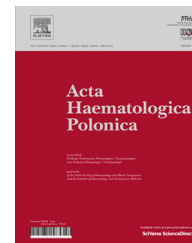


Contents lists available at [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Acta Haematologica Polonica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/achaem

Praca poglądowa/Review

Znaczenie mutacji genów modulujących zmiany epigenetyczne w ostrej białaczce szpikowej



Mutations in epigenetic modifier genes and their role in acute myeloid leukemia

Małgorzata Zajac*, Krzysztof Giannopoulos

Samodzielna Pracownia Hematoonkologii Doświadczalnej Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Kierownik: prof. dr hab. Krzysztof Giannopoulos, Lublin, Polska

INFORMACJE O ARTYKULE

Historia artykułu:

Otrzymano: 20.05.2013

Zaakceptowano: 18.11.2013

Dostępne online: 26.11.2013

Słowa kluczowe:

- ostra białaczka szpikowa
- epigenetyka
- mutacje TET2
- mutacje IDH1/2
- mutacje EZH2
- mutacje DNMT3A
- mutacje ASXL1

Keywords:

- Epigenetic
- AML
- TET2 mutations
- IDH1/2 mutations
- EZH2 mutations
- DNMT3A mutations
- ASXL1 mutations

ABSTRACT

The epigenetic regulation is a complex process that affects the gene expression. Recent studies revealed aberrant DNA methylation patterns in acute myeloid leukemia (AML) patients suggesting the significant role of these alterations in leukemogenesis. Additionally, the next generation sequencing (NGS) technology uncover mutations of IDH1/2, TET2, DNMT3A and EZH2 genes involved in DNA methylation processes or post translational histone modifications. Although, the functional application and precise mechanism in which the mutations contribute to impaired haematopoiesis remain elusive, emerging evidences indicate the complexity of epigenetic deregulation processes which cooperate with AML recurrent mutations leading to malignant transformation.

© 2013 Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów, Instytut Hematologii i Transfuzjologii. Published by Elsevier Urban & Partner Sp. z o.o. All rights reserved.

* Adres do korespondencji: Samodzielna Pracownia Hematoonkologii Doświadczalnej, ul. Chodźki 4a, 20-093 Lublin, Polska. Tel.: +48 81 756 48 12; fax: +48 81 756 48 13.

Adres email: malgosia.zajac07@gmail.com (M. Zajac).

Wprowadzenie

Termin „epigenetyka” odnosi się do dziedzicznej regulacji ekspresji genów, która nie jest zależna od zmian w sekwencji DNA. Zmiany epigenetyczne obejmujące metylację DNA lub modyfikację histonów grają kluczową rolę w warunkowaniu struktury chromatyny oraz regulowaniu prawidłowej ekspresji genów. Utrata kontroli nad tymi procesami może prowadzić do powstania nieprawidłowej struktury chromatyny i deregulacji aktywności transkrypcyjnej [1].

W ciągu ostatnich lat opisano nieprawidłowy profil metylacji DNA u pacjentów z ostrą białaczką szpikową (AML) [2–6], wykazując tym samym jego istotną rolę w patogenezie tej choroby [2, 3, 5–8]. Zmiany te charakteryzowały się obniżoną zawartością 5-metylocytozyny (5-mc) z jednoczesną hipermetylacją regionów promotorowych, w szczególności wysp CpG. Podczas gdy hipometylacja DNA może skutkować niestabilnością genomu, zwiększając liczbę aberracji genetycznych, hipermetylacja miejsc promotorowych związana jest z nieprawidłowym wyciszeniem genów supresorów nowotworowych. Używając technologii HELP (*HpaII* tiny fragment Enrichment by Ligation-mediated PCR) opartej na analizie mikromacierzy określających stopień metylacji regionów promotorowych, Figueroa i wsp. [4] wyróżnili 16 grup wśród pacjentów AML charakteryzujących się swoistym profilem metylacji DNA. Co ciekawe, 11 spośród wyodrębnionych grup korelowało z obecnością specyficznych zmian cytogenetycznych lub molekularnych.

Biorąc pod uwagę współwystępowanie nieprawidłowości genetycznych i epigenetycznych, bardziej prawdopodobna wydaje się hipoteza, że deregulacja na poziomie epigenetycznym współdziała ze zmianami genetycznymi w rozwoju i progresji nowotworów [1]. Głębsze poznanie mechanizmów epigenetycznej kontroli ekspresji genów może stać się szczególnie wartościowe, biorąc pod uwagę możliwość ich modyfikacji.

Na przełomie kilku ostatnich lat technologia „głębokiego sekwencjonowania” NGS (*next generation sequencing*) pozwoliła na zidentyfikowanie wielu mutacji genów AML, dostarczając tym samym wgląd w mechanizm leukemogenezy i ujawniając ogromną heterogenność molekularną, szczególnie grupy z prawidłowym karyotypem (CN-AML) [9, 10]. Wyjątkowo interesujący wydaje się fakt, że część mutacji dotyka genów bezpośrednio zaangażowanych lub mogących mieć znaczenie w epigenetycznej regulacji transkrypcji. W przeciągu ostatnich kilku lat mutacje w genach *TET2*, *IDH1*, *IDH2*, *DNMT3A* oraz *EZH2* zostały określone u chorych na przewlekłe mieloproliferacje (MPN), zespoły mielodysplastyczne (MDS) i AML. Chociaż funkcjonalne znaczenie tych mutacji w nieprawidłowej hematopoezie i nowotworzeniu nie jest całkowicie wyjaśnione, wydają się one mieć wartość rokowniczą i mogą służyć jako czynniki stratyfikacji pacjentów. Ponadto mutacje niektórych genów zaangażowanych w regulację epigenetyczną mogą swoiście wpływać na metylację DNA i/lub na potranslacyjną modyfikację histonów w sposób możliwy do wykorzystania w terapii.

Mutacje *IDH1* i *IDH2*

Geny *IDH1* i *IDH2* (*isocitrate dehydrogenase 1/2*) kodują enzymy cytozolowe: dehydrogenazy izocytrynianu 1 i 2 zaangażowane w reakcje cyklu Krebsa. Uczestniczą one w wielu procesach metabolizmu komórkowego, takich jak synteza lipidów oraz obrona przed stresem oksydacyjnym [11]. Są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania komórek, ponieważ biorą udział w procesach proliferacji i wzrostu.

Funkcją enzymu *IDH1* jest dekarboksylacja izocytrynianu do α -ketoglutaranu (α -KG), prowadząca do produkcji NAD-P. Gen *IDH2* koduje homologiczny enzym, katalizujący tę samą reakcję w mitochondriach. Mutacje genów *IDH1/2* są częstymi nieprawidłowościami występującymi w glejakach o niskim stopniu złośliwości. Opisano je również w niewielkiej grupie chorych z glioblastoma o wysokim stopniu złośliwości, gdzie wydają się korzystnie wpływać na rokowanie pacjentów [12–14].

Wykorzystując technikę sekwencjonowania całego genomu w ostatnich latach, określono występowanie mutacji genów *IDH1/2* w nowotworach hematologicznych, takich jak MDS, MPN czy AML [15, 16].

Mutacje genu *IDH1* dotyczą reszty argininy w pozycji 132 (R132), rzadziej znajdowane są w reszcie argininy w pozycji 172 (R172). Występują u 6–8% pacjentów AML [17–19] i u 10–12% pacjentów CN-AML [18, 20]. Interesujące jest to, że mutacje *IDH1* R132 są związane z mutacjami *NPM1* wśród chorych CN-AML, gdzie były zidentyfikowane na poziomie 14% [17–19, 21], co wskazywało na współdziałanie obu zmian w rozwoju choroby.

Wszystkie mutacje *IDH1/2* są heterozygotyczne i prowadzą do zmiany informacji genetycznej, co sugeruje możliwość nabywania nowych funkcji przez zmienione białko [22].

Zmutowana forma enzymu *IDH* katalizuje redukcję α -ketoglutaranu do 2-hydroksyglutaranu (2-HG). 2-HG jest metabolitem fizjologicznie występującym w komórkach na bardzo niskim poziomie. Niektórzy badacze twierdzą, że akumulacja związku 2-HG odgrywa ważną rolę w procesie nabywania nowych funkcji przez zmutowany enzym i przyczynia się do rozwoju nowotworu [11, 22, 23]. Gross i wsp. [22] wykazali, że mutacje *IDH1* R132 prowadzą do produkcji i akumulacji 2-HG w blastach AML, przez co poziom tego związku jest ponad 50-krotnie wyższy w porównaniu z prawidłowymi komórkami. Podwyższony poziom 2-HG wykryto również w surowicy pacjentów AML noszących zmiany w genach *IDH1/2* [22]. Ponadto u pacjentów z rzadką, dziedziczną chorobą – kwasicą 2-hydroksyglutarową zaobserwowano podwyższony poziom 2-HG wraz ze zwiększoną skłonnością do występowania nowotworów mózgu [24]. Dodatkowo 2-HG wykazuje homologiczną budowę do α -KG, dzięki czemu może wiązać się i oddziaływać z enzymami aktywowanymi przez α -KG. Wśród nich znajduje się hydroksylaza prolinowa regulująca czynnik transkrypcyjny HIF-1 α , zaangażowany w patogenezę wielu nowotworów [11, 22]. Innymi białkami hamowanymi przez zmieniony poziom α -KG są demetylazy histonów

JHDM (*the Jumonij family of histone demethylases*), które w przypadku mutacji *IDH1/2* nie spełniają prawidłowo swoich funkcji, co prowadzi do hipermetylacji reszt histonowych [25].

Badania nad nieprawidłowościami genów *IDH1/2* w glejokach sugerują, że są to zmiany występujące we wczesnych stadiach procesu patogenezy [26]. Wciąż jednak nie jest znany dokładny mechanizm wyjaśniający, w jaki sposób uczestniczą one w procesie leukemogenezy.

Ostatnio mutacje *IDH1/2* zostały powiązane z nieprawidłowym profilem hipermetylacji u chorych na AML [27]. Obszerne badania wykazały, że są one związane ze swoistym, nieprawidłowym profilem metylacji różnych miejsc promotorowych genów zaangażowanych w różnicowanie linii mieloidalnych [27]. Potencjalny mechanizm hipermetylacji i leukemogenezy u tych pacjentów może być związany z regulacją poziomu α -KG. Co więcej, α -KG jest kluczowym związkiem regulującym działanie białek z rodziny TET, będących ważnymi regulatorami procesów różnicowania komórek mieloidalnych oraz pobudzających demetylację [28].

Mutacje *IDH2* występują u 9–11% wszystkich pacjentów AML, z przewagą w grupie CN-AML [17, 29]. Zwykle dotyczą one kodonu w pozycji 140 i współwystępują z mutacjami *NPM1* [30], podczas gdy mutacje reszty 172 zachodzą bez współtowarzyszących nieprawidłowości molekularnych [31]. Co ciekawe, w przeciwieństwie do mutacji *IDH2* R140, *IDH2* R172 wydają się być swoiste dla AML. Znaczenie rokownicze mutacji *IDH2* wydaje się być zależne od kodonów objętych zmianą. Coraz więcej dowodów wskazuje, że mutacje *IDH2* R172 występujące u chorych na AML reprezentują wyraźną jednostkę chorobową. Charakteryzują się one brakiem współwystępowania z innymi nawracającymi mutacjami, opornością na terapię indukującą, swoistym profilem ekspresji genów (nadekspresja genów *APP*, *ID1*, *CXCL12*, *ABC1*), swoistym profilem mi-RNA oraz krótszym czasem przeżycia. Dodatkowo częściej identyfikowane są u chorych >60. roku życia [29].

Mutacje TET2

Doniesienia ostatnich kilku lat opisały białka z rodziny TET (*TET1-3*) jako enzymy katalizujące reakcję oksydacji 5-metylocytozyny do 5-hydroksymetylocytozyny (5-hmc) w cząsteczkach DNA komórek ssaków [28, 32]. Odkrycie to ukazało nowe możliwości regulacji epigenetycznej, gdzie 5-hmc mogłoby pełnić funkcję nowego regulatora transkrypcji.

Chociaż biologiczne znaczenie procesu oksydacji 5-mc przebiegającego za pośrednictwem białek z rodziny TET jest w dużej mierze nieokreślone, wysoki poziom 5-hmc w genomowym DNA sugeruje ich ważną rolę w procesach regulacji genów zależnych od 5-mc.

5-hmc jest cząsteczką hamującą aktywną metylację DNA [33]. Przez blokowanie wiązania białek MDB (*methyl-DNA binding proteins*) do zmetylowanego DNA wzmaga hamowanie metylacji i zapobiega wyciszaniu transkrypcji [33]. Dodatkowo, oksydacja 5-mc może przyczynić się do zmian poziomu tej zasady przez pośredniczenie w procesach biernej i aktywnej demetylacji. Zasada 5-hmc nie jest rozpoznawana przez metylazę DNA (*DNMT1*) w czasie replikacji [34],

w związku z czym konwersja 5-mc do 5-hmc uniemożliwia utrzymanie istniejącego poziomu metylacji i prowadzi do biernej demetylacji w proliferujących komórkach. Co więcej, 5-hmc może regulować strukturę chromatyny przez bezpośrednio rekrutowanie swoistych białek wiążących DNA [35].

Badania nad komórkami embrionalnymi wykazały zwiększony poziom 5-hmc w dinukleotydach CpG przy miejscach rozpoczęcia transkrypcji oraz regionach wewnątrzgenowych, wykazując, że zwiększony poziom 5-hmc w regionach regulatorowych jest związany ze zwiększoną ekspresją genów [36]. Badania ujawniające rolę 5-hmc w procesie demetylacji DNA potwierdzają niezbędną funkcję hydroksylazy TET w tych procesach [37].

Delhommeau i wsp. [38] po raz pierwszy opisali mutacje *TET2* (*the ten eleven translocation gene 2*) u pacjentów z MDS, MPN i AML z częstością występowania odpowiednio 10–20% dla MDS i MPN oraz 7–23% dla AML [38, 39]. W badaniach nad MDS i przewlekłą białaczką mielomonocytową (CMML) mutacje *TET2* zostały zidentyfikowane w komórkach CD34+, co sugeruje ich udział w ewolucji klonalnej [40]. Co ciekawe, większość mutacji jest heterozygotyczna i wskazuje na niewystarczające działanie supresorowe pozostałego niezmiennego allelu genu *TET2* [38].

Do tej pory badania nad mutacjami *TET2* w odniesieniu do całkowitego poziomu metylacji i poziomu 5-hmc u pacjentów AML są nieco sprzeczne. Późniejsze doniesienia ujawniły, że nieprawidłowości genu *TET2* prowadzą do zmiany i hamowania aktywności katalitycznej tego enzymu [41]. Te same badania wykazały obniżony poziom 5-hmc w DNA szpiku kostnego u pacjentów noszących tę mutację. W dodatku, wyłączenie funkcji genu *TET2* w modelu mysim prowadziło do hamowania różnicowania prekursorów hematopoety w hodowlach komórkowych [41].

W przeciągu ostatnich lat zauważono, że mutacje *TET2* bardzo rzadko współwystępują z mutacjami *IDH1* i *IDH2* [42]. Jak wspomniano wcześniej, prawdopodobny mechanizm warunkujący nieprawidłową metylację i leukemogenezę u pacjentów AML z nieprawidłowościami genów *IDH1/2* może być związany z obniżonym poziomem α -KG, od którego uzależniona jest aktywność enzymu *TET2* [8]. Inni badacze donoszą, że metabolit 2-HG, znacznie podwyższony u pacjentów z mutacją *IDH1/2*, może bezpośrednio hamować funkcję *TET2* [25]. Zatem obie zmiany mogą przyczynić się do nowotworzenia na drodze współdziałania, hamując funkcję białka *TET2*.

Chociaż wyniki badań dotyczące znaczenia klinicznego mutacji nie są jednoznaczne, przyjmuje się, że są one związane z gorszym rokowaniem w grupie pacjentów CN-AML [20] podczas gdy nie udowodniono ich wpływu na rokowanie dla pacjentów z MDS i MPN [42].

Mutacje EZH2

Grupa białek Polycomb (PcG) jest zaliczana do białek hamujących transkrypcję, kluczowych dla procesów regulacji różnicowania komórkowego i utrzymywania jednorodności komórkowej. W grupie białek PcG można wyróżnić kompleksy PRC1 i PRC2 (*polycomb repressive complex*) oraz kompleks PcG zidentyfikowany u muszek *Drosophila melanogaster*.

Kompleksy te inicjują i podtrzymują wyciszenie transkrypcji poprzez swoiste potranslacyjne modyfikacje histonów. EZH2 wraz z białkami SUZ12 i EED tworzą kompleks PRC2, który katalizuje potrójną metylację histonu H3 reszty lizyny 27 (H3K27me3), co prowadzi do kondensacji chromatyny i wyciszenia genów. EZH2 jest więc metylotransferazą swoistą dla H3K27. Nadekspresja EZH2 jest markerem zaawansowanych stanów wielu nowotworów, takich jak rak prostaty czy rak piersi [43]. Somatyczne, heterozygotyczne mutacje EZH2 (*enhancer of zeste homologue 2*), dotyczące reszty Y641 zostały niedawno zidentyfikowane u pacjentów z chłoniakiem rozlanym z dużych limfocytów B [44]. Chociaż biologiczne następstwa mutacji EZH2 w przebiegu chłoniaków nie są w pełni zrozumiałe, badania biochemiczne wykazały zwiększoną podwójną oraz potrójną metylację H3K27, pomimo uszkodzonej metylacji pojedynczych miejsc H3K27 [45]. Dodatkowo, hamowanie transkrypcji przez kompleks PRC2 zostało ostatnio zidentyfikowane jako ważny proces uczestniczący w patogenezie ostrej białaczki promielocytowej [46].

Mutacje EZH2 zostały niedawno zidentyfikowane u pacjentów z nowotworami szpiku, najczęściej znajdowane były u chorych z MDS, CMML i pierwotną mielofibrozą, rzadziej występowały w innych przewlekłych czy ostrych białaczkach [47, 48]. Badania *in vitro* sugerują, że mutacje powodują utratę funkcji białka, konieczne są jednak dodatkowe doświadczenia potwierdzające te dane.

Z jednej strony badania Herrera-Merchan i wsp. [49] wykazują, że ektopowa nadekspresja EZH2 skutkuje transformacją mieloidalną, co wskazuje na rolę EZH2 jako białka

onkogenego. Podwyższoną ekspresję genu EZH2 potwierdzono również w innych nowotworach [50].

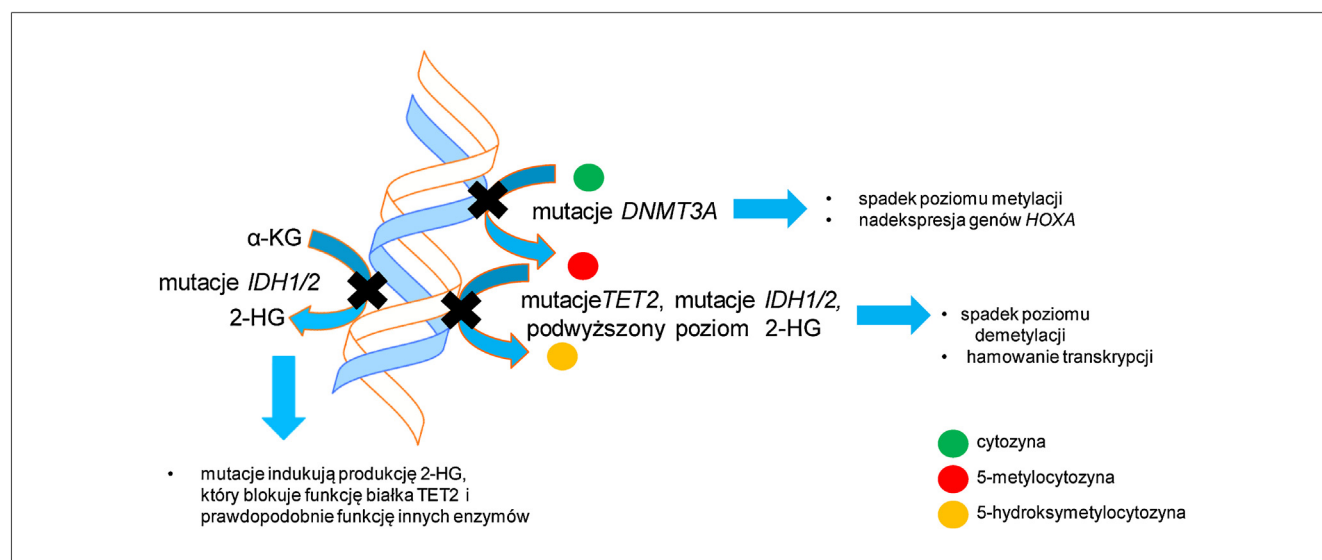
Z drugiej strony badania nad PRC1 czy PRC2 pokazują, że kompleksy te mogą pełnić funkcję supresorów nowotworowych poprzez wyciszenie mitogennych ścieżek przekazywania sygnału z udziałem białek JAK-STAT [51] i Notch [52].

Mutacje EZH2 są związane z krótszym czasem przeżycia u chorych pierwotną mielofibrozą (PMF) czy z MDS. Co więcej, gen EZH2 umiejscowiony jest w ramieniu długim chromosomu 7 (7q), którego delecja jest uznanym czynnikiem prognostycznym u pacjentów MDS czy AML [53].

Mutacje DNMT3A

Metylotransferazy DNA są enzymami odpowiedzialnymi za dodawanie grupy metylowej do reszt cytozyny dinukleotydów CpG łańcucha DNA. Enzymy te kodowane są przez trzy geny: DNMT1, DNMT3A i DNMT3B. Mutacje genu DNMT3A (*DNA methyltransferase 3A*) u chorych AML po raz pierwszy zostały opisane przez Ley'a i wsp. [54], stanowiły 20–22% przypadków *de novo* AML i związane były z gorszym rokowaniem i krótszym czasem przeżycia [55].

Większość mutacji DNMT3A skutkuje powstaniem skróconego białka (mutacje nonsensowne lub zmieniające ramkę odczytu) lub dotyczy pojedynczego aminokwasu w pozycji R882. Mutacje R882 stanowią 60% nieprawidłowości genu DNMT3A i powodują obniżenie zdolności wiązania DNA oraz spadek aktywności katalitycznej enzymu (Ryc. 1) [56]. Niektóre badania donoszą o ponad 50% spadku aktywności



Ryc. 1 – Mutacje genów modulujących zmiany epigenetyczne, ich wpływ na procesy metylacji i demetylacji DNA oraz biologiczne znaczenie w przebiegu AML. Procesy metylacji i demetylacji DNA biorą udział w regulacji epigenetycznej. Rycina przedstawia białka zaangażowane w procesy metylacji i demetylacji DNA, ulegające najczęściej mutacjom u chorych na AML. α -KG – α -ketoglutaran, 2-HG – 2-hydroksyglutaran, DNMT3A – gen kodujący metylotransferazę DNA, IDH1/2 – geny kodujące dehydrogenazy izocytrynianu 1 i 2, TET2 – gen kodujący dioksygenazę metylocytozyny.

Fig. 1 Mutation in epigenetic modifier genes, their role in DNA methylation/demethylation processes and biological relevance in acute myeloid leukemia

metylacji DNA w przypadku mutacji DNMT3A R882 [56]. Wyniki te uzyskano, badając wyłącznie zmutowane białka, natomiast w komórkach pacjentów AML noszących tą mutację nie wykryto zmienionego poziomu 5-mc czy też zmienionego profilu metylacji [54]. Fakt, że mutacje R882 pojawiają się wyłącznie jako zmiany heterozygotyczne, może sugerować udział zmutowanego allelu w transformacji nowotworowej [54].

Mutacje DNMT3A są również znajdowane u pacjentów z MDS oraz rzadziej u chorych z MPN. Niewiele wiadomo o czasie ich pojawiania się w trakcie rozwoju choroby. Niektóre badania wskazują, że mogą być one wczesnymi nieprawidłowościami ewolucji klonalnej [57].

Interesujący jest fakt, że mutacje te mogą być związane z grupą AML o pośrednim rokowaniu i współwystępują z mutacjami NPM1, FLT3-ITD i IDH1 [54].

Mutacje ASXL1

Gen ASXL1 (*the additional sex combs like 1*) należy do rodziny genów kodujących trzy słabo scharakteryzowane białka zaangażowane w regulację struktury chromatyny. Białko ASXL1 ma domenę PHD (*plant homeodomain*) zlokalizowaną

na końcu karboksylowym umożliwiającą wiązanie do umetylowanej reszty lizyny. Wraz z białkiem BAP1 składa się na kompleks PR-DUB (*Polycomb-repressive deubiquitylase complex*), powodujący deubikwitynację reszty lizyny 119 w histonie H2A (H2AK119) [58]. Najnowsze wyniki badań donoszą o możliwości oddziaływania białka ASXL1 z białkami kompleksu PRC2, tj. białkami EZH2 czy SUZ12, odpowiedzialnymi za potrójną metylację H3K27, a tym samym hamującymi transkrypcję [59].

Mutacje nonsensowne ASXL1 zostały zidentyfikowane w wielu nowotworach mieloidalnych, najczęściej występują u pacjentów MDS, PMF czy MPN [60, 61]. U chorych z MDS i AML są to zmiany związane z gorszym rokowaniem [62]. Co ciekawe, u pacjentów AML nieprawidłowości te wydają się być zależne od wieku (≥ 60 . roku życia) [62] i występują częściej u pacjentów z wcześniejszymi zaburzeniami hematologicznymi [63]. Oprócz PHD białko ASXL1 ma domeny przypuszczalnie odpowiedzialne za oddziaływanie z DNA, nie wykazano natomiast jego aktywności enzymatycznej [64]. Mutacje ASXL1 powodują utratę funkcji białka, a przez to utratę hamowania transkrypcji przez potrójną metylację H3K27 [59]. Odwrotnie, utrata ASXL1 nie skutkuje zmianami w ubikwitynacji H2AK119 w komórkach hematopoetycznych. Niedawno kompleksowe analizy genu ASXL1 ujawniły

Tabela I – Mutacje genów zaangażowanych w regulację epigenetyczną w AML
Table I Mutations in epigenetic modifier genes in AML

Gen	Funkcja	Częstość mutacji w AML (%)	Znaczenie kliniczne mutacji
IDH1/2	Gen IDH1 koduje enzym dehydrogenazę izocytrynianu zaangażowaną w reakcję cyklu Krebsa. IDH2 koduje homologiczny enzym, katalizujący tę samą reakcję w mitochondriach. Fizjologiczną funkcją enzymu jest dekarboksylacja izocytrynianu do α -KG. Zmutowana forma enzymu katalizuje reakcję redukcji α -KG do 2-HG, blokującą funkcję enzymu TET2 i prawdopodobnie funkcje innych enzymów.	15–33	Znaczenie kliniczne nie jest jednoznaczne. Większość badań wskazuje na korzystne rokowanie u chorych z mutacją IDH2-R140 oraz brak znaczenia klinicznego w przypadku mutacji IDH1-R132 i IDH2-R172 u chorych CN-AML.
TET2	Należy do rodziny białek TET, katalizujących reakcję oksydacji 5-mc do 5-hmc i pośredniczą w procesach demetylacji. Mutacje TET2 prowadzą do zmiany i hamowania aktywności katalitycznej enzymu, a w związku z tym spadkiem poziomu demetylacji.	7–23	Gorsze rokowanie u chorych CN-AML, wykazujących korzystne zmiany molekularne (mających mutacje CEBPA i/lub mutację NPM1 bez współistniejącej FLT3-ITD).
DNMT3A	Enzym DNMT3A odpowiedzialny jest za metylację DNA <i>de novo</i> . 60% mutacji DNMT3A dotyczy pojedynczego aminokwasu w pozycji R882 i powoduje obniżenie zdolności wiązania DNA oraz spadek aktywności enzymu. Mutacje DNMT3A są również powiązane z nadekspresją genów HOXA.	20–22	Związane z gorszym rokowaniem i obniżonym czasem przeżycia.
EZH2	Wraz z białkami SUZ1 i EED tworzy kompleks PRC2, który katalizuje potrójną metylację H3K27me3. Badania <i>in vitro</i> sugerują, że mutacje powodują utratę funkcji białka.	rzadko występujące	Związane są z krótszym czasem przeżycia u chorych z PMF i MDS.
ASXL1	Należy do rodziny genów kodujących słabo scharakteryzowane białka zaangażowane w regulację struktury chromatyny. Najnowsze badania donoszą o możliwości oddziaływania białka ASXL1 z białkami kompleksu PRC2, hamującymi transkrypcję. Mutacje powodują utratę funkcji białka, a przez to utratę hamowania transkrypcji.	5,2	Zmiany związane z gorszym rokowaniem u chorych AML i MDS.

PMF – *primary myelofibrosis*, MDS – *myelodysplastic syndrome*

wzrost ekspresji genów HOXA przy utracie lub mutacji genu ASXL1. Oprócz tego zaobserwowano znaczne obniżenie ilości białka EZH2 w kompleksach PRC w przypadku nieobecności białka ASXL1, co może być związane z istotną funkcją ASXL1 w procesie stabilizacji tych kompleksów w komórkach hematopoetycznych [59].

Podsumowanie

Tradycyjne wyjaśnienia patogenezy białaczek opierały się na przyczynach natury genetycznej obejmujących takie zjawiska, jak mutacje punktowe, delecje i rearanżacje chromosomowe. W ostatnich latach zwrócono jednak uwagę, że wiele zjawisk związanych z etiologią białaczek jest powiązanych z procesami regulacji epigenetycznej [65]. Odkrycie mutacji w genach zaangażowanych w regulację epigenetyczną ujawniło nowe mechanizmy przyczyniające się do transformacji nowotworowej. Mutacje w genach odpowiedzialnych za regulację metylacji DNA (*TET2*, *IDH1/2*, *DNMT3A*) i modyfikację histonów (*EZH2*, *ASXL1*) zostały zidentyfikowane w grupie pacjentów z nowotworami hematologicznymi, co sugeruje ich kluczowe funkcje w procesie hematopojezy. Ostatnie doniesienia wykazują, że zmiany te mogą być istotne dla rokowania pacjentów z MDS i AML (Tab. I) [6, 28].

Zakłócenie regulacji epigenetycznej powoduje nieprawidłową transkrypcję genów, wciąż jednak nie są poznane właściwe cząsteczki zmieniane w skutek mutacji czynników epigenetycznych oraz precyzyjne mechanizmy powodujące zmiany profilu metylacji, ekspresji genów czy fenotypu komórek hematopoetycznych.

Aktualne dane dotyczące badań genetycznych i czynnościowych sugerują, że mutacje regulatorów epigenetycznych mogą reprezentować co najmniej dwie nowe klasy mutacji wśród chorych na AML. Shih i wsp. [46] zakwalifikowali aberracje genów *TET2* i *IDH1/2* do grupy mutacji powodujących zaburzenie procesów hydroksymetylacji DNA. Mutacje genów *ASXL1* czy *DNMT3A* zostały natomiast zaliczone do grupy zmian bezpośrednio związanych z regulacją metylacji DNA i/lub stanem histonów. Dwie, nowo wyodrębnione klasy mogłyby przyczyniać się do transformacji nowotworowej poprzez zmianę ułożenia chromatyny oraz współdziałanie z efektami mutacji klas I i II. Kolejna hipoteza zakłada modulowanie efektów mutacji klas I i II, powodujące nieprawidłową metylację i/lub strukturę chromatyny, a przez to przyczyniające się do leukemogenezy. Wciąż jednak potrzebne są dodatkowe badania wyjaśniające, w jaki sposób różne kombinacje zaburzeń genetycznych mogą skutkować powstawaniem fenotypów o swoistych cechach biologicznych, wykazujących znaczenie rokownicze i podlegające swoistym schematom leczenia.

Wkład autorów/Authors' contributions

Według kolejności.

Konflikt interesu/Conflict of interest

Nie występuje.

Finansowanie/Financial support

Praca finansowana ze środków Uniwersytetu Medycznego w Lublinie jako projekt badawczy młodego naukowca nr MN sd 533.

Etyka/Ethics

Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

P I Ś M I E N N I C T W O / R E F E R E N C E S

- [1] Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007;128:683–692.
- [2] Alvarez S, Suela J, Valencia A, et al. DNA methylation profiles and their relationship with cytogenetic status in adult acute myeloid leukemia. *PLoS One* 2010;5:e12197.
- [3] Bullinger L, Ehrlich M, Dohner K, et al. Quantitative DNA methylation predicts survival in adult acute myeloid leukemia. *Blood* 2010;115:636–642.
- [4] Figueroa ME, Melnick A, Grealley JM. Genome-wide determination of DNA methylation by Hpa II tiny fragment enrichment by ligation-mediated PCR (HELP) for the study of acute leukemias. *Methods Mol Biol* 2009;538:395–407.
- [5] Figueroa ME, Reimers M, Thompson RF, et al. An integrative genomic and epigenomic approach for the study of transcriptional regulation. *PLoS One* 2008;3:e1882.
- [6] Figueroa ME, Skrabanek L, Li Y, et al. MDS and secondary AML display unique patterns and abundance of aberrant DNA methylation. *Blood* 2009;114:3448–3458.
- [7] Deneberg S, Grovdal M, Karimi M, et al. Gene-specific and global methylation patterns predict outcome in patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2010;24:932–941.
- [8] Figueroa ME, Lugthart S, Li Y, et al. DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2010;17:13–27.
- [9] Ding L, Ley TJ, Larson DE, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature* 2012;481:506–510.
- [10] Welch JS, Ley TJ, Link DC, et al. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell* 2012;150:264–278.
- [11] Reitman ZJ, Yan H. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: alterations at a crossroads of cellular metabolism. *J Natl Cancer Inst* 2010;102:932–941.
- [12] Ducray F, Marie Y, Sanson M. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* 2009;360:2248–2249.
- [13] Sanson M, Marie S, Paris S, et al. Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutations is an important prognostic biomarker in gliomas. *J Clin Oncol* 2009;27:4150–4154.
- [14] Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 2008;321:1807–1812.

- [15] Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med* 2009;361:1058–1066.
- [16] Tefferi A, Jimma T, Sulai NH, et al. IDH mutations in primary myelofibrosis predict leukemic transformation and shortened survival: clinical evidence for leukemogenic collaboration with JAK2V617F. *Leukemia* 2012;26:475–480.
- [17] Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik VI, et al. IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication. *J Clin Oncol* 2010;28:3636–3643.
- [18] Schnittger S, Haferlach C, Ulke M, et al. IDH1 mutations are detected in 6.6% of 1414 AML patients and are associated with intermediate risk karyotype and unfavorable prognosis in adults younger than 60 years and unmutated NPM1 status. *Blood* 2010;116:5486–5496.
- [19] Abbas S, Lugthart S, Kavelaars FG, et al. Acquired mutations in the genes encoding IDH1 and IDH2 both are recurrent aberrations in acute myeloid leukemia (AML): prevalence and prognostic value. *Blood* 2010;116:2122–2126.
- [20] Patel KP, Ravandi F, Ma D, et al. Acute myeloid leukemia with IDH1 or IDH2 mutation: frequency and clinicopathologic features. *Am J Clin Pathol* 2011;135:35–45.
- [21] Green CL, Evans CM, Hills RK, et al. The prognostic significance of IDH1 mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia is dependent on FLT3/ITD status. *Blood* 2010;116:2779–2782.
- [22] Gross S, Cairns RA, Minden MD, et al. Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations. *J Exp Med* 2010;207:339–344.
- [23] Reitman ZJ, Parsons DW, Yan H. IDH1 and IDH2: not your typical oncogenes. *Cancer Cell* 2010;17:215–216.
- [24] Kölker S, Pawlak V, Ahlemeyer B, et al. NMDA receptor activation and respiratory chain complex V inhibition contribute to neurodegeneration in d-2-hydroxyglutaric aciduria. *Eur J Neurosci* 2002;16:21–28.
- [25] Xu W, Yang H, Liu Y, et al. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell* 2011;19:17–30.
- [26] Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am J Pathol* 2009;174:1149–1153.
- [27] Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell* 2010;18:553–567.
- [28] Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, et al. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* 2010;466:1129–1133.
- [29] Marcucci G, Maharry K, Wu YZ, et al. IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 2010;28:2348–2355.
- [30] Rakheja D, Konoplev S, Medeiros LJ, Chen W. IDH mutations in acute myeloid leukemia. *Hum Pathol* 2012;43:1541–1551.
- [31] Dohner H, Gaidzik VI. Impact of genetic features on treatment decisions in AML. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011;36–42.
- [32] Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 2009;324:930–935.
- [33] Valinluck V, Tsai HH, Rogstad DK, et al. Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Res* 2004;32:4100–4108.
- [34] Valinluck V, Sowers LC. Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. *Cancer Res* 2007;67:946–950.
- [35] Wu H, D'Alessio AC, Ito S, et al. Genome-wide analysis of 5-hydroxymethylcytosine distribution reveals its dual function in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. *Genes & Dev* 2011;25:679–684.
- [36] Pastor WA, Pape UJ, Huang Y, et al. Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosine in embryonic stem cells. *Nature* 2011;473:394–397.
- [37] Guo JU, Su Y, Zhong C, et al. Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell* 2011;145:423–434.
- [38] Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med* 2009;360:2289–2301.
- [39] Langemeijer SM, Kuiper RP, Berends M, et al. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nature Genet* 2009;41:838–842.
- [40] Smith AE, Mohamedali AM, Kulasekararaj A, et al. Next-generation sequencing of the TET2 gene in 355 MDS and CMML patients reveals low-abundance mutant clones with early origins, but indicates no definite prognostic value. *Blood* 2010;116:3923–3932.
- [41] Ko M, Huang Y, Jankowska AM, et al. Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature* 2010;468:839–843.
- [42] Metzeler KH, Maharry K, Radmacher MD, et al. TET2 mutations improve the new European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 2011;29:1373–1381.
- [43] Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, et al. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 2002;419:624–629.
- [44] Morin RD, Johnson NA, Severson TM, et al. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nature Genet* 2010;42:181–185.
- [45] Sneeringer CJ, Scott MP, Kuntz KW, et al. Coordinated activities of wildtype plus mutant EZH2 drive tumor-associated hypertrimethylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27) in human B-cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:20980–20985.
- [46] Shih AH, Abdel-Wahab Or, Patel JP, Levine R. The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. *Nat Rev Cancer* 2012;12:599–612.
- [47] Nikoloski G, Langemeijer SM, Kuiper RP, et al. Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. *Nature Genet* 2010;42:665–667.
- [48] Ernst T, Chase AJ, Score J, et al. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nature Genet* 2010;42:722–726.
- [49] Herrera-Merchan A, Arranz L, Ligos JM, et al. Ectopic expression of the histone methyltransferase Ezh2 in haematopoietic stem cells causes myeloproliferative disease. *Nature Commun* 2012;3:623.
- [50] Simon JA, Lange CA. Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics. *Mutat Res* 2008;647:21–29.
- [51] Classen AK, Bunker BD, Harvey KF, Vaccari T, Bilder D. A tumor suppressor activity of Drosophila Polycomb genes mediated by JAK-STAT signaling. *Nat Genet* 2009;41:1150–1155.

- [52] Martinez AM, Schuettengruber B, Sakr S, et al. Polyhomeotic has a tumor suppressor activity mediated by repression of Notch signaling. *Nat Genet* 2009;41:1076–1082.
- [53] Le Beau MM, Espinosa R, Davis EM, et al. Cytogenetic and molecular delineation of a region of chromosome 7 commonly deleted in malignant myeloid diseases. *Blood* 1996;88:1930–1935.
- [54] Ley TJ, Ding L, Walter MJ, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010;363:2424–2433.
- [55] Thol F, Damm F, Lüdeking A, et al. Incidence and prognostic influence of DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2011;29:2889–2896.
- [56] Yamashita Y, Yuan J, Suetake I, et al. Array-based genomic resequencing of human leukemia. *Oncogene* 2010;29:3723–3731.
- [57] Fried I, Bodner C, Pichler MM, et al. Frequency, onset and clinical impact of somatic DNMT3A mutations in therapy-related and secondary acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2012;97:246–250.
- [58] Scheuermann JC, de Ayala Alonso AG, Oktaba K, et al. Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB. *Nature* 2010;465:243–247.
- [59] Abdel-Wahab O, Adli M, LaFave LM, et al. ASXL1 mutations promote myeloid transformation through loss of PRC2-mediated gene repression. *Cancer Cell* 2012;22:180–193.
- [60] Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med* 2011;364:2496–2506.
- [61] Abdel-Wahab O, Pardanani A, Patel J, et al. Concomitant analysis of EZH2 and ASXL1 mutations in myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and blast-phase myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2011;25:1200–1202.
- [62] Abdel-Wahab O, Kilpivaara O, Patel J, Busque L, Levine RL. The most commonly reported variant in ASXL1 (c.1934dupG;p.Gly646TrpfsX12) is not a somatic alteration. *Leukemia* 2010;24:1656–1657.
- [63] Abdel-Wahab O, Manshouri T, Patel J, et al. Genetic analysis of transforming events that convert chronic myeloproliferative neoplasms to leukemias. *Cancer Res* 2010;70:447–452.
- [64] Aravind L, Iyer LM. The HARE-HTH and associated domains: novel modules in the coordination of epigenetic DNA and protein modifications. *Cell Cycle* 2012;11:119–131.
- [65] Głowacki S, Błasiak J. Znaczenie modyfikacji epigenetycznych w patogenezie białaczek. *Act Haematol Pol* 2013;44:48–57.