



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**Η ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ Η ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ
ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΣΤΙΣ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΚΟΗΘΕΙΕΣ**

**ΛΕΩΝΙΔΑΣ ΜΠΕΝΕΤΑΤΟΣ
ΙΑΤΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2010

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)

Ημερομηνία αίτησης του κ. Μπενετάτου Λεωνίδα : 19-3-2004

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 534^α/8-6-2004

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Μπουραντάς Κωνσταντίνος Καθηγητής Παθολογίας –Αιματολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Γεωργίου Ιωάννης Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής- Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπάη Μαρία Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 19-4-2005

«Η κутταρική διαφοροποίηση και η γονιδιακή μεθλίωση στις αιματολογικές κακοήθειες»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 677^α/9-2-2010

Γεωργίου Ιωάννης	Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Γεωργούλης Αναστάσιος	Καθηγητής Ορθοπαιδικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπάη Μαρία	Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπουραντάς Κωνσταντίνος	Καθηγητής Παθολογίας -Αιματολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μακρυδήμας Γεώργιος	Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Σύρρου Μαρίκα	Επίκουρη Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας-Ιατρικής Γενετικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Καψάλη Ελένη	Λέκτορας Αιματολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 5-5-2010

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Ιωάννης Γουδέβενος

Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας



Η Γραμματέας της Σχολής

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΒΕΝΤΖΟΥΡΗ -ΖΩΗ

Στη γυναίκα μου Μαρία

και στις κόρες μου Αγάπη, Χρυσουγή και Ραφαέλα-Άρτεμις

Στη μνήμη του πατέρα μου

Πρόλογος

Η κλασική γενετική δεν μπορεί από μόνη της να εξηγήσει την φαινοτυπική ποικιλομορφία σε ένα πληθυσμό, ούτε είναι δυνατόν να εξηγήσει γιατί τα μονοζυγωτικά δίδυμα ή τα πειραματικά προϊόντα κλωνοποίησης παρουσιάζουν διαφορετικούς φαινότυπους ή διαφορετική συχνότητα εμφάνισης των ίδιων νοσημάτων, παρά μόνο σε συνδυασμό με την επιγενετική. Ο όρος «επιγενετική», ο οποίος εισήχθη για πρώτη φορά το 1939 σε μια προσπάθεια συσχέτισης του γονοτύπου και του φαινοτύπου, ορίστηκε αργότερα ως «κληρονομούμενες αλλαγές της γονιδιακής έκφρασης οι οποίες δεν οφείλονται σε διαταραχές της αλληλουχίας του DNA».

Ο καλύτερα γνωστός επιγενετικός δείκτης-μηχανισμός είναι η μεθυλίωση του DNA και σχετίζεται με την μεταγραφική αποσιώπηση των γονιδίων και λαμβάνει χώρα στη βάση κυτοσίνη η οποία προηγείται της βάσης γουανίνης στην ακολουθία του γονιδιώματος και η αντίδραση καταλύεται από τις μεθυλτρανφεράσες οι οποίες προσκολλούν ισοσθενώς μία μεθυλομάδα στη θέση C5 του δακτυλίου της κυτοσίνης. Η γονιδιακή μεθυλίωση εμπλέκεται στην αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X στις γυναίκες και στην γονιδιακή αποτύπωση με αποτέλεσμα την έκφραση του ενός μοναχά αλληλομόρφου. Επίσης συμβάλλει στη σταθερότητα του ανθρώπινου γονιδιώματος εμποδίζοντας μεταθέσεις επαναλαμβανόμενων και μετατιθέμενων στοιχείων αποκτώντας έτσι δυναμικό ρόλο κατά τη ανάπτυξη.

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν να μελετηθεί, για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία, το πρότυπο της μεθυλίωσης δύο αποτυπομένων γονιδίων, τα οποία είναι γνωστό ότι εμπλέκονται σε αναπτυξιακές διαταραχές, σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες αυτή τη φορά. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κωνσταντίνο Μπουραντά Καθηγητή Αιματολογίας-Παθολογίας, τον οποίο είχα την τιμή και τύχη να έχω επιβλέποντα της διατριβής μου. Ο κ. Μπουραντάς μου έδειξε εμπιστοσύνη με την ανάθεση της συγκεκριμένης διατριβής, με ενθάρρυνε συνεχώς και με παρότρυνε να λαμβάνω πρωτοβουλίες.

Ευχαριστώ επίσης τον κ. Ιωάννη Γεωργίου, Καθηγητή Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης για τις επικοινωνιακές συζητήσεις που είχαμε από σχεδιασμού της μελέτης έως και τη συγγραφή της.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Μαρία Μπάη, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας για τις εύστοχες παρατηρήσεις και διορθώσεις οι οποίες ήταν σημαντικές για τη σωστή εκπόνηση της διατριβής.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την κ. Μαρίκα Σύρρου, Επίκουρη Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας-Ιατρικής Γενετικής, στο εργαστήριο της οποίας ξεκίνησε η μελέτη της μεθυλίωσης, για τις οδηγίες της και την πολύτιμη βοήθειά της στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Στο Εργαστήριό της γνώρισα την κ. Αγγελική Δασούλα την οποία ευχαριστώ θερμά για την ουσιαστική βοήθεια που μου προσέφερε στο εργαστήριο.

Με την ολοκλήρωση της διατριβής διαπιστώθηκε ότι γονίδια MEG3 και SNRPN, τα οποία ανήκουν στην κατηγορία των αποτυπομένων γονιδίων και τα οποία κατέχουν χαρακτηριστικά ογκοκασταλτικών γονιδίων έχουν επίπτωση στην κυτταρική διαφοροποίηση και την καρκινογένεση. Διαταραχές της μεθυλίωσης παρατηρήθηκαν στην παρούσα εργασία, για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία, σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες, διαπιστώνοντας σημαντικό ποσοστό ασθενών με υπερμεθυλιωμένα τα γονίδια αυτά. Η θεραπευτική παρέμβαση στην μεθυλίωση, με τους υπομεθυλιούντες παράγοντες αζακυτιδίνη και ντεκυταμπίνη που είναι προς το παρόν εγκεκριμένοι για τη θεραπεία των ΜΔΣ και των ΟΜΛ, μπορεί να αντιστρέψει την παθολογική κατάσταση και να οδηγήσει σε επιθυμητά θεραπευτικά αποτελέσματα μέσω αναστολής των διαταραχών της κυτταρικής διαφοροποίησης, της ανάπτυξης, της απόπτωσης και επιπλέον αναγνώριση των νεοπλασματικών κυττάρων από το ανοσοποιητικό σύστημα και αναδεικνύει την ανάγκη για τη συνεχή μελέτη της μεθυλίωσης.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

- 1. Κυτταρική διαφοροποίηση και καρκίνος**
- 2. Μεθυλίωση του DNA (γονιδιακή μεθυλίωση)**
 - 2.1. Εισαγωγή
 - 2.2. Μεθυλίωση του DNA και κυτταρική διαφοροποίηση
 - 2.3. Μεθυλίωση του DNA και καρκινογένεση
 - 2.3.1. Εισαγωγή
 - 2.3.2. Υπερμεθυλίωση του DNA και καρκινογένεση
 - 2.3.3. Υπομεθυλίωση του DNA και καρκινογένεση
 - 2.3.4. Η μεθυλίωση του DNA στις αιματολογικές κακοήθειες
- 3. Ογκοκατασταλτικά γονίδια και καρκίνος**
 - 3.1. Ογκοκατασταλτικά γονίδια και μεθυλίωση του DNA
- 4. Γονιδιακή αποτύπωση**
 - 4.1. Εισαγωγή
 - 4.2. Ο ρόλος της μεθυλίωσης του DNA στην γονιδιακή αποτύπωση
- 5. Τα αποτυπωμένα γονίδια MEG3 και SNRPN**
 - 5.1. Το γονίδιο MEG3
 - 5.2. Το γονίδιο SNRPN

ΣΚΟΠΟΣ

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

- 6. Ασθενείς**
- 7. Μέθοδοι**
 - 7.1. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA
 - 7.2. Χημική κατεργασία με διθειώδες νάτριο-NaHSO₃ (bisulphite modification)
 - 7.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ειδική της μεθυλίωσης (Methylation specific polymerase chain reaction-MSP)
 - 7.4. Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης 2,5%
 - 7.5. Στατιστική ανάλυση
- 8. Αποτελέσματα**

8.1. Ασθενείς με Μυελοειδείς Κακοήθειες**8.1.1. Κλινικά και Εργαστηριακά Ευρήματα****8.1.2. Μελέτη της μεθυλίωσης του γονιδίου MEG3 σε ασθενείς με ΜΔΣ****8.1.3. Μελέτη της μεθυλίωσης του γονιδίου MEG3 σε ασθενείς με ΟΜΛ****8.1.4. Μελέτη της μεθυλίωσης του γονιδίου SNRPN σε ασθενείς με ΜΔΣ****8.1.5. Μελέτη της μεθυλίωσης του γονιδίου SNRPN σε ασθενείς με ΟΜΛ****8.1.6. Ανάλυση Επιβίωσης των Ασθενών με Μυελοειδείς Κακοήθειες****8.2. Ασθενείς με ΠΜ****8.2.1. Κλινικά και Εργαστηριακά Ευρήματα****8.2.2. Μελέτη της μεθυλίωσης του γονιδίου MEG3 σε ασθενείς με ΠΜ****8.2.3. Συσχέτιση της μεθυλίωσης του γονιδίου MEG3 με την
κυτταρογενετική ανάλυση****8.2.4. Συσχέτιση της μεθυλίωσης του γονιδίου MEG3 με τους υποτύπους
του ΠΜ****8.2.5. Συσχέτιση της μεθυλίωσης του γονιδίου MEG3 με το στάδιο της
νόσου****8.2.6. Συσχέτιση της μεθυλίωσης του γονιδίου MEG3 με την πρόγνωση****9. Συζήτηση****ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ****ΕΠΙΛΟΓΟΣ****ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ****ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ****ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ****ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ-ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

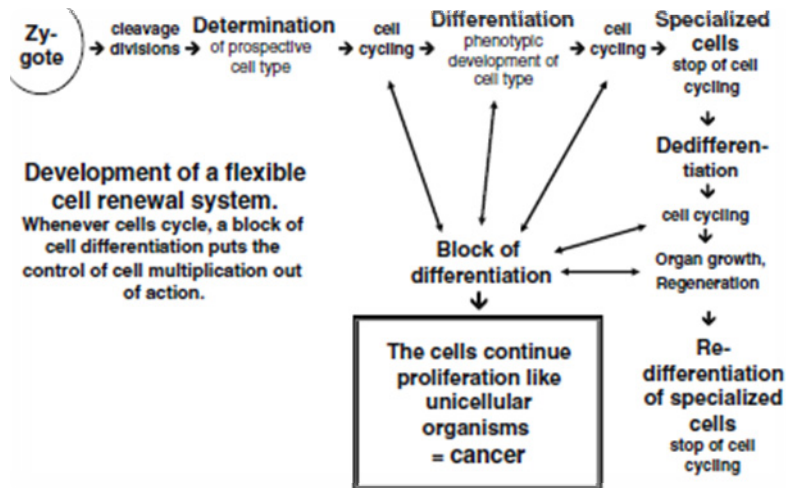
1. Κυτταρική διαφοροποίηση και καρκίνος

Η κυτταρική διαφοροποίηση αποτελεί ένα φυσικό φαινόμενο το οποίο παρατηρείται σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς. Όταν ένα κύτταρο αποκτήσει ταυτότητα μέσω της διαφοροποίησης είναι απίθανο να αλλάξει η «μοίρα» του έστω και αν το κύτταρο αυτό τοποθετηθεί σε διαφορετικό κυτταρικό περιβάλλον. Η διαδικασία της κυτταρικής διαφοροποίησης απαιτεί μη μεταβολές στη αλληλουχία του DNA και φαίνεται ότι υπόκειται σε επιγενετικό έλεγχο ο οποίος αποτελεί μέγιστο ρυθμιστικό μηχανισμό της κυτταρικής διαφοροποίησης και της μετάδοσης αυτής από το μητρικό στο θυγατρικό κύτταρο [1]. Για την επίτευξη της κυτταρικής διαφοροποίησης απαιτείται σίγαση της έκφρασης ορισμένων γονιδίων ειδικών για ειδικό τύπο κυττάρων, μέσω της μεθυλίωσης των CpG νησίδων, και ενεργοποίηση ορισμένων άλλων [2].

Η σύνθεση των διαφόρων κυττάρων του αίματος είναι θεμελιώδης για την ανάπτυξη και επιβίωση ενός φυσιολογικού ατόμου. Νέα αιμοποιητικά κύτταρα που ανήκουν σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές συντίθενται από τα αρχέγονα πολυδύναμα κύτταρα κατά την εμβρυογένεση και καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής ενός ατόμου βάσει κυτταροκινών ή ορμονών οι οποίες με τη σειρά τους προκαλούν επιγενετικές αλλαγές στα υπεύθυνα γονίδια.

Ο Harris το 2004 ανέφερε ότι «θα υπήρχε λιγότερη σύγχυση εάν υπήρχε ομοφωνία στο ότι ο καρκίνος στην αρχή του δεν είναι νόσος που χαρακτηρίζεται από κυτταρικό πολλαπλασιασμό αλλά νόσος της κυτταρικής διαφοροποίησης» καθώς υποστήριζε ότι τα φυσιολογικά κύτταρα αν έχουν επαρκές θρεπτικό υλικό και ένα ήπιο περιβάλλον δύνανται να πολλαπλασιάζονται, εκτός και αν αυτή η ικανότητά τους καταστέλλεται και ότι η μόνη διεργασία η οποία καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό σε φυσιολογικές συνθήκες είναι η διαφοροποίηση (εικόνα 1) [3]. Παρά τις διαφορετικές λειτουργίες των διαφόρων αιμοποιητικών κυττάρων όλα τα κύτταρα προέρχονται από το αρχέγονο πολυδύναμο αιμοποιητικό κύτταρο το οποίο έχει τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του αυτοπολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης και μπορεί να διαφοροποιείται χάρη στην ύπαρξη των αιμοποιητικών αυξητικών παραγόντων και κυτταροκινών, των πρωτεϊνών των μονοπατιών Notch και Wnt, των μεταγραφικών παραγόντων HOXA9, HOXA7, C/EBPA, FLT3 και Meis1. Διαταραχές της έκφρασης των παραγόντων αυτών, μεμονωμένες ή σε συνδυασμό, είτε λόγω μεταλλάξεων είτε λόγω ανώμαλης μεθυλίωσης, προκαλούν αναστολή της κυτταρικής

διαφοροποίησης και πολλαπλασιασμό άωρων μορφών κυττάρων με αποτέλεσμα την λευχαιμογένεση [4,5].



Εικόνα 1: Ο ρόλος της κυτταρικής διαφοροποίησης στον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και οι συνέπειες της αποτυχίας της διαφοροποίησης με αποτέλεσμα την καρκινογένεση

Ο μηχανισμός σταθερότητας της κυτταρικής διαφοροποίησης παραμένει υπό συνεχή έρευνα. Μελέτες οι οποίες πραγματοποιήθηκαν σε λευχαιμικά κύτταρα της μυελικής σειράς με ανώμαλο γενετικό υπόβαθρο, έδειξαν ότι τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να «επαναπρογραμματιστούν» επιγενετικά σε έναν μη-κακοήγη φαινότυπο ενάγοντας την κυτταρική διαφοροποίηση. Η επιγενετική καταστολή της κακοήθειας, πάντα με αποτέλεσμα την επανέναρξη της κυτταρικής διαφοροποίησης, υπερνικά τις γενετικές βλάβες των νεοπλασματικών κυττάρων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην θεραπεία κατά του καρκίνου [2,6].

2. Μεθυλίωση του DNA (γονιδιακή μεθυλίωση)

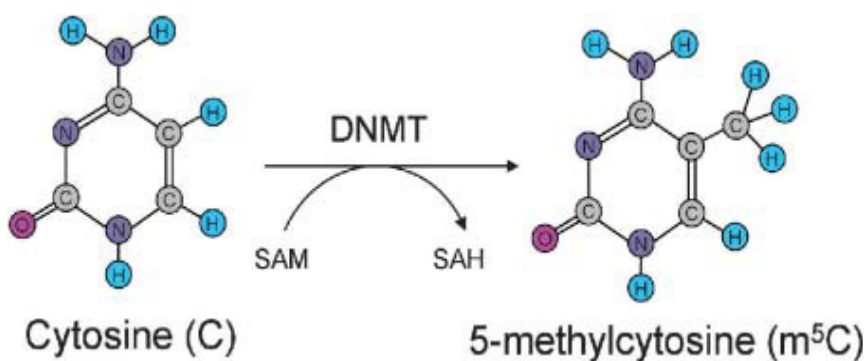
2.1. Εισαγωγή

Η κλασική γενετική δεν μπορεί από μόνη της να εξηγήσει την φαινοτυπική ποικιλομορφία σε ένα πληθυσμό ούτε είναι δυνατόν να εξηγήσει γιατί τα μονοζυγωτικά δίδυμα ή τα κλωνοποιημένα ζώα παρουσιάζουν διαφορετικούς φαινότυπους ή διαφορετική συχνότητα εμφάνισης των ίδιων νοσημάτων. Η ιδέα-ουσία της επιγενετικής μπορεί εν μέρει να εξηγήσει τα φαινόμενα αυτά. Ο όρος «επιγενετική», ο οποίος εισήχθη για πρώτη φορά από τον C.H. Waddington το 1939 σε μια προσπάθεια ορισμού «των αιτιολογικών συσχετίσεων μεταξύ των γονιδίων και των προϊόντων αυτών, με αποτέλεσμα τον παρών φαινότυπο», ορίστηκε αργότερα ως «κληρονομούμενες αλλαγές της γονιδιακής έκφρασης οι οποίες δεν οφείλονται σε διαταραχές της αλληλουχίας του DNA» [7,8].

Ο καλύτερα γνωστός επιγενετικός δείκτης-μηχανισμός είναι η μεθυλίωση του DNA και σχετίζεται με την μεταγραφική αποσιώπηση των γονιδίων και λαμβάνει χώρα στη βάση κυτοσίνη η οποία προηγείται της βάσης γουανίνης στην ακολουθία του γονιδιώματος και η αντίδραση καταλύεται από τις μεθυλτρανφεράσες οι οποίες προσκολλούν ισοσθενώς μία μεθυλομάδα στη θέση C5 του δακτυλίου της κυτοσίνης [9]. Η μεθυλίωση είναι δυναμική κατάσταση δηλαδή μη-μεθυλιωμένες αλληλουχίες μπορεί να μετατραπούν σε μεθυλιωμένες και ομοίως μεθυλιωμένες ομάδες μπορεί να χαθούν [10-14]. Η γονιδιακή μεθυλίωση εμπλέκεται στην αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X στις γυναίκες και στην γονιδιακή αποτύπωση με αποτέλεσμα την έκφραση του ενός μοναχά αλληλομόρφου. Επίσης συμβάλλει στη σταθερότητα του ανθρώπινου γονιδιώματος εμποδίζοντας μεταθέσεις επαναλαμβανόμενων και μετατιθόμενων στοιχείων αποκτώντας έτσι δυναμικό ρόλο κατά τη ανάπτυξη [9]. Η μεθυλίωση μπορεί να καταστείλει την μεταγραφή του DNA είτε άμεσα εμποδίζοντας τους ενεργοποιητές της μεταγραφής μη επιτρέποντας τη σύνδεση αυτών στις αντίστοιχες αλληλουχίες του DNA, είτε έμμεσα μέσω διαφόρων πρωτεϊνών οι οποίες αναγνωρίζουν και συνδέονται με το μεθυλιωμένο DNA, στρατολογούν άλλους ανασταλτές οι οποίοι προκαλούν αποσιώπηση της έκφρασης των γονιδίων και εν συνεχεία προκαλούν αναδιάταξη της χρωματίνης [15]. Φαίνεται ότι ακόμη και ελάχιστες μεταβολές στην «πυκνότητα» της μεθυλίωσης μπορεί να είναι θανατηφόρες κατά την εμβρυική ανάπτυξη ή να προκαλέσουν ένα ευρύ φάσμα από νοσήματα της ανάπτυξης [16,17]. Περίπου 1% των βάσεων του σωματικού ανθρώπινου γονιδιώματος είναι μεθυλ-κυτοσίνες, ποσοστό που

αντιστοιχεί στο 70-80% όλων των CpG δινουκλεοτιδίων του γονιδιώματος. Αυτά δεν είναι τυχαία κατανομημένα στο γονιδίωμα αλλά υπάρχουν περιοχές πλούσιες σε CpG ονομαζόμενες CpG νησίδες οι οποίες καλύπτουν το 5'-τελικό τμήμα της ρυθμιστικής περιοχής πολλών γονιδίων και η πλειονότητα (94%) των CpG νησίδων παραμένει μη μεθυλιωμένη στα φυσιολογικά κύτταρα [16,18-20].

Όπως ήδη αναφέρθηκε η μεθυλίωση επιτυγχάνεται μέσω των μεθυλτρανσφερασών. Πάντα στα θηλαστικά, οι μεθυλτρανσφεράσες DNMT3A και DNMT3B είναι υπεύθυνες για την εγκαθίδρυση νέων μοτίβων μεθυλιωμένου DNA, σε προηγούμενα μη μεθυλιωμένες CpG νησίδες, συνδυαζόμενου με αλληλουχίες ρετροτρανσποσονίων και δορυφορικές επαναλήψεις περικεντομεριδιακών περιοχών και διαφορετικά μεθυλιωμένων περιοχών αποτυπωμένων τόπων. Αντιθέτως η μεθυλτρανσφεράση DNMT1 αντιγράφει προϋπάρχοντα μοτίβα μεθυλίωσης και για αυτό το λόγο θεωρείται μεθυλτρανσφεράση συντήρησης. Επίμυες οι οποίοι στερούνται την μεθυλτρανσφεράση Dnmt3a αναπτύσσονται έως το τέλος της κύησης αλλά πεθαίνουν σε ηλικία 4 εβδομάδων, ενώ επίμυες οι οποίοι εμφανίζουν έλλειψη της μεθυλτρανσφεράσης Dnmt3b είχαν ενδομήτριο θάνατο (εικόνα 2) [21].



Εικόνα 2: Η μεθυλίωση των κυτοσινών. Οι βάσεις κυτοσίνες μετατρέπονται σε μεθυλκυτοσίνες χάριν των μεθυλτρανσφερασών (DNMT). Η μεθυλ-ομάδα δωρίζεται από τον καθολικό δότη S-αδενοσιλ-μεθυονίνη (SAM), ο οποίος με τη σειρά του μετατρέπεται σε S-αδενοσιλ-ομοκυστεΐνη (SAH).

2.2 Η μεθυλίωση του DNA και η κυτταρική διαφοροποίηση

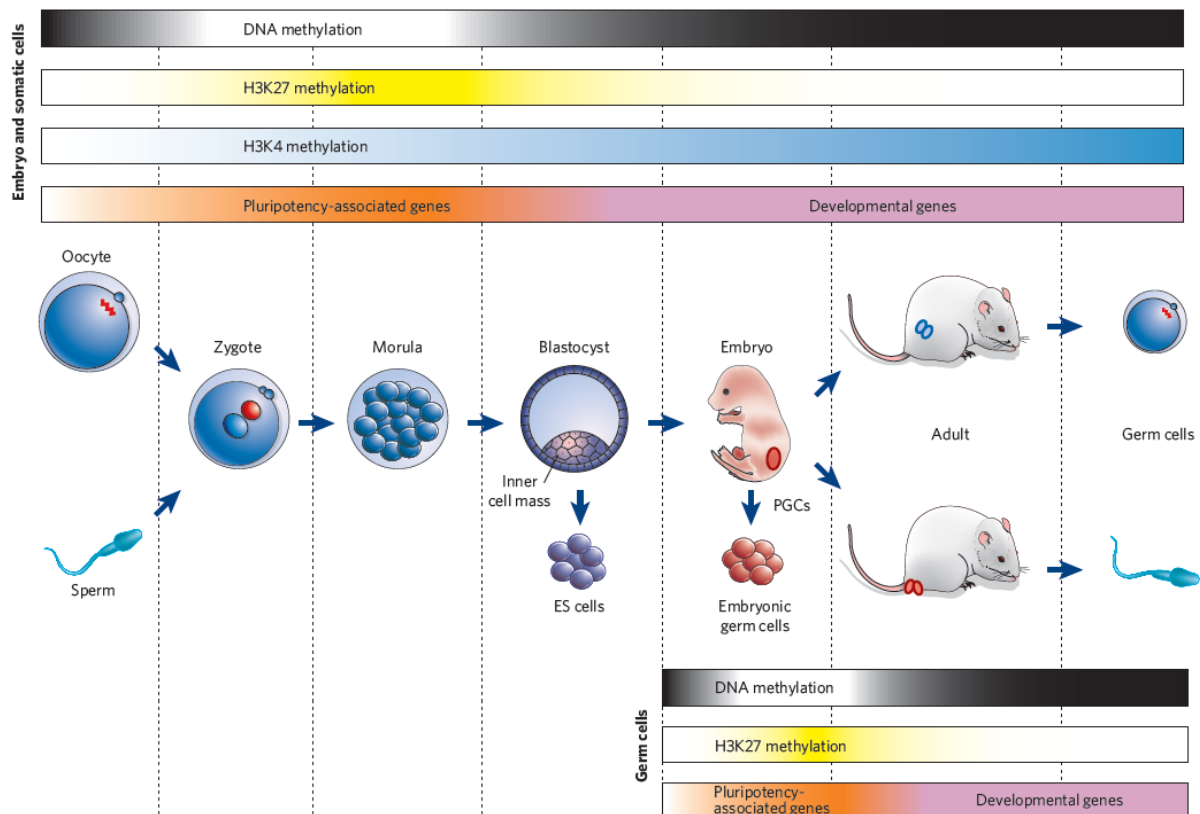
Το εναρκτήριο λάκτισμα για την έναρξη και διατήρηση της διαδικασίας της κυτταρικής διαφοροποίησης δίδεται από τους επιγενετικούς μηχανισμούς. Παρόλο που αυτοί οι

επιγενετικοί μηχανισμοί εδραιώνονται πρώιμα κατά την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των οργανισμών, συμβαίνουν συνεχείς προσαρμογές κατά τη διάρκεια της ζωής των κυττάρων ως απάντηση σε εσωτερικά και περιβαλλοντικά ερεθίσματα που μπορεί να οδηγήσουν, αργότερα στη ζωή, στην ανάπτυξη νοσημάτων και καρκίνου[9]. Η κυτταρική διαφοροποίηση βασίζεται στις επιγενετικές αλλαγές οι οποίες σχετίζονται με την επιλεκτική χρονικά ενεργοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων και την ελεγχόμενη αποσιώπηση πολυδύναμων γονιδίων.

Βασικό παράγοντα για την επίτευξη της διαφοροποίησης αποτελούν οι μεθυλτρανσφεράσες οι οποίες κατά την εμβρυική ανάπτυξη ελέγχουν τη συστηματική μεταγραφική απενεργοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων μέσω της μεθυλίωσης των υποκινητών των γονιδίων και συνεπώς τη σωστή διαφοροποίηση. Δυναμικός έλεγχος της έκφρασης των μεθυλτρανσφερασών επέρχεται κατά την ανάπτυξη, με υψηλότερα επίπεδα αυτών σε αδιαφοροποίητα κύτταρα, επίπεδα τα οποία μειώνονται όσο η κυτταρική διαφοροποίηση προχωρά. Πρόσφατες μελέτες κατέδειξαν ότι η μεθυλίωση του DNA των πλουσιών σε CpG νουκλεοτιδίων αλληλουχιών είναι πολύ χαμηλή στα αρχέγονα πολυδύναμα κύτταρα. Κατά την κυτταρική διαφοροποίηση υπερμεθυλίωση παρατηρείται στις CpG νησίδες των υποκινητών αλλά και σε αλληλουχίες πλούσιες σε CpG νουκλεοτίδια σε περιοχές πέραν των υποκινητών. Αξιοσημείωτο είναι, ότι δεν παρατηρείται σχεδόν καθόλου απομεθυλίωση μαρτυρώντας έτσι ότι η επιγενετική καταστολή μέσω της γονιδιακής μεθυλίωσης αυξάνεται κατά την διαφοροποίηση των διαφόρων κυτταρικών σειρών [22].

Κατά την διαφοροποίηση και ανάπτυξη των κυτταρικών σειρών η μεθυλίωση του DNA σταθερά περιορίζει-δεσμεύει την γονιδιακή έκφραση σε μία προκαθορισμένη μονόδρομη εξέλιξη του κυτταρικού πεπρωμένου. Μεταγραφικοί παράγοντες κλειδιά, όπως τα γονίδια NANOG και OCT4 που εκφράζονται στα εμβρυικά πολυδύναμα κύτταρα αλλά καταστέλλονται κατά την πρόοδο της διαφοροποίησης καθώς υπερμεθυλιώνονται, φαίνεται ότι αποτελούν ένα ρυθμιστικό δίκτυο μεταγραφής το οποίο επιλεκτικά ενεργοποιεί γονίδια απαραίτητα για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των εμβρυϊκών αρχέγονων πολυδύναμων κυττάρων, ενώ επίσης επιλεκτικά καταστέλλουν γονίδια απαραίτητα για την κυτταρική διαφοροποίηση [2,23]. Έτσι λοιπόν μπορεί να ειπωθεί ότι η φυσιολογική κυτταρική διαφοροποίηση εξαρτάται-κυβερνάται από αυτή την επιγενετική εξέλιξη δηλαδή την μεθυλίωση του DNA (εικόνα 3) [24].

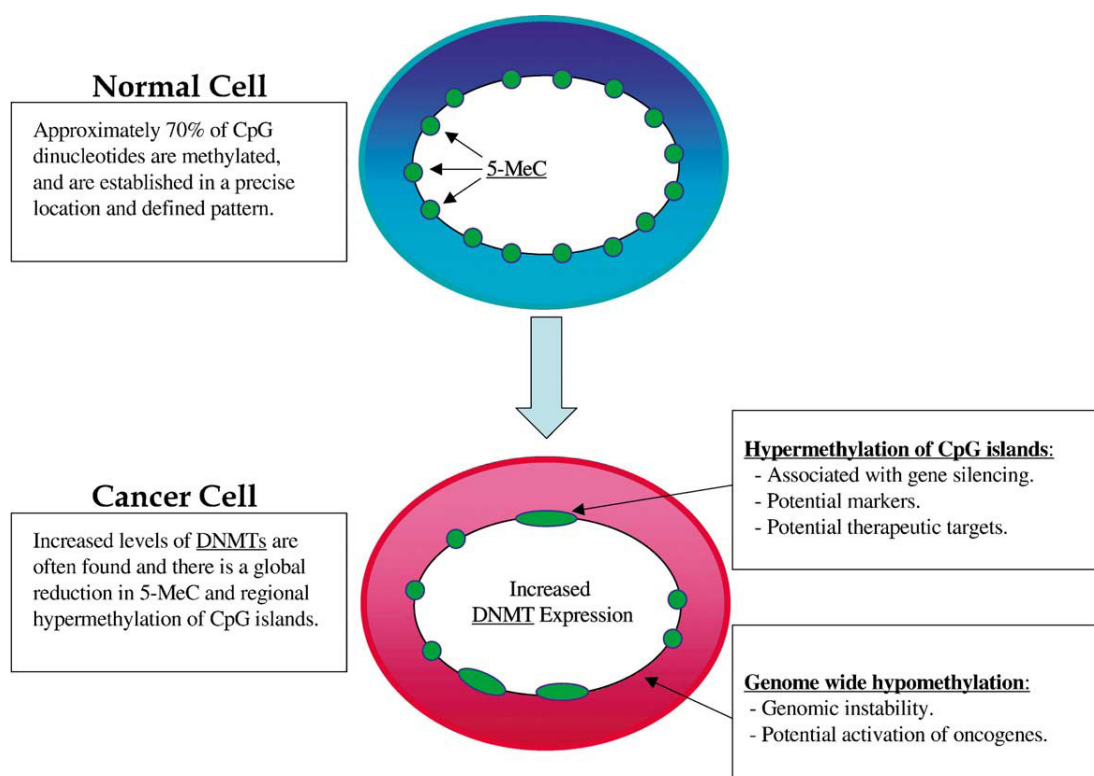
Εικόνα 3: Επιγενετικός έλεγχος των γονιδίων κατά την ανάπτυξη των θηλαστικών. Τα γεγονότα κλειδιά της ανάπτυξης φαίνονται μαζί με τις καθολικές επιγενετικές μεταβολές και τη γονιδιακή έκφραση. Η μεθυλίωση του DNA εξαλείφεται πρώιμα κατά τη διαδικασία της ανάπτυξης. Επιπλέον, πολυδύναμα γονίδια αρχίζουν να εκφράζονται και γονίδια σχετιζόμενα με την ανάπτυξη αρχίζουν να καταστέλλονται από την ομάδα των πρωτεϊνών polycomb και από την μεθυλίωση των ιστονών H3K27. Κατά την διαφοροποίηση των πολυδύναμων κυττάρων τα πολυδύναμα γονίδια αρχίζουν να καταστέλλονται οριστικά ως αποτέλεσμα της μεθυλίωσης του DNA. Την ίδια στιγμή γονίδια της ανάπτυξης αρχίζουν να εκφράζονται και υπάρχει αύξηση της μεθυλίωσης της ιστόνης H3K4. Αργότερα κατά την πρώιμη ανάπτυξη των πρωτογενών βλαστικών κυττάρων η μεθυλίωση του DNA και των ιστονών επίσης εξαλείφονται. Τα αποτυπωμένα γονίδια είναι απομεθυλωμένα αυτή την περίοδο και τα γονίδια της ανάπτυξης εκφράζονται σε μεταγενέστερη φάση. Η μεθυλίωση της ιστόνης H3K27 ενάγει τη σίγαση της έκφρασης των γονιδίων της ανάπτυξης για ένα μικρό χρονικό διάστημα στα πολυδύναμα κύτταρα. Αντιθέτως, η μεθυλίωση του DNA ενάγει τη μόνιμη σίγαση των αποτυπωμένων γονιδίων και ορισμένων πολυδύναμων κυττάρων.



2.3. Μεθυλίωση του DNA και καρκινογένεση

2.3.1. Εισαγωγή

Η πρώτη συσχέτιση της μεθυλίωσης με τον καρκίνο περιγράφηκε το 1983 όταν για πρώτη φορά διαπιστώθηκε ότι το γονιδίωμα των καρκινικών κυττάρων είναι υπομεθυλωμένο σε σχέση με εκείνο των φυσιολογικών κυττάρων [25]. Η μεθυλίωση είτε από μόνη της είτε σε συνδυασμό με κάποια μετάλλαξη έχει περιγραφεί ως παθογενετική βλάβη για πολλαπλά ογκοκατασταλτικά και καρκινογόνα γονίδια και έχει πλέον αποδεδειγμένη αξία ως δείκτης κινδύνου ανάπτυξης και εξέλιξης του καρκίνου και ως δείκτης με προγνωστική αξία [10,26]. Οι διαταραχές της μεθυλίωσης μπορεί να ευοδώσουν την ανάπτυξη κακοήθων νεοπλασιών με διάφορους τρόπους όπως μέσω της συνολικής απώλειας των μεθυλκυτοσινών (υπομεθυλίωση του DNA) η οποία μπορεί να προκαλέσει αστάθεια του γονιδιώματος, ή της υπερμεθυλίωσης υποκινητών συγκεκριμένων γονιδίων με αποτέλεσμα την παύση της μεταγραφής. Επιπλέον, μέσω της δημιουργίας σημειακών μεταλλάξεων οι μεθυλωμένες κυτοσίνες μπορούν να υφίστανται αυτόματες απαμινώσεις σε θυμίνη και να μετατρέπονται σε ενδογενείς μεταλλαξιογόνους παράγοντες, όπως επίσης προκαλούν και την προσαγωγή καρκινογόνων εποξειδίων του καπνού του τσιγάρου στη βάση γουανίνη η οποία με τη σειρά της μετατρέπεται σε θυμίνη (εικόνα 4) [18].

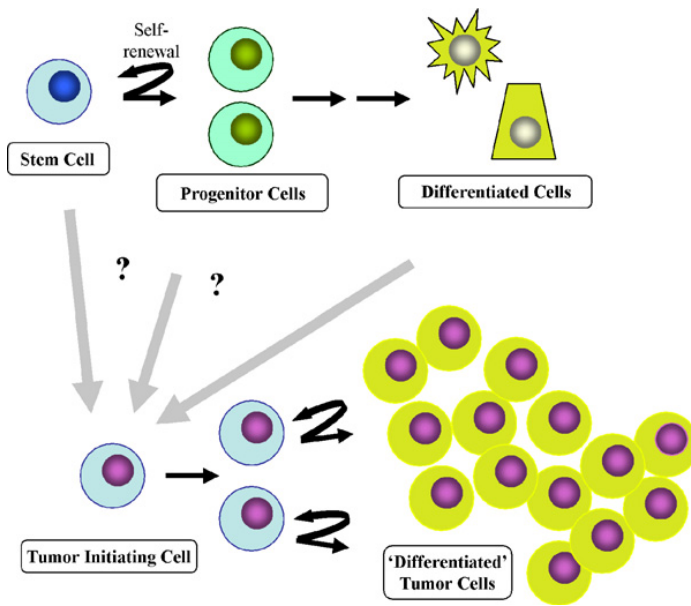


Εικόνα 4: Το αίνιγμα της μεθυλίωσης στον καρκίνο

Ανώμαλη γονιδιακή μεθυλίωση η οποία ανευρίσκεται τυπικά στον καρκίνο μπορεί να σχετίζεται με διαταραχές των αλληλεπιδράσεων που διασπών τον ακριβή έλεγχο του επιγονιδιώματος στα φυσιολογικά κύτταρα, και είναι δυνατόν η επαρχή της καρκινογένεσης να λαμβάνει χώρα στα ειδικά για τους διαφορετικούς ιστούς (tissue-specific) αρχέγονα κύτταρα, καθώς η γονιδιακή μεθυλίωση και οι μεθυλτρανσφεράσες αποτελούν ένα περίπλοκο κομμάτι του ελέγχου και της ανάπτυξης των αρχέγονων κυττάρων [21]. Μελέτες έδειξαν ότι τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν διαταραχές του μοτίβου της μεθυλίωσης συμπεριλαμβανόμενης της συνολικής υπομεθυλίωσης και της υπερμεθυλίωσης των CpG νησίδων, μεταβολές οι οποίες αποτελούν κομβικά σημεία στη δημιουργία του επιγονιδιώματος [27,28]. Αυτές οι αλλαγές επιφέρουν μεταβολές στη δομή και στη λειτουργία του DNA προκαλώντας μη επιθυμητή μεταγραφή στοιχείων, ανώμαλη ενεργοποίηση γονιδίων, προδιάθεση για γονιδιωματική αστάθεια και ανώμαλη σίγαση γονιδίων σημαντικών για την έναρξη και εξέλιξη της ογκογένεσης. Η τελευταία αυτή ανωμαλία χαρακτηρίζει ογκοκατασταλτικά γονίδια, μεταγραφικούς παράγοντες εμπλεκόμενους στην ανάπτυξη, γονίδια που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο και την

απόπτωση [27]. Παράγοντες που προάγουν αυτές τις αλλαγές μπορεί να είναι περιβαλλοντικά στοιχεία όπως το κάδμιο, το αρσενικό, το νικέλιο, η έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, λοιμωγόνι παράγοντες όπως το *Helicobacter pylori*, η υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ, η έλλειψη φυλικού οξέος, η απώλεια της γονιδιακής αποτύπωσης και η γήρανση. Η χρόνια φλεγμονή μπορεί επίσης να έχει ως αποτέλεσμα διαταραχή της μεθυλίωσης καθώς η υπερέκφραση της ιντερλευκίνης 6 (IL-6) συνδέεται με την υπερέκφραση της μεθυλτρανσφεράσης DNMT1. Επιπλέον, η σίγαση των ογκοτασταλτικών γονιδίων μέσω της υπερμεθυλίωσης συνδέεται με υπερέκφραση των μεθυλτρανσφερασών DNMT1 και DNMT3B με επακόλουθη ενεργοποίηση του μονοπατιού Ras-MAPK και συνεπώς την επαγωγική ενεργοποίηση των γονιδίων IE [9,26,29-32].

Όπως προαναφέρθηκε οι επιγενετικές ανωμαλίες οι οποίες αποτελούν ξεχωριστά χαρακτηριστικά της όγκογένεσης περιλαμβάνουν την καθολική γονιδιακή υπομεθυλίωση και την υπερμεθυλίωση CpG νησίδων. Η υπομεθυλίωση σχετίζεται πρωτίστως με επαναλαμβανόμενες περιοχές DNA και μετατοπίσιμων στοιχείων και δευτερευόντως παρατηρείται στους εκκινητές των φυσιολογικά αποσιωπημένων γονιδίων. Η υπερμεθυλίωση παρατηρείται συχνότερα στους υποκινητές των ογκοκατασταλτικών γονιδίων και δρα ως ένα ή και τα δύο από τα «χτυπήματα» που περιγράφονται στην υπόθεση των «δύο χτυπημάτων» του Knudson. Ένα σημαντικό ερώτημα που προκύπτει είναι γιατί μόνο ορισμένων γονιδίων οι υποκινητές είναι υπερμεθυλιωμένοι στον καρκίνο. Μία ενδιαφέρουσα υπόθεση η οποία επεξηγεί το φαινόμενο αυτό είναι η θεωρία του καρκινικού αρχέγονου πολυδύναμου κυττάρου. Η υπόθεση αυτή υποδηλώνει (εικόνα 5) ότι τα προγονικά κύτταρα υφίστανται κακοήθη εξαλλαγή πιθανώς λόγω περιβαλλοντικών ερεθισμάτων ή ενδογενών διαδικασιών όπως οι φλεγμονές και η επούλωση των πληγών. Τα καρκινικά αρχέγονα πολυδύναμα κύτταρα διατηρούν την ικανότητά τους για απεριόριστο αυτοπολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση και γενικά αποτελούν ένα μικρό μέρος της μάζας του όγκου. Αντιθέτως, τα ανώμαλα διαφοροποιημένα νεοπλασματικά κύτταρα αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος του εκάστοτε όγκου και μπορούν να θεραπευθούν με χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία και χειρουργικές επεμβάσεις. Τα κύτταρα αυτά έχουν μειωμένη ικανότητα ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού.



Εικόνα 5: Η θεωρία του αρχέγονου πολυδύναμου καρκινικού κυττάρου. Η ανανέωση του αντίστοιχου φυσιολογικού κυττάρου είναι μία ελεγχόμενη διαδικασία. Τα μεταγενέστερα προγονικά κύτταρα έχουν την ικανότητα της διαίρεσης και της διαφοροποίησης. Μεταμόρφωση των αρχέγονων πολυδύναμων κυττάρων λόγω γενετικών ή επιγενετικών διαταραχών μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια ελέγχου της αυτοανανέωσης με αποτέλεσμα στη γένεση του αρχέγονου πολυδύναμου καρκινικού

κυττάρου το οποίο δεν έχει την ικανότητα της διαφοροποίησης.

Συγκριτικές μελέτες οι οποίες πραγματοποιήθηκαν σε εμβρυικά αρχέγονα πολυδύναμα κύτταρα, εμβρυικό καρκίνωμα και καρκινικά κύτταρα έδειξαν τα γονίδια τα οποία είναι πιο ευάλωτα και υπόκεινται ευκολότερα σε υπερμεθυλίωση κατά την ογκογένεση, είναι σε φυσιολογικές συνθήκες κατασταλμένα από την ομάδα των πολυκομβικών πρωτεϊνών (polycomb proteins), οι οποίες πρωτεΐνες φαίνεται ότι ελέγχουν τη γονιδιακή μεθυλίωση σε επίπεδο αρχέγονου καρκινικού πολυδύναμου κυττάρου [21,35].

2.3.2. Υπερμεθυλίωση του DNA και καρκινογένεση

Η υπερμεθυλίωση των CpG νησίδων των υποκινητών είναι συχνή στις διάφορες μορφές όγκων και συσχετίζεται με την ανώμαλη απενεργοποίηση διαφόρων ογκοκατασταλτικών γονιδίων και αφορά γονίδια με δράση στον κυτταρικό κύκλο, στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA, στον μεταβολισμό καρκινογόνων ουσιών και την αγγειογένεση. Τα γονίδια τα οποία είναι πιο ευάλωτα στην υπερμεθυλίωση είναι εκείνα που εμπλέκονται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου (p16INK4A, p15INK4A, Rb, p14ARF), στη επιδιόρθωση του DNA (BRCA1, MGMT), στην απόπτωση (DAPK, TMS1), στον καταρράκτη των κινασών της τυροσίνης (SOCS-1, SOCS-3, SYK), οι μεταγραφικοί παράγοντες (GATA-4, GATA-5, ID4)

και τα γονίδια του μονοπατιού Wnt (APC, DKK-1, IGFBP-3) [34,25,35,18,19]. Υπερμεθυλίωση επέρχεται σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης των κακοήθων νεοπλασμάτων και σε διαφορετικά κυτταρικά δίκτυα και επιπλέον σχετίζεται με γενετικές βλάβες [8]. Σε ορισμένους ιστούς όπως του παγκρέατος και του νεφρού η υπερμεθυλίωση αποτελεί πρώιμο φαινόμενο και ο αριθμός των συμβαμάτων γονιδιακής υπερμεθυλίωσης προοδευτικά αυξάνεται από τις προκαρκινωματώδεις καταστάσεις στις καρκινωματώδεις. Σημαντικό θέμα συζήτησης αποτελεί η κατανόηση του γιατί παρατηρείται ανάπτυξη όγκων μόνο όταν είναι υπερμεθυλιωμένα συγκεκριμένα γονίδια. Η απάντηση φαίνεται να είναι στις μεθυλτρανσφεράσες και ιδιαίτερα στη διπλή συνέκφραση των μεθυλτρανσφερασών DNMT1 και DNMT3B, όπως προκύπτει από πειράματα σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του ορθού. Κατά τη μελέτη της υπερμεθυλίωσης του DNA στην κυτταρική σειρά HCT116 η οποία στερείται την μεθυλτρανσφεράση DNMT1 παρατηρήθηκε μιτωτική καταστροφή των κυττάρων αυτών. Υπερέκφραση της μεθυλτρανσφεράσης Dnmt3b σε επίμυες Min είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση αδενωμάτων του εντέρου, την απώλεια της αποτύπωσης του γονιδίου Igf2 και την αποσιώπηση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου Sfrp. Υπερέκφραση της μεθυλτρανσφεράσης Dnmt1 σε εμβρυικά αρχέγονα πολυδύναμα κύτταρα έχει επίσης ως αποτέλεσμα την απώλεια της αποτύπωσης του γονιδίου Igf2, αλλά όταν αυτά τα εμβρυικά αρχέγονα πολυδύναμα κύτταρα εγχύθηκαν σε βλαστοκύστη παρατηρήθηκε εμβρυικός θάνατος. Τα αποτελέσματα αυτά τονίζουν τη δράση των μεθυλτρανσφερασών στην ογκογένεση στοχεύοντας συγκεκριμένα γονίδια κάθε φορά [21]. Η αδρανοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων είναι μείζων φαινόμενο στην ογκογένεση και η εμφάνιση de novo υπερμεθυλιωμένων CpG νησίδων έχει περιγραφεί ως ένα καταλυτικό σύμβαμα κατά την ανάπτυξη του καρκίνου λόγω της αποσιώπησης της έκφρασης των ογκοκατασταλτικών γονιδίων και άλλων μορίων τα οποία εμπλέκονται στην κυτταρική διαφοροποίηση.

Η συχνότητα της εμφάνισης υπερμεθυλιωμένων CpG νησίδων διαφέρει ανάμεσα στους διάφορους τύπους καρκίνου με λιγότερο από 1% των νησίδων να ανευρίσκονται υπερμεθυλιωμένες σε όγκους των όρχεων, του μαστού, της κεφαλής και του τραχήλου ενώ στις περιπτώσεις της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας, του παχέος εντέρου και του εγκεφάλου το ποσοστό αυτό ανέρχεται στο 10% [10]. Επίσης το μοτίβο της υπερμεθυλίωσης δεν είναι τυχαίο αλλά πιο συχνό σε εκείνες τις χρωμοσωμιακές περιοχές οι οποίες είναι πιο ασταθείς [10] και φαίνεται ότι η υπερμεθυλίωση δρα σε συνέργεια με τις πρωτεΐνες που συνδέονται σε μεθυλομάδες και σε ιστόνες με αποτέλεσμα την μεταγραφική σίγαση των υπερμεθυλιωμένων

γονιδίων στον καρκίνο [35]. Το πρότυπο των υπερμεθυλιωμένων νησίδων ογκοκατασταλτικών γονιδίων διαφέρουν ανάλογα με το είδος της κακοήθειας όχι μόνο σε σποραδικούς καρκίνους αλλά και σε νεοπλάσματα τα οποία έχουν κληρονομικά χαρακτηριστικά. Επιπλέον, ορισμένα είδη καρκίνου εμφανίζουν περισσότερα υπερμεθυλιωμένα γονίδια από ότι άλλα, όπως για παράδειγμα ο καρκίνος του πεπτικού συστήματος σε σχέση με τα σαρκώματα ή τον καρκίνο των ωοθηκών [19]. Η υπερμεθυλίωση συνδέεται με τη λευχαιμία και άλλες αιματολογικές κακοήθειες. Γονίδια όπως το γονίδιο της καλσιτονίνης, το p15INK4A, το p21Cip/Waf1 και το γονίδιο ER έχουν βρεθεί υπερμεθυλιωμένα περίπου στο 65% των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων (ΜΔΣ) και στο 95% των οξειών μυελογενών λευχαιμιών (ΟΜΛ). Η υπερμεθυλίωση συσχετίζεται με την επιβίωση και την εξαλλαγή σε ΟΜΛ [34,36-38].

2.3.3. Υπομεθυλίωση του DNA και καρκινογένεση

Η παρατήρηση χαμηλών επιπέδων μεθυλίωσης του DNA σε όγκους σε σύγκριση με τα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA των υγιών ιστών αποτελεί μία από τις πρώτες επιγενετικές διαταραχές που ανευρέθηκαν σε περιπτώσεις καρκίνου και οι πρώτες μελέτες για τις διαταραχές της μεθυλίωσης πραγματοποιήθηκαν πριν περίπου 20 χρόνια από τους Ehrlich και Gama-Sosa οι οποίες ανέδειξαν μία συνολική μείωση των μεθυλκυτοσινών στις περιπτώσεις των ανθρώπινων κακοηθειών σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς [10]. Η μεθυλίωση του DNA υφίσταται ιδιαίτερη μεταβολή στον καρκίνο, καθώς ο ρυθμός της υπομεθυλίωσης του γονιδιοματικού DNA αυξάνεται κατά την κακοήθη εξαλλαγή της αρχικά καλοήθους βλάβης σε κακοήθη όγκο και η υπομεθυλίωση του DNA έχει παρατηρηθεί ευρέως σε περιπτώσεις καρκίνου του στομάχου, του κόλου, των νεφρών, του παγκρέατος, του ήπατος, της μήτρας, των πνευμόνων και του τραχήλου της μήτρας. Τρεις μηχανισμοί έχουν προταθεί οι οποίοι θα μπορούσαν να εξηγήσουν την συμμετοχή της υπομεθυλίωσης στην ογκογένεση: 1) αυξημένη αστάθεια του γονιδιώματος, 2) επανερργοποίηση αντιμεταθετών στοιχείων και 3) απώλεια της γονιδιακής αποτύπωσης, δηλαδή η υπομεθυλίωση είναι δυνατόν να ευνοήσει μιτωτικούς ανασυνδυασμούς προκαλώντας μεταθέσεις, απώλειες των χρωμοσωμάτων. Επίσης, χαρακτηριστική είναι η απώλεια της γονιδιακής αποτύπωσης ως αποτέλεσμα της υπομεθυλίωσης με συνέπεια την υπερέκφραση του αποτυπωμένου γονιδίου και συνεπώς αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου [16].

Η γονιδιακή υπομεθυλίωση έχει πολλαπλές συνέπειες συμπεριλαμβανομένων της χρωμοσωμιακής αστάθειας, της ανώμαλης ενεργοποίησης ενδογενών ρετροϊκών στοιχείων και ογκογονιδίων και της απώλειας της γονιδιακής αποτύπωσης [21]. Σε ένα μοντέλο επίμυων που χαρακτηρίζεται από πολλαπλά νεοπλάσματα του παχέως εντέρου (Min-multiple intestinal neoplasia) συνδυασμένο με συνολική γονιδιακή υπομεθυλίωση, λόγω υπομορφισμού της μεθυλτρανσφεράσης Dnmt1, παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού των μικροαδενομάτων του παχέως εντέρου χωρίς βέβαια να τεκμηριωθεί εξέλιξη αυτών σε μακροσκοπικούς όγκους. Ωστόσο, όγκοι του ήπατος αναπτύχθηκαν σε μύες με πολλαπλά νεοπλάσματα του παχέως εντέρου αναδεικνύοντας έτσι ότι οι συνέπειες της υπομεθυλίωσης είναι ειδικές για τους διαφορετικούς ιστούς (tissue-specific). Οι συνέπειες της υπομεθυλίωσης του DNA δεν περιορίζονται μόνο στην χρωμοσωμιακή αστάθεια αλλά εκτείνονται και στην ανώμαλη έκφραση των ογκογονιδίων και στην απώλεια της γονιδιακής αποτύπωσης. Για παράδειγμα, το γονίδιο της συνουκλείνης-γ (SNCG) του οποίου η έκφραση συνήθως περιορίζεται στους νευρώνες, φαίνεται να είναι υπομεθυλιωμένο στον καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών και η υπερέκφραση του γονιδίου SNCG σχετίζεται με επιθετικότερες μορφές του καρκίνου του μαστού. Ομοίως, το γονίδιο το οποίο εμπλέκεται στον έλεγχο των επιγενετικών φαινομένων (BORIS/CTCF) είναι υπομεθυλιωμένο στον επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών με αποτέλεσμα την αυξημένη έκφραση αυτού σε σχέση με τον φυσιολογικό ιστό [21].

2.3.4. Η μεθυλίωση του DNA στις αιματολογικές κακοήθειες

Ο μηχανισμός της μεθυλίωσης ελέγχει τη φυσιολογική ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των διαφόρων αιμοποιητικών κυττάρων. Οι διαταραχές της μεθυλίωσης οδηγούν σε σίγαση συγκεκριμένων γονιδίων και αναγνωρίζεται ως μηχανισμός κλειδί κατά την κακοήθη εξαλλαγή των κυττάρων σε κακοήθη [39]. Δυναμικές αλλαγές στην μεθυλίωση των υποκινητών και στην μορφή της χρωματίνης φαίνεται να είναι σημαντικές για την έκφραση αυξητικών παραγόντων και των υποδοχέων αυτών, κυτταροκινών και άλλων μορίων βασικών για την φυσιολογική μυελική ανάπτυξη. Κατά τη φυσιολογική αιμοποίηση η ελεγχόμενη έκφραση ειδικών των κυτταρικών σειρών γονιδίων είναι βασική για τον σωστό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των κυττάρων όπως για παράδειγμα ο μεταγραφικός παράγοντας GATA-1 είναι απαραίτητος για την διαφοροποίηση της ερυθράς σειράς και της

μεγακαρυοκυτταρικής σειράς, ενώ ο μεταγραφικός παράγοντας PU.1 είναι απαραίτητος για τη διαφοροποίηση της μυελικής σειράς. Περιγράφεται ότι διαφορετικά μοτίβα μεθυλίωσης του γονιδίου PU.1 συσχετίζονται με τον έλεγχο της έκφρασης του γονιδίου σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές [40]. Επίσης, το ιντρόνιο -2 του γονιδίου M-CSF είναι μη-μεθυλιωμένο και εκφράζεται στα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα ενώ εμφανίζεται μεθυλιωμένο στα ουδετερόφιλα και στα λεμφοκύτταρα. Ομοίως, ο υποδοχέας του G-CSF είναι μη-μεθυλιωμένος στα φυσιολογικά ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα ενώ είναι μεθυλιωμένος στα λεμφοκύτταρα.

Οι περισσότερες αιματολογικές κακοήθειες φαίνεται πως εμφανίζουν διαταραχές της μεθυλίωσης. Επιγενετικές βλάβες γονιδίων όπως του p15 ανευρίσκονται σχεδόν σε όλες τις αιματολογικές κακοήθειες ενώ διαταραχές του p16 είναι πιο ειδικές για ορισμένα νοσήματα. Περιγράφονται σημαντικές διαφορές μεταξύ των ογκοκατασταλτικών γονιδίων που είναι υπερμεθυλιωμένα στη λευχαιμία και στο λέμφωμα [39-42]. Στην περίπτωση των αιματολογικών κακοηθειών παρατηρείται υπομεθυλίωση του γονιδίου MDR1 σε ασθενείς με ΟΜΛ ενώ υπομεθυλίωση του TCL1 παρατηρείται σε Β-λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα [36].

Πολλές μελέτες τεκμηριώνουν την υπερμεθυλίωση και την μεταγραφική σίγαση γονιδίων και την προγνωστική τους αξία όπως επίσης και την αξία τους ως δείκτης εξέλιξης της νόσου στα ΜΔΣ και ΟΜΛ [43-46]. Η ταυτοποίηση «σημαδιών-υπογραφών» υπερμεθυλιωμένων υποκινητών σε ορισμένους επιθηλιακούς όγκους και λευχαιμίες αναδεικνύουν την σχέση της μεθυλίωσης με τους μεταγραφικούς παράγοντες ελέγχοντας έτσι την φυσιολογική κυτταρική διαφοροποίηση αποτρέποντας την εξαλλαγή τους σε κακοήθη κύτταρα. Η προέλευση της ανώμαλης γονιδιακής μεθυλίωσης δεν είναι πλήρως κατανοητή. Πιστεύεται ότι όπως σε ορισμένους συμπαγείς όγκους έτσι και στις αιματολογικές κακοήθειες, οι διαταραχές της έκφρασης των μεθυλτρανσφερασών είναι υπεύθυνες για την ανώμαλη υπερμεθυλίωση [40]. Η έκφραση της μεθυλτρανσφερασών DNMT1, DNMT3A και DNMT3B είναι αυξημένη στα βλαστικά κύτταρα των ασθενών με λευχαιμία περίπου 5,3, 4,4 και 11,7 αντίστοιχα φορές σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα [47].

Η υπερμεθυλίωση του DNA συνδέεται επίσης με την αποσιώπηση των μικροRNA (miRNA) τα οποία είναι μικρά (18-22 νουκλεοτίδια), μη κωδικοποιημένα RNA τα οποία ρυθμίζουν κυτταρικές λειτουργίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κυτταρική διαφοροποίηση και η απόπτωση μέσω ελέγχου της μετάφρασης ή της διάσπασης του RNA

[16]. Τα miRNA αντιπροσωπεύουν μία νέα τάξη ογκοκατασταλτικών γονιδίων και ο παθογενετικός τους ρόλος έγκειται στην υπερμεθυλίωση των γονιδίων αυτών και φαίνεται ότι κατέχουν σημαντικό μερίδιο στην λευχαιμογένεση, πρόοδο και πρόγνωση της νόσου. Πρόσφατες ενδείξεις αναδεικνύουν τα miRNA ως νέους επιγενετικούς στόχους στον καρκίνο και ιδιαίτερα στην παθογένεια της λευχαιμίας λόγω της διαταραγμένης ρύθμισης τους από τις ογκοπρωτεΐνες [48].

Το πρότυπο της υπερμεθυλίωσης των ογκοκατασταλτικών γονιδίων στις αιματολογικές κακοήθειες διαφέρει σε σχέση με εκείνο των συμπαγών όγκων όσον αφορά τα προσβεβλημένα γονίδια αλλά πάλι ολόκληρο το φάσμα των μονοπατιών που σχετίζονται με την ογκογένεση είναι διαταραγμένο. Επίσης υπάρχουν ενδείξεις ότι οι επιγενετικές αλλαγές πέραν της συμμετοχής τους στη λευχαιμογένεση αλληλεπιδρούν με χρωμοσωμιακές ανωμαλίες όπως στην περίπτωση της οξείας προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας όπου το γονίδιο σύντηξης PML/RAR α στρατολογεί μεθυλτρανφεράσες με αποτέλεσμα την ανώμαλη μεθυλίωση των CpG νησίδων στο σημείο έναρξης μεταγραφής του γονιδίου RAR β 2 [33].

3. Ογκοκατασταλτικά γονίδια και καρκίνος

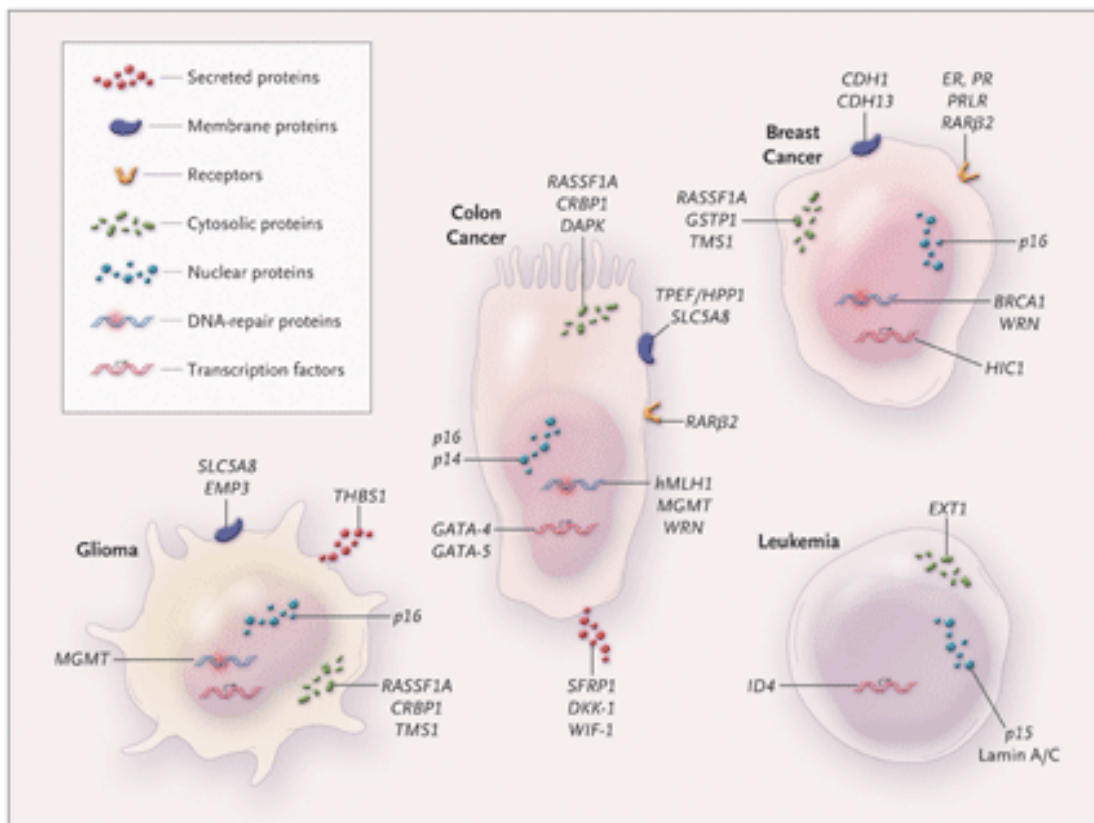
3.1 Ογκοκατασταλτικά γονίδια και μεθυλίωση του DNA

Ο αριθμός των ογκοκατασταλτικών γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στην φυσιολογική διαφοροποίηση των αιμοποιητικών κυττάρων πέραν της ογκογένεσης ολοένα αυξάνεται τα τελευταία 15 χρόνια και διαταραχές της έκφρασης τους λόγω μεταλλάξεων ή μεθυλίωσης αποτελεί γνώρισμα της παθογένειας των αιματολογικών κακοηθειών [49]. Πρόκειται περί γονιδίων που αφορούν τον κυτταρικό κύκλο όπως οι κυκλίνες και οι αναστολείς αυτών, γονιδίων όπως το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος-Rb που προάγουν την διαφοροποίηση των μονοκυττάρων, του γονιδίου «φύλακα του γονιδιώματος» p53, γονιδίων ενεργοποιητών των μεταγραφικών παραγόντων όπως του γονιδίου CBP και του επιδιορθωτικού γονιδίου MLH1 [49,50].

Η «επιγενετική σίγαση» των ογκοκατασταλτικών γονιδίων μέσω της υπερμεθυλίωσης του DNA είναι το ίδιο συχνή όσο και λόγω μεταλλάξεων των γονιδίων αυτών με αποτέλεσμα την ανάπτυξη κακοήθων όγκων. Ο μεγάλος αριθμός γονιδίων τα οποία ανευρίσκονται υπερμεθυλιωμένα σε κακοήθειες υποδηλώνει ότι οι επιγενετικές αλλαγές είναι αναγκαίες για την έναρξη ή/και την πρόοδο της καρκινογένεσης [50]. Οι περισσότερες CpG νησίδες ανευρίσκονται στις εγγύς περιοχές των υποκινητών και σχεδόν τα μισά από τα γονίδια που αποτελούν το γονιδίωμα των θηλαστικών είναι μη-μεθυλιωμένα στα φυσιολογικά κύτταρα. Αντίθετα, στον καρκίνο η υπερμεθυλίωση των υποκινητών αποτελεί την πιο γνωστή επιγενετική αλλαγή και είναι παρούσα σε κάθε είδους καρκίνο και συνδυάζεται με την μεταγραφική σίγαση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων [51].

Η λειτουργική σημασία της υπερμεθυλίωσης σημαντικών ογκοκατασταλτικών γονιδίων μπορεί επίσης να εκτιμηθεί εξετάζοντας τις συνέπειες της απενεργοποίησης των αυτοτελών ζευγών κάθε γονιδίου. Το 1971 ο Knudson παρουσίασε το μοντέλο των «δύο χτυπημάτων» δηλαδή ότι 2 συνεχόμενα γενετικά «χτυπήματα», τα οποία απενεργοποιούν τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, είναι απαραίτητα για την εξαλλαγή του φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό [51]. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο το φαινοτυπικό αποτέλεσμα της απώλειας της δράσης ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου δεν είναι εμφανές αν δεν απενεργοποιηθούν και τα 2 αλληλόμορφα του γονιδίου είτε μέσω μετάλλαξης είτε μέσω υπερμεθυλίωσης αυτών.

Ο μεθυλότυπος-δηλαδή ο μεθυλ-φαινότυπος των CpG νησίδων- έχει θεμελιώδη ρόλο στην προσπάθεια κατανόησης τις αρχές μεθυλίωσης των ογκοκατασταλτικών γονιδίων στον καρκίνο. Το γεγονός ότι διαφορετικές κακοήθειες εμφανίζουν διαφορετικό βαθμό αδρανοποίησης ογκοκατασταλτικών γονιδίων λόγω μεθυλίωσης υπονοεί ότι η μεθυλίωση δεν είναι τυχαία. Αυτό με τη σειρά του σημαίνει ότι η μεθυλίωση έχει κάποια αιτία η οποία πρέπει να ανευρεθεί (εικόνα 6) [26].



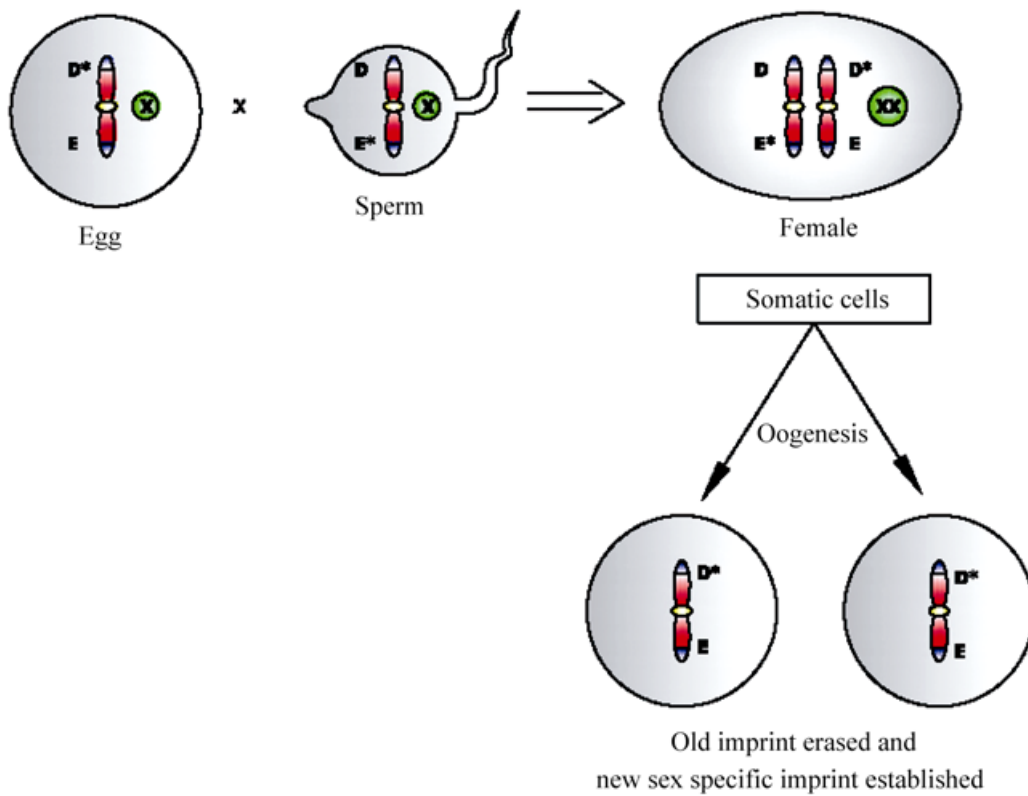
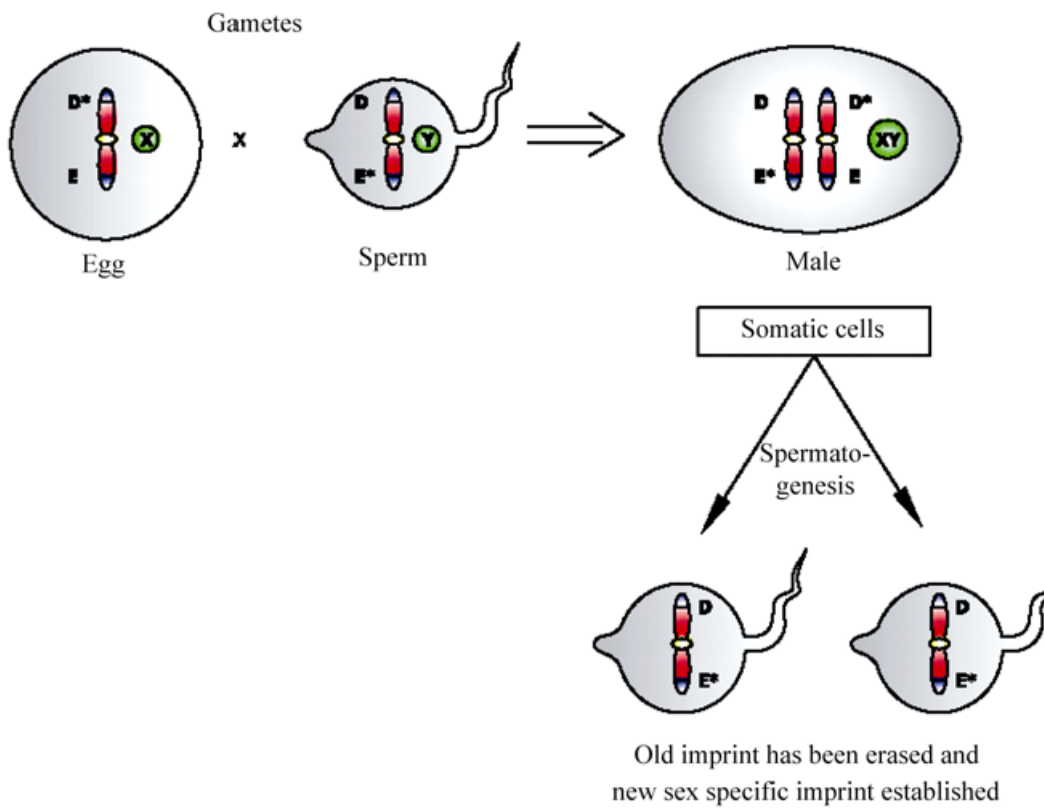
Εικόνα 6: Το προφίλ της υπερμεθυλίωσης των CpG νησίδων των υποκινητών ορισμένων ογκοκατασταλτικών γονιδίων σε διάφορες μορφές καρκίνου.

4. Γονιδιακή αποτύπωση

4.1. Εισαγωγή

Τα θηλαστικά είναι διπλοειδείς οργανισμοί οι οποίοι φέρουν δύο αλληλία κάθε αυτοσωμιακού γονιδίου, ένα εκ των οποίων κληρονομείται από την μητέρα ενώ το άλλο κληρονομείται από τον πατέρα. Ενώ στις περισσότερες των περιπτώσεων και τα δύο γονικά αλληλόμορφα εκφράζονται ισότιμα, υπάρχει μία υποομάδα γονιδίων η οποία εμφανίζει γονιδιακή αποτύπωση όπου η έκφραση των γονιδίων, μέσω επιγενετικών μηχανισμών, περιορίζεται μόνο στο πατρικό ή μητρικό αλληλόμορφο. Η γονιδιακή αποτύπωση παρατηρείται συνήθως στα θηλαστικά και στα φυτά. Το γονιδίωμα των θηλαστικών περιέχει ένα μικρό αριθμό αποτυπωμένων γονιδίων [52] και τα αποτυπωμένα γονίδια τείνουν να οργανώνονται σε συναρθροίσεις (3-15 γονίδια), αντιγράφονται ασυγχρόνως και είναι κυρίως γονίδια τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες, πάντα όμως ένα γονίδιο κωδικοποιεί ένα μη μεταφραζόμενο RNA [52-54]. Η ακριβής φύση του αρχικού επιγενετικού αποτυπώματος αποτελεί σημείο έντονης έρευνας και εικάζεται ότι η γονική αποτύπωση συντάσσεται σε βλαστικό επίπεδο καθώς τότε το γονιδίωμα βρίσκεται σε διαφορετικά τμήματα και μπορεί να διαφοροποιηθεί ανεξάρτητα [52]. Η εδραίωση της αποτύπωσης απαιτεί ότι τα 2 αλληλόμορφα έχουν διαφορετική σήμανση κατά την ωογένεση και τη σπερματογένεση, ότι τα σημάδια αυτά ξεφεύγουν του επαναπρογραμματισμού μετά την γονιμοποίηση και ότι είναι αξιόπιστα μεταβιβαζόμενα κατά την πορεία της ανάπτυξης (εικόνα 7) [55,56].

Εικόνα 7: Η εικόνα δείχνει ένα χρωμόσωμα το οποίο φέρει τα δύο αποτυπωμένα γονίδια D και E. Το γονίδιο D υποβάλλεται σε αποτύπωση στο θηλυκό γαμέτη και το E αντίστοιχα στον αρσενικό. Το γονίδιο D είναι αποτυπωμένο μόνο όταν βρίσκεται σε ένα μητρικά κληρονομούμενο χρωμόσωμα και το E ομοίως όταν βρίσκεται στο πατρικά κληρονομούμενο χρωμόσωμα. Το χρωμόσωμα μπορεί να περάσει στις επόμενες γενιές και ένας άνδρας μπορεί να μεταβιβάσει ένα χρωμόσωμα κληρονομημένο από τη μητέρα του και μία γυναίκα μπορεί να μεταδώσει ένα χρωμόσωμα πατρικής προέλευσης. Συνεπώς πρέπει να υπάρχει ένας μηχανισμός, η μεθυλίωση στην προκειμένη περίπτωση, ο οποίος διαγράφει το παλιό μοτίβο αποτύπωσης που υπάρχει στους γαμέτες πριν από την καθιέρωση μίας νέας φυλετικά ειδικής αποτύπωσης.



Τα μη μεταφραζόμενα RNA ή μη-κωδικοποιούμενα RNA (non-coding RNAs) ή επίσης μικρο-RNA (miRNA) είναι τμήματα RNA 19-24 νουκλεοτιδίων τα οποία υπάρχουν σε όλες τις αποτυπωμένες ομάδες και εκφράζονται από το γονικό χρωμόσωμα με την μη-μεθυλιωμένη περιοχή ελέγχου της αποτυπώσης-ICR και ανευρίσκονται στο 30% περίπου των αποτυπωμένων γονιδίων [57,58]. Φαίνεται ότι τα miRNA είναι λειτουργικά ιδιαίτερα στη ρύθμιση επιγενετικών διαδικασιών και ότι αναστέλλουν την μετάφραση των πρωτεϊνών ή προκαλούν αναδόμηση του mRNA [59]. Τα miRNA εμπλέκονται σε διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες όπως η κυτταρική διαφοροποίηση, ανάπτυξη, πολλαπλασιασμό και απόπτωση των κυττάρων και στον έλεγχο της έκφρασης διαφόρων ογκογονιδίων, μεταβολικών γονιδίων, στον έλεγχο της ανάπτυξης του ερειστικού συστήματος, του οφθαλμού και ορισμένων υποκυτταρικών δομών [48,59]. Τα miRNA φαίνεται να αντιπροσωπεύουν μία καινούρια τάξη ογκοκατασταλτικών γονιδίων ή ογκογονιδίων καθώς μπορούν να συνδεθούν και να εμποδίσουν την μετάφραση του mRNA ογκοκατασταλτικών γονιδίων και πρωτοογκογονιδίων οπότε με τη σειρά τους τα miRNA δρουν ως ογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά γονίδια αντίστοιχα όπως προκύπτει από μελέτες πάνω στην υπερμεθυλίωση των γονιδίων αυτών [18,48].

Η έκφραση τους ρυθμίζεται ανάλογα με την ανάπτυξη της αντίστοιχης κυτταρικής σειράς και παρουσιάζουν περιορισμένο μοτίβο έκφρασης στο αιμοποιητικό σύστημα και επίσης εμφανίζουν μοναδικά χαρακτηριστικά σημάδια της παθογένειας, της διάγνωσης και πρόγνωσης των μυελογενών και λεμφοβλαστικών λευχαιμιών. Το 2004 ο Chen και οι συνεργάτες του απέδειξαν ότι τρία miRNA εκφράζονταν μόνο στον αιμοποιητικό ιστό και εμπλέκονταν στην ανάπτυξη, ακριβή διαφοροποίηση των κυττάρων και λειτουργία του αιμοποιητικού ιστού. Απορύθμιση των miRNA έχει παρατηρηθεί σε λευχαιμίες και λεμφώματα και πειραματικά μοντέλα υποστηρίζουν το ρόλο των miRNA στην λευχαιμογένεση [60]. Το γονίδιο MEG3 το οποίο μελετήθηκε στην παρούσα διατριβή αντιπροσωπεύει ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο και δρα ως ένα miRNA [61].

Το 2008 οι Wangenheim και Peterson διατύπωσαν την άποψη ότι η γονιδιακή αποτύπωση δεν μπορεί από μόνη της να ελέγξει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό παρά μόνο μέσω αλληλεπίδρασης με την κυτταρική διαφοροποίηση συσχετίζοντας έτσι άμεσα τις δύο αυτές καταστάσεις [3].

4.2. Ο ρόλος της μεθυλίωσης του DNA στην γονιδιακή αποτύπωση

Η μεθυλίωση του DNA αποτελεί ένα σταθερό επιγενετικό μηχανισμό ο οποίος ρυθμίζει τη δομή της χρωματίνης και την έκφραση γονιδίων τα οποία εμπλέκονται σε διαδικασίες όπως η απενεργοποίηση του χρωμοσώματος X, η εμβρυογένεση, η γαμετογένεση, η αποσιώπηση-σίγαση επαναλαμβανόμενων τμημάτων DNA και η γονιδιακή αποτύπωση [21].

Οι αποτυπωμένες περιοχές των δύο γονικών χρωμοσωμάτων φέρουν διαφορετικά σημεία-σημάδια γνωστά ως επιγενετική τροποποίηση. Αυτές οι τροποποιήσεις συμπεριλαμβάνουν την μεθυλίωση του DNA στα CpG δινοκυκλεοτίδια, η οποία μεθυλίωση βοηθά στη διάκριση των δύο γονικών χρωμοσωμάτων από το μεταγραφικό μηχανισμό. Στα θηλαστικά και τα φυτά τα αποτυπωμένα γονίδια είναι διαφορετικά «σημαδεμένα» πριν τη γονιμοποίηση λόγω της μεθυλίωσης του DNA και των μεταβολών των ιστονών. Ως συνέπεια των κληρονομούμενων επιγενετικών σημάδιων των αποτυπωμένων γονιδίων, οι ρόλοι των πατρικών και μητρικών χρωμοσωμάτων δεν είναι ισοδύναμοι στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των κυττάρων [62]. Η μεθυλίωση που παρατηρείται στα αποτυπωμένα γονίδια χάνεται και επανεδραιώνεται σε κάθε γενιά καθ' όλη τη γαμετογένεση, δηλαδή κάθε ωάριο φέρει το μοτίβο μεθυλίωσης της μητέρας ενώ κάθε σπερματοζωάριο φέρει το πατρικό μοτίβο μεθυλίωσης αντίστοιχα και η εδραίωση της έκφρασης των αποτυπωμένων γονιδίων συνδυάζεται με την απομεθυλίωση κατά την εμβρυϊκή ζωή με την κατάλυση των μεθυλοτρανσφερασών [56].

Έχουν παρατηρηθεί περιοχές όπου η μεθυλίωση του DNA διαφέρει ανάμεσα στα δύο χρωμοσώματα και αυτές οι περιοχές ελέγχου της αποτύπωσης-ICR εμπλέκονται στον έλεγχο της έκφρασης των γονιδίων [63]. Ειδικότερα, η περιοχή ελέγχου της αποτύπωσης είναι μία μικρή, πλούσια σε νησίδες CpG αλληλουχία του DNA η οποία είναι μεθυλιωμένη μόνο στον ένα γαμέτη και εν συνεχεία διατηρεί αυτό το μεθυλιωμένο αποτύπωμα μόνο στο ένα γονικό αλληλόμορφο και μετά τη γονιμοποίηση όταν το έμβryo είναι διπλοειδές. Οι διαφορές που προκαλούνται από αυτές τις ειδοποιούς περιοχές, έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία αποτυπωμάτων στα βλαστικά κύτταρα τα οποία επιβάλλονται κατά τη γαμετογένεση, και φαίνεται να είναι υψίστης σημασίας για τη δημιουργία ειδικά των αλληλίων κληρονομούμενων χαρακτηριστικών αμέσως μετά την γονιμοποίηση. Φαίνεται ότι το γονιδίωμα του ωαρίου είναι λιγότερο μεθυλιωμένο από εκείνο του σπερματοζωαρίου και τα δύο αυτά μαζί είναι λιγότερο μεθυλιωμένα από το DNA των σωματικών κυττάρων. Αυτό εξηγεί το μοίρασμα των ρυθμιστικών στοιχείων που εμπλέκονται στον έλεγχο της γονιδιακής αποτύπωσης. Οι περιοχές ελέγχου της αποτύπωσης συνήθως φέρουν ένα αρχέγονο

μεθυλιωμένο γονιδιακό αποτύπωμα. Κάθε τουλάχιστον πέντε αποτυπωμένες περιοχές έχει ταυτοποιηθεί μία περιοχή ελέγχου της αποτύπωσης-ICR η οποία ρυθμίζει την δράση των αλληλίων κάθε αποτυπωμένου γονιδίου μέσα στις συναρθροίσεις. Δύο εκ των πέντε αποτυπωμένων περιοχών είναι μεθυλιωμένες στο πατρικό χρωμόσωμα και μη-μεθυλιωμένες στο μητρικό χρωμόσωμα και οι τρεις εκ των πέντε φέρουν μητρικά κληρονομούμενα μεθυλιωμένα σημεία. Διαφορετικές περιοχές ελέγχου της αποτύπωσης δεν μοιάζουν μεταξύ τους στην αλληλουχία των βάσεων αλλά έχουν κοινό γνώρισμα τα σχετικά υψηλά επίπεδα CpG δινουκλεοτιδίων και έχουν απλές επαναλήψεις αλληλουχιών που γειτνιάζουν.

Επί του παρόντος δεν γνωρίζουμε ευρέως τον μηχανισμό ελέγχου της γονιδιακής αποτύπωσης ο οποίος μηχανισμός μπορεί να διαφέρει ανάμεσα σε συγκεκριμένες περιοχές [64]. Φαίνεται όμως ότι η αποτύπωση ελέγχεται από την μεθυλίωση του DNA και τις μεταβολές-τροποποίηση των ιστονών. Η απώλεια της αποτύπωσης είναι η διακοπή των αποτυπωμένων γενετικών σημείων μέσω της προσθήκης ή αφαίρεσης της μεθυλίωσης, ή πιο απλά η απώλεια της γονιδιακής έκφρασης του φυσιολογικού αλληλόμορφου και έχει ως συνέπεια την ενεργοποίηση του φυσιολογικά σιωπηλού αλληλίου ενός γονιδίου υπεύθυνου για την ανάπτυξη των κυττάρων ή/και την αποσιώπηση ενός φυσιολογικά εκφραζόμενου αλληλίου ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου και την υψηλή έκφραση του προϊόντος αυτού δίνοντας έτσι στο κύτταρο πλεονέκτημα ανάπτυξης [15,25].

Πέραν της σίγασης των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, η ανώμαλη υπερμεθυλίωση επηρεάζει και την έκφραση των αποτυπωμένων γονιδίων με αποτέλεσμα την απώλεια της αποτύπωσης. Απώλεια της αποτύπωσης έχει περιγραφεί για τα γονίδια IGF2/H19, p73 και p57KIP2 στην περίπτωση του όγκου του Wilms, του ηπατοβλαστώματος, του λειομυοσαρκώματος της μήτρας, του καρκίνου του τραχήλου, του καρκίνου του νεφρού, του ραβδομυοσαρκώματος, του γλοιώματος, της οξείας λευχαιμίας, του λεμφώματος Burkitt και του καρκίνου του πνεύμονα [10]. Πολλαπλά γονίδια υποβάλλονται σε απώλεια της αποτύπωσης στον καρκίνο με αποτέλεσμα την έκφραση και των δύο αλληλόμορφων στα καρκινικά κύτταρα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ανώμαλη υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου H19 και κατά συνέπεια η μεταγραφική του σίγαση και την έκφραση του γονιδίου IGF2 από τα δύο αλληλόμορφα [27,63]. Η φυσιολογική αποτύπωση μέσω της μεθυλίωσης του DNA και των μεταβολών των ιστονών εξασφαλίζουν την μονογονική κληρονομούμενη έκφραση του ενός αλληλομόρφου και την καταστολή του άλλου. Η απώλεια της γονιδιακής αποτύπωσης εικονογραφεί την έννοια-ιδέα ότι κληρονομούμενες μεταβολές στην γονιδιακή έκφραση, απουσία μεταλλάξεων, μπορεί να οδηγήσουν σε

ανώμαλη επέκταση προγονικών μορφών κυττάρων, συνιστώντας κίνδυνο ότι μεταγενέστερα συμβάματα θα προάγουν πλήρη εξαλλαγή των κυττάρων και εξέλιξη σε καρκίνο [27].

5. Τα αποτυπωμένα γονίδια MEG3 και SNRPN

5.1. Το γονίδιο MEG3

Το 1998 ο K. Schuster-Gossler και η ομάδα του διαπίστωσαν ότι το γονίδιο MEG3, το οποίο βρίσκεται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 14q32 και στο χρωμόσωμα 12 των επίμων, κωδικοποιεί ένα μη μεταφραζόμενο RNA (miRNA). Το 2000 η J. Schmidt και οι συνεργάτες της ανακάλυψαν ότι το συγκεκριμένο γονίδιο είναι αποτυπωμένο, μητρικά εκφραζόμενο και στενά συνδεδεμένο-βρίσκονται σε απόσταση 90 kb μεταξύ τους-με το γονίδιο DLK1 [65,66].

Στο γονίδιο MEG3 έχουν αποδοθεί χαρακτηριστικά ογκοκατασταλτικού γονιδίου καθώς σε μελέτες βρέθηκε ότι έχει ανασταλτική δράση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και ότι μείωση της έκφρασής του παρατηρείται στα αδενώματα της ανθρώπινων αδενωμάτων της υπόφυσης και καθώς έχει τεκμηριωθεί η ενεργοποίηση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 μέσω του GDF15 από το γονίδιο MEG3 [61,67]. Στον άνθρωπο μελέτες της έκφρασής του ανέδειξαν μονοαλληλική έκφραση σε εμβρυικό καρδιακό, νεφρικό, ηπατικό, πνευμονικό ιστό και στον εγκέφαλο με αποκλειστική έκφραση από το μητρικό αλληλόμορφο και επίσης έχουν παρατηρηθεί διαταραχές της αποτύπωσης σε αμφότερες τις πατρικές και μητρικές δισωμίες του χρωμοσώματος 14q [68,69]. Μελέτη της αλληλουχίας του MEG3 έδειξε ότι ο υποκινητής του είναι πλούσιος σε CpG δινουκλεοτίδια εκ των οποίων υπάρχει σημαντικός αριθμός υπερμεθυλιωμένων CpG νησίδων με αποτέλεσμα την απώλεια της έκφρασης αυτού σε αδενώματα ανθρώπινης υπόφυσης σε σχέση με φυσιολογικό ιστό υπόφυσης [70].

5.2. Το γονίδιο SNRPN

Το γονίδιο SNRPN είναι ένα πατρικά εκφραζόμενο αποτυπωμένο γονίδιο το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 15q11-13, κωδικοποιεί την πρωτεΐνη SmN, και η περιοχή ICR του γονιδίου αποτελείται από 23 CpG δινουκλεοτίδια τα οποία είναι μεθυλιωμένα στο μητρικό χρωμόσωμα και μη-μεθυλιωμένα στο πατρικό χρωμόσωμα [71,72].

Οι διαταραχές της μεθυλίωσης της περιοχής ελέγχου της αποτύπωσης είναι υπεύθυνες για τα σύνδρομα Prader-Willi και Angelman [73-75]. Το μοτίβο της έκφρασης του γονιδίου ελέγχεται μερικώς από τη μεθυλίωση του μητρικού χρωμοσώματος στην περιοχή 5'UTR στο εξώνιο 1 [76]. Ο Korshunov και οι συνεργάτες του μελέτησαν τις διαταραχές της μεθυλίωσης και την έκφραση του γονιδίου SNRPN και απέδωσαν σε αυτό ογκοκατασταλτικές ικανότητες [76].

ΣΚΟΠΟΣ

Βάσει των ανωτέρω αναφερομένων μελετών όσον αφορά την ογκοκατασταλτική δράση των γονιδίων MEG3 και SNRPN και δεδομένης της συμμετοχής της μεθυλίωσης στην σίγαση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων και συνεπώς στην παθογένεια του καρκίνου γενικά, ο σκοπός της παρούσης διατριβής ήταν:

1. Να μελετηθεί το μοτίβο της μεθυλίωσης των υποκινητών των αποτυπομένων γονιδίων MEG3 και SNRPN σε ασθενείς με ΟΜΛ, ΜΔΣ και πολλαπλό μύελωμα (ΠΜ).
2. Να συσχετισθούν οι τυχόν διαταραχές της μεθυλίωσης με την συνολική επιβίωση των ασθενών, το στάδιο της νόσου, τους υπότυπους της νόσου, τις διάφορες χρωμοσωμιακές ανωμαλίες και τις αιματολογικές παραμέτρους.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

6. ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Η μελέτη της μεθυλίωσης των γονιδίων MEG3 και SNRPN πραγματοποιήθηκε σε γονιδιωματικό DNA το οποίο απομονώθηκε από μονοπύρρηνα κύτταρα τα οποία ελήφθησαν με αναρρόφηση μυελού των οστών ασθενών οι οποίοι δεν είχαν λάβει πρότινος ουδεμία θεραπεία για τη νόσο τους.

Μελετήθηκαν 85 ασθενείς με μυελοειδείς κακοήθειες (ήτοι 42 ασθενείς με ΟΜΛ και 43 ασθενείς με ΜΔΣ) καθώς και 21 ασθενείς με ΠΜ οι οποίοι διαγνώστηκαν και αντιμετωπίστηκαν στην Αιματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Από τους ασθενείς με μυελοειδείς κακοήθειες οι 57 (67,1%) ήταν άνδρες και οι 28 (32,9%) ήταν γυναίκες με συνολική μέση ηλικία $71,8 \pm 13,3$ έτη (εύρος 16-92 έτη). Από τους 21 ασθενείς με ΠΜ οι 11 (52,4%) ήταν άνδρες ενώ οι 10 (47,6%) ήταν γυναίκες και η συνολική μέση ηλικία ήταν 66,5 έτη (εύρος 48-85 έτη). Η διάγνωση της νόσου του ΠΜ έγινε βάσει προκαθορισμένων κριτηρίων τα οποία διατυπώθηκαν από την Διεθνή Ομάδα Εργασίας του Πολλαπλού Μυελώματος (πίνακας 1)[77].

Ασυμπτωματικό Μυέλωμα	Συμπτωματικό Μυέλωμα
Παραπρωτεΐνη ορού >30 g/l	Παραπρωτεΐνη ορού ή/και ούρων (ανεξαρτήτου επιπέδων)
Κλωνικά πλασματοκύτταρα στο μυελό των οστών >10%	Κλωνικά πλασματοκύτταρα στο μυελό των οστών ή πλασματοκύττωμα
Μη σχετιζόμενα με τη νόσο συμπτώματα, ιστική βλάβη ή οργανική ανεπάρκεια	Σχετιζόμενη με τη νόσο ιστική βλάβη ή οργανική ανεπάρκεια

Πίνακας 1: Διαγνωστικά κριτήρια ασυμπτωματικού ΠΜ και συμπτωματικού ΠΜ σύμφωνα με το International Myeloma Working Group 2003

Οι ασθενείς με ΠΜ αξιολογήθηκαν και σταδιοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας 3 διαφορετικά προγνωστικά συστήματα, ήτοι το σύστημα κατά Durie-Salmon, το διεθνές προγνωστικό σύστημα ISS και το σύστημα της νοτιοδυτικής ομάδας ογκολογίας (Southwest Oncology Group -SWOG) (πίνακας 2).

Κριτήρια

Στάδιο I (μικρή μάζα πλασματοκυττάρων)

Απαραίτητα όλα τα ακόλουθα

- Αιμοσφαιρίνη >10 g/l
- Ca^{++} ορού φυσιολογικό ή ≤ 12 mg/dl
- Σε ακτινολογικό έλεγχο μη ύπαρξη οστεολύσεων ή μονήρες πλασματοκύττωμα μονάχα
- Χαμηλή συγκέντρωση παραπρωτεΐνης
(IgG<5 g/dl, IgA<3 g/dl, ελαφρές άλυσες στα ούρα <4 g/24h)

Στάδιο II (ενδιάμεση μάζα πλασματοκυττάρων)

Μη ταξινόμηση σε στάδιο I ή στάδιο III

Στάδιο III (υψηλή μάζα πλασματοκυττάρων)

Ένα ή περισσότερα από τα ακόλουθα

- Αιμοσφαιρίνη <8,5 g/l
- Ca^{++} ορού φυσιολογικό ή > 12 mg/dl
- Βαριά οστική νόσος
- Υψηλή συγκέντρωση παραπρωτεΐνης
- (IgG<7 g/dl, IgA<5 g/dl, ελαφρές άλυσες στα ούρα <12 g/24h)

Υποκατηγορίες

A: Σχετικά φυσιολογική νεφρική λειτουργία (κρεατινίνη ορού <2 mg/dl)

B: Έκπτωση νεφρικής λειτουργίας (κρεατινίνη ορού ≥ 2 mg/dl)

Πίνακας 2α: Σταδιοποίηση των ασθενών με ΠΜ κατά Durie-Salmon

Παράμετροι

Στάδιο

I	$\beta_2M < 3,5 \text{ mg/dl}$ και αλβουμίνη ορού $\geq 3,5 \text{ g/dl}$
II	$\beta_2M < 3,5 \text{ mg/dl}$ και αλβουμίνη ορού $< 3,5 \text{ g/dl}$ ή β_2M $3,5-5 \text{ mg/dl}$
III	$\beta_2M > 5,5 \text{ mg/dl}$

Πίνακας 2β: Κριτήρια ορισμού των σταδίων του Διεθνούς Συστήματος Σταδιοποίησης (International Staging System-ISS)

*Στάδιο**Παράμετροι*

I	$\beta_2M < 2,5 \text{ mg/dl}$
II	$\beta_2M \geq 2,5 \text{ mg/dl}$ ή $\beta_2M < 5,5 \text{ mg/dl}$
III	$\beta_2M \geq 5,5 \text{ mg/dl}$ και αλβουμίνη ορού $\geq 3,0 \text{ g/dl}$
IV	$\beta_2M \geq 5,5 \text{ mg/dl}$ και αλβουμίνη ορού $< 3,0 \text{ g/dl}$

Πίνακας 2γ: Κριτήρια ορισμού των σταδίων κατά το σύστημα σταδιοποίησης SWOG

Οι ασθενείς με ΟΜΛ και ΜΔΣ ταξινομήθηκαν σύμφωνα με την ταξινόμηση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας-ΠΟΥ (πίνακας 3) [78] και επιπλέον οι ασθενείς με ΜΔΣ επανεξετάστηκαν ώστε να πληρούν τα πλέον πρόσφατα διαγνωστικά κριτήρια όπως αυτά διατυπώθηκαν στην συνάντηση της Διεθνούς Ομάδας ΜΔΣ το 2007 (πίνακας 4) [79].

Νόσος	Υπότυποι
ΜΔΣ	<ul style="list-style-type: none"> • Ανθεκτική Αναιμία (RA) • Ανθεκτική Αναιμία με Δακτυλιοειδείς Ερυθροβλάστες (RARS) • Ανθεκτική Κυτταροπενία με Δυσπλασία Πολλών Σειρών (RCMD) • Ανθεκτική Κυτταροπενία με Δυσπλασία Πολλών Σειρών και Δακτυλιοειδείς Ερυθροβλάστες (RCMD-RS) • Ανθεκτική Αναιμία με Περίσσεια Βλαστών I (RAEB-I) • Ανθεκτική Αναιμία με Περίσσεια Βλαστών II (RAEB-II) • Αταξινόμητο ΜΔΣ (MDS-U) • ΜΔΣ σχετιζόμενο με έλλειψη del(5q)
ΟΜΛ	<p data-bbox="400 775 975 808"><i>ΟΜΛ με συνυπάρχουσες γενετικές ανωμαλίες</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • t(8;21)(q22;q22), (AML1/ETO) • inv(16)(p13 ;q22) ή t(16;16)(CBFβ/MYH11) • t(15;17)(q22;q12)(PML/RARα) • 11q23(MLL) ανωμαλίες <p data-bbox="400 1039 863 1072"><i>ΟΜΛ με Δυσπλασία Πολλών Σειρών</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Απότοκος ΜΔΣ ή ΜΔΣ/MYN • Χωρίς προηγούμενο ΜΔΣ αλλά με δυσπλασία σε τουλάχιστον 50% των κυττάρων 2 ή περισσότερων σειρών <p data-bbox="400 1267 919 1301"><i>ΟΜΛ και ΜΔΣ σχετιζόμενα με Θεραπεία</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Αλκυλιούντες παράγοντες/Ακτινοθεραπεία • Αναστολείς Τοποϊσομεράσης II • Άλλα <p data-bbox="400 1496 730 1529"><i>ΟΜΛ αλλιώς αταξινόμητο</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Χωρίς Διαφοροποίηση • Χωρίς Ωρίμανση • Με Ωρίμανση • Οξεία Μυελομονοκυτταρική Λευχαιμία • Οξεία Μονοβλαστική/Μονοκυτταρική Λευχαιμία • Οξεία Ευθρολευχαιμία • Οξεία Μεγακαρυοβλαστική Λευχαιμία • Οξεία Βασεόφιλη Λευχαιμία • Οξεία Πανμύελωση με Μυελοϊνώση • Μυελοειδές Σάρκωμα

Πίνακας 3: Η ταξινόμηση των μυελοειδών Κακοηθειών κατά τη ταξινόμηση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας-ΠΟΥ

Απαραίτητα Κριτήρια	<ul style="list-style-type: none"> • Κυτταροπενία σταθερά (>6 μήνες) σε 1 ή περισσότερες σειρές ήτοι Hb<11 g/dl, ANC<1.500/μl, PLT<100.000/μl • Αποκλεισμός λοιπών αιματολογικών και μη-αιματολογικών καταστάσεων ως αίτια κυτταροπενίας/δυσπλασίας
ΜΔΣ σχετιζόμενα Κριτήρια	<ul style="list-style-type: none"> • Δυσπλασία τουλάχιστον σε 10% όλων των κυττάρων σε μία από τις σειρές στην εξέταση μυελού των οστών: ερυθρά, κοκκιώδη ή μεγακαρυοκυτταρική ή >15% δακτυλιοειδείς ερυθροβλάστες • 5-19% βλάστες στον μυελό των οστών • Τυπικές κυτταρογενετικές Ανωμαλίες (συμβατικές μέθοδοι ή FISH)
Συν-κριτήρια	<ul style="list-style-type: none"> • Παθολογικός μονοκλωνικός κυτταρικός πληθυσμός ανιχνεύσιμος με κυτταρομετρία ροής • Μεταλλάξεις χαρακτηριστικών γονιδίων • Σταθερά μειωμένη παραγωγή αποικιών μυελού των οστών (CFU assay)

Πίνακας 4: Διαγνωστικά κριτήρια ΜΔΣ. Η διάγνωση απαιτεί και τα 2 απαραίτητα κριτήρια και τουλάχιστον 1 με ΜΔΣ σχετιζόμενο κριτήριο. Τα συν-κριτήρια δεν θεωρούνται βασικά καθώς δεν πραγματοποιούνται σε όλα τα Κέντρα

Μεταβλητή	0	1	2	3
ΠΟΥ υπότυπος	RA, del(5q)	RARS, RCMD,RCMD-RS	RAEB-I	RAEB-II
Καρυότυπος	Ευνοϊκός	Ενδιάμεσος	Δυσμενής	-
Μεταγίσεις ερυθρών αιμοσφαιρίων	Όχι	Τακτικές	-	-

Πίνακας 5: Προγνωστικό σύστημα WPSS βασισμένο στην ταξινόμηση κατά ΠΟΥ για τα ΜΔΣ. Άθροισμα 0: Πολύ χαμηλού κινδύνου, Άθροισμα 1: Χαμηλού κινδύνου, Άθροισμα 2: Ενδιάμεσου κινδύνου, Άθροισμα 3-4: Υψηλού κινδύνου, Άθροισμα 5-6: Πολύ υψηλού κινδύνου

Επίσης οι ασθενείς με ΜΔΣ κατανεμήθηκαν ως προς τον βαθμό επικινδυνότητας και πρόγνωσης σύμφωνα με το προγνωστικό σύστημα του ΠΟΥ (πίνακας 5) [80]. Κυτταρογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με συμβατικές τεχνικές (ζωνοποίηση G) σε 30 ασθενείς με ΟΜΛ, 43 ασθενείς με ΜΔΣ και σε 14 ασθενείς με ΠΜ. Οι ασθενείς με ΜΔΣ και ΟΜΛ ταξινομήθηκαν περαιτέρω ανάλογα με τα αποτελέσματα της κυτταρογενετικής ανάλυσης σε χαμηλού, μέσου και υψηλού κινδύνου καρύτυπο σύμφωνα με το WPSS και SWOG/ECOG συστήματα αντίστοιχα [80,81] (πίνακας 6). Οι ασθενείς με ΜΔΣ και ΟΜΛ επίσης εκτιμήθηκαν και σε σχέση με τις αιματολογικές τους παραμέτρους ως έχοντες αναιμία (επίπεδα αιμοσφαιρίνης <100 gr/l), λευκοπενία ή λευκοκυττάρωση (συνολικός αριθμός λευκοκυττάρων $<1.5 \times 10^9/l$ ή $>30 \times 10^9/l$ αντίστοιχα) και θρομβοπενία (αριθμός αιμοπεταλίων $<100 \times 10^9/l$).

Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν 12 άτομα (7 άνδρες-5 γυναίκες) με μέση ηλικία τα 64,8 έτη, τα οποία προσήλθαν στο Αιματολογικό Εξωτερικό Ιατρείο για διερεύνηση κυτταροπενίας και υποβλήθηκαν σε αναρρόφηση μυελού των οστών και αφού αποκλείστηκε η ύπαρξη αιματολογικής κακοήθειας, η διήθηση του μυελού των οστών από συμπαγές νεόπλασμα, η συγγενής μονογονική δισωμία 14 και τα σύνδρομα Angelman και Prader-Willi.

Η αναρρόφηση μυελού των οστών, η λήψη των δειγμάτων του μυελού και η διενέργεια των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε έπειτα από την συγκατάθεση των ασθενών και των μαρτύρων και την έγκριση της Επιστημονικής Επιτροπής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Η κυτταρογενετική ανάλυση των δειγμάτων μυελού των οστών πραγματοποιήθηκε στο Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος», Τμήμα Κυτταρογενετικής και Βιοδοσιμετρίας, υπό του Διευθυντού Γ. Παντελιά.

	SWOG/ECOG	WPSS
Ευνοϊκός	<ul style="list-style-type: none"> • t(8;21) χωρίς del(9q) ή σύμπλοκο καρυότυπο • inv(16)(p13;q22) ή t(16;16) ή del(16q) • t(15;17) 	<ul style="list-style-type: none"> • Φυσιολογικός καρυότυπος • -Y • del(5q) • del(20q)
Ενδιάμεσος	<ul style="list-style-type: none"> • Φυσιολογικός καρυότυπος • -Y • +6 • +8 • del(12p) 	Λοιπές διαταραχές
Δυσμενής	<ul style="list-style-type: none"> • διαταραχές (3q) • διαταραχές (9q) • διαταραχές (11q) • διαταραχές (17p) • διαταραχές (20q) • διαταραχές (21q) • ≥ 3 ανωμαλίες • -5/del(5q) • t(6;9) • -7/del(7q) • t(9;22) 	<ul style="list-style-type: none"> • Διαταραχές 7 • ≥ 3 ανωμαλίες

Πίνακας 6: Συστήματα SWOG/ECOG και WPSS κυτταρογενετικής ταξινόμησης και πρόγνωσης για τους ασθενείς με ΟΜΛ και ΜΔΣ αντίστοιχα

7. ΜΕΘΟΔΟΙ

Η μελέτη της μεθυλίωσης των γονιδίων MEG3 και SNRPN πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, υπό την εποπτεία της Επίκουρου Καθηγήτριας Μαρίας Σύρρου και στο Ερευνητικό Αιματολογικό Εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων με εποπτεύοντα τον Καθηγητή Αιματολογίας-Παθολογίας Κωνσταντίνο Μπουραντά.

7.1. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA

Για την απομόνωση γονιδιωματικού DNA, το οποίο είχε συλλεχθεί σε φιαλίδια που περιείχαν αντιπηκτικό EDTA, από των μυελό των οστών χρησιμοποιήθηκε το QIAmp® DNA Mini Kit (Qiagen, Bioanalytica, Athens, Greece) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αναλυτικότερα, 20 μl πρωτεάσης Qiagen τοποθετήθηκαν πρωτίστως σε ένα μικροφιαλίδιο όγκου 1,5 ml και μετά προστέθηκαν 200 μl δείγματος μυελού των οστών. Στη συνέχεια προστέθηκαν 200 μl λυτικού διαλύματος Buffer AL, το μείγμα αναδεύτηκε για 15 sec και εν συνεχεία επώαστηκε στους 56° C για 10 λεπτά. Μετά από προσθήκη 200 μl αιθανόλης (96-100%) και νέα ανάδευση 15 sec το δείγμα τοποθετήθηκε σε σωλήνα μικροφυγοκέντρωσης και φυγοκεντρήθηκε στις 8.000 rpm για 1 λεπτό. Κατόπιν τούτου ακολούθησε προσθήκη 500 μl διαλύματος Buffer AW1, νέα φυγοκέντρωση στις 8.000 rpm για 1 λεπτό, προσθήκη 500 μl διαλύματος Buffer AW2 και φυγοκέντρωση στις 13.000 rpm για 3 λεπτά. Έπειτα το κάθε σωληνάριο με δείγμα τοποθετούταν εκ νέου σε άλλο σωληνάριο και μετά από προσθήκη 200μl διαλύματος Buffer AE γινόταν μια νέα φυγοκέντρωση στις 8.000 rpm για 1 λεπτό οπότε και στο υποκείμενο διάλυμα εκλούονταν το γονιδιωματικό DNA.

7.2. Χημική κατεργασία με διθειώδες νάτριο-NaHSO₃ (bisulphite modification)

Με αυτή τη μέθοδο επιδρούμε στις κυτοσίνες αποδιαταγμένου DNA χρησιμοποιώντας NaHSO₃ το ποίο επιτρέπει, έπειτα από απαμινώσεις και σουλφολυνώσεις, την μετατροπή των μη-μεθυλιωμένων κυτοσινών σε ουρακίλες. Αντιθέτως, οι 5-μεθυλκυτοσίνες παραμένουν ως έχουν. Το κατεργασμένο αυτό DNA πολλαπλασιάζεται με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ειδική της μεθυλίωσης (MSP) με τη χρήση 2 ζευγών εκκινητών, ένα ζεύγος

ειδικά σχεδιασμένο για την μεθυλιωμένη αλληλουχία και ένα ζεύγος πάλι ειδικά σχεδιασμένο για τη μη-μεθυλιωμένη αλληλουχία. Για τη χημική αυτή κατεργασία χρησιμοποιήσαμε το EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, CA, USA) βάσει του πρωτοκόλλου του κατασκευαστή. Προσθέτουμε 5 μl M-Dilution Buffer σε 10 μl DNA και συμπληρώνουμε με αποστειρωμένο H₂O μέχρι συνολικού όγκου 50 μl. Μετά από ανάδευση τα δείγματα επωάζονται στους 37°C για 15 λεπτά. Έπειτα προσθέτουμε 100 μl διαλύματος CT Conversion Reagent σε κάθε δείγμα και μετά από ανάδευση τα δείγματα επωάζονται στους 50° C στο σκοτάδι για 12-16 ώρες σε υδατόλουτρο. Ακολουθεί επώαση στους 0-4° C για 10 λεπτά και μετά προσθέτουμε 400 μl M-Binding Buffer και αναδεύουμε. Μεταφέρουμε το δείγμα σε Zymo-Spin IC Column τα οποία εναποθέτουμε εντός μικροφυγοκεντρικών σωληναρίων των 2 ml. Φυγοκεντρούμε στις 10.000 x g για 30 δευτερόλεπτα και αφού προσθέσουμε 100 μl M-Wash Buffer φυγοκεντρούμε ξανά στις ίδιες συνθήκες. Προσθέτουμε 200 μl M-Desulphonation Buffer στη στήλη, αφήνουμε για 15-20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν επαναφυγοκεντρούμε σε μέγιστη ταχύτητα για 30 δευτερόλεπτα. Έπειτα προσθέτουμε 200 μl M-Wash Buffer και φυγοκεντρούμε σε μέγιστη ταχύτητα για 30 δευτερόλεπτα και επαναλαμβάνουμε. Στο τελευταίο βήμα προσθέτουμε 100 μl ddH₂O και φυγοκεντρούμε. Το τελικό δείγμα (δηλαδή το τροποποιημένο DNA) φυλάσσεται στους -20° C. Στην παραπάνω διαδικασία υποβάλλονται το απομονωμένο γονιδιακό DNA και DNA ολικά μεθυλιωμένο (CpG GenomeTM, Universal Methylated, Chemicon International).

7.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ειδική της μεθυλίωσης (Methylation specific polymerase chain reaction-MSP)

Ο Herman και οι συνεργάτες του το 1996 [82] δημοσίευσαν μία νέα ευαίσθητη μέθοδο για την μελέτη της μεθυλίωσης, την οποία ονόμασαν αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ειδική της μεθυλίωσης-MSP, των CpG νουκλεοτιδίων με πλεονεκτήματα έναντι των άλλων μεθόδων, την ανίχνευση μικρού αριθμού μεθυλιωμένων αλληλίων από σχετικά μικρά δείγματα DNA. Επιπλέον, με τη μέθοδο MSP είναι δυνατή η μελέτη DNA από κύβους παραφίνης, η οποία ήταν αδύνατη με ανάλυση Southern. Επιτρέπει επίσης την εξέταση όλων των CpG περιοχών και όχι μόνο αυτών που αναγνωρίζονται από τα περιοριστικά ένζυμα και επειδή γίνεται ταυτόχρονη ανίχνευση των μεθυλιωμένων και μη-μεθυλιωμένων προϊόντων σε

ένα μοναδικό δείγμα επιβεβαιώνεται η ακεραιότητα του DNA ως «καλούπι-μήτρα» για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και επιτρέπει την ημιποσοτική εκτίμηση των αλληλόμορφων η οποία είναι παρόμοια με την ποσοτική εκτίμηση της Southern ανάλυσης.

Η μελέτη της μεθυλίωσης των δύο γονιδίων έγινε με τη μέθοδο MSP. Χρησιμοποιήθηκε το HotStar Taq Master Mix kit της Qiagen. Όλες οι αντιδράσεις MSP πραγματοποιήθηκαν σε συνολικό όγκο 25 μ l που περιείχε: HotStar Taq Master Mix (τελική συγκέντρωση 1x PCR buffer, 2.5 μονάδες HotStar Taq DNA polymerase, 200 μ M dNTP and 1.5 mM $MgCl_2$), 0.4 μ M εκκινητών και τροποποιημένο με $NaHSO_3$ DNA (~30 ngr). Το DNA του γονιδίου MEG3 ενισχύθηκε σε μηχανήμα DNA Engine Peltier thermal cycler (BIO-RAD) στους 95°C για 15 λεπτά ακολούθως από 5 κύκλους στους 94°C για 30 sec, στους 70°C για 30 sec και στους 72°C για 30 sec; 5 κύκλους στους 94°C για 30 sec, στους 65°C για 30 sec και στους 72°C για 30 sec; 30 κύκλους σε 94°C για 30 sec, στους 60°C για 30 sec και σε 72°C για 30 sec. Η τελική επιμήκυνση πραγματοποιήθηκε στους 72°C για 7 λεπτά. Το DNA του γονιδίου SNRPN ενισχύθηκε, πάντα στο ίδιο μηχανήμα, αρχικώς στους 95°C για 15 λεπτά και έπειτα από 35 κύκλους στους 94°C για 30 sec, σε 62°C για 30 sec και 72°C για 30 sec. Η τελική επιμήκυνση πραγματοποιήθηκε στους 72°C για 5 λεπτά. Το προϊόν της MSP, αφού ηλεκτοφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 2,5% σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης Fisherbrand, έγινε χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο και φωτογραφήθηκε σε υπεριώδες φως και αναλύθηκε. Προϊόν MSP μεγέθους 160 bp αντιπροσωπεύει το μεθυλιωμένο πατρικό αλληλόμορφο και προϊόν μεγέθους 120 bp αντιπροσωπεύει το μητρικό μη-μεθυλιωμένο αλληλόμορφο του γονιδίου MEG3, ενώ προϊόν μεγέθους 174 bp αντιστοιχεί στο μεθυλιωμένο μητρικό αλληλόμορφο και προϊόν μεγέθους 100 bp αντιστοιχεί στο μη-μεθυλιωμένο πατρικό αλληλόμορφο του γονιδίου SNRPN. Οι αλληλουχίες των εκκινητών και το μέγεθος των προϊόντων της MSP για το κάθε γονίδιο περιγράφονται στον πίνακα 7.

Για όλα τα πειράματα, τα οποία πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν χρησιμοποιήθηκε δείγμα απομονωμένου DNA από ασθενείς, δείγμα χωρίς DNA και ολικά μεθυλιωμένο ανθρώπινο DNA (CpG GenomeTM Universal Methylated, Chemicon International), διαθέσιμο στο εμπόριο, ως θετικός μάρτυρας.

Πίνακας 7: Αλληλουχίες των εκκινητών και το μέγεθος των προϊόντων της MSP για το κάθε γονίδιο

Γονίδιο	Εκκινητές (Primers)	Αλληλουχία (5'-3')	Μέγεθος προϊόντος MSP (bp)
MEG3	Μεθυλιωμένο ζεύγος	M-for: 5'GTTAGTAATCGGGTTTGTCCGGC	160
		M-rev: 5'AATCATAACTCCGAACACCCGCG	
	Μη-μεθυλιωμένο ζεύγος	Un-for: 5'GAGGATGGTTAGTTATTGGGGT	120
		Un-rev: 5'CCACCATAACCAACACCCTATAATCACA	
SNRPN	Μεθυλιωμένο ζεύγος	M-for: 5'TAAATAAGTACGTTTGC GCGGTC	174
		M-rev: 5'AACCTTACCCGCTCCATCGCG	
	Μη-μεθυλιωμένο ζεύγος	Un-for: 5'GTAGGTTGGTGTGTATGTTTAGGT	100
		Un-rev: 5'ACATCAAACATCTCCAACAACCA	

7.4. Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης 2,5%

Αγαρόζη 2,5 g διαλύεται σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης 100 ml TBE 1X στους 100° C. Προστίθεται το βρωμιούχο αιθίδιο και όλο το μείγμα που προκύπτει εκχέεται σε εκμαγείο όπου και στερεοποιείται. Στα προς ανάλυση δείγματα προστίθεται η χρωστική ουσία (Loading Buffer, Invintrogen), η οποία επιτρέπει την παρακολούθηση της ηλεκτροφόρησης και επιπλέον αυξάνει την πυκνότητα των δειγμάτων DNA ώστε να παραμένουν στις θέσεις υποδοχής τους στο πήκτωμα.

7.5. Στατιστική ανάλυση

Τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών αναλύθηκαν περιγραφικά ως διάμεσες τιμές, μέσες τιμές και ως ποσοστά. Οι καμπύλες επιβίωσης δημιουργήθηκαν με τη μέθοδο Kaplan-Meier και συγκρίθηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο long rank. Αναλύθηκαν ασθενείς οι οποίοι ήταν εν ζωή ή χάθηκαν από την παρακολούθηση την 1^η Δεκεμβρίου 2008. Ο σχετικός κίνδυνος θανάτου για όλους τους ασθενείς έγινε με τη χρήση της παλινδρόμησης Cox proportional hazard με μία μόνο μεταβλητή να παραμένει στο τελικό μοντέλο. Λόγω του σχετικά μικρού δείγματος ασθενών, χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση απλής

λογιστικής παλινδρόμησης (simple logistic regression analysis) με μοναδική προγνωστική μεταβλητή την κατάσταση μεθυσίας κάθε γονιδίου ως παράμετρο για να εκτιμηθεί η συσχέτιση με τις κλινικές παραμέτρους, τον καρύοτυπο, τον υπότυπο της νόσου κατά την ταξινόμηση WHO και WPSS. Τιμή $p < 0,05$ θεωρήθηκε στατιστικώς σημαντική. Η προαναφερθείσα στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος Stata, release 9.0 (Stata Corp., College Station, Texas, USA).

8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

8.1. Ασθενείς με Μυελοειδείς Κακοήθειες

8.1.1. Κλινικά και Εργαστηριακά Ευρήματα

Μελετήθηκαν 85 ασθενείς με μυελοειδείς κακοήθειες, 42 ασθενείς (49,4%) με ΟΜΛ και 43 ασθενείς (50,6%) με ΜΔΣ, εκ των οποίων οι 57 ασθενείς (67,1%) ήταν άνδρες και οι 28 ασθενείς (32,9%) ήταν γυναίκες με συνολική μέση ηλικία 71,8±13,3 έτη (διάμεση ηλικία 74 έτη, εύρος 16-92 έτη). Η διάμεση τιμή του αιματοκρίτη ήταν 29% (εύρος 11,2-40), της αιμοσφαιρίνης 8,99 gr/dl (εύρος 3,4-13,2 gr/dl), του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων ήταν 19.500/μl (εύρος 0,2-200.000/μl), ενώ των αιμοπεταλίων ήταν 107.000/μl (εύρος 1.000-650.000/μl). Κυτταρογενετικός έλεγχος ήταν δυνατός σε συνολικά 73 ασθενείς. Τριαντατέσσερις ασθενείς (46,6%) εμφάνιζαν καρυότυπο ευνοϊκής πρόγνωσης, 21 ασθενείς (28,8%) εμφάνιζαν καρυότυπο ενδιάμεσου κινδύνου, ενώ 18 ασθενείς (24,7%) είχαν καρυότυπο δυσμενούς πρόγνωσης, σύμφωνα με τα προαναφερθέντα συστήματα κατάταξης βάσει της κυτταρογενετικής ανάλυσης. Σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά ΠΟΥ, εκ των 42 ασθενών με ΟΜΛ, οι 14 ασθενείς (16,5%) ανήκαν στην ομάδα με ΟΜΛ απότοκο ΜΔΣ ή ΜΔΣ/MYN, 1 ασθενής (1,2%) χαρακτηριζόταν από t(8;21)(q22;q22),(AML/ETO1), 1 ασθενής (1,2%) ανήκε στην ομάδα ΟΜΛ χωρίς προϋπάρχον ΜΔΣ ή ΜΔΣ/MYN αλλά με δυσπλασία σε τουλάχιστον 50% των κυττάρων σε 2 ή περισσότερες κυτταρικές σειρές, 1 ασθενής (1,2%) εμφάνιζε ΟΜΛ μετά από θεραπεία με αλκυλιούντες παράγοντες ή ακτινοβολία, 4 ασθενείς (4,7%) είχαν αδιαφοροποίητη ΟΜΛ, 9 ασθενείς (10,6%) είχαν ΟΜΛ χωρίς ωρίμανση, 5 ασθενείς (5,9%) είχαν ΟΜΛ με ωρίμανση, 3 ασθενείς παρουσίαζαν οξεία μυελομονοκυτταρική λευχαιμία και 4 ασθενείς (4,7%) εμφάνιζαν οξεία μονοβλαστική/μονοκυτταρική λευχαιμία. Εκ των 43 ασθενών με ΜΔΣ, πάντα κατά την ταξινόμηση ΠΟΥ, 9 ασθενείς (10,6%) είχαν ανθεκτική αναιμία, 16 ασθενείς (18,8%) είχαν ανθεκτική κυτταροπενία με δυσπλασία πολλών σειρών, 7 ασθενείς (8,2%) είχαν ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών τύπου I, 6 ασθενείς (7,1%) είχαν ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών τύπου II, 2 ασθενείς (2,3%) χαρακτηριζόταν από έλλειψη του μακρού τμήματος του χρωμοσώματος 5 (del5q) και 3 ασθενείς (3,5%) είχαν ΜΔΣ αταξινόμητο. Σύμφωνα με το προαναφερθέν σύστημα WPSS 7 ασθενείς (17,5%) ανήκαν στην ομάδα πολύ χαμηλού κινδύνου, 10 ασθενείς (25%) ανήκαν στην ομάδα χαμηλού κινδύνου, 10 ασθενείς (25%) ανήκαν στην ενδιάμεση ομάδα κινδύνου, 9 ασθενείς (22,5%) ανήκαν στην υψηλή ομάδα κινδύνου και 4 ασθενείς (10%) ανήκαν στην πολύ υψηλή ομάδα κινδύνου (πίνακας 8).

Παράμετροι	Αριθμός (ποσοστό %)
Ασθενείς	85
Φύλο	
Ανδρες	57 (67,1%)
Γυναίκες	28 (32,9%)
Ηλικία (διάμεση-εύρος)	74 (16-92)
Αιματοκρίτης % (διάμεση-εύρος)	29 (11,2-40)
Αιμοσφαιρίνη (gr/dl) (διάμεση-εύρος)	8.99 (3,4-13,2)
Λευκά Αιμοσφαίρια /μl (διάμεση-εύρος)	19.500 (0,2-200.000)
Αιμοπετάλια /μL (διάμεση-εύρος)	107.000 (1.000-650.000)
Καρύοτυπος	73
Ευνοϊκός	34 (46,6)
Ενδιάμεσος	21 (28,8)
Δυσμενής	18 (24,7)
ΟΜΛ	42 (49,4%)
t(8;21)(q22;q22),(AML/ETO1)	1 (1,2%)
Απότοκος ΜΔΣ ή ΜΔΣ/MYN	14 (16,5%)
Χωρίς προϋπάρχον ΜΔΣ ή ΜΔΣ/MYN, αλλά με δυσπλασία σε τουλάχιστον 50% των κυττάρων σε 2 ή περισσότερες κυτταρικές σειρές	1 (1,2%)
Σχετιζόμενη με αλκυλιούντες παράγοντες/ακτινοβολία	1 (1,2%)
Αδιαφοροποίητη	4 (4,7%)
Χωρίς ωρίμανση	9 (10,6)
Με ωρίμανση	5 (5,9%)
Οξεία Μυελομονοκυτταρική	3 (3,5%)
Λευχαιμία	
Οξεία	4 (4,7%)

Μονοβλαστική/Μονοκυτταρική
Λευχαιμία

ΜΔΣ	43 (50,6%)
Ανθεκτική αναιμία-RA	9 (10,6%)
Ανθεκτική κυτταροπενία με δυσπλασία πολλών σειρών-RCMD	16 (18,8%)
Ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών τύπου I-RAEB I	7 (8,2%)
Ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών τύπου I-AEB II	6 (7,1%)
del5q	2 (2,3%)
ΜΔΣ αταξινόμητο-MDS U	3 (3,5%)
WPSS	40
Πολύ χαμηλού κινδύνου	7 (17,5%)
Χαμηλού κινδύνου	10 (25%)
Ενδιάμεσου κινδύνου	10 (25%)
Υψηλού κινδύνου	9 (22,5%)
Πολύ υψηλού κινδύνου	4 (10%)

Πίνακας 8: Κλινικές και Εργαστηριακές Παράμετροι των Ασθενών με ΟΜΛ και ΜΔΣ

8.1.2. Μελέτη της μεθυλίωσης του γονιδίου MEG3 σε ασθενείς με ΜΔΣ

Στο φυσιολογικό μοτίβο μεθυλίωσης του γονιδίου MEG3 παρατηρούνται 2 μπάντες, εκ των οποίων μία αντιστοιχεί στο μεθυλιωμένο πατρικό αλληλίο και έχει προϊόν 160 bp και μία αντιστοιχεί στο μη-μεθυλιωμένο μητρικό αλληλίο με προϊόν 160 bp. Στην περίπτωση της μη-φυσιολογικής μεθυλίωσης παρατηρείται η ύπαρξη μόνο του πατρικού αλληλίου ενώ δεν παρατηρείται το μητρικό αλληλίο (εικόνα 8).

Διαταραχή του προτύπου της μεθυλίωσης παρατηρήθηκε σε 35 εκ των συνολικά 85 ασθενών (41,2%) με μυελοειδείς κακοήθειες. Μη-φυσιολογική μεθυλίωση παρατηρήθηκε σε 15 ασθενείς (34,9%) με ΜΔΣ και ειδικότερα σε 1 ασθενή (6,7%) με ανθεκτική αναιμία, σε 7 ασθενείς (46,7%) με ανθεκτική κυτταροπενία με δυσπλασία πολλών σειρών, 5 ασθενείς (33,3%) με ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών τύπου I, 1 ασθενής (6,7%) με ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών τύπου II, σε 1 ασθενή (6,7%) με ΜΔΣ αταξινόμητο ενώ κανένας ασθενής που χαρακτηριζόταν από έλλειψη του μακρού τμήματος του χρωμοσώματος 5 (del5q) δεν είχε υπερμεθυλίωση του υποκινητή του υπό μελέτη γονιδίου. Δεκατρείς ασθενείς (86,7%) παρουσίαζαν καλής πρόγνωσης καρυότυπο, 1 ασθενής (6,7%) είχε καρυότυπο ενδιάμεσου κινδύνου και 1 ασθενής (6,7%) παρουσίαζε καρυότυπο υψηλού κινδύνου. Κανένας ασθενής της ομάδας πολύ χαμηλού κινδύνου και της ομάδας πολύ υψηλού κινδύνου δεν παρουσίαζαν μη-φυσιολογικό πρότυπο μεθυλίωσης, ενώ 4 ασθενείς (28,6%) της ομάδας χαμηλού κινδύνου, 6 ασθενείς (42,9%) ενδιάμεσου κινδύνου και 4 ασθενείς (28,6%) υψηλού κινδύνου εμφάνιζαν ανώμαλη μεθυλίωση, σύμφωνα με την κατάταξη του προγνωστικού συστήματος WPSS (πίνακας 9).

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στη συχνότητα ανώμαλης μεθυλίωσης και τους υπότυπους της νόσου κατά την ταξινόμηση ΠΟΥ, το προγνωστικό σύστημα WPSS, και τον καρυότυπο. Ωστόσο, οι ασθενείς με ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών τύπου I είχαν 20 φορές περισσότερες πιθανότητες να εμφανίσουν μη-φυσιολογικό πρότυπο μεθυλίωσης των CpG νησίδων του MEG3 γονιδίου (OR=20, p=0.027). Επίσης, δεν παρατηρήθηκε ουδεμία συσχέτιση μεταξύ της υπερμεθυλίωσης και των αιματολογικών παραμέτρων δηλαδή της αναιμίας, της λευκοκυττάρωσης ή της λευκοπενίας ή της θρομβοπενίας.

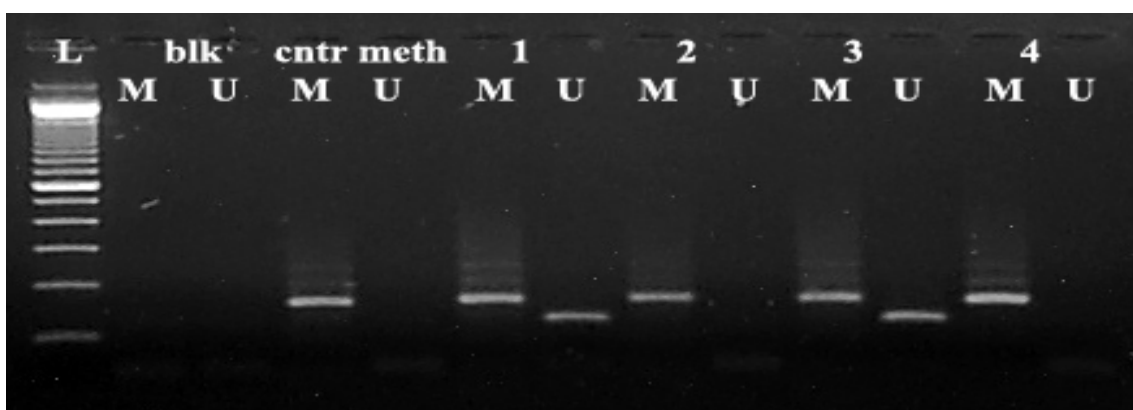
Πίνακας 9: Χαρακτηριστικά των ασθενών με ΜΔΣ οι οποίοι παρουσίαζαν μη-φυσιολογικό πρότυπο μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου MEG3

	Υπερμεθυλιωμένο MEG3 (%)
Ασθενείς Νο 43	15/43 (34,9%)
Φύλο	
Α	12/31 (38,7%)
Γ	3/12 (25%)
Καρυότυπος	
Ευνοϊκός	13/33 (39,4%)
Ενδιάμεσος	1/3 (33,3%)
Δυσμενής	1/7 (14,3%)
Υπότυποι κατά ΠΟΥ	
RA	1/9 (11,1%)
RCMD	7/16 (43,7%)
RAEB I	5/7 (71,4%)
RAEB II	1/6 (16,7%)
del5q	0/2 (0%)
MDS U	1/3 (33,3%)
WPSS	
Πολύ χαμηλού κινδύνου	0/7 (0%)
Χαμηλού κινδύνου	4/10 (40%)
Ενδιάμεσου κινδύνου	6/10 (60%)
Υψηλού κινδύνου	4/9 (44,4%)
Πολύ υψηλού κινδύνου	0/4 (0%)

8.1.3. Μελέτη της μεθυλίωσης του γονιδίου MEG3 σε ασθενείς με ΟΜΛ

Μη-φυσιολογικό μοτίβο της μεθυλίωσης του ICR του γονιδίου MEG3 ανιχνεύθηκε σε 20 ασθενείς (47,6%) με ΟΜΛ. Σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά ΠΟΥ, 1 ασθενής (5%) είχε

ΟΜΛ αδιαφοροποίητη, 5 ασθενείς (25%) είχαν ΟΜΛ χωρίς ωρίμανση, 2 ασθενείς (10%) είχαν ΟΜΛ με ωρίμανση, 7 ασθενείς (35%) εμφάνισαν ΟΜΛ ως απότοκο ΜΔΣ, 1 ασθενής (5%) χαρακτηριζόταν από την μετάθεση $t(8;21)(q22;q22)$ (AML/ETO1), 3 ασθενείς (15%) είχαν οξεία μυελομονοκυτταρική λευχαιμία και 1 ασθενής (5%) είχε οξεία μονοβλαστική λευχαιμία. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του κυτταρογενετικού ελέγχου 1 ασθενής (7,6%) εμφάνιζε ευνοϊκής πρόγνωσης καρυότυπο, 8 ασθενείς (61,6%) είχαν ενδιάμεσης πρόγνωσης καρυότυπο και 4 ασθενείς (30,8%) είχαν δυσμενούς πρόγνωσης καρυότυπο. Όπως και για την περίπτωση των ασθενών με ΜΔΣ, δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση με τους υποτύπους της νόσου κατά την κατάταξη ΠΟΥ, τον καρυότυπο και τις αιματολογικές παραμέτρους (πίνακας 10).



Εικόνα 8: Αποτέλεσμα της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης ειδική της μεθυλίωσης-MSP για την κατάσταση της μεθυλίωσης του γονιδίου MEG3 σε ασθενείς με Μυελοειδείς Κακοήθειες. Για κάθε δείγμα από χρησιμοποιήθηκε ένα ζεύγος εκκινητών τόσο για το μεθυλιωμένο (M) όσο και για το μη-μεθυλιωμένο (U) ζεύγος του ICR του γονιδίου υπό εξέταση. Το δείγμα blk αντιστοιχεί σε αρνητικό μάρτυρα ο οποίος δεν περιέχει DNA. Το δείγμα cntr meth αντιστοιχεί σε ολικά μεθυλιωμένο DNA το οποίο λειτουργεί ως θετικός μάρτυρας και είναι θετικό μόνο για το M όπως αναμένεται. Τα δείγματα 1 και 3 είναι θετικά τόσο για το M αλλήλιο όσο και για το U (φυσιολογικό πρότυπο μεθυλίωσης), ενώ τα δείγματα 2 και 4 ήταν θετικά μόνο για το M αλλήλιο (μη-φυσιολογικό πρότυπο μεθυλίωσης). Προϊόν MSP 160bp αντιστοιχεί στο μεθυλιωμένο πατρικό αλλήλιο, ενώ προϊόν MSP 120bp αντιστοιχεί στο μητρικό μη-μεθυλιωμένο αλλήλιο. (L=100bp ladder, Invitrogen).

Πίνακας 10: Χαρακτηριστικά των ασθενών με ΟΜΛ οι οποίοι παρουσίαζαν μη-φυσιολογικό πρότυπο μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου MEG3

	Υπερμεθυλιωμένο MEG3 (%)
Ασθενείς Νο 42	20/42 (47,6%)
Φύλο	
Α	13/26 (50%)
Γ	7/16 (43,7%)
Καρύοτυπος	
Ευνοϊκός	1/1 (100%)
Ενδιάμεσος	8/18 (44,4%)
Δυσμενής	4/11 (36,4%)
Υπότυποι κατά ΠΟΥ	
t(8;21)(q22;q22),(AML/ETO1)	1/1 (100%)
Απότοκος ΜΔΣ ή ΜΔΣ/MYN	7/14 (50%)
Χωρίς προϋπάρχον ΜΔΣ ή ΜΔΣ/MYN, αλλά με δυσπλασία σε τουλάχιστον 50% των κυττάρων σε 2 ή περισσότερες κυτταρικές σειρές	0/1 (0%)
Σχετιζόμενες με αλκυλιούντες παράγοντες/ακτινοβολία	0/1 (0%)
ΟΜΛ αδιαφοροποίητη	1/4 (25%)
ΟΜΛ χωρίς ωρίμανση	5/9 (55,5%)
ΟΜΛ με ωρίμανση	2/5 (40%)
Οξεία Μυελομονοκυτταρική Λευχαιμία	3/3 (100%)
Οξεία Μονοβλαστική/μονοκυτταρική Λευχαιμία	1/4 (25%)

8.1.4. Μελέτη της μεθυλίωσης του γονιδίου SNRPN σε ασθενείς με ΜΔΣ

Το φυσιολογικό μοτίβο μεθυλίωσης των CpG νησίδων του ICR του γονιδίου SNRPN χαρακτηρίζεται από 2 μπάντες, μία αντιστοιχεί στο μεθυλιωμένο μητρικό αλληλίο και παράγει προϊόν κατά την MSP μεγέθους 174 bp, ενώ η δεύτερη μπάντα με προϊόν MSP 100 bp αντιστοιχεί στο μη-μεθυλιωμένο πατρικό αλληλίο (εικόνα 9). Στην περίπτωση μη-φυσιολογικού μοτίβου της μεθυλίωσης του ICR του εν λόγω γονιδίου παρατηρείται μόνο το μεθυλιωμένο μητρικό γονίδιο ενώ το πατρικό μη-μεθυλιωμένο γονίδιο δεν παράγεται κατά την MSP.

Ανώμαλη μεθυλίωση παρατηρήθηκε σε 36 εκ των 85 συνολικά ασθενών (42,4%) με μυελοειδείς κακοήθειες που μελετήθηκαν. Δεκαπέντε ασθενείς (34,9%) με ΜΔΣ εμφάνιζαν μόνο το μητρικό αλληλίο ενώ οι υπόλοιποι 28 (65,1%) εμφάνιζαν τόσο το μητρικό όσο και το πατρικό αλληλίο. Τέσσερις ασθενείς (26,7%) έπασχαν από ανθεκτική αναιμία, 6 ασθενείς (40%) έπασχαν από ανθεκτική κυτταροπενία με δυσπλασία πολλών σειρών, 3 ασθενείς (20%) είχαν ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών τύπου I, 1 ασθενής (6,7%) είχε ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών τύπου II και 1 ασθενής (6,7%) είχε έλλειψη του μακρού τμήματος του χρωμοσώματος 5 (del5q). Δώδεκα ασθενείς (80%) χαρακτηρίζονταν από ευνοϊκό καρυότυπο, ενώ 2 ασθενείς (13,3%) και 1 ασθενής (6,7%) είχαν ενδιάμεσης και δυσμενούς πρόγνωσης καρυότυπο αντίστοιχα. Σύμφωνα με το προγνωστικό σύστημα WPSS 2 ασθενείς (13,3%) της ομάδας πολύ χαμηλού κινδύνου, 4 ασθενείς (26,7%) της χαμηλής ομάδας κινδύνου, 5 ασθενείς (33,4%) της ενδιάμεσης ομάδας και 4 ασθενείς (26,7%) της ομάδας πολύ υψηλού κινδύνου παρουσίαζαν ανώμαλη μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου SNRPN (πίνακας 11).

Δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της κατάστασης της μεθυλίωσης και των υποτύπων κατά ΠΟΥ της νόσου, των αποτελεσμάτων της κυτταρογενετικής ανάλυσης, των αιματολογικών παραμέτρων και του προγνωστικού συστήματος κατά WPSS.

Είναι ενδιαφέρον ότι 8 ασθενείς (18,6%) παρουσίαζαν μη-φυσιολογική CpG μεθυλίωση και των δύο γονιδίων, ήτοι του SNRPN και του MEG3.

Πίνακας 11: Χαρακτηριστικά των ασθενών με ΜΔΣ οι οποίοι παρουσίαζαν μη-φυσιολογικό πρότυπο μεθυσίας του υποκινητή του γονιδίου SNRPN

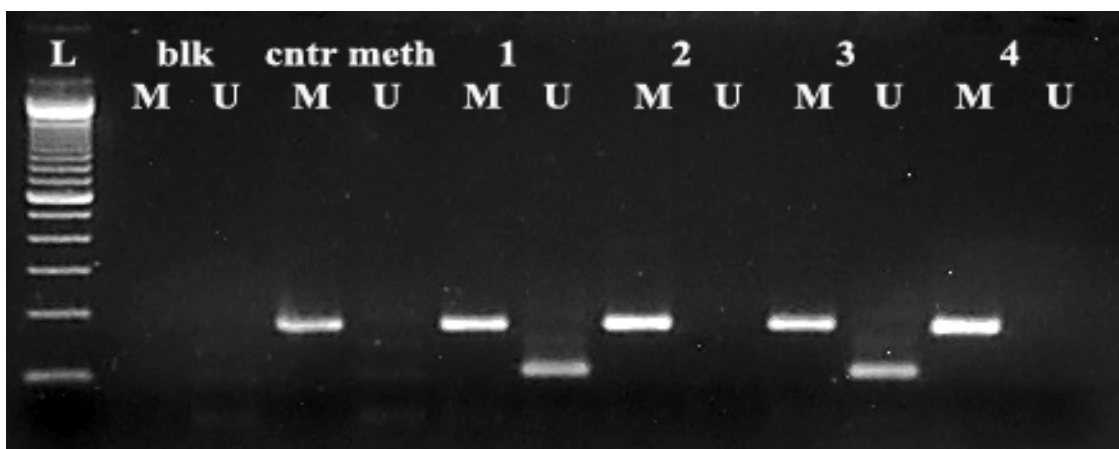
	Υπερμεθυλιωμένο SNRPN (%)
Ασθενείς Νο 43	15/43 (34,9%)
Φύλο	
Α	10/31 (32,2%)
Γ	5/12 (41,7%)
Καρυότυπος	
Ευνοϊκός	12/33 (36,7%)
Ενδιάμεσος	2/3 (66,7%)
Δυσμενής	1/7 (14,3%)
Υπότυπος κατά ΠΟΥ	
RA	4/9 (44,4%)
RCMD	6/16 (37,5%)
RAEB I	3/7 (42,8%)
RAEB II	1/6 (16,7%)
del5q	1/2 (50%)
MDS U	0/3 (0%)
WPSS	
Πολύ χαμηλού κινδύνου	2/7 (28,6%)
Χαμηλού κινδύνου	4/10 (40%)
Ενδιάμεσου κινδύνου	5/10 (50%)
Υψηλού κινδύνου	4/9 (44,4%)
Πολύ υψηλού κινδύνου	0/4 (0%)

8.1.5. Μελέτη της μεθυλίωσης του γονιδίου SNRPN σε ασθενείς με OMA

Εικοσιένιας ασθενείς (50%) με OMA παρουσίαζαν ανώμαλη ICR CpG μεθυλίωση. Το μητρικό μονάχα αλληλίο δηλαδή εμφάνιζαν 3 ασθενείς (14,3%) με αδιαφοροποίητη OMA, 4 ασθενείς (19,1%) με OMA χωρίς ωρίμανση, 3 ασθενείς (14,3%) με OMA με ωρίμανση, 9 ασθενείς (42,9%) με OMA απότοκο ΜΔΣ, 1 ασθενής (4,8%) με οξεία μυελομονοκυτταρική λευχαιμία και 1 ασθενής (4,8%) με οξεία μονοβλαστική/μονοκυτταρική λευχαιμία. Επιπλέον 8 ασθενείς (61,5%) είχαν ενδιάμεσης πρόγνωσης καρυότυπο ενώ 5 ασθενείς (38,5%) είχαν δυσμενούς πρόγνωσης καρυότυπο σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά SWOG/ECOG (πίνακας 12).

Δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της κατάστασης της μεθυλίωσης και των υποτύπων κατά ΠΟΥ της νόσου, των αποτελεσμάτων της κυτταρογενετικής ανάλυσης και των αιματολογικών παραμέτρων.

Δεκατέσσερις ασθενείς (33,3%) εμφάνιζαν υπερμεθυλίωση τόσο του γονιδίου SNRPN όσο και του γονιδίου MEG3.



Εικόνα 9: Αποτέλεσμα της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης ειδική της μεθυλίωσης-MSP για την κατάσταση της μεθυλίωσης του γονιδίου SNRPN σε ασθενείς με Μυελοειδείς Κακοήθειες. Για κάθε δείγμα από χρησιμοποιήθηκε ένα ζεύγος εκκινητών τόσο για το μεθυλιωμένο (M) όσο και για το μη-μεθυλιωμένο (U) ζεύγος του ICR του γονιδίου υπό εξέταση. Το δείγμα blk αντιστοιχεί σε αρνητικό μάρτυρα ο οποίος δεν περιέχει DNA. Το δείγμα cntr meth αντιστοιχεί σε ολικά μεθυλιωμένο DNA το οποίο λειτουργεί ως θετικός μάρτυρας και είναι θετικό μόνο για το M όπως αναμένεται. Τα δείγματα 1 και 3 είναι θετικά τόσο για το M αλληλίο όσο και για το U (φυσιολογικό πρότυπο μεθυλίωσης), ενώ τα δείγματα 2 και 4 ήταν θετικά μόνο για το M αλληλίο (μη- φυσιολογικό πρότυπο μεθυλίωσης). Προϊόν MSP 174bp αντιστοιχεί στο μεθυλιωμένο μητρικό αλληλίο, ενώ προϊόν MSP 100bp αντιστοιχεί στο πατρικό μη-μεθυλιωμένο αλληλίο. (L=100bp ladder, Invitrogen).

Πίνακας 12: Χαρακτηριστικά των ασθενών με ΟΜΛ οι οποίοι παρουσίαζαν μη-φυσιολογικό πρότυπο μεθύλιωσης του υποκινητή του γονιδίου SNRPN

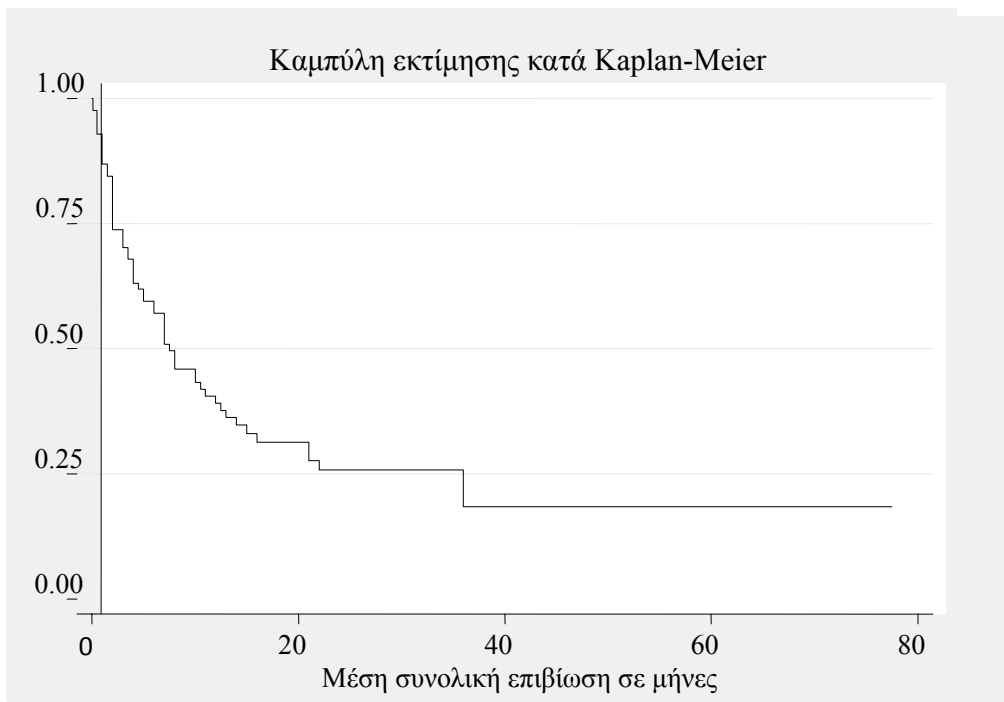
	Υπερμεθυλιωμένο SNRPN (%)
Ασθενείς Νο 42	21/42 (50%)
Φύλο	
Α	13/26 (50%)
Γ	8/16 (50%)
Καρύοτυπος	
Ευνοϊκός	0/1 (0%)
Ενδιάμεσος	8/18 (44,4%)
Δυσμενής	5/11 (45,4%)
Υπότυποι νόσου κατά ΠΟΥ	
t(8;21)(q22;q22),(AML/ETO1)	0/1 (0%)
Απότοκος ΜΔΣ ή ΜΔΣ/MYN	9/14 (64,3%)
Χωρίς προϋπάρχον ΜΔΣ ή ΜΔΣ/MYN, αλλά με δυσπλασία σε τουλάχιστον 50% των κυττάρων σε 2 ή περισσότερες κυτταρικές σειρές	
Σχετιζόμενες με αλκυλιούντες παράγοντες-ακτινοβολία	0/1 (0%)
ΟΜΛ αδιαφοροποίητη	3/4 (75%)
ΟΜΛ χωρίς ωρίμανση	4/9 (44,4%)
ΟΜΛ με ωρίμανση	3/5 (60%)
Οξεία Μυελομονοκυτταρική Λευχαιμία	1/3 (33,3%)
Οξεία Μονοβλαστική/μονοκυτταρική Λευχαιμία	1/4 (25%)

8.1.6. Ανάλυση Επιβίωσης των Ασθενών με Μυελοειδείς Κακοήθειες

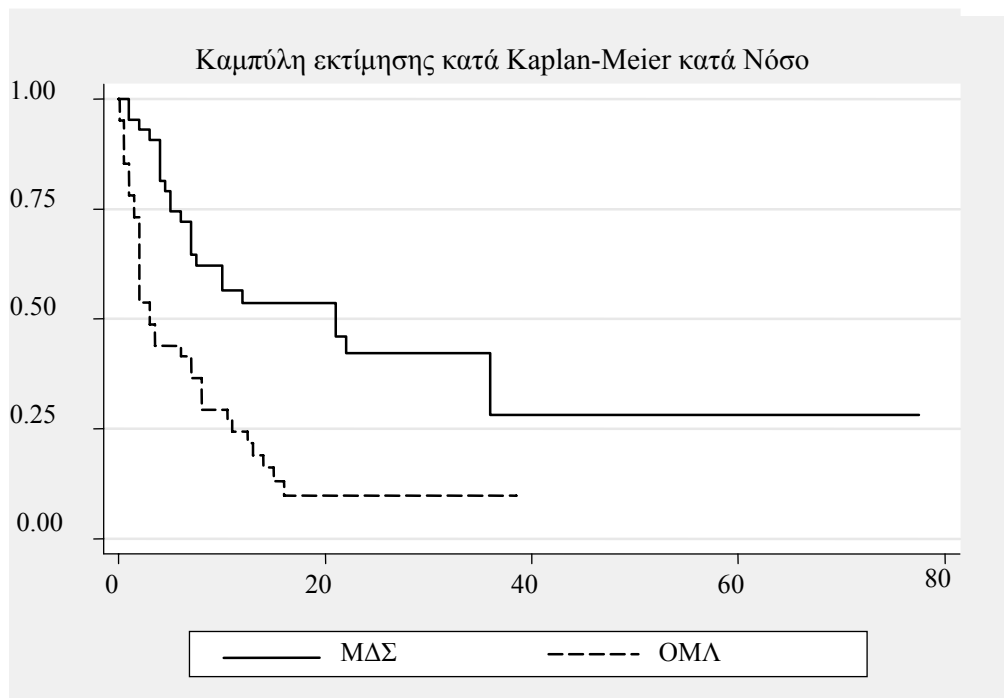
Η μέση συνολική επιβίωση (OS) για όλους τους ασθενείς με μυελοειδείς κακοήθειες ήταν 7,5 μήνες (ενδοτεταρτημοριακό εύρος-IQR: 2-36 μήνες). Οι ασθενείς με ΜΔΣ είχαν σημαντικά μεγαλύτερη επιβίωση (OS: 21 μήνες, IQR: 5 μήνες-σήμερα) ενώ οι ασθενείς με ΟΜΛ είχαν μέση συνολική επιβίωση 3 μηνών, διαφορά που ήταν σημαντική ($p=0.0001$). Η μεθυλίωση των CpG νησίδων του ICR του γονιδίου MEG3 συσχετιζόταν με σημαντικά μειωμένη συνολική επιβίωση των ασθενών με ΟΜΛ ($HR=1.98$, $p=0.047$). Στην περίπτωση των ασθενών με ΜΔΣ παρατηρήθηκε μία τάση για μειωμένη συνολική επιβίωση ($HR=2.15$, $p=0.072$) εκείνων που παρουσίαζαν ανώμαλη μεθυλίωση του γονιδιακού υποκινητή. Η ανώμαλη μεθυλίωση του γονιδίου SNRPN δεν συσχετιζόταν με την συνολική επιβίωση των ασθενών με μυελοειδείς κακοήθειες ($HR=1.08$, $p=0.85$).

Όλοι οι ασθενείς υποδιαιρέθηκαν-ταξινομήθηκαν σε 3 ομάδες ανάλογα με τον αριθμό των μεθυλιωμένων γονιδίων που εμφάνιζαν: η ομάδα Α περιείχε 36 (42,4%) ασθενείς με κανένα υπερμεθυλιωμένο γονίδιο, η ομάδα Β περιείχε 27 ασθενείς (31,8%) με 1 υπερμεθυλιωμένο γονίδιο και η ομάδα Γ περιλάμβανε 22 ασθενείς (25,9%) με 2 υπερμεθυλιωμένα γονίδια. Οι ασθενείς της ομάδας Α είχαν μέση συνολική επιβίωση 11 μηνών (IQR: 4-11 μήνες), οι ασθενείς της ομάδας Β είχαν μέση συνολική επιβίωση 12 μηνών (IQR: 2-36 μήνες), ενώ οι ασθενείς της ομάδας Γ είχαν μέση συνολική επιβίωση 3,5 μηνών (IQR: 1,5-8 μήνες).

Η διαφορά στη συνολική επιβίωση ανάμεσα στους ασθενείς των ομάδων Α και Β βρέθηκε ότι δεν είναι σημαντική ($HR=1.06$, $p=0.86$), αλλά συγκρίνοντας τους ασθενείς των ομάδων Α και Γ παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην συνολική επιβίωση ($HR=2.13$, $p=0.017$). Επίσης, παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην επιβίωση των ασθενών των ομάδων Β και Γ ($HR=2.02$, $p=0.033$). Η ίδια υποδιαίρεση και ανάλυση στους ασθενείς με ΜΔΣ δεν ανέδειξε σημαντικές διαφορές στη επιβίωση μεταξύ των διαφόρων ομάδων: Α και Β ($HR=1.08$, $p=0.86$), Α και Γ ($HR=2.14$, $p=0.14$), Β και Γ ($HR=1.97$, $p=0.21$). Μη σημαντική διαφορά τεκμηριώθηκε και στα άτομα με ΟΜΛ μεταξύ των τριών ομάδων: [($HR=0.9$, $p=0.82$), ($HR=1.6$, $p=0.24$), ($HR=1.76$, $p=0.18$)] αντίστοιχα. Η εκτίμηση της επιβίωσης με καμπύλες κατά Kaplan-Meier φαίνεται στον πίνακα 13.

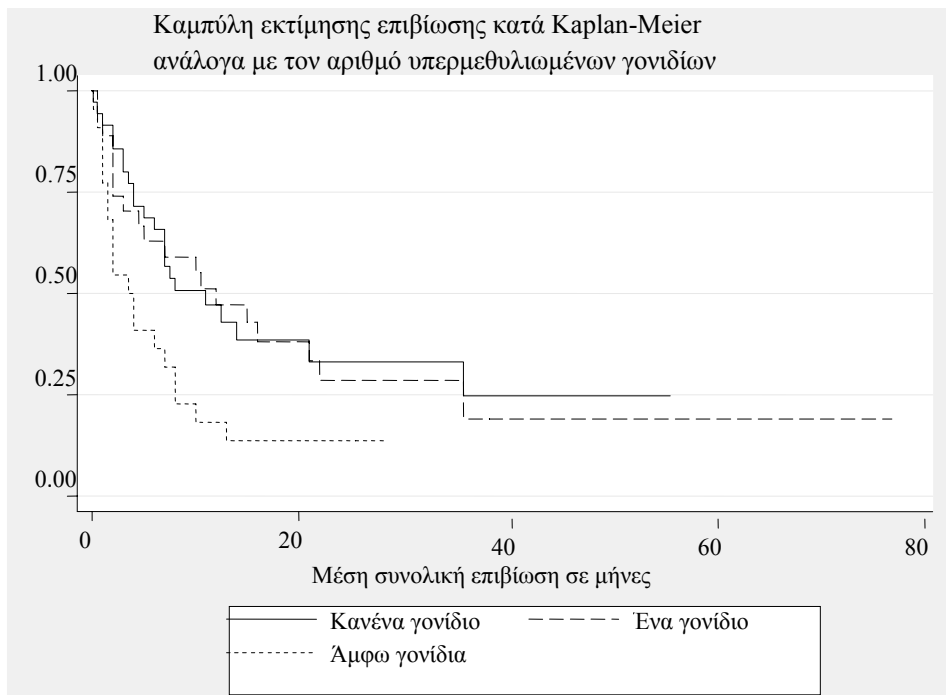


Πίνακας 13α: Καμπύλη εκτίμησης επιβίωσης κατά Kaplan-Meier για τους συνολικά 85 ασθενείς με μυελοειδείς κακοήθειες (ΟΜΛ και ΜΔΣ)

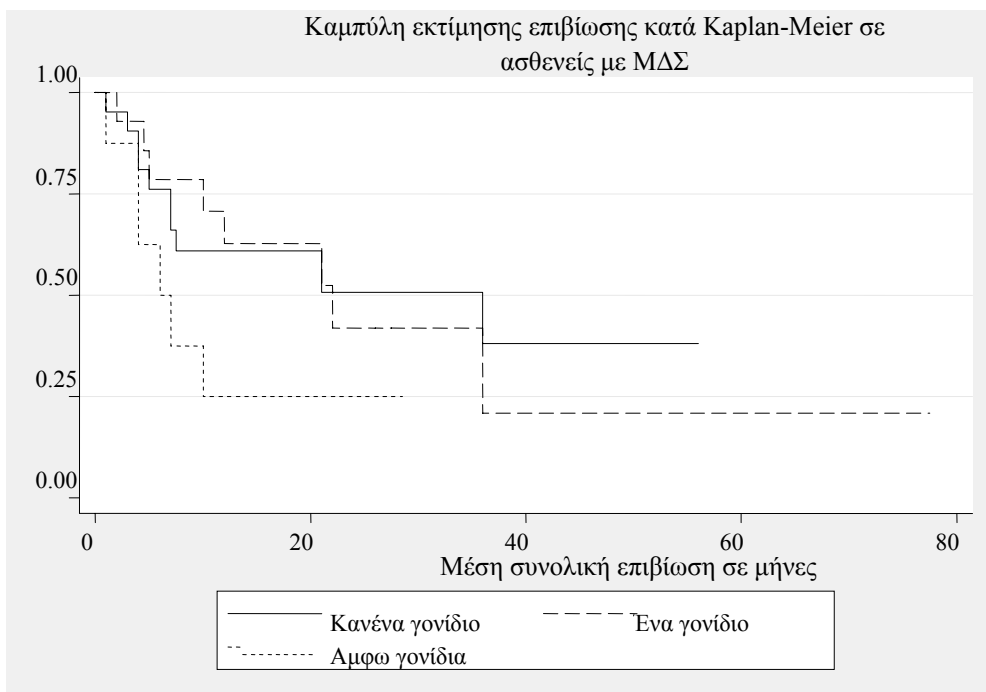


z

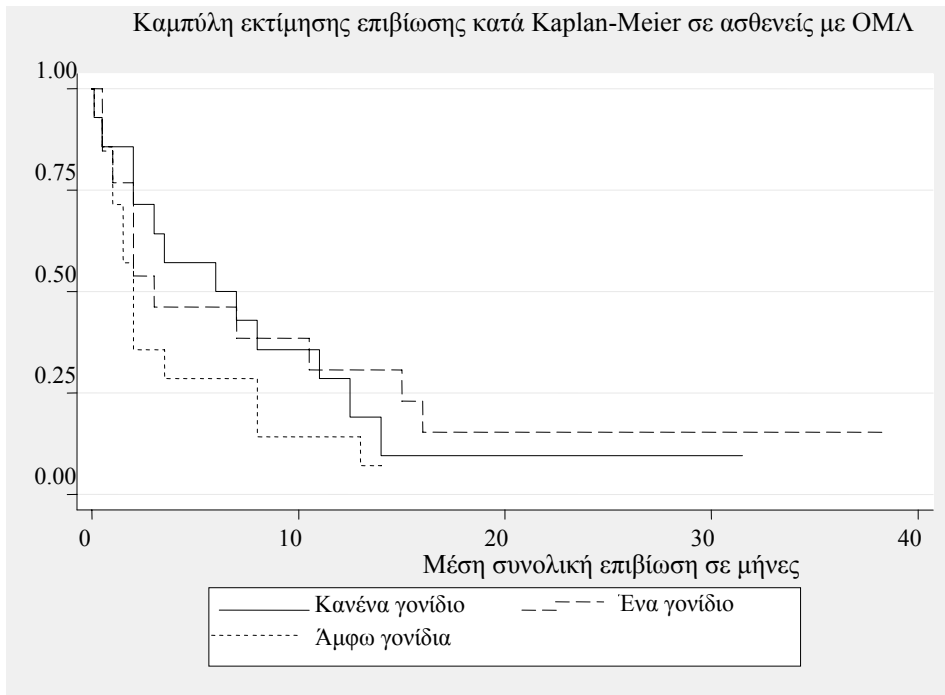
Πίνακας 13β: Ανάλυση επιβίωσης κατά νόσο, σε μήνες. Οι ασθενείς με ΜΔΣ είχαν σημαντικά μεγαλύτερη επιβίωση (21 μήνες) σε σύγκριση με τους ασθενείς με ΟΜΛ (3 μήνες) ($p=0.0001$)



Πίνακας 13γ: Εκτίμηση της επιβίωσης για όλους τους ασθενείς με μυελοειδείς κακοήθειες ανάλογα με τον αριθμό των υπερμεθυλιωμένων γονιδίων



Πίνακας 13δ: Επίπτωση του αριθμού των υπερμεθυλιωμένων γονιδίων στη συνολική επιβίωση σε ασθενείς με ΜΔΣ



Πίνακας 13ε: Επίπτωση του αριθμού των υπερμεθυλιωμένων γονιδίων στη συνολική επιβίωση σε ασθενείς με ΟΜΛ

8.2. Ασθενείς με ΠΜ

8.2.1. Κλινικά και Εργαστηριακά Ευρήματα

Η ομάδα ασθενών με ΠΜ που μελετήθηκε αποτελούταν από 21 ασθενείς, οι 11 (52,4%) ήταν άνδρες ενώ οι 10 (47,6%) ήταν γυναίκες και η συνολική μέση ηλικία ήταν 66,5 έτη (εύρος 48-85 έτη). Δεκαεπτά ασθενείς (81%) είχαν μονοκλωνική ανοσοσφαιρίνη τύπου IgG, 3 ασθενείς είχαν μονοκλωνική ανοσοσφαιρίνη τύπου IgA (14,3%), ενώ ένας ασθενής (4,8%) παρουσίαζε μονοκλωνική ανοσοσφαιρίνη τύπου IgM. Δεκαοκτώ ασθενείς (85,7%) εμφάνιζαν επίπεδα κρεατινίνης ορού < 2 mg/dl, ενώ 3 ασθενείς (14,3%) εμφάνιζαν επίπεδα κρεατινίνης ορού \geq 2mg/dl. Τα επίπεδα ασβεστίου του ορού κυμαίνονταν μεταξύ των 8,3 και 15,5 mg/dl (μέση τιμή 10,3mg/dl), το εύρος διακύμανσης τιμών της ταχύτητας καθίζησης ερυθρών αιμοσφαιρίων ήταν 31-154 mm/h (μέση τιμή 98 mm/h) και η μέση τιμή των επιπέδων της παραπρωτεΐνης ορού κατά τη διάγνωση ήταν 6.547 mg/dl (εύρος 1.620-12.480 mg/dl). Το ποσοστό του αριθμού των πλασματοκυττάρων στον μυελό των οστών κυμαίνονταν μεταξύ 10%-95% (μέση τιμή 47%).

Πέντε ασθενείς (23,8%) ανήκαν στο στάδιο I, 5 ασθενείς (23,8%) ανήκαν στο στάδιο II και 11 ασθενείς (52,4%) ανήκαν στο στάδιο III σύμφωνα με το σύστημα κατάταξης κατά Durie-Salomon, ενώ σύμφωνα με το σύστημα ISS 4 ασθενείς (19%) ανήκαν στο στάδιο I, 7 ασθενείς (33,3%) στο στάδιο II και 10 ασθενείς (47,6%) ανήκαν στο στάδιο III. Σύμφωνα με το τρίτο σύστημα κατάταξης SWOG 4 ασθενείς (19%) ανήκαν στο στάδιο I, 6 ασθενείς (28,6%) ανήκαν στο στάδιο II, 6 ασθενείς (28,6%) ανήκαν στο στάδιο III και 5 ασθενείς (23,8%) ανήκαν στο στάδιο IV.

Κυτταρογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε 14 ασθενείς με ΠΜ και όλοι οι ασθενείς παρουσίαζαν φυσιολογικό καρυότυπο (46XY ή 46XX) (πίνακας 14).

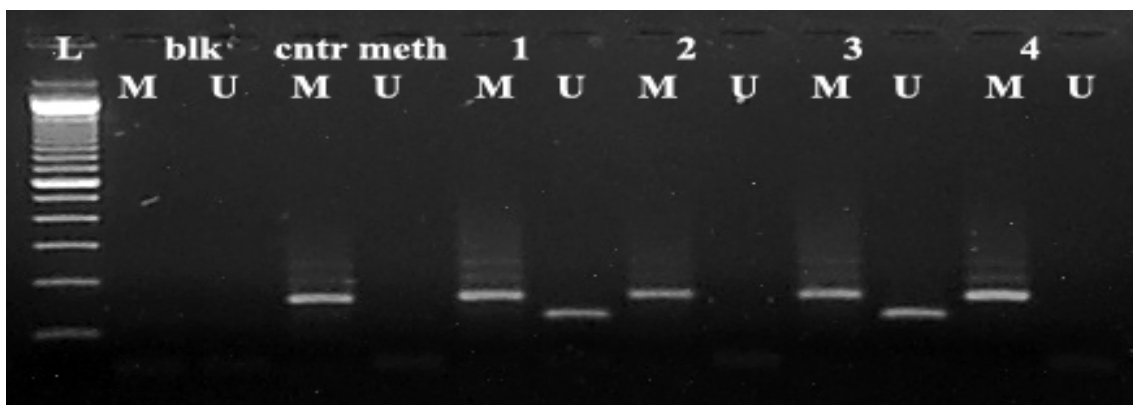
Πίνακας 14: Κλινικές και Εργαστηριακές Παράμετροι των Ασθενών με ΠΜ

Παράμετρος	Ασθενείς (ποσοστό %)
Ασθενείς	21
Ηλικία	Μέση ηλικία 66,5 έτη (εύρος:48-85 έτη)
Φύλο	
Α	11 (52,4%)
Γ	10 (47,6%)
Υπότυποι ΠΜ	
IgG	17 (81%)
IgA	3 (14,3%)
IgM	1 (4,8%)
Στάδιο Durie-Salomon	
I	5 (23,8%)
II	5 (23,8%)
III	11 (52,4%)
Στάδιο ISS	
I	4 (19%)
II	7 (33,3%)
III	10 (47,7%)
Στάδιο SWOG	
I	4 (19%)
II	6 (28,6%)
III	6 (28,6%)
IV	5 (23,8%)
Επίπεδα κρεατινίνης ορού (mg/dl)	
<2	18 (85,7%)
≥2	3 (14,3%)
Επίπεδα ασβεστίου ορού (mg/dl)	
>12	5 (23,8%)
Καρυότυπος	
46XX	6 (28,6%)
46XY	8 (38,1%)
ΥπερμεθυλίωσηMEG3	
Μυελός των οστών	12/21 (57,1%)

8.2.2. Μελέτη της μεθυλίωσης του γονιδίου MEG3 σε ασθενείς με ΠΜ

Το φυσιολογικό μοτίβο μεθυλίωσης του γονιδίου MEG3 αποτελείται από 2 αλληλία, εκ των οποίων ένα αντιστοιχεί στο μεθυλιωμένο πατρικό αλληλίο και ένα αντιστοιχεί στο μη-μεθυλιωμένο μητρικό αλληλίο. Στα δείγματα μυελού των οστών των ασθενών με ΠΜ παρατηρήθηκε μόνο το πατρικό μεθυλιωμένο αλληλίο ενώ δεν παρατηρήθηκε, κατά την μελέτη με MSP, το μη-μεθυλιωμένο μητρικό αλληλίο (εικόνα 10). Το μη φυσιολογικό αυτό πρότυπο της μεθυλίωσης του ICR του γονιδίου MEG3 παρατηρήθηκε σε 12 από τα 21 (57,1%) δείγματα μυελού των οστών. Σε κανένα από τα δείγματα των μαρτύρων δεν ήταν ορατό μη φυσιολογικό πρότυπο μεθυλίωσης, διαφορά η οποία ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0.004$).

Εικόνα 10: Αποτέλεσμα της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης ειδική της μεθυλίωσης-MSP για την κατάσταση της μεθυλίωσης του γονιδίου MEG3 σε ασθενείς με ΠΜ. Για κάθε δείγμα από χρησιμοποιήθηκε ένα ζεύγος εκκινητών τόσο για το μεθυλιωμένο (M) όσο και για το μη-μεθυλιωμένο (U) ζεύγος του ICR του γονιδίου υπό εξέταση. Το δείγμα blk αντιστοιχεί σε αρνητικό μάρτυρα ο οποίος δεν περιέχει DNA. Το δείγμα cntr meth αντιστοιχεί σε ολικά μεθυλιωμένο DNA το οποίο λειτουργεί ως θετικός μάρτυρας και είναι θετικό μόνο για το M όπως αναμένεται. Τα δείγματα 1 και 3 είναι θετικά τόσο για το M αλληλίο όσο και για το U (φυσιολογικό πρότυπο μεθυλίωσης), ενώ τα δείγματα 2 και 4 ήταν θετικά μόνο για το M αλληλίο (μη- φυσιολογικό πρότυπο μεθυλίωσης). Προϊόν MSP 160bp αντιστοιχεί στο μεθυλιωμένο πατρικό αλληλίο, ενώ προϊόν MSP 120bp αντιστοιχεί στο μητρικό μη-μεθυλιωμένο αλληλίο. (L=100bp ladder, Invitrogen).



8.2.3. Συσχέτιση της μεθυλίωσης του γονιδίου MEG3 με την κυτταρογενετική ανάλυση

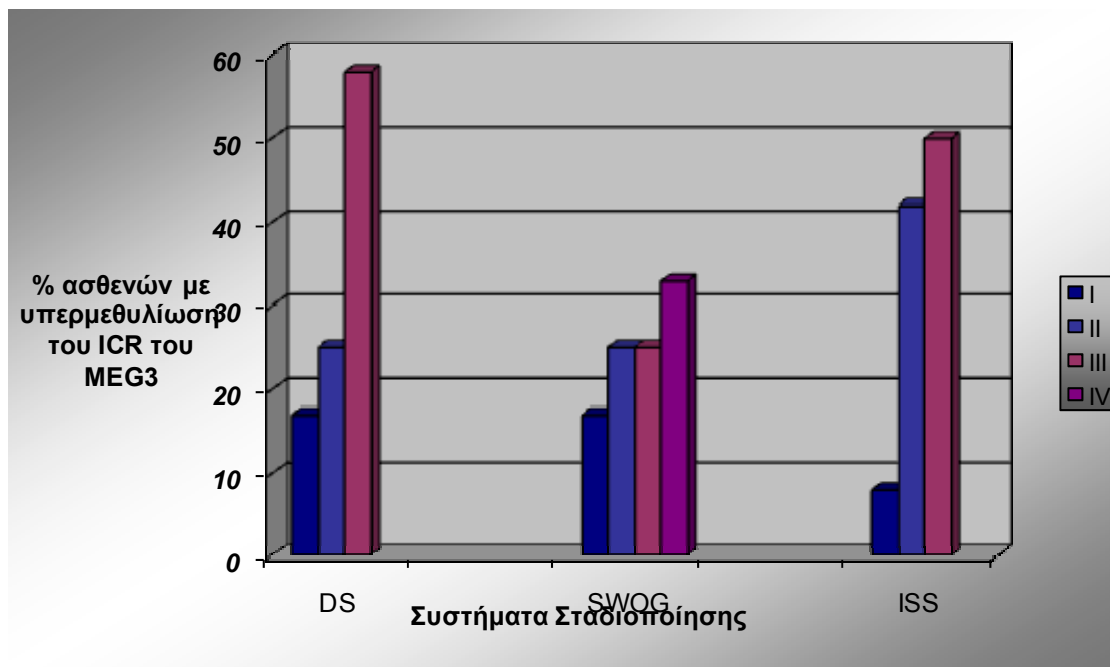
Δεν παρατηρήθηκε καμία συσχέτιση μεταξύ της υπερμεθυλίωσης του γονιδίου MEG3 και των αποτελεσμάτων της κυτταρογενετικής ανάλυσης καθώς όλοι οι ασθενείς στους οποίους είχε πραγματοποιηθεί κυτταρογενετικός έλεγχος εμφάνιζαν φυσιολογικό καρυότυπο.

8.2.4. Συσχέτιση της μεθυλίωσης του γονιδίου MEG3 με τους υποτύπους του ΠΜ

Οι 3 ασθενείς με IgA ΠΜ εμφάνιζαν τόσο το μεθυλιωμένο όσο και το μη μεθυλιωμένο αλληλίο. Ο ασθενής με IgM ΠΜ εμφάνιζε μόνο το μεθυλιωμένο αλληλίο, ενώ οι 11 (64,7%) από υπόλοιπους 17 ασθενείς με IgG ΠΜ παρουσίαζαν μόνο το πατρικό μεθυλιωμένο αλληλίο.

8.2.5. Συσχέτιση της μεθυλίωσης του γονιδίου MEG3 με το στάδιο της νόσου

Χρησιμοποιώντας το σύστημα κατάταξης κατά Durie-Salomon βρέθηκε ότι 2 ασθενείς (16,7%) με μη φυσιολογικό πρότυπο μεθυλίωσης ανήκαν στο στάδιο I της νόσου, 3 ασθενείς (25%) στο στάδιο II και 7 ασθενείς (58,3%) ανήκαν στο στάδιο III. Με βάσει το προγνωστικό σύστημα SWOG διαταραχή της μεθυλίωσης του εκκινητή του γονιδίου MEG3 παρατηρήθηκε σε 2 ασθενείς (16,7%) σταδίου I, σε 3 ασθενείς (25%) σταδίου II, σε 3 ασθενείς (25%) σταδίου III και σε 4 ασθενείς (33,3%) σταδίου IV. Τελευταίως, σύμφωνα με το σύστημα ISS 1 ασθενής (8,3%) με υπερμεθυλίωση του γονιδίου MEG3 ανήκε στο στάδιο I, 5 ασθενείς (41,7%) ανήκαν στο στάδιο II και 6 ασθενείς (50%) ανήκαν στο στάδιο III (εικόνα 11).



Εικόνα 11: Ποσοστό των ασθενών με ΠΜ οι οποίοι παρουσίαζαν μη φυσιολογικό πρότυπο μεθυλίωσης του εκκινητή του MEG3 γονιδίου σύμφωνα με 3 διαφορετικά συστήματα ταξινόμησης

8.2.6. Συσχέτιση της μεθυλίωσης του γονιδίου MEG3 με την πρόγνωση

Τρεις εκ των ασθενών με ΠΜ που παρουσίαζαν μη φυσιολογικό μοτίβο της μεθυλίωσης του γονιδίου MEG3 βρίσκονται εν ζωή, ενώ 9 ασθενείς κατέληξαν λόγω προόδου της νόσου.

9. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Έχει παρατηρηθεί ότι στο 70-95% των περιστατικών με OMA υπάρχει τουλάχιστον ένα υπερμεθυλιωμένο γονίδιο υποδεικνύοντας ότι η OMA συχνά επιδεικνύει ένα ανώμαλα μεθυλιωμένο φαινότυπο, ο οποίος συνεισφέρει στη λευχαιμογένεση από μόνος του ή σε συνδυασμό με άλλες γενετικές αλλαγές [41,83]. Ανώμαλη CpG μεθυλίωση γονιδίων που εμπλέκονται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου (CDKN2B/p15INK4B), στην πρόοδο-εξέλιξη του καρκίνου και τη μεταστατική ικανότητα αυτού (E-cadherin), στην διαφοροποίηση των κοκκιοκυττάρων (c/ebpδelta), στην «επιδιόρθωση» βλαβών του DNA (hMLH1 και MGMT), στην μεταφορά ενδογενών μονοκαρβοξυλίων (SLC5A8), στην κυτταρική προσκόλληση (IGSF4), στη μεταγραφή και στον έλεγχο μετάδοσης σημάτων (ESR1) έχει βρεθεί ότι συσχετίζονται με την πρόγνωση και την συνολική επιβίωση των ασθενών με OMA [84-88]. Επιγενετικές αλλαγές διαφόρων γονιδίων παρατηρούνται και σε ασθενείς με ΜΔΣ και ιδιαίτερα σε εκείνους με υψηλό αριθμό βλαστών. Επιπλέον, σε ασθενείς με ΜΔΣ ότι ορισμένα γονίδια όπως τα γονίδια CDKN2B/p15INK4B, SOCS1, SHP1, HIC1 έχει βρεθεί ότι έχουν προγνωστική αξία ακόμα και σε ασθενείς των οποίων η νόσος βρίσκεται σε πολύ πρώιμο στάδιο [83,89-92].

Ανώμαλη μεθυλίωση αποτυπωμένων γονιδίων, όπως των L3MBTL και NNAT, είναι γνωστό ότι συμμετέχουν στη παθογένεση των μυελοειδών κακοηθειών που χαρακτηρίζονται από έλλειψη του μακρού τμήματος του χρωμοσώματος 20 (20q) και των παιδιατρικών OMA αντιστοίχως [93,94]. Επιπλέον, η μελέτη του αποτυπωμένου γονιδίου CDKN1C/p57KIP2 ανέδειξε την ύπαρξη μη-φυσιολογικού μοτίβου μεθυλίωσης στο 0-28% των περιπτώσεων ασθενών με ΜΔΣ και OMA σε συνάρτηση με τη μέθοδο και τα ζεύγη των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν [95-97].

Η CpG μεθυλίωση των γονιδίων SNRPN και MEG3 έχει επίσης μελετηθεί και σε περιπτώσεις συμπαγών όγκων. Το γονίδιο MEG3 είναι υπερμεθυλιωμένο σε ασθενείς με καρκίνο των νεφρών, με φαιοχρωμοκυττώματα, με όγκο Wilm και όγκους της υπόφυσης [70,98,99]. Από την άλλη μεριά το γονίδιο SNRPN έχει βρεθεί υπερμεθυλιωμένο σε νευροκυττώματα του κεντρικού νευρικού συστήματος και σε ορισμένες μελέτες σε παιδιατρικούς βλαστικούς όγκους [76,100].

Στην παρούσα μελέτη, για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία, διαπιστώθηκε ότι η ανώμαλη μεθυλίωση των ICR των γονιδίων MEG3 και SNRPN απαντάται σε ένα σημαντικό

ποσοστό ασθενών με μυελοειδείς κακοήθειες (41,2% και 42,4% αντίστοιχα). Η υπερμεθυλίωση ήταν πιο συχνή σε ασθενείς με ΟΜΛ σε σύγκριση με αυτούς με ΜΔΣ και για τα δύο υπό μελέτη γονίδια αλλά η διαφορά δεν ήταν σημαντική ($p=0.15$ για το SNRPN και $p=0.23$ για το MEG3). Παρότι που η CpG μεθυλίωση του SNRPN ήταν πιο συχνή από την CpG μεθυλίωση του MEG3 αποδείχθηκε ότι η δεύτερη είχε επίπτωση στην συνολική επιβίωση των ασθενών με ΟΜΛ ($HR=1.98$, $p=0.047$) και υψηλότερο κίνδυνο θανάτου στους ασθενείς με ΜΔΣ ($HR=2.15$, $p=0.072$), ευρήματα τα οποία δεν τεκμηριώθηκαν για το γονίδιο SNRPN. Επιπλέον, οι ασθενείς που εμφάνιζαν 2 υπερμεθυλιωμένα γονίδια είχαν σαφώς πτωχότερη συνολική επιβίωση συγκρινόμενοι με εκείνους όπου δεν υπήρχε υπερμεθυλιωμένο γονίδιο ($HR=2.1$, $p=0.017$), ή συγκρινόμενοι με εκείνους τους ασθενείς οι οποίοι είχαν 1 υπερμεθυλιωμένο γονίδιο ($HR=2.02$, $p=0.033$). Δεν τεκμηριώθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ των αιματολογικών παραμέτρων, των υποτύπων κατά ΠΟΥ, του προγνωστικού συστήματος κατά WPSS, των κυτταρογενετικών ευρημάτων και της υπερμεθυλίωσης αμφοτέρων των γονιδίων, παρότι που οι ασθενείς με ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών τύπου I είχαν 20 φορές περισσότερες πιθανότητες να παρουσιάσουν ανώμαλη μεθυλίωση του γονιδίου MEG3 ($OR=20$, $p=0.027$). Επίσης διαπιστώθηκε ότι οι ασθενείς με ΟΜΛ απότοκο ΜΔΣ ή ΜΔΣ/MYN εμφάνιζαν διαταραγμένο πρότυπο μεθυλίωσης στο 50% και στο 63,3% των περιπτώσεων για τα γονίδια MEG3 και SNRPN αντίστοιχα, σε σύγκριση με το 34,9% των ασθενών με ΜΔΣ. Αυτή η διαφορά μπορεί να καταδεικνύει ότι η συχνότητα της μεθυλίωσης των συγκεκριμένων γονιδίων μπορεί να τονίζεται-αυξάνεται κατά την εξέλιξη των ΜΔΣ σε ΟΜΛ.

Δεν διαπιστώθηκε υπερμεθυλίωση των CpG νησίδων σε κανέναν από τους μάρτυρες που μελετήθηκαν ($p=0.007$ για αμφότερα τα γονίδια), γεγονός ενδεικτικό του ότι το συγκεκριμένο επιγενετικό φαινόμενο χαρακτηρίζει μόνο ασθενείς με κακοήθειες (αιματολογικές κακοήθειες στην περίπτωση μας) και μπορεί να αποτελεί σημαντικό τρόπο αδρανοποίησης των 2 υπό μελέτη ογκοκατασταλτικών γονιδίων.

Ομοίως, τα παθογενετικά συμβάματα υπεύθυνα για τη κακοήθη κλωνική εξαλλαγή του πλασματοκυττάρου χαρακτηριστικό του ΠΜ είναι υπό συνεχή μελέτη. Επιγενετικές αλλαγές διαφόρων γονιδίων φαίνεται να συμβαίνουν στο ΠΜ και η μελέτη των διαταραχών της μεθυλίωσης αντικατοπτρίζουν ένα πολλά υποσχόμενο πεδίο έρευνας. Η υπερμεθυλίωση γονιδίων που εμπλέκονται στην ογκοκαταστολή, ρύθμιση κυτταροκινών, απόπτωση, αντίσταση στη χημειοθεραπεία, στην κυτταρική προσκόλληση έχει μελετηθεί σε σχέση με

την γονιδιακή έκφραση αυτών, την αγγειογένεση, την πρόγνωση και τα μοριακά μονοπάτια που ενεργοποιούνται στην εξέλιξη της νόσου [101-107].

Η κατάσταση της μεθυλίωσης του ICR του MEG3 γονιδίου μελετήθηκε, επίσης για πρώτη φορά, και σε ομάδα ασθενών με ΠΜ. Η μελέτη κατάδειξε ότι ένα υψηλό ποσοστό (57.14%) ασθενών με ΠΜ παρουσιάζει διαταραχή της μεθυλίωσης του ICR του MEG3 γονιδίου. Η διαταραχή της μεθυλίωσης συσχετιζόταν με τον υπότυπο της νόσου καθώς το 67,7% των ασθενών με ΠΜ τύπου IgG και το 100% των ασθενών με ΠΜ τύπου IgM εμφάνιζαν υπερμεθυλιωμένο τον υποκινητή του υπό μελέτη γονιδίου. Επιπλέον, κανείς εκ των ασθενών με ΠΜ τύπου IgA δεν παρουσίαζε την ειδική αυτή επιγενετική αλλαγή. Παρατηρήθηκε ακόμη ότι υψηλότερο ποσοστό ασθενών σε προχωρημένο στάδιο της νόσου εμφάνιζε υπερμεθυλίωση του γονιδίου σε σχέση με τους ασθενείς σε πρωιμότερο στάδιο της νόσου. Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε σημαντική σχέση με την πρόγνωση της νόσου.

Διάφορες εξηγήσεις έχουν δοθεί ώστε να περιγραφεί η δράση του γονιδίου MEG3 σε συμπαγείς όγκους και κυτταρικές σειρές. Πιθανώς η υπερμεθυλίωση του γονιδίου MEG3 μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την υπερέκφραση του «ομόλογου» του DLK1, παρόλο που αυτό δεν έχει αποδειχθεί πλήρως [98]. Επιπλέον, το γονίδιο φαίνεται να δρα ογκοκατασταλτικά και η δράση αυτού είναι αμφοτέρα p53-εξαρτώμενη και p53-ανεξάρτητη [61]. Το γονίδιο p53, γνωστό και ως «ο φύλακας του γονιδιώματος», είναι ογκοκατασταλτικό και εμπλέκεται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου ή/και στην απόπτωση και επιπλέον στη μεταγραφή άλλων γονιδίων υπεύθυνων για τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και την επιδιόρθωση βλαβών του DNA στο ΠΜ [108-110]. Ο Zhou και οι συνεργάτες του [61] απέδειξαν ότι το γονίδιο MEG3 ενεργοποιεί με τη σειρά του το γονίδιο p53 μέσω της καταστολής του γονιδίου MDM2 ή μέσω ενεργοποίησης άλλων πρωτεϊνών που με τη σειρά τους τροποποιούν το γονίδιο p53 ή/και το γονίδιο MDM2 και τελικά και δεν επιτρέπουν την αποδόμιση της πρωτεΐνης p53. Η υπερμεθυλίωση του γονιδίου MEG3 και η μειωμένη έκφραση του μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την μειωμένη έκφραση του γονιδίου p53 και αυτό δυνητικά μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα μηχανισμό μέσω του οποίου το γονίδιο MEG3 ασκεί τη δράση του στο ΠΜ.

Στην παρούσα μελέτη υπάρχουν ορισμένοι περιορισμοί όπως η ηλικιακή ανομοιογένεια (εύρος ηλικίας 16-92 έτη) καθώς και ο σχετικά μικρός αριθμός ασθενών (42 ασθενείς με ΟΜΛ, 43 ασθενείς με ΜΔΣ και 21 ασθενείς με ΠΜ) και οι υποκατηγοριοποιήσεις αυτών σε

μικρότερες υποομάδες. Αυτοί οι περιορισμοί δεν επιτρέπουν συμπαγή στατιστική ανάλυση η οποία θα τεκμηριώνει τις τάσεις συσχέτισης οι οποίες προέκυψαν κατά την μελέτη. Επίσης, η απομόνωση γονιδιωματικού DNA δεν πραγματοποιήθηκε σε καθαρό πληθυσμό κυττάρων - δηλαδή βλάστες στην περίπτωση των περιστατικών με OML και ΜΔΣ και πλασματοκύτταρα στα περιστατικά με ΠΜ- μετά από κυτταρικό διαχωρισμό (cell sorting) οπότε και θα ήταν δυνατή η ανάλυση σε δείγματα με μικρότερο αριθμό παθολογικών κυττάρων και πιθανώς θα είχαμε περισσότερα θετικά αποτελέσματα.

Συμπερασματικά, στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε για πρώτη φορά την κατάσταση μεθυλίωσης των αποτυπωμένων γονιδίων MEG3 και SNRPN σε ασθενείς με OML, ΜΔΣ και ΠΜ. Η βιολογική σημασία των συγκεκριμένων γονιδίων στην φυσιολογική αιμοποίηση, στη λευχαιμογένεση και στη παθογένεια του ΠΜ δεν είναι πλήρως κατανοητή. Η παρούσα μελέτη μας προτείνει-καταδεικνύει ότι η υπερμεθυλίωση των δύο γονιδίων μπορεί να εμπλέκεται στη παθογένεια των νοσημάτων αυτών. Θεωρείται ότι είναι αναγκαίες επιπλέον μελέτες οι οποίες θα τεκμηριώσουν τα σηματοδοτικά μονοπάτια μέσω των οποίων η ανώμαλη μεθυλίωση των ICR των υποκινητών των δύο γονιδίων ασκεί τη δράση της στην γένεση της Οξείας Μυελογενούς Λευχαιμίας, των Μυελοδυσπλαστικών Συνδρόμων και του Πολλαπλού Μυελώματος.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε για πρώτη φορά η μεθυλίωση και οι διαταραχές αυτής στα δύο αποτυπωμένα γονίδια MEG3 και SNRPN στην OML, τα ΜΔΣ και το ΠΜ. Είναι γνωστό ότι τα γονίδια αυτά εμπλέκονται στην παθογένεια αναπτυξιακών διαταραχών όπως η μονογονική δισωμία 14, το σύνδρομο Angelman και το σύνδρομο Prader-Willi. Καθώς τα συγκεκριμένα γονίδια παρουσιάζουν ιδιότητες ογκοκατασταλτικών γονιδίων θεωρείται ότι η σίγαση-αποσιώπηση της μεταγραφής λόγω της ανώμαλης μεθυλίωσης τους μπορεί να τους προσδίδει παθογενετική αξία. Έχει βρεθεί ότι και τα δύο αυτά γονίδια παρουσιάζουν διαταραχές του μοτίβου της μεθυλίωσης σε ασθενείς με καρκίνο των νεφρών, με φαιοχρωμοκυττώματα, με όγκο του Wilm, με όγκους της υπόφυσης, με νευροκυτώματα του κεντρικού νευρικού συστήματος και σε ορισμένες μελέτες σε παιδιατρικούς βλαστικούς όγκους. Οι διαταραχές της μεθυλίωσης των εν λόγω γονιδίων συσχετίστηκαν με κλινικές παραμέτρους όπως η ηλικία, το φύλο, η αναιμία, η λευκοκυττάρωση ή λευκοπενία, η θρομβοπενία, ο καρυότυπος, οι διάφορες υποκατηγορίες και τα στάδια των νοσημάτων, τα διάφορα προγνωστικά συστήματα και η συνολική επιβίωση.

Παρατηρήθηκαν λοιπόν για πρώτη φορά τα εξής νέα δεδομένα:

1. Η ανώμαλη μεθυλίωση των ICR των γονιδίων MEG3 και SNRPN απαντάται σε ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών με μυελοειδείς κακοήθειες (41,2% και 42,4% αντίστοιχα).
2. Διαταραχή της μεθυλίωσης του γονιδίου MEG3 απαντάται σε ασθενείς με ΜΔΣ και OML σε ποσοστό 34,9% και 47,6% αντίστοιχα.
3. Ανώμαλη μεθυλίωση του γονιδίου MEG3 απαντάται σε ποσοστό 57,1% στην ομάδα ασθενών με ΠΜ.
4. Αντίστοιχη διαταραχή της μεθυλίωσης του γονιδίου SNRPN ανευρέθηκε στο 34,9% των ασθενών με ΜΔΣ και στο 50% των ατόμων με OML.
5. Ουδεμία συσχέτιση της ανώμαλης μεθυλίωσης αμφοτέρων των γονιδίων έχει βρεθεί με την ηλικία, το φύλο, τις αιματολογικές παραμέτρους, τον καρυότυπο, τις διάφορες υποκατηγορίες, τα στάδια των νοσημάτων και τα διάφορα προγνωστικά συστήματα σε ασθενείς με μυελοειδείς κακοήθειες. Ωστόσο, οι ασθενείς με ΜΔΣ και ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών I είχαν την τάση (20 φορές περισσότερες πιθανότητες) να εμφανίσουν μη-φυσιολογικό πρότυπο μεθυλίωσης των CpG νησίδων του MEG3 γονιδίου (OR=20, p=0.027).

6. Η μεθυλίωση των CpG νησίδων του ICR του γονιδίου MEG3 συσχετιζόταν σημαντικά με μειωμένη συνολική επιβίωση των ασθενών με ΟΜΛ (HR=1.98, p=0.047). Στην περίπτωση των ασθενών με ΜΔΣ παρατηρήθηκε μία τάση για μειωμένη συνολική επιβίωση (HR=2.15, p=0.072) εκείνων που παρουσίαζαν ανώμαλη μεθυλίωση του γονιδιακού υποκινητή.
7. Η ανώμαλη μεθυλίωση του γονιδίου SNRPN δεν συσχετιζόταν με την συνολική επιβίωση των ασθενών με μυελοειδείς κακοήθειες (HR=1.08, p=0.85).
8. Η υπερμεθυλίωση ήταν πιο συχνή στα περιστατικά ΟΜΛ σε σύγκριση με τα ΜΔΣ και για τα δύο υπό μελέτη γονίδια αλλά η διαφορά δεν ήταν σημαντική (p=0.15 για το SNRPN και p=0.23 για το MEG3).
9. Οι ασθενείς που εμφάνιζαν διαταραχή της μεθυλίωσης και των 2 γονιδίων είχαν σαφώς πτωχότερη συνολική επιβίωση σε σχέση με εκείνους που δεν είχαν κανένα υπερμεθυλιωμένο γονίδιο (HR=2.1, p=0.017), ή συγκρινόμενοι με τους ασθενείς οι οποίοι είχαν 1 υπερμεθυλιωμένο γονίδιο (HR=2.02, p=0.033).
10. Οι ασθενείς με ΟΜΛ απότοκο ΜΔΣ ή ΜΔΣ/MYN εμφάνιζαν διαταραγμένο πρότυπο μεθυλίωσης στο 50% και στο 63,3% των περιπτώσεων για τα γονίδια MEG3 και SNRPN αντίστοιχα, σε σύγκριση με το 34,9% των ασθενών με ΜΔΣ. Αυτή η διαφορά μπορεί να καταδεικνύει ότι η συχνότητα της μεθυλίωσης των συγκεκριμένων γονιδίων μπορεί να αυξάνεται κατά την εξέλιξη των ΜΔΣ σε ΟΜΛ.
11. Υψηλότερο ποσοστό ασθενών με ΠΜ προχωρημένου σταδίου της νόσου εμφάνιζε υπερμεθυλίωση του γονιδίου MEG3 σε σχέση με τους ασθενείς σε πρωιμότερο στάδιο της νόσου.

ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Η ζωή ενός ατόμου δεν ορίζεται μόνο από το γονιδίωμα του αλλά και από πολυάριθμα επιγονιδιώματα του που υπάρχουν σε διαφορετικά είδη κυττάρων, με πολλά από αυτά να δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, όχι μόνο την εμβρυική, αλλά και κατά την «πλαστική» φάση της παιδικής ηλικίας. Επίσης, το επιγονιδίωμα αντιδρά στην περιβαλλοντική επιρροή συμπεριλαμβανομένων της μητρικής φροντίδας, της διαίτας, της έκθεσης σε τοξικούς παράγοντες και μπορεί οι επιγενετικές απαντήσεις σε αυτά τα ερεθίσματα να έχουν συνέπειες που μπορεί να επηρεάσουν τις μελλοντικές γενιές [9]. Οι επιγενετικές αλλαγές του DNA φαίνεται να κατέχουν πρωτεύοντα ρόλο στην γένεση και εξέλιξη του καρκίνου και οι αιματολογικές κακοήθειες δεν αποτελούν εξαίρεση. Οι πολυκύτταροι οργανισμοί βασίζονται στις επιγενετικές διεργασίες προκειμένου τα γονίδια τους να εκφράζονται σωστά και εν συνεχεία τα κύτταρά τους να αναπτύσσονται, διαφοροποιούνται και λειτουργούν σωστά. Ο Haggis ανέφερε το 2004 [3] ότι ο καρκίνος στα αρχικά του στάδια τουλάχιστον είναι διαταραχή της κυτταρικής διαφοροποίησης και όχι του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και είναι πλέον γνωστό ότι η μεθυλίωση του DNA έχει βασικό ρόλο στην φυσιολογική κυτταρική διαφοροποίηση. Η εστιακή υπερμεθυλίωση των CpG νησίδων των διαφόρων ογκοκατασταλτικών γονιδίων έχει ως αποτέλεσμα την μεταγραφική καταστολή και επακόλουθη σίγαση των γονιδίων αυτών και εν συνεχεία τη διαταραχή της φυσιολογικής κυτταρικής ανάπτυξης και διαφοροποίησης.

Η μεθυλίωση του DNA συμμετέχει στη φυσιολογική γονιδιακή αποτύπωση και η απώλεια αυτής λόγω της υπερμεθυλίωσης μπορεί να προκαλέσει ενεργοποίηση του φυσιολογικά αδρανούς αλληλόμορφου (π.χ. το γονίδιο IGF2) ή σίγαση ενός φυσιολογικά ενεργού γονιδίου αναστολέα της κυτταρικής ανάπτυξης (π.χ. το γονίδιο p57KIP2). Η απώλεια της αποτύπωσης δεν είναι μόνο ένα επικρατών αλλά και επίσης ένα αρκετά πρώιμο φαινόμενο στην πορεία της καρκινογένεσης. Η σπουδαιότητα της γονιδιακής αποτύπωσης και η απώλεια αυτής φαίνεται επίσης από την ύπαρξη γενετικών νοσημάτων της ανάπτυξης τα οποία έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου όπως τα άτομα με σύνδρομο Prader-Willi, σύνδρομο Angelman, σύνδρομο Silver-Russel και σύνδρομο Beckwith-Wiedemann. Τα γονίδια που μελετήθηκαν σε αυτή τη διατριβή, ήτοι το γονίδιο MEG3 και το γονίδιο SNRPN, ανήκουν στην κατηγορία των αποτυπομένων γονιδίων στα οποία έχουν αποδοθεί χαρακτηριστικά ογκοκατασταλτικών γονιδίων τα οποία έχουν επίπτωση στην κυτταρική διαφοροποίηση και την καρκινογένεση. Διαταραχές της μεθυλίωσης των δύο εν λόγω γονιδίων έχουν μελετηθεί σε συμπαγείς όγκους και στην παρούσα εργασία για πρώτη φορά

στη διεθνή βιβλιογραφία μελετήθηκε το ανώμαλο μοτίβο της μεθυλίωσης αυτών σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες, διαπιστώνοντας σημαντικό ποσοστό ασθενών με υπερμεθυλιωμένα τα γονίδια αυτά. Αυτό σημαίνει ότι οι αλλαγές αυτές επιφέρουν σίγαση των συγκεκριμένων ογκοκατασταλτικών γονιδίων με αποτέλεσμα βλάβη στην φυσιολογική κυτταρική διαφοροποίηση των αιμοποιητικών κυττάρων και την εξέλιξη σε αιματολογική κακοήθεια.

Τέλος, η παρέμβαση στην μεθυλίωση, με τους υπομεθυλιούντες παράγοντες αζακυτιδίνη και ντεκυταμίνη που είναι προς το παρόν εγκεκριμένοι για τη θεραπεία των ΜΔΣ και των ΟΜΛ, μπορεί να αντιστρέψει την παθολογική κατάσταση και να οδηγήσει σε επιθυμητά θεραπευτικά αποτελέσματα μέσω αναστολής των διαταραχών της κυτταρικής διαφοροποίησης, της ανάπτυξης, της απόπτωσης και επιπλέον αναγνώριση των νεοπλασματικών κυττάρων από το ανοσοποιητικό σύστημα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ

Η κυτταρική διαφοροποίηση και η γονιδιακή μεθυλίωση στις αιματολογικές κακοήθειες

Λεωνίδας Μπενετάτος

Εισαγωγή: Η κυτταρική διαφοροποίηση αποτελεί ένα φυσικό φαινόμενο το οποίο παρατηρείται σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς. Όταν ένα κύτταρο αποκτήσει ταυτότητα μέσω της διαφοροποίησης είναι απίθανο να αλλάξει η «μοίρα» του έστω και αν το κύτταρο αυτό τοποθετηθεί σε διαφορετικό κυτταρικό περιβάλλον. Η διαδικασία της κυτταρικής διαφοροποίησης απαιτεί μη μεταβολές στη αλληλουχία του DNA και φαίνεται ότι υπόκειται σε επιγενετικό έλεγχο ο οποίος αποτελεί μέγιστο ρυθμιστικό μηχανισμό της κυτταρικής διαφοροποίησης και της μετάδοσης αυτής από το μητρικό στο θυγατρικό κύτταρο. Για την επίτευξη της κυτταρικής διαφοροποίησης απαιτείται σίγαση της έκφρασης ορισμένων γονιδίων ειδικών για ειδικό τύπο κυττάρων, μέσω της μεθυλίωσης των CpG νησίδων, και ενεργοποίηση ορισμένων άλλων. Ο καλύτερα μελετημένος επιγενετικός μηχανισμός είναι η μεθυλίωση του DNA η οποία σχετίζεται με την μεταγραφική αποσιώπηση των γονιδίων και λαμβάνει χώρα στη βάση κυτοσίνη η οποία προηγείται της βάσης γουανίνης στην ακολουθία του γονιδιώματος και η αντίδραση καταλύεται από τις μεθυλτρανφεράσες οι οποίες προσκολλούν ισοσθενώς μία μεθυλομάδα στη θέση C5 του δακτυλίου της κυτοσίνης. Το εναρκτήριο λάκτισμα για την έναρξη και διατήρηση της διαδικασίας της κυτταρικής διαφοροποίησης δίδεται από τους επιγενετικούς μηχανισμούς. Παρόλο που αυτοί οι επιγενετικοί μηχανισμοί εδραιώνονται πρώιμα κατά την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των οργανισμών, συμβαίνουν συνεχείς προσαρμογές κατά τη διάρκεια της ζωής των κυττάρων ως απάντηση σε εσωτερικά και περιβαλλοντικά ερεθίσματα που μπορεί να οδηγήσουν, αργότερα στη ζωή, στην ανάπτυξη νοσημάτων και καρκίνου. Η κυτταρική διαφοροποίηση βασίζεται στις επιγενετικές αλλαγές οι οποίες σχετίζονται με την επιλεκτική χρονικά ενεργοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων και την ελεγχόμενη αποσιώπηση πολυδύναμων γονιδίων.

Σκοπός: Να μελετηθεί το μοτίβο της μεθυλίωσης των υποκινητών των αποτυπομένων γονιδίων MEG3 και SNRPN σε ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία (ΟΜΛ), μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (ΜΔΣ) και πολλαπλό μυέλωμα (ΠΜ) και να συσχετισθούν οι τυχόν διαταραχές της μεθυλίωσης με την συνολική επιβίωση των ασθενών, το στάδιο της

νόσου, τους υπότυπους της νόσου, τις διάφορες χρωμοσωμιακές ανωμαλίες και τις αιματολογικές παραμέτρους.

Ασθενείς και μέθοδοι: Μελετήθηκαν 85 ασθενείς με μυελοειδείς κακοήθειες (42 ασθενείς με OMA και 43 ασθενείς με ΜΔΣ) καθώς και 21 ασθενείς με ΠΜ οι οποίοι διαγνώστηκαν και αντιμετωπίστηκαν στην Αιματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Από τους ασθενείς με μυελοειδείς κακοήθειες οι 57 (67,1%) ήταν άνδρες και οι 28 (32,9%) ήταν γυναίκες με συνολική μέση ηλικία $71,8 \pm 13,3$ έτη (εύρος 16-92 έτη). Από τους 21 ασθενείς με ΠΜ οι 11 (52,4%) ήταν άνδρες ενώ οι 10 (47,6%) ήταν γυναίκες και η συνολική μέση ηλικία ήταν 66,5 έτη (εύρος 48-85 έτη). Η διάγνωση της νόσου του ΠΜ έγινε βάσει προκαθορισμένων κριτηρίων τα οποία διατυπώθηκαν από την Διεθνή Ομάδα Εργασίας του Πολλαπλού Μυελώματος. Οι ασθενείς με OMA και ΜΔΣ ταξινομήθηκαν σύμφωνα με την ταξινόμηση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας-ΠΟΥ και επιπλέον οι ασθενείς με ΜΔΣ επανεξετάστηκαν ώστε να πληρούν τα πλέον πρόσφατα διαγνωστικά κριτήρια όπως αυτά διατυπώθηκαν στην συνάντηση της Διεθνούς Ομάδας ΜΔΣ το 2007. Πραγματοποιήθηκε απομόνωση γονιδιωματικού DNA από δείγματα μυελού των οστών χρησιμοποιώντας το QIAmp® DNA Mini Kit (Qiagen, Bioanalytica, Athens, Greece) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Εν συνεχεία, το DNA σε χημική κατεργασία με διθειώδες νάτριο με τη χρήση του EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, CA, USA) βάσει του πρωτοκόλλου του κατασκευαστή. Η μελέτη της μεθυλίωσης των δύο γονιδίων έγινε με τη μέθοδο MSP, χρησιμοποιώντας το HotStar Taq Master Mix kit της Qiagen.

Αποτελέσματα: Στο φυσιολογικό μοτίβο μεθυλίωσης του γονιδίου MEG3 παρατηρούνται 2 μπάντες, εκ των οποίων μία αντιστοιχεί στο μεθυλιωμένο πατρικό αλληλίο και έχει προϊόν 160 bp και μία αντιστοιχεί στο μη-μεθυλιωμένο μητρικό αλληλίο με προϊόν 160 bp. Στην περίπτωση της μη-φυσιολογικής μεθυλίωσης παρατηρείται η ύπαρξη μόνο του πατρικού αλληλίου ενώ δεν παρατηρείται το μητρικό αλληλίο. Διαταραχή του προτύπου της μεθυλίωσης παρατηρήθηκε σε 35 εκ των συνολικά 85 ασθενών (41,2%) με μυελοειδείς κακοήθειες. Μη-φυσιολογική μεθυλίωση παρατηρήθηκε σε 15 ασθενείς (34,9%) με ΜΔΣ και ανιχνεύθηκε επίσης σε 20 ασθενείς (47,6%) με OMA. Το φυσιολογικό μοτίβο μεθυλίωσης των CpG νησίδων του ICR του γονιδίου SNRPN χαρακτηρίζεται από 2 μπάντες, μία αντιστοιχεί στο μεθυλιωμένο μητρικό αλληλίο και παράγει προϊόν κατά την MSP μεγέθους 174 bp, ενώ η δεύτερη μπάντα με προϊόν MSP 100 bp αντιστοιχεί στο μη-μεθυλιωμένο πατρικό αλληλίο. Στην περίπτωση μη-φυσιολογικού μοτίβου της μεθυλίωσης του ICR του εν

λόγω γονιδίου παρατηρείται μόνο το μεθυλιωμένο μητρικό γονίδιο ενώ το πατρικό μη-μεθυλιωμένο γονίδιο δεν παράγεται κατά την MSP. Ανώμαλη μεθυλίωση παρατηρήθηκε σε 36 εκ των 85 συνολικά ασθενών (42,4%) με μυελοειδείς κακοήθειες που μελετήθηκαν. Δεκαπέντε ασθενείς (34,9%) με ΜΔΣ εμφάνιζαν μόνο το μητρικό αλληλίο ενώ οι υπόλοιποι 28 (65,1%) εμφάνιζαν τόσο το μητρικό όσο και το πατρικό αλληλίο. Εικοσιένιας ασθενείς (50%) με ΟΜΛ παρουσίαζαν ανώμαλη ICR CpG μεθυλίωση. Η μεθυλίωση των CpG νησίδων του ICR του γονιδίου MEG3 συσχετιζόταν με σημαντικά μειωμένη συνολική επιβίωση των ασθενών με ΟΜΛ (HR=1.98, p=0.047). Στην περίπτωση των ασθενών με ΜΔΣ παρατηρήθηκε μία τάση για μειωμένη συνολική επιβίωση (HR=2.15, p=0.072) εκείνων που παρουσίαζαν ανώμαλη μεθυλίωση του γονιδιακού υποκινητή. Η ανώμαλη μεθυλίωση του γονιδίου SNRPN δεν συσχετιζόταν με την συνολική επιβίωση των ασθενών με μυελοειδείς κακοήθειες (HR=1.08, p=0.85). Το μη φυσιολογικό αυτό πρότυπο της μεθυλίωσης του ICR του γονιδίου MEG3 παρατηρήθηκε σε 12 από τα 21 (57,1%) δείγματα μυελού των οστών ασθενών με ΠΜ και υπήρχε συσχέτιση με το στάδιο της νόσου. Σε κανένα από τα δείγματα των μαρτύρων δεν ήταν ορατό μη φυσιολογικό πρότυπο μεθυλίωσης, διαφορά η οποία ήταν στατιστικά σημαντική (p=0.004).

Συμπεράσματα: Τα γονίδια τα οποία μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή, εμπλέκονται στην παθογένεια αναπτυξιακών διαταραχών όπως η μονογονική δισωμία 14, το σύνδρομο Angelman και το σύνδρομο Prader-Willi. Καθώς τα συγκεκριμένα γονίδια παρουσιάζουν ιδιότητες ογκοκατασταλτικών γονιδίων θεωρείται ότι η σίγαση-αποσιώπηση της μεταγραφής λόγω της ανώμαλης μεθυλίωσης τους μπορεί να τους προσδίδει παθογενετική αξία στις αιματολογικές κακοήθειες. Παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία σημαντικό ποσοστό ανώμαλης μεθυλίωσης των δύο γονιδίων σε ασθενείς με ΜΔΣ, ΟΜΛ και ΠΜ και συσχέτιση αυτής με το στάδιο της νόσου και με τη συνολική επιβίωση.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ

Cell differentiation and gene methylation in hematological malignancies

Leonidas Benetatos

Abstract

Background: Cell differentiation represents a normal developmental process of all living beings. When a cell acquires its identity it is very improbable that its fate could be reversed even if the cell is situated in another environment. Cell differentiation necessitates no changes in the sequence of DNA and it seems that is under epigenetic control. In order to achieve normal cell differentiation it is necessary that some genes are silenced and not expressed in a cell-specific manner. The epigenetic mechanism that has been best studied is DNA methylation which is associated with gene transcriptional silencing and occurs in cytosines that proceed guanines in genome sequence. The reaction is catalyzed by DNA methyltransferases which attack a methylgroup in the C5 position in the cytosine ring structure. Epigenetic changes represent the first step of cell differentiation. Although epigenetic control establish early during development and cell differentiation, continuous readjustment occurs during cell cycle as response to internal and external stimuli resulting in oncogenesis.

Aim: Aim of the study is to observe the methylation pattern of the MEG3 and SNRPN imprinted genes in patients with acute myeloid leukemia (AML), myelodysplastic syndromes (MDS), and multiple myeloma (MM). Moreover, aberrant methylation is correlated with overall survival, disease stage, disease subtypes, cytogenetic abnormalities, and blood counts.

Patients and Methods: Bone marrow genomic DNA of 85 newly diagnosed and previously untreated patients with AML (42 patients-49.4%) and MDS (43 patients-50.6%) who presented at the Department of Haematology of the University Hospital of Ioannina were evaluated. There were 57 males (67.1%), and 28 female patients (32.9%) with a mean age 71.8 ± 13.3 years (range 16-92). All individuals were classified according to the WHO classification, and patients with MDS were re-validated in order to fulfil the diagnostic criteria recently published. The recently proposed WHO classification-based prognostic scoring system for MDS (WPSS) was used for risk stratification of MDS patients. Bone marrow

samples were also obtained, from 21 MM patients. Diagnosis of MM was based on previously published criteria. There were 21 patients (11 males-10 females) with median age 66.5 years (range 48-85 years). The MM subtypes were as following: IgG 17 patients (80.96%), IgA 3 patients (14.28%), IgM 1 patient (4.76%). DNA was extracted from bone marrow nucleated cells collected in EDTA containing tubes, and bisulphite treatment was performed using the QIAmp® DNA Mini Kit, (Qiagen), and EZ DNA methylation kit (Zymo Research) respectively according to manufacturers' instructions. The methylation status of both genes was determined by using conventional methylation specific PCR (MSP). For MSP reaction we used the HotStarTaq Master Mix kit of Qiagen.

Results: The normal pattern of MEG3 consists of 2 bands (alleles), namely one corresponding to the methylated paternal allele, (size 160 bp) and one corresponding to the unmethylated maternal allele (size 120 bp). In abnormal methylated samples only the methylated (paternal) allele (160bp) can be observed, while the unmethylated (maternal) allele (120 bp) is not generated. Abnormal methylation pattern of the MEG3 DMR was observed in 35 out of 85 patients (41.2%) evaluated with myeloid malignancies (i.e. MDS and AML patients). In particular, the aberrant methylation was observed in 15 MDS patients (34.9 %) and in 20 individuals (47.6%) with AML. Patients with RAEB-I were 20 fold more likely to present the MEG3 gene abnormally methylated (OR=20, p=0.027). The normal pattern of SNRPN consists of 2 bands, one corresponding to the methylated maternal allele, (size 174 bp) and a further band corresponding to the unmethylated paternal allele (size 100 bp). In the case of DMR aberrant methylation only the methylated (maternal) allele is observed, while the unmethylated (paternal) allele is not. Abnormal methylation was found in 36 patients (42.4%) of the 85 studied. With regard to MDS patients, 15 patients (34.9%) presented only the maternal allele, and twenty one AML individuals (50%) had SNRPN CpG methylation. MEG3's DMR CpG methylation was associated with significant reduced OS in AML patients (HR=1.98, p=0.047), while SNRPN was not associated with OS (HR=0.94, p=0.87). In MDS, there was a trend in patients with abnormal MEG3 methylation for reduced overall survival (HR=2.15, p=0.072). SNRPN aberrant methylation was not associated with OS (HR=1.08, p=0.85). All patients were also subdivided in three groups whether they presented no abnormally methylated gene (group A: 36 patients, 42.4%), one methylated gene (group B: 27 patients, 31.8%), and both genes methylated (group C: 22 patients, 25.9%). Patients in group A had a median OS of 11 months (IQR: 4-11 months), patients in group B had a median OS

of 12 months (IQR: 2-36 months), while patients in group C had a median OS of 3.5 months (IQR: 1.5-8 months). There was no significant difference in OS comparing the patients of group A and those of group B (HR=1.06, p=0.86, 95% CI: 0.57-1.95), but when patients of group A were compared to those of group C there was a significant difference in OS (HR=2.13, p=0.017). Comparison of groups B and C demonstrated a significant difference in OS (HR=2.02, p=0.033). Same analysis for MDS patients between groups A and B (HR=1.08, p=0.86, groups A and C (HR=2.14, p=0.14), and between groups B and C (HR=1.97, p=0.21) demonstrated no significant difference in OS. In AML patients no significant association between the three groups was also observed: [(HR=0.9, p=0.82), (HR=1.6, p=0.24), (HR=1.76, p=0.18)] respectively. In abnormally methylated MM samples only the methylated allele, while the unmethylated allele was not generated. Abnormal methylation pattern of the MEG3 DMR was observed in 12 of the 21 marrow samples (57.14%). According to the DS prognostic system, of the 12 patients with altered DMR, 2 (16.65%) belonged to stage I, 3 (25%) to stage II, and 7 (58.35%) to stage III. Using the SWOG system the same alteration was observed in 2 (16.67%) stage I patients, in 3 (25%) stage II patients, in 3 (25%) stage III patients, and in 4 (33.33%) stage IV patients. Finally, according to the IPI system 1 (8.34%) patient was stage I, 5 (41.66%) were stage II, and 6 (50%) were stage III.

Conclusions: In the present study, we have shown that MEG3 and SNRPN DMR aberrant methylation occurs in an important portion of patients with myeloid malignancies (41.2% and 42.4% respectively), and in 57.14% of MM patients. Methylation was more frequent in AML than in MDS for both genes studied but that difference was not statistically significant. Although SNRPN CpG methylation was more frequent than MEG3, it was demonstrated that MEG3 abnormal methylation had an impact on OS in AML and a higher risk of death in MDS, a finding that was not verified for SNRPN. Moreover, patients who presented two abnormally hypermethylated genes had a poorer OS compared to those patients where none gene was methylated, or where one gene was methylated. We did not observe any statistically correlation between WHO subtypes, WPSS score, haemoglobin level, white blood cell count, cytogenetic abnormalities, and MEG3 or SNRPN CpG methylation, although RAEB-I patients were 20 fold more likely to present MEG3 hypermethylation. We also found that patients with AML following MDS or MDS/MPD presented altered methylation profile in 50% and in 63.3% of MEG3 and SNRPN respectively, comparing to 34.9% of the MDS patients. This difference may indicate that aberrant methylation of the specific genes may be

accentuated during MDS progression to AML. No abnormal methylation was determined in any of the control group subjects ($p=0.007$ for both genes) indicating that this specific epigenetic phenomenon occurs only in patients with malignancies (myeloid malignancies in our case) and may be an important way of inactivation of the tumor suppressor genes studied. Again, MEG3 aberrant DNA methylation was associated with disease stage in MM. To date, this is the first report investigating the aberrant methylation profile in MDS, AML, and MM patients of two imprinted genes, already known to be implicated in developmental disorders and in cancer. These data also showed a prognostic impact of MEG3 methylation on overall survival. The biological significance of MEG3 and SNRPN in normal hematopoiesis and oncogenesis is not completely understood and we suggest that methylation of these genes may be involved in disease pathogenesis. However, additional studies that will establish the specific pathogenetic pathways of action of the specific genes are necessary. Furthermore, as two nucleoside inhibitors of DNA methylation, azacitidine and decitabine are standard of care in MDS, there is proof of principle for epigenetic therapy.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ng RK, Gurdon JB. Epigenetic inheritance of cell differentiation status. *Cell Cycle*. 2008;7:1173-1177.
2. Lotem J, Sachs L. Epigenetics wins over genetics: induction of differentiation in tumor cells. *Semin Cancer Biol*. 2002;12:339-346.
3. von Wangenheim KH, Peterson HP. The role of cell differentiation in controlling cell multiplication and cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2008;134:725-741.
4. Moore MA. Converging pathways in leukemogenesis and stem cell self-renewal. *Exp Hematol*. 2005;33:719-737.
5. Rosmarin AG, Yang Z, Resendes KK. Transcriptional regulation in myelopoiesis: Hematopoietic fate choice, myeloid differentiation, and leukemogenesis. *Exp Hematol*. 2005;33:131-143.
6. Li X, Zhao X. Epigenetic regulation of mammalian stem cells. *Stem Cells Dev*. 2008;17:1043-1052.
7. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell*. 2007;128:635-638.
8. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*. 2008;358:1148-1159.
9. Delcuve GP, Rastegar M, Davie JR. Epigenetic control. *J Cell Physiol*. 2009;219:243-250.
10. Plass C, Soloway PD. DNA methylation, imprinting and cancer. *Eur J Hum Genet*. 2002;10:6-16.
11. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*. 2003;349:2042-2054.
12. Baylin SB. Mechanisms underlying epigenetically mediated gene silencing in cancer. *Semin Cancer Biol*. 2002;12:331-337.
13. Kim JK, Samaranyake M, Pradhan S. Epigenetic mechanisms in mammals. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66:596-612.
14. Illingworth RS, Bird AP. CpG islands--'a rough guide'. *FEBS Lett*. 2009;583:1713-1720.

15. Preston RJ. Epigenetic processes and cancer risk assessment. *Mutat Res.* 2007;616:7-10.
16. Hirst M, Marra MA. Epigenetics and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41:136-146.
17. Davuluri RV, Suzuki Y, Sugano S, et al. The functional consequences of alternative promoter use in mammalian genomes. *Trends Genet.* 2008;24:167-177.
18. Grønbaek K, Hother C, Jones PA. Epigenetic changes in cancer. *APMIS.* 2007;115:1039-1059.
19. Esteller M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum Mol Genet.* 2007;16 Spec No 1:R50-59.
20. Ohgane J, Yagi S, Shiota K. Epigenetics: the DNA methylation profile of tissue-dependent and differentially methylated regions in cells. *Placenta.* 2008;29 Suppl A:S29-35.
21. Gopalakrishnan S, Van Emburgh BO, Robertson KD. DNA methylation in development and human disease. *Mutat Res.* 2008;647:30-38.
22. Mohn F, Schübeler D. Genetics and epigenetics: stability and plasticity during cellular differentiation. *Trends Genet.* 2009;25:129-136.
23. Reik W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature.* 2007;447:425-432.
24. Hsiao SH, Huang TH, Leu YW. Excavating relics of DNA methylation changes during the development of neoplasia. *Semin Cancer Biol.* 2009;19:198-19208.
25. Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet.* 2005;6:597-610.
26. Issa JP. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2004;4:988-993.
27. Ting AH, McGarvey KM, Baylin SB. The cancer epigenome--components and functional correlates. *Genes Dev.* 2006;20:3215-3231.
28. Dobrovic A, Kristensen LS. DNA methylation, epimutations and cancer predisposition. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41:34-39.
29. Kanai Y. Alterations of DNA methylation and clinicopathological diversity of human cancers. *Pathol Int.* 2008;58:544-558.
30. Santos-Rebouças CB, Pimentel MM. Implication of abnormal epigenetic patterns for human diseases. *Eur J Hum Genet.* 2007;15:10-17.

31. Nagase H, Ghosh S. Epigenetics: differential DNA methylation in mammalian somatic tissues. *FEBS J.* 2008;275:1617-1623.
32. Prokhortchouk E, Defossez PA. The cell biology of DNA methylation in mammals. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1783:2167-2173.
33. Galm O, Herman JG, Baylin SB. The fundamental role of epigenetics in hematopoietic malignancies. *Blood Rev.* 2006;20:1-13.
34. Das PM, Singal R. DNA methylation and cancer. *J Clin Oncol.* 2004;22:4632-4642.
35. Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet.* 2000;16:168-174.
36. Lehmann U, Brakensiek K, Kreipe H. Role of epigenetic changes in hematological malignancies. *Ann Hematol.* 2004;83:137-152.
37. Lopez-Serra L, Esteller M. Proteins that bind methylated DNA and human cancer: reading the wrong words. *Br J Cancer.* 2008;98:1881-1885.
38. Esteller M. Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes. *Br J Cancer.* 2006;94:179-183.
39. Claus R, Lübbert M. Epigenetic targets in hematopoietic malignancies. *Oncogene.* 2003 ;22:6489-6496.
40. Rice KL, Hormaeche I, Licht JD. Epigenetic regulation of normal and malignant hematopoiesis. *Oncogene.* 2007;26:6697-6714.
41. Rush LJ, Plass C. Alterations of DNA methylation in hematologic malignancies. *Cancer Lett.* 2002;185:1-12.
42. Esteller M. Profiling aberrant DNA methylation in hematologic neoplasms: a view from the tip of the iceberg. *Clin Immunol.* 2003;109:80-88.
43. Mihara K, Takihara Y, Kimura A. Genetic and epigenetic alterations in myelodysplastic syndrome. *Cytogenet Genome Res.* 2007;118:297-303.
44. Toyota M, Kopecky KJ, Toyota MO, et al. Methylation profiling in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2001;97:2823-2829.
45. Ekmekci CG, Gutiérrez MI, Siraj AK, et al. Aberrant methylation of multiple tumor suppressor genes in acute myeloid leukemia. *Am J Hematol.* 2004;7:233-240.
46. Jiang Y, Dunbar A, Gondek LP, et al. Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. *Blood.* 2009;11:1315-1325.
47. Melki JR, Clark SJ. DNA methylation changes in leukaemia. *Semin Cancer Biol.* 2002;12:347-357.

48. Nervi C, Fazi F, Grignani F. Oncoproteins, heterochromatin silencing and microRNAs: a new link for leukemogenesis. *Epigenetics*. 2008;3:1-4.
49. Krug U, Ganser A, Koeffler HP. Tumor suppressor genes in normal and malignant hematopoiesis. *Oncogene*. 2002;21:3475-3495.
50. Baylin SB. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol*. 2005;2 Suppl 1:S4-11.
51. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*. 2002;3:415-428.
52. Ideraabdullah FY, Vigneau S, Bartolomei MS. Genomic imprinting mechanisms in mammals. *Mutat Res*. 2008;647:77-85.
53. Wood AJ, Oakey RJ. Genomic imprinting in mammals: emerging themes and established theories. *PLoS Genet*. 2006;2:e147.
54. Pauler FM, Koerner MV, Barlow DP. Silencing by imprinted noncoding RNAs: is transcription the answer? *Trends Genet*. 2007;23:284-292.
55. Morison IM, Ramsay JP, Spencer HG. A census of mammalian imprinting. *Trends Genet*. 2005;21:457-465.
56. Wilkins JF. Genomic imprinting and methylation: epigenetic canalization and conflict. *Trends Genet*. 2005;21:356-365.
57. Kiefer JC. Epigenetics in development. *Dev Dyn*. 2007;236:1144-1156.
58. Peters J, Robson JE. Imprinted noncoding RNAs. *Mamm Genome*. 2008;19:493-502.
59. Mattick JS. The genetic signatures of noncoding RNAs. *PLoS Genet*. 2009;5:e1000459.
60. Garzon R, Croce CM. MicroRNAs in normal and malignant hematopoiesis. *Curr Opin Hematol*. 2008;15:352-358.
61. Zhou Y, Zhong Y, Wang Y, et al. Activation of p53 by MEG3 non-coding RNA. *J Biol Chem*. 2007;282:24731-24742.
62. Kinoshita T, Ikeda Y, Ishikawa R. Genomic imprinting: a balance between antagonistic roles of parental chromosomes. *Semin Cell Dev Biol*. 2008;19:574-579.
63. Jelinic P, Shaw P. Loss of imprinting and cancer. *J Pathol*. 2007;211:261-268.
64. Munshi A, Duvvuri S. Genomic imprinting - the story of the other half and the conflicts of silencing. *J Genet Genomics*. 2007;34:93-103.
65. Schmidt JV, Matteson PG, Jones BK, et al. The *Dlk1* and *Gtl2* genes are linked and reciprocally imprinted. *Genes Dev*. 2000;14:1997-2002.

66. Murphy SK, Wylie AA, Coveler KJ, et al. Epigenetic detection of human chromosome 14 uniparental disomy. *Hum Mutat.* 2003;22:92-97.
67. Zhang X, Zhou Y, Mehta KR, et al. A pituitary-derived MEG3 isoform functions as a growth suppressor in tumor cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:5119-5126.
68. Miyoshi N, Wagatsuma H, Wakana S, et al. Identification of an imprinted gene, *Meg3/Gtl2* and its human homologue MEG3, first mapped on mouse distal chromosome 12 and human chromosome 14q. *Genes Cells.* 2000;5:211-220.
69. Rosa AL, Wu YQ, Kwabi-Addo B, et al. Allele-specific methylation of a functional CTCF binding site upstream of MEG3 in the human imprinted domain of 14q32. *Chromosome Res.* 2005;13:809-818.
70. Zhao J, Dahle D, Zhou Y, et al. Hypermethylation of the promoter region is associated with the loss of MEG3 gene expression in human pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:2179-2186.
71. Geuns E, De Rycke M, Van Steirteghem A, et al. Methylation imprints of the imprint control region of the SNRPN-gene in human gametes and preimplantation embryos. *Hum Mol Genet.* 2003;12:2873-2879.
72. Bussey KJ, Lawce HJ, Himoe E, et al. SNRPN methylation patterns in germ cell tumors as a reflection of primordial germ cell development. *Genes Chromosomes Cancer.* 2001;32:342-352.
73. Kantor B, Makedonski K, Green-Finberg Y, et al. Control elements within the PWS/AS imprinting box and their function in the imprinting process. *Hum Mol Genet.* 2004;13:751-762.
74. Nicholls RD, Saitoh S, Horsthemke B. Imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Trends Genet.* 1998;14:194-200.
75. Perk J, Makedonski K, Lande L, et al. The imprinting mechanism of the Prader-Willi/Angelman regional control center. *EMBO J.* 2002;21:5807-5814.
76. Korshunov A, Sycheva R, Golanov A. Recurrent cytogenetic aberrations in central neurocytomas and their biological relevance. *Acta Neuropathol.* 2007;113:303-312.
77. The International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Hematol* 2003;121:749-757.
78. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood.* 2002;100:2292-2302.

79. Valent P, Horny HP, Bennett JM. Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. *Leuk Res.* 2007;31:727-736.
80. Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, et al. Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol.* 2007;25:3503-3510.
81. Fröhling S, Scholl C, Gilliland DG, et al. Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications. *J Clin Oncol.* 2005;23:6285-6295.
82. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:9821-9826.
83. Boultonwood J, Wainscoat JS. Gene silencing by DNA methylation in haematological malignancies. *Br J Haematol.* 2007;138:3-11.
84. Hess CJ, Errami A, Berkhof J, et al. Concurrent methylation of promoters from tumor associated genes predicts outcome in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2008;49:1132-1141.
85. Whitman SP, Hackanson B, Liyanarachchi S, et al. DNA hypermethylation and epigenetic silencing of the tumor suppressor gene, SLC5A8, in acute myeloid leukemia with the MLL partial tandem duplication. *Blood.* 2008;112:2013-2016.
86. Lenz G, Hutter G, Hiddemann W, et al. Promoter methylation and expression of DNA repair genes hMLH1 and MGMT in acute myeloid leukemia. *Ann Hematol.* 2004;83:628-633.
87. Agrawal S, Hofmann WK, Tidow N, et al. Müller-Tidow C. The C/EBPdelta tumor suppressor is silenced by hypermethylation in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2007;109:3895-3905.
88. Shimamoto T, Ohyashiki JH, Ohyashiki K. Methylation of p15(INK4b) and E-cadherin genes is independently correlated with poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Leuk Res.* 2005;29:653-659.
89. Wu SJ, Yao M, Chou WC, et al. Clinical implications of SOCS1 methylation in myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol.* 2006;135:317-323.
90. Aggerholm A, Holm MS, Guldberg P, et al. Promoter hypermethylation of p15INK4B, HIC1, CDH1, and ER is frequent in myelodysplastic syndrome and predicts poor prognosis in early-stage patients. *Eur J Haematol.* 2006;76:23-32.

91. Brakensiek K, Länger F, Schlegelberger B, et al. Hypermethylation of the suppressor of cytokine signalling-1 (SOCS-1) in myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol.* 2005;130:209-17.
92. Johan MF, Bowen DT, Frew ME, et al. Aberrant methylation of the negative regulators RASSF1A, SHP-1 and SOCS-1 in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2005;129:60-65.
93. Li J, Bench AJ, Vassiliou GS, et al. Imprinting of the human L3MBTL gene, a polycomb family member located in a region of chromosome 20 deleted in human myeloid malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:7341-7346.
94. Kuerbitz SJ, Pahys J, Wilson A, et al. Hypermethylation of the imprinted NNAT locus occurs frequently in pediatric acute leukemia. *Carcinogenesis.* 2002;23:559-564.
95. Brakensiek K, Länger F, Kreipe H, et al. Absence of p21(CIP 1), p27(KIP 1) and p57(KIP 2) methylation in MDS and AML. *Leuk Res.* 2005;29:1357-1360.
96. Chim CS, Wong AS, Kwong YL. Epigenetic inactivation of the CIP/KIP cell-cycle control pathway in acute leukemias. *Am J Hematol.* 2005;80:282-287.
97. Kikuchi T, Toyota M, Itoh F, et al. Inactivation of p57KIP2 by regional promoter hypermethylation and histone deacetylation in human tumors. *Oncogene.* 2002;21:2741-2749.
98. Astuti D, Latif F, Wagner K, et al. Epigenetic alteration at the DLK1-GTL2 imprinted domain in human neoplasia: analysis of neuroblastoma, pheochromocytoma and Wilms' tumour. *Br J Cancer.* 2005;92:1574-1580.
99. Kawakami T, Chano T, Minami K, et al. Imprinted DLK1 is a putative tumor suppressor gene and inactivated by epimutation at the region upstream of GTL2 in human renal cell carcinoma. *Hum Mol Genet.* 2006;15:821-830.
100. Schneider DT, Schuster AE, Fritsch MK, et al. Multipoint imprinting analysis indicates a common precursor cell for gonadal and nongonadal pediatric germ cell tumors. *Cancer Res.* 2001;61:7268-7276.
101. Chim CS, Kwong YL, Fung TK, et al. Methylation profiling in multiple myeloma. *Leuk Res* 2004;28:379-385.
102. Drucker L, Tohami T, Tartakover-Matalon S, et al. Promoter hypermethylation of

tetraspanin members contributes to their silencing in myeloma cell lines. *Carcinogenesis* 2006;27:197-204.

103. Wang Z, Zhang J, Zhang Y, et al. SPAN-XB core promoter sequence is regulated in myeloma cells by specific CpG dinucleotides associated with the MeCP2 protein. *Int J Cancer* 2006;119:2878-2884.
104. Turner JG, Gump JL, Zhang C, et al. ABCG2 expression, function, and promoter methylation in human multiple myeloma. *Blood* 2006;108:3881-3889.
105. Gonzalez-Paz N, Chng WJ, McClure RF, et al. Tumor suppressor p16 methylation in multiple myeloma: biological and clinical implications. *Blood* 2007;109:1228-1232.
106. Guillermin G, Depil S, Wolowicz D, et al. Different prognostic values of p15(INK4b) and p16(INK4a) gene methylations in multiple myeloma. *Haematologica* 2003;88:476-478.
107. Ribas C, Colleoni GW, Felix RS, et al. p16 gene methylation lacks correlation with angiogenesis and prognosis in multiple myeloma. *Cancer Lett* 2005;222:247-254.
108. Wylie AA, Murphy SK, Orton TC, et al. Novel imprinted DLK1/GTL2 domain on human chromosome 14 contains motifs that mimic those implicated in IGF2/H19 regulation. *Genome Res* 2000;10:1711-1718.
109. Stuhmer T, Chatterjee M, Hildebrandt M et al. Nongenotoxic activation of the p53 pathway as a therapeutic strategy for multiple myeloma. *Blood* 2005; 106:3609-3617.
110. Stuhmer T, Bargou RC. Selective pharmacologic activation of the p53-dependent pathway as a therapeutic strategy for hematologic malignancies. *Cell Cycle* 2006; 5:39-42.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ-ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

Τα αποτελέσματα της παρούσης διατριβής έχουν δημοσιευθεί στα κάτωθι περιοδικά:

1. Promoter hypermethylation of the MEG3 imprinted gene (DLK1/MEG3) in multiple myeloma

Benetatos L, Dasoula A, Hatzimichael E, Georgiou I, Syrrou M, Bourantas K L.

Clinical Lymphoma Myeloma 2008 Jun;8(3):171-5.

2. CpG methylation analysis of the MEG3 and SNRPN imprinted genes in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes.

Benetatos L, Hatzimichael E, Dasoula A, Dranitsaris G, Tsiara S, Syrrou M, Georgiou I,

Bourantas KL.

Leuk Res. 2010 Feb;34(2):148-53.

Επίσης τμήματα της διατριβής έχουν ανακοινωθεί στα εξής συνέδρια:

1. Benetatos L., Dasoula A., Hatzimichael E., Georgiou I., Kapsali E., Bourantas K.,

Syrrou M.

Epigenetic alterations in dlk1/gtl 2 imprinting status in myelodysplastic syndromes; preliminary results.

11th Congress of the European Hematology Association. Amstredam,

Netherlands, 15-18 June 2006.

2. **Benetatos L.**, Dasoula A., Hatzimichael E., Georgiou I., Vassou A., Syrrou M.,
Bourantas K.

**Epigenetic modifications of the dlk1/gtl 2 imprinted genes in multiple myeloma and
Waldenstrom's macroglobulinemia; preliminary results**

11th Congress of the European Hematology Association. Amstredam, Netherlands, 15-18
June 2006.

3. **L. Benetatos**, A. Dasoula, E. Hatzimichael, G. Dranitsaris, M. Voukelatou, S. Tsiara, I.
Georgiou, K. Bourantas

**Methylation analysis of the snrpn and meg3 imprinted genes in acute myeloid
leukemia patients**

14th Congress of the European Hematology Association. Berlin, Germany June 4-7, 2009.

4. **L. Benetatos**, E. Hatzimichael, G. Dranitsaris, A. Dasoula, M. Syrrou, S. Tsiara, G.
Vartholomatos, M. Voukelatou, K. Bourantas

**Promoter hypermethylation status of the meg3 and snrpn imprinted genes in
myelodysplastic syndromes**

14th Congress of the European Hematology Association. Berlin, Germany June 4-7, 2009.

