσαρκώματα<sup>73</sup>. Στην περίπτωση των γλιωμάτων ανεύρεση των μεταλλάξεων προοιωνίζει ικανοποιητική μείωση του όγκου μετά από χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία και ευαισθητοποιεί τα καρκινικά κύτταρα στην συνδυαστική θεραπεία με αναστολείς του bcl-2 ή αναστολείς της PARP. Επιπλέον η πρόσφατη εμπειρία με τον αναστολέα του bcl-2 venetoclax σε ασθενείς με ανθεκτική χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία και ελλείμματα του 17p οδήγησε στην πειραματική χορήγησή του σε ασθενείς με OMA αλλά και με γλιοβλάστωμα. Όπως προκύπτει από την μελέτη η κλινική και εργαστηριακή ανταπόκριση είναι αρχικά επαρκής για να στηρίξει περαιτέρω έρευνα και βασίζεται σε ένα πολυσύνθετο δίκτυο μηχανισμών

όπως της αυτοφαγίας, της απόπτωσης, της υποστολής των κινασών και του μονοπατιού m-TOR<sup>74</sup>.

#### 2.1.4 Μεθυλίωση του DNA και θεραπείες στα MDS:

Στο πλαίσιο επιγενετικής θεραπείας σε ασθενείς με MDS κακής πρόγνωσης (IPSS-R: Int-2 και υψηλού κινδύνου) χορηγούνται φάρμακα που προκαλούν υπομεθυλίωση του DNA (HMAs)<sup>75</sup>. Πρόκειται για την αζακυτιδίνη και την γεσιταμπίνη που στοχεύουν στην αναστροφή της μεθυλίωσης ογκοκατασταλτικών γονιδίων μέσω αναστολής των μεθυλοτρανσφερασών, καθώς και στην άμεση κυτταροτοξικότητα μέσω δράσεως στα νουκλεϊκά οξέα. Η θεραπευτική χορήγηση αναστολέων των μεθυλοτρανσφερών επιφέρει καθολική απομεθυλίωση των υποκινητών των γονιδίων αυτών αλλά το μέγεθος της αρχικής μεθυλίωσής τους δεν μεταφράζεται σε απολύτως ανάλογα θεραπευτικά αποτελέσματα. Το φάρμακο **γεσιταμπίνη** παρουσιάζει δομή παρόμοια με αυτή της κυτοσίνης-αραβινοσίδης και αρχικά χορηγούνταν σε συνεχή έγχυση, λόγω όμως της μυελοκαταστολής που επέφερε αλλά και της χημικής του αστάθειας κατά την πολύωρη έγχυσή του, καθιερώθηκε η χορήγησή του πέντε φορές εβδομαδιαίως με ένα μέσο αριθμό οκτώ θεραπευτικών κύκλων. Το αποτέλεσμα ήταν μικρότερη μυελοκαταστολή και αύξηση της συνολικής επιβίωσης (Εικόνα 15) με επιμήκυνση του διαστήματος πριν την εκτροπή σε λευχαιμία<sup>76</sup>.



Εικόνα 15: Συνολική επιβίωση ασθενών υπό αζακυτιδίνη, Fenaux et al. (2009)

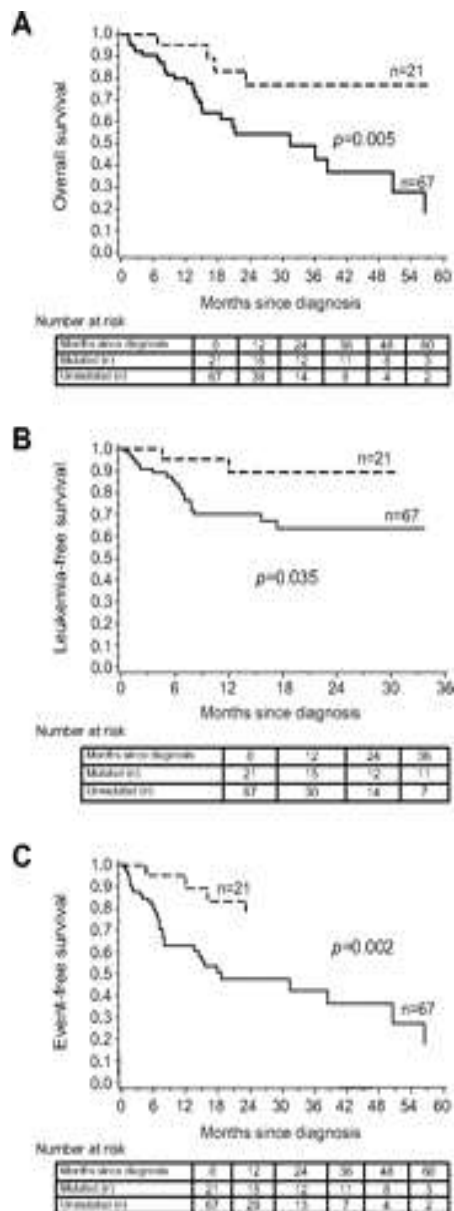


Κλινική μελέτη που περιλαμβάνει την συγχορήγηση ντεσιταμπίνης και τριοξειδίου του αρσενικού σε ασθενείς με MDS και μεταλλάξεις του p53 βρίσκεται σήμερα σε εξέλιξη (εκτιμώμενος χρόνος ολοκλήρωσης: 11<sup>ος</sup> / 2020)<sup>77,78</sup>. Τυχαιοποιημένες πολυκεντρικές μελέτες φάσεως III κατά τις οποίες χορηγήθηκε αζακυτιδίνη 75 mg/m<sup>2</sup> ημερησίως επί επταήμερου ανέδειξαν συνολική επιβίωση 15.7%<sup>76</sup>.

Η 5-αζακυτιδίνη έχει διαφορετική δομή από την γεσιταμπίνη καθώς είναι ανάλογο ριβόζης και για να συνδεθεί με το DNA πρέπει πρώτα να ενωθεί με το RNA και στη συνέχεια με την βοήθεια ενζύμου να τροποποιηθεί ανάλογα. Χορηγείται υποδορίως άπαξ ημερησίως επί επτά συνεχόμενες ημέρες και επιφέρει ικανοποιητική ανταπόκριση σε μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα πτωχής πρόγνωσης όπως για παράδειγμα αυτά που φέρουν ελλείμματα του χρωμοσώματος 7<sup>79</sup>.

Πρόσφατες μελέτες με αζακυτιδίνη κατέδειξαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε ασθενείς που φέρουν την μετάλλαξη ταυτόχρονα με ευνοϊκά κυτταρογενετικά ευρήματα. Σύμφωνα με πολυκεντρική μελέτη φάσεως III των Fenaux et al. ( κωδικός μελέτης NCT00071799), χορήγηση του φαρμάκου ακόμη και σε πάσχοντες με περίσσεια βλαστών >10% οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αιματολογική ανταπόκριση, μία διαπίστωση που βασιζόμενη και σε ευρύτερες μελέτες μπορεί να καταστήσει την TET2 προγνωστικό δείκτη ανταπόκρισης (Εικόνα 16) στην αζακυτιδίνη<sup>80</sup>.

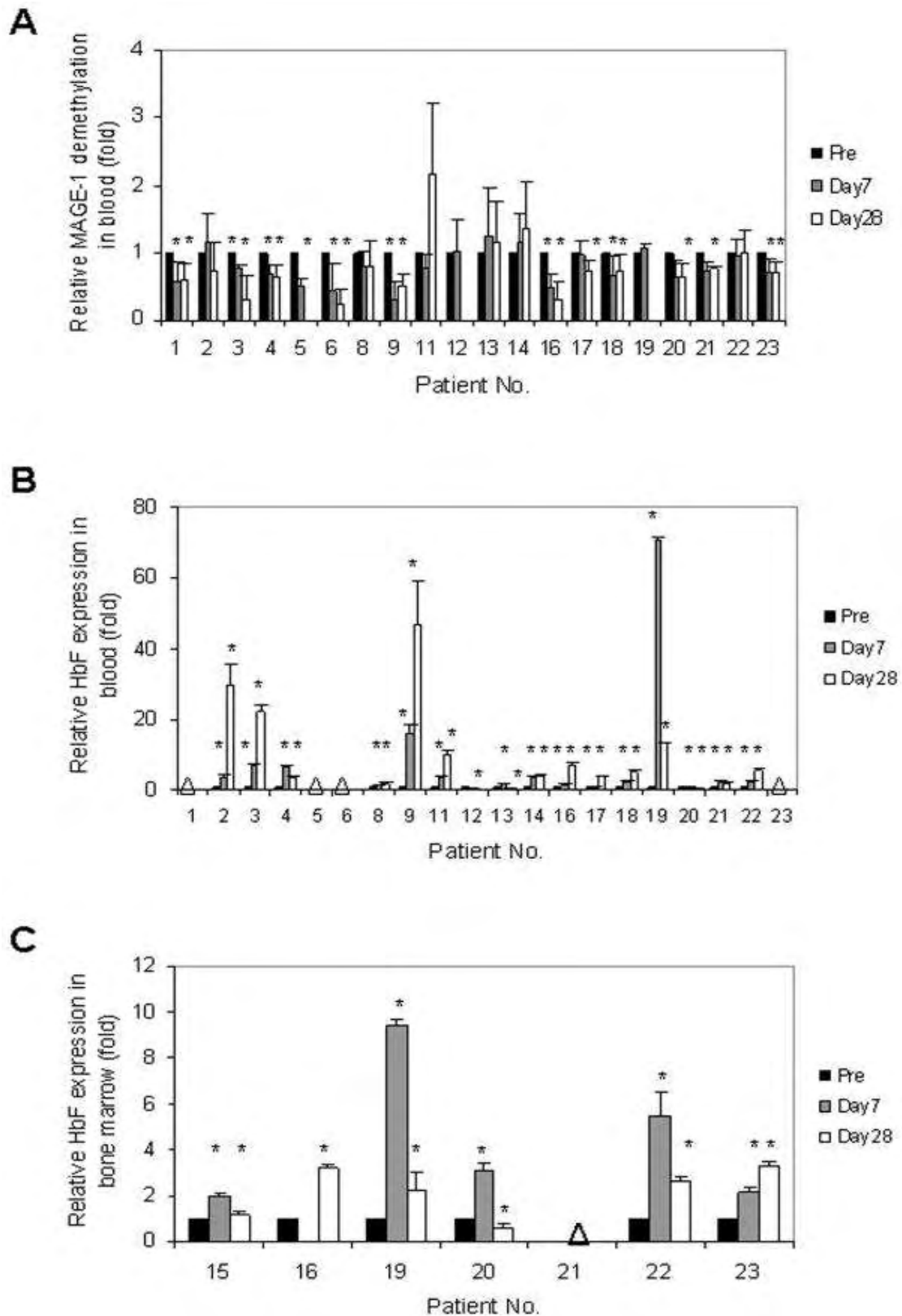




Εικόνα 16: Συνολική επιβίωση ασθενών με μεταλλάξεις της TET2, Paquette R et al. (1993)

Κλινικές μελέτες των Momparler et al. έδειξαν ότι: χορήγηση ντεσιταμπίνης σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό νεόπλασμα πνεύμονα σταδίου IV οδήγησε σε ικανοποιητική διάμεση επιβίωση μέσω απομεθυλίωσης των εκκινητών γονιδίων που ενέχονται στην εξειδίκευση των πρόδρομων κυττάρων, ενώ χορήγηση χαμηλών δόσεων ντεσιταμπίνης σε παιδιατρικούς ασθενείς με νευροβλάστωμα (και με συγχορήγηση κυκλοφωσφαμίδης) καθυστέρησε την πρόοδο της νόσου<sup>81</sup>. Σε μελέτη φάσεως I κατά την οποία συγχορηγήθησαν decitabine, doxorubicin και

cyclophosphamide σε παιδιατρικούς ασθενείς με νεοπλασίες<sup>82</sup> αναλύθηκαν βιοδείκτες όπως το MAGE-1 και η HbF (εικόνα 17).

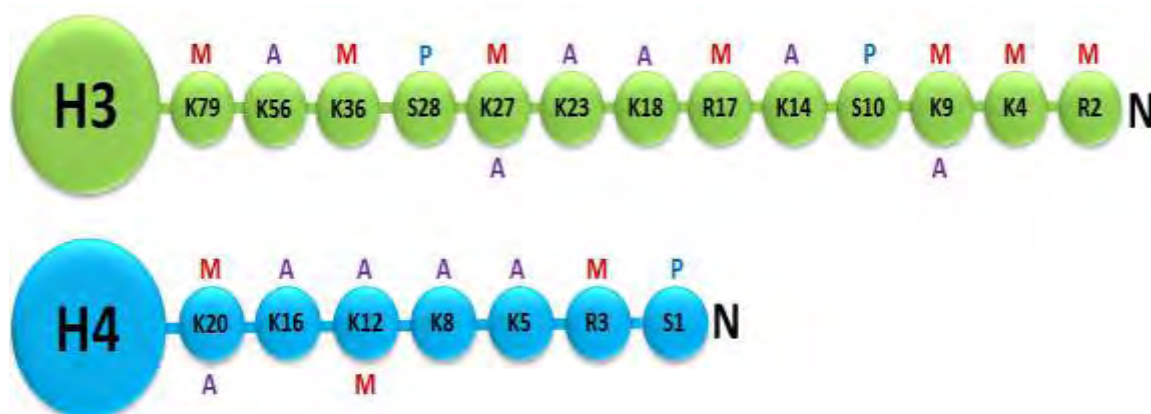


Εικόνα 17: Ανάλυση απομεθυλίωσης βιοδεικτών (MAGE-1, HbF) και γονιδιακής έκφρασης μετά από χορήγηση decitabine και χημειοθεραπείας, George R et al. (2010)

Καθώς η άμεση υποστροφή της μεθυλίωσης με την χορήγηση των σκευασμάτων αυτών είναι δυνατό να συμπαρασύρει και να απενεργοποιήσει μεταξύ άλλων και ευεργετικά γονίδια, διεξήχθησαν μελέτες κατά τις οποίες συγχορηγήθησαν απομεθυλιωτές και αναστολείς της ακετυλίωσης των ιστονών όπως το βαλπροϊκό οξύ. Συγκεκριμένα οι Kuendgen et al. σε μελέτη 18 ασθενών με MDS και δευτεροπαθή ΟΜΛ έδειξαν ότι μονοθεραπεία με βαλπροϊκό οξύ (συγκέντρωση ορού: 346-693 μΜ) επέφερε σημαντική ανταπόκριση σε ποσοστό 44% των ασθενών<sup>83</sup>. Τα αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά αλλά δεδομένης της νευροτοξικότητας που παρατηρείται αναζητούνται νέοι ‘επιγενετικοί’ φαρμακευτικοί συνδυασμοί όπως το anti-CD33 και η λεναλιδομίδη. Παρόμοια θεραπευτικά σχήματα εφαρμόζονται σήμερα και σε άλλες κακοήθειες του αιμοποιητικού και άλλων ιστών εφόσον το πρότυπο της μεθυλίωσης του DNA συμμετέχει οπουδήποτε στην γονιδιακή έκφραση<sup>84</sup>.

## 2.2 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΤΩΝ ΙΣΤΟΝΩΝ

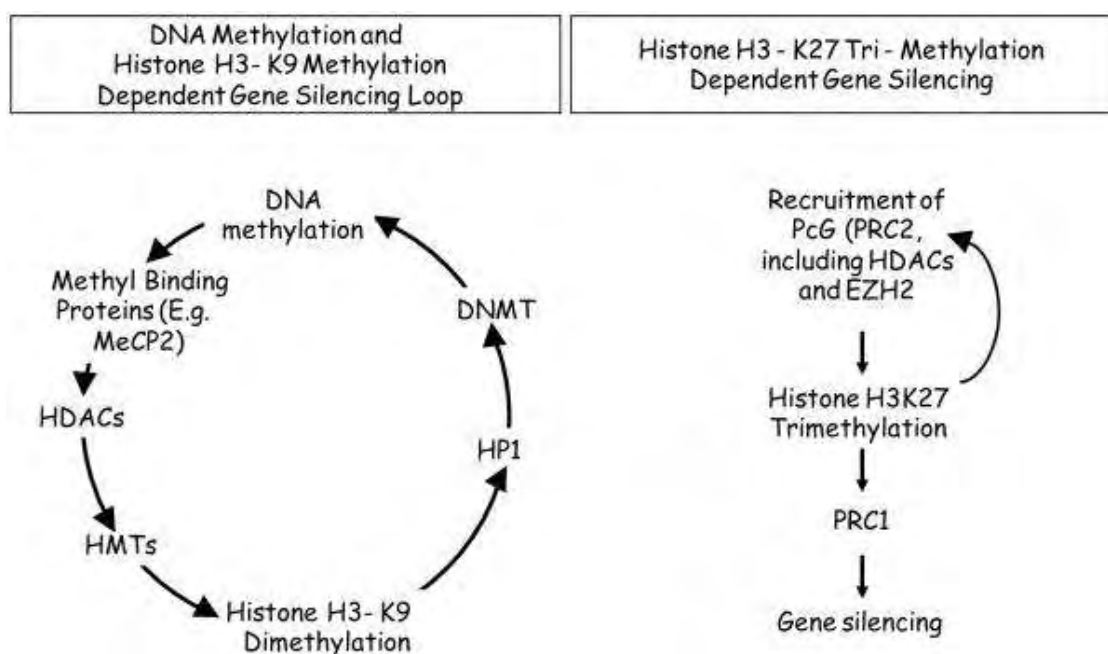
Οι ιστόνες αποτελούν πρωτεΐνες γύρω από τις οποίες περιελίσσεται το DNA προκειμένου να δημιουργηθούν τα νουκλεοσώματα. Πρόκειται για οκταμερή που σχηματίζονται από ζεύγη των τεσσάρων κεντρικών ιστονών (H2A, H2B, H3, H4 / εικόνα 18) και ζεύγη βάσεων DNA γύρω από αυτές. Τροποποιήσεις τους εμπλέκονται σε μία σειρά βιολογικών διαδικασιών όπως ενίσχυση ή καταστολή μεταγραφικής/ μεταφραστικής δραστηριότητας, επιδιόρθωση του DNA και οργάνωσή του σε χρωμοσώματα. Οι συχνότερες επιγενετικές αλλαγές που παρατηρούνται κατά κύριο λόγο στα άκρα των ιστονών H3 και H4 (περιέχουν αμινοξέα όπως σερίνη, λυσίνη, θρεονίνη και αργινίνη) είναι: μεθυλίωση, ακετυλίωση, ουμπικουϊτίνωση, σουμοϋλίωση, φωσφορυλίωση<sup>85, 86</sup>.



Εικόνα 18 : Μεθυλίωση, ακετυλίωση, φωσφορυλίωση των ιστονών H3, H4, histone modification (2018)

Οι μεθυλοτρανσφεράσες των ιστονών (HMTs) ρυθμίζουν την μεταγραφική ενεργοποίηση ή καταστολή της χρωματίνης μεταφέροντας 1-3 μεθυλομάδες στα άκρα των ιστονών H3, H4 (κυρίως υπολλείμματα λυσίνης).

Μεθυλιωμένες περιοχές με επακόλουθη ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων είναι η H3K4 και η H3K79, ενώ αντίστοιχες με καταστολή μεταγραφικών παραγόντων είναι η H4K20 και η H3K9. Μάλιστα η μεθυλιωμένη H3K9 μπορεί να προκαλέσει έναν καταρράκτη αποσταθεροποιητικών μηχανισμών που οδηγούν σε έναρξη και συντήρηση της μεθυλίωσης του DNA<sup>87</sup>.



Εικόνα 19 : δύο μονοπάτια αποσιώπησης γονιδίων με την συμβολή των ιστονών, Issa J et al. (2010)

Ο βαθμός ακετυλίωσης των ιστονών ρυθμίζεται από τις τρανσφεράσες HATs και HDACs που προσθέτουν ή αφαιρούν ακετυλομάδες αντίστοιχα. Καθώς συμβάλλουν επίσης σε επιγενετικές μεταγραφικές τροποποιήσεις, σημαντικός αναδεικνύεται ο ρόλος τους στις νεοπλασίες, την φλεγμονή, την χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, την καρδιακή ανεπάρκεια και την σχιζοφρένεια με πρόσφατες μελέτες να σημειώνουν ικανοποιητική θεραπευτική ανταπόκριση μετά από χορήγηση αναστολέων τους<sup>88, 89</sup>.

Η ακετυλίωση και η μεθυλίωση των ιστονών είναι δυνατό να διενεργούνται από το ίδιο ένζυμο (για παράδειγμα η H3K9 μπορεί να μεθυλιώνεται ή να ακετυλιώνεται εν είδει διακόπτη, όχι όμως ταυτόχρονα). Η εναλλαγή μεθυλίωσης/απομεθυλίωσης της H3K9 διατηρείται σταθερή σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης των θηλαστικών. Μεθυλιωμένη H3K27 οδηγεί σε μειωμένη γονιδιακή έκφραση με την βοήθεια των ενζύμων PcG ενώ η μεθυλιωμένη H3K9 μέσω των HP/SUV πρωτεϊνών (Εικόνα 19).

### 2.2.1 Σύμπλοκο PCG

Μεταλλάξεις των γονιδίων που εμπλέκονται στην τροποποίηση των ιστονών όπως οι πρωτεΐνες του συμπλόκου Polycomb (PcG) έχουν περιγραφεί σε ασθενείς με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα. Το σύμπλοκο αυτό κωδικοποιείται από μια σειρά γονιδίων, με κυριότερα το PRC1 που φέρει δακτυλίους Rnf1 και Rnf2 με λειτουργία λιγάσης της ουμπικουΐνης και το PRC2 που αποτελείται από τους ενισχυτές EZH1 και EZH2 με λειτουργία μεθυλοτρανσφεράσης των ιστονών<sup>90</sup>.

### 2.2.2 EZH1, EZH2, SUZ12

Μεταλλάξεις του EZH2 (το γονίδιο του βρίσκεται στην περιοχή 7q) μετά από εναλλακτικό μάτισμα ή μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης έχουν συσχετισθεί με υπολειμματική μεθυλίωση ογκοκατασταλτικών γονιδίων σε ασθενείς με MDS. Ανιχνεύονται στο C άκρο ή σε όλη την έκταση του γονιδίου αλλά και σε μία περιοχή πλούσια σε κυστεΐνη στην οποία συνδέεται ο παράγων SUZ12<sup>91, 92</sup>. Τροποποιήσεις αυτού του τύπου διαπιστώνονται σε περιστατικά με μονογονεϊκή δισωμία και αποτελούν αρνητικό προγνωστικό δείκτη σε μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα χαμηλής επικινδυνότητας. Συχνά ανιχνεύονται σε ασθενείς με ελλείμματα του χρωμοσώματος 7 που ως γνωστόν επιβαρύνουν την πρόγνωση<sup>93</sup>.

Οι μεταλλάξεις του EZH2 είναι κοινές κυρίως σε ασθενείς με MDS (σπανιότερα στις λευχαιμίες) και μάλιστα σε συνδυασμό με μεταλλάξεις του RUNX1. Ο παθογενετικός μηχανισμός που προωθεί την εξάπλωση δυσπλαστικών κλώνων φαίνεται να στηρίζεται στην παραγωγή προφλεγμονωδών ουσιών ενώ η καταστολή της

λευχαιμογένεσης στην μειωμένη έκφραση του παράγοντα HOXA9<sup>94</sup>. Τα σύμπλοκα PRC1,2 εμποδίζουν την γονιδιακή έκφραση μέσω αλληλεπίδρασής τους με τις ιστόνες αλλά και με μηχανισμούς ανεξάρτητους των ιστονών. Πρόκειται για ογκογονίδια ενώ το EZH2 είναι ογκοκατασταλτικό γονίδιο. Τροποποιήσεις του παράγοντα RUNX1 παρατηρούνται επίσης στα νοσήματα με del7 και συμβάλλουν μέσω της συνεργασίας τους με τον EZH2 στην κλινική επιδείνωση των πασχόντων, ακόμη και εάν δεν σημειωθεί εκτροπή σε οξεία λευχαιμία (μεγαλύτερες ανάγκες σε μετάγγιση αίματος και παραγώγων, λοιμώξεις). Εξάλλου σημαντικό ρόλο στην συντήρηση της μυελοδυσπλασίας έχει και το μικροπεριβάλλον του μυελού μέσω της παραγωγής κυτταροκινών από το RUNX1 και το EZH2<sup>95</sup>.

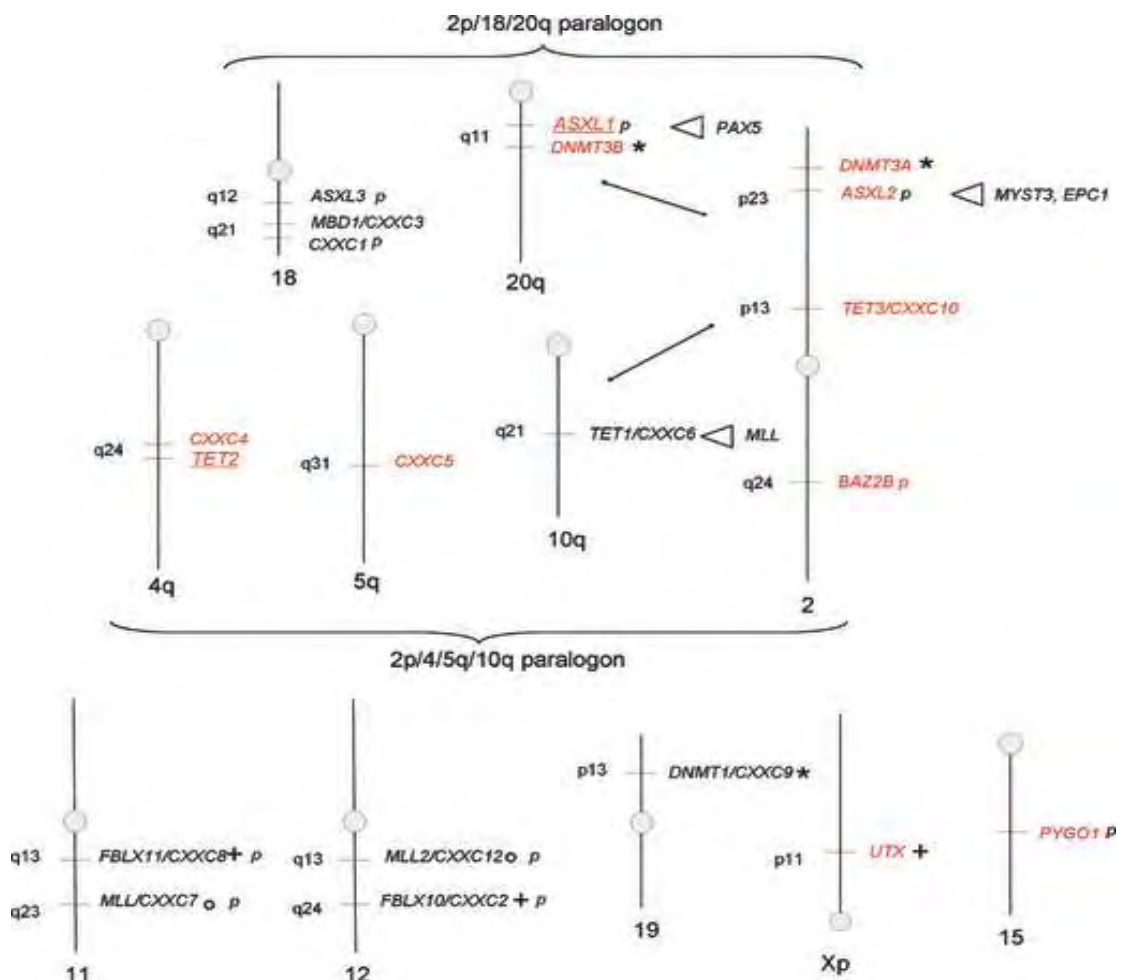
### 2.2.3 Παράγων ASXL1

Το γονίδιο ASXL1 είναι ένα από τα συνήθη μεταλλαγμένα γονίδια στις αιματολογικές κακοήθειες, εντοπίζεται στην περιοχή 20q11, κοντά στην γονιδιακή περιοχή του DNMT3b (αντίστοιχα μεταλλάξεις του ASXL2 βρίσκονται στο 2p23 κοντά στο γονίδιο του DNMT3a). Οι περιοχές των χρωμοσωμάτων που φιλοξενούν ομόλογα γονίδια (Εικόνα 20) όπως του ASXL ονομάζονται ‘παραλογικές’ (paralogous)<sup>96, 97</sup>.

Ο παράγων ASXL1 μεταξύ άλλων κωδικοποιεί έναν ενεργοποιητή του υποδοχέα του ρετινοϊκού που συμμετέχει στην μυελοποίηση στην περιοχή 5q, περιοχή που συχνά αποκόπτεται στα MDS που εκτρέπονται<sup>98</sup>. Αντίστοιχα το γονίδιο ASXL2 συνδεόμενο με ενεργοποιητές του συμπλέγματος PcG οδηγεί στην έκφραση ενός ενζύμου με δράση αποακετυλάσης των ιστονών. Με την γνώση αυτή η χορήγηση αναστολέων της μεθυλίωσης και της αποακετυλίωσης εφαρμόζεται στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα με μεταλλάξεις των ASXL, με ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Από την αλληλούχιση του γονιδιώματος ασθενών με CMML προέκυψε η αποκάλυψη αυτών των μεταλλάξεων σε ένα σημαντικό ποσοστό περιστατικών με καθ’υπεροχήν μυελοϋπερπλαστικό χαρακτήρα με ή χωρίς την συνεύρεση μεταλλάξεων των TET πρωτεϊνών<sup>99</sup>. Επιπλέον η διαπίστωση της πανομοιότυπης έκφρασης των ASXL τόσο σε μεταλλαγμένα γονιδιακά πρότυπα όσο και σε μη μεταλλαγμένα ερμηνεύεται από την υπερίσχυση της δράσης ενός άλλου μεταλλαγμένου γενετικού τύπου, για παράδειγμα της TET2, αλλά και από επιγενετικές τροποποιήσεις που μπορεί να υπερβούν ακόμη κι αυτή την ίδια την μετάλλαξη<sup>100</sup>.

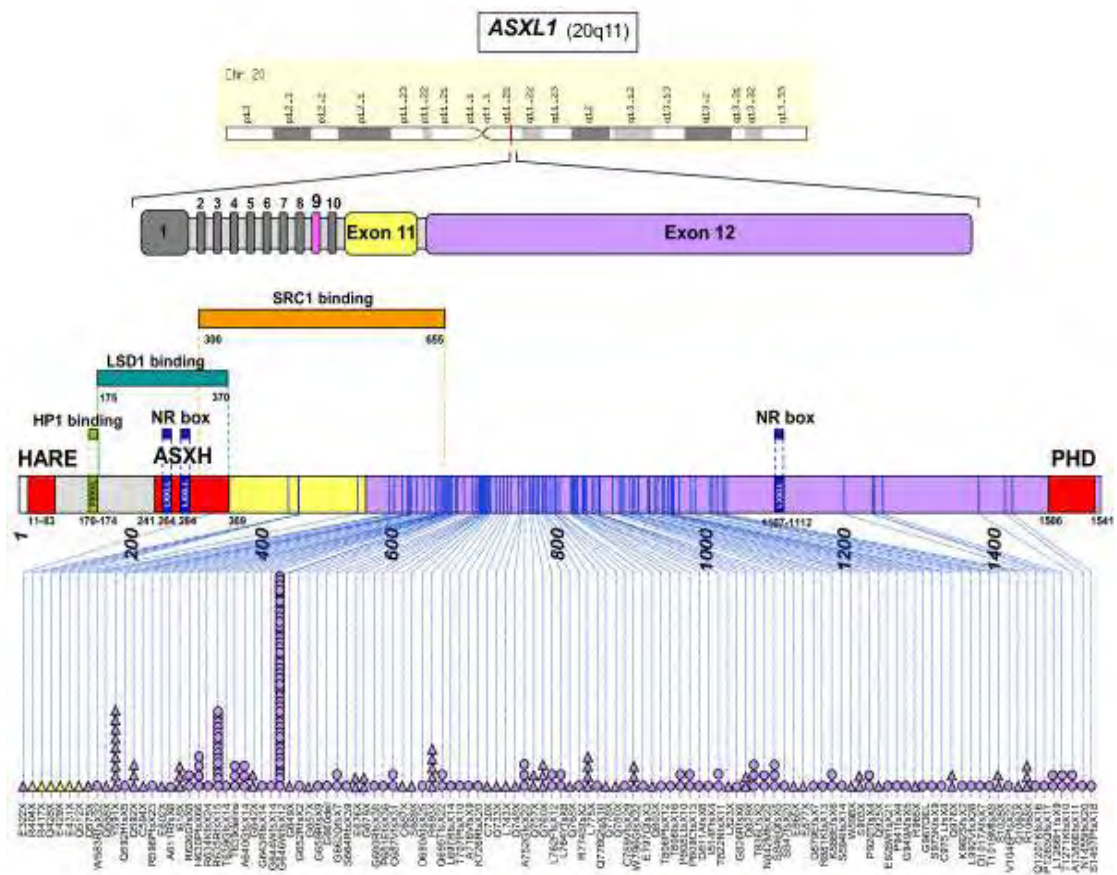
Καθώς επισημαίνεται η σχέση του ASXL1 με την χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία και διευκρινίζεται ότι πρόκειται επίσης για ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο, είναι σκόπιμη η μελέτη και εδραίωση θεραπευτικών μοντέλων που ήδη χρησιμοποιούνται στις προαναφερθείσες μεταλλάξεις και στηρίζονται σε επιγενετικές δράσεις.

Μεταλλάξεις του ASXL1 οδηγούν σε παραγωγή μίας πρωτεΐνης που αποτελείται από: άκρο C στο οποίο συνδέονται μεθυλιωμένες βάσεις λυσίνης, N ελικοειδές άκρο και μία ενδιάμεση περιοχή η οποία σε συνεργασία με την αποουμπικουϊτινάση του συμπλέγματος PRC αποουμπικουϊτινώνει τμήματα των ιστονών, καθιστώντας συγκεκριμένα γονίδια (όπως επιδιόρθωσης του DNA ή τροποποιητές της χρωματίνης) ανενεργά<sup>101, 102</sup>.



Εικόνα 20: παραλογικές περιοχές ομολόγων γονιδίων που παρατηρούνται μεταλλαγμένα στα MDS, Veronique Gelsi-Boyer et al. (2009)

Μεταλλάξεις του γονιδίου ASXL1 έχουν παρατηρηθεί σε όλο το μήκος του (Εικόνα 21), ωστόσο οι μεταλλάξεις που συνδέονται με αιματολογικές κακοήθειες εντοπίζονται καθ'υπεροχήν στο εξόνιο 12 και είναι σπανιότερα σημειακές (έλλειμμα ή διπλασιασμός ή αντικατάσταση) με αποτέλεσμα την παραγωγή μικρότερης πρωτεΐνης και συχνότερα ετερόζυγες με συνέπεια την απώλεια λειτουργίας της πρωτεΐνης<sup>103</sup>. Οι μεταλλάξεις αυτές συναντώνται ευρέως στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα με κυτταρογενετικά ευρήματα ενδιαμέσου κινδύνου, αλλά και στα μυελοϋπερπλαστικά νεοπλάσματα, καθώς και στα MDS/MPNs και μάλιστα στην χρόνια φάση τους<sup>104</sup>.



Εικόνα 21: Κατανομή των μεταλλάξεων του ASXL1 κατά μήκος της πρωτεΐνης, Gelsi-Boyer V. et al. (2012)



Μεταλλάξεις λόγω αλλαγής πλαισίου ή πρόωρου τερματισμού κωδικονίου οδηγούν σε παραγωγή ελλειμματικής πρωτεΐνης που επηρεάζει την αιμοποίηση των δεσμευμένων κυτταρικών σειρών του μυελού.

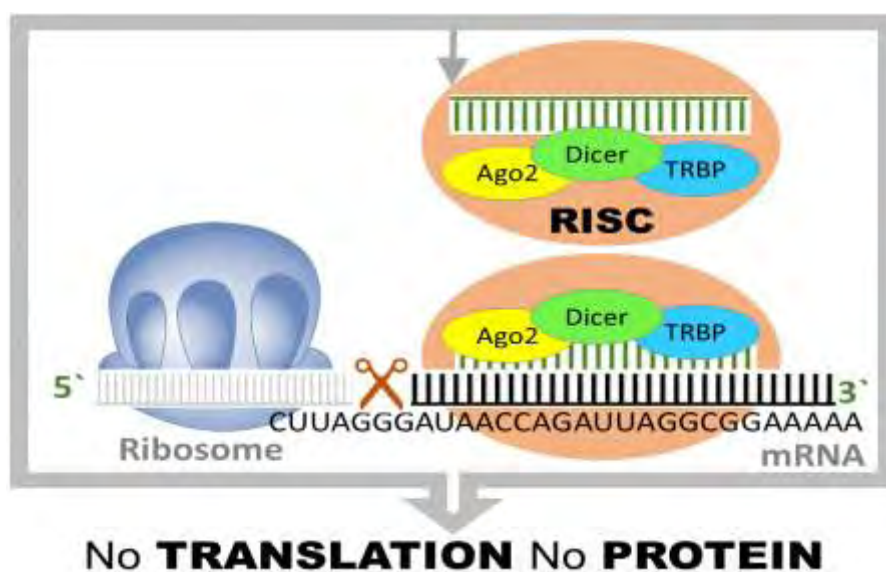
Από την παρατήρηση ασθενών με MDS/MPN που φέρουν επιπλέον του ASXL1 και μεταλλάξεις του JAK2 δεν έχει αποσαφηνισθεί πλήρως ποια από τις δύο μεταλλάξεις προηγείται της άλλης, εικάζεται όμως μία συνεργασία των δύο στην παθογένεια και εξέλιξη των συνδρόμων μέσω αθροιστικής δράσης<sup>105</sup>. Οι μεταλλάξεις του ASXL1 σύμφωνα με περιορισμένο αριθμό μελετών επιταχύνουν την εξέλιξη των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων σε επιθετικές οξείες λευχαιμίες, επηρεάζοντας δυσμενώς την πρόγνωση, εντούτοις μένει να διευκρινισθεί αν σε αυτό συμβάλλουν και άλλες μεταλλάξεις (πιθανή πολυπαραγοντική δράση και εδώ). Αντιμεταθέσεις του γονιδίου συνδέονται με μορφές οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας, ενώ μεταλλάξεις του συμπλέγματος PRC παρατηρήθηκαν επίσης σε μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα και σε λευχαιμίες<sup>106</sup>.

Τέλος μεταλλάξεις της πρωτεΐνης SUZ12 και του RING1 (σύμπλοκο PRC1), μόνες ή σε συνδυασμούς με προαναφερθείσες μεταλλάξεις συμβάλλουν στην παθογένεια των MDS και επιβαρύνουν την πρόγνωση<sup>107, 108</sup>. Το SUZ12 που οδηγεί στην έκφραση του PRC2 (με δράση μεθυλοτρανσφεράσης που διαφοροποιεί τις ιστόνες) εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17q (στην ίδια περιοχή με τον NF1) και μεταλλαγμένα πρότυπά του έχουν περιγραφεί σε MDS/MPN καθώς και στην CMML. Στα ίδια νοσήματα ανιχνεύονται ταυτόχρονα μεταλλάξεις των ισοκιτρικών δεϋδρογονασών και των μεθυλοτρανσφερασών. Μεταλλαγμένο γονίδιο SUZ12 προκαλεί υπολλειμματική λειτουργία του PRC2 και κατ'επέκτασιν διαταραγμένη μεθυλιωτική δραστηριότητα<sup>109</sup>.

### 3. MicroRNAs

Τα microRNAs (miRNAs) είναι μικρά μη κωδικοποιητικά RNAs που παράγονται με έναν εξαιρετικά πολύπλοκο μηχανισμό με την βοήθεια της RNA πολυμεράσης και της ριβονουκλεάσης RNAάσης και συνδέονται με ειδικές αλληλουχίες mRNAs ή RNAs ανακόπτωντας την ομαλή μεταγραφική τους λειτουργία. Για να συμβεί αυτό δημιουργούν το σύμπλοκο RISC (αποσιωπητικό σύμπλοκο επαγόμενο από RNA), ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα που αποτελείται από miRNA ή siRNA (αναγνωρίζει ομόλογη αλληλουχία RNA μεταγράφου) και την πρωτεΐνη *Αργοναύτης* (Εικόνα 22)

που αλληλεπιδρά με το RNA και το αποδομεί μέσα σε ειδικά κυτταροπλασματικά σωμάτια, τα σωμάτια P. Προκειμένου να μειωθεί σημαντικά το ποσό του mRNA που πρόκειται να μεταφρασθεί, αναστέλλεται η σύνδεση του εκλυτικού παράγοντα της μετάφρασης eIF στο 5' άκρο, αποαδενυλιώνεται η 3' πολυA τελική περιοχή και απομακρύνεται η υπομονάδα 60S του ριβοσώματος. Αν και δεν είναι απόλυτα αποσαφηνισμένος ο τρόπος με τον οποίο το RISC αναγνωρίζει το RNA που πρόκειται να απενεργοποιηθεί, διαφαίνεται ότι πρόκειται για μηχανισμό που λειτουργεί και ανεξάρτητα από την μεταφραστική διαδικασία<sup>110</sup>.

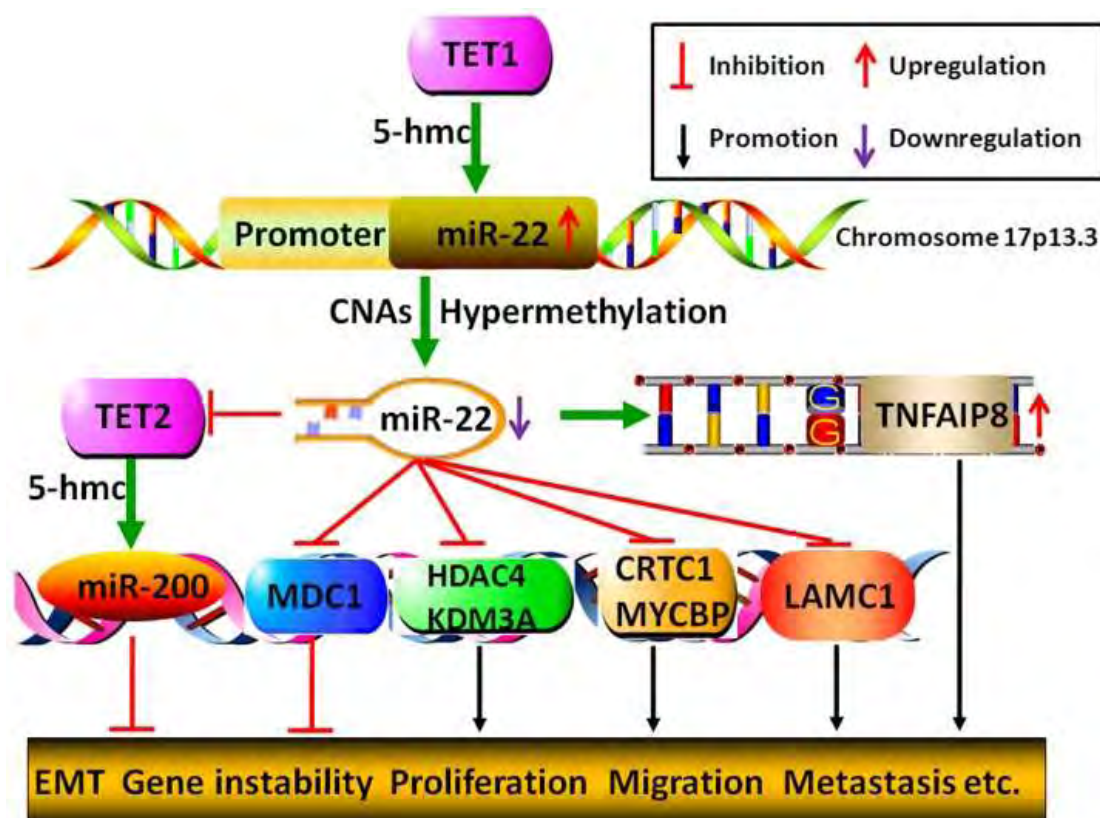


Εικόνα 22: σύμπλοκο RISC και διακοπή της μετάφρασης, Buza T et al. (2014)

Μία από τις πρώτες μελέτες των micro-RNAs (Pons et al. 2009) έδειξε μετά από παρακολούθηση 25 ασθενών με MDS και 12 υγιών ατόμων την υπερέκφραση miRNAs (12 στον μυελό και 6 στο περιφερικό αίμα) που συμμετέχουν στον αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω καταστολής των πρωτεϊνών E2F. Ακολούθησαν μεγαλύτερης κλίμακας μελέτες που επιβεβαίωσαν την παρατήρηση αυτή και διερεύνησαν την σχέση των miRNAs με συγκεκριμένες υποκατηγορίες MDS χωρίς σημαντικά αποτελέσματα, με εξαίρεση την υποκατηγορία del5q που αποτελεί ξεχωριστή υποκατηγορία με ιδιαίτερα κυτταρογενετικά και επιγενετικά ευρήματα<sup>111</sup>.

Με την βοήθεια μικροσυστοιχιών παρατηρήθηκε μία σημαντική συσχέτιση των miRNAs με τα κλωνικά αιματολογικά νοσήματα, όπως για παράδειγμα η συχνή παρουσία των mir-22, mir-222, mir-34a στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα με

λιγότερο συχνά τα mir-150, let-7a, mir-20a και αντίστοιχα η ανεύρεση mir-299-5p, mir-134, mir-127, mir-126, mir-22 στις οξείες μυελογενείς λευχαιμίες με σπανιότερα τα let-7c, -7b. Μάλιστα η κοινή παρουσία του mir-22 και στις δύο κατηγορίες νοσημάτων ταυτίζεται με επιθετικότερη πορεία νόσου, με αυξημένα επίπεδα 5-μεθυλκυτοσίνης (Εικόνα 23) και ικανή ανταπόκριση μετά από χορήγηση απομεθυλιωτών<sup>112, 113</sup>.

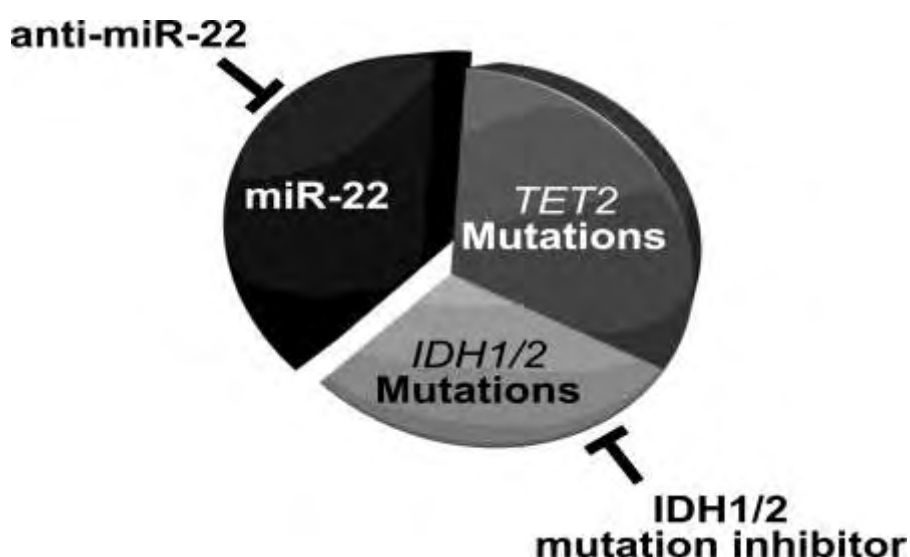


Εικόνα 23: Γενετικοί και επιγενετικοί μηχανισμοί μέσω των οποίων το mir-22 συμβάλλει στην ογκογένεση, Wang J et al. (2017)

Ειδικότερα ασθενείς με υπερέκφραση του mir-17-3p και υποέκφραση του mir-100-5p που έλαβαν αζακυτιδίνη παρουσίασαν αύξηση της συνολικής επιβίωσης. Τα microRNAs mir-100 και mir-1 υπερεκφράζονται στην οξεία μυελογενή λευχαιμία και επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, γεγονός που τα καθιστά ογκογονίδια. Εξάλλου η μειωμένη έκφραση των mir-181 και mir-15 και η καθυστέρηση της βλαστικής εκτροπής σε ασθενείς μετά από λήψη αζακυτιδίνης ενισχύουν την θεωρία της ευεργετικής επιγενετικής δράσης του φαρμάκου.<sup>114</sup> Ταυτόχρονες βλάβες σε άλλους μηχανισμούς όπως μεταλλάξεις των IDH1/2 περιπλέκουν την εικόνα και καταδεικνύουν ότι πρόκειται για πολυπαραγοντικές οντότητες στις οποίες η

αναστροφή της μίας βλάβης δεν αρκεί για να επιτευχθεί πλήρης φαινοτυπική και γονιδιακή ύφεση<sup>115</sup>.

Η ανίχνευση του miR-22 (ένα από τα πλέον κοινά mi-RNAs) μπορεί να αποτελέσει δείκτη για την διάγνωση συγγενών ανωμαλιών του εμβρύου ή να προσφέρει προγνωστική αξία σε περιστατικά συμπαγών όγκων όπου η χορήγηση συγκεκριμένων χημειοθεραπευτικών αντενδείκνυται (χορήγηση πεμετρεξέδης σε μη μικροκυτταρικό νεόπλασμα του πνεύμονα)<sup>116</sup>. Παράλληλα το miR-22 (Εικόνα 24) δύναται να αποτελέσει θεραπευτικό στόχο στον μεταστατικό καρκίνο του μαστού αλλά και στην επιταχυνόμενη φάση χρονίων μυελοδυσπλαστικών / μυελοϋπερπλαστικών νοσημάτων σε συνδυασμό με την στόχευση μεταλλάξεων και την χορήγηση τροποποιητών της μεθυλίωσης<sup>117</sup>.

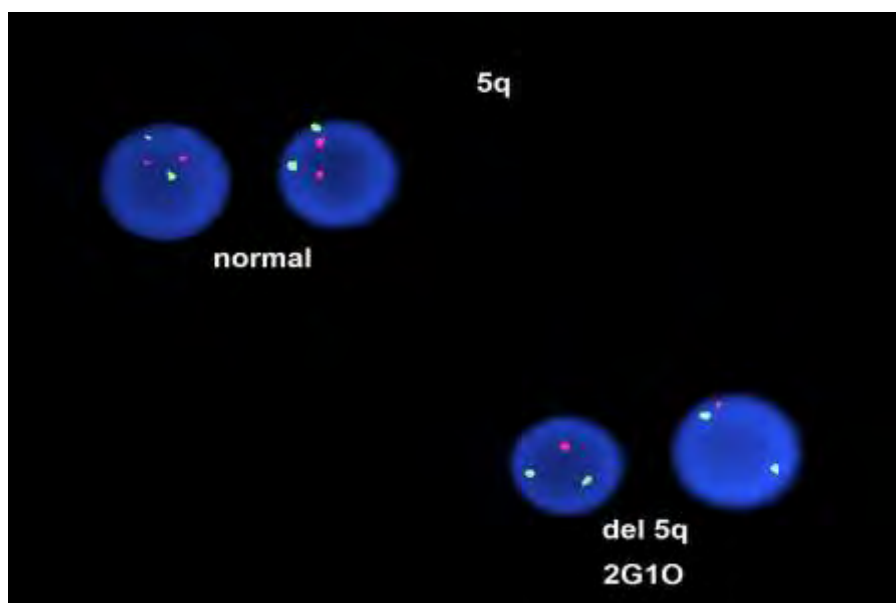


Εικόνα 24: το miR-22 νέος θεραπευτικός στόχος στις αιματολογικές κακοήθειες, Song S et al. (2014)

Στην οξεία μυελογενή λευχαιμία OML2 κατά FAB τα λευχαιμικά κύτταρα με την αντιμετάθεση t(8;21) εκφράζουν σε χαμηλό ποσοστό το miR-223 (μέσω καταστολής του) το οποίο υπό κανονικές συνθήκες ρυθμίζει την ομαλή κοκκιοποίηση. Θεραπεία με αναστολείς της μεθυλίωσης οδηγεί σε αύξηση του miR-223 και μακροπρόθεσμα σε επανεκκίνηση της κυτταρικής ωρίμανσης<sup>118</sup>.

#### 4. MDS del5q

Το MDS 5q- περιλαμβάνει μία ξεχωριστή κατηγορία μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων σύμφωνα την ταξινόμηση της WHO (2008/2016) με απαραίτητη προϋπόθεση την έλλειψη του μακρού τμήματος του χρωμοσώματος 5 που διαπιστώνεται μετά από υβριδισμό με FISH (Εικόνα 25).

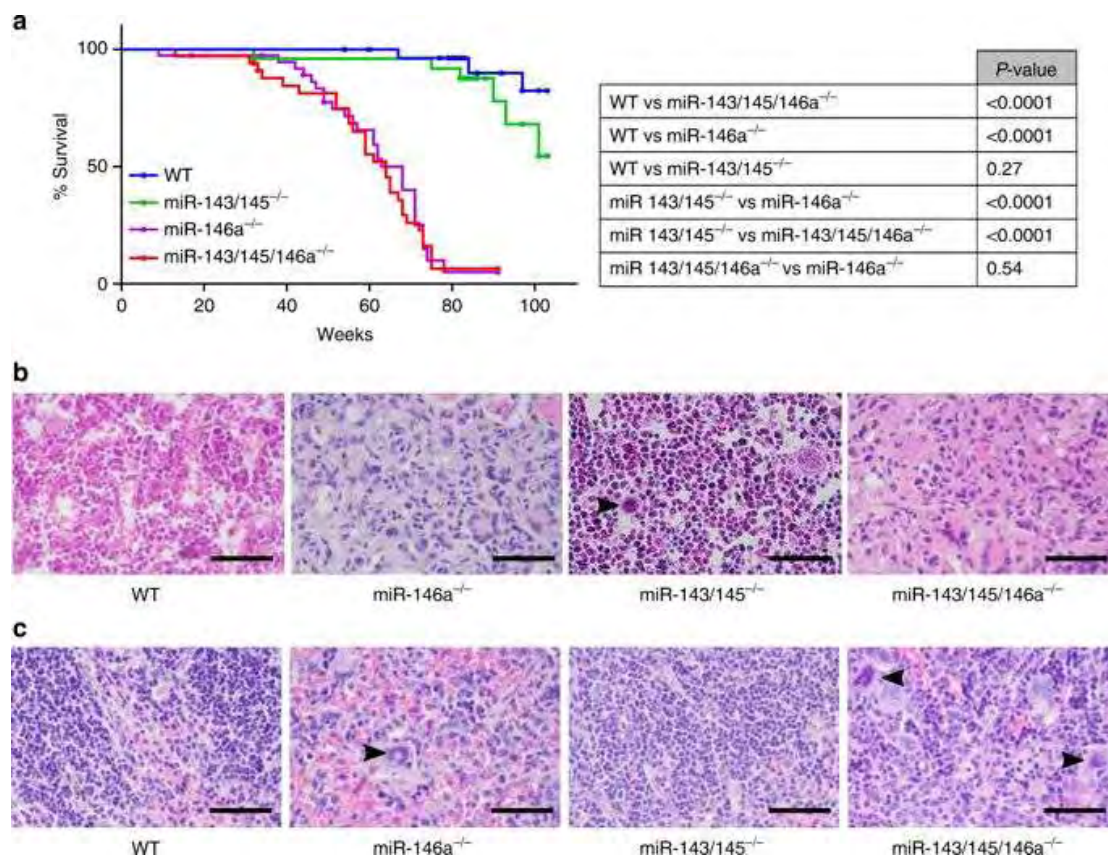


Εικόνα 25: FISH με 5q- , Parylo S (2017)

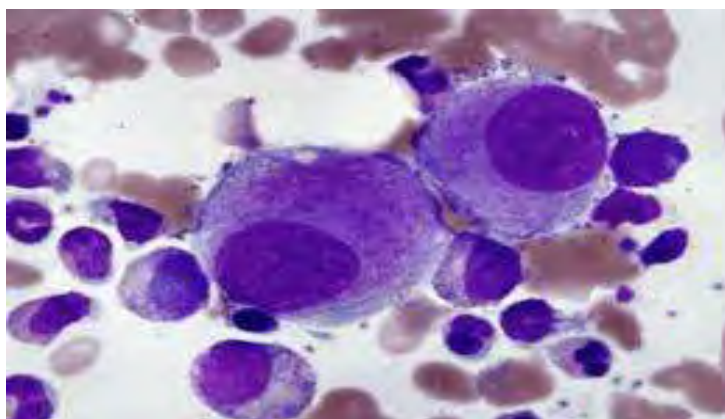
Πρόκειται για χρωμοσωμική διαταραχή σε αδιαφοροποίητα αρχέγονα κύτταρα με την πλέον ξεκάθαρη σχέση γονοτύπου-φαινοτύπου. Εμφανίζεται καθ' υπεροχήν στον γυναικείο πληθυσμό και χαρακτηρίζεται από μακροκυτταρική αναιμία, ήπια θρομβοκυττάρωση και παρουσία υπολοβομένων μεγακαρυοκυττάρων (Εικόνα 27) στον μυελό. Προκαλείται από μεταλλάξεις του ριβοσωμικού γονιδίου RPS14. Στην παθογένεια του συνδρόμου συμμετέχουν γονίδια που σχετίζονται μεταξύ άλλων με την μεταφραστική λειτουργία, τις μεταλλάξεις του p53 και την τροποποίηση των ιστονών<sup>119</sup>. Απουσία των microRNAs mir145, mir146a προκαλεί αφενός υπερέκφραση των παραγόντων TIRAP και TRAF6 και έκκριση κυτταροκινών, και αφετέρου καταστολή του μεταγραφικού παράγοντα FLI1 και δυσμεγακαρυοποίηση. Προσθήκη των microRNAs σε πολυδύναμα στελεχιαία κύτταρα ασθενών με MDS



5q- υποστρέφει την εικόνα δυσερυθροποίησης<sup>120,121</sup> και αυξάνει την συνολική επιβίωση (Εικόνα 26). Διαφορετικά microRNAs που υποεκφράζονται στο ίδιο νόσημα είναι τα: miR-520c, 128b, 213, ενώ άλλα που υπερεκφράζονται είναι τα: miR-130a, 199a, 24, 335, 99b<sup>122</sup>.

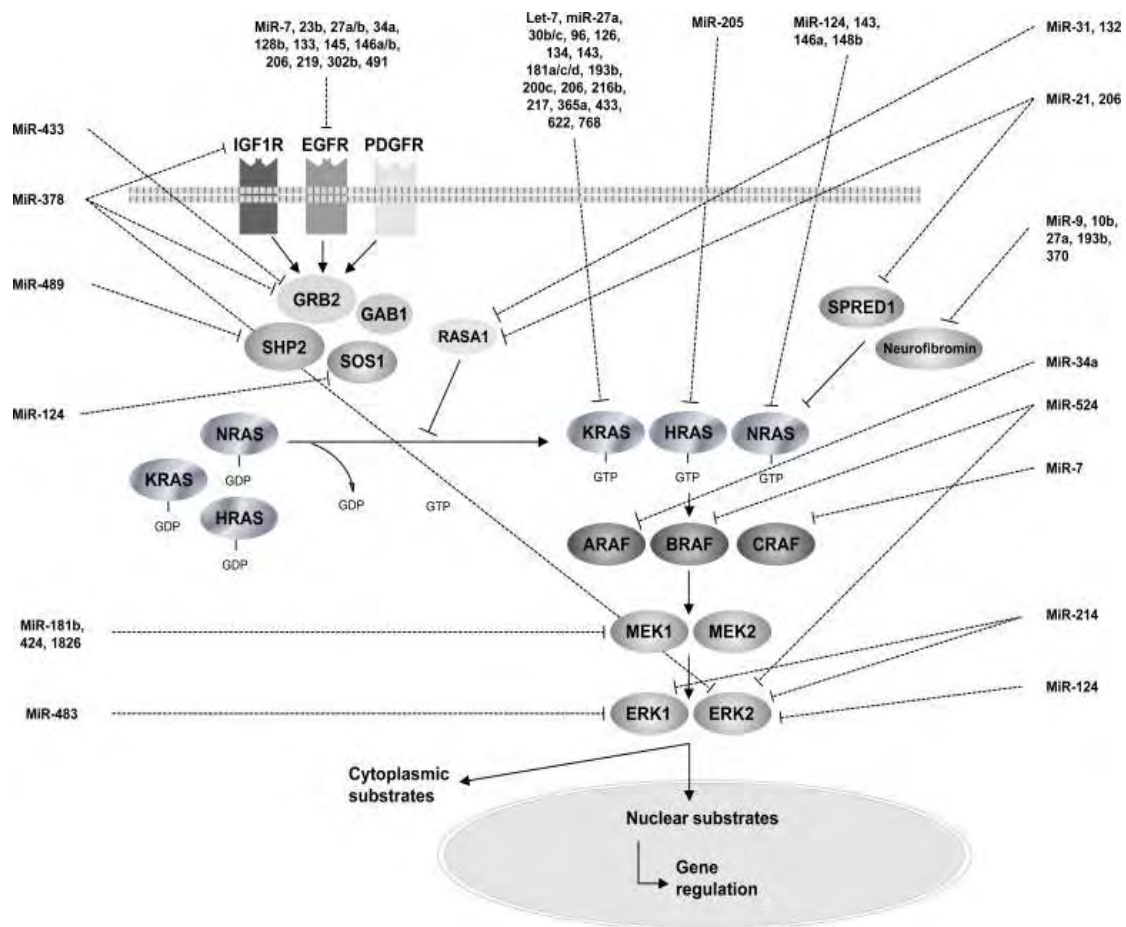


Εικόνα 26: Απόλεια των *mir-143,145* σε ασθενείς με *del5q* επιβαρύνουν την συνολική επιβίωση, Lam J et al (2018).



*Εικόνα 27: μυελικό επίχρισμα ασθενούς με MDS 5q- , James W Vardiman (2001)*

Ένα πλήθος mi-RNAs ενεργοποιούν το μονοπάτι RAS-MAPK στις αιματολογικές κακοήθειες αλλά και στους συμπαγείς όγκους παρουσιάζοντας δράση άλλοτε ογκοκατασταλτική και άλλοτε ογκοεπαγωγική. Η λειτουργία τους δύναται να τροποποιηθεί με την χορήγηση αντινοσηματικών ολιγονουκλεοτιδίων όπως το miR-34a ή το let-7 με σημαντική κλινική βελτίωση. Το miR-132 προωθεί την νεοαγγειογένεση, το miR-10b αλληλεπιδρά με τη NF-1 (Πίνακας 4), ενώ το miR-370 υπερεκφράζεται στις αιματολογικές κακοήθειες μέσω στόχευσης στη NF-1. Διαφορετικά micro-RNAs στοχεύουν διαφορετικά προϊόντα της αλυσίδας του Ras/MAPK μονοπατιού με ιδιαίτερη θεραπευτική σημασία<sup>123</sup>.



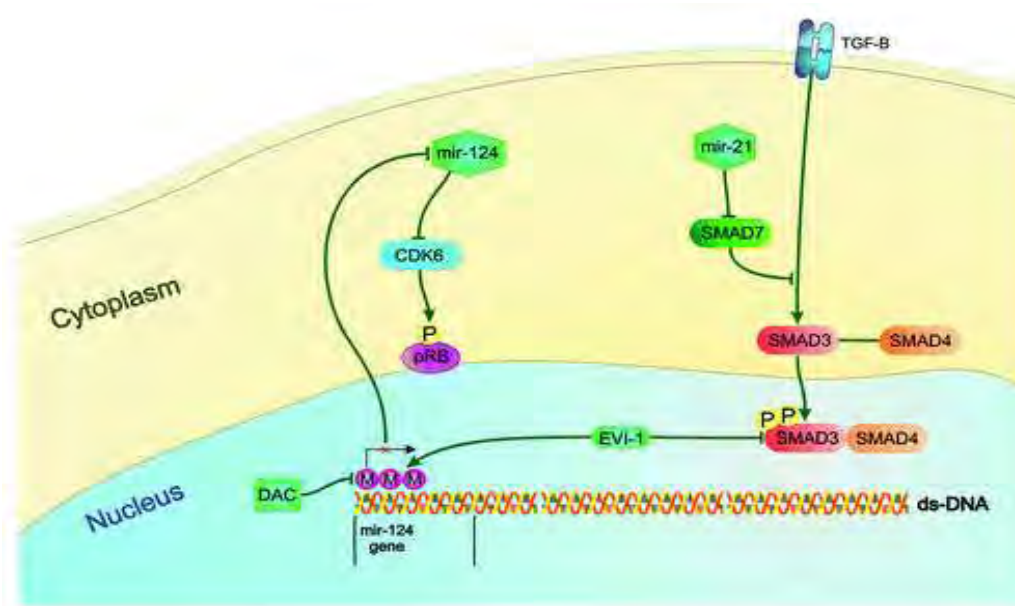
Πίνακας 4: miRNAs και RAS-MAPK, Masliah-Planchon J et al. (2016)

Τα microRNAs διαφοροποιούν το μοντέλο μεθυλίωσης ενός πλήθους παραγόντων που συμμετέχουν στην γονιδιακή έκφραση, αλλά και τα ίδια υπόκεινται σε επιγενετικές αλλαγές. Στα MDS υπερέκφραση του miR-21 οδηγεί σε ενίσχυση της δράσης του TGF- $\beta$  και δυσερυθροποίηση μέσω καταστολής του μονοπατιού SMAD, ενώ το miR-17-5p μειώνει την έκφρασή του σε ασθενείς υψηλού κινδύνου, με θετική έκβαση στην εξέλιξη των συνδρόμων<sup>124, 125</sup>.

Η υποομάδα των miR που ασκούν επιγενετικές δράσεις αποκαλείται epi-microRNAs και στις δράσεις τους περιλαμβάνονται μεταξύ άλλων ο αποκλεισμός των μεθυλοτρανσφερασών και η αφύπνιση των ανενεργών ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Για να συμβεί αυτό το mRNA τους αλληλεπιδρά με τους εκκινητές των γονιδίων μεταγραφικών παραγόντων ή μεταφέρεται στον πυρήνα όπου καταστέλλει απευθείας πυρηνικά μόρια υπεύθυνα για την μετάφραση. Πρόκειται για μία νέα οδό άμεσης εμπλοκής στην αιμοποίηση<sup>126, 127</sup>.



Το μοντέλο της δικής τους επιγενετικής τροποποίησης εξαρτάται από την θέση τους στο γονιδίωμα (ρύθμιση της αντιγραφής, μεταγραφής ή μετάφρασης αντίστοιχα). Για παράδειγμα το mir-124 εμφανίζει τρεις διαφορετικές ισομορφές με τις δύο εξ'αυτών να στερούνται μεθυλίωσης μετά από χορήγηση απομεθυλιωτών και να προωθείται η έκφρασή τους, σημειώνοντας θετική ανταπόκριση στην αγωγή. Η διαδικασία αυτή επιτελείται μέσω των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (Εικόνα 28) και ιστοειδικών τροφοδοτικών παραγόντων<sup>128</sup>.

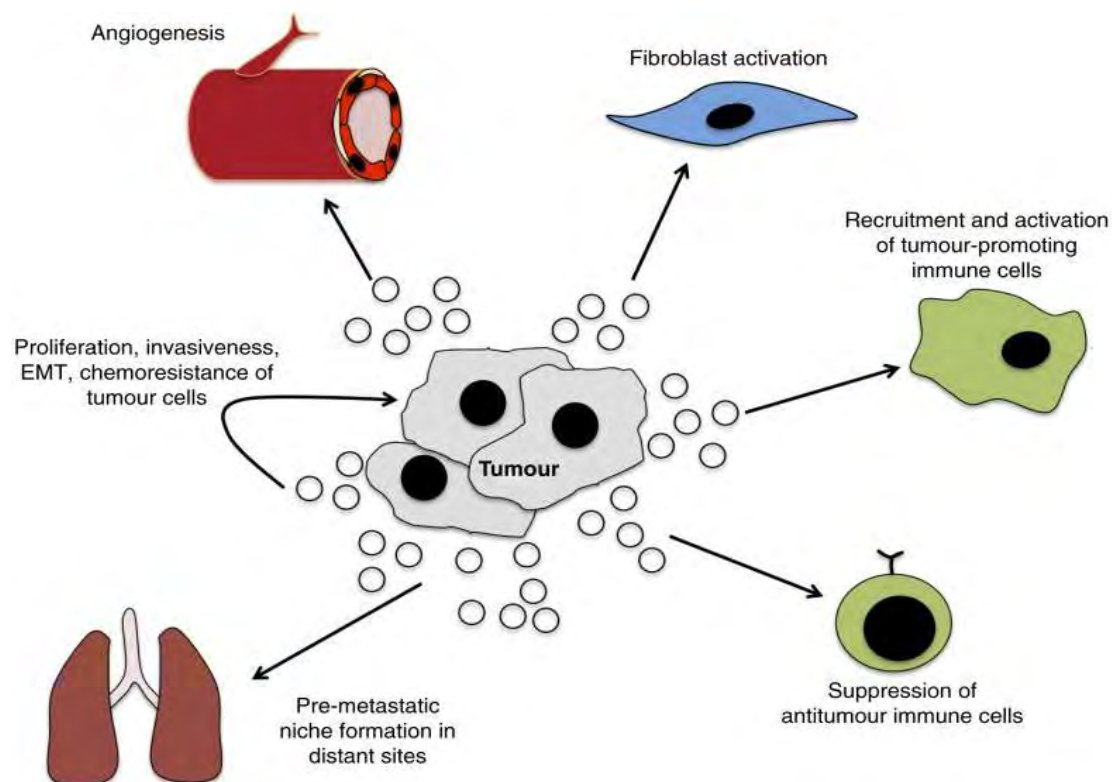


Εικόνα 28: επιγενετική τροποποίηση του mir-124 και η συμβολή του στην παθογένεια των MDS, Vasilatou D et al. (2013)

## 5. ΕΞΩΣΩΜΙΚΑ miRNAs

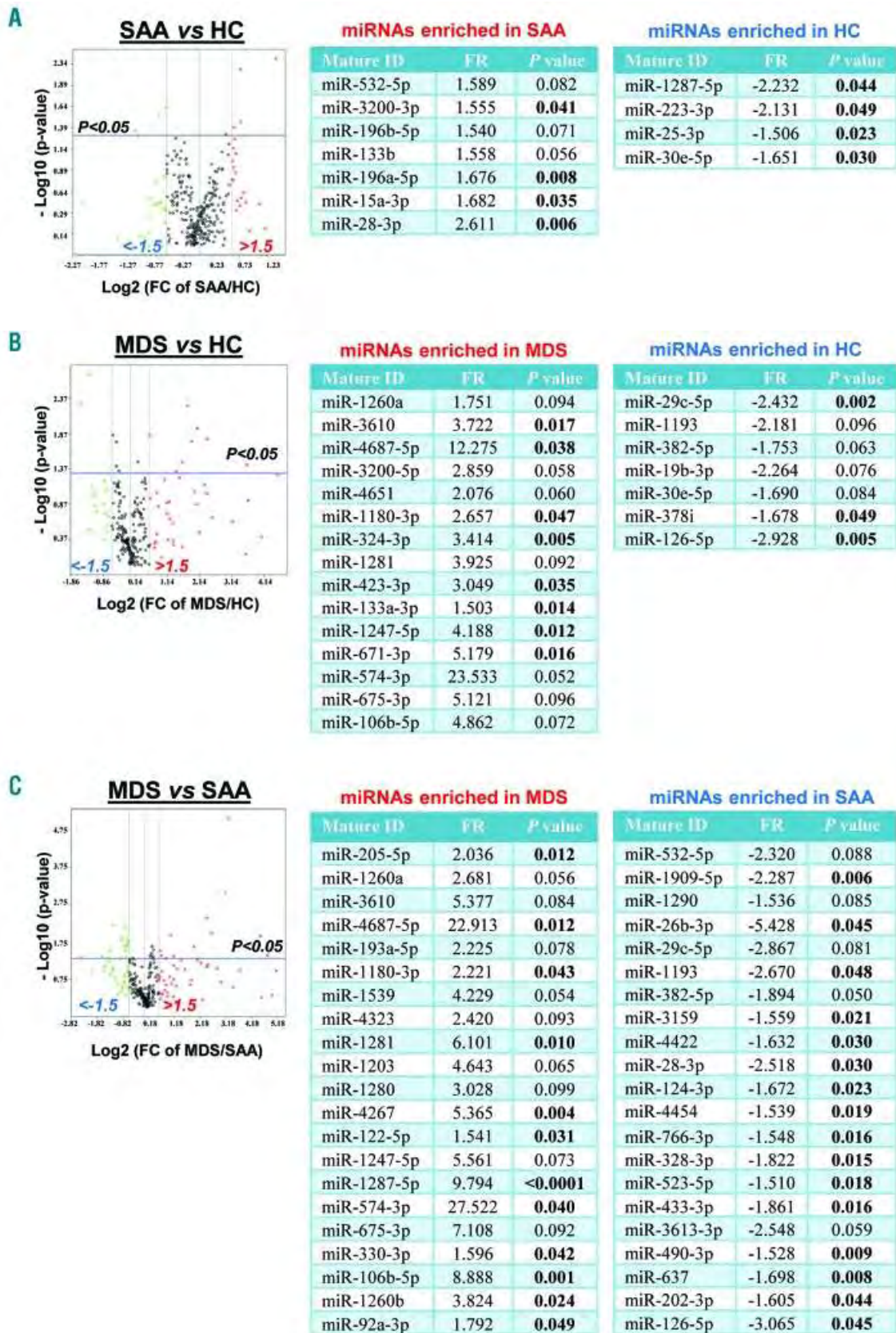
Τέλος αξιοσημείωτη είναι η πρόσφατη παρατήρηση των Giudice V. et al. (2018) ότι πέραν των κυκλοφορούντων miRNAs, σημαντικό ρόλο στην πρόγνωση ασθενών με αιματολογικές κακοήθειες έχουν και τα εξωσωμικά miRNAs (τα εξωσώματα είναι μικρά εξωκυττάρια κυστίδια που περιέχουν RNA και πρωτεΐνες και μεταφέρονται στον εξωκυττάριο χώρο όλων των κυτταρικών τύπων, επηρεάζοντας σημαντικές βιολογικές λειτουργίες). Η συμβολή των εξωσωμικών miRNAs στην ογκογένεση επιτελείται μέσω ενεργοποίησης των ινοβλαστών (Εικόνα 29), μέσω άμεσης

μεταφοράς τους στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα και μέσω αλληλεπίδρασης με το ανοσοποιητικό σύστημα<sup>129</sup>.



Εικόνα 29: Ο ρόλος των εξωσωμάτων στις διαδικασίες ογκογένεσης, Thind A et al, (2016)

Μελέτη 372 ασθενών με σοβαρή απλαστική αναιμία SAA και MDS, καθώς και 12 υγιών μαρτύρων οδήγησε στην διαπίστωση της υπερέκφρασης και υποέκφρασης διαφορετικών εξωσωμικών miRNAs (Πίνακας 5) στα δύο αυτά νοσήματα. Τα εξωσωμικά miRNAs σε συνδυασμό με τα ήδη μελετημένα κυκλοφορούντα miRNAs μπορούν να αποτελέσουν νέο αντικείμενο έρευνας με προγνωστικές και θεραπευτικές προεκτάσεις.<sup>130</sup>



Πίνακας 5: miRNAs σε SAA και MDS, Giudice V. et al. (2018)

## 6. Νέα δεδομένα για τους επιγενετικούς μηχανισμούς στις αιματολογικές νεοπλασίες MDS

Η επισταμένη έρευνα στο πεδίο των επιγενετικών μηχανισμών προσέφερε νέα δεδομένα στην διερεύνηση των κακοηθειών του αιμοποιητικού ιστού και των συμπαγών οργάνων, αλλά και στην κατανόηση των μηχανισμών που λαμβάνουν μέρος στην παθοφυσιολογία μη κλωνικών χρονίων νοσημάτων. Από την καταγραφή των μεθυλιωτικών/απομεθυλιωτικών διεργασιών στο μεγαλύτερο φάσμα του γονιδιώματος, προχωρήσαμε στην *φαρμακοεπιγενετική*, δηλαδή στην λεπτομερέστερη συσχέτιση εξαιρετικά ειδικών επιγενετικών τροποποιήσεων με συγκεκριμένες ασθένειες και στον σχεδιασμό στοχευμένων θεραπευτικών σχημάτων<sup>131</sup>.

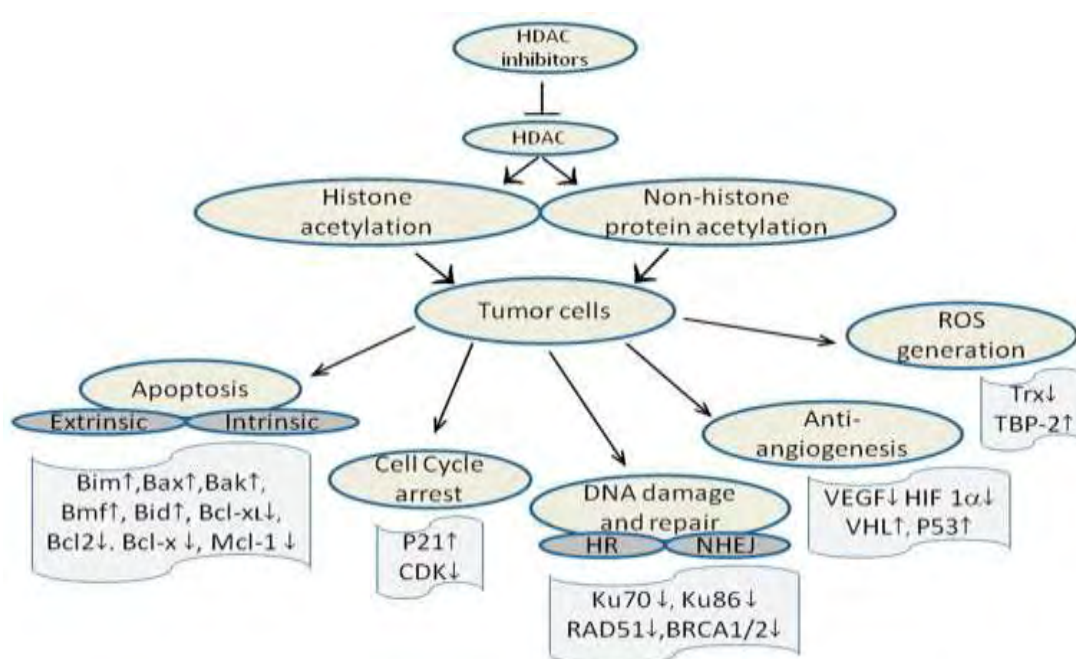
Έτσι ελαττωμένη μεθυλίωση της H3K4 επιβαρύνει την εξέλιξη των νεοπλασιών του προστάτη και του νεφρού (πολυμεθυλιωμένα πρότυπα H3K4 παρατηρούνται σε υποτροπές των όγκων του προστάτη), ενώ ενισχυμένη ακετυλίωση της H3K9 επιταχύνει την εξάπλωση των όγκων του πνεύμονα<sup>132</sup>. Χορήγηση απομεθυλιωτών μπορεί ακόμη να αναστρέψει τις επιπλοκές της χρόνιας γαστρίτιδος από το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού και να βοηθήσει χρονίως πάσχοντες με ρευματοειδή αρθρίτιδα και απομυελινωτικές νόσους<sup>133</sup>.

Από την αζακυτιδίνη και την γεμισιταμίνη περάσαμε στην εισαγωγή:

- της *απομεθυλάσης της λυσίνης-1 της ιστόνης (LSD1)* για την θεραπεία της AML, της CMML και των NHL<sup>134</sup>,
- του *αποκλειστή της G9a μεθυλάσης της ιστόνης* στην οξεία λεμφοβλαστική και μυελογενή λευχαιμία<sup>135</sup>,
- της *τριχοστατίνης (αποακετυλάση των ιστονών)* από την εμπειρία στις μυκητιασικές λοιμώξεις στην θεραπεία αιματολογικών κακοηθειών<sup>136, 137</sup>,
- των *miRNAs* για την προγνωστική τους αξία σε διάφορες νεοπλασίες,
- των *αποακετυλασών όπως το vorinostat και το romidepsin* στο T-δερματικό λέμφωμα, των *παραγώγων του υδροξυαμικού οξέος* στην λευχαιμία και στα γλοιώματα, του *ranobinostat* στα MDS/MPN με μυελοϊνωση<sup>138</sup>,
- των *λιπαρών οξέων ελαφρών αλυσίδων όπως το βαλπροϊκό οξύ* σε νευροενδοκρινείς όγκους και σε συνδυασμό με αζακυτιδίνη στα MDS<sup>139</sup>.



Στο πλαίσιο της αποακετυλίωσης των ιστονών (Πίνακας 6) δοκιμάζονται σήμερα θειοεστέρες όπως η μερκαπτοκετόνη, οι αποακετυλάσες που αλληλεπιδρούν με ιόντα ψευδαργύρου σε κακοήθειες του γαστρεντερικού, οι αποκλειστές των πρωτεασών σερίνης και ασπαρτικού σε γυναικολογικούς καρκίνους και διαπιστώνεται μία συνδυασμένη δράση τόσο δια των μιτοχονδρίων όσο και μέσω ενεργοποίησης μεμβρανικών υποδοχέων με επιπτώσεις στην απόπτωση, τον κυτταρικό θάνατο, την κυτταρική διαφοροποίηση και την αναστολή της νεοαγγειογένεσης<sup>140</sup>.



Πίνακας 6: ογκοκατασταλτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τους HDACs, Mottamal M et al. (2015)

Πρόσφατες μελέτες με νέους επιγενετικούς ρυθμιστές στις αιματολογικές κακοήθειες όπως:

- ο αναστολέας του DOT1L pinometostat (υποστρέφει την μεθυλίωση της H3K79 ιστόνης και εφαρμόζεται στα περιστατικά με αναδιατάξεις του MLL),
- ο αναστολέας της κινάσης του BRD4 που φωσφορυλιώνει την πολυμεράση II του RNA,
- οι αποκλειστές των ισοκιτρικών δεϋδρογονασών (IDH) enasidenib, AG-120 στα MDS με μεταλλάξεις των IGH1/2,
- οι αποκλειστές του EZH2 tazemetostat και EPZ011989,

- οι νεότεροι αναστολείς των μεθυλοτρανσφερασών guadecitabine, SGI-110
- οι αποκλειστές του PRMT5 (μεθυλοτρανσφεράσης της αργινίνης, GSK3326595)

θα οδηγήσουν στην εφαρμογή καινούργιων προγνωστικών δεικτών και θεραπειών μέσω διαγονιδιακών αλληλεπιδράσεων και πέρα από τις μονοσήμαντες μονογονιδιακές μεταλλάξεις<sup>141, 142</sup>.

## 7. Συμπεράσματα

Τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα αποτελούν τις τελευταίες δεκαετίες πεδίο εμπειριστατωμένης έρευνας στο πλαίσιο τόσο της κατάταξής τους με περιοδικές αναθεωρήσεις των συστημάτων ταξινόμησής τους, όσο και της διευκρίνησης των μηχανισμών που ενσωματώνουν. Πρόκειται άλλωστε για μία ετερογενή ομάδα συνδρόμων με ποικίλες κλινικές εκφράσεις και γενετικές προεκτάσεις. Η μελέτη του επιγενώματος που βασίζεται στην ενδεδειγμένη αποτύπωση κυρίως του μεθυλώματος αλλά και των των δευτερευόντων αναστρέψιμων τροποποιήσεων του γενετικού υλικού κατέστησε την επιγενετική ρύθμιση ακρογωνιαίο λίθο της αιτιοπαθογένειάς τους. Ειδικότερα μελέτες με τροποποιητές της μεθυλίωσης/ακετυλίωσης του DNA σε ασθενείς με MDS οδήγησαν σε βελτίωση της ερυθροποίησης και αύξηση της συνολικής επιβίωσης μέσω τροποποιήσεων των ιστονών, αλλαγών του προτύπου μεθυλίωσης αλλά και μέσω της δράσης των miRNAs.

Ταυτόχρονα έστρεψε το επιστημονικό ενδιαφέρον στην εξέλιξη της *φαρμακοεπιγενομικής* προκειμένου να αντιμετωπισθούν με αποτελεσματικότητα και ακρίβεια κλωνικά νοσήματα με διαταραγμένα μοριακά σηματοδοτικά μονοπάτια, έντονη μεταλλακτική δραστηριότητα και αλληλεπιδράσεις των γονιδίων μεταξύ τους. Η εφαρμογή των νεότερων επιγενετικών ρυθμιστών σε συνδυασμό με δοκιμασμένες χημειοθεραπευτικές επιλογές καλείται να αυξήσει το προσδόκιμο επιβίωσης των χρονίως πασχόντων και ιδανικά να υποστρέψει την κλωνική εξέλιξη των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων.

## 8. Βιβλιογραφία

1. Lim DHK, Maher ER. DNA methylation: a form of epigenetic control of gene expression. *Obstet Gynaecol.* 2010;12(1):37-42.  
doi:10.1576/toag.12.1.037.27556
2. Fraga M, Fernandez AF. *Epigenomics in Health and Disease.* Academic Press; 2015.
3. Montalban-Bravo G, Garcia-Manero G. Myelodysplastic syndromes: 2018 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol.* 2018;93(1):129-147. doi:10.1002/ajh.24930
4. Fenaux P, Kelaidi C. Treatment of the 5q- Syndrome. *Hematology.* 2006;2006(1):192-198. doi:10.1182/asheducation-2006.1.192
5. Cazzola M. Introduction to a review series: the 2016 revision of the WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. *Blood.* 2016;127(20):2361-2364. doi:10.1182/blood-2016-03-657379
6. Gaballa MR, Besa EC. Myelodysplastic syndromes with 5q deletion: pathophysiology and role of lenalidomide. *Ann Hematol.* 2014;93(5):723-733. doi:10.1007/s00277-014-2022-3
7. Shastri A, Will B, Steidl U, Verma A. Stem and progenitor cell alterations in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2017;129(12):1586-1594. doi:10.1182/blood-2016-10-696062
8. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues ....  
<https://www.slideshare.net/adraiyan/2016-update-of-who-classification-of-tumours-of-haematopoietic-and-lymphoid-tissues>. Accessed September 15, 2018.
9. Hong M, He G. The 2016 Revision to the World Health Organization Classification of Myelodysplastic Syndromes. *J Transl Intern Med.* 2017;5(3):139-143. doi:10.1515/jtim-2017-0002
10. Kardos G, Baumann I, Passmore SJ, et al. Refractory anemia in childhood: a retrospective analysis of 67 patients with particular reference to monosomy 7. *Blood.* 2003;102(6):1997-2003. doi:10.1182/blood-2002-11-3444
11. Margolskee E, Hasserjian RP, Hassane D, et al. Myelodysplastic Syndrome, Unclassifiable (MDS-U) With 1% Blasts Is a Distinct Subgroup of MDS-U

- With a Poor Prognosis. *Am J Clin Pathol*. 2017;148(1):49-57.  
doi:10.1093/ajcp/aqx043
12. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. Review Series THE UPDATED WHO CLASSIFICATION OF HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. 2016. doi:10.1182/blood-2016-03-643544
  13. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012;120(12):2454-2465. doi:10.1182/blood-2012-03-420489
  14. Schanz J, Steidl C, Fonatsch C, et al. Coalesced Multicentric Analysis of 2,351 Patients With Myelodysplastic Syndromes Indicates an Underestimation of Poor-Risk Cytogenetics of Myelodysplastic Syndromes in the International Prognostic Scoring System. *J Clin Oncol*. 2011;29(15):1963-1970.  
doi:10.1200/JCO.2010.28.3978
  15. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, et al. Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. *Blood*. 2012;120(12):2454-2465. doi:10.1182/blood-2012-03-420489
  16. Deeg HJ, Scott BL, Fang M, et al. Five-group cytogenetic risk classification, monosomal karyotype, and outcome after hematopoietic cell transplantation for MDS or acute leukemia evolving from MDS. *Blood*. 2012;120(7):1398-1408.  
doi:10.1182/blood-2012-04-423046
  17. Haase D. Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol*. 2008;87(7):515-526. doi:10.1007/s00277-008-0483-y
  18. Fenaux P. Chromosome and Molecular Abnormalities in Myelodysplastic Syndromes. *Int J Hematol*. 2001;73(4):429-437. doi:10.1007/BF02994004
  19. Sun L-M, Lin C-L, Lin M-C, Liang J-A, Kao C-H. Radiotherapy- and chemotherapy-induced myelodysplasia syndrome: a nationwide population-based nested case-control study. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(17):e737.  
doi:10.1097/MD.0000000000000737
  20. Bacher U, Schanz J, Bräulke F, Haase D. Rare cytogenetic abnormalities in myelodysplastic syndromes. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2015;7(1):e2015034. doi:10.4084/MJHID.2015.034
  21. Paulsson K, Haferlach C, Fonatsch C, et al. The idic(X)(q13) in myeloid malignancies: breakpoint clustering in segmental duplications and association



- with TET2 mutations. *Hum Mol Genet.* 2010;19(8):1507-1514.  
doi:10.1093/hmg/ddq024
22. Bejar R, Papaemmanuil E, Haferlach T, et al. Somatic Mutations in MDS Patients Are Associated with Clinical Features and Predict Prognosis Independent of the IPSS-R: Analysis of Combined Datasets from the International Working Group for Prognosis in MDS-Molecular Committee. *Blood.* 2015;126(23). <http://www.bloodjournal.org/content/126/23/907?sso-checked=true>. Accessed September 16, 2018.
  23. Graubert TA, Shen D, Ding L, et al. Recurrent mutations in the U2AF1 splicing factor in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet.* 2012;44(1):53-57. doi:10.1038/ng.1031
  24. Kwok B, Hall JM, Witte JS, et al. MDS-associated somatic mutations and clonal hematopoiesis are common in idiopathic cytopenias of undetermined significance. *Blood.* 2015;126(21):2355-2361. doi:10.1182/blood-2015-08-667063
  25. Heinrichs S, Kulkarni R V, Bueso-Ramos CE, et al. Accurate detection of uniparental disomy and microdeletions by SNP array analysis in myelodysplastic syndromes with normal cytogenetics. *Leukemia.* 2009;23(9):1605-1613. doi:10.1038/leu.2009.82
  26. Bejar R. *Integrating Molecular Findings into the Diagnosis and Prognosis of MDS.*; 2016.  
<https://pdfs.semanticscholar.org/presentation/d220/904cd8f1ed591b36e0d25443b11b9e35fb4f.pdf>. Accessed September 16, 2018.
  27. Čermák J, Michalová K, Březinová J, Zemanová Z. A prognostic impact of separation of refractory cytopenia with multilineage dysplasia and 5q- syndrome from refractory anemia in primary myelodysplastic syndrome. *Leuk Res.* 2003;27(3):221-229. doi:10.1016/S0145-2126(02)00096-6
  28. Issa J-PJ. The myelodysplastic syndrome as a prototypical epigenetic disease. *Blood.* 2013;121(19):3811-3817. doi:10.1182/blood-2013-02-451757
  29. Issa J-P. Epigenetic changes in the myelodysplastic syndrome. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2010;24(2):317-330. doi:10.1016/j.hoc.2010.02.007
  30. Saito Y, Jones PM. Epigenetic Activation of Tumor Suppressor MicroRNAs in Human Cancer Cells. *Cell Cycle.* 2006;5(19):2220-2222. doi:10.4161/cc.5.19.3340

31. Eggan K, Akutsu H, Hochedlinger K, Rideout W, Yanagimachi R, Jaenisch R. X-Chromosome inactivation in cloned mouse embryos. *Science*. 2000;290(5496):1578-1581. doi:10.1126/science.290.5496.1578
32. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res*. 2011;21(3):381-395. doi:10.1038/cr.2011.22
33. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol*. 2010;28(10):1057-1068. doi:10.1038/nbt.1685
34. Schweiger MR, Kerick M, Timmermann B, Isau M. The power of NGS technologies to delineate the genome organization in cancer: from mutations to structural variations and epigenetic alterations. *Cancer Metastasis Rev*. 2011;30(2):199-210. doi:10.1007/s10555-011-9278-z
35. Khan H, Vale C, Bhagat T, Verma A. Role of DNA Methylation in the Pathogenesis and Treatment of Myelodysplastic Syndromes. *Semin Hematol*. 2013;50(1):16-37. doi:10.1053/J.SEMINHEMATOL.2013.01.001
36. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nat* 2004 4296990. May 2004.
37. Soppe WJJ. DNA methylation controls histone H3 lysine 9 methylation and heterochromatin assembly in Arabidopsis. *EMBO J*. 2002;21(23):6549-6559. doi:10.1093/emboj/cdf657
38. Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet*. 1997;13(8):335-340. doi:10.1016/S0168-9525(97)01181-5
39. Goyal R, Reinhardt R, Jeltsch A. Accuracy of DNA methylation pattern preservation by the Dnmt1 methyltransferase. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(4):1182-1188. doi:10.1093/nar/gkl002
40. Jeltsch A. On the Enzymatic Properties of Dnmt1: Specificity, Processivity, Mechanism of Linear Diffusion and Allosteric Regulation of the Enzyme. *Epigenetics*. 2006;1(2):63-66. doi:10.4161/epi.1.2.2767
41. Valinluck V, Sowers LC. Endogenous Cytosine Damage Products Alter the Site Selectivity of Human DNA Maintenance Methyltransferase DNMT1. *Cancer Res*. 2007;67(3):946-950. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3123
42. Robertson KD, Keyomarsi K, Gonzales FA, Velicescu M, Jones PA. Differential mRNA expression of the human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b during the G(0)/G(1) to S phase transition in normal

- and tumor cells. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(10):2108-2113.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10773079>. Accessed September 16, 2018.
43. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development. *Cell.* 1999;99(3):247-257. doi:10.1016/S0092-8674(00)81656-6
  44. Liu K, Wang YF, Cantemir C, Muller MT. Endogenous assays of DNA methyltransferases: Evidence for differential activities of DNMT1, DNMT2, and DNMT3 in mammalian cells in vivo. *Mol Cell Biol.* 2003;23(8):2709-2719. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12665573>. Accessed September 16, 2018.
  45. Uysal F, Ozturk S, Akkoyunlu G. DNMT1, DNMT3A and DNMT3B proteins are differently expressed in mouse oocytes and early embryos. *J Mol Histol.* 2017;48(5-6):417-426. doi:10.1007/s10735-017-9739-y
  46. Fathi AT, Abdel-Wahab O. Mutations in epigenetic modifiers in myeloid malignancies and the prospect of novel epigenetic-targeted therapy. *Adv Hematol.* 2012;2012:469592. doi:10.1155/2012/469592
  47. Di Croce L, Raker VA, Corsaro M, et al. Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science.* 2002;295(5557):1079-1082. doi:10.1126/science.1065173
  48. El Ghannam D, Taalab MM, Ghazy HF, Eneen AF. DNMT3A R882 mutations in patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Blood Cells, Mol Dis.* 2014;53(1-2):61-66. doi:10.1016/j.bcmed.2014.01.004
  49. Lin J, Yao D, Qian J, et al. Recurrent DNMT3A R882 Mutations in Chinese Patients with Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndrome. Bunce C, ed. *PLoS One.* 2011;6(10):e26906. doi:10.1371/journal.pone.0026906
  50. Lu R, Wang P, Parton T, et al. Epigenetic Perturbations by Arg882-Mutated DNMT3A Potentiate Aberrant Stem Cell Gene-Expression Program and Acute Leukemia Development. *Cancer Cell.* 2016;30(1):92-107. doi:10.1016/j.ccell.2016.05.008
  51. Tsai CT, So CWE. Epigenetic therapies by targeting aberrant histone methylome in AML: molecular mechanisms, current preclinical and clinical development. *Oncogene.* 2017;36(13):1753-1759. doi:10.1038/onc.2016.315

52. Khan M, Cortes J, Kadia T, et al. Clinical Outcomes and Co-Occurring Mutations in Patients with RUNX1-Mutated Acute Myeloid Leukemia. *Int J Mol Sci.* 2017;18(8). doi:10.3390/ijms18081618
53. Scourzic L, Mouly E, Bernard OA. TET proteins and the control of cytosine demethylation in cancer. *Genome Med.* 2015;7(1):9. doi:10.1186/s13073-015-0134-6
54. Abdel-Wahab O, Mullally A, Hedvat C, et al. Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. *Blood.* 2009;114(1):144-147. doi:10.1182/blood-2009-03-210039
55. Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Ciudad M, et al. TET2 gene mutation is a frequent and adverse event in chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica.* 2009;94(12):1676-1681. doi:10.3324/haematol.2009.011205
56. Mullighan CG. TET2 mutations in myelodysplasia and myeloid malignancies. *Nat Genet.* 2009;41(7):766-767. doi:10.1038/ng0709-766
57. Delhommeau F, Dupont S, Valle V Della, et al. Mutation in *TET2* in Myeloid Cancers. *N Engl J Med.* 2009;360(22):2289-2301. doi:10.1056/NEJMoa0810069
58. Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Cheok M, et al. TET2 mutation is an independent favorable prognostic factor in myelodysplastic syndromes (MDSs). *Blood.* 2009;114(15):3285-3291. doi:10.1182/blood-2009-04-215814
59. Itzykson R, Kosmider O, Cluzeau T, et al. Impact of TET2 mutations on response rate to azacitidine in myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemias. *Leukemia.* 2011;25(7):1147-1152. doi:10.1038/leu.2011.71
60. Delhommeau F, Dupont S, Valle V Della, et al. Mutation in *TET2* in Myeloid Cancers. *N Engl J Med.* 2009;360(22):2289-2301. doi:10.1056/NEJMoa0810069
61. Pronier E, Quivoron C, Bernard OA, Villeval J-L. JAK2V<sup>617</sup>F/TET2 mutations: does the order matter? *Haematologica.* 2011;96(5):638-640. doi:10.3324/haematol.2011.042846
62. Horbinski C. What do we know about IDH1/2 mutations so far, and how do we use it? *Acta Neuropathol.* 2013;125(5):621-636. doi:10.1007/s00401-013-1106-9
63. Parker SJ, Metallo CM. Metabolic consequences of oncogenic IDH mutations.

- Pharmacol Ther.* 2015;152:54-62. doi:10.1016/j.pharmthera.2015.05.003
64. Kickingereeder P, Sahn F, Radbruch A, et al. IDH mutation status is associated with a distinct hypoxia/angiogenesis transcriptome signature which is non-invasively predictable with rCBV imaging in human glioma. *Sci Rep.* 2015;5:16238. doi:10.1038/srep16238
65. 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(1):401. doi:10.1186/1471-2407-10-401
66. Brunner AM, Wander SA, Neuberg D, et al. Diagnostic Features and 2-Hydroxyglutarate (2-HG) Levels Among Acute Myeloid Leukemia (AML) Patients with and without Isocitrate Dehydrogenase (IDH) Mutations. *Blood.* 2014;124(21). <http://www.bloodjournal.org/content/124/21/1045?sso-checked=true>. Accessed September 16, 2018.
67. AACR Annual Meeting 2017: Challenging the Dogma of Treating IDH-mutant Cancers With IDH Inhibitors - CANCER RESEARCH Catalyst. <https://blog.aacr.org/aacr-annual-meeting-2017-challenging-the-dogma-of-treating-idh-mutant-cancers-with-idh-inhibitors/>. Accessed September 16, 2018.
68. Lemonnier F, Cairns RA, Inoue S, et al. The IDH2 R172K mutation associated with angioimmunoblastic T-cell lymphoma produces 2HG in T cells and impacts lymphoid development. *Proc Natl Acad Sci.* 2016;113(52):15084-15089. doi:10.1073/pnas.1617929114
69. Chen C, Liu Y, Lu C, et al. Cancer-associated IDH2 mutants drive an acute myeloid leukemia that is susceptible to Brd4 inhibition. *Genes Dev.* 2013;27(18):1974-1985. doi:10.1101/gad.226613.113
70. Patel KP, Ravandi F, Ma D, et al. Acute myeloid leukemia with IDH1 or IDH2 mutation: frequency and clinicopathologic features. *Am J Clin Pathol.* 2011;135(1):35-45. doi:10.1309/AJCPD7NR2RMNQDVF
71. DiNardo CD, Jabbour E, Ravandi F, et al. IDH1 and IDH2 mutations in myelodysplastic syndromes and role in disease progression. *Leukemia.* 2016;30(4):980-984. doi:10.1038/leu.2015.211
72. Sallman DA, Tanaka TN, List A, Bejar R. SOHO State of the Art Update and Next Questions: Biology and Treatment of Myelodysplastic Syndromes. *Clin*

- Lymphoma Myeloma Leuk.* 2017;17(10):613-620.  
doi:10.1016/J.CLML.2017.09.018
73. Molenaar RJ, Maciejewski JP, Wilmink JW, van Noorden CJF. Wild-type and mutated IDH1/2 enzymes and therapy responses. *Oncogene.* 2018;37(15):1949-1960. doi:10.1038/s41388-017-0077-z
  74. Goethe E, Carter BZ, Rao G, Pemmaraju N. Glioblastoma and acute myeloid leukemia: malignancies with striking similarities. *J Neurooncol.* 2018;136(2):223-231. doi:10.1007/s11060-017-2676-5
  75. Garcia-Manero G. Demethylating agents in myeloid malignancies. *Curr Opin Oncol.* 2008;20(6):705-710. doi:10.1097/CCO.0b013e328313699c
  76. Mario A Di, De Stefano V, Leone G. Use of gemcitabine (GEM) in advanced myelodysplastic syndromes Use of CSF markers in leukemia and its treatment View project Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases View project. *Artic Ann Oncol.* 2001. doi:10.1023/A:1012594004015
  77. Welch JS, Petti AA, Miller CA, et al. TP53 and Decitabine in Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. *N Engl J Med.* 2016;375(21):2023-2036. doi:10.1056/NEJMoa1605949
  78. Yan W, Jung Y-S, Zhang Y, Chen X. Arsenic Trioxide Reactivates Proteasome-Dependent Degradation of Mutant p53 Protein in Cancer Cells in Part via Enhanced Expression of Pirh2 E3 Ligase. Li Y, ed. *PLoS One.* 2014;9(8):e103497. doi:10.1371/journal.pone.0103497
  79. Götze K, Müller-Thomas C, Peschel C. The role of azacitidine in the management of myelodysplastic syndromes (MDS). *Cancer Manag Res.* 2009;1:119-130. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21188130>. Accessed September 16, 2018.
  80. Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, et al. 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.* 2009;10(3):223-232. doi:10.1016/S1470-2045(09)70003-8
  81. George RE, Lahti JM, Adamson PC, et al. Phase I study of decitabine with doxorubicin and cyclophosphamide in children with neuroblastoma and other solid tumors: a Children's Oncology Group study. *Pediatr Blood Cancer.* 2010;55(4):629-638. doi:10.1002/pbc.22607
  82. George RE, Lahti JM, Adamson PC, et al. Phase I study of decitabine with

- doxorubicin and cyclophosphamide in children with neuroblastoma and other solid tumors: a Children's Oncology Group study. *Pediatr Blood Cancer*. 2010;55(4):629-638. doi:10.1002/pbc.22607
83. Kuendgen A, Strupp C, Aivado M, et al. Treatment of myelodysplastic syndromes with valproic acid alone or in combination with all-trans retinoic acid. 2004. doi:10.1182/blood-2003-12-4333
  84. Brodie SA, Brandes JC. Could valproic acid be an effective anticancer agent? The evidence so far. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2014;14(10):1097-1100. doi:10.1586/14737140.2014.940329
  85. DNA Packaging: Nucleosomes and Chromatin | Learn Science at Scitable. <https://www.nature.com/scitable/topicpage/dna-packaging-nucleosomes-and-chromatin-310>. Accessed September 17, 2018.
  86. Histone Modifications | What is Epigenetics? <https://www.whatisepigenetics.com/histone-modifications/>. Accessed September 17, 2018.
  87. Issa J-P. Epigenetic Changes in the Myelodysplastic Syndrome. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2010;24(2):317-330. doi:10.1016/j.hoc.2010.02.007
  88. Akbarian S. Epigenetic mechanisms in schizophrenia. *Dialogues Clin Neurosci*. 2014;16(3):405-417. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25364289>. Accessed September 17, 2018.
  89. Mortaz E, Masjedi MR, Barnes PJ, Adcock IM. Epigenetics and chromatin remodeling play a role in lung disease. *Tanaffos*. 2011;10(4):7-16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25191382>. Accessed September 17, 2018.
  90. Margueron R, Li G, Sarma K, et al. Ezh1 and Ezh2 Maintain Repressive Chromatin through Different Mechanisms. *Mol Cell*. 2008;32(4):503-518. doi:10.1016/j.molcel.2008.11.004
  91. Cho YJ, Kim SH, Kim EK, et al. Prognostic implications of polycomb proteins ezh2, suz12, and eed1 and histone modification by H3K27me3 in sarcoma. *BMC Cancer*. 2018;18(1):158. doi:10.1186/s12885-018-4066-6
  92. Cao R, Zhang Y. SUZ12 Is Required for Both the Histone Methyltransferase Activity and the Silencing Function of the EED-EZH2 Complex. *Mol Cell*. 2004;15(1):57-67. doi:10.1016/j.molcel.2004.06.020

93. Brecqueville M, Cervera N, Adélaïde J, et al. Mutations and deletions of the SUZ12 polycomb gene in myeloproliferative neoplasms. *Blood Cancer J.* 2011;1(8):e33-e33. doi:10.1038/bcj.2011.31
94. Sashida G, Harada H, Matsui H, et al. Ezh2 loss promotes development of myelodysplastic syndrome but attenuates its predisposition to leukaemic transformation. *Nat Commun.* 2014;5(1):4177. doi:10.1038/ncomms5177
95. Kroeze LI, Nikoloski G, da Silva-Coelho P, et al. Genetic defects in PRC2 components other than EZH2 are not common in myeloid malignancies. *Blood.* 2012;119(5):1318-1319. doi:10.1182/blood-2011-07-365213
96. Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adélaïde J, et al. Mutations of polycomb-associated gene *ASXL1* in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2009;145(6):788-800. doi:10.1111/j.1365-2141.2009.07697.x
97. Mutations of polycomb-associated gene *ASXL1* in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. doi:10.1111/j.1365-2141.2009.07697.x
98. Abdel-Wahab O, Adli M, LaFave LM, et al. *ASXL1* mutations promote myeloid transformation through loss of PRC2-mediated gene repression. *Cancer Cell.* 2012;22(2):180-193. doi:10.1016/j.ccr.2012.06.032
99. Cui Y, Tong H, Du X, et al. TET2 mutations were predictive of inferior prognosis in the presence of *ASXL1* mutations in patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Stem Cell Investig.* 2016;3:50-50. doi:10.21037/sci.2016.09.04
100. Abdel-Wahab O, Levine RL. Mutations in epigenetic modifiers in the pathogenesis and therapy of acute myeloid leukemia. *Blood.* 2013;121(18):3563-3572. doi:10.1182/blood-2013-01-451781
101. Yannakou CK, Jones K, McBean M, et al. *ASXL1* c.1934dup;p.Gly646Trpfs\*12—a true somatic alteration requiring a new approach. *Blood Cancer J.* 2017;7(12):656. doi:10.1038/s41408-017-0025-8
102. Sahtoe DD, van Dijk WJ, Ekkebus R, Ovaa H, Sixma TK. BAP1/*ASXL1* recruitment and activation for H2A deubiquitination. *Nat Commun.* 2016;7:10292. doi:10.1038/ncomms10292
103. Gelsi-Boyer V, Brecqueville M, Devillier R, Murati A, Mozziconacci M-J, Birnbaum D. Mutations in *ASXL1* are associated with poor prognosis across



- the spectrum of malignant myeloid diseases. *J Hematol Oncol*. 2012;5(1):12. doi:10.1186/1756-8722-5-12
104. Boultonwood J, Perry J, Pellagatti A, et al. Frequent mutation of the polycomb-associated gene ASXL1 in the myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2010;24(5):1062-1065. doi:10.1038/leu.2010.20
  105. Yonal-Hindilerden I, Daglar-Aday A, Akadam-Teker B, et al. Prognostic significance of ASXL1, JAK2V617F mutations and JAK2V617F allele burden in Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. *J Blood Med*. 2015;6:157-175. doi:10.2147/JBM.S78826
  106. Mullighan CG, Downing JR. Genome-wide profiling of genetic alterations in acute lymphoblastic leukemia: Recent insights and future directions. 2009. doi:10.1038/leu.2009.18
  107. Brecqueville M, Cervera N, Adélaïde J, et al. Mutations and deletions of the SUZ12 polycomb gene in myeloproliferative neoplasms. *Blood Cancer J*. 2011;1(8):e33. doi:10.1038/bcj.2011.31
  108. Sashida G, Harada H, Matsui H, et al. Ezh2 loss promotes development of myelodysplastic syndrome but attenuates its predisposition to leukaemic transformation. *Nat Commun*. 2014;5(1):4177. doi:10.1038/ncomms5177
  109. Brecqueville M, Rey J, Bertucci F, et al. Mutation analysis of *ASXL1*, *CBL*, *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*, *JAK2*, *MPL*, *NF1*, *SF3B1*, *SUZ12*, and *TET2* in myeloproliferative neoplasms. *Genes, Chromosom Cancer*. 2012;51(8):743-755. doi:10.1002/gcc.21960
  110. Leung AKL, Sharp PA. Quantifying Argonaute proteins in and out of GW/P-bodies: implications in microRNA activities. *Adv Exp Med Biol*. 2013;768:165-182. doi:10.1007/978-1-4614-5107-5\_10
  111. Milunović V, Mandac Rogulj I, Planinc-Peraica A, Bulycheva E, Kolonić Ostojić S. The role of microRNA in myelodysplastic syndromes: Beyond DNA methylation and histone modification. *Eur J Haematol*. 2016;96(6):553-563. doi:10.1111/ejh.12735
  112. Song SJ, Pandolfi PP. MicroRNAs in the pathogenesis of myelodysplastic syndromes and myeloid leukaemia. *Curr Opin Hematol*. 2014;21(4):276-282. doi:10.1097/MOH.0000000000000054
  113. Wang J, Li Y, Ding M, Zhang H, Xu X, Tang J. Molecular mechanisms and clinical applications of miR-22 in regulating malignant progression in human

- cancer (Review). *Int J Oncol*. 2017;50(2):345-355. doi:10.3892/ijo.2016.3811
114. Krejcik Z, Belickova M, Hrustincova A, et al. MicroRNA profiles as predictive markers of response to azacitidine therapy in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Cancer Biomarkers*. 2018;22(1):101-110. doi:10.3233/CBM-171029
115. Thol F, Scherr M, Kirchner A, et al. Clinical and functional implications of microRNA mutations in a cohort of 935 patients with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2015;100(4):e122-4. doi:10.3324/haematol.2014.120345
116. Franchina T, Amodeo V, Bronte G, et al. Circulating miR-22, miR-24 and miR-34a as novel predictive biomarkers to pemetrexed-based chemotherapy in advanced non small cell lung cancer. *J Cell Physiol*. 2013;229(1):n/a-n/a. doi:10.1002/jcp.24422
117. Wang J, Li Y, Ding M, Zhang H, Xu X, Tang J. Molecular mechanisms and clinical applications of miR-22 in regulating malignant progression in human cancer (Review). *Int J Oncol*. 2017;50(2):345-355. doi:10.3892/ijo.2016.3811
118. Fazi F, Racanicchi S, Zardo G, et al. Epigenetic Silencing of the Myelopoiesis Regulator microRNA-223 by the AML1/ETO Oncoprotein. *Cancer Cell*. 2007;12(5):457-466. doi:10.1016/j.ccr.2007.09.020
119. Caceres G, McGraw K, Yip BH, et al. TP53 suppression promotes erythropoiesis in del(5q) MDS, suggesting a targeted therapeutic strategy in lenalidomide-resistant patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(40):16127-16132. doi:10.1073/pnas.1311055110
120. Lindsley RC, Ebert BL. Molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes. *Annu Rev Pathol*. 2013;8:21-47. doi:10.1146/annurev-pathol-011811-132436
121. Lam J, van den Bosch M, Wegrzyn J, et al. miR-143/145 differentially regulate hematopoietic stem and progenitor activity through suppression of canonical TGF $\beta$  signaling. *Nat Commun*. 2018;9(1):2418. doi:10.1038/s41467-018-04831-3
122. Vasilatou D, Papageorgiou SG, Dimitriadis G, Pappa V. Epigenetic alterations and microRNAs: new players in the pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Epigenetics*. 2013;8(6):561-570. doi:10.4161/epi.24897
123. Masliah-Planchon J, Garinet S, Pasmant E. RAS-MAPK pathway epigenetic

- activation in cancer: miRNAs in action. *Oncotarget*. 2016;7(25):38892-38907. doi:10.18632/oncotarget.6476
124. Vassilatou D, Pappa V, Kontsioti F, et al. Analysis of Let-7a and Mir-17-5p Micro-RNAs Expression In Patients with Adult De Novo Myelodysplastic Syndromes. *Blood*. 2010;116(21).  
<http://www.bloodjournal.org/content/116/21/4965?sso-checked=true>. Accessed September 19, 2018.
  125. Pfeffer SR, Yang CH, Pfeffer LM. The Role of miR-21 in Cancer. *Drug Dev Res*. 2015;76(6):270-277. doi:10.1002/ddr.21257
  126. Liu X, Chen X, Yu X, et al. Regulation of microRNAs by epigenetics and their interplay involved in cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2013;32(1):96. doi:10.1186/1756-9966-32-96
  127. Epi-miRNAs: an emerging science in the Interactions of microRNA and Epigenetic Modifications in Cancer | Request PDF.  
[https://www.researchgate.net/publication/310598056\\_Epi-miRNAs\\_an\\_emerging\\_science\\_in\\_the\\_Interactions\\_of\\_microRNA\\_and\\_Epigentic\\_Modifications\\_in\\_Cancer](https://www.researchgate.net/publication/310598056_Epi-miRNAs_an_emerging_science_in_the_Interactions_of_microRNA_and_Epigentic_Modifications_in_Cancer). Accessed September 19, 2018.
  128. Vasilatou D, Papageorgiou SG, Dimitriadis G, Pappa V. Epigenetic alterations and microRNAs: new players in the pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Epigenetics*. 2013;8(6):561-570. doi:10.4161/epi.24897
  129. Thind A, Wilson C. Exosomal miRNAs as cancer biomarkers and therapeutic targets. *J Extracell vesicles*. 2016;5:31292. doi:10.3402/JEV.V5.31292
  130. Giudice V, Banaszak LG, Gutierrez-Rodrigues F, et al. Circulating exosomal microRNAs in acquired aplastic anemia and myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2018;103(7):1150-1159. doi:10.3324/haematol.2017.182824
  131. Peedicayil J. Pharmacoepigenetics and pharmacoepigenomics: An overview. *Curr Drug Discov Technol*. 2018;15. doi:10.2174/1570163815666180419154633
  132. Ramakrishnan S, Ellis L, Pili R. Histone modifications: implications in renal cell carcinoma. *Epigenomics*. 2013;5(4):453-462. doi:10.2217/epi.13.40
  133. Kundu TK. *Epigenetics : Development and Disease*. Springer; 2013.  
<https://books.google.gr/books?id=O2OBaKOyavwC&pg=PA464&lpg=PA464&dq=epigenetics+gastritis+rheumatoid+arthritis&source=bl&ots=xqReOeEHS A&sig=t6Cvh8GIGwLI->

- AtlvYA4pJAufeA&hl=el&sa=X&ved=2ahUKEwiCoZKzxsfdAhWLw4sKHdn8CF4Q6AEwBXoECAAQAQ#v=onepage&q=epigenetics. Accessed September 19, 2018.
134. Niebel D, Kirfel J, Janzen V, Höller T, Majores M, Gütgemann I. Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) in hematopoietic and lymphoid neoplasms. *Blood*. 2014;124(1):151-152. doi:10.1182/blood-2014-04-569525
  135. Lu R, Wang GG. Pharmacologic Targeting of Chromatin Modulators As Therapeutics of Acute Myeloid Leukemia. *Front Oncol*. 2017;7:241. doi:10.3389/fonc.2017.00241
  136. Myelodysplastic Syndromes: Clinical and Biological Advances - Βιβλία Google.  
[https://books.google.gr/books?id=8BcuQUQtsc0C&pg=PA312&lpg=PA312&dq=trichostatin+mds&source=bl&ots=cgXgKqDtVc&sig=aNw0AmkVPZGCh\\_p0T5F807cEyHY&hl=el&sa=X&ved=2ahUKEwjY8caAycfdAhXpk4sKHb6sB1EQ6AEwCHoECAIQAQ#v=onepage&q=trichostatin mds&f=false](https://books.google.gr/books?id=8BcuQUQtsc0C&pg=PA312&lpg=PA312&dq=trichostatin+mds&source=bl&ots=cgXgKqDtVc&sig=aNw0AmkVPZGCh_p0T5F807cEyHY&hl=el&sa=X&ved=2ahUKEwjY8caAycfdAhXpk4sKHb6sB1EQ6AEwCHoECAIQAQ#v=onepage&q=trichostatin mds&f=false). Accessed September 19, 2018.
  137. Gore SD. Combination therapy with DNA methyltransferase inhibitors in hematologic malignancies. *Nat Clin Pract Oncol*. 2005;2(S1):S30-S35. doi:10.1038/ncponc0346
  138. Lane AA, Chabner BA, General M. Histone Deacetylase Inhibitors in Cancer Therapy. *J Clin Oncol*. 2009;27:5459-5468. doi:10.1200/JCO.2009.22.1291
  139. Kuendgen A, Strupp C, Aivado M, et al. Treatment of myelodysplastic syndromes with valproic acid alone or in combination with all-trans retinoic acid. *Blood*. 2004;104(5):1266-1269. doi:10.1182/blood-2003-12-4333
  140. Mottamal M, Zheng S, Huang T, Wang G. Histone Deacetylase Inhibitors in Clinical Studies as Templates for New Anticancer Agents. *Molecules*. 2015;20(3):3898-3941. doi:10.3390/molecules20033898
  141. Hamed NA. Canc Therapy & Oncol Int J Awareness of Emerging Novel Epigenetic Targeting Therapy in Acute Myeloid Leukemia Cancer Therapy & Oncology International Journal. *Canc Ther Oncol Int J*. 2018;11(3). doi:10.19080/CTOIJ.2018.11.555815
  142. Sun Y, Chen B-R, Deshpande A. Epigenetic Regulators in the Development, Maintenance, and Therapeutic Targeting of Acute Myeloid Leukemia. *Front Oncol*. 2018;8:41. doi:10.3389/fonc.2018.00041

