ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΕΘΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ»

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΥΓΕΙΟΦΥΣΙΚΗΣ, ΡΑΔΙΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΑΙ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑΣ»

Ιωαννίδου Αγάπη
Βιοεπιστήμονας, MSc

Αθήνα 2019

ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΕΘΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ»

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΥΓΕΙΟΦΥΣΙΚΗΣ, ΡΑΔΙΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΑΙ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑΣ»

Ιωαννίδου Αγάπη
Βιοεπιστήμονας, MSc

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Ρούσου Παρασκευή, Αναπλ. Καθηγήτρια Αιματολογίας, Αιματολογική Μονάδα της Γ΄ Πανεπιστημιακής Παθολογικής Κλινικής του Γ.Ν.Ν.Θ.Α. «Η ΣΩΤΗΡΙΑ» (Επιβλέπουσα)

Διαμάντη Κανδαράκη Ευανθία, Καθηγήτρια Ενδοκρινολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών, Διευθύντρια Παθολογικής Κλινικής Παν. Αθηνών

Δρ. Μανωλά Καλλιόπη, Ερευνήτρια Α΄ βαθμίδας, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», Εργαστήριο Υγειοφυσικής, Ραδιοβιολογίας & Κυτταρογενετικής

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα». Σχετικές διατάξεις του άρθρου 50 του Ν.1268/82, σε συνδυασμό με το Ν.5343/32, άρθρο 202 παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος).

Αθήνα 2019

Στοιχεία Διδακτορικής Διατριβής

Ημερομηνία αίτησης υποψηφίου: 25-07-2014

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 26-11-2014

Μέλη τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Π. Ρούσσου	Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ (Επιβλέπουσα)
Ε. Διαμάντη Κανδαράκη	Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ
Κ. Μανωλά	Ερευνήτρια Α΄ βαθμίδας, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

Ημερομηνία ορισμού του θέματος: 26-11-2014

Ημερομηνία κατάθεσης διδακτορικής διατριβής:05/02/2021

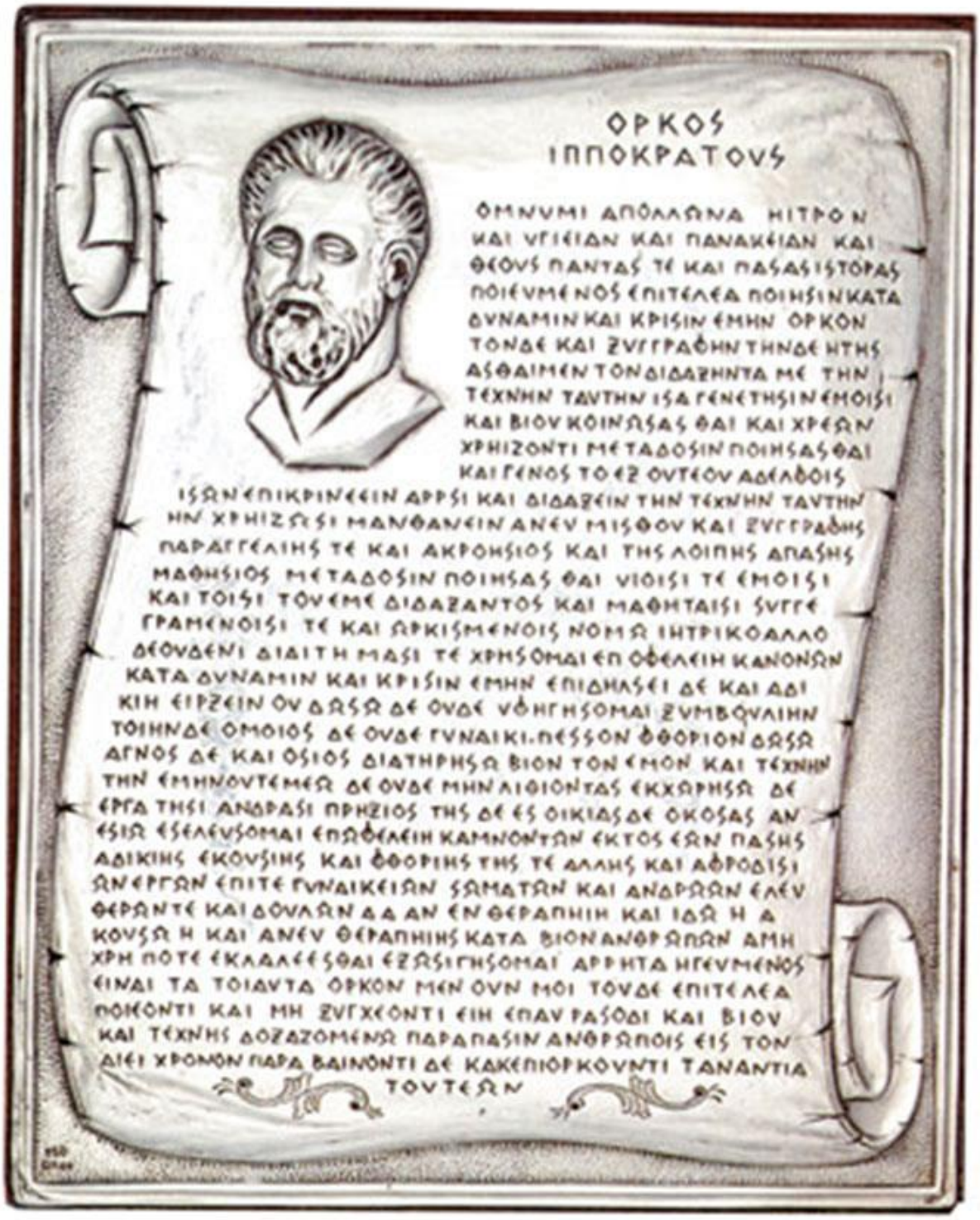
Διορισμός Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής: 17/01/2020…..

Π. Ρούσσου	Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ (Επιβλέπουσα)
Ε. Διαμάντη Κανδαράκη	Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ
Κ. Μανωλά	Ερευνήτρια Α΄, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»
Μ. Αγγελοπούλου	Αναπλ. Καθηγήτρια
Β. Παππά	Αναπλ. Καθηγήτρια
Π. Τσιριγώτης	Επ. Καθηγητής
Στ. Παπαγεωργίου	Επ. Καθηγητής

Τόπος διεξαγωγής της εργασίας

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Υγειοφυσικής, Ραδιοβιολογίας & Κυτταρογενετικής (ΕΥΡΚ) του Ινστιτούτου Πυρηνικών & Ραδιολογικών Επιστημών & Τεχνολογίας, Έρευνας & Ασφάλειας (ΙΠΡΕΤΕΑ) του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» το χρονικό διάστημα Δεκέμβριος 2014 – Δεκέμβριο 2018, υπό την εποπτεία της Δρ. Καλλιόπης Μανωλά, Βιολόγου-Κυτταρογενετίστριας, Ερευνήτριας Α΄ βαθμίδας.

ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»


ΟΡΚΟΣ
ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ
ΟΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ
ΚΑΙ ΥΓΙΕΙΑΝ ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ
ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ ΙΣΤΟΡΑΣ
ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΙΝ ΚΑΤΑ
ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ
ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ ΗΤΗΣ
ΑΣΘΑΙΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ
ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ
ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ
ΧΡΗΙΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ
ΚΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΟΥΤΕΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ
ΙΣΩΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΕΙΝ ΑΡΡΣΙ ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ
ΗΝ ΧΡΗΙΖΩΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΣ
ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ
ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ
ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕ
ΓΡΑΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΩΡΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ ΙΗΤΡΙΚΟΑΛΛΟ
ΔΕΟΥΔΕΝΙ ΔΙΔΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΝΟΝΩΝ
ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ ΕΠΙΔΗΛΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙ
ΚΙΗ ΕΙΡΞΕΙΝ ΟΥΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ
ΤΟΙΗΝΔΕ ΟΜΟΙΟΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ
ΑΓΝΟΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΟΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ
ΤΗΝ ΕΜΗΝ ΟΥΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘΙΟΝΤΑΣ ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ
ΕΡΓΑ ΤΗΣΙ ΑΝΔΡΑΣΙ ΠΡΗΞΙΟΣ ΤΗΣ ΔΕ ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ
ΕΣΙΩ ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ
ΑΔΙΚΙΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙ
ΩΝΕΡΓΩΝ ΕΠΙΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΩΝ ΕΛΕΥ
ΘΕΡΩΝΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ ΑΑ ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΗΙΗ ΚΑΙ ΙΔΩ Η Α
ΚΟΥΣΩ Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΗΙΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ ΑΜΗ
ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ ΕΞΩΣΙΓΗΣΟΜΑΙ ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ
ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΥΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ
ΠΟΙΕΟΝΤΙ ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΟΔΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ
ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ ΠΑΡΑΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΙΣ ΤΟΝ
ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΚΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ ΤΑΝΑΝΤΙΑ
ΤΟΥΤΕΩΝ

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ ΤΗΣ ΙΩΑΝΝΙΔΟΥ ΑΓΑΠΗΣ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ	
Ημερομηνία γέννησης	25/11/1983
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ	
Δεκέμβριος 2014 – Σήμερα	**Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στην Ιατρική Σχολή** του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ) **Τίτλος διδακτορικής διατριβής**: «Κυτταρογενετική, μοριακή και επιγενετική διερεύνηση της Χρόνιας Λεμφοκυτταρικής Λευχαιμίας»
Φεβρουάριος 2011	**Τμήμα Βιολογίας,** Σχολή θετικών επιστημών – Εθνικού και Καποδιστριακού Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης «Σύγχρονες Τάσεις στη Διδακτική των Βιολογικών Μαθημάτων και Νέες Τεχνολογίες». **Βαθμός:** «8,2» Λίαν Καλώς.
Διπλωματική Εργασία (Φεβρουάριος 2011)	«Η Διδασκαλία της Θεωρίας της Εξέλιξης στην Μέση εκπαίδευση σε Ελλάδα και Κύπρο με χρήση Συγκριτικής Μεθόδου» **Βαθμός:** «7» Λίαν Καλώς.
Ιούλιος 2008	**Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα,** Σχολή Επιστημών και Τεχνολογιών Πτυχίο Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, 5ους φοιτήσεως. **Βαθμός:** «6,45» Λίαν Καλώς.
Πτυχιακή Εργασία (Ιούνιος 2007)	«Imprinting - Μεθυλίωση στα Αναπαραγωγικά Κύτταρα». **Βαθμός:** «10» Άριστα.
Ιούνιος 2001	Απολυτήριο Λυκείου, Λύκειο Ακροπόλεως Λευκωσία Κύπρος, **Βαθμός**: «17 1/11» Λίαν Καλώς.
ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ / ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ	
Δεκέμβριος 2014 – Σήμερα	Εργαστήριο Υγειοφυσικής, Ραδιοβιολογίας & Κυτταρογενετικής, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος».
Ιούνιος 2007 – 2017	Γραμματειακή Υποστήριξη της Πανελλήνιας Ένωσης Βιοεπιστημόνων με κύριες αρμοδιότητες: Πρωτόκολλο εισερχομένων/εξερχομένων εγγράφων, Τήρηση αρχείου μελών και ηλεκτρονικού αρχείου μελών σε βάση δεδομένων Access, Τήρηση αρχείου οικονομικών – καταγραφή εσόδων/εξόδων, Διαχείριση τηλεφωνημάτων και ηλεκτρονικής αλληλογραφίας και ιστοσελίδας, Αποστολή ομαδικών επιστολών/προσκλήσεων, Υπεύθυνη εγγραφών/ετήσιων συνδρομών και συνδρομών για ημερίδες/συνέδρια, Γραμματειακή και τεχνική υποστήριξη ημερίδων και συνεδρίων.

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

Μέλος Επιστημονικών Ενώσεων

- Πανελλήνια Ένωση Βιοεπιστημόνων (ΠΕΒ)
- Ελληνική Αιματολογική Εταιρία (ΕΑΕ)
- European Hematology Association (EHA)
-

Δημοσιεύσεις σε διεθνή περιοδικά και διεθνή και ελληνικά συνέδρια

2019

- «Paraoxonase 1 (PON1) Q192R and L55M Polymorphisms as Potential Predisposition Factors for Chronic Lymphocytic Leukemia»
  Anticancer Research 2019 Jun;39(6):2861-2869.
  Ioannidou A, Zachaki S, Daraki A, Margariti IM, Pantelia D, Diamantopoulou P, Sambani C, Roussou P, Manola KN

2018

- «Cohesin RAD21 Gene Promoter Methylation in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia»
  Cytogenetic Genome Research 2018;154(3):126-131
  Ioannidou A, Zachaki S, Karakosta M, Daraki A, Roussou P, Manola KN.
- «ASXL1 mutations in AML are associated with specific clinical and cytogenetic characteristics»,
  Leukemia Lymphoma,. 2018 Feb 7:1-8
  Kakosaiou K, Panitsas F, Daraki A, Pagoni M, Apostolou P, *Ioannidou A*, Vlachadami I, Marinakis T, Giatra C, Vasilatou D, Sambani C, Pappa V, Manola KN

2017

- «Methylation status of RAD21 gene in Chronic Lymphocytic Leukemia»,
  Haematologica Abstract Book, 22nd Congress of the European Hematology Association, Μαδρίτη, Ισπανία, 22-25 Ιουνίου 2017.
  Agapi Ioannidou, Sophia Zachaki, Maria Karakosta, Aggeliki Daraki, Paraskevi Roussou, Kalliopi Manola
-

Συμμετοχές σε Συνέδρια / Ημερίδες / Διαλέξεις

2019

- **Αναρτημένη ανακοίνωση:** «PON1 Q192R genetic polymorphism as a predisposing factor for leukemia and its specific cytogenetic aberrations»,
  12th European Cytogenomics Conference – ECA 2019, Salzburg Congressa, Salzburg, Austria, 6-9 July 2019.
  Ioannidou A., Chatzidrosou V., Zachaki S., Daraki A. Kalomiraki M., Diamantopoulou P., Margariti M., Pantelia D., Argyri L., Sampani K., Manola K.N.

2018

- **Αναρτημένη ανακοίνωση:** «Ο Γενετικός πολυμορφισμός Q192R του γονιδίου αποτοξικοποίησης PON1 ως πιθανός προδιαθεσικός παράγοντας στην εμφάνιση λευχαιμίας»,
  3ο Πανελλήνιο Συνέδριο Συνδέσμου Ιατρών Γενετιστών Ελλάδας, Αθήνα 2-4 Νοεμβρίου 2018 *Α. Ιωαννίδου*, Β. Χατζηδρόσου, Σ. Ζαχάκη, Α. Δαράκη, Μ. Καλομοιράκη, Π. Διαμαντοπούλου, Μ.

Μαργαρίτη, Δ. Παντελιά, Λ. Αργύρη, Κ. Σαμπάνη, Κ.Ν. Μανωλά

2017

- **Αναρτημένη ανακοίνωση**: «ASXL1 mutations in AML are associated with specific clinical and cytogenetic characteristics»,
  22nd Congress of the European Hematology Association, Μαδρίτη, Ισπανία, 22-25 Ιουνίου 2017
  Kakosaiou K, Panitsas F, Daraki A, Pagoni M, Apostolou P, *Ioannidou* A, Vlachadami I, Marinakis T, Giatra C, Vasilatou D, Sambani C, Pappa V, Manola KN
- **Αναρτημένη ανακοίνωση**: «Q192R και L55M πολυμορφισμοί του γονιδίου PON1 (Παραοξονάση 1) στην Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (ΧΛΛ).»
  28ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2-4 Νοεμβρίου 2017
  Α. Ιωαννίδου, Σ. Ζαχάκη, Α. Δαράκη, Γ. Παντελιάς, Κ. Σαμπάνη, Π. Ρούσσου, Κ. Μανωλά

2016

- **Μέλος της Οργανωτικής Επιτροπής:** 10ο Πανελλήνιο Συνέδριο "Βιοεπιστήμες στον 21ο αιώνα", 18 – 20 Νοεμβρίου 2016, Ίδρυμα Ευγενίδου Αθήνα.
- **Αναρτημένη ανακοίνωση**: «Η Μεθυλίωση του γονιδίου RAD21 στην ανάπτυξη της Χρόνιας Λεμφοκυτταρικής Λευχαιμίας»
  27ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη 3-5 Νοεμβρίου 2016
  Α. Ιωαννίδου, Α. Δαράκη, Σ. Ζαχάκη, Κ. Σταυροπούλου, Γ. Παντελιάς, Κ. Σαμπάνη, Π. Ρούσσου, Κ.Ν. Μανωλά.
- **Αναρτημένη ανακοίνωση & Βραβείο καλύτερης αναρτημένης ανακοίνωσης**: «Μεταλλάξεις του γονιδίου ASXL1 σε ασθενείς με Οξεία Μυελογενείς Λευχαιμία και συσχέτιση με τα κυτταρογενετικά ευρήματα»
  27ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη 3-5 Νοεμβρίου 2016
  Κακοσαίου, Α. Δαράκη, Π. Αποστόλου, Μ. Παγώνη, Ι. Βλαχαδάμη, Θ. Μαρινάκης, *Α. Ιωαννίδου*, Χ. Γιατρά, Δ. Βασιλάτου, Κ. Σαμπάνη, Β. Παππά, Κ.Ν. Μανωλά

2015

- **Μέλος της Οργανωτικής Επιτροπής:** 3ο Συνέδριο ΠΕΒ «Η Βιολογία στην εκπαίδευση», Συνεδριακό κέντρο Δήμου Κατερίνης, 13-15 Νοεμβρίου 2015.

2014

- **Μέλος της Οργανωτικής Επιτροπής**: 9ο Πανελλήνιο Συνέδριο "Το Περιβάλλον και ο Άνθρωπος", 5 - 7 Δεκεμβρίου 2014, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, ΙΙΒΕΑΑ, Αθήνα

2011

- **Ομιλήτρια** στη 2ρη Ημερίδα Νέων Βιοεπιστημόνων (Η.Υ.Β.), Θέμα: «Η Μεταπτυχιακή Εκπαίδευση» (Απρίλιος 2011, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, ΙΙΒΕΑΑ).
- **Μέλος της Οργανωτικής Επιτροπής:** 2ης Ημερίδας Νέων Βιοεπιστημόνων, (Απρίλιος 2011, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, ΙΙΒΕΑΑ).

Έντυπο υλικό

2009

- Μετάφραση κεφαλαίων της έκδοσης «2009 Έτος Δαρβίνου: Η θεωρία που άλλαξε τις αντιλήψεις μας για τη ζωή», Έκδοση Πανελλήνιας Ένωσης Βιοεπιστημόνων, Μάρτιος 2009.

Πίνακας Περιεχομένων

Πίνακας Περιεχομένων **1**
Ευχαριστίες **3**
Α. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ **5**
Α1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 6
Α1.1 ΧΛΛ 7
Α1.1.1 Γενικά 7
Α1.1.2 Ταξινόμηση 7
Α1.1.3 Επιδημιολογία 11
Α1.1.4 Παθογένεια 11
Α1.1.4.1 Μετάλλαξη του IGHV 11
Α1.1.4.2. Προέλευση του παθολογικού κυττάρου της ΧΛΛ 12
Α1.1.4.3. Συσσώρευση και πολλαπλασιασμός των παθολογικών ΧΛΛ κυττάρων 13
Α1.1.5 Κλινική Εικόνα 14
Α1.1.6 Διάγνωση 15
Α1.1.7 Σταδιοποίηση 16
Α1.1.7.1 Σύστημα σταδιοποίησης κατά Binet 17
Α1.1.7.2 Σύστημα σταδιοποίησης κατά Rai 17
Α1.1.8 Πρόγνωση 17
Α1.18.1 Βιολογικοί προγνωστικοί δείκτες 18
Α1.1.9 Αιτιολογία – Πιθανοί παράγοντες κινδύνου 21
Α1.1.10 Θεραπεία 22
Α1.1.11 Εξέλιξη της νόσου 24
Α1.1.11.1 Σύνδρομο Richter 24
Α1.2 Κυτταρογενετική στη ΧΛΛ 25
Α1.2.1 Κυτταρογενετικές τεχνικές - Καρυότυπος 25
Α1.2.2 Φθορίζον Επιτόπιος Υβριδισμός (Fluorescence In Situ Hybridization, FISH) 25
Α1.2.3 Άλλες μεθόδοι μοριακής γενετικής 26
Α1.2.4 Ειδικές χρωμοσωμικές αλλοιώσεις στη ΧΛΛ 27
Α1.2.4.1 del(13q)- 29
Α1.2.4.2 Τρισωμία 12 (+12) 30
Α1.2.4.3 del(11q) 31
Α1.2.4.4 del(6q) 32
Α1.2.4.5 del(17p) 33
Α1.2.4.6 t/der(14q32) 34
Α1.2.4.7 Λοιπές χρωμοσωμικές αλλοιώσεις 35
Α1.3 Γενετικές και επιγενετικες αλλαγές στην ΧΛΛ 37

A1.3.1 Μεταλλάξεις γονιδίων στη ΧΛΛ 37
A1.3.2 Γενετική προδιάθεση και ανάπτυξη της ΧΛΛ 39
A1.3.2.1 Πολυμορφισμοί γονιδίων στη ΧΛΛ 40
A1.3.2.1.1 Το γονίδιο PON1 40
A1.3.3 Μεθυλίωση του DNA 41
A1.3.3.1 Μεθυλίωση του DNA και ΧΛΛ 292
A1.3.3.2 Σύμπλεγμα Cohesin και το γονίδιο RAD21 294
A1.4 Σκοπός της εργασίας 116
Β. ΥΛΙΚΟ & ΜΕΘΟΔΟΙ 47
Β1. Υλικό 48
Β1.1 Εργαστηριακός Εξοπίσμός 48
Β1.2 Αντιδραστήρια και Διαλύματα 48
Β1.3 Ταυτότητα Δειγμάτων 50
Β2. Μέθοδοι 51
Β2.1 Κυτταρογενετική 51
Β2.1.1 Κλασσική Κυτταρογενετική - Καρυότυπος 51
Β2.1.2 Μοριακή Κυτταρογενετική - FISH 55
Β2.2 Γονοτυπική ανάλυση πολυμορφισμών Q192R και L55M του γονιδίου PON1 60
Β2.3 Μελέτη μεθυλίωσης υποκινιτών του γονιδίου RAD21 64
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 69
Γ1. Κυτταρογενετική ανάλυση ασθενών με ΧΛΛ 70
Γ2. Γονοτυπική Ανάλυση 72
Γ3. Μελέτη μεθυλίωσης υποκινητών γονιδίων 78
Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ 83
Δ1. Γονοτυπική ανάλυση πολυμορφισμών, Q192R και L55M του γονιδίου PON1 84
Δ2. Μελέτη μεθυλίωσης υποκινητών γονιδίων 87
Δ. Γενικά συμπεράσματα – μελλοντικές προοπτικές 89
Ε. ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ & ΜΕΤΑΦΡΑΣΕΩΝ 91
Ζ. ΠΕΡΙΛΗΨΗ 94
Ζ1. Περίληψη στα ελληνικά 994
Ζ2. Περίληψη στα Αγγλικά – Abstract 97
ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 100

Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε κατά το διάστημα Δεκέμβριος 2014 – Δεκέμβριος 2019, με επιβλέπουσα τη Δρ. Π. Ρούσσου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Αιματολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών, Γ΄ Παθολογική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, ΓΝΝΘΑ «Η Σωτηρία». Εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Υγειοφυσικής, Ακτινοπροστασίας & Κυτταρογενετικής του Ινστιτούτου Πυρηνικών & Ραδιολογικών Επιστημών & Τεχνολογίας, Έρευνας & Ασφάλειας (Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α.), του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ», με Επιστημονική Υπεύθυνη την Δρ. Κ. Μανωλά, Βιολόγο, Ερευνήτρια Α΄βαθμίδας.

Ευχαριστώ θερμά την Δρ. Π. Ρούσσου, επιβλέπουσα της τριμελούς επιτροπής, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την καθοδήγηση και την πολύτιμη βοήθειά της κατά την εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής μου. Θερμά ευχαριστώ την Δρ. Κ. Μανωλά, Επιστημονική Υπεύθυνη της διδακτορικής μου διατριβής και μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για την υπόδειξη του θέματος, την καθοδήγηση και την πολύτιμη βοήθειά της κατά την εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής μου, τις εποικοδομητικές επιστημονικές συζητήσεις, την υποστήριξη και τις εύστοχες παρατηρήσεις της, καθώς και τη ουσιαστική συμμετοχή της στην τελική διαμόρφωση της διδακτορικής διατριβής μου αλλά και των δημοσιεύσεων που επιτεύχθηκαν σε επιστημονικά περιοδικά, εγχώρια και διεθνή συνέδρια. Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης την Δρ. Ε. Διαμάντη Κανδαράκη, Καθηγήτρια Ενδοκρινολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών και μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής μου επιτροπής, για την πολύτιμη βοήθεια και συμβολή της στη συγγραφή της παρούσης διατριβής. Παράλληλα ευχαριστώ τον Προϊστάμενο του Εργαστηρίου Κυτταρογενετικής, Δρ. Γ. Παντελιά, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στο εργαστήριό του.

Ιδιαιτέρως, θα ήθελα να ευχαριστήσω την συνάδελφο και φίλη Δρ. Σ. Ζαχάκη, συνεργαζόμενη Ερευνήτρια του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» για τη συστηματική καθοδήγηση, την καταλυτική βοήθεια και τη δύναμη που μου προσέφερε για την κατανόηση του θεωρητικού και πρακτικού μέρους της εργασίας, την πολύτιμη βοήθεια στη δημοσίευση των αποτελεσμάτων, καθώς και την αμέριστη συμπαράστασή της καθ’όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής. Επίσης, ευχαριστώ θερμά την συνάδελφο Δρ. Α. Δαράκη, για τη καθοδήγηση και τη βοήθεια που μου προσέφερε για την κατανόηση και την προτυποποίηση των μοριακών τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή του πειραματικού μέρους της εργασίας. Θερμές ευχαριστίες

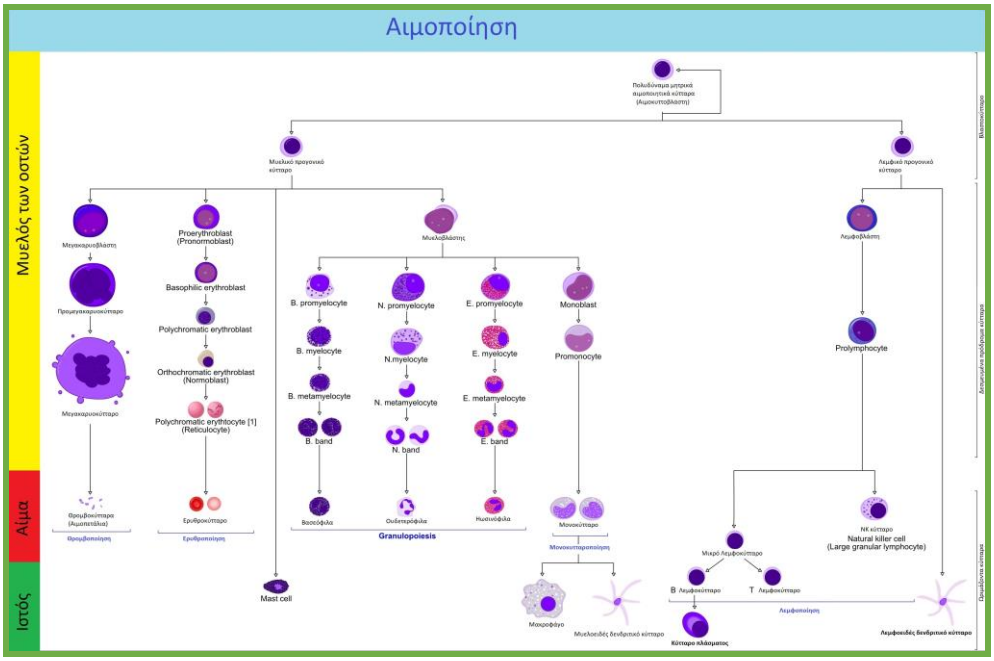
απευθύνω επίσης στη συνάδελφο Κακοσαίου Κατερίνα, υποψήφια διδάκτωρ της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, για τη βοήθειά της στη διεξαγωγή του πειραματικού μέρους της εργασίας. Ευχαριστώ θερμά το προσωπικό του Εργαστηρίου Κυτταρογενετικής για τη διευκόλυνση και τη βοήθεια που μου προσέφεραν προκειμένου να ολοκληρωθεί η εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής στα προβλεπόμενα χρονικά πλαίσια. Ιδιαιτέρως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις συναδέλφους Δόμνα Παντελιά και Μαριάννα Μαργαρίτη, Μαρίνα Καλομοιράκη, Κέλυ Σταυροπούλου, για τη άρτια τεχνική κατάρτιση και την προθυμία τους να με βοηθήσουν, καθώς και τη συνάδελφο Αργύρη Λέττα για την σημαντική βοήθεια που μου προσέφερε σε στοιχεία καταλυτικής σημασίας για την επιτυχή έκβαση και ολοκλήρωση της εργασίας μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου για την αμέριστη συμπαράσταση, στήριξη και κατανόηση που δείχνουν στην επιστημονική μου σταδιοδρομία. Ιδιαιτέρως, τον σύντροφο και συμπαραστάτη μου Κωνσταντίνο Γεωργίου για την απόλυτη κατανόηση, την ανιδιοτελή βοήθεια, την ηρεμία και τη στήριξή του σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Α. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Α.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι Λευχαιμίες συνιστούν μια ετερογενή ομάδα αιματολογικών κακοηθειών οι οποίες προκύπτουν από βλάβες των αρχέγονων πολυδύναμων αιμοποιητικών κυττάρων, κυρίως των λευκοκυττάρων. Τα καρκινικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα από τη μορφή μεμονωμένων κλωνικών κυττάρων (βλάστες), αποθούν τα φυσιολογικά αιμοποιητικά κύτταρα , διηθώντας το μυελό των οστών. Κατά την διαδικασία της αιμοποίησης (Εικόνα Α1) τα πολυδύναμα αιμοποιητικά μητρικά κύτταρα εξελίσσονται σε ερυθρά αιμοσφαίρια, αιμοπετάλια και κύτταρα της μυελικής και της λεμφικής σειράς. Οι λευχαιμίες, ανάλογα με την αιμοποιητική κυτταρική σειρά που πάσχει διακρίνονται σε Λεμφογενείς ή Λεμφοβλαστικές και Μυελογενείς ή Μυελοβλαστικές. Με βάση τη χρονική εξέλιξη της νόσου, το στάδιο διαφοροποίησης των κυττάρων και τα κλινικά χαρακτηριστικά που παρουσιάζονται γίνεται περεταίρω διάκριση τους σε οξείες και χρόνιες λευχαιμίες. Οι Οξείες Λευχαιμίες (ΟΛ) εκδηλώνονται αιφνίδια σε οποιαδήποτε ηλικία και η νόσος έχει ταχεία εξέλιξη. Διακριτικό γνώρισμα στις ΟΛ αποτελεί η συσσώρευση πληθυσμού ανώριμων κυττάρων που εντοπίζονται στο μυελό των οστών και το περιφερικό αίμα. Αντιθέτως, οι Χρόνιες Λευχαιμίες (ΧΛ), εκδηλώνονται κυρίως σε προχωρημένη ηλικία, εκδηλώνοντας ηπιότερα συμπτώματα και αργή, λιγότερο επιθετική εξέλιξη της νόσου, καθότι οι καρκινικοί κλώνοι προέρχονται από ώριμα κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος. Τα τέσσερα βασικά είδη λευχαιμιών είναι Οξείες Μυελογενής (ΟΜΛ) και Χρόνιες (ΧΜΛ), και οι Οξείες Λεμφογενής (ΟΛΛ) και Χρόνιες (ΧΛΛ) [NCI "Leukemia" 2014; WHO Report 2014].



Εικόνα Α1: Αιμοποίηση

Α1.1. ΧΛΛ

Α1.1.1 Γενικά

Η ΧΛΛ αναφέρεται σαν νόσημα για πρώτη φορά τον 19^{ο} αιώνα, από Ευρωπαίους γιατρούς οι οποίοι αρχικά την ονόμασαν Weissesblut ή whiteblood, δηλαδή λευκό αίμα. Σαν ξεχωριστή κλινική οντότητα, αναγνωρίστηκε το 1903 από τον Turk και τα κλινικά της χαρακτηριστικά περιγράφηκαν το 1924 από τους Minot και Isaacs [Hamblin T. 1924]. Το 1967 οι Galton και Dameshek, σχεδόν ταυτόχρονα, πρότειναν τον κύριο παθοφυσιολογικό μηχανισμό της νόσου, την προοδευτική συσσώρευση μη λειτουργικών μακροβιούντων λεμφοκυττάρων [Galton DAG. 1966; Dameshek W. 1967]. Σήμερα, αποτελεί μία από τις πιο συχνές μορφές αιματολογικών κακοηθειών και χαρακτηρίζεται από *in vivo* συσσώρευση μονοκλωνικών Β-λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα και στο μυελό των οστών, τα οποία διηθούν τους λεμφικούς ιστούς και τον σπλήνα προκαλώντας συχνά διόγκωση των λεμφαδένων και δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Η διαδικασία συσσώρευσης μη λειτουργικών μακροβιούντων λεμφοκυττάρων οφείλεται περισσότερο στην αναστολή της απόπτωσης παρά στον αυξημένο πολλαπλασιασμό τους [Hamblin T. 2002]. Η νόσος παρουσιάζει μεγάλη κλινική ετερογένεια η οποία είναι συνυφασμένη με την ετερογένεια που παρατηρείται σε γενετικό και μοριακό επίπεδο. Κάποιοι ασθενείς επιβιώνουν για πολλά χρόνια χωρίς θεραπεία, ενώ άλλοι παρουσιάζουν επιθετική νόσο και μικρή επιβίωση [Rozovski U et al. 2014; Zenz T, Mertens D et al. 2009]. Η μοριακή και γενετική βάση της ΧΛΛ δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί ως σήμερα, ωστόσο στην παθογενετική πορεία της νόσου και στην μεγάλη κλινική ετερογένεια που παρουσιάζει, φαίνεται να εμπλέκονται διάφοροι γενετικοί και επιγενετικοί μηχανισμοί.

Α1.1.2 Ταξινόμηση

Η ΧΛΛ συγκαταλέγεται στα Χρόνια Λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα, ποιο συγκεκριμένα στις Β- Χρόνιες Λεμφοϋπερπλαστικές Νόσους, με βάση το αναθεωρημένο σύστημα ταξινόμησης του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, Π.Ο.Υ. 2016 (2016 World Health Organisation, WHO) [Swerdlow et al 2016]. Η συγκεκριμένη κατάταξη των νεοπλασματικών αιματολογικών νόσων είναι η πλέον πρόσφατη και αποτελεί την κοινά αποδεκτή ιστολογική ταξινόμηση στην κλινική πράξη αλλά και την επιστημονική έρευνα.

Τα Λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα αποτελούν μία ετερογενή ομάδα νοσημάτων που χαρακτηρίζονται συνήθως από ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και συσσώρευση σχετικά ώριμων κυττάρων της λεμφικής σειράς στο μυελό και στο αίμα. Η ΧΛΛ ανήκει σε αυτήν την ομάδα νοσημάτων, μαζί με τη Λευχαιμία από τριχωτά λεμφοκύτταρα (Hairy cell leukemia) και μαζί με αρκετούς τύπους λεμφωμάτων όπως το Ki-1 αναπλαστικό λέμφωμα (Ki-1 anaplastic large cell lymphoma (ALCL)), το NK/T-λέμφωμα ρινοφάρυγγος (Natural killer (NK)-cell lymphoma) το λέμφωμα Hodgkin (Hodgkin Lymphoma, HL), τα μη Hodgkin λεμφώματα (Non Hodgin Lymphoma, NHL) κ.α. [Swerdlow et al. 2008; Hallek et al. 2008; Swerdlow et al. 2016].

Στα Χρόνια Λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα, ως **λευχαιμίες** αναφέρονται οι νεοπλασίες του λεμφικού ιστού οι οποίες χαρακτηρίζονται ή συνοδεύονται από παρουσία νεοπλασματικών κυττάρων στο μυελό και το αίμα. Με τον όρο **λέμφωμα** αναφέρονται οι νεοπλασίες του λεμφικού ιστού στις οποίες τα νεοπλασματικά κύτταρα διηθούν τα λεμφικά και άλλα όργανα χωρίς να κυκλοφορούν στο αίμα. [Swerdlow et al. 2008]. Στην ταξινόμηση WHO τα λεμφώματα

διακρίνονται σε ξεχωριστές νοσολογικές οντότητες, οι οποίες ορίζονται με βάση τη μορφολογία, τα ανοσοφαινοτυπικά ευρήματα, τα κυτταρογενετικά και μοριακά ευρήματα, τα κλινικά χαρακτηριστικά και τον αντίστοιχο φυσιολογικό πληθυσμό λεμφοκυττάρων.

2016 WHO classification of mature lymphoid, histiocytic, and dendritic neoplasms

Mature B-cell neoplasms
Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma
Monoclonal B-cell lymphocytosis*
B-cell prolymphocytic leukemia
Splenic marginal zone lymphoma
Hairy cell leukemia
Splenic B-cell lymphoma/leukemia, unclassifiable
Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma
Hairy cell leukemia-variant
Lymphoplasmacytic lymphoma
Waldenström macroglobulinemia
Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), IgM*
μ heavy-chain disease
γ heavy-chain disease
α heavy-chain disease
Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), IgG/A*
Plasma cell myeloma
Solitary plasmacytoma of bone
Extraosseous plasmacytoma
Monoclonal immunoglobulin deposition diseases*
Extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)
Nodal marginal zone lymphoma
Pediatric nodal marginal zone lymphoma
Follicular lymphoma
In situ follicular neoplasia*
Duodenal-type follicular lymphoma*
Pediatric-type follicular lymphoma*

*Large B-cell lymphoma with IRF4 rearrangement**
Primary cutaneous follicle center lymphoma
Mantle cell lymphoma
In situ mantle cell neoplasia*
Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), NOS
Germinal center B-cell type*
Activated B-cell type*
T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma
Primary DLBCL of the central nervous system (CNS)
Primary cutaneous DLBCL, leg type
EBV$^+$ DLBCL, NOS*
*EBV$^+$ mucocutaneous ulcer**
DLBCL associated with chronic inflammation
Lymphomatoid granulomatosis
Primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma
Intravascular large B-cell lymphoma
ALK$^+$ large B-cell lymphoma
Plasmablastic lymphoma
Primary effusion lymphoma
*HHV8$^+$ DLBCL, NOS**
Burkitt lymphoma
*Burkitt-like lymphoma with 11q aberration**
High-grade B-cell lymphoma, with *MYC* and *BCL2* and/or *BCL6* rearrangements*
High-grade B-cell lymphoma, NOS*
B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and classical Hodgkin lymphoma
Mature T and NK neoplasms
T-cell prolymphocytic leukemia

T-cell large granular lymphocytic leukemia
Chronic lymphoproliferative disorder of NK cells
Aggressive NK-cell leukemia
Systemic EBV^{+} T-cell lymphoma of childhood*
Hydroa vacciniforme–like lymphoproliferative disorder*
Adult T-cell leukemia/lymphoma
Extranodal NK-/T-cell lymphoma, nasal type
Enteropathy-associated T-cell lymphoma
Monomorphic epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma*
*Indolent T-cell lymphoproliferative disorder of the GI tract**
Hepatosplenic T-cell lymphoma
Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma
Mycosis fungoides
Sézary syndrome
Primary cutaneous CD30^{+} T-cell lymphoproliferative disorders
Lymphomatoid papulosis
Primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma
Primary cutaneous γδ T-cell lymphoma
Primary cutaneous CD8^{+} aggressive epidermotropic cytotoxic T-cell lymphoma
*Primary cutaneous acral CD8^{+} T-cell lymphoma**
*Primary cutaneous CD4^{+} small/medium T-cell lymphoproliferative disorder**
Peripheral T-cell lymphoma, NOS
Angioimmunoblastic T-cell lymphoma
*Follicular T-cell lymphoma**
*Nodal peripheral T-cell lymphoma with TFH phenotype**

Anaplastic large-cell lymphoma, ALK^{+}
Anaplastic large-cell lymphoma, ALK^{-}*
*Breast implant–associated anaplastic large-cell lymphoma**
Hodgkin lymphoma
Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma
Classical Hodgkin lymphoma
Nodular sclerosis classical Hodgkin lymphoma
Lymphocyte-rich classical Hodgkin lymphoma
Mixed cellularity classical Hodgkin lymphoma
Lymphocyte-depleted classical Hodgkin lymphoma
Posttransplant lymphoproliferative disorders (PTLD)
Plasmacytic hyperplasia PTLD
Infectious mononucleosis PTLD
Florid follicular hyperplasia PTLD*
Polymorphic PTLD
Monomorphic PTLD (B- and T-/NK-cell types)
Classical Hodgkin lymphoma PTLD
Histiocytic and dendritic cell neoplasms
Histiocytic sarcoma
Langerhans cell histiocytosis
Langerhans cell sarcoma
Indeterminate dendritic cell tumor
Interdigitating dendritic cell sarcoma
Follicular dendritic cell sarcoma
Fibroblastic reticular cell tumor
Disseminated juvenile xanthogranuloma
Erdheim-Chester disease*

Πίνακας Α1: Κατάταξη WHO 2016 όπου φαίνονται αναλυτικά όλες οι Β-ΧΛΥΠ *Οι αλλαγές από την κατάταξη 2008. [Swerdlow et al. 2016] .

Α1.1.3 Επιδημιολογία

Η ΧΛΛ είναι η πιο κοινή λευχαιμία στο Δυτικό ημισφαίριο καλύπτοντας το 30% του συνόλου των λευχαιμιών με συχνότητα εμφάνισης 2-6 περιστατικά ανά 100.000 άτομα ετησίως. Προσβάλει κυρίως ηλικιωμένους και περισσότερο άνδρες (αναλογία Α:Γ 2:1). Είναι γεγονός τώρα ότι όλο και πιο συχνά διαγιγνώσκονται ασθενείς με ηλικίες κάτω των 55 ετών, ενώ τα παιδιά δεν νοσούν σχεδόν ποτέ από ΧΛΛ [Chiorazzi N, et al. 2005; Diehl et al.1999; T. Robak et al. 2013].

Επιδημιολογικά η ΧΛΛ παρουσιάζει γενετική προδιάθεση καθώς 10% των ασθενών έχουν έναν τουλάχιστον συγγενή πρώτου ή δεύτερου βαθμού με το ίδιο νόσημα. Οι ασθενείς με οικογενή μορφή της νόσου είναι κατά μέσο όρο 10 χρόνια νεότεροι στη διάγνωση από εκείνους με σποραδική μορφή, ενώ τα προσβληθέντα παιδιά τους εμφανίζουν τη νόσο 15-20 χρόνια νωρίτερα από τους γονείς τους [Rodríguez-Vicente AE et al. 2013].

Η εμφάνιση της νόσου μεταξύ των χωρών παρουσιάζει μεγάλες διακυμάνσεις λόγω του γεγονότος ότι η διάγνωση της γίνεται τυχαία και επιπλέον αρκετές φορές οι μελέτες αποτυγχάνουν να διακρίνουν την συγκεκριμένη νόσο από άλλα χαμηλής κακοήθειας νεοπλασματικά νοσήματα λόγω της μεγάλης ετερογένειας που εμφανίζεται στους ασθενείς. Παρ' όλα αυτα, η ΧΛΛ φαίνεται να είναι πιο κοινή στους Καυκάσιους και μειώνεται σε συχνότητα μεταξύ των Αφρικανών, Ισπανών, Ινδών και Ασιατών. [Papakonstantinou N et al. 2013].

Η κλινική πορεία της ΧΛΛ είναι εξαιρετικά μεταβλητή. Το ένα τρίτο των ασθενών που πάσχουν εμφανίζουν τη νόσο με προσδόκιμο ζωής παρόμοιο με εκείνο των υγιών ατόμων της ίδιας ηλικίας. Άλλοι ασθενείς παρουσιάζουν καλοήθη νόσο διάρκειας 5-10 ετών, όπου κάποιες φορές αργότερα η νόσος εξελίσσεται ταχέως ενώ περίπου το 10% των ασθενών έχουν επιθετική νόσο με μέση επιβίωση 1-3 χρόνια από τη στιγμή της διάγνωσης. [Rozovski U et al. 2014].

Α1.1.4 Παθογένεια

Με βάση τις γνώσεις που έχουμε σήμερα για τη μοριακή και γενετική βάση της ΧΛΛ, διακρίνονται υποκατηγορίες ασθενών με ξεχωριστά βιολογικά χαρακτηριστικά στο γενωμικό και επιγενωμικό προφίλ, χωρίς όμως να υπάρχουν συγκεκριμένες βλάβες που να χαρακτηρίζουν μεγάλο ποσοστό ασθενών. Επιπλέον, η ΧΛΛ διακρίνεται και με βάση δομικές ιδιαιτερότητες του κλωνοτυπικού Β-κυτταρικού υποδοχέα (B-cell receptor, BCR) [Caligaris-Cappio et al. 2008].

Α1.1.4.1 Μετάλλαξη του IGHV

Η ανοσογενετική ανάλυση των κλωνοτυπικών BCR υπήρξε αποκαλυπτική για την παθογένεια της νόσου. Μάλιστα, τα τελευταία χρόνια γίνεται διάκριση της νόσου σε δύο υποτύπους, οι οποίοι παρουσιάζουν καθοριστικές διαφορές μεταξύ τους ώστε ο κάθε υπότυπος να ορίζει σχεδόν διαφορετική νόσο [Stilgenbauer S et al. 2002]. Η διάκριση αυτή γίνεται ανάλογα με την ύπαρξη ή την απουσία μεταλλάξεων στην μεταβλητή περιοχή της αλληλουχίας της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών (Variable Diverse and Joining gene segments - VDJ) στις IGVH (immunoglobulin variable region heavy chain). Στους ασθενείς που στα κύτταρα της ΧΛΛ παρουσιάζουν διαφορά στην αλληλουχία των βάσεων του γονιδίου IGHV σε ποσοστό >2%, σε σχέση με το αντίστοιχο μη αναδιαταγμένο τύπο των κυττάρων της βλαστικής σειράς, ο κλώνος τους θεωρείτε μεταλλαγμένος. Ενώ μη μεταλλαγμένος κλώνος θεωρείτε όταν στα ΧΛΛ κύτταρα η αλληλουχία των βάσεων του

γονιδίου IGHV διαφέρει σε ποσοστό <2% από τα κύτταρα της βλαστικής σειράς [Schroeder HW Jr e al. 2012; Schroeder HW Jr e al. 1994].

Στο λεμφοκύτταρο, το τμήμα του γονιδιώματος στην περιοχή αυτήν αφορά το μέρος όπου συντίθεται το ειδικό αντίσωμα που έρχεται σε άμεση επαφή με το αντιγόνο. Έτσι μοναδικά αντισώματα προκύπτουν από τον ανασυνδυασμό αυτού του γονιδίου και επομένως δημιουργούνται οι μοναδικοί κλώνοι των ενεργοποιημένων Β-λεμφοκυττάρων. Όλη η πορεία της νόσου μπορεί να χαρακτηρισθεί από τις διαφορές μεταξύ των δύο αυτών υποτύπων, από την προέλευση του κακοήθους κυττάρου, την παθογένεια, μέχρι τη συμπεριφορά του κυττάρου και τα βιολογικά του παράγωγα. Οι σωματικές μεταλλάξεις της IGVH περιοχής είναι παρούσες περίπου στο ήμισυ των περιπτώσεων ΧΛΛ. Οι μη μεταλλαγμένες περιπτώσεις προέρχονται από κύτταρα που πιθανώς η τελική ανάπτυξή τους έγινε πριν από την είσοδο τους στο βλαστικό κέντρο, ενώ τα μεταλλαγμένα κύτταρα ΧΛΛ πιθανότατα διέσχισαν πρώτα το βλαστικό κέντρο και στη συνέχεια υπέστησαν τελικό μετασχηματισμό. Σε κάθε περίπτωση, η κυτταρική προέλευση της ΧΛΛ παραμένει άγνωστη. [Rodríguez-Vicente AE et al. 2013]

Η χειρότερη πρόγνωση χαρακτηρίζει τον μη μεταλλαγμένο τύπο και αυτό είναι η σημαντικότερη διαφορά μεταξύ των δύο υποτύπων της νόσου. Η διαπίστωση αυτή, καθιέρωσε τη μελέτη των βιολογικών παραμέτρων της νόσου χωριστά και συγκριτικά για τους δύο αυτούς τύπους ΧΛΛ. Η προγνωστική σημασία της μετάλλαξης του IGHV είναι επιβεβαιωμένη [Magnac C. et al. 2003; Krober A. et al. 2002; Jelinek D.F. et al. 2001; Hamblin T.J. et al. 2002; Oscier D.G. et al. 2002] καθώς τα δεδομένα κλινικών δοκιμών επιβεβαιώνουν την επίδραση της μετάλλαξης του IGHV στο αποτέλεσμα της νόσου [Catovsky D. et al. 2007; Grever M.R. et al. 2007]. Οι νέες οδηγίες από τη διεθνή συνάντηση επιστημόνων εξειδικευμένων στη ΧΛΛ (international workshop on chronic lymphocytic leukemia (iwCLL) εισηγούνται να γίνεται αρχικά έλεγχος του τύπου της IGHV σε όλους τους ασθενείς με ΧΛΛ [Schroeder HW Jr e al 2012, Hallek M et al 2018].

Η κατάσταση μετάλλαξης του IGHV παράλληλα με τις κυτταρογενετικές αλλοιώσεις που εντοπίζονται (βλ. κεφ. Α1.2.) παίζουν σημαντικό ρόλο στην επιβίωση των ασθενών με ΧΛΛ. Κατά τη διάρκεια της νόσου οι κυτταρογενετικές αλλαγές που παρατηρούνται είναι σχετικά συχνές, ενώ η μεταλλακτική κατάσταση του IGHV, παραμένει σταθερή με την πάροδο του χρόνου. Οι μη ευνοϊκές αλλοιώσεις [del(11q), del(17p)] εμφανίζονται συχνότερα σε ασθενείς χωρίς μεταλλαγμένο IGHV, ενώ ευνοϊκότερες αλλοιώσεις [del(13q)] παρουσιάζονται πιο συχνά στην υποομάδα με μεταλλαγμένο IGHV. Αυτή η μη ισορροπημένη κατανομή των γενομικών ανωμαλιών δίνει έμφαση στο διαφορετικό βιολογικό υπόβαθρο των υποομάδων της ΧΛΛ (με μεταλλαγμένο ή μη μεταλλαγμένο IGHV) και εν μέρει εξηγεί την διαφορετική τους κλινική πορεία. [Krober A. et al. 2002; Mould S.J. et al. 2002; Lin K. et al. 2002].

Α1.1.4.2 Προέλευση του παθολογικού κυττάρου της ΧΛΛ

Το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών παρέχει το κατάλληλο υπόστρωμα για την ανάπτυξη των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Κανονικά, τα Β λεμφοκύτταρα εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος ως ώριμα παρθένα Β λεμφοκύτταρα (mature naive B cells) και διέρχονται από τα δευτερογενή λεμφικά όργανα. Τα κύτταρα αυτά εκφράζουν μη-μεταλλαγμένες ανοσοσφαιρίνες και αν δεν συναντήσουν κάποιο αντιγόνο σύντομα αποπίπτουν. Αντίθετα, αν έρθουν σε επαφή με το αντιγόνο, αλληλεπιδρούν με βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα (T helpers) και στη συνέχεια σχηματίζουν βλαστικά κέντρα στο κέντρο των λεμφοζιδίων. Η επαφή των ώριμων Β λεμφοκυττάρων με το αντίστοιχο αντιγόνο έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση και τη

διαφοροποίηση τους, με τη δημιουργία πλασματοκυττάρων που παράγουν αντισώματα μεγάλης συγγένειας με το αντιγόνο.

Κατά την διαδικασία της ωρίμασης των Β λεμφοκυττάρων, τα παθολογικά Β λεμφοκύτταρα πιστεύεται πως εμφανίζονται ως κλώνοι κυττάρων όπου η διαφοροποίηση τους έχει σταματήσει σε κάποιο στάδιο ωρίμανσης, πριν φτάσουν να γίνουν ώριμα πλασματοκύτταρα. Γι' αυτό και όλα τα παθολογικά Β λεμφοκύτταρα φέρουν τις ίδιες αναδιατάξεις των IGHV [Ghia P. et al. 2007]. Ειδικότερα στην ΧΛΛ, πιστεύεται ότι υπάρχουν δύο τρόποι παθολογικής εκτροπής των κυττάρων. Σύμφωνα με τον έναν τρόπο, το παθολογικό κύτταρο δεν πέρασε από το παθολογικό κέντρο και φέρει αμετάλλακτη IGHV αλληλουχία και στον άλλο τρόπο το παθολογικό κύτταρο έχει περάσει από το βλαστικό κέντρο και φέρει μεταλλαγμένες IGVH. Παλαιότερα είχε θεωρηθεί ότι οι κλώνοι χωρίς μεταλλάξεις προέρχονται από άωρο κύτταρο, γεγονός που θα εξηγούσε και την κακοήθη εξέλιξη αυτού του τύπου [Hamblin TJ. et al. 1999]. Έχει πλέον φανεί ότι τα ΧΛΛ κύτταρα όλων των ασθενών, ανεξάρτητα από μεταλλάξεις, επιδεικνύουν στοιχεία ενεργοποίησης και επαφής με αντιγόνα [Damle RN. et al. 2002]. Η μεταξύ τους διαφορά μάλλον προέρχεται από τη χρονική στιγμή επαφής με το αντιγόνο κατά την πορεία εξέλιξης του παθογενετικού μηχανισμού της νόσου [Gorgun G. et al. 2005]. Επιπλέον, στο βλαστικό κέντρο γίνεται η αλλαγή του τύπου της ανοσοσφαιρίνης από IgM σε IgG και οι σημειακές μεταλλάξεις στα γονίδια των υπερμεταβλητών περιοχών των βαρέων αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών. Υποστηρίζεται πως ο κάθε τύπος λεμφώματος προέρχεται από κύτταρο που έχει εξαλλαγεί σε κάποιο στάδιο της εξέλιξης του και έχει μεταλλαχθεί στο βλαστικό κέντρο [Rawstron A.C. 2009].

Α1.1.4.3 Συσσώρευση και πολλαπλασιασμός των παθολογικών ΧΛΛ κυττάρων

Η κακοήθεια της νόσου έχει αποδοθεί στη συσσώρευση των παθολογικών κυττάρων λόγω του ότι τα περισσότερα παθολογικά κύτταρα παρατηρούνται να είναι σε αδράνεια, παραμένοντας στην G0 φάση του κυτταρικού κύκλου. Με τον τρόπο αυτό μπορούν να επιβιώσουν για μερικούς μήνες, ενώ κανονικά ήταν προγραμματισμένα να επιβιώσουν για μόλις λίγες μέρες. Μέχρι πρόσφατα ως μηχανισμός συσσώρευσης προτεινόταν ο ελαττωματικός ενδογενής μηχανισμός απόπτωσης, κάτι που δεν υποστηρίζεται από τα σύγχρονα δεδομένα, λόγω του ότι *in vitro* τα ίδια κύτταρα υφίστανται αυτόματη απόπτωση. Ταυτόχρονα παρατηρείται ένας υπέρμετρος πολλαπλασιασμός ορισμένων παθολογικών κλώνων που συνδέεται με επιθετικότερη νόσο [Collins RJ. et al. 1989]. Πλέον, για τη συσσώρευση θεωρούνται υπεύθυνοι διάφοροι παράγοντες από το μικροπεριβάλλον του μυελού, του οποίου οι επιδράσεις συντηρούν τα κύτταρα εν ζωή. Στοιχεία του εξωτερικού μικροπεριβάλλοντος που ενοχοποιούνται γι' αυτή τη λειτουργία είναι πιθανόν διάφορα άλλα γειτονικά κύτταρα, με τα οποία τα κύτταρα της ΧΛΛ έρχονται σε επαφή κατά την περιφορά τους στο λεμφικό σύστημα π.χ. στρωματικά κύτταρα [Panayiotidis P. et al. 1996] και ειδικά μονοκύτταρα [Tsukada N. et al. 2002]. Επίσης, για τη συσσώρευση των παθολογικών κυττάρων ενοχοποιούνται και διάφορα σήματα επιβίωσης (survival signals) τα οποία ενεργοποιούν τους υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης π.χ. οι κυτταροκίνες, όπως IL-4, INF-α, INF-γ, που εκκρίνονται από τα Τ-κύτταρα [Kiall S. et al. 2005], η οικογένεια κυτταροκινών TNF (παράγοντες νέκρωσης όγκων) [Grdisa M. 2003], και οι χημειοκίνες, όπως ο SDF-1, [Burger JA. et al. 2002]. Ακόμα και κάποια σήματα που παράγονται από τα ίδια τα Β-λεμφοκύτταρα δημιουργώντας ένα αυτόνομο αυτοκρινές σύστημα, όπως συμβαίνει κατά την έκφραση από έναν κλώνο Β-κυττάρων ταυτόχρονα του υποδοχέα CD40 και του CD40L [Younes A. et al. 1998].

Ρόλο στην κακοήθεια της νόσου παίζει και ο υπέρμετρος πολλαπλασιασμός ορισμένων κλώνων. Τα κύτταρα της ΧΛΛ χαρακτηρίζονται από αρκετά έντονο ρυθμό πολλαπλασιασμού, ο οποίος κυμαίνεται από 0,1 έως >1% του κλώνου ανά ημέρα [Messmer BT. et al. 2005]. Στους ασθενείς που έχουν χάσει την ευαισθησία στον αντί-πολλαπλασιαστικό (anti-proliferative) παράγοντα TGF-β ο ρυθμός πολλαπλασιασμού παρατηρείται να είναι ακόμα μεγαλύτερος [Decoteau JF et al. 1997; Shciemann WP. et al. 2004]. Δεδομένου ότι ο μέσος αριθμός κυττάρων σ' έναν ασθενή είναι 1012, καθημερινά παράγονται 109–1010 νέα λευχαιμικά κύτταρα. Έτσι προκύπτουν νέες μεταλλάξεις, οι οποίες μπορούν να δώσουν στη νόσο ένα επιθετικότερο χαρακτήρα. Κατ' επέκταση, υποστηρίζεται ότι η αυξημένη αναλογία των νέων λευχαιμικών κυττάρων σχετίζεται με την επιθετικότητα της νόσου περισσότερο από τον απόλυτο αριθμό λεμφοκυττάρων ή το μέγεθος των λεμφαδένων, καθώς τα τελευταία δείχνουν εντονότερα την ισορροπία μεταξύ κυτταρικού πολλαπλασιασμού και απόπτωσης, απ' ό,τι τη δυνατότητα νέων επικίνδυνων μεταλλάξεων. Σ' αυτό συνηγορεί και το γεγονός ότι τα τελομερή, τα οποία ως γνωστόν βραχύνονται με κάθε κυτταρική διαίρεση, παρατηρούνται μικρότερα στο DNA των ασθενών με επιθετικότερη νόσο [Damle RN. et al. 2004].

Όλα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω σε συνδυασμό με την απορρύθμιση των αντι-αποπτωτικών γονιδίων λόγω μεταλλάξεων, όπως το BCL2 κ.α. (βλ. κεφ. Α1.3.1), δρουν συνεργατικά και προάγουν την επιβίωση των παθολογικών κυτταρικών κλώνων. Το αποτέλεσμα όλων είναι η συσσώρευση των κλωνικών κυττάρων της ΧΛΛ και η πιθανή μετανάστευση τους από τα κέντρα πολλαπλασιασμού στο περιφερικό αίμα και τα δευτερογενή λεμφικά όργανα.

Α1.1.5 Κλινική Εικόνα

Η κλινική εικόνα της νόσου είναι ετερογενής καθώς κάποιοι ασθενείς ζουν δεκαετίες χωρίς ανάγκη θεραπείας, ενώ άλλοι σχετικά σύντομα εμφανίζουν εξέλιξη της νόσου και χρειάζονται θεραπεία. Κατά την αρχική διάγνωση, περίπου στο 50% των περιπτώσεων δεν παρατηρείται κανένα σύμπτωμα. Η υποψία της νόσου τίθεται με τυχαία ανεύρεση μεμονωμένης λεμφοκυττάρωσης στο αίμα ή διαπίστωση λεμφαδενοπάθειας ή και σπληνομεγαλίας κατά την κλινική εξέταση. Όταν υπάρχει συμπτωματολογία αφορά, πιθανή λεμφαδενοπάθεια, λοιμώξεις (βακτηριακή πνευμονία) και σπάνια πυρετό ή σημαντική απώλεια βάρους. Κατά την όψιμη διάγνωση η εκδήλωση της νόσου οφείλεται σε ανοσοανεπάρκεια λόγω υπογαμμασφαιριναιμίας. Επίσης, παρατηρούνται διαταραχές στη λειτουργία των Τ-λεμφοκυττάρων, του συμπληρώματος και των ουδετερόφιλων. Το αποτέλεσμα όλων αυτών των μεταβολών παράλληλα με την επιβάρυνση από τη θεραπεία (βλ. κεφ. Α1.1.10) έχει ως συνέπεια την προσβολή από τυπικές βακτηριακές και άλλες ευκαιριακές λοιμώξεις, οι οποίες ακολουθούνται από υποτροπή της νόσου σε ποσοστό ~80%. Τελικά, επέρχεται ο θάνατος με κύριο αίτιο την σήψη [Roussou P. et al. 2008].

Πολύ συχνά, εμφανίζονται κάποιες αυτοάνοσες διαταραχές, κυρίως του αιμοποιητικού συστήματος, με υψηλότερη επίπτωση στα άτομα που έχουν υποβληθεί σε θεραπεία. Τα αυτοαντισώματα που παράγονται είναι έναντι του DNA, των ιστονών, των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών, των ερυθροκυττάρων, των αιμοπεταλίων κ.α. [Kipps TJ. et al. 1993]. Κατά τη διάγνωση της ΧΛΛ ανευρίσκεται Coombs (+) αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία περίπου στο 2% των ασθενών. Τελικά, ένα ποσοστό ασθενών ~7,7–35% με την εξέλιξη της νόσου θα αναπτύξει αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία [Hamblin TJ. et al. 1986]. Περίπου το 90% αυτών των ασθενών έχει IgG αντιερυθροκυτταρικά αντισώματα, ενώ οι υπόλοιποι IgM. Τα αντι-ερυθροκυτταρικά αντισώματα είναι συνήθως θερμά, πολυκλωνικά IgG, τα οποία παράγονται πιθανότατα από μη κακοήθη Β-

λεμφοκύτταρα [Kipps TJ. et al. 1993; Hamblin TJ. et al. 1986], Επιπλέον, έχουν περιγραφεί και IgG αντισώματα με σύσταση ελαφρών αλυσίδων αντίστοιχη του λευχαιμικού κλώνου [Sthoeger ZM. et al. 1993], γεγονός που υποδηλώνει εκτεταμένη διαταραχή του ανοσοποιητικού συστήματος. Η αναιμία που εμφανίζεται μπορεί να οφείλεται και σε διάφορους παθογενετικούς μηχανισμούς, όπως διήθηση του μυελού, σπληνομεγαλία, ανεπάρκεια αιμοποιητικών παραγόντων, απώλεια αίματος, ή αναιμία χρόνιας νόσου. Πιο σπάνια, φαινόμενα που ακολουθούν την αυτοανοσία είναι η αυτοάνοση θρομβοπενία και η απλασία της ερυθράς σειράς, ενώ εκτός αιμοποιητικού συστήματος μπορεί να εμφανιστεί νεφρωσικό σύνδρομο, αγγειοοίδημα και παρανεοπλασματική πέμφιγα [Johnston JB. 2003; Roussou P. et al. 2008].

Α1.1.6 Διάγνωση

Η ΧΛΛ αργεί συνήθως να εκδηλώσει συμπτώματα τα οποία γίνονται αντιληπτά από τον ασθενή. Τις περισσότερες φορές υποψία για τη νόσο κινείται από τη γενική εξέταση αίματος κατά την οποία προκύπτει αυξημένος αριθμός λεμφοκυττάρων (>4000/μL). Κάποιες φορές, αφορμή για τη διάγνωση είναι η ανώδυνη διόγκωση των λεμφαδένων κι ακόμα πιο σπάνια γενικά συμπτώματα όπως κόπωση, έντονη εφίδρωση, πυρετός και ανεξήγητη απώλεια βάρους [Kuss BJ. et al. 2017].

Με την χρήση της τεχνικής της κυτταρομετρίας ροής προσδιορίζεται ο ανοσοφαινότυπος των λεμφοκυττάρων, εξέταση η οποία στις περισσότερες περιπτώσεις οριστικοποιεί τη διάγνωση της ΧΛΛ ή λέμφωμα. Η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιείται ως ανάλυση από το 1970, κατά την οποία μελετώνται συγκεκριμένες πρωτεΐνες στην επιφάνεια των κυττάρων και διαπιστώνεται η ταυτότητά τους. Η ΧΛΛ ορίζεται με βάση το χαρακτηριστικό ανοσοφαινότυπο των Β λεμφοκυττάρων, ο οποίος είναι CD5+, CD19+, CD23+, FMC7-, ενώ οι δείκτες CD20, CD79b/CD22 και οι επιφανειακές ανοσοσφαιρίνες ανευρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα και με ασθενή έκφραση [Matutes et al. 2000; Moreau et al. 1997]. Στην προκειμένη περίπτωση η εξέταση αποκαλύπτει ότι στο αίμα κυκλοφορούν αυξημένα Β λεμφοκύτταρα τα οποία φέρουν τα χαρακτηριστικά της ΧΛΛ. Για την διάγνωση της ΧΛΛ τυπικά απαιτείται η ανίχνευση >5000 ΧΛΛ κυττάρων/μL, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί και να υπάρχουν λιγότερα αλλά όμως να συνυπάρχουν διογκωμένοι λεμφαδένες ή/και σπλήνας. Σε αυτές τις περιπτώσεις γίνεται βιοψία του λεμφαδένα, εφόσον είναι εφικτό, η οποία κατά κανόνα θέτει τη διάγνωση κάποιου λεμφώματος. Σε περίπτωση που υπάρχουν λιγότερα από 5000 κύτταρα ΧΛΛ/μL στο αίμα και δεν συνυπάρχουν διογκωμένοι λεμφαδένες ή σπλήνας, αναφερόμαστε στη μονοκλωνική Β λεμφοκυττάρωση, μια κατάσταση η οποία με την πάροδο του χρόνου μπορεί να εξελιχθεί σε ΧΛΛ. Είναι σημαντικό να γίνεται επιβεβαίωση ότι ο ασθενής πάσχει από ΧΛΛ και όχι από κάποιο άλλο λαμφουπερπλαστικό νόσημα (διαφορική διάγνωση). Ο ανοσοφαινότυπος και ειδικά το CD5 αντιγόνο διαχωρίζει τη ΧΛΛ από τις άλλες κακοήθειες των Β λεμφοκυττάρων και έτσι είναι αυτός που χρησιμοποιείται για την αρχική διάγνωση [Zenz T. et al. 2010].

Το 1994 ήταν η πρώτη φορά που ο καθηγητής Ε. Matutes πρότεινε ένα σύστημα βαθμολόγησης για την διαφορική διάγνωση της Β-ΧΛΛ, αναφέρεται ως το σύστημα βαθμολόγησης Matutes (Matutes scoring system) (Πίνακας Α2) το οποίο αξιολογεί την έκφραση πέντε αντιγόνων [Matutes et al. 1994, Kohnke et al. 2017].

Μεμβρανικός Δείκτης	Βαθμοί	
	1	0
SmIg	Ασθενές	Ισχυρό
CD5	Θετικό	Αρνητικό
CD23	Θετικό	Αρνητικό
FMC7	Αρνητικό	Θετικό
CD22/CD79b (SN8)	Ασθενές	Ισχυρό
Στην ΧΛΛ οι βαθμοί είναι >3 ενώ στα άλλα λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα <3.		

Πίνακας Α2: Σύστημα βαθμολόγησης Matutes για την διάγνωση της ΧΛΛ.

Τέλος άλλοι παράγοντες όπως η ενδοκυττάρια κινάση της τυροσίνης, ZAP-70 (zeta-associated protein of 70kDa), ο δείκτης CD38, η β2-μικροσφαιρίνη και άλλα ευρήματα από την Κλασική και Μοριακή Κυτταρογενετική ανάλυση παίζουν σημαντικό ρόλο στην διαφορική διάγνωση, τα οποία αναφέρονται διεξοδικότερα σε ακόλουθα κεφάλαια της παρούσας εργασίας.

Α1.1.7 Σταδιοποίηση

Η σταδιοποίηση της νόσου γίνεται αμέσως μετά τη διάγνωση και έχει σαν σκοπό την εκτίμηση της κλινικής πορείας των ασθενών με ΧΛΛ, ώστε να καθορίσει πόσο προχωρημένη είναι η νόσος για προγνωστικούς λόγους. Ειδικά για τη ΧΛΛ υπάρχουν δύο συστήματα σταδιοποίησης, εξίσου καθιερωμένα και ευρέως χρησιμοποιούμενα, το Σύστημα κατά Binet και το Σύστημα κατά Rai. Και τα δύο αξιολογούν αποκλειστικά ευρήματα από τη γενική ανάλυση αίματος και την κλινική εξέταση, δηλαδή την παρουσία ή όχι αναιμίας (χαμηλού αιματοκρίτη), θρομβοπενίας (χαμηλών αιμοπεταλίων), διογκωμένων λεμφαδένων, ήπατος ή/και σπλήνα.

Το στάδιο που βρίσκεται η νόσος είναι ένας από τους παράγοντες που επηρεάζουν την πρόγνωση της, δηλαδή το πόσο γρήγορα θα εξελιχθεί και πόσο σύντομα θα χρειαστεί θεραπεία. Όσο πιο πρώιμο είναι το στάδιο (π.χ. Α κατά Binet ή 0 κατά Rai), τόσο καλύτερη η πρόγνωση [Mina A. et al. 2018; Hallek M.2017].

A1.1.7.1 Σύστημα σταδιοποίησης κατά Binet

Στάδιο	Κλινικά Χαρακτηριστικά
A	Αιμοσφαιρίνη στην γενική ανάλυση αίματος ≥ 10g/dl Αιμοπετάλια στην γενική ανάλυση αίματος ≥ 100.000 <3 διογκωμένες περιοχές (π.χ. λεμφαδένες στο λαιμό, στις μασχάλες, στις βουβωνικές περιοχές, ή διογκωμένο ήπαρ ή σπλήνα κατά την κλινική εξέταση με ψηλάφηση και όχι από απεικονιστικές εξετάσεις π.χ. υπέρηχο, ακτινογραφίες ή αξονικές και μαγνητικές τομογραφίες)
B	Αιμοσφαιρίνη στην γενική ανάλυση αίματος ≥ 10g/dl Αιμοπετάλια στην γενική ανάλυση αίματος ≥ 100.000 ≥3 διογκωμένες περιοχές (π.χ. λεμφαδένες στο λαιμό, στις μασχάλες, στις βουβωνικές περιοχές, ή διογκωμένο ήπαρ ή σπλήνα κατά την κλινική εξέταση με ψηλάφηση και όχι από απεικονιστικές εξετάσεις π.χ. υπέρηχο, ακτινογραφίες ή αξονικές και μαγνητικές τομογραφίες)
C	Αιμοσφαιρίνη στην γενική ανάλυση αίματος <10g/dl ή Αιμοπετάλια στην γενική ανάλυση αίματος <100.000

A1.1.7.2 Σύστημα σταδιοποίησης κατά Rai

Στάδιο	Κλινικά Χαρακτηριστικά
0	Μόνο αυξημένα λεμφοκύτταρα στη γενική ανάλυση αίματος
I	Αυξημένα λεμφοκύτταρα στην γενική ανάλυση αίματος και διογκωμένοι λεμφαδένες
II	Αυξημένα λεμφοκύτταρα στην γενική ανάλυση αίματος και διογκωμένο ήπαρ ή σπλήνας
III	Αιμοσφαιρίνη στη γενική ανάλυση αίματος <11g/dl
IV	Αιμοπετάλια στη γενική αίματος <100.000

Με τον τρόπο αυτό κατά Rai:
ΣΤΑΔΙΟ 0 > χαμηλής επικινδυνότητας
ΣΤΑΔΙΑ I και II > μέσης επικινδυνότητας
ΣΤΑΔΙΑ III και IV > υψηλής επικινδυνότητας.
Και τα δύο συστήματα κλινικής σταδιοποίησης χρησιμοποιούνται για την προγνωστική διαστρωμάτωση των ασθενών, στερούνται ωστόσο προβλεπτικής αξίας σε ασθενείς αρχικών σταδίων. Έτσι στα στάδια αυτά οι κλινικοί γιατροί προσθέτουν και άλλους παράγοντες που αποτελούν προγνωστικούς στόχους για την πρόγνωση και θεραπεία της ΧΛΛ [Hallek M. 2017].

A1.1.8 Πρόγνωση

Η κλινική εικόνα των ασθενών με τα ανεπαίσθητα συμπτώματα και τα αμυδρά εργαστηριακά ευρήματα στα αρχικά στάδια της ΧΛΛ δεν μπορεί να εκφράσει και να χαρακτηρίσει τυχόν επιθετική νόσο. Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, τα υπάρχοντα συστήματα ταξινόμησης (Rai και Binet) δεν εξασφαλίζουν επιτυχή πρόγνωση για τους ασθενείς που βρίσκονται στα πρώτα στάδια της νόσου,

και έτσι επιπλέον προγνωστικοί δείκτες απαιτούνται για ολοκληρωμένη και επιτυχή πρόγνωση στην ΧΛΛ. Ακόμα και αν κανείς γνωρίζει ότι έχει αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξει ΧΛΛ, π.χ. αν είναι συγγενής α΄ βαθμού με κάποιον που πάσχει από τη νόσο, δεν μπορεί να κάνει κάτι για να προλάβει ή να αποτρέψει την εμφάνιση της νόσου. Αξίζει να σημειωθεί ότι η μονοκλωνική Β λεμφοκυττάρωση, η κατάσταση που θεωρείται ότι προηγείται χρονικά της ΧΛΛ, ανιχνεύεται σε μεγάλο ποσοστό του γενικού πληθυσμού (1 στα 10 άτομα μπορεί να παρουσιάσει μονοκλωνική Β λεμφοκυττάρωση). Το ποσοστό αυξάνεται ακόμη περισσότερο με την αύξηση της ηλικίας, όμως με την πάροδο του χρόνου μόλις το 1-2% των ατόμων με μονοκλωνική Β λεμφοκυττάρωση θα εκδηλώσει ΧΛΛ και θα απαιτεί θεραπεία [Amaya-Chanaga CI. et al. 2016]. Όσο ποιο μεγάλος ο αριθμός των παθολογικών Β λεμφοκυττάρων που κυκλοφορούν στο αίμα του ατόμου τόσο μεγαλύτερη είναι και η πιθανότητα για τη μετάπτωση της μονοκλωνικής Β λεμφοκυττάρωσης σε ΧΛΛ. Ο αριθμός των παθολογικών Β λεμφοκυττάρων που κυκλοφορούν στο αίμα αποτελεί προγνωστικό παράγοντα για την εμφάνιση της ΧΛΛ όμως, ακόμη και στις περιπτώσεις με αρκετά αυξημένο αριθμό παθολογικών λεμφοκυττάρων, δεν υπάρχει κάτι που θα μπορούσε να γίνει προληπτικά προκειμένου να εμποδιστεί η τυχόν εξέλιξη της νόσου. Παράλληλα, η έναρξη της θεραπείας στα άτομα με ΧΛΛ γίνεται μόνο όταν εμφανιστούν συμπτώματα από τη νόσο. Κατά συνέπεια, η διαπίστωση της πάθησης όσο το δυνατό νωρίτερα όπως συμβαίνει με άλλους καρκίνους, π.χ. τον καρκίνο του εντέρου ή του πνεύμονα, δεν έχει νόημα αφού η θεραπεία στην περίπτωση της ΧΛΛ ξεκινά μόνο όταν η νόσος προχωρήσει αρκετά ώστε να εμφανιστούν προβλήματα [Cramer P. et al. 2011].

Εκτός από τη διάκριση σε μεταλλαγμένο IgVH και μη, που αναφέρθηκε ήδη ως ο σημαντικότερος δείκτης στη ΧΛΛ (βλ. κεφ. Α1.1.4.), διερευνάται ο ρόλος των χρωμοσωμικών ανωμαλιών (βλ. κεφ. Α1.2.), διαφόρων άλλων βιολογικών προγνωστικών δεικτών και πολλών ακόμα παραγόντων.

Α1.1.8.1 Βιολογικοί προγνωστικοί δείκτες

Η μεγάλη κλινική ετερογένεια που χαρακτηρίζει την ΧΛΛ οδήγησε στην αναζήτηση επιπρόσθετων βιολογικών δεικτών με προγνωστική αξία. Σχετικές μελέτες έδειξαν ότι η κλινική ετερογένεια της νόσου είναι συνυφασμένη με την ετερογένεια σε γενετικό, βιολογικό και ανοσοφαινοτυπικό επίπεδο. Η καλύτερη κατανόηση της νόσου οδήγησε στην εισαγωγή μιας σειράς βιολογικών δεικτών οι οποίοι επιτρέπουν να προβλεφθεί με μεγαλύτερη ακρίβεια η έκβαση των ασθενών.

i) **Ανοσοφαινοτυπικοί δείκτες**:

- Έκφραση του CD38, μιας διαμεμβρανικής γλυκοπρωτεΐνης τύπου ΙΙ. Η έκφραση του CD38 στην επιφάνεια των Β λεμφοκυττάρων πλέον αποτελεί ανεξάρτητο αρνητικό προγνωστικό παράγοντα, ενώ συνήθως συνδυάζεται με μη μεταλλαγμένο τύπο ΧΛΛ, υψηλές τιμές ZAP-70 (βλ. παρακάτω), καθώς και υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης λεμφαδενοπάθειας, ηπατομεγαλία, κυτταρογενετικές αλλοιώσεις υψηλού κινδύνου, αυξημένο b2M, σύντομο χρονικό διάστημα μέχρι την έναρξη της πρώτης θεραπείας, κακή ανταπόκριση στη θεραπεία και βραχύτερη συνολική επιβίωση [D'Arena G. et al. 2001; Ghia P. et al. 2003; Hayat A. et al. 2006; Oscier DG. et al. 2013]. Παρόλα αυτά η σύνδεση της έκφρασης του CD38 και της μεταλλακτικής κατάστασης του IGHV δεν είναι απόλυτη. Επομένως, η έκφραση του CD38 μπορεί να μην είναι επαρκής δείκτης που να αντικαθιστά ως προγνωστικό παράγοντα την εικόνα μετάλλαξης του IGHV, ωστόσο είναι ένας ευρέως διαθέσιμος πολύτιμος προγνωστικός παράγοντας [Jelinek DF. et al. 2001]. Υπάρχουν αρκετές διαφωνίες σχετικά με

την ανεύρεση του καταλληλότερου ορίου θετικότητας ως προς τον δείκτη CD38, όπου αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφρασή του μεταβάλλετε με την πάροδο του χρόνου. [Kröber A. et al. 2002; Hamblin TJ. et al. 2002; Boonstra JG. et al. 2006; Ghia P. et al. 2003].

- Έκφραση της ZAP-70 (zeta-associated protein of 70kDa), μιας ενδοκυττάριας κινάσης της τυροσίνης που κανονικά εκφράζεται στα Τ λεμφοκύτταρα και τα NK κύτταρα (Natural Killers) και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην έναρξη της σηματοδότησης και είναι ομόλογη της πρωτεΐνης Syk, η οποία ελέγχει την μεταβίβαση σήματος μέσω του BCR υποδοχέα στα Β λεμφοκύτταρα. Η ZAP-70 αρχικά θεωρήθηκε ότι δεν εκφράζεται στα φυσιολογικά Β λεμφοκύτταρα, ωστόσο ποιο πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι εκφράζεται ιδιαίτερα στα ενεργοποιημένα Β λεμφοκύτταρα. Η έκφρασή της στα κύτταρα της ΧΛΛ έχει συσχετιστεί με δυσμενή πρόγνωση. Παράλληλα η έκφρασή της έχει επιπλέον συσχετιστεί με το φορτίο των μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV, όπου οι μεταλλαγμένες αλληλουχίες στα γονίδια αυτά είναι αρνητικές στη ZAP-70 ενώ οι περιπτώσεις με αμετάλλακτες αλληλουχίες συχνά είναι θετικές. Σήμερα επικρατεί η άποψη ότι η έκφραση της ZAP-70 στα κύτταρα της ΧΛΛ προκαλεί αυξημένη μεταβίβαση του σήματος του Β κυτταρικού υποδοχέα, γεγονός που είναι πολύ πιθανό να σχετίζεται με κακή πρόγνωση της νόσου στις περιπτώσεις ΧΛΛ οι οποίες εκφράζουν τη ZAP-70. [Orchard JA. et al. 2004; Catherwood MA. et al. 2006; Kipps TJ. 2007; Muñoz L. et al. 2014; Jafari Ghahfarokhi H. et al.2014].

ii) Κυτταρογενετικοί δείκτες (αναλυτικότερα βλ. κεφ. Α1.2)

Η συχνότητα ανίχνευσης χρωμοσωμικών ανωμαλιών στα κλωνικά κύτταρα της ΧΛΛ κυμαίνονταν από 30-50% με μεθόδους κλασσικής κυτταρογενετικής έως περίπου 80% με την μέθοδο FISH [Dicker F. et al. 2006]. Τα τελευταία χρόνια η χρησιμοποίηση νέων διεγερτών των κυττάρων της ΧΧΛ έχει αυξήσει σημαντικά το ποσοστό αλλά και την ποικιλία των κυτταρογενετικών αλλοιώσεων στον καρυότυπο. Από τις ποιο συχνές κυτταρογενετικές ανωμαλίες που παρουσιάζονται σε άτομα με ΧΛΛ, η έλλειψη στο χρωμόσωμα 13 θεωρείται δείκτης καλής πρόγνωσης και η τρισωμία του χρωμοσώματος 12 έχει συσχετιστεί με ενδιάμεση πρόγνωση. Επιπλέον, ελλείψεις στις χρωμοσωμικές ζώνες 11(q22-q23), όπου εντοπίζονται τα γονίδια RDX (radixin) και ATM (ataxia telangiectasia mutated) και ιδίως στο 17p (TP53) καθορίζουν μια ομάδα ασθενών με ταχεία εξέλιξη της νόσου και μικρή επιβίωση. Εξίσου δυσμενείς είναι η πρόγνωση για ασθενείς με μεταλλάξεις του γονιδίου TP53, χωρίς τη δομική ανωμαλία του χρωμοσώματος 17p [Amaya-Chanaga CI. et al. 2016].

iii) Φορτίο μεταλλάξεων των γονιδίων IGHV (βλ. κεφ. Α1.1.4.1.)

Στη ΧΛΛ, η ανάλυση των μεταλλάξεων των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών δημιούργησε δύο κατηγορίες πρόγνωσης ασθενών, με ή χωρίς σωματικές μεταλλάξεις του IGHV. Οι δύο αυτές κατηγορίες, παρουσιάζουν και διαφορετική κλινική πορεία. Οι περιπτώσεις στις οποίες IGHV των νεοπλασματικών λεμφοκυττάρων φέρουν σωματικές μεταλλάξεις έχουν πιο ήπια εξέλιξη και μεγαλύτερη συνολική επιβίωση, ενώ όσες δεν φέρουν σωματικές μεταλλάξεις ή φέρουν λίγες έχουν μια πιο δυσμενή εξέλιξη.

Παλαιότερα, επικράτησε η άποψη ότι οι κλώνοι που φέρουν αμετάλλακτες αλληλουχίες IGHV προέρχονται από ένα κύτταρο που δεν έχει έρθει σε επαφή με αντιγόνο, ενώ οι κλώνοι που φέρουν μεταλλαγμένες αλληλουχίες από ένα κύτταρο με εμπειρία αντιγόνου που έχει περάσει από το βλαστικό κέντρο. Ωστόσο, η ύπαρξη ιδιαίτερων χαρακτηριστικών στην περιοχή πρόσδεσης του αντιγόνου (VH CDR3) σε αναδιατάξεις με αμετάλλακτα γονίδια IGHV υποδεικνύουν ότι σε ορισμένες από αυτές τις περιπτώσεις τα κύτταρα έχουν

ενεργοποιηθεί από συγκεκριμένα αυτοαντιγόνα ή εξωγενή παθογόνα, πιθανόν εκτός των βλαστικών κέντρων [Caligaris-Cappio F. et al. 2004].

iv) Μοριακή στερεοτυπία του Β κυτταρικού υποδοχέα (BCR)

Στην ΧΛΛ παρατηρούνται υποσύνολα ασθενών με σχεδόν ταυτόσημους ή πολύ όμοιους Β κυτταρικούς υποδοχείς (B cell resceptors, BCRs). Αυτό το γεγονός είναι αξιοσημείωτο λόγο του ότι, η πιθανότητα δύο διαφορετικά Β λεμφοκύτταρα να εκφράζουν στερεότυπους υποδοχείς είναι μηδαμινή (10^{-12}), βάση των μηχανισμών δημιουργίας ποικιλότητας των ανοσοσφαιρίνων (βλ. κεφ. Α1.1.4.1). Το φαινόμενο αυτό στη βιβλιογραφία περιγράφεται με τον όρο στερεοτυπία του BCR. [Sarkar M. et al. 2016].

Η στερεοτυπία δείχνει να είναι συχνή στην ΧΛΛ. Μελέτη 7500 ασθενών με ΧΛΛ αποκάλυψε ότι περίπου το 30% των περιπτώσεων φέρουν στερεότυπους BCR [Darzentas N. et al.2010]. Η έκφραση στερεότυπων BCR είναι πολύ συχνότερη σε ασθενείς με αμετάλλακτα IGHV γονίδια (>40%) σε σχέση με τους ασθενείς με μεταλλαγμένα γονίδια IGHV (~15%). Επίσης, η συχνότητα της στερεοτυπίας διαφέρει ανάλογα με το ρεπερτόριο των γονιδίων IGHV [Agathangelidis A. et al. 2012].

Οι περιπτώσεις ΧΛΛ που ανήκουν σε στερεότυπα υποσύνολα φαίνεται να μοιράζονται και κοινά κλινικά χαρακτηριστικά και πλέον συγκεκριμένα στερεότυπα υποσύνολα σχετίζονται με ιδιαίτερη πρόγνωση για τη νόσο [Stamatopoulos K. et al. 2017]. Με βάση τα πιο πάνω φαίνεται πως η στερεοτυπία του Β κυτταρικού υποδοχέα καταργεί τη λογική του τυχαίου στην οντογένεση της ΧΛΛ και μπορεί να θεωρηθεί ως ισχυρότατη ένδειξη για την αναγνώριση κοινού επιτόπιου.

	Καλή Πρόγνωση	**Κακή Πρόγνωση**
Δείκτες στον ορό (Stk,Scd23, β2M)	Φυσιολογικοί δείκτες	Αυξημένοι δείκτες
Κυτταρογενετικοί	Φυσιολογικός del(13q)	del(11q), del(17p)
Έκφραση του CD38	<20% (ή <30%)	>20% (ή >30%)
Γονίδια IGVH	Μεταλλαγμένος τύπος (Mutated)	Αμετάλλακτος τύπος (unmutated)
Πρωτεΐνη ZAP-70	-	+

Πίνακας Α3: Νέοι προγνωστικοί παράγοντες στη ΧΛΛ.

Εν συντομία, με βάση όσα αναφέρθηκαν μπορούμε να πούμε πως η πρόγνωση για εμφάνιση της ΧΛΛ είναι δυσμενής όταν υπάρχει :

- Διάχυτη διήθηση, προσβολή του μυελού των οστών
- Μεγάλη ηλικία εμφάνισης της νόσου
- Έλλειψη στα χρωμοσώματα 17p ή 11q
- Μεγάλη τιμή Β2 – μικροσφαιρίνης στο αίμα
- Χρόνος διπλασιασμού λεμφοκυττάρων σε διάστημα λιγότερο των 12 μηνών
- Αυξημένος αριθμός άτυπων ή «μεγάλων» λεμφοκύτταρων στο αίμα
- Υψηλό ποσοστό κυττάρων ΧΛΛ που περιέχουν ZAP-70 (περισσότερο 20%) ή ποσοστό έκφρασης CD38 (>30%)

Α1.1.9 Αιτιολογία – Πιθανοί παράγοντες κινδύνου

Ως παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη κάποιας κακοήθειας θεωρούμε κάτι το οποίο αυξάνει την πιθανότητα ενός ατόμου να αναπτύξει τη συγκεκριμένη κακοήθεια. Ανάμεσα στους γενικούς παράγοντες κινδύνου για καρκίνο είναι η προχωρημένη ηλικία, το προσωπικό ή/και οικογενειακό ιστορικό, η παχυσαρκία, η χρήση καπνού, συγκεκριμένα χημικά (όπως το βενζόλιο), η έκθεση σε ραδιενέργεια κλπ. Μπορούμε να αποφύγουμε ορισμένους από αυτούς, όπως το κάπνισμα, η μη ισορροπημένη διατροφή, υπάρχουν όμως και άλλοι που δεν μπορούν να ελεγχθούν, όπως για παράδειγμα το επερχόμενο γήρας.

Ωστόσο, το να έχει κανείς κάποιον ή κάποιους παράγοντες κινδύνου για ένα πολυποπαραγοντικό νόσημα, δεν σημαίνει ότι θα εμφανίσει με βεβαιότητα την πάθηση αυτή. Αντίστροφα, μπορεί η πάθηση να εμφανιστεί σε κάποιον που δεν είχε κανένα από τους γνωστούς παράγοντες κινδύνου. Όσο αφορά την ΧΛΛ υπάρχουν λίγοι γνωστοί παράγοντες κινδύνου. Όπως προαναφέρθηκε, οι άντρες έχουν αυξημένη πιθανότητα να αναπτύξουν ΧΛΛ σε σχέση με τις γυναίκες, άρα το άρρεν φύλο αποτελεί πιθανό παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση της νόσου παράλληλα με την ηλικία καθώς η πάθηση εμφανίζεται πιο συχνά σε άτομα προχωρημένης ηλικίας.

Παρόλο που η αιτία της ΧΛΛ παραμένει άγνωστη, η νόσος δείχνει γενετική προδιάθεση η οποία ενισχύει ως παράγοντα κινδύνου την κληρονομικότητα της νόσου [Brown JR 2013; Cerhan JR et al. 2015; Hayakawa K et al. 2016; Ghamlouh H et al. 2017]. Το οικογενειακό ιστορικό με προσβεβλημένα μέλη από ΧΛΛ ή άλλο ΧΛΥΠ νόσημα αποτελεί έναν από τους ισχυρότερους παράγοντες κινδύνου εμφάνισης της νόσου. Ο κίνδυνος για του α' βαθμού συγγενείς νοσούντων αυξάνεται κατά 30 φορές ενώ οι ασθενείς με την οικογενή μορφή της νόσου είναι κατά μέσο όρο 10 χρόνια νεότεροι από εκείνους με σποραδική μορφή και τα προσβεβλημένα παιδιά τους νοσούν 15-20 χρόνια νωρίτερα [Brown JR et al. 2008a,b]. Η συνάθροιση των οικογενών περιστατικών με ΧΛΛ τείνει να αποδοθεί στην γενετική προδιάθεση παρά, στην έκθεση σε κοινούς περιβαλλοντικούς παράγοντες. Υπάρχουν αυξημένες πιθανότητες συγκεκριμένα γονίδια να σχετίζονται με την εκδήλωση της ΧΛΛ αλλά και με άλλα συναφή ΧΛΥΠ [Brown JR 2013]. Η αδυναμία των μελετών να εντοπίσουν μια συγκεκριμένη μετάλλαξη γονιδίου με μεγάλη επίπτωση στον ασθενή, όπως συμβαίνει για παράδειγμα στον καρκίνο του μαστού με μετάλλαξη στο γονίδιο BRCA1, πιθανότατα υποδεικνύει ότι στην προδιάθεση της ΧΛΛ διαδραματίζουν ρόλο περισσότερα γονίδια με μικρότερες επιπτώσεις το κάθε ένα ξεχωριστά αλλά δρώντας συνεργατικά πιθανόν να συμβάλουν στην εκδήλωση της νόσου [Ghamlouh H et al. 2017]. Αυτά τα γονίδια μπορεί να είναι δυσκολότερο να εντοπιστούν όμως η έρευνα που επικεντρώνεται σε γονιδιακές μεθόδους μεγάλης κλίμακας και δύναται να εφαρμοστεί σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων είναι πολλά υποσχόμενη για τον προσδιορισμό εκείνων των γονιδίων που σχετίζονται με την εκδήλωση της ΧΛΛ.

Έρευνες και επιδημιολογικές μελέτες σε ασθενείς με ΧΛΛ εντόπισαν αρκετούς παράγοντες κινδύνου, υποστηρίζοντας το σημαντικό ρόλο των περιβαλλοντικών παραγόντων παράλληλα με την γενετική προδιάθεση, στην παθογένεση της ΧΛΛ [Slager SL et al., 2014; Benavente Y et al. 2018]. Αυξημένος κίνδυνος εντοπίζεται σε άτομα που ασχολούνται με αγροτικές εργασίες, χωρίς όμως να ενοχοποιούνται συγκεκριμένες γεωργικές χημικές ουσίες, ενώ παράλληλά κάποιες έρευνες ενοχοποιούν τη χρήση των παρασιτοκτόνων και εντομοκτόνων (καρβονικό άλας, φωσφορικό άλας, DDT) με την εκδήλωση της ΧΛΛ. Γενικότερα όμως η ΧΛΛ τείνει να εμφανίζει μεγαλύτερη συχνότητα σε περιοχές με χαμηλή δόση χρόνιων τοξικών επιδράσεων, όπως λιπάσματα και

παρασιτοκτόνα. Περιστατικά ΧΛΛ έχουν αναφερθεί σε άτομα που εργάζονται με καουτσούκ και πετρέλαιο αλλά και η έκθεση σε βενζόλιο στην εργασία αυξάνει την εκδήλωση της νόσου [Brown JR 2013; Slager SL et al. 2014; Benavente Y et al. 2018).

Γενικά η ΧΛΛ, όπως και οι περισσότερες κακοήθειες στον άνθρωπο, έχει θεωρηθεί ως αποτέλεσμα έκθεσης σε συνδυασμό παραγόντων, οι οποίοι επηρεάζονται από γενετικό υπόβαθρο. Ωστόσο, δεν θεωρείται πιθανό όλες οι περιπτώσεις ασθενών με ΧΛΛ να μοιράζονται μια κοινή ή αποκλειστική αιτία.

Α1.1.10 Θεραπεία

Τα τελευταία χρόνια σημειώθηκε σημαντική πρόοδος στη θεραπεία της ΧΛΛ. Σήμερα, στόχος της θεραπείας στην ΧΛΛ είναι η πλήρης ύφεση, η εξάλειψη της ελάχιστης υπολειμματικής νόσου και τελικά η αύξηση της επιβίωσης. Παρά την πρόοδο στην κατανόηση των παθοφυσιολογικών μηχανισμών της νόσου και την αποκάλυψη νέων προγνωστικών παραγόντων, η ΧΛΛ παραμένει νόσος χωρίς συγκεκριμένη θεραπεία [Rowswell-Turner RB et al. 2017]. Καθώς η νόσος παραμένει ανίατη με συμβατική θεραπεία, η σωστή επιλογή των ασθενών οι οποίοι είναι κατάλληλοι για μεταμόσχευση αλλογενών αιμοποιητικών κυττάρων είναι ένα κρίσιμο ζήτημα. Ιδίως επειδή οι ασθενείς είναι κυρίως μεγάλης ηλικίας ή δεν έχουν νόσο «υψηλού κινδύνου», όπως αυτή ορίζεται από τους προγνωστικούς δείκτες, ώστε να κρίνονται κατάλληλοι για τη συγκεκριμένη θεραπευτική παρέμβαση.

Είναι πλέον αποδεκτό, σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του iwCLL/NCI, ότι η θεραπεία πρέπει να χορηγείται μόνο όταν η νόσος είναι ενεργός [Hallek M et al. 2008].Τα κριτήρια για το χαρακτηρισμό της νόσου ως ενεργό δηλ. για την έναρξη θεραπείας, είναι ο ασθενείς να εμφανίζει τουλάχιστον ένα από τα εξής χαρακτηριστικά:
α) στάδιο III ή IV κατά Binet. β) προοδευτική μυελική ανεπάρκεια (εγκατάσταση ή επιδείνωση προϋπάρχουσας αναιμίας ή θρομβοπενίας) γ) εκσεσημασμένη ή προοδευτική ή συμπτωματική σπληνομεγαλία (>6cm) δ) εκσεσημασμένη ή προοδευτική ή συμπτωματική διόγκωση λεμφαδένων (>10cm) ε) προοδευτική λεμφοκυττάρωση με αύξηση >50% σε 2 μήνες ή υπολογιζόμενος χρόνος διπλασιασμού λεμφοκυττάρων <30.000 (σημαντικό είναι πως ο χρόνος διπλασιασμού λεμφοκυττάρων δεν πρέπει να χρησιμοποιείται σε καμία περίπτωση ως μοναδικός δείκτης ενεργού νόσου) στ) αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία ή/και θρομβοπενία, μη ανταποκρινόμενη σε θεραπεία με κορτικοστεροειδή ή άλλη καθιερωμένη θεραπεία και ζ) ένα ή περισσότερα από τα ακόλουθα συμπτώματα: απώλεια βάρους $\geq$ 10% τους τελευταίους 6 μήνες, μεγάλη καταβολή δυνάμεων (κατάσταση ικανότητας κατά ECOG$\geq$2), πυρετός >38˚C για $\geq$ 2 εβδομάδες χωρίς παρουσία λοίμωξης, νυχτερινές εφιδρώσεις για διάστημα >1 μήνα, χωρίς παρουσία λοίμωξης [Hallek M et al. 2008; Jamroziak K. et al. 2017].

Στην κλινική πράξη, ο θεράπων ιατρός καλείται να επιλέξει μεταξύ διαφόρων διαθέσιμων θεραπευτικών σχημάτων λαμβάνοντας υπόψη τη φυσική κατάσταση του ασθενούς, τους επιβαρυντικούς παράγοντες, το στάδιο Rai ή Binet της νόσου και τα άλλα κυτταρογενετικά και μοριακά ευρήματα που την χαρακτηρίζουν. Ασθενείς που βρίσκονται σε σταθερή, αδρανή φάση της νόσου, χαμηλού κινδύνου ή σταδίου A Binet συνήθως δεν λαμβάνουν θεραπεία. Η επιβίωση μπορεί και να μειωθεί με τη χημειοθεραπεία, η οποία μπορεί να δράσει αρνητικά. Παρ' ολ' αυτά, η μετά ανάλυση μελετών που ασχολήθηκαν με τη υπόθεση της άμεσης έναρξης της θεραπείας, δεν έδειξε διαφορά ως προς την επιβίωση των ασθενών που έλαβαν πρώιμα θεραπεία σε σχέση με όσους έλαβαν θεραπεία μόνο όταν εμφάνισαν ενεργό νόσο [J Natl Cancer Inst. 1999]. Η βάση υπέρ της

πρώιμης έναρξης θεραπείας είναι ότι το φορτίο της νόσου είναι μικρότερο και μπορεί να επιτευχθεί νωρίτερα βαθύτερη ύφεση και έτσι ώστε να μην δοθεί χρόνος στα νεοπλασματικά κύτταρα να αποκτήσουν πρόσθετες γενετικές βλάβες οι οποίες μπορεί να τα κάνουν ανθεκτικά απέναντι στη θεραπεία. Αντίθετα υποστηρίζεται πως οι πρόσθετες γενετικές βλάβες μπορεί να είναι πολλές φορές αποτέλεσμα της θεραπείας και επομένως η καθυστερημένη έναρξη της μπορεί να μεταφράζεται υπέρ της επιβίωσης.

Η ΧΛΛ θεραπεύεται με τη χρήση:

- Χημειοθεραπευτικών φαρμάκων (χημειοθεραπεία): χλωραμβουκίλη (χάπι), φλουνταραμπίνη (χάπι ή ενδοφλέβια χορήγηση), πεντοστατίνη (ενδοφλέβια χορήγηση) και μπενταμουστίνη (ενδοφλέβια χορήγηση). Αυτές οι θεραπείες, έχουν την ιδιότητα να καταστρέφουν τα κύτταρα που πολλαπλασιάζονται με πολύ γρήγορο ρυθμό.
- Μονοκλωνικών αντισωμάτων (ανοσοθεραπεία): ουσίες που κατασκευάστηκαν ώστε να συνδέονται ειδικά σε συγκεκριμένα κύτταρα και να προκαλούν την καταστροφή τους. Στην ΧΛΛ ο στόχος των ουσιών αυτών είναι τα Β λεμφοκύτταρα. Οι συχνότερες ουσίες που χρησιμοποιούνται είναι τα α) Rituximab (Mabthera®), β) Ofatumumab (Arzerra®) γ) Obinutuzumab (Gazyvaro®). Συνήθως αυτά χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με ένα ή περισσότερα χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Οι συνδυασμοί που προτιμώνται είναι: i) Mabthera® - φλουνταραμπίνη – κυκλοφωσφαμίδη και ii) Mabthera® - μπενταμουστίνη. Για προχωρημένης ηλικίας ασθενείς προτιμώνται πιο ήπιοι συνδυασμοί π.χ. κάποιο μονοκλωνικό αντίσωμα σε συνδυασμό με χλωραμβουκίλη.
- Αναστολέων σηματοδότησης: η φαρμακευτική ουσία ibrutinib (Imbruvica ®) (χάπι που δεν συνδυάζεται με κάποιο άλλο φάρμακο), η φαρμακευτική ουσία idelalisib (Zydelig®) (χάπι που χορηγείται σε συνδυασμό με Mabthera®). Και τα δύο φαίνεται να έχουν αποτελεσματικότητα και χρησιμοποιούνται ως πρώτη θεραπεία για ασθενείς με del(17p) ή μεταλλάξεις του γονιδίου TP53.
- Αλλογενής μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων: μια διαδικασία κατά την οποία ο ασθενείς αρχικά λαμβάνει χημειοθεραπεία, με στόχο τον εξαφανισμό του αιμοποιητικού συστήματος δηλ. το «άδειασμα» του μυελού των οστών, ώστε να χορηγηθεί μόσχευμα από κάποιον συμβατό δότη δίνοντας γένεση σε ένα νέο αιμοποιητικό σύστημα. Η θεραπεία αυτή προτείνεται σε ασθενής νεότερης ηλικίας (<60 ετών, χωρίς άλλα σημαντικά προβλήματα υγείας) οι οποίοι πάσχουν από κακής πρόγνωσης ΧΛΛ, αφού πρώτα τους χορηγηθεί κάποιος αναστολέας σηματοδότησης και βρεθεί κατάλληλος συμβατός δότης [Hamblin TJ. 2001; Gurbity Pálfi T. et al. 2017; Jamroziak K. et al. 2017; Gomes LC. et al. 2018]

Αυτή τη στιγμή, σε κλινικές μελέτες δοκιμάζονται αρκετά νέα φάρμακα με υποσχόμενα αποτελέσματα όπως π.χ. venetoclax. Οι νέοι παράγοντες που βρίσκονται υπό κλινική μελέτη παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς στοχεύουν σε συγκεκριμένες διαταραχές της σηματοδότησης οι οποίες στερούν από τα κύτταρα της ΧΛΛ ζωτικά σήματα για την επιβίωση τους, ή επαναπρογραμματίζουν το ανοσοποιητικό σύστημα στρέφοντας το εναντίον των κυττάρων της ΧΛΛ [Seymour JF. et al. 2018; Cramer P. et al. 2018].

Α1.1.11 Εξέλιξη της νόσου

Η εξέλιξη της ΧΛΛ εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τους αναγνωρισμένους προγνωστικούς δείκτες, τα μοριακά και κυτταρογενετικά χαρακτηριστικά [Malek SN. 2013; Sportoletti P. et al. 2014]. Αξιοσημείωτο είναι ότι το 30-35% των μακροχρόνιων επιζώντων ΧΛΛ, διατρέχουν υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης δευτεροπαθών νεοπλασμάτων, κυρίως του επιθηλίου. Αυτή η ευαισθησία δεν φαίνεται να εξαρτάται από την αντινεοπλασματική θεραπεία καθώς παρατηρήθηκε η ίδια συχνότητα σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε αγωγή και σε ασθενείς που δεν έλαβαν θεραπεία. Συγκεκριμένα, σε σύγκριση με τον γενικό πληθυσμό, οι ασθενείς με ΧΛΛ έχουν τετραπλάσια αύξηση του κινδύνου εμφάνισης κακοήθους μελανώματος [Falchi L. et al. 2016].

Α1.1.11.1 Σύνδρομο Richter

Η σχετικά καλοήθης μορφή της ΧΛΛ κάποιες φορές εξελίσσεται προοδευτικά με σταδιακή εμφάνιση περισσότερων συμπτωμάτων και ευρημάτων όπως: η αύξηση του αριθμού των λεμφοκυττάρων με παράλληλη μείωση του αιματοκρίτη και των άλλων αιματολογικών παραμέτρων, οι συχνές λοιμώξεις, η οργανομεγαλία και ο πυρετός, και έπεται κακή κατάληξη μέσα σε μερικά χρόνια από τη διάγνωση. Σε ορισμένες περιπτώσεις η κατάσταση επιβαρύνεται ξαφνικά και απρόβλεπτα, με την εμφάνιση πολύ άωρων λεμφικών στοιχείων και λεμφοβλαστών στο αίμα, ασύμμετρης διόγκωσης λεμφαδένων, και γενικών συμπτωμάτων. Η βιοψία των λεμφαδένων είναι συμβατή με διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β λεμφοκύτταρα. Η κατάσταση αυτή χαρακτηρίζεται ως σύνδρομο Richter και έχει κακή εξέλιξη. [Condoluci A. et al.2017; Wąsik-Szczepanek E. et al. 2018].

Α1.2. Κυτταρογενετική στη ΧΛΛ

Η παρουσία κυτταρογενετικών ανωμαλιών αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα στους καρυοτύπους των ασθενών με ΧΛΛ. Η αναγνώριση συγκεκριμένων κυτταρογενετικών αλλοιώσεων είναι σημαντική στην κλινική πρακτική, καθιστώντας έτσι δυνατό τον διαχωρισμό των ασθενών σε διαφορετικές ομάδες κινδύνου βάση των καρυοτυπικών τους ευρημάτων. Πιο συγκεκριμένα η πολυπλοκότητα του καρυότυπου και το ποσοστό των μη φυσιολογικών κυττάρων έχουν προγνωστική σημασία και συγκεκριμένες χρωμοσωμικές αλλοιώσεις έχουν επίπτωση στην κλινική έκβαση των ασθενών [Heim S et al. 2015]. Τα κυτταρογενετικά ευρήματα συμβάλλουν καθοριστικά στη διάγνωση, πρόγνωση και επιλογή του κατάλληλου θεραπευτικού πρωτοκόλλου των ασθενών με ΧΛΛ.

Α1.2.1 Κυτταρογενετικές τεχνικές – Καρυότυπος

Ήδη από το 1990, η πρόγνωση στη ΧΛΛ συσχετίστηκε με αλλαγές στο γονιδίωμα, εξετάζοντας τα χρωμοσώματα των ασθενών σε δείγμα κυττάρων, μετρώντας τον αριθμό τους και αξιολογώντας τις δομικές αλλοιώσεις τους, χρησιμοποιώντας τεχνικές G-banding [Juliusson G. et al. 1990]. Η παραδοσιακή τεχνική G-banding παρέχει επισκόπηση ολόκληρου του γονιδιώματος, όμως η διαγνωστική αξία της μπορεί να είναι χαμηλή σε κακοήθειες, όπως η ΧΛΛ, που παρουσιάσουν χαμηλή μιτωτική δραστηριότητα. Έτσι, σε μεγαλύτερης διάρκειας καλλιέργειες, στο μέσο της καλλιέργειας, εισήχθησαν διεγερτικοί παράγοντες όπως είναι το 12-0-tetradecanoy1phorbol-13-acetate (TPA), phytohemagglutinin (PHA), lipopolysaccharide (LPS) και pokeweed mitogen (PWM). Ωστόσο, οι κλωνικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες ανιχνεύθηκαν περίπου μόνο στο 40% των περιπτώσεων, με πιο συνηθισμένες την τρισωμία 12 και τις αλλοιώσεις στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 13 (13q14) [Hernandez JM. et al. 1995].

Σήμερα, στην καλλιέργεια του μυελού των οστών των ασθενών με ΧΛΛ γίνεται προσθήκη ενός συνδυασμού διεγερτών των Β κυττάρων. Στο εργαστήριό μας χρησιμοποιείται ο συνδυασμός DSP-30 και ιντερλευκίνης-2 (IL-2), αυξάνοντας έτσι σημαντικά το ποσοστό ανίχνευσης των κλωνικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών, εξατομικεύοντας την πρόγνωση των ασθενών [Mayr C. et al. 2006; Dicker F. et al. 2006]. Μετά από διέγερση με CpG-ολιγοδεοξυνουκλεοτίδια και IL-2, η παρατηρούμενη συχνότητα αλλοιώσεων γίνεται συγκρίσιμη με αυτήν που ανιχνεύεται με τη FISH (φθορίζον in situ υβριδισμός βλ. Α1.2.2.), ενώ παράλληλα αυξάνεται και η ποικιλία των χρωμοσωμικών αλλοιώσεων που παρατηρούνται. Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατό να ανιχνευθούν επιπλέον περιπτώσεις ΧΛΛ, οι οποίες φέρουν διάφορες αλλοιώσεις συμβάλλοντας στη βαθύτερη κατανόηση της νόσου γενικότερα αλλά και των προγνωστικών υποομάδων της [Zenz T. et al. 2010]. Τέλος, από την κυτταρογενετική μελέτη μπορεί να φανεί η παρουσία εξελικτικών κλώνων που μπορεί να συσχετισθούν με επιθετική νόσο. Σήμερα, η κυτταρογενετική μελέτη ασθενών με ΧΛΛ κατευθύνει τη θεραπευτική αντιμετώπιση, ενώ γενικά η κλασική και η μοριακή Κυτταρογενετική βοηθούν στη προγνωστική διαστρωμάτωση των ασθενών και στην ανάπτυξη νέων στοχευμένων θεραπειών.

Α1.2.2 Φθορίζον *In Situ* Υβριδισμός (Fluorescence *In Situ* Hybridization, FISH)

Η πρόοδος της κυτταρογενετικής στη ΧΛΛ στηρίζεται όχι μόνο σε μεθόδους κλασσικής κυτταρογενετικής, αλλά και στις μεθόδους μοριακής κυτταρογενετικής, με κυρίαρχη την τεχνική του

φθορίζοντος *in situ* υβριδισμού (Fluorescence in situ Hybridization, FISH). Αρκετές μελέτες έχουν αναδείξει τη χρησιμότητα των τεχνικών της μοριακής κυτταρογενετικής, όπως είναι η ανάλυση FISH με ειδικούς κεντρομεριδιακούς ανιχνευτές (centromeric probes) ή ανιχνευτές ειδικών χρωμοσωμικών περιοχών (locus-specific probes), η τεχνική της φασματικής καρυοτυπίας (Spectral Karyotyping, SKY) και η τεχνική του πολυχρωματικού FISH (M-FISH), για την ακριβέστερη ανίχνευση χρωμοσωμικών αλλοιώσεων.

Η τεχνική FISH παρουσιάζει υψηλότερη ανάλυση από την κλασσική κυτταρογενετική και επιτρέπει την ανίχνευση των χρωμοσωμικών ανωμαλιών, ανεξάρτητα από την ικανότητα του κυττάρου για διαίρεση. Παράλληλα παρέχει πρόσθετες, ιδιαιτέρως χρήσιμες πληροφορίες σε σημαντικό ποσοστό των περιστατικών με ΧΛΛ, ιδίως για (α) την ανίχνευση υπομικροσκοπικών αλλοιώσεων σε ασθενείς με φυσιολογικό καρυότυπο, (β) την ανίχνευση υπομικροσκοπικών αλλοιώσεων σε ασθενείς με άλλες χρωμοσωμικές αλλοιώσεις στο καρυότυπο, (γ) την ανίχνευση χρωμοσωμικών αλλοιώσεων σε περιπτώσεις που δεν υπάρχουν μεταφάσεις ή οι μεταφάσεις έχουν κακή ποιότητα και (δ) τον λεπτομερέστερο χαρακτηρισμό σύνθετων αλλοιώσεων [Lichter P. et al. 1988]. Παρ ολ' αυτά, η ανάλυση FISH περιορίζεται σε συγκεκριμένους στόχους του γονιδιώματος που έχουμε προεπιλέξει χρησιμοποιώντας συγκεκριμένους ανιχνευτές και δεν αποκαλύπτει αλλοιώσεις σε όλο το γονιδίωμα όπως ο καρυότυπος.

Συγκεκριμένα για τη ΧΛΛ, η ανάλυση FISH χρησιμοποιεί ανιχνευτές που αφορούν τις συχνότερες αλλοιωμένες περιοχές της ΧΛΛ, οι οποίες αφορούν περίπου το 80% των περιπτώσεων. Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του iwCLL/NCI Διεθνούς Εργαστηρίου για τις Χρόνιες Λεμφοκυτταρικές Λευχαιμίες, συνίσταται έλεγχος FISH πριν την έναρξη θεραπείας για τη διερεύνηση της ύπαρξης ανωμαλίας στις περιοχές 11q22 (ATM), 13q14 (D13S319), TP53 (17p13) καθώς και για την κατάδειξη τρισωμίας 12. Επίσης, επιπλέον προτείνεται ο έλεγχος για έλλειψη στο μακρό βραχίονα του χρωμοσώματος 6 στις περιοχές 6q21 ή/και 6q23 [Hallek M. et al. 2008, Hallek M. et al. 2018]. Το National Comprehensive Cancer Network (NCCN) συνιστά έλεγχο FISH ή κυτταρογενετικό έλεγχο με χρήση νέων μιτογόνων ώστε να διερευνηθεί η ύπαρξη και άλλων κλωνικών αλλοιώσεων. Η FISH αποκάλυψε επίσης ότι η κλωνική εξέλιξη είναι κοινή στην ΧΛΛ και αρκετές μακροχρόνιες μελέτες σε μεγάλες ομάδες ασθενών έδειξαν ότι η κλωνική εξέλιξη που εμφανίζεται στο 20-40% των ασθενών αντικατοπτρίζει την εξέλιξη της νόσου [Fegan C. et al. 1995; Finn WG. et al. 1998; Cuneo A. et al. 2002; Stilgenbauer S. et al. 2002; Stilgenbauer S. et al. 2007; Berkova A. et al.2009, [Dohner et al. 2000] .

Α1.2.3 Άλλες μοριακές μέθοδοι

Ενώ η μέθοδος FISH καλύπτει μόνο ένα περιορισμένο σύνολο αλλοιώσεων, οι πρόσφατες εξελίξεις της συγκριτικής υβριδοποίησης γονιδιώματος (comparative genome hybridization, CGH) και συγκεκριμένων συστοιχιών SNP υψηλής ανάλυσης (particular highresolution SNP arrays) έχουν οδηγήσει σε καλύτερη κατανόηση του γενετικού προφίλ της ΧΛΛ [Zenz T. et al. 2011].

Μία μελέτη με SNP συστοιχιών υψηλής ανάλυσης σε 70 ΧΛΛ περιπτώσεις, SNP συστοιχίες 10k και 50k αξιολογήθηκαν ως διαγνωστικό εργαλείο και αποκάλυψαν χρωμοσωμικές ανισορροπίες σε ποσοστό 65,6% και 81,5% των περιπτώσεων. Αντίστοιχα, οι αλλοιώσεις που είχαν προηγουμένως δειχθεί ότι είχαν προγνωστική σημασία, προσδιορίστηκαν στην αναμενόμενη συχνότητα. Επιπλέον, σε 14 περιπτώσεις εντοπίστηκαν 24 μεγάλες (> 10 Mb) περιοχές μονού αριθμού αντιγράφων με απώλεια ετεροζυγωτίας (loss of heterozygosity, LOH). Τέτοιες αλλοιώσεις δεν είναι ανιχνεύσιμες με τις περισσότερες από τι άλλες μεθόδους και η ταυτοποίηση τους μπορεί να

οδηγήσει στην ανακάλυψη διαφόρων αποσιωπημένων γονιδίων ή δυσλειτουργικών αλληλόμορφων, που να είναι πιθανόν σημαντικά για την παθογένεση της ΧΛΛ [Pfeifer D. et al. 2007].

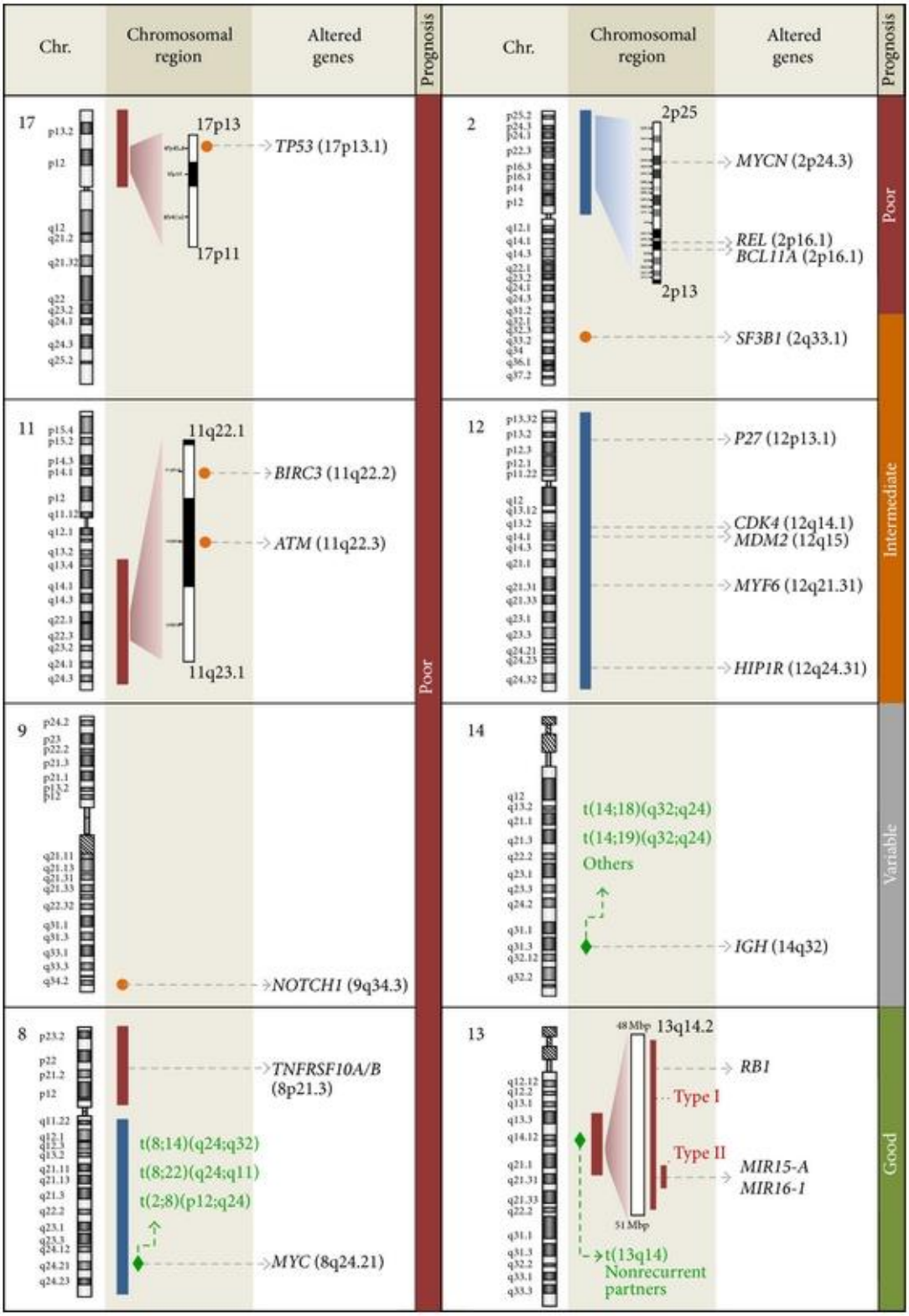
Πιο πρόσφατες μελέτες που χρησιμοποιούν SNP arrays επικεντρώθηκαν στην αρχιτεκτονική των επαναλαμβανόμενων αλλοιώσεων, στην κλινική τους επίδραση και στη συσχέτιση μεταξύ μεγαλύτερου αριθμού αλλοιώσεων και της έκβασης της νόσου [Ouillette P. et al. 2008; Kujawski L. et al. 2008; Mosca L. et al. 2010].

Α1.2.4 Ειδικές χρωμοσωμικές αλλοιώσεις στη ΧΛΛ

Στην ΧΛΛ η κυτταρογενετική ανάλυση παίζει σπουδαίο ρόλο στην ταξινόμηση των ασθενών, στην πρόγνωση και στην επιλογή κατάλληλου θεραπευτικού σχήματος. Στη διάγνωση, ειδικές χρωμοσωμικές αλλοιώσεις παρουσιάζονται στο 80% των ασθενών με ΧΛΛ. Η συχνότητα των κυτταρογενετικών αλλοιώσεων αυξάνεται ανάλογα με τη σοβαρότητα της νόσου, καθώς επίσης και με τον κίνδυνο εξέλιξης της νόσου [Zenz T. et al. 2011].

Δεν έχει εντοπιστεί κάποια συγκεκριμένη κυτταρογενετική ανωμαλία υπεύθυνη για την ανάπτυξη της ΧΛΛ. Αντί αυτού, η ασθένεια χαρακτηρίζεται από την παρουσία πολλών συγκεκριμένων κυτταρογενετικών ανωμαλιών που εμπλέκονται στη παθογένεση της νόσου και συνιστούν έναν ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα [Dohner et al. 2000; Mayr et al, 2006; Quesada et al, 2013]. Οι περισσότερες από αυτές τις αλλοιώσεις είναι μη-ισοζυγισμένες, και συνηθέστερα αφορούν έλλειψη κάποιου χρωμοσωμικού τμήματος. Οι πιο κοινές κλωνικές χρωμοσωμικές αλλοιώσεις που χρησιμοποιούνται για την πρόβλεψη της επιβίωσης στη ΧΛΛ είναι (Εικόνα Α2): έλλειψη στον μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 13, [del (13q)] με ~ 50% συχνότητα εμφάνισης στους ασθενείς, η τρισωμία 12 (+12,) με ~ 15% συχνότητα εμφάνισης, έλλειψη στον μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 11 [del (11q)], ~ 15-20%, έλλειψη στον μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 6 [del (6q)] ~ 5%, έλλειψη στον μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 17 [del (17ρ)] ~ 5% και οι αλλοιώσεις του χρωμοσώματος14 [t/der (14)(q32), ~ 4-20% [Heim S et al. 2015].

Η κατηγοριοποίηση των ΧΛΛ ασθενών βάση των χρωμοσωμικών τους αλλοιώσεων είναι σημαντική, καθώς αποτελούν πρόβλεψη για την έκβαση της ασθένειας. Πέντε προγνωστικές κατηγορίες έχουν εντοπιστεί σε ένα ιεραρχικό μοντέλο, το οποίο σε ασθενείς με del(17p) και del(11q) στον καρυότυπο τους, δείχνει φτωχή επιβίωση (μέση επιβίωση 32 και 79 μήνες, αντίστοιχα) αλλά καλύτερη επιβίωση για ασθενείς με τρισωμία 12, κανονικό καρυότυπο και διαγραφή 13q ως μοναδική αλλοίωση (114, 111 και 133 μήνες αντίστοιχα) [Dohner et al. 2000, Miller CR et al 2019Γενικά, η διαγραφή ή η αναδιάταξη του 17ρ με αποτέλεσμα την απώλεια ή μετάλλαξη του γονιδίου p53 αντιστοιχεί στην χειρότερη επιβίωση [Heim et al. 2015]. Οι τρέχουσες οδηγίες στη ΧΛΛ (iwCLL: International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia, NCI: National Cancer Institute) θεωρούν υποχρεωτική την αξιολόγηση των χρωμοσωμικών αλλοιώσεων και με ανάλυση FISH στη γενική πρακτική, ως βασική αξιολόγηση πριν από τη θεραπεία [Hallek M et al. 2018].



Εικόνα Α2: Οι κύριες χρωμοσωμικές αλλοιώσεις, με γνωστή προγνωστική σημασία στην ΧΛΛ. Στο τμήμα της χρωμοσωμικής περιοχής, οι απώλειες και η προσθήκες αντιστοιχούν σε κόκκινες και μπλε ράβδους αντίστοιχα. Τα σημεία διακοπής που αφορούν τις μετατοπίσεις απεικονίζονται ως πράσινα διαμάντια. Με πορτοκαλί κύκλο παρουσιάζονται οι περιοχές όπου εντοπίζονται τα μεταλλαγμένα γονίδια. [Puiggros A. et al. 2014]

A1.2.4.1 del(13q)

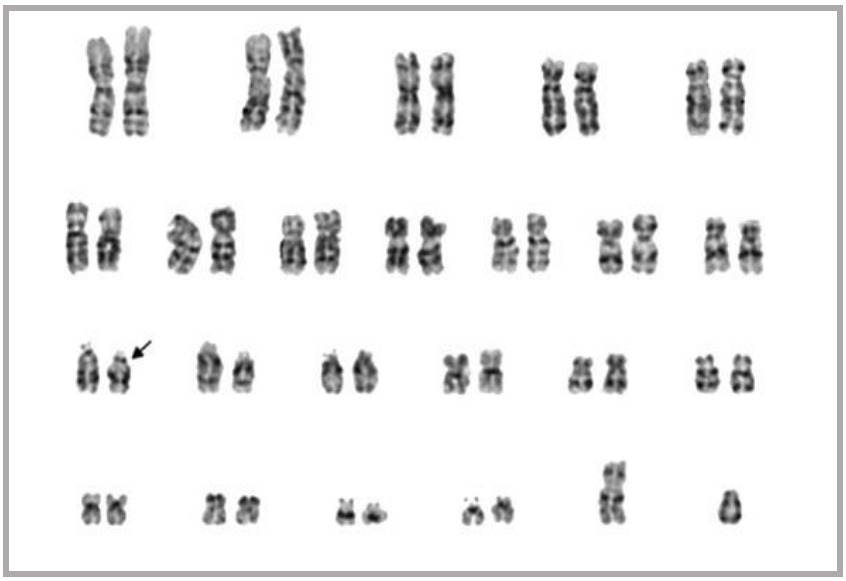
Η έλλειψη στον μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 13 [del(13q)] είναι η πιο συνηθισμένη χρωμοσωμική αλλοίωση, και συναντάται στο 40-60% των περιπτώσεων με ΧΛΛ [Hernandez JM et al. 1995; Dohner et al. 2000; Van Bockstaele F. et al. 2009]. Η αλλοίωση αυτή μπορεί να βρεθεί και σε ασθενείς με λέμφωμα ή με άλλους συμπαγείς όγκους όπως λέμφωμα των κυττάρων του μανδύα, πολλαπλό μυέλωμα ακόμα και σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη ή του πνεύμονα [Zenz T. et al. 2011]. Σε αντίθεση με άλλες επαναλαμβανόμενες αλλοιώσεις, οι ελλείψεις στο χρωμόσωμα 13 μπορεί να είναι ετερόζυγες (στο 76% των περιπτώσεων) ή ομόζυγες (στο 24% των περιπτώσεων). Μελέτες υποδεικνύουν ότι η ετερόζυγη έλλειψη αποτελεί πρώιμο γεγονός, ενώ η έλλειψη και του δεύτερου αντιγράφου αυτής της περιοχής συμβαίνει σε μεταγενέστερο στάδιο [Shanafelt TD. et al. 2006; Stilgenbauer S. et al. 2007]. Οι ασθενείς με del(13q) ως μοναδική αλλοίωση, έχουν καλύτερη πρόγνωση. Ωστόσο, μελέτες έδειξαν ότι η κατάσταση μπορεί να είναι πιο σύνθετη, καθώς το ποσοστό των πυρήνων με del(13q) αλλά και το μέγεθος της έλλειψης μπορεί να επηρεάζει την πρόγνωση. Έχει δειχθεί ότι, ο αριθμός των κακοηθών κυττάρων που φέρουν del(13q), σχετίζεται έντονα με την έκβαση της νόσου και τα μοριακά χαρακτηριστικά [Hernández JA. et al. 2009; Rodríguez AE. et al. 2012]. Έτσι, με βάση το ποσοστό των κυττάρων με del(13q), μπορούν να καθοριστούν δύο προγνωστικές ομάδες ανάμεσα στους ασθενείς με την συγκεκριμένη αλλοίωση. Οι ασθενείς με υψηλή αναλογία κυττάρων με del(13q), >80%, έχουν μικρότερη συνολική επιβίωση και ο μικρότερο χρόνο μέχρι την πρώτη θεραπεία, σε σχέση με τους ασθενείς με αναλογία <80%[Van Dyke DL. et al. 2010; Dal Bo M. et al. 2011] Επιπλέον, ο χαρακτηρισμός των ελλείψεων στο χρωμόσωμα 13 έχει δείξει ότι τα σημεία κοπής είναι ετερογενή και το μέγεθος της περιοχής που διαγράφεται ποικίλει σημαντικά, με διακύμανση από μόνο ~ 300 kbp έως και >70 mbp [Liu Y. et al. 1997; Bullrich F. et al. 2001; Mosca L. et al. 2010].

Μελέτες στο χρωμόσωμα 13 οδήγησαν στην αναγνώριση μίας συγκεκριμένης κοινής περιοχής που απουσιάζει συνήθως (minimal deleted region, MDR) [Liu Y. et al. 1997; Migliazza A. et al. 2001] απομακρυσμένης από το γονίδιο RB1, που περιέχει το γονίδιο DLEU2 (Deleted In Lymphocytic Leukemia 2), και το σύμπλεγμα microRNA (miR) 15a/16-1 [Calin GA. et al. 2002]. Επιπλέον, η ανάλυση της αρχιτεκτονικής της έλλειψης στο χρωμόσωμα 13, υποδεικνύει ότι η έκταση της έλλειψης συμβάλλει στα χαρακτηριστικά της νόσου [Ouillette P. et al. 2008; Hanlon K. et al. 2009; Mosca L. et al. 2010; Parker H. et al.2011;]. Έτσι, συχνά αναφέρονται δύο τύποι έλλειψης: del(13q) τύπου I (βραχύ έλλειμα), οπού η διάσπαση γίνεται κοντά στην περιοχή miR16/15a και δεν περιλαμβάνει RB1 και del(13q) τύπου II (μεγαλύτερο έλλειμα), που περιλαμβάνει την περιοχή RB1 και έχει προταθεί ότι σχετίζεται με μεγαλύτερη γονιδιωματική πολυπλοκότητα και με πιο επιθετική πορεία της νόσου [Calin GA. et al. 2002].

Συχνότερα, οι μεγάλες ελλείψεις στον 13q είναι ετερόζυγες ενώ ένα μικρό ποσοστό ασθενών φέρει ομόζυγες ελλείψεις. Μέχρι και σήμερα απομένει να επιβεβαιωθεί το κατά πόσον η παρουσία μιας ομόζυγης έναντι ετεροζυγωτικής έλλειψης στον 13q διαδραματίζει έναν επιπλέον ρόλο. Οι ασθενείς με ετερόζυγες ελλείψεις στο 13q παρουσιάζουν πιο αργή ανάπτυξη λεμφοκυττάρων σε σύγκριση με ασθενείς με ομόζυγες ελλείψεις [Pfeifer D. et al. 2007]. Ωστόσο, σχετικά πρόσφατες αναφορές υποδεικνύουν ότι η ετεροζυγωτικότητα δεν επηρεάζει το χρόνο μέχρι την πρώτη θεραπεία ή την γενική επιβίωση του ασθενούς [Van Dyke DL. et al. 2010; Garg R. et al. 2012]

Αρκετές μελέτες έχουν επιχειρήσει να αναγνωρίσουν κάποιο ογκοκατασταλτικό γονίδιο στο 13q, αλλά δεν έχει αποδειχθεί η όποια αδρανοποίηση υποψήφιων γονιδίων μέσω κάποιας

μετάλλαξης. Έχει όμως περιγραφεί ένας περίπλοκος, επιγενετικός, ογκοκατασταλτικός, ρυθμιστικός μηχανισμός, ο οποίος ελέγχει την έκφραση ολόκληρης της περιοχής [Mertens D. et al. 2006]. Στην ανάπτυξη της ΧΛΛ, έχει αποδειχθεί κάποια συμμετοχή έλλειψης της miR-15a/16-1 [Calin GA. et al. 2008; Garzon R. et al. 2009; Raveche ES. et al. 2007]. Το σύμπλεγμα miR-15a/16-1 διαγράφηκε ή απορυθμίστηκε στην πλειονότητα των περιπτώσεων με ΧΛΛ (68%) και φαίνεται πως έτσι ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση του γονιδίου BCL2 και άλλων γονιδίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση [Cimmino A. et al. 2005; Calin GA. et al. 2008]. Μελέτες σε ποντίκια έδειξαν πως στις περιπτώσεις στις οποίες διαγράφηκαν η MDR ή το ειδικό σύμπλεγμα miR15a/16-1, αναπτύχθηκε μονοκλωνική λεμφοκυττάρωση Β-λεμφοκυττάρων και ΧΛΛ με χαμηλή διείσδυση [Klein U. et al. 2010].



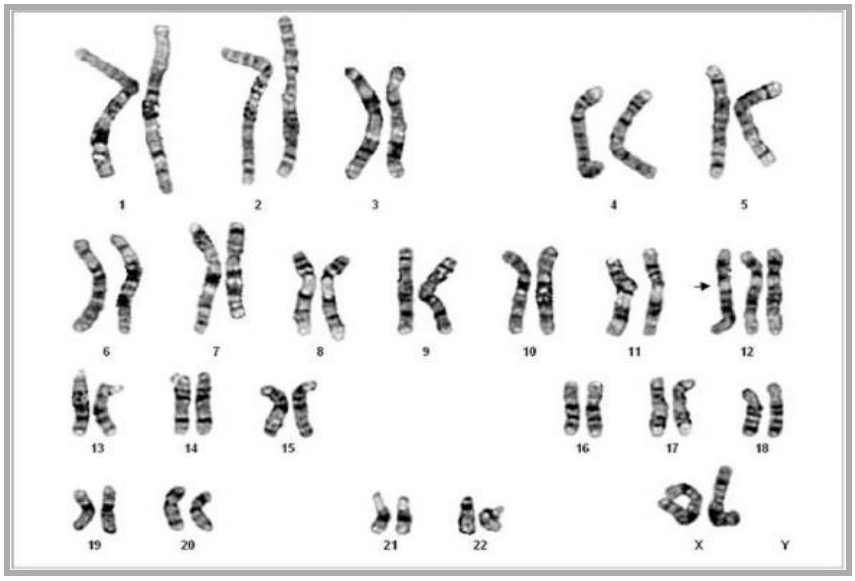
Εικόνα Α3: Καρυότυπος ασθενούς με έλλειψη στον μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 13 [del(13q)].

Α1.2.4.2 τρισωμία 12 (+12)

Στη ΧΛΛ η τρισωμία 12 (+12) συγκαταλέγεται στις πιο συχνές αλλοιώσεις, παρουσιάζεται σε ποσοστό 10-20% των περιπτώσεων και συσχετίζεται με την πρόωρη εμφάνιση της νόσου [Tari K et al. 2018, Dohner et al. 2000]. Ασθενείς ΧΛΛ που παρουσιάζουν +12 στον καρυότυπο τους φέρουν ενδιάμεση πρόγνωση για την εξέλιξη της νόσου. Παρόλο που η επιβίωση των ατόμων αυτών μπορεί να είναι μικρότερη, η συνολική επιβίωση τους φαίνεται ευνοϊκή [Hallek M. et al. 2010]. Οι περιπτώσεις με +12 σπάνια παρουσιάζουν και μεταλλάξεις του γονιδίου TP53 και σπάνια τις αποκτούν με την πάροδο του χρόνου, γεγονός που μπορεί να εξηγήσει εν μέρει την καλοήθη πορεία που παρουσιάζουν μετά τη θεραπεία [Zenz T. et al. 2010].

Η τρισωμία 12 έχει συσχετιστεί με μια άτυπη μορφολογία ή ανοσοφαινότυπο [Matutes E. et al. 1996]. Μία μικρή προστιθέμενη κοινή περιοχή παρατηρείται στο 12q13, όπου έχουν αναφερθεί μικρές αναδιατάξεις του 12q. Σε ποντίκια με ΧΛΛ φαίνεται να ενισχύεται το γονίδιο MDM2, το οποίο βρίσκεται στο 12q15 [Merup M. et al. 1997]. Επιπλέον, το γονίδιο CLLU1 (CLL up-regulated gene 1), το οποίο βρίσκεται στην περιοχή 12q22, έχει προταθεί ως προγνωστικός δείκτης σε ΧΛΛ ασθενείς <70 ετών, καθώς η υψηλή έκφραση του έχει συσχετιστεί με βραχύτερη συνολική επιβίωση

[Josefsson P. Et al. 2007], αν και η υπερέκφραση του γονιδίου CLLU1 συμβαίνει ανεξάρτητα από την +12 [Buhl AM. et al. 2006]. Επομένως, τα κρίσιμα γονίδια που πραγματικά εμπλέκονται σε αυτήν την αλλοίωση παραμένουν άγνωστα.

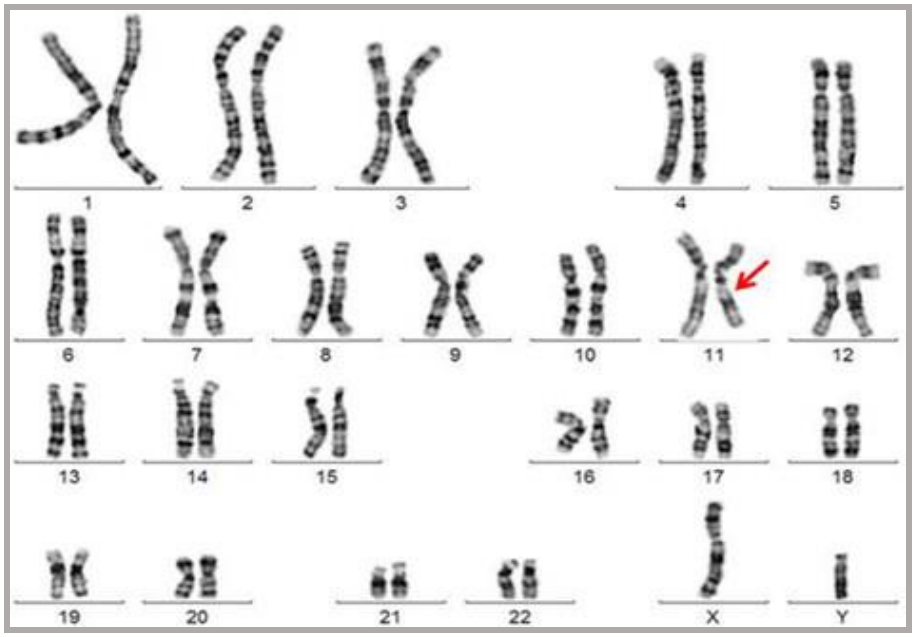


Εικόνα Α4: Καρυότυπος ασθενούς με τρισωμία 12 (+12).

Α1.2.4.3 del(11q)

Περίπου το ένα πέμπτο των ασθενών με ΧΛΛ, οι οποίοι φέρουν ενδείξεις για θεραπεία, παρουσιάζουν και έλλειψη στον μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 11 [del(11q)]. Παράλληλα, οι μεταλλάξεις του γονιδίου ATM έχουν αναφερθεί στο 30% των ασθενών αυτών. Οι ασθενείς που φέρουν στον καρυότυπο τους del(11q) είναι γενικότερα νεότεροι, έχουν περισσότερα συμπτώματα και ταχύτερη εξέλιξη της νόσου με συντομότερη συνολική επιβίωση [Döhner H1. et al. 1997; Catovsky D. et al. 2007]. Επιπλέον, η αλλοίωση αυτή συνδέεται και με εκτεταμένη λεμφαδενοπάθεια στους ασθενείς [Hallek M et al. 1996]. Ωστόσο, έχει αναφερθεί ότι τα άτομα που φέρουν de novo del(11q) μπορεί να παρουσιάσουν ποικίλες κλινικές εκβάσεις [Marasca R. et al. 2013].

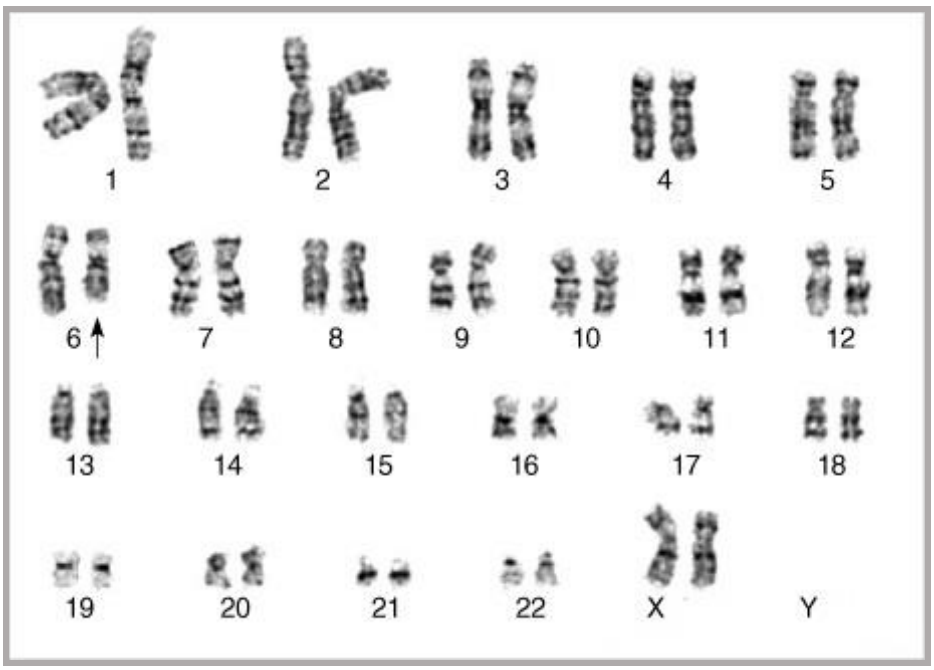
Το γονίδιο ATM βρίσκεται στην μικρή περιοχή 11q22.3-q23.1. Η πρωτεϊνική κινάση ATM είναι ένα βασικό συστατικό του μονοπατιού βλάβης του DNA (DNA damage pathway) και μεσολαβεί στην κυτταρική απόκριση στα θραύσματα της διπλής έλικας DNA (DNA double-stand breaks, DSBs). Το ATM ενεργοποιεί τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, μπορεί να προκαλέσει απόπτωση ως απάντηση στα θραύσματα DNA και λειτουργεί άμεσα στην επιδιόρθωση των DSBs του DNA [Lavin MF. 2008]. Ο ρόλος των άλλων γονιδίων στο 11q22-q23.1 παραμένει άγνωστος, όμως υπάρχουν ενδείξεις για την εμπλοκή κι άλλων γονιδίων στην περιοχή.



Εικόνα Α5: Καρυότυπος ασθενούς με έλλειψη στον μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 11 [del(11q)].

Α1.2.4.4. del(6q)

Η έλλειψη του μακριού βραχίονα του χρωμοσώματος 6 [del(6q)] είναι μια σπάνια κυτταρογενετική ανωμαλία που παρατηρείται στο περίπου 6% των ασθενών με ΧΛΛ [Dohner H et al. 2000; Cuneo A. et al. 2004; Stilgenbauer S. et al. 1999]. Γενικά θεωρείται ενδιάμεσου κινδύνου αλλοίωση, μεταξύ των ασθενών με del(11q22.3) ή del(17p13) και των ασθενών με μοναδική αλλοίωση τη del(13)(q14), καθώς σχετίζεται με πιο εμφανή λεμφοκύτταρα άτυπης μορφολογίας, σπληνομεγαλία, υψηλότερα ποσοστά θετικότητας CD38 και ενδιάμεση συχνότητα μετάλλαξης του IGHV [Cuneo A. et al. 2004; Wang DM. et al. 2011].



Εικόνα Α6: Καρυότυπος ασθενούς με έλλειψη στον μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 6 [del(6q)].

Α1.2.4.5 del(17p)

Η έλλειψη στον μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 17 [del (17p)-], έχει περιγραφεί σε ποσοστό 3-8% των ασθενών με ΧΛΛ που δεν έχουν λάβει θεραπεία, αν και σε ασθενείς με προχωρημένη, υποτροπιάζουσα νόσο έχουν αναφερθεί περισσότερα περιστατικά που φτάνουν μέχρι το 30% των ασθενών [Dohner H et al. 2000; Dohner H et al. 1997; Fiegl M. et al. 2010]. Οι περισσότερες περιπτώσεις με del(17p) δείχνουν να έχουν απώλεια του ενός αντιγράφου και το εναπομείναν αντίγραφο τους να είναι μεταλλαγμένο [Zenz T et al. 2008;Dicker F. et al. 2009; Rossi D. et al. 2009].

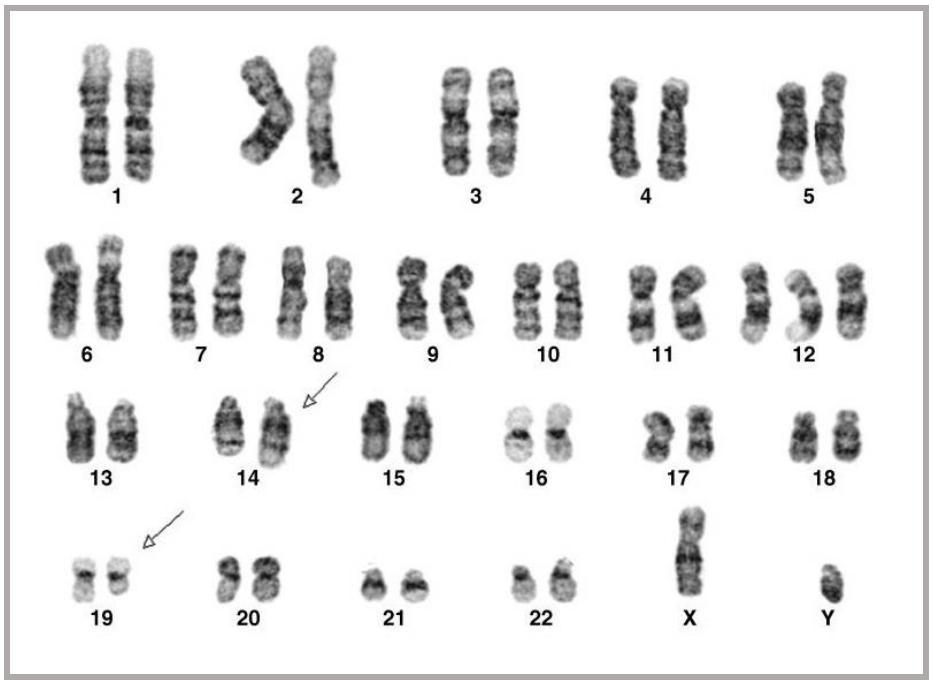
Αυτή η αλλοίωση συσχετίζεται συνήθως με μια πολύ επιθετική κλινική πορεία και αποτελεί πρόβλεψη για μικρή επιβίωση, έλλειψη αντίδρασης στη θεραπεία, σύντομη διάρκεια ανταπόκρισης και σύντομη γενική επιβίωση [Döhner H. et al. 1995; Dohner H et al. 2000; Oscier D. et al. 2010]. Ο αριθμός των παθολογικών κυττάρων που εμφανίζουν del(17p) έχει αποδειχθεί κομβικής σημασίας σε ασθενείς με ΧΛΛ. Έτσι, η παρουσία >20% κυττάρων με απώλεια του γονιδίου TP53 έχει συσχετιστεί με μια δυσμενή πρόγνωση, ενώ οι ασθενείς με <20% κυττάρων με απώλεια του γονιδίου TP53 είχαν πρόγνωση παρόμοια με εκείνη της συνολικής σειράς [Catovsky D. et al. 2007; Marasca R. et al. 2013].

Η έλλειψη στο 17p περιέχει πάντα το ογκοκατασταλτικό γονίδιο TP53, αλλά συνήθως καλύπτει το μεγαλύτερο μέρος του μικρού βραχίονα του χρωμοσώματος 17, γεγονός που έχει προκαλέσει την εξέταση και άλλων γονιδίων τα οποία μπορεί να εμπλέκονται στη έλλειψη. Το ογκοκατασταλτικό TP53 παίζει ουσιαστικό ρόλο στην επαγωγή της απόπτωσης ή της διακοπής του κυτταρικού κύκλου, μετά από βλάβη του DNA. Η θεραπεία με φλουδαραβίνη και αλκυλιωτικούς παράγοντες βασίζεται σε έναν μηχανισμό εξαρτώμενο από το TP53, ο οποίος θα μπορούσε να εξηγήσει γιατί ασθενείς με ΧΛΛ και με del(17p) ή αδρανοποιητικές μεταλλάξεις του TP53 είναι ανθεκτικοί σε μια τέτοια χημειοθεραπεία [Van Bockstaele F. al. 2009]. Ωστόσο, η φαιδαραδίνη της φλουδαραβίνης προκαλείται από διαταραχή του TP53 σε περίπου 40% των ασθενών, οι οποίοι δεν ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία, αλλά σε ένα σημαντικό ποσοστό η μοριακή βάση αυτού του επιθετικού κλινικού φαινοτύπου παραμένει ασαφής [Gonzalez D. et al. 2009; Zenz T et al. 2010].

Εικόνα Α7: Καρυότυπος ασθενούς με έλλειψη στον μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 17 [del(17p)].

A1.2.4.6 t/der(14q32)

Στον καρυότυπο των ασθενών με ΧΛΛ σπάνια συναντώνται επαναλαμβανόμενες ισορροπημένες μεταθέσεις, σε αντίθεση με άλλους τύπους λευχαιμίας ή λεμφώματος Β-λεμφοκυττάρων, στους οποίους ειδικές και επαναλαμβανόμενες μετατοπίσεις απορυθμίζουν γνωστά ογκογονίδια (π.χ. BCL στο follicular lymphoma, myc στο λέμφωμα Burkitt και cyclin D1 στο λέμφωμα των κυττάρων του μανδύα). Η αναδιάταξη στην περιοχή 14q32, όπου εδράζονται τα γονίδια IgH (immunoglobulin heavy-chain genes), ανιχνεύεται στο 6-19% των ασθενών με ΧΛΛ στη διάγνωση της νόσου και συσχετίζεται με πτωχή πρόγνωση. Στις περιπτώσεις t/der14q32 γίνεται περαιτέρω διερεύνηση για καθορισμό του χρωμοσώματος που συμμετέχει στην αναδιάταξη π.χ. [t(11;14),t(14;18),t(14;19)] [Cavazzini F. et al. 2008]. Οι πιο κοινές επαναλαμβανόμενες μετατοπίσεις στην ΧΛΛ είναι t(14;18)(q32;q21) και t(14;19)(q32;q13). Πρόσφατα, σε κάποιες περιπτώσεις ΧΛΛ με t(14;19)(q32;q13) δείχθηκε ότι τα γονίδια IGHV είχαν ελάχιστη απόκλιση από τις ακολουθίες των βλαστικών γραμμών [Schweighofer CD. et al. 2011]. Η t(14;18)(q32;q21) πιο συχνά συνδέεται με neoplasms of follicular center cell origin νεοπλάσματα της προέλευσης των θυλακικών κεντρικών κυττάρων ωστόσο έχει αναφερθεί σε σπάνιες περιπτώσεις ΧΛΛ [Zenz T. et al. 2011].



Εικόνα Α8: Καρυότυπος ασθενούς με t(14;19)(q32;q13).

Α1.2.4.7 Λοιπές χρωμοσωμικές αλλοιώσεις

Εκτός από τα πλέον συχνά κυτταρογενετικά ευρήματα που αναφέρθηκαν πιο πάνω, αρκετές σπάνιες, αλλά επαναλαμβανόμενες κυτταρογενετικές αλλοιώσεις έχουν συνδεθεί με την ΧΛΛ. Η προγνωστική αξία τους διερευνάται, προκειμένου να εμπλουτιστεί και να βελτιωθεί το διεθνές προγνωστικό σύστημα ταξινόμησης της νόσου. Κάποιες επαναλαμβανόμενες αλλοιώσεις που έχουν περιγραφεί στη ΧΛΛ είναι: η ολική ή μερική τρισωμία 3, η τρισωμία 8, η τρισωμία 18 και αλλαγές στις χρωμοσωμικές περιοχές 2p24-25, 3q26-27 και 8q24. Έχουν αναφερθεί και κάποιες λίγες περιπτώσεις ασθενών με διαγραφή στο μακρού βραχίονα του χρωμοσώματος 5 (5q) [Karakosta M. et al. 2010].

Όλες αυτές οι αλλοιώσεις είναι σπάνιες στην ΧΛΛ και η προγνωστική τους σημασία είναι γενικότερα άγνωστη. Τα τελευταία χρόνια με τη χρήση των νέων μιτογόνων φάνηκε ότι ο αριθμός των ανιχνεύσιμων χρωμοσωμικών ανωμαλιών με την κλασσική κυτταρογενετική είναι μεγαλύτερος έναντι εκείνων που βρέθηκαν με την FISH με τους ευρέως χρησιμοποιούμενους ανιχνευτές για τη ΧΛΛ [Haferlach C. et al. 2007]. Ο σύνθετος καρυότυπος (δηλαδή ≥3 χρωμοσωμικές αλλοιώσεις στον ίδιο κλώνο) δεν καταδεικνύεται συνήθως με τη μέθοδο FISH και φαίνεται ότι συσχετίζεται με άλλους καθιερωμένους δυσμενείς βιολογικούς προγνωστικούς παράγοντες στη ΧΛΛ. Επίσης επηρεάζει δυσμενώς την επιβίωση και στα δύο άκρα του φάσματος της προγνωστικής διαστρωμάτωσης, δηλαδή σε ασθενείς με del(17p) και ασθενείς με μεταλλαγμένες τις IGHV αλληλουχίες. Ωστόσο, ο σύνθετος καρυότυπος είναι μια ετερογενής κυτταρογενετική κατηγορία. Σε 90 ασθενείς με ΧΛΛ και με σύνθετο καρυότυπο, οι Rigolin GM et al. 2018, παρατηρήθηκαν μη ισορροπημένες ανακατατάξεις στο 73,3% των ασθενών και έτσι η παρουσία του σύνθετου καρυότυπου στη ΧΛΛ συσχετίστηκε με μικρότερη συνολική επιβίωση και βραχύτερο χρόνο μέχρι την πρώτη θεραπεία. Επιπλέον, οι ασθενείς με μη ισορροπημένες αναδιατάξεις παρουσίασαν ένα

ξεχωριστό προφίλ έκφρασης mRNA. Με βάση αυτά τα δεδομένα συμπέραναν πως οι ασθενείς με ΧΛΛ και με μη ισορροπημένες αναδιατάξεις μπορεί να αντιπροσωπεύουν ένα υποσύνολο ασθενών υψηλού κινδύνου με ξεχωριστά κλινικά και βιολογικά χαρακτηριστικά [Rigolin GM. et al. 2018].

Α1.3. Γενετικές και επιγενετικες αλλαγές στην ΧΛΛ

Η μοριακή ανάλυση έχει αναδείξει αλλαγές σε γονίδια τα προϊόντα των οποίων ρυθμίζουν σημαντικές λειτουργίες των κυττάρων, όπως η αύξηση, η διαίρεση και ο πολλαπλασιασμός τους. Οι αλλαγές αυτές αφορούν τόσο μεταλλάξεις γονιδίων, όσο και επιγενετικές αλλαγές.

Σήμερα, αρκετές μοριακές αλλαγές έχουν βρεθεί να σχετίζονται με την ΧΛΛ, αλλά καμία από αυτές δεν είναι ειδική για τη νόσο, καθώς όλες μπορούν να ανιχνευθούν και σε άλλα νοσήματα. Τα έως τώρα αποτελέσματα σχετικών ερευνών δίνουν την εντύπωση ότι στο άμεσο μέλλον θα καταστεί δυνατός ένας περαιτέρω μοριακός χαρακτηρισμός της ΧΛΛ όπως και άλλων κακοηθών νεοπλασμάτων, καθώς η εισαγωγή τεχνολογιών υψηλής διακριτικής ικανότητας, θα επιτρέψει στους ερευνητές να υπεισέλθουν λεπτομερέστερα στους μοριακούς μηχανισμούς, ταυτοποιώντας υπομικροσκοπικές μοριακές αλλοιώσεις, αποσαφηνίζοντας τις τροποποιήσεις που λαμβάνουν χώρα με επακόλουθο την ανακάλυψη νέων πιθανών θεραπευτικών στόχων. Παρακάτω, περιγράφονται συνοπτικά οι σημαντικότερες μοριακές αλλαγές που παρατηρούνται στη ΧΛΛ.

Α1.3.1 Μεταλλάξεις γονιδίων στη ΧΛΛ

Τα παθολογικά Β λεμφοκύτταρα, υποκρύπτουν διάφορους συνδυασμούς μεταλλάξεων, οι οποίες επεκτείνονται και εξελίσσονται με την πάροδο του χρόνου ως απάντηση στις αλλαγές στο τοπικό τους περιβάλλον. Αυτή η γενετική ποικιλότητα των καρκινικών κυττάρων είναι ουσιώδης στην πρόοδο της νόσου [Schuh A et al. 2012; Landau DA et al. 2013; Collado R et al. 2014.] Ο αργός ρυθμός εξέλιξης της ΧΛΛ καθιστά δυνατό τον προσδιορισμό των εξελικτικών βημάτων, που δεν είναι ευδιάκριτα σε άλλους τύπους κακοήθειας και μέσω της μελέτης μεγάλου αριθμού ασθενών είναι δυνατή η αξιολόγηση των συχνοτήτων τους και οι κλινικές συσχετίσεις τους, στην εκτίμηση των γονιδιωματικών ανωμαλιών που χαρακτηρίζουν την νόσο [Ghamlouch H et al. 2017]. Οι βελτιωμένες και εξελιγμένες τεχνικές όπως το Next Generation sequencing (NGS) και η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος (Whole genome sequencing) οδήγησαν σε εκθετική αύξηση της γνώσης των μοριακών αλλοιώσεων της ΧΛΛ και σήμαναν τη γενετική ανομοιογένεια της νόσου στους ασθενείς, ενώ παράλληλα επέστησαν την προσοχή σε νέες θεραπευτικές διαδικασίες [Ghamlouch H et al. 2017].

Κλωνικές και υποκλωνικές μεταλλάξεις μπορούν να συμβάλλουν στην απορρύθμιση αρκετών βιολογικών διαδικασιών συμπεριλαμβανομένων των μεταλλάξεων σε γονίδια όπως το NOTCH1, SF3B1, MYD88, XPO1, και BIRC3, μεταλλάξεις στην σηματοδότηση του BCR και του Toll-like υποδοχέα (TLR), μετατοπίσεις/αναδιατάξεις του IGH, και την απώλεια ή προσθήκη στην χρωμοσωμική περιοχή 8p/8q, στον διαχωρισμό του RNA, στην ριβοσωμική διεργασία, στον μηχανισμό επιδιόρθωσης του DNA και στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου [Haferlach C et al. 2010; Puente XS et al. 2011; Rossi D et al. 2013; Collado R et al. 2014]. Τέτοιες μεγάλες μελέτες και γονιδιωματικές αναλύσεις υπογραμμίζουν την ποικιλομορφία μεταξύ των ασθενών της ΧΛΛ. Σχετικά πρόσφατα, η αλληλούχιση ολόκληρων γονιδιωμάτων και περισσότερων από 200 ολόκληρων εξωνίων σε ασθενείς με ΧΛΛ, οδηγήσαν σε σημαντικές μοριακές ανακαλύψεις και στην καλύτερη κατανόηση της νόσου [Puente XS et al. 2011; Fabbri G. et al. 2011; Quesada V. et al. 2011; Lawrence MS et al. 2011]. Αυτές οι μελέτες, αποκάλυψαν την μοριακή ετερογένεια της νόσου, όπου πολύ λίγα μεταλλαγμένα γονίδια παρουσιάστηκαν σε ποσοστό ~10-15% των περιπτώσεων και ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων παρατηρήθηκαν να είναι μεταλλαγμένα σε

χαμηλότερη συχνότητα (~2-5%). Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι περίπου στο ένα τρίτο των περιπτώσεων με ΧΛΛ δεν παρατηρήθηκαν συγκεκριμένες επαναλαμβανόμενες μεταλλάξεις [Quesada V. et al.2013]. Τα μεταλλαγμένα γονίδια συμμετέχουν σε συγκεκριμένα βιολογικά μονοπάτια τα οποία φαίνονται να είναι διαφορετικά μεταξύ των δύο υποτύπων ΧΛΛ (μεταλλαγμένο και μη μεταλλαγμένο IGHV). Στον μη μεταλλαγμένο IGHV τύπο βρίσκονται πιο συχνά μεταλλάξεις στο μονοπάτι NOTCH1 (NOTCH1 και FBXW7), στο μηχανισμό ματίσματος του mRNA, στα μονοπάτια επεξεργασίας και μεταφοράς (SF3B1, U2AF2,SFRS1, XPO1 και DDX3X), και στο μονοπάτι επιδιόρθωσης βλαβών DNA (ATM, TP53 και POT1). Στον μη μεταλλαγμένο IGHV τύπο παρατηρούνται κυρίως μεταλλάξεις στο μονοπάτι φλεγμονώδης απόκρισης (MYD88, TLR2 και MAPK1) [Quesada V. et al. 2011; Wang L. et al. 2011; Ramsay AJ. et al. 2013]. Με βάση τα παραπάνω μπορούμε να υποθέσουμε πως η διαφορετική κλινική συμπεριφορά των δύο υποτύπων της ΧΛΛ μπορεί να σχετίζεται με απορρύθμιση διαφορετικών μοριακών μηχανισμών.

Δύο μεγάλες μελέτες δίνουν έμφαση στη μοριακή ετερογένεια της ΧΛΛ, σχετικά με τη διαφορετική κατανομή των μεταλλαγμένων γονιδίων [Quesada V. et al. 2011; Wang L. et al. 2011;]. Τα πιο συχνά μεταλλαγμένα γονίδια βάση των Quesada et al. είναι το NOTCH1 (12%) και το SF3B1 (10%), ακολουθούν τα POT1 (5%), CHD2 (5%) και το LRP1B (5%), καθώς με βάση τους Wang et al. πιο συχνά παρατηρούνται μεταλλαγμένα τα γονίδια TP53 (15%), SF3B1 (15%), MYD88 (10%) και ATM (9%). Σε μια πιο πρόσφατη μελέτη παρατηρήθηκαν μεταλλάξεις στο NOTCH1 σε ποσοστό 4% των περιπτώσεων καθώς, ενώ το TP53 και το ATM βρέθηκαν μεταλλαγμένα στο 1-4% των περιπτώσεων. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι, σε αυτές τις δύο μελέτες η κλινική εικόνα τον ασθενών που μελετήθηκαν παρουσίασε σημαντικές διαφορές. Οι Quesada et al. συμπεριέλαβαν ασθενείς στη διάγνωση ή ασθενείς που δεν είχαν λάβει καθόλου θεραπεία ενώ οι Wang et al. μελέτησαν νεότερους ασθενείς (54 vs. 62 ετών) και το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών είχαν δυσμενή πρόγνωση (όψιμο στάδιο 21 vs 8%, κυτταρογενετικές αλλοιώσεις με δυσμενή πρόγνωση 43 vs 15% και υψηλή έκφραση της ZAP70 46 vs. 29%). Επιπλέον, το ένα τρίτο αυτών των ασθενών μελετήθηκαν στην υποτροπή. Τα αποτελέσματα αυτά εισηγούνται ότι η κατανομή των μεταλλαγμένων γονιδίων πιθανό να αντικατοπτρίζει και την κληρονομική μοριακή ετερογένεια της ΧΛΛ και συγκεκριμένη κλινική εικόνα στους ασθενείς [Martín-Subero JI. et al. 2013].

Αποτελέσματα από την αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος μπορεί να παρουσιάσουν δεδομένα για τους μηχανισμούς που χαρακτηρίζουν το πεδίο μεταλλάξεων στις κακοήθειες. Το μοτίβο αντικατάστασης των νουκλεοτιδίων διαφέρει μεταξύ των διαφόρων καρκινικών κακοηθειών και μπορεί να αντικατοπτρίσει την παθογένεση της ασθένειας μέσω συγκεκριμένων μεταλλαξογόνων μηχανισμών π.χ. έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία [Nik-Zainal S. et al. 2012; Nik-Zainal S. et al. 2010]. Οι δύο τύποι ΧΛΛ στην πορεία τους εκτίθενται σε διαφορετικά μικροπεριβάλλοντα καθώς ο μεταλλαγμένος τύπος υπόκειται σε μεταλλάξεις στο γονίδιο IGHV στο βλαστικό κέντρο, ενώ στον μη μεταλλαγμένο τύπο απουσιάζουν τέτοιες μεταλλάξεις. Κάποια γονίδια που είναι μεταλλαγμένα στον μεταλλαγμένο IGHV τύπο (π.χ. το KLHL6) φέρουν το αποτύπωμα του μηχανισμού SHM που προωθείται από τη δράση της AID (Activation-induced cytidine deaminase) [Puente XS. et al. 2011]. Επιπλέον, οι Puente et al. παρατήρησαν ότι στο μεταλλαγμένο IGHV τύπο υπήρξε σημαντικό ποσοστό μεταλλάξεων σε A>C/T>G σε σχέση με τον μη μεταλλαγμένο IGHV τύπο. Αυτή η εικόνα μεταλλάξεων φαίνεται να συνιστά κάποιο κοινό σφάλμα κατά την λειτουργία της DNA πολυμεράσης, όταν αυτή καλείτε να επιδιορθώσει σπασίματα που προκαλούνται στο μόριο του DNA. Η πολυμεράση εκφράζεται σε υψηλά ποσοστά στα κύτταρα

του βλαστικού κέντρου και η δράση της, που είναι επιρρεπείς σε σφάλματα, μαζί με την AID συμβάλει στην δημιουργία ποικιλίας γονιδίων της ανοσοσφαιρίνης. Στη δράση της πολυμεράσης δεν απαιτείται μεταγραφή και έτσι μπορεί να δράσει ευρέος στο γονιδίωμα. Έτσι, οι διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των δύο υποομάδων της ΧΛΛ σχετικά με την επικράτηση A>G μπορεί να είναι ένα διαφορετικό αποτύπωμα στο μικροπεριβάλλον του βλαστικού κέντρου, που αντικατοπτρίζει τη διαφορετική καταγωγή του κυττάρου των δύο υποτύπων ΧΛΛ [Puente XS. et al. 2011; Quesada V. et al. 2011; Kulis M. et al. 2012].

Εικόνα Α9: Συχνότητα γονιδιακών μεταλλάξεων στη ΧΛΛ. Το μέγεθος κάθε γονιδιακού συμβόλου είναι ανάλογο της μεταλλακτικής συχνότητας του αντίστοιχου γονιδίου όπως περιγράφεται από τους Quesada et al. (2011) και Wang et al. (2011). Τα γονίδια με κόκκινο μεταλλάσσονται κατά προτίμηση σε περιπτώσεις ΧΛΛ με μη μεταλλαγμένα IGHV, γονίδια σε μπλε μεταλλάσσονται σε περιπτώσεις ΧΛΛ μεταλλαγμένων IGHV και γονίδια σε μοβ μεταλλάσσονται και στα δύο [Quesada V.et al. 2013].

Α1.3.2 Γενετική προδιάθεση και ανάπτυξη της ΧΛΛ

Τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί ιδιαίτερη έμφαση στην ανάδειξη γενετικών, επιγενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη ΧΛΛ. Αν και η αιτία της ΧΛΛ παραμένει άγνωστη, η νόσος φαίνεται να δείχνει σχετικά κοινή οικογενή βάση γεγονός που υποστηρίζει τη γενετική ευαισθησία της ΧΛΛ και σηματοδοτεί την κληρονομικότητα της νόσου ως μείζον παράγοντα κινδύνου [Brown JR. 2013; Cerhan JR. et al 2015; Hayakawa K. et al. 2016; Ghamlouh H. et al. 2017].

Έρευνες και επιδημιολογικές μελέτες σε ασθενείς με ΧΛΛ εντόπισαν και επιβεβαίωσαν αρκετούς ανεξάρτητους παράγοντες κινδύνου για τη νόσο, υποστηρίζοντας τον σημαντικό ρόλο της γενετικής, της ανοσολογικής λειτουργίας, των λοιμώξεων και των μεταβλητών περιβαλλοντικών παραγόντων στη παθογένεια της ΧΛΛ [Slager SL. et al. 2014; Benavente Y. et al. 2018]. Η ΧΛΛ, όπως και οι περισσότερες κακοήθειες στον άνθρωπο, θεωρείται ότι προέρχεται από συνδυασμό παραγόντων έκθεσης σε τοξικούς παράγοντες οι οποίοι επηρεάζονται από την γενετική προδιάθεση

και μοιάζει απίθανο το γεγονός όλες οι περιπτώσεις ΧΛΛ να μοιράζονται μια κοινή ή αποκλειστική αιτία [Brown JR. 2013; Slager SL. et al. 2014].

Α1.3.2.1 Πολυμορφισμοί γονιδίων στη ΧΛΛ

Οι πολυμορφισμοί συνολικά αφορούν αλλαγές στην αλληλουχία του DNA που εμφανίζονται στο γενικό πληθυσμό με συχνότητα μεγαλύτερη από 1%. Οι γενετικοί πολυμορφισμοί, σε ποσοστό 10% αφορούν ενθέσεις ή ελλείψεις νουκλεοτιδίων, μικροδορυφορικές αλληλουχίες και ψευδογονίδια, ενώ σε ποσοστό 90% αφορούν αλλαγές ενός μόνο νουκλεοτιδίου (SNP). Πολυμορφισμοί σε κωδικοποιούσες περιοχές του γονιδιώματος πιθανώς οδηγούν σε αλλαγή της γονιδιακής έκφρασης και κατ' επέκταση σε ελάττωση ή ολική απώλεια της ενζυματικής δράσης, με αποτέλεσμα την ανεπαρκή αποτοξικοποίηση ή/και επιδιόρθωση του DNA.

Μέχρι στιγμής γύρω στους 30 SNP πολυμορφισμούς από 31 περιοχές έχουν ανιχνευθεί για την ΧΛΛ συμπεριλαμβανομένου των: 2q13 (BCL2L11), 2q37.1 (SP140), 6p25.3 (IRF4), 4q25 (LEF1), 5p15.33 (TERT), 7q31.33 (POT1), 8q24.21 (MYC), 11q24.1, 15q15.1 (BMF), 16q24.1 (IRF8) και 18q21.33 (BCL2) [Cerhan JR. & Slager SL. 2015; Berndt SI. et al. 2016]. Αρκετά από τα αναγνωρισμένα SNPs εδράζονται κοντά ή μέσα σε γονίδια τα οποία έχουν συσχετιστεί με την νόσο συμπεριλαμβανομένων τον γονιδίων που σχετίζονται με την διαδικασία της απόπτωσης (FAS,PMAIP1,BAK1,BCL2,BCL2L11,BMF & CASP8/CASP10), την λειτουργία τελομερών (POT1, TERT, and TERC), μεταγραφικούς παράγοντες σημαντικούς στην διαδικασία διαφοροποίησης των Β λεμφοκυττάρων (IRF8, LEF1, PRKD3 & SP140), και την ενεργοποίηση του υποδοχέα των Β λεμφοκυττάρων (IRF3 & HLA-DQA1) [Speedy HE. et al. 2014; Cerhan JR. et al. 2015; et al, 2016; Ghamlouh H. et al. 2017].

Α1.3.2.1.1 Το γονίδιο PON1

Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, μελέτες ασθενών με ΧΛΛ έχουν αναδείξει την συμμετοχή γενετικών προδιαθεσικών παραγόντων στην εμφάνιση της νόσου. Ο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου έχει επιπλέον συσχετιστεί με πολυμορφικές παραλλαγές γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα τα οποία εμπλέκονται στις διαδικασίες ενεργοποίησης και αποτοξικοποίησης [Krajinovic M. et al. 2002; Bolufer P. et al. 2006; de Aguiar Gonçalves BA. et al. 2012].

Στην παρούσα μελέτη έγινε διερεύνηση του πιθανού ρόλου των πολυμορφισμών του γονιδίου PON1 στην προδιάθεση εμφάνισης της ΧΛΛ. Το παραγόμενο προϊόν του γονιδίου PON1 ανήκει στην οικογένεια των παραωξονασών (PONs) τα οποία είναι ένζυμα που προστατεύουν τα κύτταρα του οργανισμό από γονοτοξικούς παράγοντες και από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS). Η συσσώρευση ROS στον οργανισμό προκαλεί οξειδωτικό στρες (OS), μια κατάσταση οξειδοαναγωγικής ανισορροπίας η οποία φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά τις γενετικές και επιγενετικές διαδικασίες, υπογραμμίζοντας την διαφορική γονιδιακή έκφραση στην καρκινογένεση [Devasagayam TP. et al. 2004; Ziech D. et al. 2011; Hayyan M Et al. 2016]. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου ταξινομούνται σε τέσσερις κατηγορίες: (i) ελεύθερες ρίζες, όπως η ρίζα υδροξυλίου (·OH), (ii) ιόντα ,όπως το υποχλωριώδες ανιόν (ClO-), που προκύπτει από τη διάσταση του υποχλωριώδους οξέος (HClO), (iii) συνδυασμούς ελευθέρων ριζών και ιόντων, όπως το ανιόν υπεροξειδίου (·O2-) και (iv) μόρια, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2). Τα λευχαιμικά κύτταρα, στο υπογλυκαιμικό περιβάλλον του μυελού των οστών, εξαρτώνται ειδικά από το οξειδωτικό στρες και άρα από την συσσώρευση των ROS, για την ομαλή λειτουργικότητα τους. Στην ΧΛΛ συγκεκριμένα, το OS μπορεί να επηρεάσει τους ασθενείς όπου παρατηρείται ταυτόχρονη αύξηση παραγωγής

μεταβολιτών ROS μαζί με μείωση των αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών [Samimi A. et al 2018].

Όπως αναφέρθηκε, οι παραωξονάσες (PON1, PON2 & PON3), είναι ένζυμα του ανθρώπινου ορού τα οποία προστατεύουν τα κύτταρα από γονοτοξικούς παράγοντες όπως τα οργανοφωσφορικά και οι ROS, παράγοντες που προκαλούν μεταβολικές αλλοιώσεις και βλάβες στο DNA συμβάλλοντας στην καρκινογένεση [Costa LG. Et al 1999; T Bacchettia T. et al. 2017]. Στον ορό ασθενών με καρκίνο έχει αναφερθεί χαμηλότερη δράση της PON1 και υπερέκφραση των άλλων δύο παραοξονασών, PON2 και PON3. Έτσι και τα δύο ένζυμα θα μπορούσαν να εμπλέκονται στην επιβίωση της κακοήθειας και την αντοχή στο OS. Η PON1 παρουσιάζει πρωτίστως συσχέτιση με την υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (HDL) του πλάσματος, ενώ φαίνεται να οξειδώνει λιπίδια και να υδρολλύει τους δραστικούς μεταβολίτες αρκετών οργανοφωσφορικών παρασιτοκτόνων [Costa LG. et al. 2005]. Από την οικογένεια των παραοξωνασών, η PON1 αποτελεί το επίκεντρο των πιο έντονων ερευνητικών δραστηριοτήτων, λόγω της προφανής ικανότητάς της στο να προστατεύει τις λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDL) από το OS [Précourt LP. et al. 2011].

Το γονίδιο PON1 εδράζεται, μαζί με τις άλλες υπομονάδες του γονιδιακού συμπλέγματος των παραοξωνασών, στην χρωμοσωμική περιοχή 7q21.3. Στην κωδικοποιούσα περιοχή του παρουσιάζει δύο πολυμορφισμούς τύπου SNP στις θέσεις 55 και 192, ως αποτέλεσμα της αντικατάστασης ενός αμινοξέος, που επηρεάζουν τη συγκέντρωση, τη σταθερότητα και την ενεργότητα του ενζύμου. Πιο συγκεκριμένα, ο πολυμορφισμός L55M (rs854560) αφορά αντικατάσταση λευκίνης (L) από μεθειονίνη (M) και ο πολυμορφισμός Q192R (rs662) αντικατάσταση γλουταμίνης (Q) από αργινίνη (R) [Humbert R. et al. 1993; Leviev I. et al. 2001].

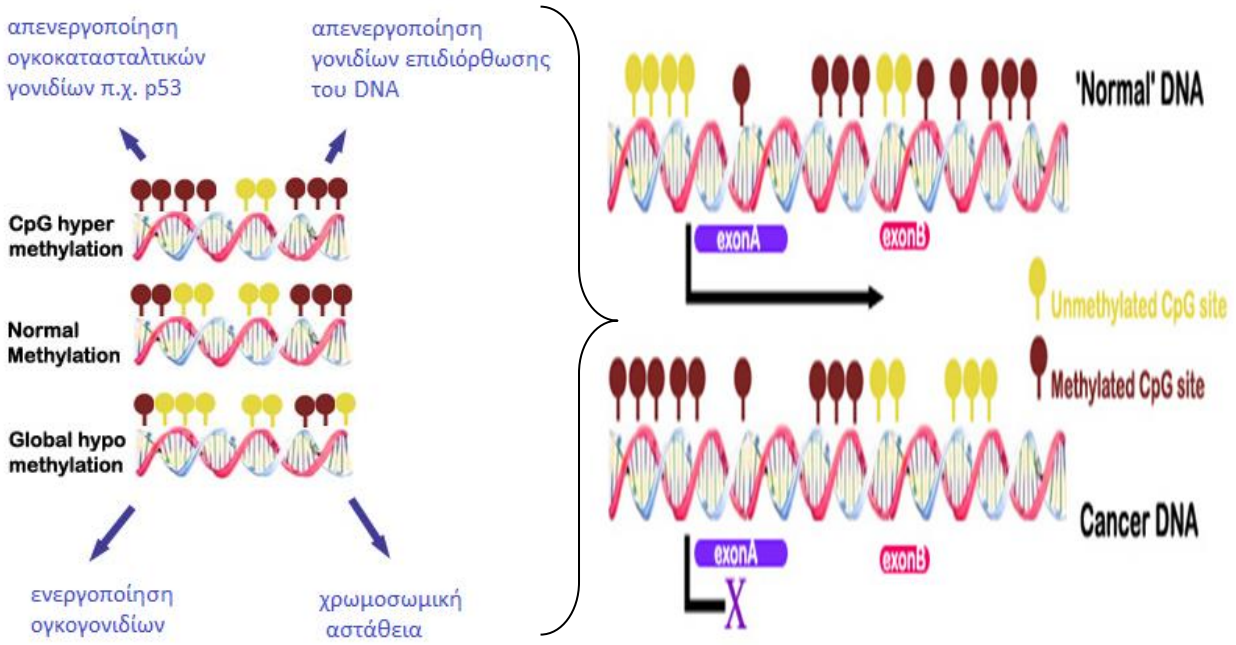
Αξίζει να σημειωθεί ότι, οι πολυμορφισμοί Q192R και L55M έχει αποδειχτεί ότι αιτιολογούν ένα ποσοστό 60% της δια-μεμονωμένης μεταβολής της συγκέντρωσης και της δραστηριότητας του ενζύμου [Précourt LP. et al. 2011] και έχουν συσχετιστεί με αρκετές μορφές καρκίνου στον άνθρωπο [Akkız H. et al 2013; Bacchettia T. et al. 2017]. Η σχέση τους με την ΧΛΛ έχει αναφερθεί πρόσφατα μόνο σε μία μικρή ομάδα ασθενών [Tomatir AG. et al. 2015]. Στην παρούσα μελέτη έγινε διερεύνηση του πιθανού ρόλου των πολυμορφισμών Q192R και L55M του γονιδίου PON1 με την προδιάθεση ανάπτυξης της ΧΛΛ, σε μεγάλο αριθμό ασθενών, και παράλληλα έγινε συσχέτιση των αποτελεσμάτων των αλληλομόρφων και γονοτύπων με τα κυτταρογενετικά ευρήματα της νόσου.

Α1.3.3 Μεθυλίωση του DNA

Η μεθυλίωση του DNA είναι ένας τύπος χημικής τροποποίησης ο οποίος δεν επιφέρει αλλαγή στην αλληλουχία του DNA αλλά περιλαμβάνει την προσθήκη μιας μεθυλομάδας στη θέση 5 του άνθρακα του δακτυλίου της κυτοσίνης με τη δράση μεθυλοτρανσφερασών (DNA methyltransferases, DNMTs). Στον άνθρωπο, η μεθυλίωση του DNA καταλύεται από τα ένζυμα DNMT1, DNMT3a και DNMT3b [Bird A. 2002] και λαμβάνει χώρα μόνο όταν η κυτοσίνη ακολουθείται από μία βάση γουανίνης, δηλαδή μόνο το δινουκλεοτίδιο CpG μπορεί να αποτελέσει θέση μεθυλίωσης. Στις περιοχές των υποκινητών των γονιδίων υπάρχουν μικρά τμήματα DNA, μήκους 1-2 kb, τα οποία ονομάζονται νησίδες CpG, η μεθυλίωση των οποίων αποτελεί έναν σημαντικό επιγενετικό μηχανισμό ελέγχου της μεταγραφής. Στον καρκίνο ο μηχανισμός αυτός συχνά απορυθμίζεται, καθώς παίζει κρίσιμο ρόλο στην μεταγραφική αποσιώπηση των

ογκοκατασταλτικών γονιδίων, την επιδιόρθωση του DNA, τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, την απόπτωση και την αποτοξικοποίηση [Herman J.G. & Baylin S.B. 2003].

Σε αντίθεση με τη δημιουργία μεταλλάξεων, η αποσιώπηση των γονιδίων μέσω μεθυλίωσης του DNA είναι αναστρέψιμη διαδικασία. Το γεγονός αυτό χρησιμοποιείται στην προσπάθεια θεραπευτικής αντιμετώπισης διαφόρων κακοηθειών, με την εισαγωγή απομεθυλιωτικών παραγόντων. Η αντιμετώπιση αυτή φέρει ενθαρρυντικά αποτελέσματα στη βελτίωση της διαδικασίας της αιμοποίησης και την παράταση του χρόνου επιβίωσης των ασθενών [Daskalakis M. et al, 2002, Banerjee S et al. 2019].



Εικόνα Α10: Επιγενετική τροποποίηση στον καρκίνο. Η μεθυλίωση ή απομεθυλίωση περιοχών CpG υποκινητών γονιδίων είναι ένας από τους κυριότερους μηχανισμούς ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης. Παρατηρείτε γονιδιακή αποσιώπηση μέσω μεθυλίωσης και γονιδιακή ενεργοποίηση μέσω της απομεθυλίωσης. Η μη-φυσιολογική υπερμεθυλίωση υποκινητών γονιδίων συνδέεται με την ανάπτυξη καρκίνου. Σε αντίθεση με τις γενετικές αλλαγές, οι επιγενετικές αλλοιώσεις είναι δυνητικά αναστρέψιμες, επιτρέποντας τον κακοήθη κυτταρικό πληθυσμό να επανέλθει στην πρωθύστερη κατάσταση.

Α1.3.3.1 Μεθυλίωση του DNA και ΧΛΛ

Η έρευνα για τη ΧΛΛ επικεντρώνεται όχι μόνο σε γενετικές αλλά και επιγενετικές διεργασίες, προκειμένου να εντοπιστούν νέοι παθογενετικοί και προγνωστικοί παράγοντες. [Rodríguez-Vicente AE. et al. 2013; Rodríguez D. et al. 2015]. Η μεθυλίωση των κυτοσινών στις νησίδες CpG υποκινητών γονιδίων είναι μια από τις πιο μελετημένες επιγενετικές τροποποιήσεις του DNA στον άνθρωπο και επηρεάζει τη δομή της χρωματίνης και τη μεταγραφική ενεργότητα των γονιδίων. Αν και η διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών λευχαιμογένεσης βρίσκεται σήμερα στο επίκεντρο του ερευνητικού ενδιαφέροντος, η μελέτη αυτών των μηχανισμών στη ΧΛΛ είναι ακόμα σε πρώιμο στάδιο. Αρκετές μελέτες υποδεικνύουν ότι η μεθυλίωση του DNA σχετίζεται με τη ΧΛΛ και έχει υποδειχθεί ως ισχυρός ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για την εξέλιξη της νόσου [Yu et al, 2007; Oakes et al, 2016; Cahill et al, 2013]. Συγκεκριμένα, η διαφορική μεθυλίωση

υποκινητών γονιδίων οδηγεί σε απορρύθμιση της έκφρασης αρκετών γονιδίων όπως TCL1, DAPK1 ή ZAP70 και σε συνδεδεμένα με την ΧΛΛ microRNAs [Yuille et al, 2001; Raval et al, 2007; Claus et al, 2014; Pallasch et al 2009; Baer et al 2012].

Το DNA ασθενών με ΧΛΛ παρατηρείται συνολικά υπομεθυλιωμένο σε σχέση με το DNA υγιών ατόμων [Wahlfors J. et al. 1992; Stach D. et al. 2003; Lyko F. et al. 2004]. Επίσης, έχει περιγραφεί γονιδιακή υπομεθυλίωση και άρα ενεργοποίηση και έκφραση κάποιον συγκεκριμένων γονιδίων [Lipsanen V. et al. 1988; Hanada M. et al. 1993; Yuille M.R. et al. 2001;].

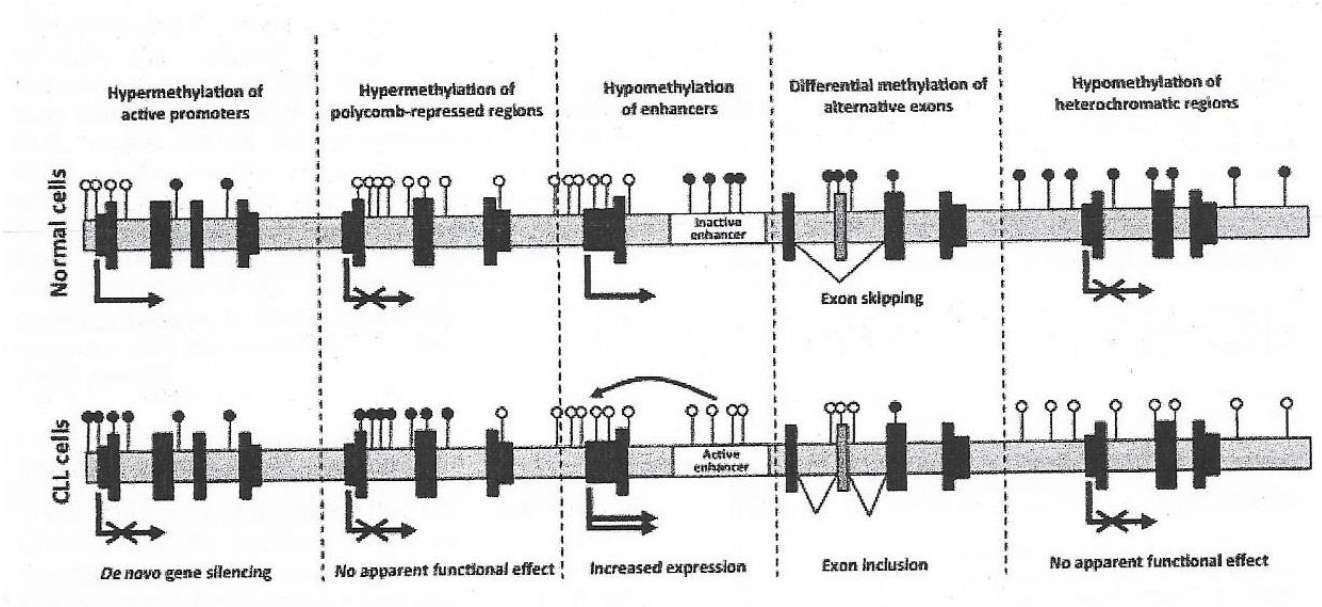
Παρόλα αυτά στην ΧΛΛ, βρίσκονται αποσιωποιημένα διάφορα ογκοκατασταλτικά γονίδια τα οποία αφού έχουν υποστεί τοπική υπερμεθυλίωση στους υποκινητές τους δεν εκφράζονται [Robertson K.D. & Jones P.A. 2000; Rush L.J. et al. 2004; Rahmatpanah F.B. et al. 2009]. Γονίδια που συναντώνται συχνά απορυθμισμένα στην ΧΛΛ έχει παρατηρηθεί να είναι μεθυλιωμένα. Συχνά, οι μελέτες επιγενετικών τροποποιήσεων επικεντρώνονται στα γνωστά γονίδια που είναι γενικά τροποποιημένα στην ΧΛΛ και στις πιο γνωστές αλλοιωμένες χρωμοσωμικές περιοχές, χαρακτηριστικές για τη νόσο. Έχουν όμως αναγνωριστεί επιγενετικά αποσιωπημένα και πολλά νεοεμφανιζόμενα γονίδια για την ΧΛΛ, όπως είναι το γονίδιο TWIST-2 (μεταγραφικός παράγοντας γνωστός για την αποσιώπηση της λειτουργίας του p53 σε άλλες κακοήθειες) το οποίο βρέθηκε μεθυλιωμένο κυρίως σε ασθενείς με μεταλλαγμένο IGHV [Raval A. et al. 2005]. Επιπλέον σε αυτή την ομάδα ΧΛΛ ασθενών, η μεθυλίωση του CD38 και του BTG4 συσχετίστηκε με ευνοϊκή εξέλιξη ενώ η μεθυλίωση του HOXA4 συσχετίστηκε με κακή έκβαση για τη νόσο [Rahmatpanah F.B. et al. 2009). Ενδιαφέρον αποτελεί το ZAP-70 του οποίου το επίπεδο έκφρασης του συνδέεται με μεθυλίωση των ειδικών CpG νησίδων του υποκινητή [Corcoran, M. et al. 2005]. Πρόσφατα, η ποσοτική ανάλυση της συνολική μεθυλίωσης του γονιδίου ZAP-70 επέτρεψε την αναγνώριση σημαντικών περιοχών οι οποίες είναι υπεύθυνες για την μεταγραφική ρύθμιση [Claus R. et al. 2012] και οι οποίες μπορεί στο μέλλον να αποτελέσουν έναν καλό προγνωστικό δείκτη. Τα στοιχεία της απορρύθμισης γονιδίου που εκφράζει αποπτωτικές πρωτεΐνες όπως η kinase 1 (DAPK1, γονίδιο που εμπλέκετε στην ρύθμιση την απόπτωσης και τον κυτταρικό θάνατο) μέσω μεθυλίωσης του υποκινητή του στην ΧΛΛ υπέδειξε πως και γενετικοί αλλά και επιγενετικοί παράγοντες μπορούν να εκφράσουν και σποραδικές αλλά και κληρονομικές μορφές για τη νόσο [Raval A. et al. 2007]. Σημαντικό να αναφερθεί πως μελετήθηκε σε μικρό αριθμό ασθενών η μεθυλίωση και των γονιδίων p16INK4A [Tsirigotis P. et al. 2006] και p15INK4B [Papageorgiou S.G. et 2007] αλλά η κλινική τους σημασία δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί.

Παρόλο που στην ΧΛΛ έχουν μελετηθεί γενικά ο ρόλος της μεθυλίωσης του DNA και ειδικά η μεθυλίωση υποκινητών γονιδίων, οι μελέτες που έχουν γίνει σε ολόκληρο το γονιδίωμα και είναι σχετικές με τις επιγενετικές τροποποιήσεις είναι περιορισμένες. Μέσω νέων τεχνολογικών αλληλούχησης και higher-resolution microarrays εκτεταμένες μελέτες αφιερώθηκαν στην αποκάλυψη της μεθυλίωσης σε ολικό επίπεδο DNA, οι οποίες θα παρουσιάσουν νέα δεδομένα σε αυτό τον τομέα [Yu M.K. et al. 2007; Kanduri M. et al. 2010; Kulis M. et al. 2012]. Γενικά, ο βαθμός της μεθυλίωσης του DNA έχει υποδειχθεί ως ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για την εξέλιξη της ΧΛΛ [Yu M.K. et al. 2007; Tary K. Et al 2018] και διαφορές στην εικόνα της συνολικής μεθυλίωσης μεταξύ των διαφορετικών προγνωστικών ομάδων των ασθενών με ΧΛΛ έχουν καταγραφεί [Kanduri M. et al. 2010]. Μια σημαντική σχετικά πρόσφατη μελέτη ενσωματώνει ολική επιγενομική και γενομική αλλοιλούχηση σε ασθενείς με ΧΛΛ [Kulis M. et al. 2012].

Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός πως η επιγενετική ρύθμιση δείχνει να έχει ρόλο στην διαφορική έκφραση των miRNA στη ΧΛΛ [Nicoloso M.S. et al. 2007; Nana-Sinkam S.P. & Croce

C.M. 2010]. Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί πως η απορρύθμιση της έκφρασης των DLEU2 και miR15a/16-1 σε περιπτώσεις με ΧΛΛ χωρίς διαγραφή του 13q14 [Giles F.J. et al 1998] μπορεί .να εξηγηθεί μέσω των κατασταλτικών επιγενετικών μηχανισμών [Mertens D. et al. 2002]. Το PLAG1, γονίδιο που θεωρείτε ογκογονίδιο στη ΧΛΛ, υπερεκφράζεται λόγο της απενεργοποίησης του miR-124-1 [Pallasch C.P. et al. 2009; Patz M. et al. 2010; Wong K.Y. et al. 2011]. Επιπλέον κάποιες μονάδες της οικογένειας του miR-29 στοχεύουν επίσης τις DNMTs και μπορούν να επαναενεργοποιήσουν ογκοκατασταλτικά γονίδια [Fabbri M. et al. 2007]. Έτσι η απώλεια κάποιας μονάδες της οικογένειας miR-29 μπορεί να προκαλέσει επιγενετικές αλλαγές που να σχετίζονται με την ΧΛΛ αλλά και με άλλους τύπους καρκίνου.

Οι επιγενετικές τροποποιήσεις είναι ένας ενδιαφέρον θεραπευτικός στόχος καθώς όπως αναφέραμε είναι αναστρέψιμες. Αρκετές χημικές ενώσεις όπως οι αναστολείς αποακετυλίωσης ιστονών [histone deacetylase inhibitors (HDACi)] έχουν ελεγχθεί ως προς την αποτελεσματικότητά τους σαν θεραπευτικές ουσίες σε κύτταρα ΧΛΛ in vitro αλλά και σε κλινικές μελέτες [Mercurio C. et al. 2010].



Εικόνα Α11: Απεικόνιση των ποιο κοινών αλλαγών μέσω μεθυλίωσης του DNA που παρατηρούνται στα κύτταρα της ΧΛΛ σε σχέση με φυσιολογικά Β κύτταρα. Η υπερμεθυλίωση του υποκηνιτή (αριστερά) συχνά μπορεί να οδηγήσει σε de novo γονιδιακή αποσιώπηση και στις περισσότερες περιπτώσεις επηρεάζει τα γονίδια τα οποία είναι ήδη αποσιωπημένα στα φυσιολογικά κύτταρα με τροποποιήσεις στις ιστόνες. Η υπομεθυλίωση (δεξιά) είναι εκτενής και στο γονιδιακό σώμα και σε μεγάλες περιοχές της ετεροχρωματίνση. Στο γονιδιακό σώμα, η υπομεθυλίωση συχνά επηρεάζει την ενίσχυση στοιχείων αλλά μπορεί να επηρεάσει και αδύναμα εξώνια οδηγώντας σε εναλλακτικό διαχωρισμό. Μαύρα σημεία (●) στο σχήμα αντιπροσωπεύουν τις μεθυλιωμένες περιοχές ενώ άσπρα σημεία (○) παρουσιάζουν τις υπομεθυλιωμένες περιοχές [J.I. Martin Subero 2015].

Α1.3.3.2 Σύμπλεγμα Cohesin και το γονίδιο RAD21

Είναι φανερό , με βάση και τα όσα αναφέρθηκαν μέχρι στιγμής, ότι επιγενετικοί παράγοντες όπως η μεθυλίωση του DNA, σχετίζονται και συμμετέχουν στην εξέλιξη των λευχαιμιών, συγκεκριμένα και της ΧΛΛ. Στην παρούσα μελέτη έγινε διερεύνηση του πιθανού ρόλου της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου RAD21. Το RAD21 είναι ένα σημαντικό γονίδιο που εδράζεται στον μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 8, στην χρωμοσωμική περιοχή 8q24.11. Η

παραγόμενη πρωτεΐνη του είναι μία από τις βασικές υπομονάδες του πρωτεϊνικού συμπλέγματος Cohesin.

Το σύμπλοκο Cohesin αποτελείται από τις πρωτεΐνες Rad21, Smc1a, Smc3 και Stag2 και έχει σημαντικό ρόλο στον σωστό διαχωρισμό αδελφών χρωματίδων (κατά τη διάρκεια της μίτωσης και της μείωσης), στη δομή της χρωματίνης, την έκφραση γονιδίων και εμπλέκεται στον μηχανισμό επιδιόρθωσης του DNA [Rankin S. et al. 2015; Gelot C. et al. 2016]. Αν και σχετικές πρώιμες μελέτες πρότειναν ότι μέσω της απενεργοποίησης του Cohesin το αποτέλεσμα είναι οι ανευπλοειδίες, πιο πρόσφατες μελέτες θέτουν υπό αμφισβήτηση αυτήν την θέση, υποδεικνύοντας ως σημαντικό αποτέλεσμα της απενεργοποίησης, μεταβολές που συμβαίνουν κατά τη διαφοροποίηση του προγονικού κυτταρικού στελέχους. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι μεταλλάξεις στο σύμπλοκο Cohesin επηρεάζουν αρνητικά τη διαφοροποίηση στελεχών των αιμοποιητικών και των προγονικών τους κύτταρων (HSPC) επηρεάζοντας τη προσβασιμότητα της χρωματίνης και τη δραστικότητα των μεταγραφικών παραγόντων. Με αυτό τον τρόπο ενδεχομένως να συμβάλλουν στη λευχαιμογένεση. Πρόσφατες μελέτες, έδειξαν ότι, σε διάφορους καρκίνους συμπεριλαμβανομένων και αιματολογικών κακοηθειών όπως η ΟΜΛ και το ΜΔΣ (μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο), τα γονίδια που κωδικοποιούν τις υπομονάδες του συμπλόκου Cohesin φέρουν σε ευρεία κλίμακα σωματικές μεταλλάξεις [Thota S. et al. 2014; Solomon DA. et al. 2014; Mullenders J. et al. 2015; Hill VK. et al. 2016]. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι σε δείγματα από κακοήθειες της μυελικής σειράς που παρουσιάζουν χαμηλότερη έκφραση των γονιδίων του συμπλέγματος παρουσιάζουν και παρόμοιες μεταγραφικές μεταβολές με δείγματα που φέρουν μεταλλάξεις εντός του συμπλόκου Cohesin [Thota S. et al. 2014]. Δεδομένου ότι η πλειοψηφία των μεταλλάξεων στο σύμπλοκο Cohesin προβλέπεται ότι προκαλεί απώλεια της λειτουργίας της κωδικοποιημένης πρωτεΐνης και μέσω της μεθυλίωσης του υποκινητή επέρχεται γονιδιακή σίγαση, η διερεύνηση της κατάστασης της μεθυλίωσης παράλληλα με διάφορες αλλοιώσεις του γονιδιώματος προβλέπεται να προσδώσουν σημαντικά δεδομένα για την έρευνα στον καρκίνο [Gelot C. et al. 2016].

Η παρούσα μελέτη επικεντρώνεται στο γονίδιο RAD21 του συμπλέγματος, για το οποίο μέχρι τώρα έχουν αναφερθεί περιορισμένα αλλά ενδιαφέρον δεδομένα. Πιο συγκεκριμένα, η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος έδειξε ότι με αφαίρεσή του γονιδίου RAD21 σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές προκαλούνται χρωμοσωμικές αναδιατάξεις όπως μετατοπίσεις, επαναλήψεις ή διαγραφές και οδηγούνταν στο σχηματισμό συγχωνεύσεων χρωμοσωμάτων, που μπορεί να παράγουν δυνητικά επιβλαβείς γενομικές αναδιατάξεις [Gelot C. et al., 2016]. Αξίζει να αναφερθεί ότι πρόσφατα αποδείχθηκε ότι, το γονίδιο RAD21 δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της αιμοποιητικής αυτοανανέωσης μέσω επιγενετικής καταστολής των γονιδίων HoxA7 και HoxA9, υποδεικνύοντας έτσι πιθανή επιπλοκή του στην λευχαιμογένεση [Fisher JB. et al. 2017].

Η μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου RAD21 οδηγεί σε μεταγραφική απενεργοποίηση και κατ' επέκταση γονιδιακή αποσιώπηση. Ωστόσο, η μεθυλίωση του γονιδίου RAD21 δεν έχει μελετηθεί ποτέ σε αιματολογικές κακοήθειες συμπεριλαμβανομένης και της ΧΛΛ. Στην παρούσα μελέτη, η κατάσταση μεθυλίωσης του RAD21 μελετάται για πρώτη φορά σε ασθενείς με ΧΛΛ και σχετίζεται παράλληλα με τα κυτταρογενετικά ευρήματά των ασθενών, προκειμένου να διερευνηθούν πιθανή εμπλοκή τους στην παθογένεση της νόσου.

Α1.4. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η κυτταρογενετική, μοριακή και επιγενετική διερεύνηση ασθενών με Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία με απώτερο στόχο την ανάδειξη γενετικών πολυμορφισμών που μπορεί να εμπλέκονται στην προδιάθεση εμφάνισης της ΧΛΛ καθώς και μεθυλιωμένων γονιδίων που μπορεί να σχετίζονται με την παθογένεση της νόσου.
Πιο συγκεκριμένα η συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή επικεντρώθηκε στη:

-Μελέτη των πολυμορφισμών L55M (rs854560) και Q192R (rs662) που παρουσιάζονται , στις θέσεις 55 και 192 στην κωδικοποιούσα περιοχή του γονιδίου PON1, ενός γονιδίου που μετέχει στην προστασία των κυττάρων του οργανισμό από γονοτοξικούς παράγοντες και ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, και η συσχέτισή τους με την προδιάθεση ανάπτυξης ΧΛΛ και τη δημιουργία των κυτταρογενετικών της αλλοιώσεων.

-Διερεύνηση πιθανή ύπαρξης μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου RAD21 σε ασθενείς με ΧΛΛ, ενός γονιδίου που έχει συσχετιστεί με την διατήρηση της γονιδιωματικής σταθερότητας και έχει προταθεί ότι δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της αιμοποιητικής αυτοανανέωσης, και η συσχέτιση της με την παθογένεση της νόσου και τις ειδικές χρωμοσωμικές της αλλοιώσεις.

Τα αποτελέσματα αναμένεται να συνεισφέρουν στην ανάδειξη νέων παραγόντων που εμπλέκονται στην παθογένεση της νόσου και μπορεί στο μέλλον να συμβάλλουν τόσο στη διάγνωση και πρόγνωση των ασθενών με ΧΛΛ όσο και στη διαλεύκανση της παθογενετικής πορείας της νόσου.

.

Β. ΥΛΙΚΟ & ΜΕΘΟΔΟΙ

Β1. Υλικό

Β1.1 Εργαστηριακός Εξοπλισμός

Οι κύριες συσκευές, εργαστηριακά μηχανήματα, και ηλεκτρονικά προγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή της πειραματικής πορείας είναι:

- Οπτικό μικροσκόπιο μεγέθυνσης 100Χ – 1000Χ
- Λογισμικό πρόγραμμα ανάλυσης εικόνας καρυότυπου, Ikaros, Metasystems
- Μικροσκόπιο φθορισμού προσπίπτοντος UV με φίλτρα φθορισμού
- Λογισμικό πρόγραμμα ανάλυσης εικόνας FISH, ISIS, Metasystems
- Εστία κάθετης ροής (Laminar Flow Hood)
- Κλίβανος επώασης διοξειδίου του άνθρακα (37°C, 5% CO_2)
- Επιτραπέζια μικροφυγόκεντρος
- Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων
- Θερμικός κυκλοποιητής C1000 Thermal Cycler, Bio-Rad
- CFX96 Real-Time PCR System, Bio-Rad
- BIORAD CFX96 Thermocycler
- LightCycler 2.0, Roche Diagnostics
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης Horizon 11-14 GibcoBRL
- Τράπεζα υπεριώδους φωτός TFX-20M UV Transilluminator, GibcoBRL
- Θάλαμος επώασης Thermobrite
- Θερμαινόμενη πλάκα

Β1.2 Αντιδραστήρια και Διαλύματα

Τα αντιδραστήρια της πειραματικής πορείας είναι:

- Qiamp DNA-extraction midikit, Qiagen, Hilden, Germany
- Tag DNA polymerase with Thermopol ® buffer, NEB, New England BioLabs
- Δεοξυνουκλεοτίδια dATP, dCTP, dGTP, και dTTP, New England BioLabs
- Certified™ Molecular Biology Agarose, Bio-Rad Laboratories
- GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, Biotium, USA
- Tris, Molecular Biology Grade, A 2264, Applichem, 1000μg/ml
- Acetic Acid (CH3COOH MW= 60,05g/mol), J.T. Baker
- Ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA), Sigma - Aldrich
- Φάγος (DNA Ladder) 50bp, N3236S, NEB, New England BioLabs
- Φάγος, Low Molecular Weight DNA Ladder, 25 bp to 766 bp, NEB, New England BioLabs
- Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, New England BioLabs)
- Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες Alw1 (NEB, New England BioLabs) και FAT1 (NEB, New England BioLabs)
- Για την μελέτη του πολυμορφισμού PON1 Q192R, οι σημασμένοι εκκινητές για τον πολλαπλασιασμό των γονιδίων ήταν F: (5’TATTGTTGCTGTGGGACCTGAG3’) και R: (5'CACGCTAAACCCAAATACATCTC3’)
- Για την μελέτη του πολυμορφισμού PON1 L55M, οι σημασμένοι εκκινητές για τον πολλαπλασιασμό των γονιδίων ήταν F: (5’GAAGAGTGATGTATAGCCCCAG3’) και

R: (5'TTTAATCCAGAGCTAATGAAAGCC3')

- EpiTect Methyl II DNA Restriction Kit (12) (QIAGEN) για μελέτη μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου RAD21
- Θρεπτικό υλικό MC Coy's 5A modified medium (1x) για καλλιέργεια ανθρώπινων κυττάρων
- Εμβρυϊκός ορός μόσχου-Featal Calf Serum (FCS)
- Διάλυμα αντιβιοτικών πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης για καλλιέργεια ανθρώπινων κυττάρων
- L-γλουταμίνη (20mM)
- Διάλυμα κολχικίνης σε PBS, συγκέντρωσης 10μg/ml
- Χλωριούχο Κάλιο (KCL) σε σκόνη (MW=74,56g/mol)
- Μεθανόλη (CH_4O, MW= 32,44g/mol)
- Ισοτονικό διάλυμα θρυψίνης/EDTA σε PBS: Trypsin/EDTA 0.05%/0.02% σε PBS
- DSP-30 (2Μμ; TIB Mol-biol, Berlin, Germany)
- IL-2 (200U/mL; Roche Diagnostics, Germany)
- Διάλυμα χρώσης χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων Giemsa (Giemsa Azur-Eosin-Methylene Blue Solution)
- Ρυθμιστικό διάλυμα Sorensen (pH 6.8) σε ταμπλέτες
- Tri-Natriuncittrat-Dihydrat σε σκόνη ($C_6H_5Na_3O_7$-$2H_2O$)
- Nonidet P450NP-40
- Φθοριόχρωμα αντίχρωσης 2,6-διαμιδινο-2-φαινυλινδολη (DAPI/antifade, MetaSystems DAPI/antifade, D-0902-500-DA
- Διάλυμα 0,4 x SSC (pH 7-7.5) στους 72˚C
- Διάλυμα 2 x SSC, 0.05% Tween-20 (pH 7) σε θερμοκρασία δωματίου
- CLL set probes for FISH: XL DLEU/LAMP/12cen probe για εντοπισμό τρισωμίας 12 και deletions 13q14.3/13q34.3, και XL ATM/TP53 deletions of 11q22.3 (ATM) και deletions 17p13 (TP53), MetaSystems probes.
- Υλικό επικόλλησης καλυπτρίδων (Entellan)
- Συνθετικό κεδρέλαιο για οπτικό μικροσκόπιο

Για τη διεξαγωγή της πειραματικής πορείας επιπλέον παρασκευάστηκαν και τα ακόλουθα διαλύματα:

- <u>10x TAE (Tris-Acetic-EDTA)</u>
  0,4M Tris
  1,14% Acetic Acid
  0,01M EDTA
- <u>Πλήρες θρεπτικό υλικό για κυτταροκαλλιέργειες (V=500ml)</u>
  440ml McCoy's 5A
  50ml Εμβρυϊκός ορός μόσχου (FCS-Featal Calf Serum)
  5ml L-γλουταμίνη (200mM)
  5ml Διάλυμα αντιβιοτικών Penicillin/Streptomycin, 10000U/10000 μg/μl
- <u>Υποτονικό διάλυμα KCL (75mM)</u>
  Διάλυση 0,56g Χλωριούχου Καλίου (KCL) σε 100mL απεσταγμένου νερού
- <u>3:1 Διάλυμα Μονιμοποίησης Carnoy's (Μεθανόλη/Οξικό οξύ) (V=120ml)</u>

90mL Μεθανόλη (Methanol CH_4O)
30mL Οξικού Οξέος (Acetic Acid glacial, CH_3COOH)

- Διάλυμα χρώσης της Giemsa
  1 δισκίο Sorensen phosphate buffer διαλύεται σε 1L απεσταγμένο νερό (10x). Ακολουθεί μία δεκαδική αραίωση σε απεσταγμένο νερό (1x).
  Σε 70ml διαλύματος Sorensen 1x (pH=6.8) προστίθενται 2ml Giemsa ($C_{τελ}$=5%).
- Διάλυμα DSP-30
  Σε 1 mL απεσταγμένου νερού διαλύουμε το λυοφιλιωμένο DSP-30. Διατηρούμε το διάλυμα στους -20˚C, σε κλάσματα εργασίας 120μL σε αποστειρωμένα eppendorfs. Για την καλλιέργεια χρησιμοποιούνται 24μL από το working solution τελικής συγκέντρωσης DSP-30 2μM.

Β1.3 Ταυτότητα Δειγμάτων

Στην μελέτη συμμετείχαν, 300 επιλεγμένα δείγματα μυελού των οστών/ή και περιφερικού αίματος ενήλικων ασθενών με ΧΛΛ. Τα δείγματα αυτά παρελήφθησαν από το Εργαστήριο Υγειοφυσικής, Ραδιοβιολογίας & Κυτταρογενετικής του Ινστιτούτου Πυρηνικών & Ραδιολογικών Επιστημών & Τεχνολογίας, Έρευνας & Ασφάλειας (ΙΠΡΕΤΕΑ) του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος», για καρυοτυπική ανάλυση από τις αρχές του έτους 2012 μέχρι και το τέλος του 2017, προκειμένου να ελεγχθούν για την ύπαρξη κλωνικών δομικών και/ή αριθμητικών χρωμοσωμικών αλλοιώσεων. Η διάγνωση της ΧΛΛ πραγματοποιήθηκε από τις Αιματολογικές Κλινικές Ελληνικών Νοσοκομείων. Μετά από ενημέρωση και γραπτή συγκατάθεση των ασθενών ή στενού συγγενικού προσώπου, σε περίπτωση που δεν ήταν εφικτό από τον ασθενή, απομονώθηκε από κάθε δείγμα ολικό γενωμικό υλικό (gDNA), προκειμένου να μελετηθούν οι πολυμορφισμοί του γονιδίου PON1 και να πραγματοποιηθεί έλεγχος της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου RAD21.

Επιπλέον, στην μελέτη συμπεριλήφθηκαν και 106 δείγματα περιφερικού αίματος υγιών μη-συγγενικών ατόμων αντίστοιχης ηλικίας και φύλου (age and sex matched). Μετά από αναλυτική ενημέρωση και γραπτή συγκατάθεση των υγιών δοτών, απομονώθηκε ολικό γενωμικό υλικό (gDNA) από το κάθε δείγμα, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί στη συγκριτική μελέτη ασθενών-μαρτύρων, κατά τη σύγκριση των συχνοτήτων των υπό μελέτη πολυμορφισμών του γονιδίου PON1 και του ελέγχου της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου RAD21.

Β2. Μέθοδοι

Αρχικά, έγινε επιλογή και αρχειοθέτηση αποθηκευμένου DNA μυελού των οστών από παλαιότερους ασθενείς με ΧΛΛ και κατάρτιση πινάκων με τα κλινικά δεδομένα τους, που ήδη υπήρχαν στο εργαστήριο Υγειοφυσικής, Ραδιοβιολογίας & Κυτταρογενετικής του ΕΚΕΦΕ "Δημόκριτος", προκειμένου να υλοποιηθεί αναδρομική μελέτη των εν λόγω ασθενών. Επιπλέον, κατά το διάστημα της παρούσας διδακτορικής διατριβής, νέα δείγματα μυελού των οστών ασθενών με ΧΛΛ, παρελήφθησαν, καλλιεργήθηκαν και προετοιμάσθηκαν κατάλληλα προκειμένου να πραγματοποιηθεί κυτταρογενετική ανάλυση, με μεθόδους κλασσικής ή/και μοριακής κυτταρογενετικής. Από αυτά τα δείγματα καθώς και από τα δείγματα υγιών δοτών απομονώθηκε ολικό γενωμικό DNA, ώστε στη συνέχεια της διδακτορικής της διατριβής να πραγματοποιηθεί η μοριακή ανάλυση.

Η μελέτη του πιθανού ρόλου γενετικών πολυμορφισμών του γονιδίου PON1, Q192R (Gln192Arg [rs662]) και L55M (Leu55Met [rs854560]) πραγματοποιήθηκε μέσω της αλυσιδωτής αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) και ακολούθως πέψης με περιοριστικές ενδονουκλεάσες για τον προσδιορισμό φυσιολογικών και μεταλλαγμένων αλληλομόρφων. Για το σκοπό αυτό, προτυποποιήθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες της αντίδρασης και της πέψης. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο PCR-RFLPs και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης για λήψη του αποτελέσματος.

Για τον έλεγχο του βαθμού μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου RAD21 σε ασθενείς με ΧΛΛ και υγιείς δότες, έγινε μοριακός έλεγχος μέσω της ειδικής για τη μεθυλίωση τεχνολογίας MethylScreen™ με PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το EpiTect Methyl II PCR Assay και προτυποποιήθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες της αντίδρασης. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται μέσω καμπύλης τήξης (melting curve analysis).

Β2.1 Κυτταρογενετική

Β2.1.1 Κλασσική Κυτταρογενετική – Καρυότυπος

Η μεθοδολογία της κλασσικής κυτταρογενετικής περιλαμβάνει την παραλαβή και καλλιέργεια κυττάρων μυελού των οστών, τη συλλογή και μονιμοποίηση των κυττάρων, την προετοιμασία των χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων για κυτταρογενετική ανάλυση, τη ζωνοποίηση των χρωμοσωμάτων με τη μέθοδο G-banding-Trypsin-Giemsa (GTG banding) και τέλος τη μικροσκοπική και καρυοτυπική ανάλυση και αξιολόγηση. Οι καρυότυποι περιγράφηκαν σύμφωνα με το διεθνές σύστημα ονοματολογίας Κυτταρογενετικής ISCN 2016 [McGowan-Jordan J, et al. 2016]. Βάση καρυοτύπου, οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν σύμφωνα με τα κυτταρογενετικά τους ευρήματα σε τρεις υποομάδες: καλής, κακής και ενδιάμεσης πρόγνωσης [Tari K et al. 2018].

Παραλαβή και καλλιέργεια κυττάρων

Από κάθε ασθενή, σε ηπαρινισμένο σωληνάριο και άσηπτες συνθήκες συλλέγεται από τον αιματολόγο δείγμα μυελού των οστών 2-3ml και εν συνεχεία αποστέλλεται στο Εργαστήριο Υγειοφυσικής, Ραδιοβιολογίας & Κυτταρογενετικής του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος». Ο μυελός των οστών αποτελεί την καλύτερη πηγή νεοπλασματικών κυττάρων για την ΧΛΛ, αλλά και για όλες τις υπόλοιπες αιματολογικές κακοήθειες. Ωστόσο, σε περιπτώσεις που δεν είναι εφικτή η λήψη μυελού των οστών από τον ασθενή, μπορεί να χρησιμοποιηθεί περιφερικό αίμα. Για κάθε δείγμα

πραγματοποιούνται 2 ανεξάρτητες καλλιέργειες μη διεγερμένων κυττάρων διάρκειας επώασης 24 και 48, ωρών. Παράλληλα, λόγο του ότι τα παθολογικά ΧΛΛ κύτταρα παρουσιάζουν χαμηλό μιτωτικό δείκτη, πραγματοποιούνται και καλλιέργειες διεγερμένων κυττάρων, επώασης 72 ωρών ή και 96 ωρών, με προσθήκη CpG-ολιγονουκλεοτίδιο DSP-30 (2Μμ, TIB Mol-biol, Βερολίνο, Γερμανία) και IL-2 (200U / mL · Roche Diagnostics, PB), αυξάνοντας σημαντικά το ποσοστό ανίχνευσης των κλωνικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών. Τα ολιγονουκλεοτίδια DSP30 CpG είναι ουσιαστικά τεχνητές μη μεθυλιωμένες CpG αλληλουχίες, 19-25 βάσεων προερχόμενες από μικρές συνθετικές ή βακτηριακές μονές αλυσίδες DNA. Μετά την είσοδό τους στα Β κύτταρα, αυξάνουν τα συν-διεγερτικά μόρια διαμεσολαβώντας στον υποδοχέα 9 προάγοντας την κυτταρική διαίρεση των ΧΛΛ λεμφοκυττάρων [Manzel L et al. 1999; Bauer S et al. 2001; Ilvesaro JM et al. 2008; Liang X et al. 2010]. Η IL2, που προστίθεται ως συν-διεγερτικό, αναφέρθηκε ότι ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των Β λεμφοκυττάρων στην καλλιέργεια [Decker T. et al 2000; Decker T. et al 2000].

Για κάθε καλλιέργεια, προστίθενται 0,2-0,4ml μυελού των οστών σε φιάλη καλλιέργειας 25cm^2 με 6ml πλήρες θρεπτικό υλικό McCoy's. Για την παρασκευή των διεγερμένων καλλιεργειών τοποθετείτε το πλήρες θρεπτικό υλικό με το δείγμα του ασθενή και επιπροσθέτως προστίθενται 24μL DSP30 (Immunostimulatory CpG-ODN) με τελική συγκέντρωση 2μM και 120 μL IL-2 (Interleukin-2, human (hIL-2) recombinant (E.coli) Solution (ανθρώπινη ανασυνδυασμένη σε βακτήριο E. coli), με τελική συγκέντρωση 2μM.

Οι καλλιέργειες μεταφέρονται σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C (±0.2°C) και σε ατμόσφαιρα 5% (±0.1%) CO_2. Η θερμοκρασία των 37°C (±0.2°C) είναι απαραίτητη για την φυσιολογική αύξηση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων ενώ το ποσοστό 5% CO_2 (±0.1%) στον αέρα απαιτείται για την επίτευξη κατάλληλου pH (7.4-7.7) στις καλλιέργειες, διατηρώντας την συγκέντρωση διττανθρακικών ανιόντων και μερικής πίεσης CO_2 σε ισορροπία.

Συλλογή και μονιμοποίηση κυττάρων

Μία ώρα πριν τη λήξη της επώασης της κάθε καλλιέργειας προστίθενται 50μl κολσεμίδιο (colsemid) σε τελική συγκέντρωση 0.02μg/ml. Το κολσεμίδιο αναστέλλει την πρωτεϊνοσύνθεση των μικροσωληνίσκων της μιτωτικής ατράκτου καθυστερώντας τον αποχωρισμό των κεντρομεριδίων, με αποτέλεσμα να αυξάνεται το ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση της μετάφασης. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται ο συγχρονισμός και η συσσώρευση των κυττάρων στην μετάφαση, όπου σε αυτήν τα χρωμοσώματα έχουν τη μέγιστη συσπείρωση και γίνονται ευδιάκριτα στο οπτικό μικροσκόπιο.

Μετά το πέρας της επώασης, τα κύτταρα μεταφέρονται σε ειδικό σωληνάριο (Falcon 14mL) και φυγοκεντρούνται για 10min στις 1300rpm (στροφές/min). Ακολουθεί απόχυση του υπερκείμενου και σταδιακή προσθήκη 8-10mL υποτονικού διαλύματος KCl (75mM). Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η διόγκωση των κυττάρων, λόγω της διαφοράς στην ωσμωτική πίεση που δημιουργείται μεταξύ ενδοκυττάριου και εξωκυττάριου χώρου. Σε περίπτωση περιορισμένης επώασης το αποτέλεσμα είναι η μη διόγκωση των κυτταρικών μεμβρανών. Σε παρατεταμένη επώαση στο υπότονο διάλυμα, γίνεται βίαιο σπάσιμο των κυτταρικών μεμβρανών και η καταμέτρηση του διπλοειδούς αριθμού των χρωμοσωμάτων (2n) των φυσιολογικών κυττάρων είναι ιδιαίτερα δύσκολη. Σε αυτό το στάδιο γίνεται αιμόλυση των ερυθρών κυττάρων, με αποτέλεσμα να απομακρύνεται η αιμοσφαιρίνη και τα υπόλοιπα κατεστραμμένα συστατικά τους μαζί με το υπερκείμενο.

Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 min στις 1300 rpm και απόχυση του υπερκείμενου, ενώ στη συνέχεια προστίθεται σταδιακά με πιπέτα Pasteur 8-10ml διαλύματος Carnoy's (μεθανόλη/οξικό οξύ, 3/1) που επιτρέπει τη μονιμοποίηση των κυττάρων. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (1300 στροφές/min για 10 min), απόχυση του υπερκειμένου και εκ νέου προσθήκη μονιμοποιητή Carnoy's. Το τελικό ίζημα αραιώνεται με προσθήκη ~0,5ml μονιμοποιητή, ανάλογα με την ποσότητα του κυτταρικού ιζήματος.

Προετοιμασία των χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων για κυτταρογενετική ανάλυση

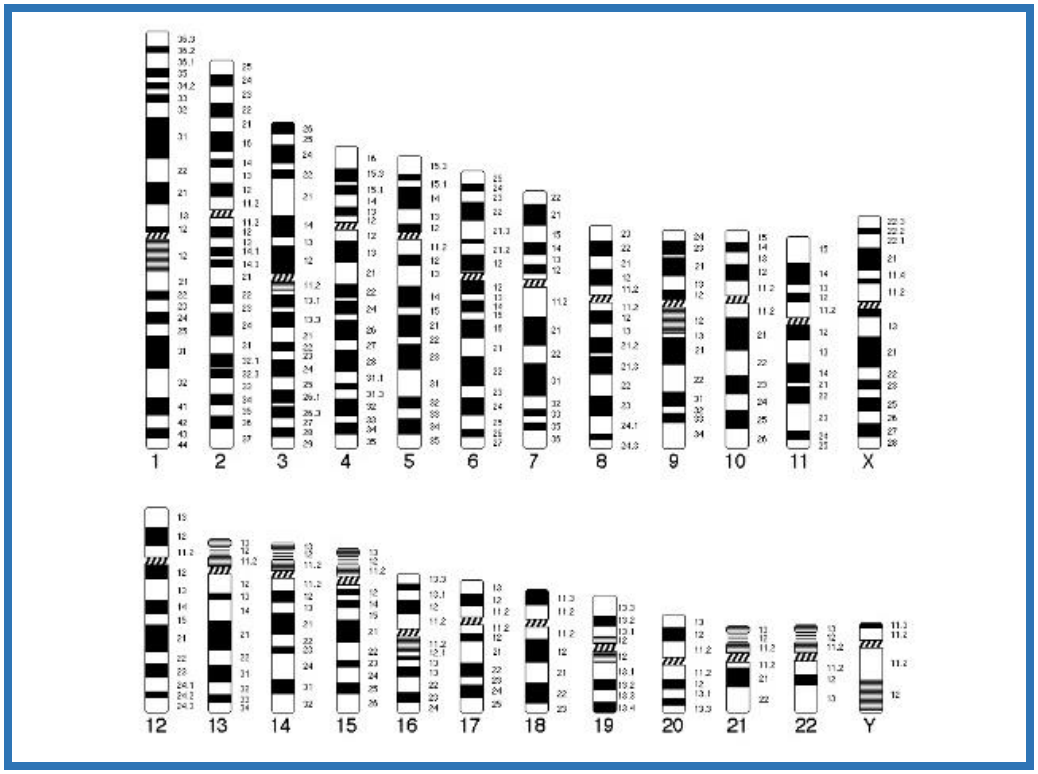
Η επίστρωση του χρωμοσωμικού υλικού γίνεται με εναπόθεση 1-2 σταγόνων εναιωρήματος κυττάρων πάνω σε καθαρή και υγρή αντικειμενοφόρο πλάκα. Μετά την επίστρωση, γίνεται παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο αντίθετης φάσης ώστε να προσδιοριστεί η ποιότητα των πλακακίων (πυκνότητα πυρήνων, ανάπτυξη μεταφάσεων) και ακολούθως οι πλάκες αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Από κάθε καλλιέργεια κάθε δείγματος που προορίζεται για κυτταρογενετική ανάλυση, επιστρώνονται τουλάχιστον δύο αντικειμενοφόροι πλάκες. Για λόγους τήρησης του απορρήτου, όλα τα δείγματα είναι κωδικοποιημένα και παραμένουν αυστηρώς ανώνυμα καθ'όλη τη διάρκεια της διαδικασίας. Σε κάθε πλακάκι αναγράφεται μόνο ο εργαστηριακός κωδικός, η ημερομηνία παραλαβής του δείγματος, η διάρκεια της καλλιέργειας και ο αύξων αριθμός του πλακακίου. Τέλος, τα πλακάκια επωάζονται στους 90°C για 1 ώρα σε ξηρό κλίβανο, προκειμένου να επιτευχθεί η παλαίωση και μονιμοποίηση των χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων.

Ζωνοποίηση χρωμοσωμάτων: μέθοδος GTG

Για τον προσδιορισμό των χρωμοσωμάτων και την ανάλυση της δομής τους χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ζωνοποίησης GTG. Αυτή η μέθοδος ζωνοποίησης και χρώσης είναι η πλέον διαδεδομένη και περιλαμβάνει: κατεργασία των χρωμοσωμάτων με θρυψίνη ώστε να μετουσιωθούν οι χρωμοσωμικές πρωτεΐνες και χρώση με Giemsa (G-banding-Trypsin-Giemsa, GTG). Κάθε ζεύγος χρωμοσωμάτων χαρακτηρίζεται από μία συγκεκριμένη και σταθερή διαδοχή σκουρόχρωμων και ανοικτόχρωμων ζωνών (ζώνες G). Στην Εικόνα Β1 απεικονίζονται διαγραμματικά η ζώνωση G ανθρώπινων χρωμοσωμάτων με 550 περίπου ζώνες ανά απλοειδή καρυότυπο.

Αναλυτικά, τα στάδια της μεθόδου είναι τα εξής:

1. Τα χρωμοσωματικά παρασκευάσματα επωάζονται σε ισοτονικό διάλυμα θρυψίνης 0.05% για 1min περίπου και κατόπιν με απόπλυση σε φυσιολογικό ορό απομακρύνεται το ένζυμο.
2. Ακολουθεί χρώση των παρασκευασμάτων σε διάλυμα Giemsa για 15 min (Seabright, 1971).
3. Στη συνέχεια πραγματοποιείται έκπλυση με νερό βρύσης.
4. Τα πλακάκια αφήνονται να στεγνώσουν και προστίθενται 2 σταγόνες Entellan ανά αντικειμενοφόρο πλάκα. Τέλος τοποθετείται υάλινη καλυπτρίδα (24x50mm).

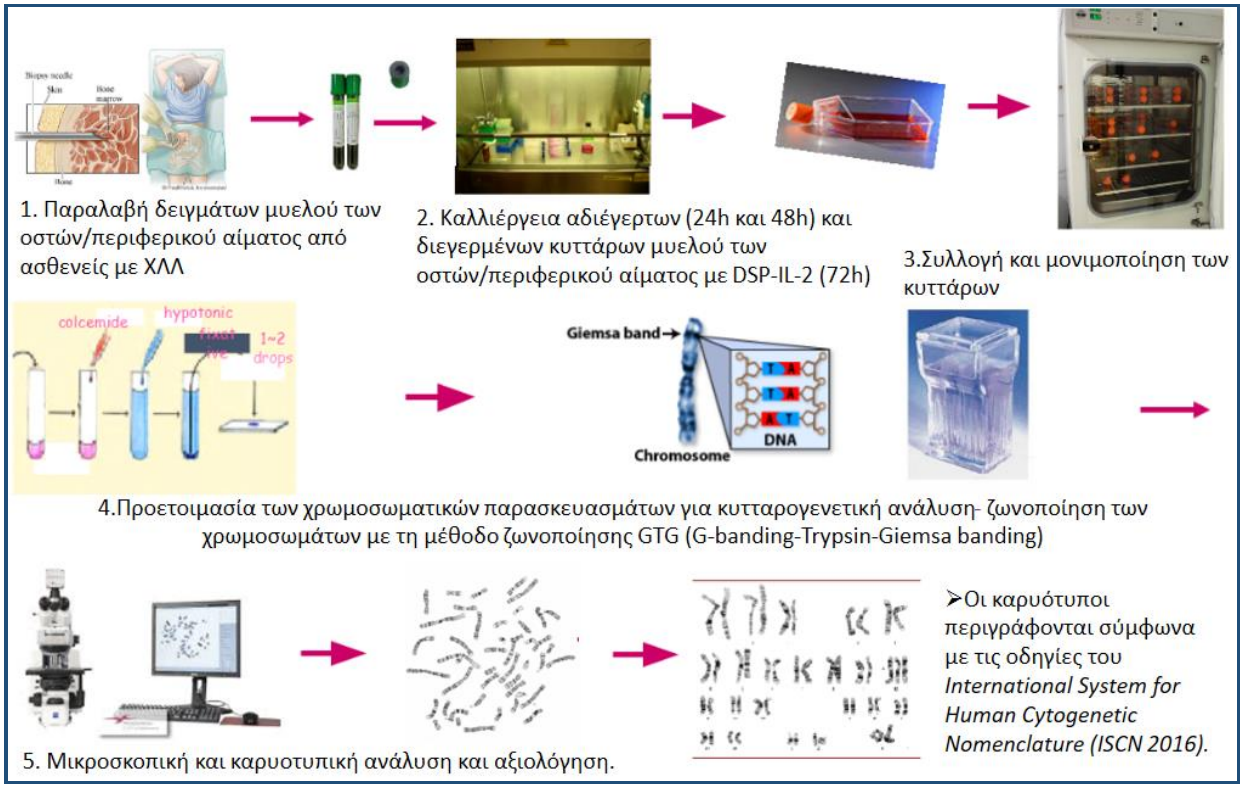


Εικόνα Β1: Ιδεογράμματα ανθρώπινων χρωμοσωμάτων με G ζωνοποίηση. Παρουσιάζονται ~550 ζώνες ανά απλοειδή καρυότυπο. Τα χρωμοσώματα αναπαρίστανται ως μονοχρωματικές δομές (όχι με δύο χρωματίδες όπως συνήθως φαίνονται τα μιτωτικά χρωμοσώματα στο μικροσκόπιο). Σκούρες στικτές περιοχές: οι πρωτογενείς περισφίξεις (κεντρομερή), πιο ανοικτόχρωμες στικτές περιοχές: οι ζώνες στικτής χρώσης που συχνά αντιστοιχούν σε θέσεις ετερομορφισμών.

Μικροσκοπική παρατήρηση και καρυοτυπική ανάλυση χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων

Τα χρωμοσωμικά παρασκευάσματα, αφού έχουν ζωνοποιηθεί και χρωστεί, μελετώνται σε οπτικό μικροσκόπιο (Zeis-Axioscop 40) εφοδιασμένο με ψηφιακή κάμερα μικροσκοπίου και με το λογισμικό σύστημα ψηφιακής εικόνας IKAROS, της εταιρίας Metasystems (Metasystems, Germany). Αρχικά, σαρώνεται η αντικειμενοφόρος πλάκα με αντικειμενικό φακό μεγέθυνσης 10x, ώστε να ανιχνευθούν οι περιοχές που φέρουν μεταφάσεις με σχετικά καλή μορφολογία και διάταξη χρωμοσωμάτων, καθώς και με ικανοποιητικό για την ανάλυση αριθμό αλληλεπικαλυπτόμενων χρωμοσωμάτων. Με τη χρήση του καταδυτικού φακού 100x μεγεθύνεται η εικόνα της επιλεγμένης μετάφασης, η οποία και αποθηκεύεται σε ηλεκτρονική μορφή για επεξεργασία.

Για κάθε ασθενή με αιματολογική κακοήθεια, πλήρης καρυοτυπικός έλεγχος θεωρείται η ανάλυση 20 μεταφάσεων. Ο καρυότυπος περιγράφεται σύμφωνα με το ισχύον σύστημα κυτταρογενετικής ονοματολογίας ανθρώπου ISCN 2016 (International System for Human Cytogenetic Nomenclature 2016). Για τη στοιχειοθέτηση κυτταρογενετικά αλλοιωμένου κλώνου απαιτείται η ανίχνευση τουλάχιστον δύο κυττάρων με την ίδια αλλοίωση, όταν αυτή είναι δομική ή αριθμητική, ενώ θα πρέπει να ανιχνευθούν τουλάχιστον τρία κύτταρα με την ίδια αλλοίωση όταν πρόκειται για απώλεια χρωμοσώματος (μονοσωμία).



Εικόνα Β2: Διαγραμματική απεικόνιση σταδίων που ακολουθούνται κατά την μέθοδο της κλασσικής κυτταρογενετικής ανάλυσης (καρυότυπος).

Β2.1.2 Μοριακή Κυτταρογενετική – FISH

Η μέθοδος του φθορίζοντος *in situ* υβριδισμού (FISH), διεξήχθη χρησιμοποιώντας τους εμπορικούς ανιχνευτές για τη ΧΛΛ και τον εντοπισμό των πιο κοινών αλλοιώσεων της νόσου συμπεριλαμβανομένης της τρισωμίας 12 και των ελλείψεων 17p13 (TP53), 11q22.3 (ATM) και 13q14.3 / 13q34.3 σε τουλάχιστον 200 μεσοφασικά κύτταρα (MetaSystems), Εικόνα Β3

Τα κύρια στάδια της μεθοδολογίας περιλαμβάνουν αρχικά την ταυτόχρονη αποδιάταξη γενομικού DNA και μοριακών ανιχνευτών, ακολούθως την υβριδοποίηση των ανιχνευτών στους DNA στόχους. Τέλος γίνετε οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων σε μικροσκόπιο φθορισμού και η αξιολόγηση τους.

Για τη FISH χρησιμοποιήθηκαν μονιμοποιημένα κύτταρα από διεγερμένες καλλιέργειες με DSP-30/IL-2. Επιλέγουμε την συγκεκριμένη καλλιέργεια λόγο του ότι σε αυτήν αυξάνεται η πιθανότητα ανεύρεσης του παθολογικού κλώνου, ιδιαίτερα σε μεταφάσεις, λόγω της διέγερσης των παθολογικών ΧΛΛ κυττάρων.

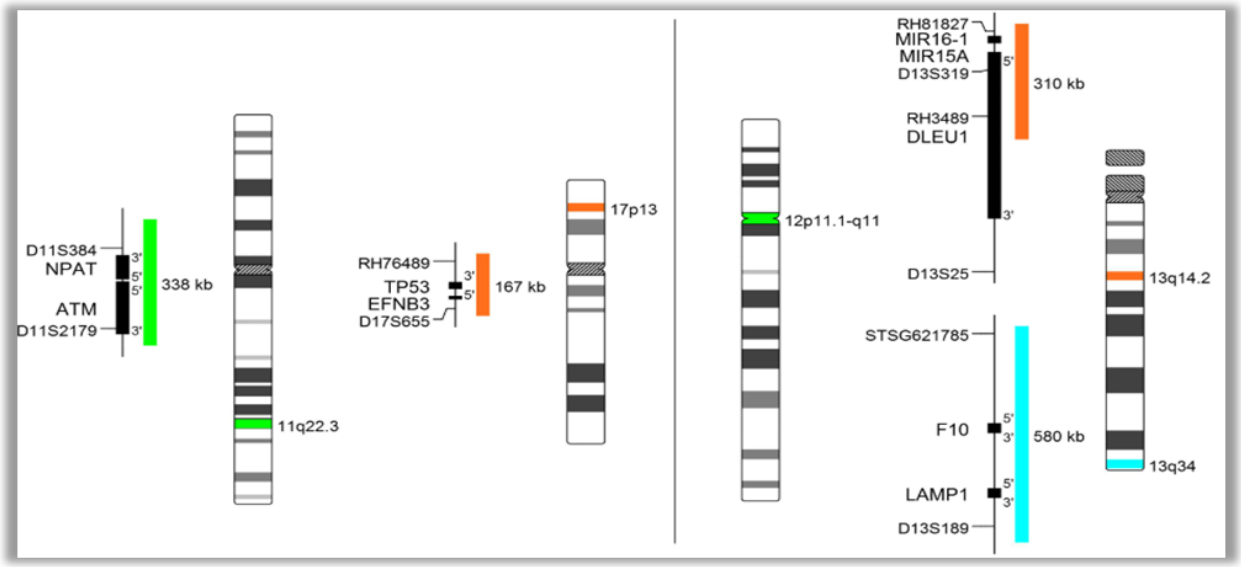
Προετοιμασία κυτταρογενετικού παρασκευάσματος

Για κάθε υπό μελέτη δείγμα, σε αντικειμενοφόρο πλάκα, επιστρώνεται μικρή ποσότητα (~20-30μl) μονιμοποιημένων κυττάρων. Με το οπτικό μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης ελέγχεται η ποιότητα των επιστρωμένων παρασκευασμάτων (πυκνότητα κυττάρων, ανάπτυξη μεταφάσεων).

Υβριδισμός του μοριακού ιχνηθέτη στην περιοχή στόχο

Στο στάδιο αυτό επιδιώκουμε τον πλήρη διαχωρισμό των δύο αλυσίδων DNA ώστε οι μοριακοί ανιχνευτές να έχουν ελεύθερη πρόσβαση και να επιτευχθεί η πρόσδεση τους στο συμπληρωματικό τμήμα του DNA. Ο υβριδισμός επιτυγχάνεται με σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας ώστε ο χρόνος συνάντησης των συμπληρωματικών αλληλουχιών να είναι επαρκείς. Σε περίπτωση απότομης ψύξης ευνοούνται λανθασμένες συνδέσεις οι οποίες αποτελούν σφάλμα κατά την πειραματική διαδικασία. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι:

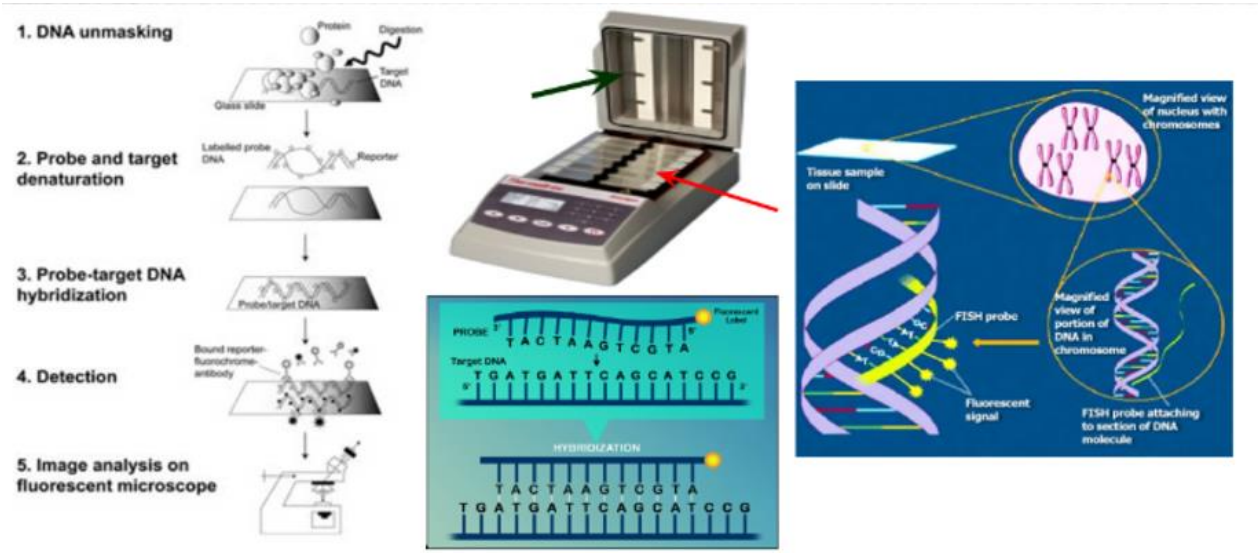
1. 10 μL από το διάλυμα του μοριακού ιχνηθέτη προστίθενται στο κέντρο της κάθε αντικειμενοφόρου πλάκας. Η διαδικασία γίνεται σε περιβάλλον χαμηλού φωτισμού λόγω της φωτοευαισθησίας που παρουσιάζουν τα υλικά.
2. Η περιοχή υβριδισμού καλύπτεται με αποστειρωμένη καλυπτρίδα 22x22, όπου το διάλυμα των ιχνηθετών απλώνεται ομοιόμορφα. Η καλυπτρίδα στεγανοποιείται με την τοποθέτηση ειδικής κόλλας (Sement glue) στην περιφέρεια της.
3. Τα πλακίδια τοποθετούνται σε ειδική επωαστική συσκευή Thermobrite, σε περιβάλλον υγρασίας, ώστε να γίνει η ταυτόχρονη αποδιάταξη της χρωματίνης και των μοριακών ιχνηθετών (σε θερμοκρασία 75˚C για 2 λεπτά) και ο υβριδισμός του μοριακού ιχνηθέτη στην συμπληρωματική περιοχή-στόχο του DNA (37˚C <u>+ 1</u> ˚C καθ'όλη την διάρκεια της νύχτας).



Εικόνα Β3: Μοριακοί Ανιχνευτές της ΧΛΛ για τον εντοπισμό των πιο κοινών αλλοιώσεων της: τρισωμίας 12 και των ελλείψεων 17p13 (TP53), 11q22.3 (ATM) και 13q14.3 / 13q34.3 (XL CLL Probe Kit (XL DLEU/LAMP/12cen + XL ATM/TP53), MetaSystems).

Εκπλύσεις και ανίχνευση σήματος υβριδισμού

1. Τα πλακάκια εξάγονται από τον επωαστικό θάλαμο υβριδισμού και με προσοχή χρησιμοποιώντας λαβίδα αφαιρείται η κόλλα ελαστικού από την κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα και απομακρύνεται η καλυπρτίδα. *Πριν την αφαίρεση της καλυπτρίδας σημειώνονται με μολύβι τα όρια που βρίσκονται οι περιοχές υβριδισμού.
2. Έκπλυση στο διάλυμα 0,4 x SSC (pH 7) στους 72 ˚C για 2 λεπτά.
3. Τα πλακάκια αφήνονται να στεγνώσουν στον αέρα σε όρθια θέση, και γίνεται έκπλυση σε 2 x SSC, 0.05% Tween-20 (pH 7) σε θερμοκρασία δωματίου για 30 δευτερόλεπτα.
4. Ξεπλένονται τα πλακάκια σε απεσταγμένο νερό για να αποφευχθεί η δημιουργία κρυστάλλων και αφήνονται να στεγνώσουν σε όρθια θέση.
5. (Σε κάθε πλακάκι προστίθενται 10 μL μίγματος αντίχρωσης DAPI στην κάθε περιοχή υβριδισμού και η περιοχή-στόχος καλύπτεται με γυάλινη αποστειρωμένη καλυπτρίδα 24x32 mm2.
6. Πριν από την παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού, οι αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετούνται σε σκοτεινό περιβάλλον στους -20 ˚C (+4 ˚C), σε ειδικές χάρτινες θήκες.

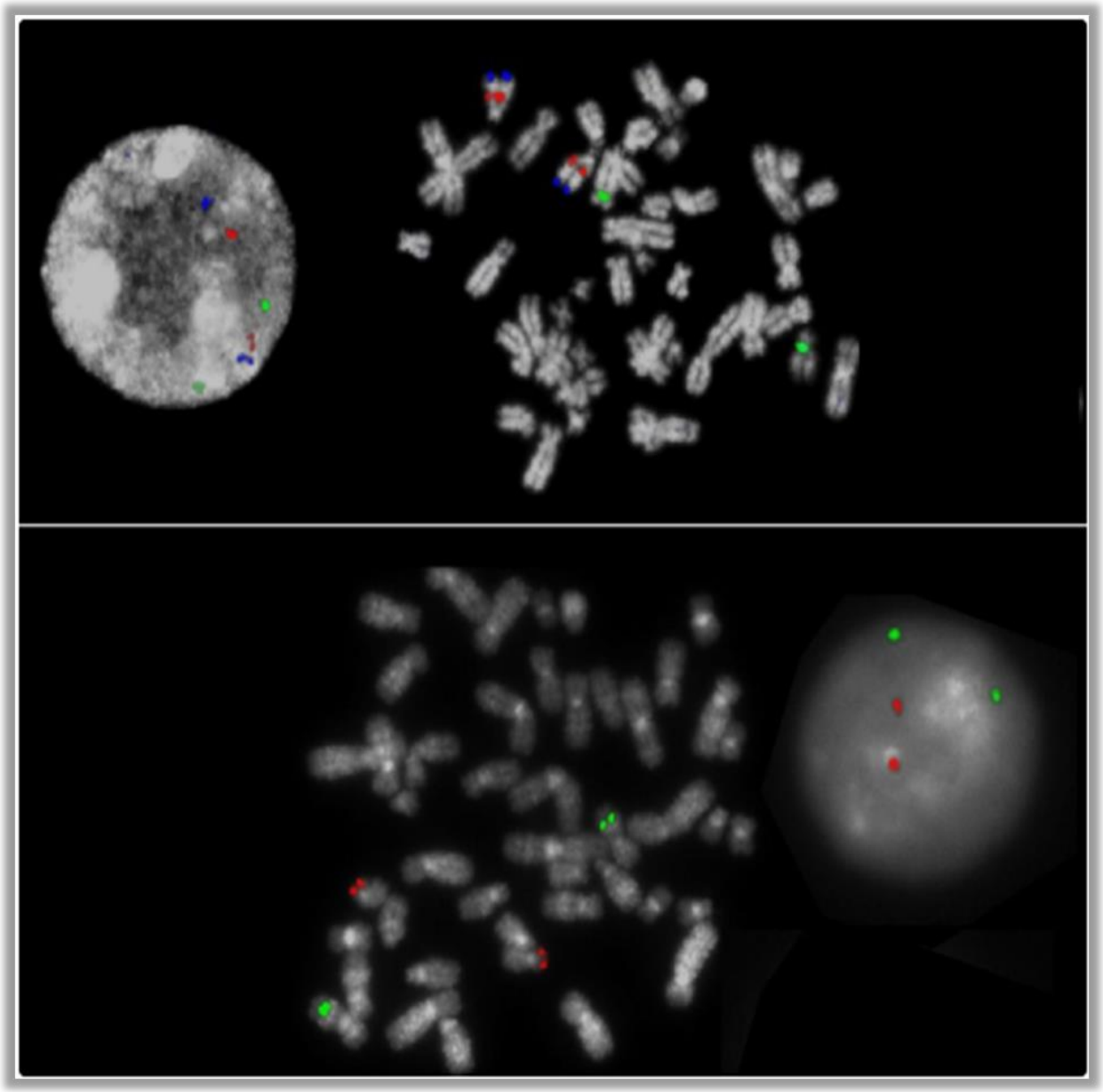


Εικόνα Β4: Διαγραμματική απεικόνιση των βημάτων που ακολουθούνται κατά την μέθοδο της Μοριακής κυτταρογενετικής ανάλυσης – FISH.

Μικροσκοπική παρατήρηση, ανάλυση και αξιολόγηση χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων

Τα παρασκευάσματα μελετώνται σε μικροσκόπιο φθορισμού (Zeiss Axioplan 2 microscope system), χρησιμοποιώντας τα ενδεδειγμένα φίλτρα φθορισμού και το λογισμικό σύστημα ψηφιακής εικόνας ISIS (Metasystems, Germany), σε περιβάλλον μειωμένου φωτισμού. Το λευκό φως που προκύπτει από την πηγή του μικροσκοπίου φιλτράρεται, έτσι ώστε μόνο το μήκος κύματος που διεγείρει το φθοριόχρωμα να προσπίπτει στο δείγμα. Η εκπομπή δευτερεύουσας ακτινοβολίας από τα διαφορετικά φθοριοχρώματα έχει ως αποτέλεσμα διαφορετικό μήκος κύματος να γίνετε ορατό ως φωτεινό χρωματισμένο σήμα (Εικόνα Β5).

Με αντικειμενικό φακό 20x, σαρώνεται η αντικειμενοφόρος πλάκα και ανιχνεύονται οι βέλτιστες περιοχές υβριδισμού (καλή κατανομή πυρήνων, φωτεινά και ευκρινή σήματα). Στη συνέχεια, με τη χρήση αντικειμενικού 100X, σαρώνεται η περιοχή και καταμετράται ο αριθμός των σημάτων εντός του πυρήνα κάθε αξιολογήσιμου κυττάρου που είναι σε μεσόφαση. Η διαδικασία καταμέτρησης επαναλαμβάνεται για 200 διαιρούμενους και 200 μη-διαιρούμενους πυρήνες. Τέλος, εφόσον είναι εφικτό, πραγματοποιείται και αξιολόγηση 10 μεταφάσεων (metaphaseFISH, mFISH). Οι αντιπροσωπευτικές εικόνες των πυρήνων και των μεταφάσεων αποθηκεύονται σε ηλεκτρονική μορφή και μετά το πέρας της ανάλυσης, οι αντικειμενοφόρες πλάκες υβριδισμού αρχειοθετούνται σε ειδικές θήκες και αποθηκεύονται στο σκοτάδι στου -20˚C.



Εικόνα Β5: Πάνω: Κόκκινα σήματα για 13q14, μπλε σήμα για 13q34 και πράσινο σήμα για την κεντρομεριδιακή περιοχή του χρωμοσώματος 12. Κάτω: Κόκκινα σήματα για 17p13 και πράσινα σήματα για 11q22.

Β2.2 Γονοτυπική ανάλυση πολυμορφισμών Q192R και L55M του γονιδίου PON1

Για την διερεύνηση του πιθανού ρόλου γενετικών πολυμορφισμών του γονιδίου αποτοξικοποίησης PON1 στην προδιάθεση ανάπτυξης ΧΛΛ, πραγματοποιήθηκε μελέτη ασθενών-μαρτύρων (Case-Control Study). Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε περιλαμβάνει συνοπτικά: απομόνωση DNA από τους ασθενείς με ΧΛΛ και από τους υγιείς μάρτυρες που συμμετείχαν, τη γονοτύπηση, τον υπολογισμό των συχνοτήτων αλληλομόρφων και γονοτύπων και τη στατιστική ανάλυση για την ανάδειξη πιθανών συσχετίσεων. Οι συχνότητες αλληλομόρφων και γονοτύπων μελετήθηκαν επίσης σε σχέση με τα κυτταρογενετικά ευρήματα των ασθενών που συμμετείχαν.

Η συγκεκριμένη μελέτη περιλαμβάνει 300 ασθενείς με ΧΛΛ (187 άντρες και 113 γυναίκες), με μέση ηλικία 65.3 έτη (35-94), και 106 υγιείς δότες αντίστοιχης ηλικίας και φύλου. Η διάγνωση της ΧΛΛ έγινε σύμφωνα με την ταξινόμηση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO) και τα διεθνή εργαστηριακά για τα κριτήρια για τη ΧΛΛ (iwCLL) [Swerdlow et al 2016, Hallek et al, 2018]. Οι υγιείς δότες ήταν άτομα από τον γενικό πληθυσμό της Ελλάδας, με αρνητικό ιστορικό προηγούμενων κακοηθειών και με φυσιολογικό αριθμό περιφερικών αιμοκυττάρων. Η μελέτη εγκρίθηκε από την Επιτροπή Ηθικής του Πανεπιστημίου Αθηνών και την Επιστημονική Επιτροπή του Γενικού Νοσοκομείου «Σωτηρία», Αθήνα. Ενημερωμένη συγκατάθεση ελήφθη από όλα τα εγγεγραμμένα άτομα.

Απομόνωση γενωμικού DNA

Ολικό γενωμικό DNA (gDNA) απομονώθηκε από δείγματα μυελού των οστών ασθενών με ΧΛΛ και από ολικό περιφερικό αίμα υγιών ατόμων με τη χρήση του QIAamp DNA-extraction midi kit (Qiagen, Hilden, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Μετά από την απομόνωση, το DNA χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο για την επακόλουθη γονοτυπική ανάλυση.

Γονοτυπική ανάλυση

Για τη γονοτυπική ανάλυση των πολυμορφισμών Q192R και M55L του γονιδίου PON1 ακολουθήθηκε η μέθοδος PCR-RFLPs και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης (Εικόνα Β6). Οι συσχετίσεις μεταξύ του πολυμορφισμού Q192R μεταξύ ασθενών και φυσιολογικών δοτών και των κυτταρογενετικών ευρημάτων ελέγχθηκαν με τη δοκιμασία χ2 (chi-square test). Στατιστικά σημαντικά θεωρήθηκαν τα ευρήματα με $p<0.05$ και διάστημα εμπιστοσύνης CI=95%.

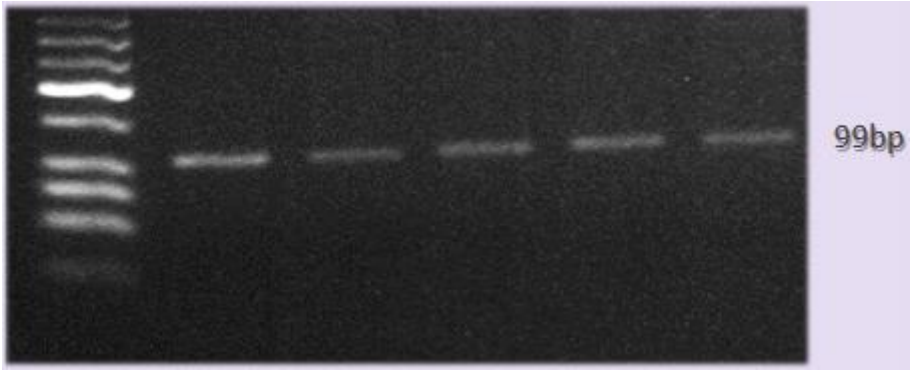
Εικόνα Β6: Απεικόνιση σταδίων γονοτυπικής ανάλυσης.

Στα δείγματα του απομονωμένου gDNA, τα αλληλόμορφα του PON1 που περιλαμβάνουν την περιοχή 192 και 55 ενισχύθηκαν χρησιμοποιώντας την DNA πολυμεράση Q5 High-Fidelity (NEB, New England BioLabs) επί του BIORAD CFX96 Thermocycler.

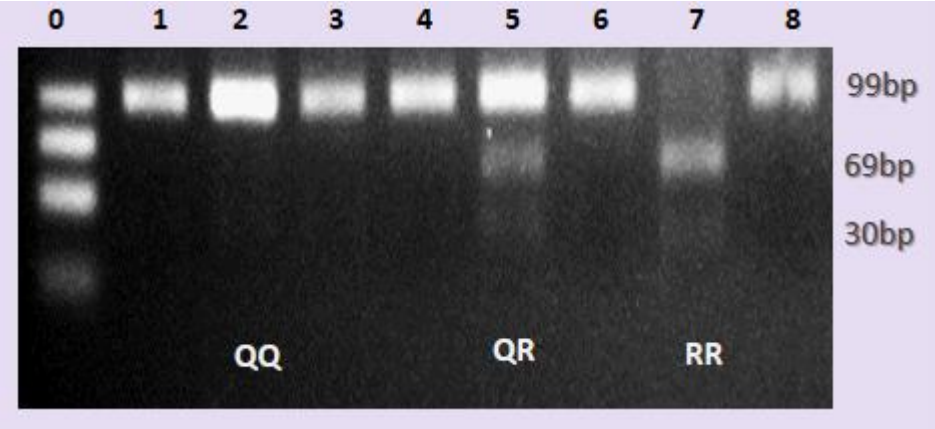
Γονοτύπιση του PON1 Q192R

Για τον πολυμορφισμό Q192R η αντίδραση της PCR έγινε χρησιμοποιώντας τους εκκινητές F: (5'TATTGTTGCTGTGGGACCTGAG3') and R: (5'CACGCTAAACCCAAATACATCTC3') (Gürbüz Şet al. 2015), και ακολουθώντας τις εξής συνθήκες αντίδρασης: 95°C για 30sec (initial denaturation) ακολούθησαν 40 κύκλοι αρχικά στους 95°C για 30sec (denaturation), 57°C για 40sec (annealing), 68°C για 1min (extension), και τέλος η διαδικασία για το final extension στους 68°C για 5min.

Μετά την διαδικασία της PCR, το παραγόμενο προϊόν μεγέθους 99bp υπέστη πέψη με την χρήση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης Alw1 (NEB, New England BioLabs). Τα παραγόμενα προϊόντα είναι τμήματα μεγέθους 99bp, 69bp και 30bp για τον γονότυπο QR (ετερόζυγο για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο), τμήματα 69bp και 30bp για τον γονότυπο RR (ομόζυγο για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο) και άπεπτο τμήμα μεγέθους 99bp για τον γονότυπο QQ (ομόζυγο αλληλόμορφο άγριου τύπου). Όλα τα προϊόντα από τη PCR και τα προϊόντα πέψης υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, Εικόνες Β7 και Β8.



Εικόνα Β7: Εικόνα προϊόντων ηλεκτροφόρησης μετά από την PCR, για τον πολυμορφισμό Q192R.

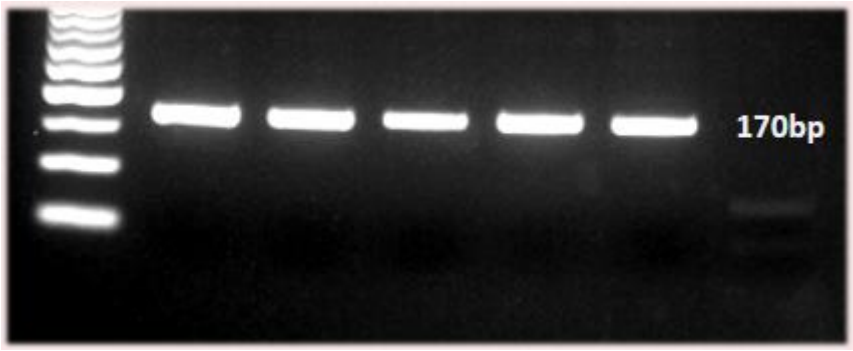


Εικόνα Β8: Ηλεκτροφόρηση μετά από πέψη με το ένζυμο Alw1 για τον προσδιορισμό των γονοτύπων του πολυμορφισμού Q192R του γονιδίου PON1. Θέση 0: μάρτυρας DNA ladder 25bp. Θέσεις 1-4,6 και 8: μία ζώνη μήκους 99bp που αντιστοιχεί στον ομοζυγώτη για το φυσιολογικό γονότυπο QQ, Θέση 5: ετερόζυγος γονότυπος QR με τρείς ζώνες μήκους 99bp, 69bp και 30bp. Θέση 7: με δύο ζώνες μήκους 69bp και 30bp ο ομόζυγος ως προς το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο, γονότυπος RR.

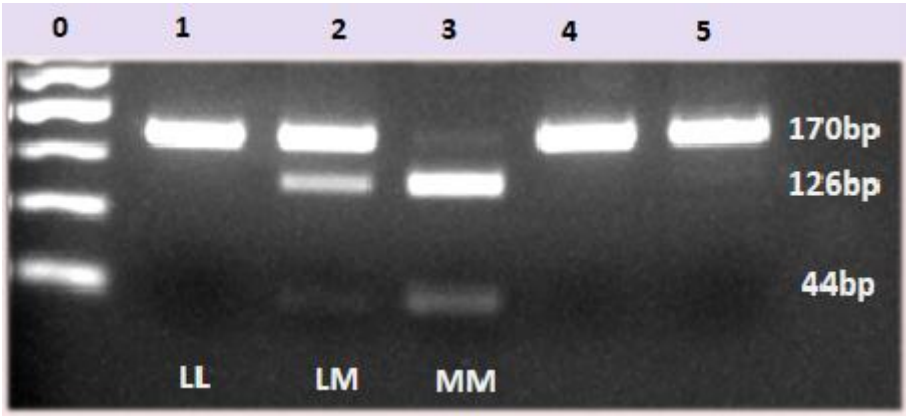
Γονοτύπιση του PON1 L55M

Για τον πολυμορφισμό L55M η αντίδραση της PCR έγινε χρησιμοποιώντας τους εκκινητές F: (5'GAAGAGTGATGTATAGCCCCAG3') και R: (5'TTTAATCCAGAGCTAATGAAAGCC3') [Gürbüz Şet al. 2015], και ακολουθώντας τις εξής συνθήκες για την αντίδραση: 95°C για 30sec (initial denaturation) ακολούθησαν 35 κύκλοι ξεκινώντας με 95°C για 30sec (denaturation), 55°C για 60sec (annealing), 68°C για 30sec (extension), και για το final extension για 5min στους 68°C.

Μετά την διαδικασία της PCR, το παραγόμενο προϊόν μεγέθους 170bp υπέστη πέψη με την χρήση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης FAT1 (NEB, New England BioLabs) με αποτέλεσμα την παραγωγή τμημάτων μεγέθους 170bp, 126bp και 44bp για τον γονότυπο ML (ετερόζυγος για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο), τμήματα 126bp και 44bp για τον γονότυπο MM (ομόζυγο για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο) και άπεπτα τμήματα μεγέθους 170bp για τον γονότυπο LL (ομόζυγο για το άγριου τύπου αλληλόμορφο). Όλα τα προϊόντα από τη PCR και τα προϊόντα πέψης υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, Εικόνες Β9 και Β10.



Εικόνα Β9: Εικόνα προϊόντων ηλεκτροφόρησης μετά από την PCR, για τον πολυμορφισμό L55M που δείχνει το παραγόμενο τμήμα μεγέθους 170bp.



Εικόνα Β10: Ηλεκτροφόρηση μετά από πέψη με το ένζυμο FAT1 για τον προσδιορισμό των γονοτύπων του πολυμορφισμού L55M του γονιδίου PON1. Θέση 0: μάρτυρας DNA ladder 50bp. Θέσεις 1,4,5: μία ζώνη μήκους 170bp που αντιστοιχεί στον ομοζυγώτη για το φυσιολογικό γονότυπο LL, Θέση 2: ετερόζυγος γονότυπος ML με τρείς ζώνες μήκους 170bp, 126bp και 44bp. Θέση 3: με δύο ζώνες μήκους 126bp και 44bp ο ομόζυγος ως προς το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο, γονότυπος MM.

Στατιστική επεξεργασία των γονοτυπικών αποτελεσμάτων

Οι συχνότητες των γονοτύπων και των αλληλομόρφων προσδιορίστηκαν στις ομάδες ασθενών και μαρτύρων και συγκρίθηκαν με το στατιστικό μη-παραμετρικό τεστ χ^2 (Chi-Square test), χρησιμοποιώντας το λογισμικό SPSS (Statistical Package for Social Sciences) έκδοση 20. Ο έλεγχος έγινε βάσει 95% διαστήματος εμπιστοσύνης (95% confidence interval) και επίπεδο σημαντικότητας 5%. Τα γονοτυπικά ευρήματα συσχετίστηκαν επιπλέον με τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών (φύλο, ηλικία διάγνωσης, υπότυπος νόσου) και τα κυτταρογενετικά ευρήματα.

Β2.3 Μελέτη μεθυλίωσης υποκινητών του γονιδίου RAD21

Για την διερεύνηση της παθογένεσης της ΧΛΛ έγινε έλεγχος της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου RAD2 και ακολουθήθηκε μεθοδολογία η οποία συνοπτικά περιλαμβάνει: την επιλογή δειγμάτων DNA ασθενών και υγιών μαρτύρων, και τον έλεγχο της μεθυλίωσης μέσω της τεχνολογίας MethylScreen™ με PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το EpiTect Methyl II PCR Assay αφού προτυποποιήθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες της αντίδρασης. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται μέσω καμπύλης τήξης (melting curve analysis), (Εικόνα Β11).

Εικόνα Β11: Απεικόνιση σταδίων ανάλυσης με PCR ειδικής για την μεθυλίωση.

Επιλογή δειγμάτων ασθενών και μαρτύρων

Η μελέτη αυτή περιλαμβάνει 105 ασθενείς με ΧΛΛ οι οποίοι επιλέχθηκαν με βάση τα κυτταρογενετικά τους ευρήματα, καθώς και 17 υγιή άτομα. Η διάγνωση της ΧΛΛ καθορίστηκε σύμφωνα με την ταξινόμηση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO) και το Διεθνές συμπόσιο ΧΛΛ(IWCLL) [Swerdlow et al 2008; Hallek et al, 2008]. Οι υγιείς δότες ήταν ανεξάρτητα άτομα από τον γενικό πληθυσμό της Ελλάδας, με αρνητικό ιστορικό προηγούμενων κακοηθειών και φυσιολογικό αριθμό περιφερικών αιμοκυττάρων. Η μελέτη εγκρίθηκε από την Επιτροπή Ηθικής του Πανεπιστημίου Αθηνών και την Επιστημονική Επιτροπή του Γενικού Νοσοκομείου «Σωτηρία», Αθήνα και μετά από σχετική ενημέρωση δόθηκε συγκατάθεση από όλους τους δότες που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη.

Απομόνωση γενωμικού DNA

Ολικό γενωμικό DNA (gDNA) απομονώθηκε από δείγματα μυελού των οστών ασθενών με ΧΛΛ και ολικό περιφερικό αίμα υγιών μαρτύρων, αντίστοιχης ηλικίας και φύλου. Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε με το QIAamp DNA Midi kit (Qiagen, Hilden, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Ειδική PCR για τη μελέτη της μεθυλίωσης του RAD21

Η μελέτη της μεθυλίωσης των CpG νησίδων στον εκκινητή του γονιδίου RAD21 πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της μεθόδου Methylation-Specific PCR (MSP) και της πραγματικού χρόνου PRC (Real-time PCR) στο μηχάνημα Biorad CFX96 (Biorad,California,USA). Το ολικό γενωμικό DNA αρχικά υποβλήθηκε σε πέψη με ειδικά περιοριστικά ένζυμα με βάση τις οδηγίες του EpiTect Methyl II DNA Restriction Kit (12) (QIAGEN), με σκοπό τον εντοπισμό των μεθυλιωμένων και μη μεθυλιωμένων κυτοσίνων. Μετά την πέψη το κάθε δείγμα DNA υποβλήθηκε για την αντίδραση MSP ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή του Epitect Methyl II PCR Assay (QIAGEN) (Εικόνα Β12). Τελικώς, το ποσοστό μεθυλίωσης του υποκινητή του RAD21 για το κάθε δείγμα υπολογίστηκε αναλύοντας τις τιμές Ct, χρησιμοποιώντας το φύλλο εργασίας EpiTect Methyl II PCR Array Microsoft Excel

based data analysis του κατασκευαστή, το οποίο μας επιτρέπει να προσδιορίσουμε το ποσοστό μεθυλίωσης για το κάθε δείγμα (Εικόνα Β13). Τα δείγματα που παρουσίασαν μεθυλίωση σε ποσοστό >10% των αναλυθέντων κυττάρων ορίστηκαν ως μεθυλιωμένα καθώς αυτά που παρουσίασαν μεθυλίωση σε ποσοστό <10% θεωρήθηκαν ως μη μεθυλιωμένα.

Πρωτόκολλο: PCR EpeTect Methyl II με χρήση 1 δείγματος DNA

Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες για κάθε δείγμα ασθενή.

- Παρασκευάζεται μίγμα αντίδρασης χωρίς την προσθήκη των ένζυμων, όπως υποδεικνύεται στον πίνακα Β1. Το 5x Restriction Digestion Buffer θα πρέπει να αποψυχθεί και να στροβιλιστεί καλά πριν τη χρήση. Εάν υπάρχουν τυχόν ιζήματα στο ρυθμιστικό διάλυμα, συνεχίζεται η ανάμιξη του μέχρι να διαλυθούν.

Συστατικό	Όγκος
Γενωμικό DNA	1 μL
5x Restriction Digestion Buffer	13 μL
RNase-/DNase-free water	46 μL
Συνολικός όγκος	60 μL

Πίνακας Β1: Μίγμα αντίδρασης χωρίς την προσθήκη ενζύμων.

- Ακολούθως, γίνονται 4 αντιδράσεις πέψης (Mo, Ms, Md, και Msd) σύμφωνα με τον Πίνακα Β2. Και οι 4 σωλήνες πρέπει να περιέχουν ίσες ποσότητες DNA.

Συστατικό	Mo	Ms	Md	Msd
Μίγμα αντίδρασης πίνακα **	14 μL	14 μL	14 μL	14 μL
Methylation-sensitive enzyme A	-	0.5 μL	-	0.5 μL
Methylation-dependent enzyme B	-	-	0.5 μL	0.5 μL
RNase-/DNase-free water	1 μL	0.5 μL	0.5 μL	-
Συνολικός όγκος	15 μL	15 μL	15 μL	15 μL

Πίνακας Β2: Αντιδράσεις πέψης.

- Αναδεύουμε ελαφρά ώστε να αναμιχθούν καλά τα διαλύματα και φυγοκεντρούμε τους σωλήνες εν συντομία σε μικροφυγόκεντρο.
- Οι 4 σωλήνες επωάζονται στους 37 ° C για 6 ώρες σε θερμικό κυκλοποιητή.
- Μετά την επώαση, οι αντιδράσεις σταματούν απενεργοποιώντας τα ένζυμα στους 65 ° C για 20 λεπτά.
- Τα δείγματα είναι έτοιμα για χρήση ή αποθήκευση στους -20 ° C. Πριν την χρήση αναμειγνύουμε καλά τα δείγματα και τα φυγοκεντρούμε εν συντομία ώστε να προχωρήσουμε στο βήμα 1 "Ρύθμιση διαλυμάτων για τη real-time PCR".

Ρύθμιση διαλυμάτων για τη Real-time PCR

- Προετοιμάζονται μεμονωμένες αντιδράσεις για καθεμία από τις 4 πέψεις (Mo: χωρίς ένζυμο, Ms: methylation sensitive restriction enzyme, Md: methylation dependent

restriction enzymes και Msd: και τα δύο ένζυμα) σε ένα σωλήνα των 1,5 ml σύμφωνα με τον Πίνακα Β3 σε 96-well plate.

Συστατικό	Mo	Ms	Md	Msd
PCR master mix	12.5 μl	12.5 μl	12.5 μl	12.5 μl
PCR primer mix	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL
Πέψη Mo	5 μl	-	-	-
Πέψη Ms	-	5 μl	-	-
Πέψη Md	-	-	5 μl	-
Πέψη Msd	-	-	-	5 μl
RNase-/DNase-free water	6,5 μl	6,5 μl	6,5 μl	6,5 μl
Συνολικός όγκος	25 μl	25 μl	25 μl	25 μl

Πίνακας Β3: Διαλύματα για ρύθμιση PCR.

- Αναμειγνύουμε καλά τα δείγματα και αφαιρούμε τυχόν φυσαλίδες αέρα από τον πυθμένα.

Εκτέλεση της Real-time PCR

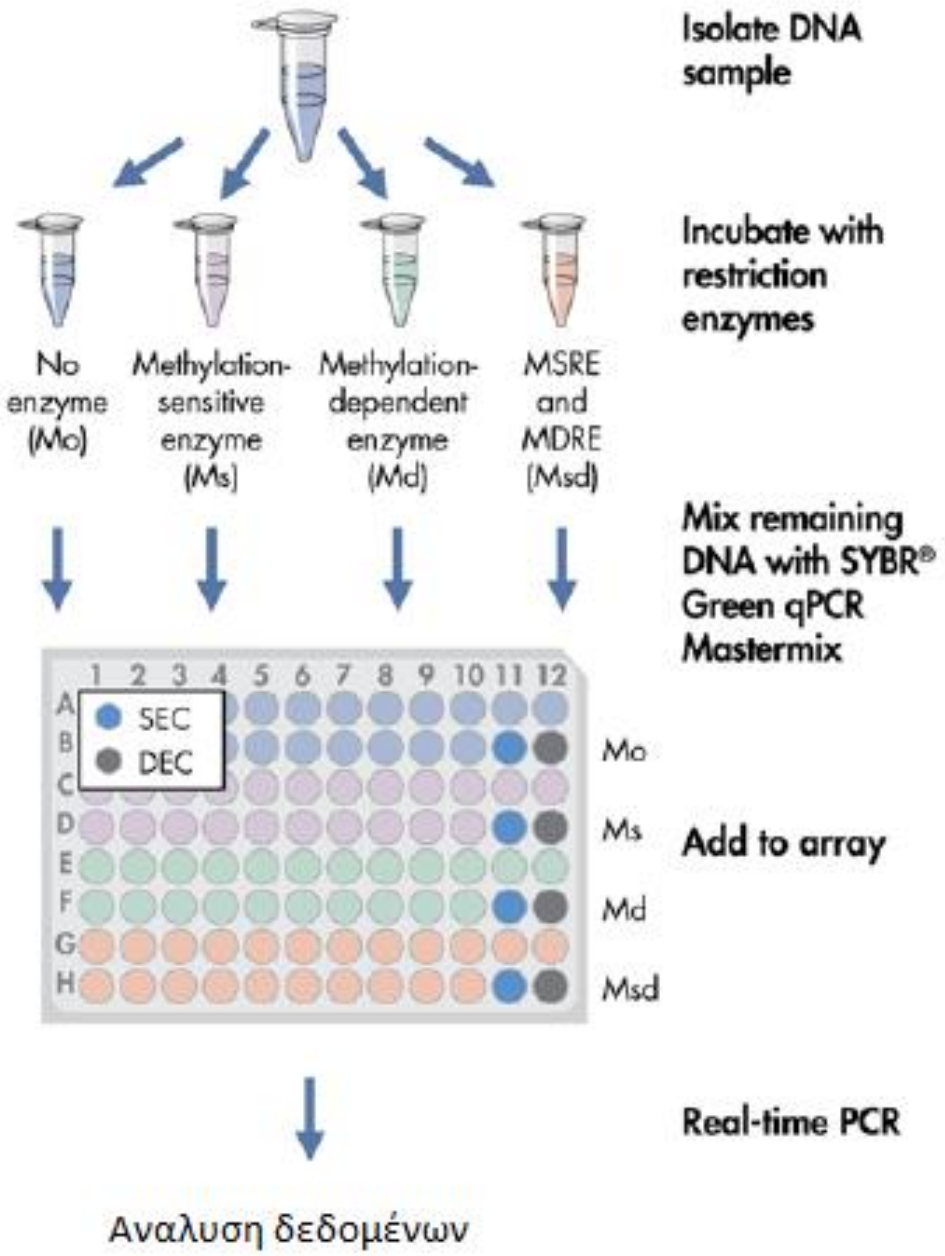
- Προγραμματίζουμε τον θερμικό κυκλοποιητή σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, χρησιμοποιώντας τις συνθήκες που περιγράφονται στον Πίνακα Β4.

Θερμοκρασία	Χρόνος	Αριθμός κύκλων
95°C	10 λεπτά	1 κύκλος
99°C	30 δευτερόλεπτα	3 κύκλοι
72°C	1 λεπτό	
97°C	15 δευτερόλεπτα	40 κύκλοι
72°C	1 λεπτό *	
Σύμφωνα με τις συστάσεις του οργάνου	Στήλη καμπύλης τήξης	

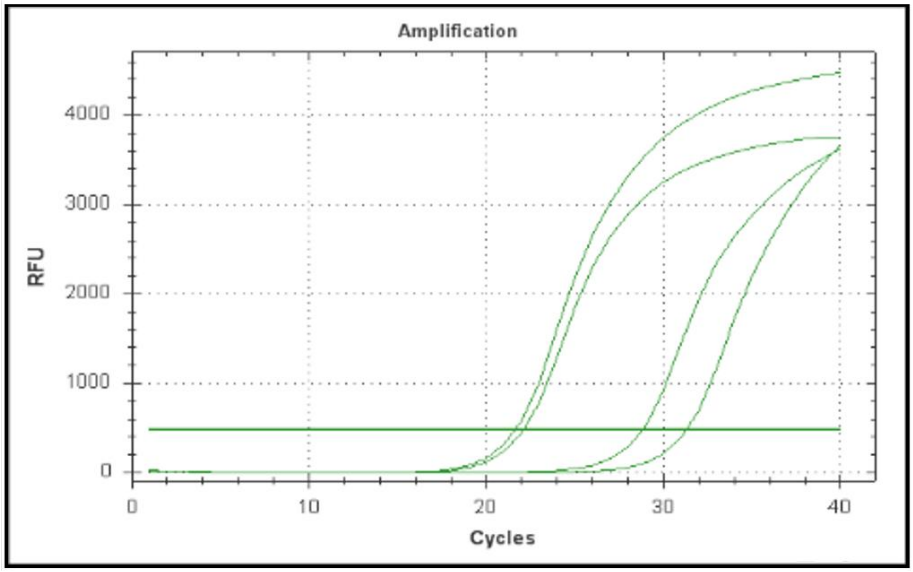
Πίνακας Β4: Προγραμματισμός θερμικού κυκλοποιητή. *Ανίχνευση και καταγραφή SYBR πράσινου φθορισμού από κάθε φρεάτιο κατά τη διάρκεια του σταδίου annealing κάθε κύκλου.

- Αφού ολοκληρωθεί η εκτέλεση, τα δεδομένα αναλύονται όπως περιγράφεται στις οδηγίες του κατασκευαστή.
- Κατ 'αρχάς, κατεβάζουμε το πρότυπο ανάλυσης δεδομένων EpiTect Methyl II PCR Array, το οποίο διατίθεται στη διεύθυνση: www.sabiosciences.com/dna_methylation_data_analysis.php.
- Στη συνέχεια, επικολλώνται τα δεδομένα αξιών CT και αναλύονται τα αποτελέσματα που δημιουργούνται αυτόματα, ακολουθώντας τις οδηγίες στο φύλλο εργασίας "Οδηγίες" του αρχείου Excel.

Οι συσχετίσεις μεταξύ της κατάστασης μεθυλίωσης του RAD21, των δημογραφικών χαρακτηριστικών και των κυτταρογενετικών ευρημάτων εξετάστηκαν και συγκρίθηκαν με το στατιστικό μη-παραμετρικό τεστ χ^2 (Chi-Square test). Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας λογισμικό SPSS (Statistical Package for Social Sciences) έκδοση 20. Ο έλεγχος έγινε βάσει 95% διαστήματος εμπιστοσύνης (95% confidence interval) και επίπεδο σημαντικότητας 5%. Στις περιπτώσεις που ήταν απαραίτητο χρησιμοποιήθηκε και το Fisher's Exact Test.



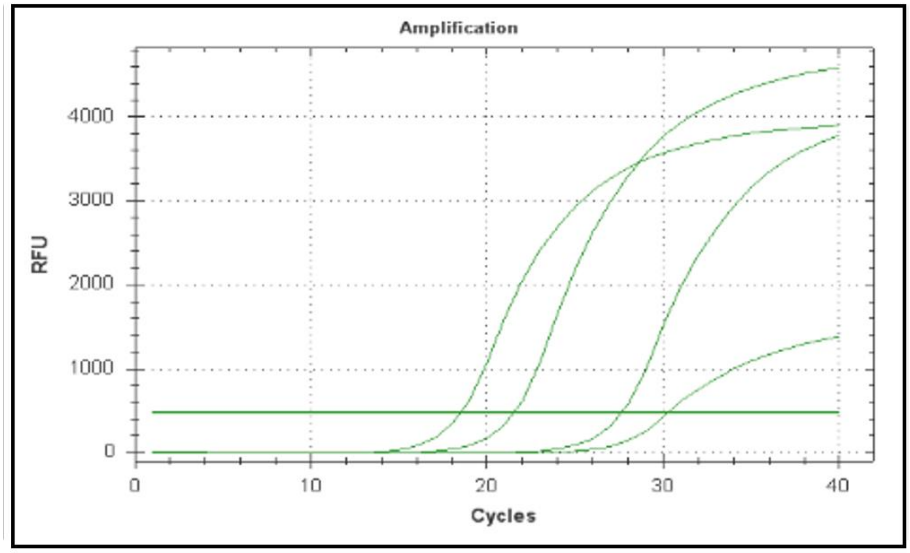
Εικόνα Β12. Διαδικασία PCR EpiTect Methyl II



1		
HM	UM	IM
0.95%	99.05%	0.00%

→ FM=0.95%

Unmethylated



2		
HM	UM	IM
0.18%	12.25%	87.58%

→ FM=87.76%

Methylated

Εικόνα Β13: Γραφική αναπαράσταση των δεδομένων από την real-time PCR. Οι 4 καμπύλες αναπαριστάνουν τις 4 ξεχωριστές αντιδράσεις που υπόκειται το κάθε δείγμα με (a) the methylation- sensitive restriction enzyme, (b) the methylation-dependent restriction enzyme, (c) καθόλου ένζυμο και (d) προσθήκη και των δύο ενζύμων. Συσχετίζοντας τις τιμές Δ CT, υπολογίζεται το ποσοστό μεθυλιωμένων και μη μεθυλιωμένων DNA περιοχών. Πάνω, μη μεθυλιωμένο (FM = HM + IM = 0.95%) Κάτω: μεθυλιωμένο (FM = HM + IM = 87.76%). FM, μεθυλιωμένο (M) DNA; HM, υπερμεθυλιωμένο; IM, μερικός μεθυλιωμένο; UM, μη-μεθυλιωμένο.

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Γ1. Κυτταρογενετική ανάλυση ασθενών με ΧΛΛ

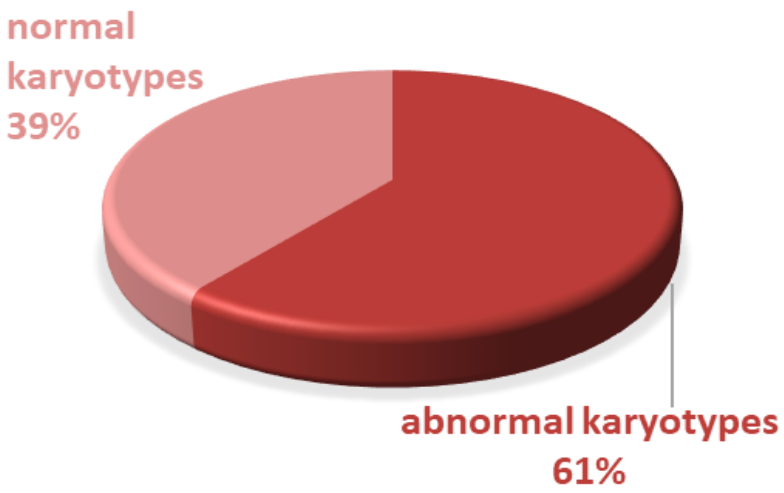
Αναλύθηκαν καρυοτυπικά 300 δείγματα μυελού των οστών (Bone Marrow, BM) από ενήλικες ασθενείς με ΧΛΛ. Η υπό μελέτη ομάδα των ασθενών περιλαμβάνει: 187 άντρες (187/300, 62.3%) και 133 γυναίκες (133/300, 37.7%). Η μέση ηλικία διάγνωσης ήταν 65.3 χρόνια (εύρος 35-94 έτη).

Μεταξύ των 300 επιλεγμένων ΧΛΛ ασθενών, 118/300 (39,3%) άτομα είχαν φυσιολογικό καρυότυπο (επιβεβαιωμένο και με FISH) και 182/300 (60,7%) άτομα παθολογικό καρυότυπο (παρουσιάζοντας τουλάχιστον μία χαρακτηριστική αλλοίωση για την ΧΛΛ). Συγκεκριμένα μεταξύ των 182 ασθενών με παθολογικό καρυότυπο: 61/182 (33,5%) έφεραν del(13q), 56/182 (30,8%) τρισωμία 12, 40/182 (21,9%) del(11q), 24/182 (13,2%) del(17p), 21/182 (11,5%) ασθενείς έφεραν αλλοιώσεις της περιοχής 14q32 [abn(14q32)], 12/182 (6,6%) αλλοιώσεις του χρωμοσώματος 8 [abn(8)], 9/182 (4,9%) ασθενείς del(6q) και 22/182 (12,1%) ασθενείς έφεραν άλλες χρωμοσωμικές αλλοιώσεις. Επιπλέον, από αυτούς τους 182 ασθενείς, οι 32/182 (17,6%) παρουσίαζαν αριθμητικές αλλοιώσεις, 80/182 (43,9%) δομικές αλλοιώσεις και 70/182 (38,5%) τόσο αριθμητικές όσο και δομικές αλλοιώσεις. Με βάση την πολυπλοκότητα του καρυοτύπου, 88/182 (48,4%) ασθενείς παρουσίασαν μία μοναδική αλλοίωση, 38/182 (20,9%) δύο αλλοιώσεις και 56/182 (30,8%) ασθενείς είχαν σύνθετο/complex καρυότυπο (≥3 αλλοιώσεις). Συνοψίζοντας, οι συχνότερες αλλοιώσεις με ανάλογη σειρά εμφάνισης ήταν: del(13q), +12, del(11q), del(17p), abn(14q32), abn(8) και del(6q).

Τα παραπάνω καρυοτυπικά ευρήματα συγκεντρώνονται στον Πίνακα Γ1. Η διάγνωση της ΧΛΛ έγινε κατά το διάστημα Ιανουάριος 2012-Δεκέμβριος 2017.

Κυτταρογενετικά ευρήματα	N (%)
Φυσιολογικός καρυότυπος	118 (39,3)
Παθολογικός καρυότυπος	182 (60,7)
del(13q)	61 (33,5)
Τρισωμία 12	56 (30,8)
del(11q)/ATM	40 (21,9)
del(17p)/p53	24 (13,2)
abn(14q32)	21 (11,5)
abn(8)	12 (6,6)
del(6q)	9 (4,9)
Άλλες χρωμοσωμικές αλλοιώσεις	22 (12,1)

Πίνακας Γ1: Κλινικά καρυοτυπικά χαρακτηριστικά ασθενών με ΧΛΛ.



Εικόνα Γ1: Διαγραμματική απεικόνιση σχέσης των ασθενών με ΧΛΛ με φυσιολογικό καρυότυπο και των ασθενών με παθολογικό καρυότυπο.

Γ2. Γονοτυπική Ανάλυση

Στην παρούσα διατριβή, πραγματοποιήθηκαν μελέτες ασθενών-μαρτύρων (case-control studies) για τη διερεύνηση του πιθανού ρόλου γενετικών πολυμορφισμών, Q192R και L55M, του γονιδίου PON1 στην προδιάθεση εμφάνισης της ΧΛΛ στον Ελληνικό πληθυσμό. Αυτή η μελέτη ήταν επιτυχής και στους 300 ΧΛΛ ασθενείς (100%) ενώ στους 104 από τους 106 υγιείς δότες (98,1%). Τα δείγματα μυελού των οστών των ασθενών παραπέμφθηκαν στο Εργαστήριο Υγειοφυσικής, Ραδιοβιολογίας & Κυτταρογενετικής του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος», προκειμένου να ελεγχθούν και να αξιολογηθούν καρυοτυπικά. Υπολογίστηκαν οι συχνότητες αλληλομόρφων και γονοτύπων σε κάθε ομάδα και συγκρίθηκαν μεταξύ τους προκειμένου να αναδειχθούν πιθανές συσχετίσεις της παρουσίας των υπό μελέτη πολυμορφισμών με τον κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου. Επιπλέον, οι γονότυποι συσχετίστηκαν με τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών και τα κυτταρογενετικά ευρήματα.

Στον Πίνακα Γ2 παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά των ασθενών και μαρτύρων. Τα καρυοτυπικά ευρήματα των ασθενών συγκεντρώνονται στον Πίνακα Γ1.

n	**Φύλο** ♂ / ♀		**Αναλογία φύλου**	**Μέση ηλικία (έτη)**	**Εύρος ηλικίας**
ΧΛΛ=300	113	87	1.63	65.3	35-94
Control=106	59	47	1.3	57,9	30-92

Πίνακας Γ2: Χαρακτηριστικά ασθενών με ΧΛΛ και μαρτύρων.

Αποτελέσματα πολυμορφισμού PON1 Q192R

Η μελέτη του πολυμορφισμού PON1 Q192R ήταν επιτυχής σε όλους τους 300 ασθενείς με ΧΛΛ (100%) και στους 104 από τους 106 υγιείς δότες (98,1%). Η κατανομή των γονοτύπων PON1 Q192R στους υγιείς δότες ήταν: 63.5% άγριου τύπου (QQ), 31.7% ετερόζυγοι (QR) και 4.8% ομόζυγοι για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο (RR). Δεν παρατηρήθηκε καμία απόκλιση Hardy Weinberg στην ομάδα των μαρτύρων. Η κατανομή των γονοτύπων στους ασθενείς με ΧΛΛ ήταν: 48.3% άγριου τύπου (QQ), 44% ετερόζυγοι QR και 7.7% ομόζυγοι RR.

Συνεπώς, παρατηρείται μια στατιστικά σημαντική απόκλιση συγκρίνοντας τις συχνότητες των γονοτύπων μεταξύ των ασθενών και των υγιών δοτών. Συγκεκριμένα, στους ασθενείς παρατηρείται υψηλότερη συχνότητα των μεταλλαγμένων γονοτύπων (ετεροζυγοτών QR και ομόζυγων RR) σε σχέση με τις σχετικές συχνότητες που εμφανίζονται στους μάρτυρες (44% vs 31.7% και 7.7% vs 4.8% αντίστοιχα) ($p=0.028$, $x2=7.14$, $df=2$) (Πίνακας Γ3). Επιπλέον, παρόμοια με τα παραπάνω αποτελέσματα βρέθηκαν να είναι και τα αποτελέσματα από την κατανομή της συχνότητας των αλληλομόρφων, καθώς στους ΧΛΛ ασθενείς παρατηρείται αυξημένη συχνότητα του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου (R) σε σχέση με τους μάρτυρες (29.7% vs 20.7% αντίστοιχα) ($p=0.012$, OR [95% CI] = 1.619 [1.030-1.776]) (Πίνακας Γ3).

	rs854560 (L55M)						*rs662 (Q192R)*				
	Genotype Frequency			Allele			Genotype Frequency			Allele	
Group	LL n (%)	ML n (%)	MM n (%)	L n (%)	M n (%)	Group	QQ n (%)	QR n (%)	RR n (%)	Q n (%)	R n (%)
Healthy Controls (n=105)	53 (50.5)	52 (49.5)	0 (0)	158 (75.2)	52 (24.8)	Healthy Controls (n=104)	66 (63.46)	33 (31.73)	5 (4.81)	165 (79.33)	43 (20.67)
CLL patients (n=181)	91 (50.3)	89 (49.2)	1 (0.6)	271 (74.9)	91 (25.1)	CLL patients (n=300)	145 (48.33)	132 (44)	23 (7.67)	422 (70.33)	178 (29.67)
p-Value	p=0.747			p=0.834 OR [95% CI] = 1.065 [0.814-1.326]		p-Value	p=0.028, x^2=7.14, df=2			p=0.012 OR [95% CI] = 1.619 [1.030-1.776]	

Πίνακας Γ3: Συσχέτιση αποτελεσμάτων για τον M/L55 και τον Q/R192 πολυμορφισμό του γονιδίου PON1 μεταξύ ασθενών με ΧΛΛ και μαρτύρων. *OR: Odds Ratio; CI: Confidence Intrevals.

Η κατανομή των συχνοτήτων, των γονοτύπων και των αλληλομόρφων του πολυμορφισμού Q192R στις υποομάδες των ασθενών με ΧΛΛ με βάση τα καρυοτυπικά τους ευρήματα έδειξε να μην υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητα των γονοτύπων στους ασθενείς με φυσιολογικό καρυότυπο σε σχέση με αυτούς που έφεραν παθολογικό καρυότυπο (Πίνακας Γ4). Παρόλα αυτά, το μεταλλαγμένο R αλληλόμορφο εμφανίστηκε με στατιστικά σημαντική αυξημένη συχνότητα στους ασθενείς με abn14q32 στον καρυότυπο τους, σε σχέση με όλους τους υπολοίπους ΧΛΛ ασθενείς (p=0.006).

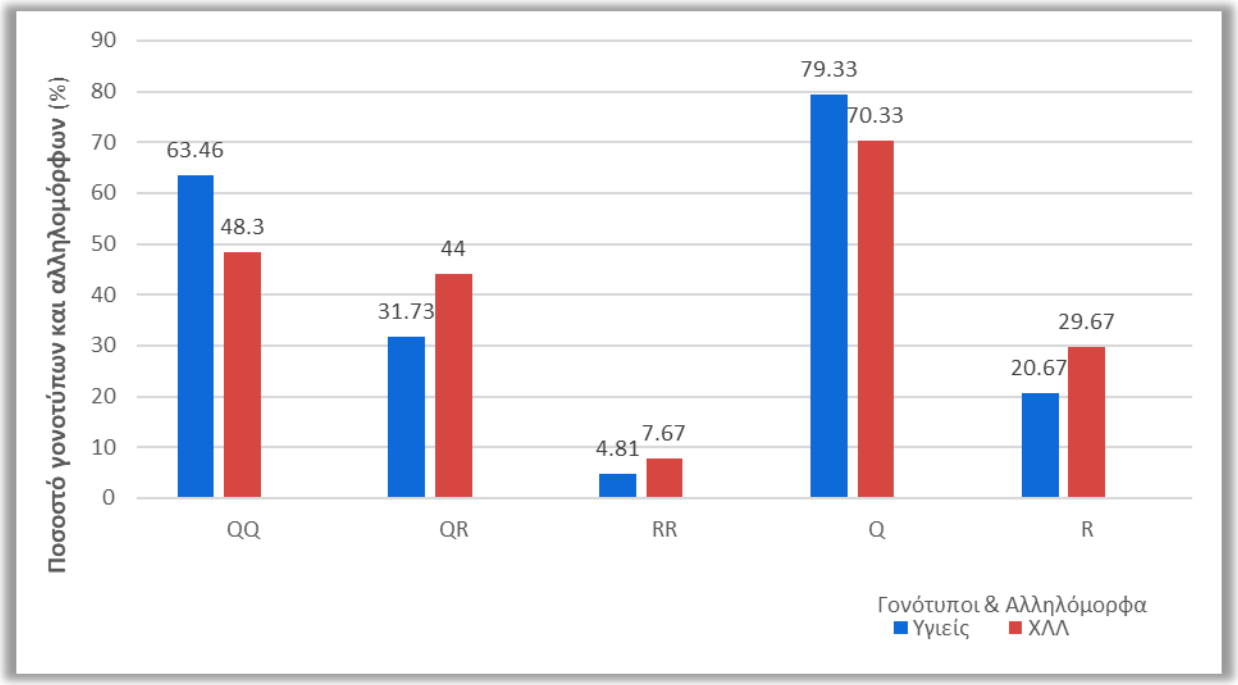
Συγκρίνοντας την κάθε καρυοτυπική υποομάδα ασθενών μαζί με τα αποτελέσματα των υγιών δοτών προέκυψαν ενδιαφέρον συσχετίσεις. Συγκεκριμένα, στατιστικά ψηλότερη συχνότητα εμφάνισης των μεταλλαγμένων γονοτύπων και αλληλομόρφων παρατηρείται στην ομάδα των ασθενών με παθολογικό καρυότυπο σε σχέση με την ομάδα των μαρτύρων (p=0.046 και p=0.019 αντίστοιχα) (Πίνακας Β4). Παρόμοιο αποτέλεσμα παρουσιάστηκε στους ασθενείς κάποιον συγκεκριμένων καρυοτυπικών υποσυνόλων, συγκρίνοντας τα με το σύνολο των υγιών δοτών. Αναλυτικά, η κατανομή των γονοτυπικών αποτελεσμάτων στην ομάδα των ασθενών που έφεραν abn14q32 και del(6q) σε σχέση με τους μάρτυρες βρέθηκε στατιστικά σημαντική (p=0.030 και p=0.021 αντίστοιχα), λόγο της αυξημένης παρουσίας ετεροζυγοτών (QR) και ομοζυγότων για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο (RR) (Πίνακας Γ4). Επιπλέον, στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα αποτέλεσε η αυξημένη συχνότητα για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο που βρέθηκε στην υποομάδα των ασθενών με del(11q) σε σχέση με τους μάρτυρες, (p=0.035) (Πίνακας Γ4).Επιπροσθέτως, όταν συγκρίναμε τους ασθενείς που παρουσίασαν τουλάχιστον ένα μεταλλαγμένο αλληλόμορφο (QR+RR γονότυποι) με τους μάρτυρες, η συσχέτιση σε κάποιες συγκεκριμένες καρυοτυπικές υποομάδες έδωσε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα.

Συγκεκριμένα, στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα παρουσιάστηκε όταν συγκρίθηκε η συχνότητα των QR+RR γονοτύπων στους ασθενείς με φυσιολογικό καρυότυπο (p=0.023) καθώς και στους ασθενείς με παθολογικό καρυότυπο (p=0.014,) σε σχέση με τους υγιείς δότες. Παρόμοιο στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα παρατηρήθηκε και στους ασθενείς που έφεραν την αλλοίωση abn14q32 (p=0.011) αλλά και σε αυτούς με del(6q) στον καρυότυπο τους (p=0.015) (Πίνακας Γ4).

Αντίθετα, η μελέτη που έγινε κατατάσσοντας τους ασθενείς σε σχέση με τον τύπο της κυτταρογενετικής αλλοίωσης (αριθμητικές/δομικές αλλοιώσεις) αλλά και με βάση την πολυπλοκότητα των καρυοτύπων (μοναδική αλλοίωση, δύο αλλοιώσεις και σύνθετοι/complex καρυότυποι) παράλληλα με την κατανομή των συχνοτήτων γονοτύπων και των αλληλομόρφων για τον πολυμορφισμό PON1 Q192R, δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικά τα αποτελέσματα.

rs662 (Q192R)													
		Genotype					Allele				Genotypes with at least one mutant allele		
		QR	QQ	RR			Q	R			QR + RR		
	n	n (%)	n (%)	n (%)	*P-Value*	*P-Value**	n (%)	n (%)	*P-Value*	*P-Value**	n (%)	*P-Value*	*P-Value**
Controls	104	33 (31.73)	66 (63.5)	5 (4.81)			165 (79.33)	43 (20.67)			38 (36.5)		
Cytogenetic findings													
Normal Karyotype	118	52 (44.1)	57 (48.3)	9 (7.6)		0.075	166 (70.3)	70 (29.7)		0.030	61 (51.7)		0.023
Abnormal Karyotype	182	80 (43.9)	88 (48.4)	14 (7.7)	1.000	0.046	256 (70.3)	108 (29.7)	0.998	0.019	94 (51.7)	0.954	0.014
Trisomy 12	56	24 (42.9)	29 (51.8)	3 (5.4)	0.716	0.346	82 (73.2)	30 (26.9)	0.459	0.214	27 (48.2)	0.518	0.151
del(17p)/p53	24	8 (33.3)	14 (58.3)	2 (8.3)	0.541	0.763	36 (75)	12 (25)	0.461	0.511	10 (41.7)	0.307	0.640
del(13q)	61	23 (37.7)	32 (52.5)	6 (9.8)	0.489	0.266	87 (71.3)	35 (28.7)	0.461	0.098	29 (47.5)	0.470	0.165
del(11q)/ATM	40	14 (35)	20 (50)	6 (15)	0.060	0.086	54 (67.5)	26 (32.5)	0.551	0.035	20 (50)	0.710	0.140
abn(14q32)	21	13 (55.6)	7 (38.9)	1 (5.6)	0.229	0.030	72 (82.8)	15 (17.2)	0.006	0.499	14 (66.7)	0.154	**0.011**
del(6q)	9	7 (77.78)	2 (22.22)	0 (0)	0.109	0.021	11 (61.1)	7 (38.9)	0.425	0.074	7 (77.8)	0.111	**0.015**
abn(8)	12	4 (33.33)	6 (50)	2 (16.66)	0.438	0.243	16 (66.7)	8 (33.3)	0.688	0.156	6 (50)	0.906	0.363
Other abnormal Karyotypes	22	11(50)	11(50)	0 (0)	0.363	0.189	33 (75)	11 (25)	0.481	0.525	11 (50)	0.811	0.239

Πίνακας Γ4: Συσχέτιση κυτταρογενετικών αποτελεσμάτων μεταξύ όλων των ΧΛΛ ασθενών μαζί με τα αποτελέσματα του πολυμορφισμού Q/R192 του γονιδίου PON1. rs662 (Q192R) από την αντικατάσταση της γλουταμίνης (Q γονότυπος) στη θέση 192 του γονιδίου PON1 με αργινίνη (R γονότυπος). Ο πιο συχνός γονότυπος είναι ο ομόζυγος QQ, ακολουθεί ο ετερόζυγος QR και πιο σπάνιος ο γονότυπος RR. P-Value σύγκριση κάθε συγκεκριμένης καρυοτυπικής υποομάδας με το σύνολο των υπολοίπων ασθενών με ΧΛΛ. P-Value* σύγκριση κάθε συγκεκριμένης καρυοτυπικής υποομάδας των ΧΛΛ ασθενών με την ομάδα των υγιών δοτών.



Εικόνα Γ2: Συσχέτιση αποτελεσμάτων για τον πολυμορφισμό Q192R του γονιδίου PON1 μεταξύ ασθενών με ΧΛΛ και μαρτύρων. Η κατανομή των γονοτύπων έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ασθενών και υγιών δοτών (p=0.028). Η συχνότητα του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου R βρέθηκε στατιστικά σημαντικά αυξημένη στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς (29.67% vs 20.67%, p=0.012).

Αποτελέσματα πολυμορφισμού PON1 L55M

Η μελέτη του πολυμορφισμού PON1 L55M ήταν επιτυχείς σε όλους τους 181 επιλεγμένους ΧΛΛ ασθενείς (100%) και στους 105/106 μάρτυρες (99,1%). Η συχνότητα των γονοτύπων και των αλληλομόρφων μεταξύ ασθενών και υγιών δοτών παρουσιάζονται στον Πίνακα Γ3. Τα αποτελέσματα αυτά δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ ασθενών και μαρτύρων (p=0.747). Επιπλέον, καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν βρέθηκε συσχετίζοντας την συχνότητα εμφάνισης των αλληλομόρφων (M και L) μεταξύ των ασθενών με ΧΛΛ και την ομάδα των υγιών δοτών (p=0.834, OR [95% CI] = 1.065 [0.814-1.326]).

Στον Πίνακα Γ5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την κατάταξη των ασθενών με βάση τα κυτταρογενετικά τους ευρήματα και τα αποτελέσματα από την γονοτυπική ανάλυση για τον πολυμορφισμό PON1 L55M. Η συχνότητα γονοτύπων και αλληλομόρφων μεταξύ των καρυοτυπικών ομάδων των ασθενών με φυσιολογικό και παθολογικό καρυότυπο και μεταξύ του κάθε καρυοτυπικού υποσυνόλου με την ομάδα των υπολοίπων ΧΛΛ ασθενών, δεν έφτασαν το στατιστικά σημαντικό επίπεδο. Η κατάταξη των ασθενών με βάση τα γονοτυπικά αποτελέσματα για τον πολυμορφισμό L55M του γονιδίου PON1 και τον τύπος των χρωμοσωμικών αλλοιώσεων (αριθμητικών και δομικών αλλοιώσεων) ή βάση της πολυπλοκότητας των καρυοτύπων (μοναδική αλλοίωση, δύο αλλοιώσεις και σύνθετοι/complex καρυότυποι), επίσης δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα.

rs854560 (L55M)													
		Genotype					Allele				Genotypes with at least one mutant allele		
		ML	LL	MM			L	M			ML + MM		
	n	n (%)	n (%)	n (%)	*P-Value*	*P-Value**	n (%)	n (%)	*P-Value*	*P-Value**	n (%)	*P-Value*	*P-Value**
Controls	105	53 (50.5)	52 (49.5)	0 (0)			158 (75.2)	52 (24.8)			53 (50.5)		
Cytogenetic findings													
Normal Karyotype	37	19 (51.4)	18 (48.6)	0 (0)		0.927*	55 (74.3)	19 (25.7)		0.876	19 (51.4)		0.927
Abnormal Karyotype	144	69 (47.9)	74 (51.4)	1 (0.7)	0.830	0.653	217 (75.7)	71 (24.7)	0.856	0.978	70 (48.6)	0.766	0.771
Trisomy 12	41	16 (39.02)	25 (60.98)	0 (0)	0.306	0.213*	66 (80.5)	16 (19.5)	0.203	0.340	16 (39.02)	0.139	0.253
del(17p)/p53	24	16 (66.7)	8 (33.3)	0 (0)	0.159	0.729*	32 (66.7)	16 (33.3)	0.145	0.224	16 (66.7)	0.066	0.129
del(13q)	54	26 (48.2)	27 (50)	1 (1.8)	0.306	0.371	80 (74.1)	28 (25.9)	0.760	0.821	27 (50)	0.884	0.955
del(11q)/ATM	38	18 (47.4)	20 (52.6)	0 (0)	0.856	0.743*	58 (76.3)	18 (23.7)	0.789	0.851	18 (47.4)	0.803	0.820
abn(14q32)	21	9 (42.9)	12 (57.1)	0 (0)	0.787	0.524*	33 (78.6)	9 (21.4)	0.584	0.645	9 (42.9)	0.538	0.577
del(6q)	9	3 (33.33)	6 (66.67)	0 (0)	0.552	0.324*	15 (83.3)	3 (16.7)	0.409	0.441	3 (33.3)	0.330	0.351
abn(8)	13	7 (53.8)	6 (46.2)	0 (0)	0.932	0.819*	19 (73.1)	7 (26.9)	0.801	0.810	7 (53.8)	0.726	0.769
Other abnormal Karyotypes	10	4 (40)	6 (60)	0 (0)	0.764	0.527*	16 (80)	4 (20)	0.605	0.635	4 (40)	0.515	0.565

Πίνακας Γ5: Συσχέτιση κυτταρογενετικών αποτελεσμάτων μεταξύ όλων των ΧΛΛ ασθενών μαζί με τα αποτελέσματα του πολυμορφισμού M/L55 του γονιδίου PON1. **rs854560 (L55M)** από την αντικατάσταση της λευκίνης (L γονότυπος) στη θέση 192 του γονιδίου PON1 με μεθυονίνη (M γονότυπος). Ο πιο συχνός γονότυπος είναι ο ομόζυγος LL, ακολουθεί ο ετερόζυγος ML και πιο σπάνιος ο γονότυπος MM. P-Value σύγκριση κάθε συγκεκριμένης καρυοτυπικής υποομάδας με το σύνολο των υπολοίπων ασθενών με ΧΛΛ. P-Value* σύγκριση κάθε συγκεκριμένης καρυοτυπικής υποομάδας των ΧΛΛ ασθενών με την ομάδα των υγιών δοτών. Τα αποτελέσματα με * παρουσιάζουν την συσχέτιση μεταξύ των γονοτύπων ML και LL καθώς ο γονότυπος MM απουσίαζε και στις δύο ομάδες.

Αποτελέσματα συνδυαστικής μελέτης και των δύο πολυμορφισμών του γονιδίου PON1, Q192R & L55M

Για να συγκρίνουμε τα αποτελέσματα από την εμφάνιση και των δύο πολυμορφισμών του γονιδίου PON1, εξετάσαμε ταυτόχρονα την συχνότητα των γονοτύπων και αλληλομόρφων των δύο πολυμορφισμών, PON1 Q192R και PON1 L55M, σε 180 ασθενείς με ΧΛΛ (αυτούς που είχαμε παράλληλα αποτελέσματα για τους δύο πολυμορφισμούς Q192R & L55M) μαζί με 103 υγιείς δότες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα Γ6.

Στην ομάδα των μαρτύρων, η συχνότητα εμφάνισης φυσιολογικών γονοτύπων και για τους δύο πολυμορφισμούς (QQ\LL) βρέθηκε αυξημένη (32.1%) σε σχέση με την ομάδα των ασθενών (16.7%), υποδεικνύοντας πως η παρουσία τουλάχιστον ενός μεταλλαγμένου αλληλομόρφου είναι στατιστικά σημαντικά αυξημένη στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς (x2=.8.95, df=1, p=0.003).

Η παράλληλη συσχέτιση της κατανομής των γονοτύπων και των αλληλομόρφων και των δύο πολυμορφισμών μαζί με τα κυτταρογενετικά ευρήματα των ΧΛΛ ασθενών έδειξε παρόμοια αποτελέσματα μεταξύ των ασθενών με παθολογικό και φυσιολογικό καρυότυπο (p=0.117). Αυξημένη συχνότητα έδειξαν οι ασθενείς με τουλάχιστον ένα μεταλλαγμένο γονότυπο και φυσιολογικό καρυότυπο (91,9%), αλλά και οι ασθενείς με abn(14q32) (86.4%) σε σχέση με τους υπόλοιπους ασθενείς με ΧΛΛ.

PON1 polymorphisms *Q192R\ L55M*	**a. QQ\LL n (%)**	**b. QQ\ML+MM n (%)**	**c. QR+RR\LL n (%)**	**d. QR+RR\ML+MM n (%)**	***p-Value***	**e (At least one mutation) n (%)**	****p-Value (between column a and e)***
CLL (n=180)	30 (16.7)	55 (30.6)	61 (33.9)	34 (18.9)	p=0.006, x2=.12.5, df=3	150 (83.3)	p=0.003, x2=.8.95, df=1
Controls (n=103)	33 (32.1)	32 (31.1)	19 (18.4)	19 (18.4)		70 (67.9)	

Πίνακας Γ6: Αποτελέσματα της συνδυαστικής μελέτης και των δύο πολυμορφισμών του γονιδίου PON1, L55M και Q192R, σε ασθενείς με CLL (n = 180) και με την ομάδα ελέγχου (n = 103). Στατιστικά σημαντικά αυξημένη η παρουσία τουλάχιστον ενός μεταλλαγμένου γονοτύπου στους ΧΛΛ ασθενείς σε σχέση με τα control (p=0.003).

.

Γ3. Μελέτη μεθυλίωσης υποκινητών γονιδίων

Για την διερεύνηση της παθογένεσης της ΧΛΛ έγινε έλεγχος της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου RAD21. Αναλύθηκαν 105 δείγματα μυελού των οστών από ενήλικες ασθενείς με ΧΛΛ, 58 άντρες (58/105, 55,2%) και 47 γυναίκες (47/105, 44,8%). Η μέση ηλικία διάγνωσης ήταν 63 χρόνια (εύρος 40-86 έτη). Η ομάδα των υγιών δοτών που συμμετείχαν περιλαμβάνει 17 δείγματα εκ των οποίων 9 άντρες (9/17, 52,9%) και 8 γυναίκες (8/17, 47,1%) με μέση ηλικία 50.47 έτη (εύρος 36-92 έτη). Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές συγκρίνοντας την ηλικία και το φύλο μεταξύ ασθενών και υγιών ατόμων, ($p > 0,05$).

n	**Φύλο** ♂ / ♀		**Αναλογία φύλου**	**Μέση ηλικία (έτη)**	**Εύρος ηλικίας**
ΧΛΛ=105	58	47	1.23	63	40-86
Control=17	9	8	1.25	50.47	36-92

Πίνακας Γ7: Χαρακτηριστικά ΧΛΛ ασθενών και μαρτύρων

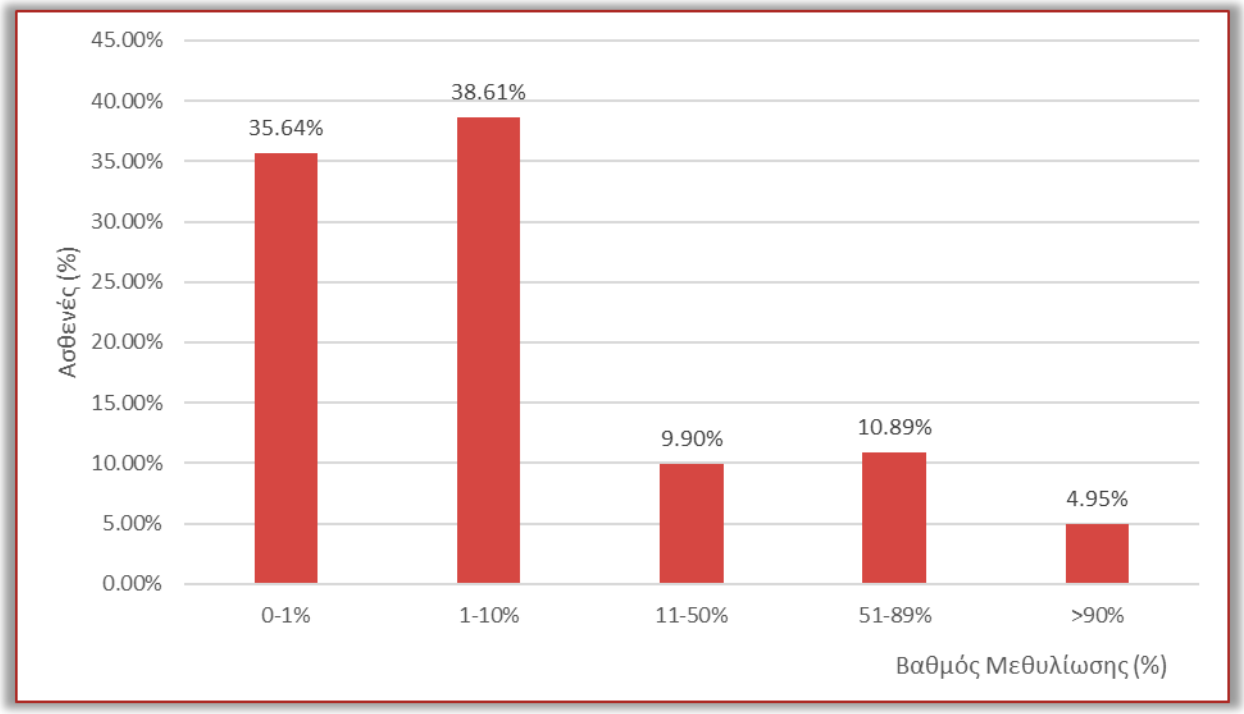
Μεταξύ των 105 επιλεγμένων ΧΛΛ ασθενών, 21/105 (20%) άτομα είχαν φυσιολογικό καρυότυπο (επιβεβαιωμένο και με FISH) και 84/105 (80%) άτομα παθολογικό καρυότυπο (παρουσιάζοντας τουλάχιστον μία χαρακτηριστική αλλοίωση για την ΧΛΛ). Συγκεκριμένα μεταξύ των 84 ασθενών με παθολογικό καρυότυπο 33 ασθενείς έφεραν del(13q), 19 τρισωμία 12, 17 ασθενείς del(11q), 16 del(17p), 15 ασθενείς αλλοιώσεις της περιοχής 14q32 [abn(14q32)], 12 ασθενείς αλλοιώσεις του χρωμοσώματος 8 [abn(8)] και 11 ασθενείς παρουσίασαν del(6q) (Πίνακας Γ8).

Αποτελέσματα μεθυλίωσης του γονιδίου RAD21

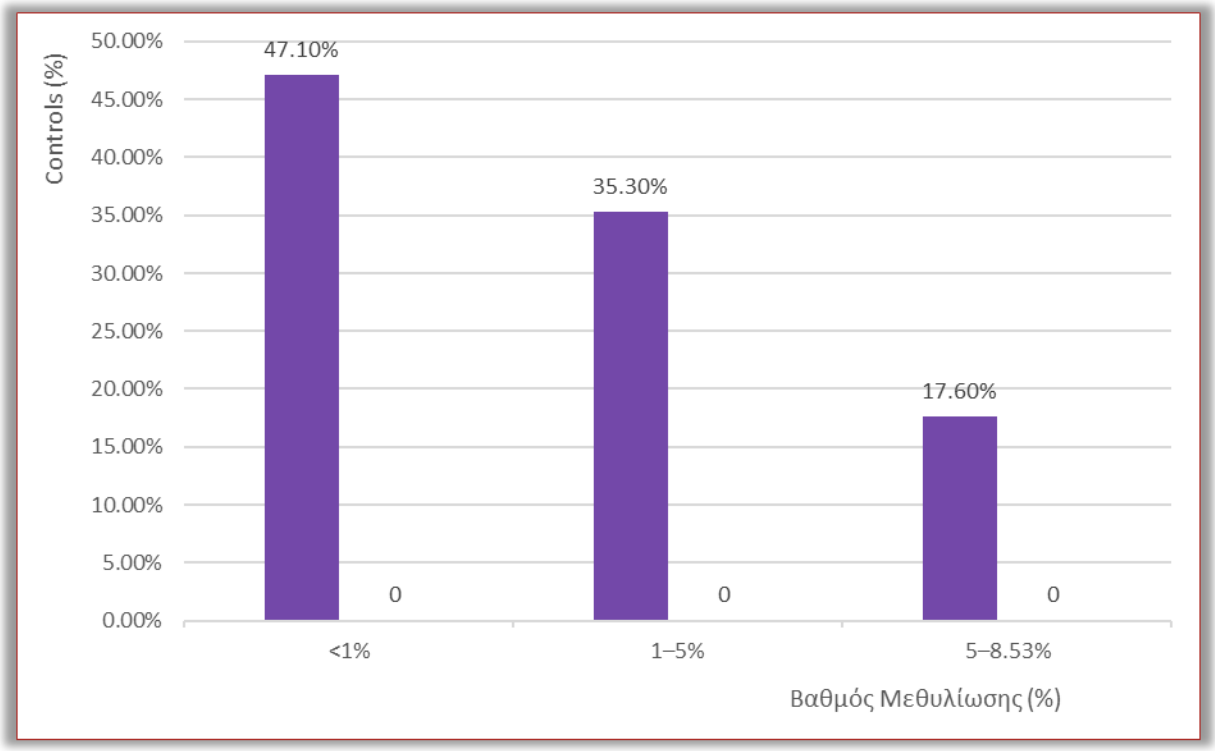
Η μελέτη της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου RAD21 ήταν επιτυχής στο 96% των ασθενών (101/105 ασθενείς) και στο 100% των υγειών δοτών (17/17).

Κανένας από τους υγιείς δότες δεν βρέθηκε με μεθυλίωση στον υποκινητή του RAD21. Αντίθετα, 25.74% των ασθενών (26/101) παρουσίασαν μεθυλίωση στις νησίδες CpG του υποκινητή του γονιδίου RAD21 σε ποσοστό >10% των αναλυθέντων κυττάρων (ορίστηκαν ως μεθυλιωμένοι) αποτέλεσμα στατιστικά σημαντικό σε σύγκριση με τα αποτελέσματα στους υγιείς δότες ($p=0.022$). Το ποσοστό μεθυλίωσης του RAD21 βρέθηκε να ποικίλει μεταξύ των ασθενών. Συγκεκριμένα, 35.64% των ασθενών (36/101) παρουσίασαν βαθμό μεθυλίωσης 0-1% των αναλυθέντων κυττάρων, 38.61% των ασθενών (39/101) ποσοστό 1-10%, 9.9% των ασθενών (10/101) στο 11-50% των αναλυθέντων κυττάρων, 10.89% των ασθενών (11/101) 51-89% και υψηλό βαθμό μεθυλίωσης (>90% των αναλυθέντων κυττάρων) βρέθηκε στο 4.95% των ασθενών με ΧΛΛ (5/101). Αυτή η διαφορά στο ποσοστό μεθυλίωσης μπορεί να οφείλεται στο

διαφορετικό ποσοστό των ΧΛΛ κυττάρων που περιείχε το δείγμα του ΜΟ των ασθενών, στην ετερογένεια της νόσου ή στο διαφορετικό στάδιο που βρίσκεται ο κάθε ασθενής, Η εξέλιξη της κατάστασης μεθυλίωσης για κάθε ασθενή παράλληλα με την εξέλιξη της νόσου είναι ένα ενδιαφέρον θέμα για περαιτέρω έρευνα, σε εκείνες τις περιπτώσεις ασθενών όπου είναι διαθέσιμα τα κλινικά στοιχεία τους κατά τη διάρκεια της νόσου (follow up).



Εικόνα Γ3: Κατανομή του βαθμού μεθυλίωσης του RAD21 στους ασθενείς με ΧΛΛ

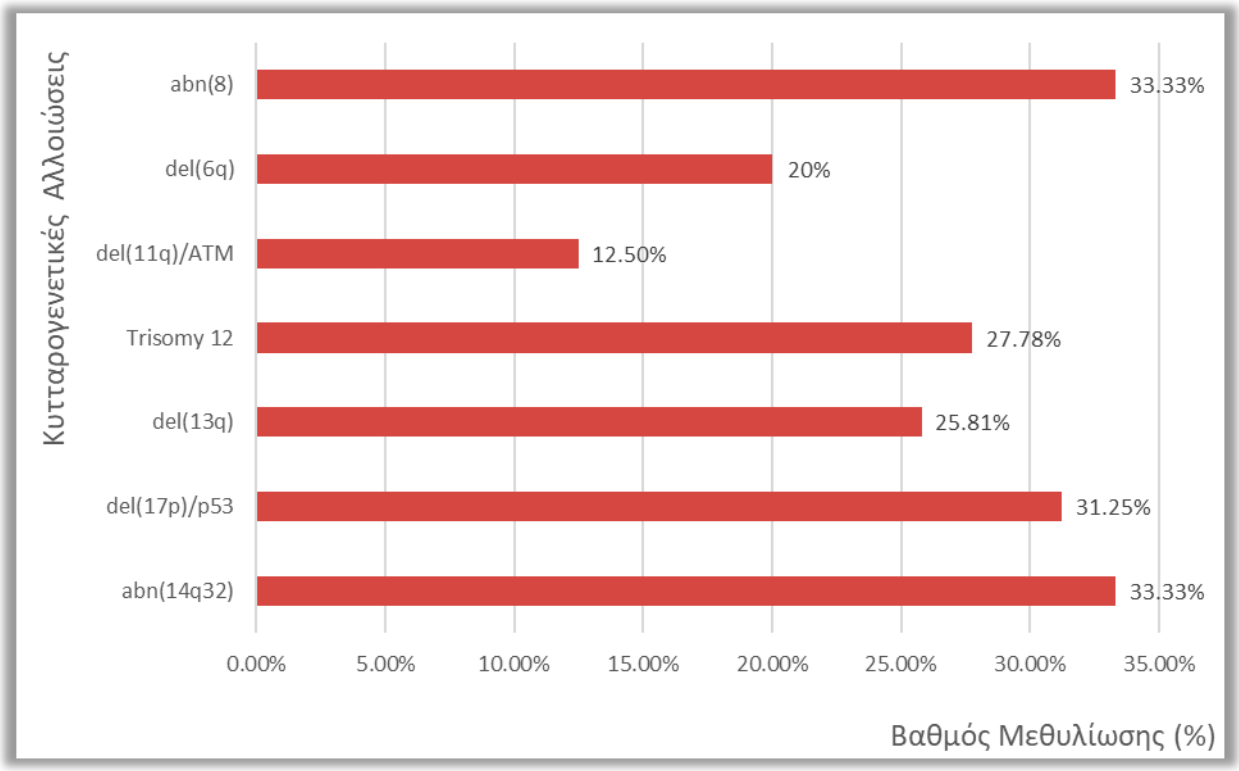


Εικόνα Γ5: Κατανομή του βαθμού μεθυλίωσης του RAD21 στους υγιείς δότες.

Ταξινομώντας τους ασθενείς με βάση το φύλο παρατηρήθηκε ότι το 22.41% των αντρών και 27.66% των γυναικών παρουσίασαν μεθυλίωση στον υποκινητή του RAD21 (p=0.790). Η μέση ηλικία των ασθενών με μεθυλίωση στο RAD21 βρέθηκε χαμηλότερη (59.31±12.46 έτη) σε σχέση με τους ασθενείς χωρίς μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου RAD21 (65.63±9.74 έτη) (p=0.252). Το γεγονός ότι οι ασθενείς με μεθυλίωση και χωρίς μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου RAD21 έχουν ίδια μέση ηλικία ,υποστηρίζει πως η μεθυλίωση του γονιδίου πιθανό να οφείλεται στην παθογένεση της νόσου και όχι στην προχωρημένη τους ηλικία. Η παρούσα διατριβή αποτελεί την πρώτη μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου RAD21 στη ΧΛΛ. Επιπλέον, στην συγκεκριμένη μελέτη οι χαρακτηριστικές κυτταρογενετικές αλλοιώσεις για την νόσο συγκρίνονται με την κατάσταση μεθυλίωσης του γονιδίου RAD21 σε ασθενείς με ΧΛΛ. Αυτή η συσχέτιση έγινε για να διερευνηθεί η πιθανή εμπλοκή της μεθυλίωσης του γονιδίου RAD21 με τον σχηματισμό συγκεκριμένων χρωμοσωμικών αλλοιώσεων, δεδομένου του ρόλου των χρωμοσωμικών αλλοιώσεων στην παθογένεση της νόσου και του ρόλου του RAD21 στον διαχωρισμό χρωμοσωμάτων και στην επιδιόρθωση του DNA. Η ταξινόμηση των ασθενών με βάση τα κυτταρογενετικά τους ευρήματα έδειξε όμοια αποτελέσματα στη συχνότητα εμφάνισης της μεθυλίωσης μεταξύ των επιμέρους κυτταρογενετικών υποομάδων. Συγκεκριμένα, μεθυλίωση παρατηρήθηκε στο 28.57% των ασθενών (6/21) με φυσιολογικό καρυότυπο και στο 25% των ασθενών (20/80) με παθολογικό καρυότυπο. Με βάση την πολυπλοκότητα του καρυοτύπου, μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου RAD21 παρατηρήθηκε στο 18.18% των ασθενών με μία αλλοίωση, στο 26.09% των ασθενών με δύο αλλοιώσεις στον καρυότυπο τους και στο 25.71% των ασθενών με σύνθετο/complex καρυότυπο (Πίνακας Γ8).

Στον πίνακα Γ8 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του βαθμού μεθυλίωσης στην κάθε ξεχωριστή υποομάδα ασθενών με συγκεκριμένη χρωμοσωμική αλλοίωση χωρίς όμως οι

διαφορές αυτές να είναι στατιστικά σημαντικές (p>0.005). Εν συντομία, μια σχετικά αυξημένη συχνότητα μεθυλίωσης παρατηρείται στους ασθενείς με abn(14q32), abn(8) και del(17p), ενώ η υποομάδα ασθενών με del(11q) παρουσίασε την χαμηλότερη συχνότητα μεθυλίωσης. Περαιτέρω κατάταξη των ασθενών με βάση τον τύπο των αλλοιώσεων που έφεραν, έδειξε πως 22.73% των ασθενών με αριθμητικές αλλοιώσεις (10/44), 25.97% των ασθενών με δομικές αλλοιώσεις (20/77) και 25% των ασθενών που φέρουν και αριθμητικές και δομικές αλλοιώσεις (10/40) παρουσιάζουν και μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου RAD21.



Εικόνα Γ6: Διαγραμματικά τα αποτελέσματα της συσχέτισης της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου RAD21 σε σχέση με τα καρυοτυπικά ευρήματα των ασθενών με ΧΛΛ.

	n	Μεθυλιωση Rad21 % (n)	Μη μεθυλίωση Rad21 % (n)	p-Value
Όλοι οι ασθενείς	101	25.74% (26/101)	74.26% (75/101)	0.022
Μάρτυρες	17	0% (0/17)	100% (17/17)	
Κυτταρογενετικά ευρήματα ασθενών με ΧΛΛ				
Φυσιολογικός καρυότυπος	21	28.57% (6/21)	71.43% (15/21)	0.739
Παθολογικός καρυότυπος	80	25% (20/80)	75% (60/80)	
abn(14q32)	15	33.33% (5/15)	66.67% (10/15)	0.408
del(17p)/*p53*	16	31.25% (5/16)	68.75% (11/16)	0.519
del(13q)	31	25.81% (8/31)	74.19% (23/31)	0.895
Trisomy 12	18	27.78% (5/18)	72.22% (13/18)	0.757
del(11q)/*ATM*	16	12.5% (2/16)	87.5% (14/16)	0.197
del(6q)	10	20% (2/10)	80% (8/10)	0.696
abn(8)	12	33.33% (4/12)	66.67% (8/12)	0.470
Περιπλοκότητα καρυοτύπου				
Μοναδική αλλοίωση	22	18.18% (4/22)	81.81% (18/22)	0.771
Δύο αλλοιώσεις	23	26.09% (6/23)	73.91% (17/23)	
Σύνθετος καρυότυπος	35	25.71% (9/35)	74.29% (26/35)	
Είδος της αλλοίωσης				
Αριθμητικές αλλοιώσεις	4	0% (0/4)	100% (4/4)	
Δομικές αλλοιώσεις	36	27.8% (10/36)	72.2% (26/36)	
Αριθμητικές & Δομικές	40	25% (10/40)	75% (30/40)	

Πίνακας Γ8: Αποτελέσματα μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου RAD21 σε σχέση με τα καρυοτυπικά ευρήματα των ασθενών με ΧΛΛ

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Δ1. Γονοτυπική Ανάλυση πολυμορφισμών, Q192R και L55M, του γονιδίου PON1

Αρκετές μελέτες υποδεικνύουν ότι η γενετική προδιάθεση που μπορεί να οφείλεται σε κληρονομούμενες μικρές γενετικές παραλλαγές ή μεταλλάξεις του ανθρώπινου γονιδιώματος με ταυτόχρονη έκθεση σε περιβαλλοντικούς γονοτοξικούς παράγοντες μπορεί να διαδραματίσει κεντρικό ρόλο στην παθογενετική πορεία ανάπτυξης της ΧΛΛ [Bolufer Pet al. 2006; Brown JR et al. 2013; Cerhan JR & Slager SL 2015; Benavente Y et al. 2018]. Με το πέρασμα του χρόνου γίνεται συσσώρευση τοξικών μεταβολιτών στον οργανισμό, ως αποτέλεσμα μη αποτελεσματικής αποτοξίνωσης, μη αποτελεσματικών αμυντικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών ή ελαττωματικού μηχανισμού επιδιόρθωσης του DNA [Karakosta M et al. 2016]. Για να εξετάσουμε αυτή η υπόθεση, μελετήσαμε τους πολυμορφισμούς Q192R και L55M του γονιδίου PON1, το οποίο εμπλέκεται σε αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, σε μια μεγάλη ομάδα ασθενών (n=300), διερευνώντας τη πιθανή συμβολή των πολυμορφισμών αυτών στην ανάπτυξη της νόσου και στο σχηματισμό των χαρακτηριστικών χρωμοσωμικών αλλοιώσεων της ΧΛΛ.

Όσον αφορά τον πολυμορφισμό PON1 Q192R, η συχνότητα των ομοζυγώτων (RR) και των ετεροζυγώτων (QR) για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο ήταν σημαντικά αυξημένη στην ομάδα των ασθενών σε σύγκριση με την ομάδα των υγειών μαρτύρων. Αυτό υποδεικνύει ότι τα άτομα με πολυμορφισμό PON1 Q192R είναι πιθανώς πιο ευάλωτα στην ανάπτυξη της νόσου. Το αποτέλεσμα αυτό υποστηρίζεται και από την αυξημένη συχνότητα του μεταλλαγμένου R αλληλομόρφου στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς δότες (p=0.012). Αυτά τα αποτελέσματά, είναι σύμφωνα με τη μόνη σχετική μελέτη που έχει έως τώρα δημοσιευθεί στη διεθνή βιβλιογραφία, στην οποία διερευνήθηκαν οι δύο πολυμορφισμοί του γονιδίου PON1 σε 60 ασθενείς με ΧΛΛ [Tomatir et al. 2015] όπου η συχνότητα τόσο του μεταλλαγμένου γονότυπου RR όσο και του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου R ήταν επίσης στατιστικώς σημαντικά αυξημένη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου [Tomatir et al. 2015]. Επιπροσθέτως, θετικές συσχετίσεις αυτού του πολυμορφισμού έχουν βρεθεί και σε άλλες κακοήθειες σχετικές με τη ΧΛΛ, όπως οι λεμφοαιματοποιητικοί καρκίνοι και τα λεμφώματα [Kokouva M et al. 2012; Kerridge I et al. 2002]. Ο μεταλλαγμένος γονότυπος RR του πολυμορφισμού Q192R έχει συσχετιστεί με τον κίνδυνο λεμφώματος και σε μια άλλη μελέτη, όπου φαίνεται να συνδέεται ιδιαίτερα με το θυλακοειδές λέμφωμα (FL) και το διάχυτο από μεγάλα Β-κύτταρα λέμφωμα, [Conesa-Zamora P et al. 2013]. Αυτή είναι μια πολύ ενδιαφέρουσα παρατήρηση, καθώς τόσο το FL όσο και το DLBCL σύμφωνα με την Ταξινόμηση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας 2016 (ΠΟΥ)

ανήκουν στην ίδια αιματολογική ομάδα με την ΧΛΛ, στις "Χρόνιες Λεμφοϋπερπλαστικές Παθήσεις" όπου μπορεί να υπάρχει ένας κοινός παθογενετικούς μηχανισμός.

Επιπλέον, στην τρέχουσα διατριβή συσχετίστηκαν για πρώτη φορά, η συχνότητα των γονότυπων και των αλληλομόρφων για τον πολυμορφισμό Q192R με τα κυτταρογενετικά ευρήματα ασθενών με ΧΛΛ. Αυτή η συσχέτιση αποκάλυψε μια σημαντικά αυξημένη συχνότητα των μεταλλαγμένων γονοτύπων στους ασθενείς με παθολογικούς καρυότυπους και πιο συγκεκριμένα στους ασθενείς με τις αλλοιώσεις abn(14q32) και del(6q), υποδεικνύοντας πως ο πολυμορφισμός PON1 Q192R πιθανό να εμπλέκεται στο σχηματισμό ειδικών για τη ΧΛΛ χρωμοσωμικών αλλοιώσεων. Αυτό το εύρημα αξίζει περαιτέρω διερεύνηση αφού σε προηγούμενη μελέτη έχει αναφερθεί ότι, σε ασθενείς με ΧΛΛ τα Β-κύτταρα που φέρουν ορισμένες κυτταρογενετικές αλλοιώσεις όπως είναι οι del(17p) και del(11q) είναι πιο ευάλωτα σε βλάβες που προκλήθηκαν από ROS.

Σχετικά με τον πολυμορφισμό PON1 L55M, οι κατανομές της συχνότητας γονότυπων και αλληλόμορφων μεταξύ ασθενών και υγιών μαρτύρων δεν διέφεραν σημαντικά, υποδεικνύοντας ότι ο πολυμορφισμός PON1 L55M δεν προσδίδει γενετική προδιάθεση στην νόσο. Τα αποτελέσματά μας είναι αντίθετα με αυτά των Tomatir et al. οι οποίοι αναφέρουν αυξημένη τη συχνότητα των ομόζυγων MM γονότυπων σε ασθενείς με ΧΛΛ σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Η διαφορά αυτή πιθανό να οφείλετε στον μικρό αριθμό ασθενών με ΧΛΛ που συμμετείχαν στην εν λόγω μελέτη (60 ασθενείς) [Tomatir et al. 2015]. Επιπλέον, ο πολυμορφισμός M55L δεν συνδέθηκε ποτέ θετικά με άλλες αιματολογικές κακοήθειες, όμως έχει εξεταστεί ως πιθανός παράγοντας προδιάθεσης σε άλλους τύπους κακοηθειών, όπως είναι ο καρκίνος του μαστού [Deroo LA et al. 2014; Conesa Zamora P et al. 2013; Hu p. et al 2017]. Επίσης, ταξινομώντας τους ασθενείς σύμφωνα με τα κυτταρογενετικά τους ευρήματα παράλληλα με τα γονοτυπικά αποτελέσματα για τον πολυμορφισμό M55L, δεν παρουσιάστηκε θετική συσχέτιση ως προς κάποια συγκεκριμένη χρωμοσωμική αλλοίωση.

Σήμερα, είναι ευρέως αποδεκτό ότι γενετικές παραλλαγές στο ανθρώπινο γονιδίωμα, οι οποίες επηρεάζουν την αποτοξίνωση των κυττάρων ή την επιδιόρθωση του DNA, μπορούν να συμβάλλουν στη γενετική προδιάθεση της ΧΛΛ [Haferlach C et al. 2010; Puente XS et al. 2011; Rossi D et al. 2013; Collado R et al. 2014; Ghamlouch H et al. 2017]. Γνωρίζουμε επίσης ότι ο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου αυξάνεται με την ηλικία ενώ παράλληλα με την προχωρημένη ηλικία μειώνεται η αντιοξειδωτική ικανότητα του ανθρώπινου οργανισμού. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι ασθενείς ≥65 ετών με ΧΛΛ και NHL παρουσιάζουν αυξημένη τοξικότητα σε σχέση με νεότερους ασθενείς μετά από τη λήψη χημειοθεραπείας, λόγω μειωμένης αντιοξειδωτικής ικανότητας του οργανισμού [Tallarico M et al 2018]. Από τα αποτελέσματά μας

και με βάση τα παραπάνω καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι, ο πολυμορφισμός Q192R του αντιοξειδωτικού γονιδίου PON1 ο οποίος έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της αντιοξειδωτικής δράσης του παραγόμενου ενζύμου και τη συσσώρευση γονοτοξικών ενώσεων στον οργανισμό με την πάροδο των χρόνων μπορεί να συμβάλλει στην εμφάνιση της ΧΛΛ σε προχωρημένη ηλικία, και στο σχηματισμό χρωμοσωμικών αλλοιώσεων που μετέχουν στην παθογένεση της.

Είναι γνωστό ότι η συσσώρευση των ROS προκαλεί οξειδωτικό στρες, το οποίο συμβάλλει στη γενωμική αστάθεια. Έχει επίσης υποστηριχθεί ότι τα Β-κύτταρα από ασθενείς με ΧΛΛ και δυσμενείς κυτταρογενετικές αλλοιώσεις, όπως del(17p) και del (11q), είναι ευαίσθητα σε βλάβες προκαλούμενες από συσσώρευση των ROS [Collado R et al. 2014]. Αυτή η παρατήρηση, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι οι ασθενείς με ΧΛΛ αποκτούν νέες αλλοιώσεις κατά τη διάρκεια της νόσου, δείχνουν ότι η παρουσία χρωμοσωμικών αλλοιώσεων και η αύξηση των ROS από μη αποτελεσματική αντιοξειδωτική δράση λόγω συγκεκριμένων πολυμορφισμών γονιδίων όπως το PON1 μπορεί να συμβάλλει στην επιταχυνόμενη κακοήθη εξέλιξη [Collado R et al. 2014].

Τα αποτελέσματά της παρούσας διατριβής ενισχύουν την ανάγκη στοχευμένης αντιοξειδωτικής θεραπείας που προωθεί την αποτοξίνωση, τονώνει την ανοσολογική αντίδραση και μειώνει τον αριθμό των μολυσματικών επιπλοκών της νόσου, βελτιώνοντας την ποιότητα ζωής των ασθενών. Διάφορες μελέτες έχουν ήδη καταλήξει στο συμπέρασμα ότι, η θεραπεία των παθολογικών ΧΛΛ κυττάρων με χρήση αντιοξειδωτικών σε συνδυασμό με τις υπάρχουσες θεραπευτικές στρατηγικές, θα μπορούσε να εξουδετερώσει ενδογενή συσσώρευση ROS και να προστατεύσει το ανοσοποιητικό σύστημα αυξάνοντας την επιβίωση των ασθενών. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η θεραπεία των ΧΛΛ κυττάρων με χρήση αντιοξειδωτικών σε συνδυασμό με τις υπάρχουσες θεραπευτικές στρατηγικές θα μπορούσε να εξουδετερώσει ενδογενές συσσώρευση ROS και να προστατέψει το ανοσοποιητικό σύστημα βελτιώνοντας την επιβίωση [Brune et al. 2006; Collado R et al. 2014]. Επομένως, προκειμένου να βελτιωθεί η επιβίωση των ασθενών με ΧΛΛ, ειδικά εκείνων με μειωμένη ικανότητα αποτοξίνωσης όπως ασθενείς με πολυμορφισμούς του γονιδίού PON1, θα πρέπει διερευνάται η γενετική κατάσταση τέτοιων γονίδιων. Τέτοιες στρατηγικές εφαρμόζονται επιτυχώς σε άλλες αιματολογικές κακοήθειες όπως η ΟΜΛ [Brune et al. 2006; Collado R et al. 2014].

Συμπερασματικά, η συγκεκριμένη μελέτη έδειξε ότι ο πολυμορφισμός PON1 Q192R μπορεί να εμπλέκεται στην προδιάθεση της ΧΛΛ και στον σχηματισμό ειδικών χρωμοσωμικών αλλοιώσεων.

Δ2. Μελέτη μεθυλίωσης υποκινητών του γονιδίου RAD21

Οι αποκτηθείσες γενετικές αλλοιώσεις και η διαφοροποίηση της γονιδιακής έκφρασης παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της ΧΛΛ αλλά και στην κλινική πορεία των ασθενών με ΧΛΛ. Η μεθυλίωση υποκινητών γονιδίων έχει προταθεί ότι εμπλέκεται στην παθογένεση του καρκίνου [Dubovsky JA et al 2009]. Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη μελέτη που διερευνά την κατάσταση μεθυλίωσης του γονιδίου RAD21 σε κύτταρα ΜΟ ασθενών με ΧΛΛ, που πιθανό εμπλέκεται στη γενετική ανομοιογένεια και παθογένεση της νόσου.

Με βάση τα αποτελέσματά μας, ο υποκινητής του γονιδίου RAD21 φαίνεται μεθυλιωμένος στο 25,74% των ασθενών με ΧΛΛ, καταστέλλοντας έτσι τη μεταγραφή του γονιδίου RAD21. Η παρουσία μεθυλίωσης στους ασθενείς και όχι στους υγιείς δότες είναι μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση δεδομένου του γεγονότος ότι το γονίδιο RAD21 είναι απαραίτητο για τον σωστό διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων (SCC) και την επιδιόρθωση του DNA [Rankin S et al. 2015]. Κατά συνέπεια η αποσιώπηση του γονιδίου μέσω μεθυλίωσης του υποκινητή του μπορεί να διαταράξει την λειτουργία του μηχανισμού επιδιόρθωσης του DNA και την ακεραιότητα των χρωμοσωμάτων, συμβάλλοντας στην ανάπτυξη της νόσου. Αυτό το εύρημα μπορεί να συμβάλει στην αποσαφήνιση της μοριακής βάσης της ΧΛΛ, μιας σύνθετης γενετικά νόσου. Επιπλέον, σύμφωνα με μια πρόσφατη μελέτη, η μείωση της έκφρασης του γονιδίου RAD21 ενισχύει την αυτοανανέωση των πρωτογενών αιμοποιητικών στελεχών και προγονικών κυττάρων (HSPCs) [Fisher et al. 2017]. Επομένως, η μεθυλίωση του συγκεκριμένου γονιδίου στους ασθενείς με ΧΛΛ σε συνδυασμό με τους προαναφερθέντες ρόλους του γονιδίου RAD21 μας οδηγεί να υποθέσουμε ότι η μεταγραφική αδρανοποίησή του γονιδίου μετά από τη μεθυλίωση του υποκινητή του μπορεί να ενισχύει την ανεξέλεγκτη αυτοανανέωση των κυττάρων της ΧΛΛ και έτσι να συμβάλλει στην ανάπτυξη της νόσου.

Ακόμα πιο αναλυτικά, στα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, μεταξύ των ΧΛΛ ασθενών με μεθυλιωμένο υποκινητή του γονιδίου RAD21, το ποσοστό των μεθυλιωμένων κυττάρων βρέθηκε να κυμαίνεται από χαμηλό (1-10%) έως εξαιρετικά υψηλό (> 90%). Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να αποδοθεί στο διαφορετικό αριθμό των ΧΛΛ κυττάρων που βρίσκονται στο μυελό των οστών των ασθενών, στην ετερογένεια ή στην αργή εξέλιξη της νόσου. Η κατάσταση μεθυλίωσης για τον κάθε ασθενή κατά τη διάρκεια της εξέλιξης της νόσου είναι ένα ενδιαφέρον θέμα για περαιτέρω έρευνα, για τις περιπτώσεις των ασθενών όπου είναι διαθέσιμες πληροφορίες της κλινικής τους πορείας και παρακολούθησης καθ’όλη την διάρκεια της νόσου.

Συσχετίζοντας τα αποτελέσματα της μεθυλίωσης του γονιδίου RAD21 με το φύλο και την ηλικία δεν αποκαλύφθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Πιο συγκεκριμένα, η κατάταξη των

ασθενών σύμφωνα με το φύλο έδειξε ότι 22,41% των αντρών και 27,66% των γυναικών εμφάνισαν μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου RAD21 (p = 0,790). Η μέση ηλικία των ασθενών που παρουσίασαν μεθυλίωση στο RAD21 ήταν 59,31 ± 12,46 έτη έναντι 65,63 ± 9,74 έτη σε εκείνους με απουσία μεθυλίωσης του RAD21 (p=0,252). Εδώ, αξίζει να σημειωθεί ότι η μέση ηλικία των ασθενών που παρουσίασαν μεθυλίωση ήταν συγκρίσιμη με αυτή των μη μεθυλιωμένων ασθενών, υποστηρίζοντας έτσι ότι η μεθυλίωση του γονιδίου RAD21 οφείλεται στην παθογένεση της ΧΛΛ και όχι στην προχωρημένη ηλικία των ασθενών.

Αν και η μεθυλίωση του RAD21 δεν έχει μελετηθεί σε σχέση με τη λευχαιμογένεση, μεταλλάξεις γενικά στο σύμπλοκο Cohesin έχουν ταυτοποιηθεί σε κύτταρα ΜΟ ασθενών με de novo και δευτερογενή ΟΜΛ και σε συμπαγείς όγκους [Leiserson MD et al. 2015]. Δεδομένου ότι η πλειοψηφία αυτών των μεταλλάξεων προβλέπεται ότι θα έχει αποτέλεσμα την απώλεια της λειτουργίας της παραγόμενης πρωτεΐνης και ότι η μεθυλίωση του υποκινητή οδηγεί επίσης σε γονιδιακή αποσιώπηση, η διερεύνηση της κατάστασης μεθυλίωσης παράλληλα με χρωμοσωμικές αλλοιώσεις θα έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον γενικά για την έρευνα σχετικά με τον καρκίνο [Gelot G et al. 2015]. Στη συγκεκριμένη διατριβή υψηλότερη συχνότητα μεθυλίωσης παρατηρήθηκε κυρίως στους ασθενείς με abn(14q32), abn(8) και del(17p). Αν και αυτό το εύρημα δεν ήταν στατιστικά σημαντικό, ίσως λόγω του περιορισμένου αριθμού των δειγμάτων των ασθενών της κάθε κυτταρογενετικής υποομάδας στην παρούσα διατριβή, περαιτέρω έρευνα με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών σε κάθε κυτταρογενετική ομάδα κρίνεται αναγκαία..

Κατατάσσοντας τους ασθενείς σύμφωνα με τον τύπο των χρωμοσωμικών αλλοιώσεων που ανιχνεύθηκαν, μεθυλίωση στο RAD21 παρουσίασαν το 0% των ασθενών με αριθμητικές αλλοιώσεις, το 27,8% των ασθενών με δομικές αλλοιώσεις και το 25% των ασθενών με αριθμητικές και με δομικές αλλοιώσεις. Το γεγονός ότι οι ασθενείς που έφεραν μόνο αριθμητικές και όχι δομικές αλλοιώσεις δεν παρουσίασαν μεθυλίωση είναι σύμφωνο με μια πρόσφατη μελέτη η οποία αναφέρει πως η μείωση της πρωτεΐνης RAD21 δεν επάγει ανευπλοειδίες αλλά αυξάνει την έκφραση του γονιδίου Hoxa9 και ενισχύει την αυτοανανέωση των πρωτογενών HSPC [Fisher et al, 2017]. Τα αποτελέσματά μας υποστηρίζονται και από μια άλλη πρόσφατη μελέτη που δείχνει πως απορρυθμίζοντας το σύμπλοκο Cohesin οδηγούμαστε σε αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση χωρίς όμως να διαταράζεται ο διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων και ότι η μειωμένη έκφραση του Cohesin αποσταθεροποιεί την έκφραση των γονιδίων, διακόπτοντας την δέσμευση τους πριν την διαδικασία της αντιγραφής, σε καρκίνους στον άνθρωπο οι οποίοι χαρακτηρίζονται από χρωμοσωμική αστάθεια [Yun et al. 2015]. Στα αποτελέσματά μας κατατάσσοντας τους ασθενείς βάση της καρυοτυπικής τους πολυπλοκότητας, το ποσοστό της μεθυλίωσης του γονιδίου RAD21 βρέθηκε υψηλότερο σε ασθενείς με 2 ή περισσότερες χρωμοσωμικές

αλλοιώσεις σε σύγκριση με αυτούς με μόνο μία αλλοίωση, αν και τα αποτελέσματα δεν ήταν στατιστικά σημαντικά.

Συμπερασματικά, στα πλαίσια αυτής της διατριβής έγινε η πρώτη μελέτη που διερευνά την κατάσταση μεθυλίωσης του γονιδίου RAD21 σε ασθενείς με ΧΛΛ, παρέχοντας τα πρώτα στοιχεία για έναν πιθανό παθογενετικό ρόλο της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου RAD21 στην ανάπτυξη της ΧΛΛ μέσω αυτοανανέωσης των παθολογικών κυττάρων και όχι μέσω του σχηματισμού χρωμοσωμικών αλλοιώσεων. Περαιτέρω διερεύνηση της κατάστασης μεθυλίωσης όλου του γονιδιακού συμπλέγματος Cohesin σε μεγάλη σειρά ασθενών είναι απαραίτητη καθώς θα μπορούσε να είναι χρήσιμη στην διαλεύκανση της παθογένεσης της ΧΛΛ και στο σχεδιασμό νέων υπομεθυλιωτικών παραγόντων για τη θεραπεία της νόσου.

Δ3. Γενικά συμπεράσματα – μελλοντικές προοπτικές

Συνοψίζοντας, ο πολυμορφισμός Q192R του γονιδίου PON1 φαίνεται να εμπλέκεται στην εμφάνιση της ΧΛΛ και πιθανόν να σχετίζεται με τη δημιουργία συγκεκριμένων χρωμοσωμικών αλλοιώσεων της νόσου. Η θετική συσχέτιση του πολυμορφισμού Q192R με τους ασθενείς που φέρουν abn(14q32), del(6q) και del(11q) δείχνει πως ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός μπορεί να συμβάλλει στη δημιουργία των συγκεκριμένων αλλοιώσεων, οι οποίες σχετίζονται με την παθογένεση της ΧΛΛ. Επιπλέον, η παρουσία του πολυμορφισμού L55M που μελετήθηκε στο γονιδίωμα των ατόμων δεν φαίνεται να συμβάλει στην προδιάθεση ανάπτυξης ΧΛΛ.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή είναι η πρώτη μελέτη που ερευνά την μεθυλίωση του γονιδίου RAD21 στη ΧΛΛ. Η μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου RAD21 η οποία οδηγεί σε μεταγραφική απενεργοποίηση και κατ' επέκταση γονιδιακή αποσιώπηση, ανιχνεύτηκε στο 25,74% των ασθενών με ΧΛΛ και σε κανένα υγιή δότη γεγονός που υποδεικνύει την πιθανή εμπλοκή της στην παθογένεση της ΧΛΛ. Με βάση τα αποτελέσματά μας υποστηρίζεται πως η μεθυλίωση του γονιδίου RAD21 δεν σχετίζεται με τη δημιουργία χρωμοσωμικών αλλοιώσεων της ΧΛΛ. Αυτό το εύρημα υποδεικνύει τον πιθανό ρόλο της μεθυλίωσης του γονιδίου RAD21 στην ανάπτυξη της ΧΛΛ μέσω αυτό-ανανέωσης των παθολογικών ΧΛΛ κυττάρων και όχι μέσω του σχηματισμού χρωμοσωμικών αλλοιώσεων.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής συμβάλλουν στη διευκρίνιση της γενετικής προδιάθεσης της ΧΛΛ, της επιγενετικής μελέτης της νόσου μέσω της μεθυλίωσης του γονιδίου RAD21 και στη διερεύνηση των μηχανισμών δημιουργίας των κυτταρογενετικών αλλοιώσεων της ΧΛΛ. Επίσης στο μελλον μπορεί να χρησιμεύσουν στο σχεδιασμό νέων

θεραπευτικών σχημάτων υπομεθυλιωτικών παραγόντων αλλά και στη σχεδίαση κατάλληλων εξατομικευμένων θεραπευτικών πρωτοκόλλων ανάλογα με το γενετικό υπόβαθρο των ασθενών.

Οι μελλοντικές προοπτικές της εν λόγω διατριβής εστιάζονται στην περαιτέρω έρευνα του πολυμορφισμού Q192R σε σχέση με την κλινική πορεία και έκβαση των ασθενών, για την διερεύνηση πιθανών παρενεργειών στους ασθενείς μετά την λήψη χημειοθεραπευτικών σχημάτων, λόγω μη αποτελεσματικής αποτοξικοποίησης –δηλ. της ικανότητας παραγωγής μη δραστικών φαρμακολογικά μεταβολιτών αλλά και μετατροπής φαρμάκων σε μεταβολίτες που αποβάλλονται ευκολότερα από τον οργανισμό- σε όσους ασθενείς παρουσιάσουν μεταλλαγμένους γονοτύπους. Επιπλέον, η περεταίρω έρευνα της μεθυλίωσης όλων των γονιδίων του συμπλόκου cohesin σε μεγάλο αριθμό ασθενών και συσχέτιση τους με την κλινική πορεία και έκβαση των ασθενών θα ήταν χρήσιμη για την διαλεύκανση της παθογένειας της ΧΛΛ αλλά και στον σχεδιασμό νέων θεραπευτικών σχημάτων απομεθυλιωτικών παραγόντων, δίνοντας μια νέα πολύτιμη προσέγγιση στην στοχευμένη θεραπεία της ΧΛΛ.

Πίνακας Συντμήσεων & Μεταφράσεων			
Σύντμηση	**Αγγλικός Όρος**	**Μεταφρασμένος Όρος**	**Σύντμηση**
AID	Activation-induced cytidine deaminase	Δεν μεταφράζεται	
AL	Acute Leukemias	Οξείες Λευχαιμίες	ΟΛ
ALL	Acute Lymphocytic Leukemia	Οξία Λεμφογενής Λευχαιμία	ΟΛΛ
AML	Acute Myeloid Leukemia	Οξεία Μυελογενείς Λευχαιμία	ΟΜΛ
ATM	ataxia telangiectasia mutated	Δεν μεταφράζεται	
	B chronic lephohyperplastic syndrome	Β- Χρόνιες Λεμφοϋπερπλαστικές Παθήσεις	ΧΛΥΠ
BCR	B-cell receptor	Β-κυτταρικός υποδοχέας	BCR
	Centromeric probes	Κεντρομεριδιακοί ανιχνευτές	
CL	Chronic Leukemias	Χρόνιες Λευχαιμίες	ΧΛ
CLL	Chronic Lymphocytic Leukemia	Χρόνια Λεμφογενής Λευχαιμία	ΧΛΛ
CML	Chronic Myeloid Leukemia	Χρόνια Μυελογενείς Λευχαιμία	ΧΜΛ
CLLU1	CLL up-regulated gene 1	Δεν μεταφράζεται	
CGH	Comparative genome hybridization	Συγκριτική υβριδοποίηση γονιδιώματος	CGH
DLEU2	Deleted In Lymphocytic Leukemia 2	Δεν μεταφράζεται	
	DNA damage pathway	Μηχανισμοί βλάβης του DNA	
DSBs	DNA double-stand breaks	θραύσματα της διπλής έλικας DNA	
DNMTs	DNA methyltransferases	DNA μεθυλοτρανσφεράσες	DNMTs
FISH	Fluorescence *in situ* Hybridization	Φθορίζον *in situ* υβριδισμός	FISH
	Hairy cell leukemia	Λευχαιμία τριχωτών λεμφοκυττάρων	
HL	Hodgkin Lymphoma	λέμφωμα Hodgkin	
IgH	immunoglobulin heavy-chain genes	IgH: βαριά αλυσίδα ανοσοσφαιρίνης	
IGVH	immunoglobulin variable region heavy chain	υπερμεταβλητή περιοχή του γονιδίου της ανοσοσφαιρίνης	IGVH
IL	interleukin	ιντερλευκίνη-2	IL-2
iwCLL	international workshop on chronic lymphocytic leukemia	Διεθνές συμπόσιο ΧΛΛ	iwCLL
ALCL	Ki-1 anaplastic large cell	Ki-1 αναπλαστικό λέμφωμα	

	lymphoma		
	Locus-specific probes	Ανιχνευτές ειδικών χρωμοσωμικών περιοχών	
LOH	Loss of heterozygosity	Απώλεια ετεροζυγωτίας	
	mature naive B cells	ώριμα παρθένα Β λεμφοκύτταρα	
	Matutes scoring system	Σύστημα βαθμολόγησης Matutes	
MDR	Minimal Deleted Region	Περιοχής ελάχιστης διαγραφής	
M-FISH	Multiplex fluorescence in situ hybridization	Πολυχρωματικό FISH	M-FISH
MDS	Myelodysplastic syndrome	Μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο	ΜΔΣ
NCCN	National Comprehensive Cancer Network	Δεν μεταφράζεται	
	Natural killer (NK)-cell lymphoma	NK/T-λέμφωμα NK: φυσικά φονικά κύτταρα	
	Neoplasms of follicular center cell origin	Νεοπλάσματα προέλευσης θυλακικών κεντρικών κυττάρων	
NGS	Next Generation sequencing	Αλληλούχιση νέας γενιάς	NGS
NHL	Non Hodgin Lymphoma	λέμφωμα μη Hodgkin	
OS	Oxidative Stress	Οξειδωτικό στρες	OS
PONs	Paraoxonases	Παραοξωνάσες	PONs
RDX	radixin	Δεν μεταφράζεται	
ROS	Reactive Oxygen Species	Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου	ROS
SNP	Single Nucleotide Polymorphism	Αλλαγές ενός μόνο νουκλεοτιδίου	SNP
SNP arrays	Single nucleotide polymorphisms arrays	Συστοιχίες SNP υψηλής ανάλυσης	
SKY	Spectral Karyotyping	Φασματική καρυοτυπία	SKY
	Survival signals	Σήματα επιβίωσης	
	T helpers	βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα	
	T-cell lymphoma	Τ-λεμφοβλαστικό λέμφωμα	
TLR	Toll-like receptor	Toll-like υποδοχέα	TLR
VDJ	Variable Diverse and Joining gene segments		
WGS	Whole genome sequencing	Αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος	
WHO	World Health Organisation	Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας	Π.Ο.Υ.
ZAP-70	Zeta-associated protein of 70kDa	Zeta-associated protein of 70kDa	ZAP-70

SCC	Sister-chromatid cohesion	Διαχωρισμός αδελφών χρωματίδων	
TPA	12-0-tetradecanoy1phorbol-13-acetate	Δεν μεταφράζεται	
PHA	phytohemagglutinin	Δεν μεταφράζεται	
LPS	lipopolysaccharide	Δεν μεταφράζεται	
PWM	pokeweed mitogen	Δεν μεταφράζεται	

Περίληψη

Η Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (ΧΛΛ), μία από τις πιο συχνές μορφές αιματολογικών κακοηθειών, χαρακτηρίζεται από in vivo συσσώρευση μονοκλωνικών Β-λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα και στο μυελό των οστών, τα οποία διηθούν τους λεμφικούς ιστούς και τον σπλήνα προκαλώντας συχνά διόγκωση των λεμφαδένων και δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Η νόσος παρουσιάζει μεγάλη κλινική ετερογένεια η οποία είναι συνυφασμένη με την ετερογένεια που παρατηρείται σε γενετικό και μοριακό επίπεδο. Κάποιοι ασθενείς επιβιώνουν για πολλά χρόνια χωρίς θεραπεία, ενώ άλλοι παρουσιάζουν επιθετική νόσο και μικρή επιβίωση. Η μοριακή και γενετική βάση της ΧΛΛ δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί ως σήμερα, ωστόσο στην παθογενετική πορεία της νόσου και στην μεγάλη κλινική ετερογένεια που παρουσιάζει, φαίνεται να εμπλέκονται γενετικοί και επιγενετικοί μηχανισμοί.

Τα κυτταρογενετικά ευρήματα συμβάλλουν καθοριστικά στη διάγνωση, πρόγνωση και επιλογή του κατάλληλου θεραπευτικού πρωτοκόλλου των ασθενών με ΧΛΛ. Σήμερα, στην καλλιέργεια του μυελού των οστών των ασθενών με ΧΛΛ γίνεται προσθήκη ενός συνδυασμού διεγερτών των Β κυττάρων, όπως είναι ο συνδυασμός DSP-30 και ιντερλευκίνης-2 (IL-2), αυξάνοντας έτσι σημαντικά το ποσοστό ανίχνευσης των κλωνικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών, εξατομικεύοντας την πρόγνωση των ασθενών.

Η μοριακή ανάλυση έχει αναδείξει αλλαγές σε γονίδια τα προϊόντα των οποίων ρυθμίζουν σημαντικές λειτουργίες των κυττάρων, όπως η αύξηση, η διαίρεση και ο πολλαπλασιασμός τους. Οι αλλαγές αυτές αφορούν τόσο μεταλλάξεις γονιδίων, όσο και επιγενετικές αλλαγές. Η μεθυλίωση των κυτοσινών στις νησίδες CpG υποκινητών γονιδίων είναι μια από τις πιο μελετημένες επιγενετικές τροποποιήσεις του DNA στον άνθρωπο και επηρεάζει τη δομή της χρωματίνης και τη μεταγραφική ενεργότητα των γονιδίων. Αν και η διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών λευχαιμογένεσης βρίσκεται σήμερα στο επίκεντρο του ερευνητικού ενδιαφέροντος, η μελέτη αυτών των μηχανισμών στη ΧΛΛ είναι ακόμα σε πρώιμο στάδιο.

Πολύ πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι η μεθυλίωση του DNA είναι μια σημαντική επιγενετική τροποποίηση η οποία σχετίζεται με τη ΧΛΛ. Στην παρούσα διατριβή έγινε μελέτη της μεθυλίωσης του γονιδίου *RAD21* το οποίο εδράζεται στα μακρά σκέλη του χρωμοσώματος 8, στη χρωμοσωμική περιοχή 8q24.11. Η παραγόμενη πρωτεΐνη RAD21 αποτελεί μία από τις βασικές υπομονάδες του πρωτεϊνικού συμπλέγματος cohesin που εμπλέκεται στον μηχανισμό που ελέγχει το σωστό διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων και συμμετέχει στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA. Η μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου *RAD21* οδηγεί σε μεταγραφική απενεργοποίηση και κατ' επέκταση γονιδιακή αποσιώπηση. Η μελέτη της μεθυλίωσης του *RAD21* και η συσχέτιση των ευρημάτων με την ΧΛΛ και τις ειδικές κυτταρογενετικές αλλοιώσεις της μπορεί να συμβάλει στην καλύτερη κατανόηση της παθογενετικής πορείας της νόσου αλλά και στο σχεδιασμό νέων θεραπευτικών σχημάτων απομεθυλιωτικών παραγόντων που ήδη χρησιμοποιούνται στη θεραπεία διαφόρων άλλων αιματολογικών κακοηθειών.

Επιπλέον, μελέτες ασθενών με ΧΛΛ έχουν αναδείξει την συμμετοχή γενετικών προδιαθεσικών παραγόντων στην εμφάνιση της νόσου. Οι παραοξονάσες (PONs) είναι ένζυμα που προστατεύουν τα κύτταρα από γονοτοξικούς παράγοντες όπως τα οργανοφωσφορικά και οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, παράγοντες που προκαλούν μεταβολικές αλλοιώσεις και βλάβες στο DNA συμβάλλοντας στην καρκινογένεση. Το γονίδιο *PON1* (παραοξονάση 1, υπομονάδα του γονιδιακού συμπλέγματος των παραοξωνασών) που εδράζεται στην χρωμοσωματική περιοχή 7q21.3, παρουσιάζει δύο πολυμορφισμούς τύπου SNP στην κωδικοποιούσα περιοχή του, στις θέσεις 55 και 192, που έχουν σαν αποτέλεσμα την αντικατάσταση ενός αμινοξέος και επηρεάζουν τη συγκέντρωση, τη σταθερότητα και την ενεργότητα του ενζύμου. Πιο συγκεκριμένα ο πολυμορφισμός L55M (Leu55Met [rs854560]) αφορά αντικατάσταση λευκίνης

(L) από μεθειονίνη (M) και ο πολυμορφισμός Q192R (Gln192Arg [rs662]) αντικατάσταση γλουταμίνης (Q) από αργινίνη (R). Στην παρούσα διατριβή μελετήσαμε τους δύο πολυμορφισμούς του γονιδίου *PON1*, προκειμένου να διερευνηθεί η πιθανή εμπλοκή τους στην γενετική προδιάθεση της ΧΛΛ και στη δημιουργία των χαρακτηριστικών χρωμοσωμικών αλλοιώσεων της.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η κυτταρογενετική, μοριακή και επιγενετική διερεύνηση ασθενών με Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία. Πιο συγκεκριμένα η παρούσα διατριβή επικεντρώνεται στη διερεύνηση του προτύπου μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου *RAD21* και τη μελέτη των πολυμορφισμών L55M και Q192R του γονιδίου *PON1* που σε συνδιασμό με τα κυτταρογενετικά δεδομένα μπορεί να συμβάλλουν στη διαλεύκανση των μηχανισμών παθογένεσης και προδιάθεσης της νόσου.

Για τη συγκεκριμένη διατριβή χρησιμοποιήθηκαν 300 δείγματα μυελού των οστών από ασθενείς με ΧΛΛ που παραλήφθησαν στο Εργαστήριο του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» προκειμένου να πραγματοποιηθεί κυτταρογενετική τους ανάλυση. Τα κυττάρα μυελού των οστών καλλιεργήθηκαν, συλλέχθηκαν και μονιμοποίηθηκαν. Μετά από ζωνοποίηση των χρωμοσωμάτων, με τη μέθοδο GTG banding, έγινε μικροσκοπική και καρυοτυπική ανάλυση και τέλος αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Οι καρυότυποι περιγράφηκαν σύμφωνα με το διεθνές σύστημα ονοματολογίας Κυτταρογενετικής ISCN 2016. Σε ασθενείς που κρίθηκε απαραίτητο έγινε εφαρμογή της μεθόδου του Φθορίζοντος *in situ* Υβριδισμού (FISH) σε μεσοφασικά και μεταφασικά κύτταρα (interphase και metaphase FISH).

Από όλα τα δείγματα των ασθενών με ΧΛΛ καθώς και από 106 δείγματα περιφερικού αίματος υγιών δοτών απομόνωθηκε ολικό γενωμικό DNA, προκειμένου στη συνέχεια να πραγματοποιηθεί η μοριακή ανάλυση.

Στη μελέτη της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου *RAD21* συμπεριλήφθηκαν 105 ασθενείς με ΧΛΛ, επιλεγμένοι με βάση τα κυτταρογενετικά τους ευρήματα, και 17 υγιείς δότες. Με PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR) και τη χρήση του EpiTect Methyl II PCR Assay μελετήθηκε το πρότυπο μεθυλίωσης του γονιδίου *RAD21* και ακολούθως τα αποτελέσματα συσχετίστηκαν με τα κυτταρογενετικά ευρήματα των ασθενών ώστε να διερευνηθεί πιθανή εμπλοκή της εν λόγω μεθυλίωσης στο σχηματισμό συγκεκριμένων χρωμοσωμικών αλλοιώσεων της ΧΛΛ.

Για την μελέτη των πολυμορφισμών Q192R και L55Mτου γονιδίου *PON1*, συμμετείχαν 300 ασθενείς με ΧΛΛ και 106 υγιείς δότες. Αφού έγινε προτυποποίηση των μεθόδων γονοτυπικής ανάλυσης για τους δύο πολυμορφισμούς του γονιδίου *PON1,* η κατανομή των γονοτύπων και των αλληλομόρφων των πολυμορφισμών έγινε μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) και πέψης με περιοριστικές ενδονουκλεάσες για τον προσδιορισμό φυσιολογικών και μεταλλαγμένων γονοτύπων. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο PCR-RFLPs και με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Μετά την κατανομή των γονοτύπων και των αλληλομόρφων των πολυμορφισμών έγινε συσχέτιση με τα κυτταρογενετικά ευρήματα των ασθενών.

Οι συσχετίσεις όλων των αποτελεσμάτων, εξετάστηκαν και συγκρίθηκαν με το στατιστικό μη-παραμετρικό τεστ χ^2 (Chi-Square test). Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας λογισμικό SPSS (Statistical Package for Social Sciences) έκδοση 20. Ο έλεγχος έγινε βάσει 95% διαστήματος εμπιστοσύνης (95% confidence interval) και επίπεδο σημαντικότητας 5%. Στις περιπτώσεις που ήταν απαραίτητο χρησιμοποιήθηκε και το Fisher's Exact Test.

Κατά την κυτταρογενετική ανάλυση των 300 ασθενών με ΧΛΛ, 39,3% (118/300) των ασθενών είχαν φυσιολογικό καρυότυπο (επιβεβαιωμένο και με FISH) και 60,7% (182/300) παθολογικό καρυότυπο. Μεταξύ των 182 ασθενών με παθολογικό καρυότυπο το 33,5% (61/182) έφεραν del(13q), 30,8% (56/182) τρισωμία 12, 21,9% (40/182) del(11q), 13,2% (24/182) del(17p), 11,5% (21/182) των ασθενών έφεραν αλλοιώσεις της περιοχής 14q32 [abn(14q32)], 6,6% (12/182) αλλοιώσεις του χρωμοσώματος 8 [abn(8)], 4,9% (9/182) των ασθενών del(6q) και 12,1% (22/182) των ασθενών έφεραν άλλες χρωμοσωμικές αλλοιώσεις.

Όσον αφορά τη μεθυλίωση του γονιδίου *RAD21* η μελέτη αυτή ήταν επιτυχής στο 96% των ασθενών και στο 100% των υγειών δοτών. Στατιστικά σημαντική υψηλότερη συχνότητα μεθυλιωμένων δειγμάτων παρατηρήθηκε στους ασθενείς (25,75%), σε σύγκριση με τους υγιείς δότες (0%) (p=0,022). Η συσχέτιση της μεθυλίωσης με τα κυτταρογενετικά ευρήματα έδειξε παρόμοια αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, μεθυλίωση παρατηρήθηκε στο 28.57% των ασθενών με φυσιολογικό καρυότυπο και στο 25% των ασθενών με παθολογικό καρυότυπο υποδικνύοντας ότι η μεθυλίωση του συγκεκριμένου γονιδίου δεν σχετίζεται με τη δημιουργία χρωμοσωμικών αλλοιώσεων. Η παρούσα διατριβή αποτελεί την πρώτη μελέτη μεθυλίωσης του γονιδίου *RAD21* σε ασθενείς με ΧΛΛ.

Κατά την μελέτη των δύο πολυμορφισμών του γονιδίου *PON1,* η μελέτη του πολυμορφισμού Q192R ήταν 100% επιτυχής στους ασθενείς με ΧΛΛ και στο 98,1% για τούς υγιείς δότες. Η κατανομή των γονοτύπων και των αλληλομόρφων του πολυμορφισμού αυτού έδειξε στατιστικά σημαντική υψηλότερη συχνότητατων μεταλλαγμένων γονοτύπων (ετεροζυγοτών QR και ομόζυγων RR) (p=0.028) και του μεταλλαγμένου R αλληλομόρφου στους ασθενείς σε σύγκριση με τους υγιείς δότες (p=0.012). Συγκρίνοντας την κάθε καρυοτυπική υποομάδα ασθενών μαζί με τα αποτελέσματα των υγιών δοτών στατιστικά ψηλότερη συχνότητα εμφάνισης των μεταλλαγμένων γονοτύπων και αλληλομόρφων παρατηρείται στην ομάδα των ασθενών με παθολογικό καρυότυπο και συγκεκριμένα αυτών που έφεραν abn14q32 και del(6q) (p=0.030 και p=0.021 αντίστοιχα). Στατιστικά αυξημένη συχνότητα για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο αποκαλύφθηκε επίσης στους ασθενείς με την αλλοίωση del(11q) στον καρυότυπο τους (p=0.035).

Η μελέτη του πολυμορφισμού L55M ήταν 100% επιτυχής στους ασθενείς με ΧΛΛ και στο 99,1% για τούς υγιείς δότες. Αντίθετα όμως με τον πολυμορφισμό Q192R, ο πολυμορφισμός L55M έδειξε στατιστικά παρόμοιες κατανομές μεταξύ ασθενών και μαρτύρων υποδεικνύοντας ότι ο πολυμορφισμός L55M σε αντίθεση με τον πολυμορφισμό Q192R, δεν φαίνεται να προδιαθέτει στην εμφάνιση της ΧΛΛ.

Συμπερασματικά μπορούμε να πούμε ότι, στη συγκεκριμένη διατριβή έγινε η πρώτη μελέτη διερεύνησης της κατάστασης μεθυλίωσης του γονιδίου *RAD21* σε ασθενείς με ΧΛΛ, και έδειξε αυξημένη παρουσία μεθυλίωσης στους ασθενείς με ΧΛΛ σε σχέση με τους υγιείς δότες, υποδεικνύοντας πιθανή συμετοχή της μεθυλίωσης του γονιδίου *RAD21* στην παθογένεση της ΧΛΛ πιθανόν μέσω αυτοανανέωσης των κυττάρων της ΧΛΛ και όχι μέσω του σχηματισμού χρωμοσωμικών αλλοιώσεων.

Τα αποτελέσματά μας από την μελέτη των δύο πολυμορφισμών του γονιδίου PON1, ενισχύουν τον πιθανό ρόλο του πολυμορφισμού Q192R στην προδιάθεση της ΧΛΛ και στη δημιουργία συγκεκριμένων χρωμοσωμικών αλλοιώσεων της νόσου, σε αντίθεση με τον πολυμορφισμό L55M.

Abstract

Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL), one of the most common forms of hematologic malignancies, is characterized by *in vivo* accumulation of monoclonal B-lymphocytes in peripheral blood and bone marrow, which infiltrate lymphatic tissues and spleen, often causing inflation of the lymph nodes and dysfunction of the immune system. The disease presents great clinical variation which is intertwined with the diversity observed at genetic and molecular level. Some patients survive for many years without treatment while others suffer from an aggressive form of the disease. The molecular and genetic basis of CLL has not been fully elucidated yet however, genetic and epigenetic mechanisms appear to be present in the pathogenetic pathway of the disease and the large clinical variability that it presents.

Cytogenetic findings contribute to the diagnosis, prognosis and selection of the appropriate treatment protocol for CLL patients. Nowadays, in the bone marrow (BM) cell culture of CLL patients we use a combination of B-cell stimulators, such as DSP-30 and interleukin-2 (IL-2) combination, which significantly increase the percentage detection of clonal chromosomal abnormalities, personalizing the prognosis of patients.

Molecular analysis has shown alterations in genes whose products regulate important cell functions such as growth, division and proliferation. These changes involve both gene mutations and epigenetic changes. Methylation of cytosines in CpG islands of gene promoters is one of the most studied epigenetic DNA modifications in humans and affects the structure of chromatin as well as the transcriptional activity. Although the investigation of molecular mechanisms in leukemia is currently at the center of research interest, the study of these mechanisms in CLL is still at an early stage.

Very recent studies indicate that methylation of DNA is a significant epigenetic modification that is associated with CLL. In this thesis we study methylation of *RAD21* gene which is located in the long arm of chromosome 8, chromosomal region 8q24.11. The produced RAD21 protein is one of the basic subunits of the cohesin complex which is involved in the mechanism that controls the correct separation of sister chromatids during cell division and participates in DNA repair mechanisms. Methylation of *RAD21* gene promoter leads to transcriptional inactivation and thus gene silencing. Studying methylation of *RAD21* gene and associating findings with CLL and its specific cytogenetic alterations may contribute to a better understanding of the pathogenetic course of the disease and also to the design of new therapeutic methods using demethylation agents that are already used in the treatment of other diseases.

In addition, studies of CLL patients have shown the involvement of genetic predisposing factors in the onset of the disease. Paroxonases (PONs) are enzymes that protect cells from genotoxic factors such as organophosphates and free oxygen radicals, agents that cause metabolic lesions and DNA damage by contributing to carcinogenicity. *PON1* gene (paroxonase 1, a subunit of the paroxonases complex) located on the chromosome region 7q21.3, presents two SNP polymorphisms in its coding region, at positions 55 and 192, which result in the replacement of an amino acid and affect the concentration, stability and activity of the enzyme. In particular, the L55M polymorphism (Leu55Met [rs854560]) involves replacement of leucine (L) by methionine (M) and polymorphism Q192R (Gln192Arg [rs662]) replacing glutamine (Q) by arginine (R). In this dissertation we studied the two polymorphisms of *PON1* gene in order to investigate their possible involvement in the genetic predisposition of CLL and the formation of characteristic chromosomal lesions.

The purpose of this doctoral thesis is the cytogenetic, molecular and epigenetic study of CLL patients. In particular, the present thesis focuses on investigating the methylation pattern of

RAD21 gene promoter and the study of L55M and Q192R polymorphisms of *PON1* gene which, in combination with cytogenetic findings, may contribute to the elucidation of the pathogenesis and the mechanisms of the disease.

For the purposes of this thesis, 300 bone marrow samples from CLL patients, received at the NCSR Lab "Demokritos" for their cytogenetic analysis were recruited. After BM cell culturing, harvesting and fixation, chromosome banding was performed using GTG banding method. Microscopic and karyotypic analysis was performed using Ikaros software (Metasystems). Karyotypes were described according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN) 2016. In patients deemed necessary, we applied fluorescent in situ hybridization (FISH) method to mesophasic and metaphase cells (FISH interphase and metaphase) using appropriate probes.

Studying *RAD21* methylation we included 105 CLL patients, selected based on their cytogenetic findings, and 17 healthy donors. Total genomic DNA was isolated from all of CLL patients' BM samples and from 106 healthy donors' peripheral blood samples for molecular analysis. Using Real-Time PCR and the EpiTect Methyl II PCR Assay we studied the methylation status of *RAD21* gene promoter and then the results were correlated with patients' cytogenetic findings to investigate possible involvement in the formation of specific CLL abnormalities.

In the study of the two polymorphisms of *PON1* gene, 300 CLL patients and 106 healthy donors were participated. Genotyping methods using Polymerase Chain Reaction (PCR) and digestion with restriction endonucleases (PCR-RFLPs method) were standardized. For the determination of normal and mutant genotypes electrophoresis in 2% agarose gel was performed. After the distribution of the genotypes and alleles of the polymorphisms the results were associated with patients' cytogenetic findings. The correlations of all results were examined and compared with the Chi-Square test, χ^2. Statistical analysis was performed using SPSS software (Statistical Package for Social Sciences) version 20. The study was based on a 95% confidence interval and a significance level of 5%. Fisher's Exact Test was used where necessary.

From the cytogenetic analysis of the 300 CLL patients, 39.3% (118/300) of patients had normal karyotype (confirmed with FISH) and 60.7% (182/300) pathological karyotype. Among the 182 patients with pathological karyotype 33.5% (61/182) had del(13q), 30.8% (56/182) trisomy 12, 21.9% (40/182) del(11q), 13.2% (24/182) del(17p), 11.5% (21/182) of patients had abnormalities in 14q32 region [abn(14q32)], 6.6% (12/182) chromosome 8 alterations [abn(8)], 4.9% (9/182) of patients del(6q) and 12.1% (22/182) of patients had other chromosomal alterations.

Concerning *RAD21* methylation, this study was successful in 96% of patients and 100% of healthy donors. A statistically higher frequency of methylated samples was observed in patients (25.75%), compared to controls (0%) (p= 0.022). Correlation between *RAD21* gene methylation and karyotypic results showed comparable methylation frequency between the different cytogenetic subgroups. Specifically, methylation was observed in 28.57% of patients with normal karyotype and in 25% of patients with pathological karyotype suggesting that methylation of this gene was not associated with chromosomal alterations. This thesis is the first study that examines the methylation of *RAD21* gene in patients with CLL.

Examining *PON1* gene polymorphisms, the Q192R polymorphism study was 100% successful in CLL patients and 98.1% in healthy donors. Genotypic and allele distribution ofQ192R polymorphism showed a statistically significant higher frequency of the mutant genotypes (QR heterozygotes and RR homozygotes) (p=0.028) and the mutant R allele in patients compared to controls (p=0.012). Comparing each karyotypic subgroup of patients with the results of the healthy donors a statistically higher incidence was showed at mutated genotypes and

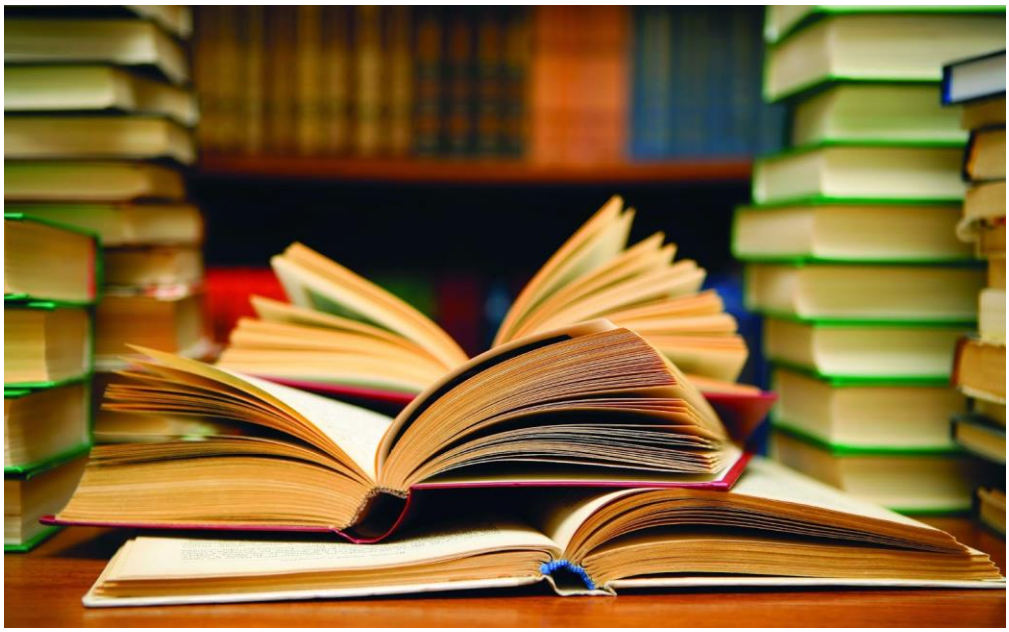
alleles in the pathological karyotype group, specifically in those carrying abn14q32 and del(6q) (p=0.030 and p=0.021 respectively). A statistically increased frequency for the mutant allele was also revealed in patients with del(11q) (p=0.035).

The study of L55M polymorphism was 100% successful in CLL patients and 99.1% in healthy donors. But unlike Q192R polymorphism, L55M polymorphism showed similar distributions between patients and controls indicating that L55M polymorphism, in contrast to Q192R polymorphism, does not appear to predispose to the appearance of CLL.

In conclusion, this thesis was the first study to investigate the methylation status of *RAD21* gene in patients with CLL and showed an increased presence of methylation in CLL patients compared to healthy donors, suggesting a possible pathogenetic role of *RAD21* promoter methylation in the development of CLL probably *via* self-renewal of CLL cells and not *via* the formation of chromosomal abnormalities.

Our results from the study of the two polymorphisms of *PON1* gene, indicates a possible role of Q192R polymorphism in CLL predisposition and the formation of specific chromosome aberrations in contrast with L55M polymorphism.

ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Agathangelidis A, Darzentas N et al. Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies. Blood. 2012 May 10;119(19):4467-75.
2. Akkız H, Kuran S, Akgöllü E, et al. Effect of PON1 gene polymorphisms in Turkish patients with hepatocellular carcinoma. Meta Gene. 2013;1:93-101.
3. Amaya-Chanaga CI, Rassenti LZ. Biomarkers in chronic lymphocytic leukemia: Clinical applications and prognostic markers. Best Pract Res Clin Haematol. 2016 Mar;29(1):79-89.
4. Bacchettia T, Ferretti G, Sahebkar A. The role of paraoxonase in cancer. Seminars in Cancer Biology. 2017; S1044-579X(17)30191-8.
5. Banerjee S, Gusho E, Gaughan C, et al. OAS-RNase L innate immune pathway mediates the cytotoxicity of a DNA-demethylating drug. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019 Mar 12;116(11):5071-5076.
6. Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, et al. TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98:9237–42.
7. Benavente Y, Casabonne D, Costas L, et al. Established and suggested exposures on CLL/SLL etiology: Results from the CLL-MCC-Spainstudy. Cancer Epidemiol. 2018;52:106-111.
8. Berkova A, Zemanova Z et al. Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia studied by interphase fluorescence in-situ hybridization. Neoplasma. 2009;56(5):455-8.
9. Berndt SI, Camp NJ, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies discovers multiple loci for chronic lymphocytic leukemia. Nat Commun. 2016 Mar 9;7:10933.
10. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes Dev. 2002 Jan 1;16(1):6-21.
11. Bolufer P, Barragan E, Collado M, et al. Influence of genetic polymorphisms on the risk of developing leukemia and on disease progression. Leuk Res 2006;30:1471–1491.
12. Boonstra JG, van Lom K et al. CD38 as a prognostic factor in B cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL): comparison of three approaches to analyze its expression. Cytometry B Clin Cytom. 2006 May;70(3):136-41.
13. Brown J., Neuberg D., Phillips K., Reynolds H., Silverstein J., Clark J., et al. (2008a) Prevalence of familial malignancy in a prospectively screened cohort of patients with lymphoproliferative disorders. Br J Haematol 143: 361–368 .

14. Brown J., Rassenti L., Neuberg D., Greaves A., Byrd J., Grever M., et al. (2008b) Characteristics of Familial CLL Evaluated in the CLL Research Consortium Cohort. Blood 112: abstract 3125.
15. Brown JR, Inherited susceptibility to chronic lymphocytic leukemia: evidence and prospects for the future, Ther Adv Hematol, 2013;4(4) 298–308.
16. Buhl AM, Jurlander J et al. Identification of a gene on chromosome 12q22 uniquely overexpressed in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2006 Apr 1;107(7):2904-11.
17. Bullrich F, Fujii H et al. Characterization of the 13q14 tumor suppressor locus in CLL: identification of ALT1, an alternative splice variant of the LEU2 gene. Cancer Res. 2001 Sep 15;61(18):6640-8.
18. Burger JA, Kipps TJ. Chemokine receptors and stromal cells in the homing and homeostasis of chronic lymphocytic leukemia B cells. Leuk Lymphoma 2002, 43:461–466.
19. Caligaris-Cappio F, Ghia P. The nature and origin of the B-chronic lymphocytic leukemia cell: a tentative model. Hematol Oncol Clin North Am. 2004 Aug;18(4):849-62, viii. Review.
20. Caligaris-Cappio F, Ghia P.Novel insights in chronic lymphocytic leukemia: are we getting closer to understanding the pathogenesis of the disease? J Clin Oncol. 2008 Sep 20;26(27):4497-503.
21. Calin GA, Dumitru CD et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Nov 26;99(24):15524-9.
22. Calin GA, Cimmino A et al. MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Apr 1;105(13):5166-71.
23. Catherwood MA, Matthews C et al. ZAP-70 mRNA quantification in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. Eur J Haematol. 2006 Apr;76(4):294-8.
24. Catovsky D, Richards S et al. Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukaemia (the LRF CLL4 Trial): a randomised controlled trial. Lancet. 2007 Jul 21;370(9583):230-239.
25. Cavazzini F, Hernandez JA et al. Chromosome 14q32 translocations involving the immunoglobulin heavy chain locus in chronic lymphocytic leukaemia identify a disease subset with poor prognosis. Br J Haematol. 2008 Aug;142(4):529-37.
26. Cerhan JR & Slager SL. Familial predisposition and genetic risk factors for lymphoma. Blood, 2015;126, 2265–2273.

27. Chiorazzi N, Rai KR et al. Chronic Lymphocytic leukemia. N Eng J Med. 2005;352:804-815.
28. Cimmino A, Calin GA et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Sep 27;102(39):13944-9.
29. Claus, R., Lucas, D.M., Stilgenbauer, S. et al. Quantitative DNA methylation analysis identifies a single CpG dinucleotide important for ZAP-70 expression and predictive of prognosis in chronic lymphocytic leukemia. J Clin Oncol. 2012; 30: 2483–2491.
30. Collado R, Ivars D, Oliver I et al. Increased Oxidative Damage Associated with Unfavorable Cytogenetic Subgroups in Chronic Lymphocytic Leukemia. Biomed Res Int. 2014;2014:686392.
31. Collins RJ, Verschuer LA,et al. Spontaneous programmed death (apoptosis) of Bchronic lymphocytic leukaemia cells following their culture in vitro. Br J Haematol 1989, 71:343–350.
32. Condoluci A, Rossi D et al.Treatment of Richter's Syndrome. Curr Treat Options Oncol. 2017 Nov 21;18(12):75.
33. Corcoran, M., Parker, A., Orchard, J. et al. ZAP-70 methylation status is associated with ZAP-70 expression status in chronic lymphocytic leukemia. Haematologica. 2005; 90: 1078–1088.
34. Costa LG, Li WF, Richter RJ, et al. The role of paraoxonase (PON1) in the detoxication of organophosphates and its human polymorphism. Chem Biol Interact. 1999;119-120:429–38.
35. Costa LG, Vitalone A, Cole TB et al. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. Biochem Pharmacol 2005;69:541–550.
36. Cramer P, Hallek M. Prognostic factorsin chronic lymphocytic leukemia–whatdo we need to know? Nat Rev Clin Oncol2011;8:38–47.
37. Cramer P, von Tresckow J et al. Bendamustine followed by obinutuzumab and venetoclax in chronic lymphocytic leukaemia (CLL2-BAG): primary endpoint analysis of a multicentre, open-label, phase 2 trial. Lancet Oncol. 2018 Aug 13. pii: S1470-2045(18)30414-5.
38. Cuneo A, Rigolin et al. Chronic lymphocytic leukemia with 6q- shows distinct hematological features and intermediate prognosis. Leukemia. 2004 Mar;18(3):476-83.
39. Cuneo A, Bigoni R et al. Late appearance of the 11q22.3-23.1 deletion involving the ATM locus in B-cell chronic lymphocytic leukemia and related disorders. Clinico-biological significance. Haematologica. 2002 Jan;87(1):44-51.
40. Dal Bo M, Rossi FM, 13q14 deletion size and number of deleted cells both influence prognosis in chronic lymphocytic leukemia. Genes Chromosomes Cancer. 2011 Aug;50(8):633-43.

41. Dameshek W. Chronic lymphocytic Leukemia: an accumulatiove disease of immunologically incompetent lymphocytes. Blood 1967;24:566-584.
42. Damle RN, Batliwalla FM et al. Telomere length and telomerase activity delineate distinctive replicative features of the B-CLL subgroups defined by immunoglobulin V gene mutations. Blood 2004,103:375–382
43. Damle RN, Ghiotto F et al. B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. Blood 2002, 99:4087–4093.
44. D'Arena G, Musto P et al. CD38 expression correlates with adverse biological features and predicts poor clinical outcome in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Leuk Lymphoma 2001;42(1-2): 109e14.
45. Darzentas N, Hadzidimitriou A et al.. A different ontogenesis for chronic lymphocytic leukemia cases carrying stereotyped antigen receptors: molecular and computational evidence. Leukemia. 2010 Jan;24(1):125-32.
46. Daskalakis M, Nguyen TT et al. Demethylation of a hypermethylated P15/INK4B gene in patients with myelodysplastic syndrome by 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) treatment. Blood. 2002 Oct 15;100(8):2957-64.
47. de Aguiar Gonçalves BA, Vasconcelos GM, Thuler LC, NQO1 rs1800566 (C609T), PON1 rs662 (Q192R), and PON1 rs854560 (L55M) polymorphisms segregate the risk of childhood acute leukemias according to age range distribution. Cancer Causes Control. 2012;23(11):1811-9.
48. Decker T, Schneller F, Kronschnabl M, et al. Immunostimulatory CpG-oligonucleotides induce functional high affinity IL-2 receptors on B-CLL cells: costimulation with IL-2 results in a highly immunogenic phenotype. Exp Hematol. 2000;28:558–68.
49. Decker T, Schneller F, Sparwasser T, et al. Immunostimulatory CpG-oligonucleotides cause proliferation, cytokine production, and an immunogenic phenotype in chronic lymphocytic leukemia B cells. Blood. 2000;95:999–1006.
50. Decoteau JF, Knaus PI et al. Loss of functional cell surface transforming growth factor beta (TGF-beta) type 1 receptor correlates with insensitivity to TGF-beta in chronic lymphocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci USA 1997, 94:5877–5881.
51. Devasagayam TP, Tilak JC et al. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. J Assoc Physicians India. 2004 Oct;52:794-804.

52. Dicker F, Schnittger S et al. Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80% of CLL patients: A study of 132 CLL cases with correlation to FISH, IgVH status, and CD38 expression. Blood. 2006 Nov 1;108(9):3152-60. Epub 2006 Jul 13.
53. Dicker F, Herholz H et al.The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype. Leukemia. 2009 Jan;23(1):117-24.
54. Diehl LF, Karnell LH et al.The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. The National Cancer Data Base report on age, gender, treatment, and outcomes of patients with chronic lymphocytic leukemia. Cancer. 1999 Dec 15;86(12):2684-92.
55. Döhner H, Fischer K et al. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. Blood. 1995 Mar 15;85(6):1580-9.
56. Döhner H1, Stilgenbauer S et al. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. Blood. 1997 Apr 1;89(7):2516-22.
57. Dohner, H, Stilgenbauer, S, Benner A et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med. 2000; 343: 1910–1916.
58. Fabbri G, Rasi S et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. J Exp Med. 2011 Jul 4;208(7):1389-401.
59. Fabbri, M., Garzon, R., Cimmino, A. et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007; 104: 15805–15810.
60. Falchi L, Vitale C et al. Incidence and prognostic impact of other cancers in a population of long-term survivors of chronic lymphocytic leukemia. Ann Oncol. 2016 Jun; 27(6):1100-6.
61. Fegan C, Robinson H et al. Karyotypic evolution in CLL: identification of a new sub-group of patients with deletions of 11q and advanced or progressive disease. Leukemia. 1995 Dec;9(12):2003-8.
62. Fiegl M, Erdel M et al. Clinical outcome of pretreated B-cell chronic lymphocytic leukemia following alemtuzumab therapy: a retrospective study on various cytogenetic risk categories. Ann Oncol. 2010 Dec;21(12):2410-9.

63. Finn WG, Kay NE et al. Secondary abnormalities of chromosome 6q in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a sequential study of karyotypic instability in 51 patients. Am J Hematol. 1998 Nov;59(3):223-9.
64. Fisher JB, Peterson J, Reimer M Jr. et al. The cohesin subunit Rad21 is a negative regulator of hematopoietic self-renewal through epigenetic repression of HoxA7 and HoxA9. Leukemia. 2017;31(3): 712–719.
65. Galton DAG. The pathogenesis of Chronic Lymphocytic leukemia. Canadian Medical Association Journal 1966:94:1005-1010.
66. Garg R, Wierda W, The prognostic difference of monoallelic versus biallelic deletion of 13q in chronic lymphocytic leukemia. Cancer. 2012 Jul 15;118(14):3531-7.
67. Garzon R, Calin GA et al. MicroRNAs in Cancer. Annu Rev Med. 2009;60:167-79.
68. Gelot C, Guirouilh-Barbat J et al. The Cohesin Complex Prevents the End Joining of Distant DNA Double-Strand Ends. Molecular Cell. 2016;61(1):15–26.
69. Ghamlouch H, Nguyen-Khac F et al. Chronic lymphocytic leukaemia genomics and the precision medicine era. Br J Haematol. 2017 Sep;178(6):852-870.
70. Ghia P, Guida G et al. The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients at risk of disease progression. Blood 2003;101(4):1262e9.
71. Ghia P, Scielzo C et al. From normal to clonal B cells : CLL at the crossroad between neoplasia and autoimmunity Autoimmun Rev. 2007;7:127-31. Epub 2007 Mar 22. Review.
72. Giles, F.J., O'Brien, S.M., and Keating, M.J. Chronic lymphocytic leukemia in (Richter's) transformation. Semin Oncol. 1998; 25: 117–125.
73. Gomes LC, Ferrão ALM et al. Advances in chronic lymphocytic leukemia pharmacotherapy. Biomed Pharmacother. 2018 Jan;97:349-358.
74. Gonzalez D, Martinez P et al. Mutational status of the TP53 gene as a predictor of response and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the LRF CLL4 trial. J Clin Oncol. 2011 Jun 1;29(16):2223-9, Zenz T et al. 2009.
75. Gorgun G, Holderried TA et al. Chronic lymphocytic leukemia cells induce changes in gene expression of CD4 and CD8 T cells. J Clin Invest 2005, 115:1797–1805.
76. Grdisa M. Influence of CD40 ligation on survival and apoptosis of B-CLL cells in vitro. Leuk Res 2003, 27:951–956.

77. Grever, M.R., Lucas, D.M., Johnson, A.J. et al. Novel agents and strategies for treatment of p53-defective chronic lymphocytic leukemia. Best Pract Res Clin Haematol. 2007; 20: 545–556.
78. Gurbity Pálfi T, Fésüs V et al. State of the art molecular diagnostics and therapy of chronic lymphocytic leukaemia in the era of new targeted therapies, Orv Hetil. 2017 Oct;158(41):1620-1629.
79. Haferlach C, Dicker F, Weiss T et al. Toward a comprehensive prognostic scoring system in chronic lymphocytic leukemia based on a combination of genetic parameters, Genes Chromosomes and Cancer, 2010;49; 9: 851–859.
80. Haferlach C, Dicker F et al. Comprehensive genetic characterization of CLL: a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgV(H) status and immunophenotyping. Leukemia. 2007 Dec;21(12):2442-51.
81. Hallek M, Fischer K et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. Lancet. 2010 Oct 2;376(9747):1164-74.
82. Hallek M, Wanders L et al. Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. Leuk Lymphoma. 1996 Aug;22(5-6):439-47.
83. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. Am J Hematol. 2017 Sep;92(9):946-965.
84. Hallek M, Cheson BD et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. Blood. 2018 Jun 21;131(25):2745-2760.
85. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. Blood. 2008;111(12):5446-5456.
86. Hamblin T. Is Chronic Lymphocytic leukemia one disease? Hematlogica 2002;87(12):1235-1238.
87. Hamblin T., Historical aspects of chronic lymphocytic leukaemia, Br J Haematol. 200;111(4):1023-34,
88. Hamblin TJ, Davis Z et al. Unmutated IgV(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. Blood 1999, 940:1848–1854.

89. Hamblin TJ, Orchard JA et al. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. Blood. 2002 Feb 1;99(3):1023-9.
90. Hamblin TJ, Oscier DG et al, Autoimmunity in chronic lymphocytic leukaemia. J Clin Pathol 1986, 39:713.
91. Hamblin TJ. Achieving optimal outcomes in chronic lymphocytic leukaemia. Drugs. 2001;61(5):593-611.
92. Hamblin, T.J., Orchard, J.A., Ibbotson, R.E. et al. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. Blood. 2002; 99: 1023–1029.
93. Hanada, M., Delia, D., Aiello, A. et al. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Blood. 1993; 82: 1820–1828.
94. Hanlon K, Harries LW et al. Evaluation of 13q14 status in multiple myeloma by digital single nucleotide polymorphism technology. J Mol Diagn. 2009 Sep;11(5):450-7.
95. Hayakawa K, Formica AM et al. Early generated B1 B cells with restricted BCRs become chronic lymphocytic leukemia with continued c-Myc and low Bmf expression. Journal of Experimental Medicine. 2016; 213, 3007–3024.
96. Hayakawa K, Formica AM et al. Loss of a chromosomal region with synteny to human 13q14 occurs in mouse chronic lymphocytic leukemia that originates from early-generated B-1 B cells. Leukemia. 2016 Jul;30(7):1510-9.
97. Hayat A, O'Brien D et al. CD38 expression level and pattern of expression remains a reliable and robust marker of progressive disease in chronic lymphocytic leukemia. Leuk Lymphoma 2006;47(11):2371e9.
98. Hayyan M, Hashim MA et al. Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. Chem Rev. 2016 Mar 9;116(5):3029-85.
99. Heim S, Mitelman F et al. Cancer Cytogenetics: Chromosomal and Molecular Genetic Aberrations of Tumor Cells, Fourth Edition. 2015, Print ISBN: 9781118795538.
100. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. N Engl J Med. 2003 Nov 20;349(21):2042-54.

101. Hernández JA, Rodríguez AE et al. A high number of losses in 13q14 chromosome band is associated with a worse outcome and biological differences in patients with B-cell chronic lymphoid leukemia. Haematologica. 2009 Mar;94(3):364-71.

102. Hernandez JM, Mecucci C et al.Cytogenetic analysis of B cell chronic lymphoid leukemias classified according to morphologic and immunophenotypic (FAB) criteria. Leukemia. 1995 Dec;9(12):2140-6.

103. Hill VK, Jung-Sik K, Waldman T et al. Cohesin mutations in human cancer. Biochim Biophys Acta. 2016;1866(1):1-11.

104. Humbert R, Adler DA, Disteche CM, et al. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. Nat Genet. 1993;3(1):73–6.

105. Ilvesaro JM, Merrell MA, Li L, Wakchoure S, et al. Toll-like receptor 9 mediates CpG oligonucleotide-induced cellular invasion. Mol Cancer Res. 2008;6:1534–43.

106. J Natl Cancer Inst. 1999 May 19;91(10):861-8. Chemotherapeutic options in chronic lymphocytic leukemia: a meta-analysis of the randomized trials. CLL Trialists' Collaborative Group.

107. J.I. Martin Subero, Vienna Austria june 11-14,2015 Hematology education, program for the annual congress of the europian hematology association 2015;9:75-82.

108. Jafari Ghahfarokhi H, Ashoori S et al. ZAP70 Expression Within del6q21, del11q13 and del17p13 Cytogenetic Subgroups of Iranian Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. Iran Red Crescent Med J. 2014 Nov 16;16(11):e22528.

109. Jamroziak K, Puła B et al. Current Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia. Curr Treat Options Oncol. 2017 Jan;18(1):5.

110. Jelinek DF, Tschumper RC et al. Analysis of clonal B-cell CD38 and immunoglobulin variable region sequence status in relation to clinical outcome for B-chronic lymphocytic leukaemia. Br J Haematol 2001;115(4):854-861.

111. Johnston JB. Chronic lymphocytic leukemia. In: Greer JP, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader BE (eds) Wintrobe’s clinical hematology. 11th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2003:2429–2463.

112. Josefsson P, Geisler CH CLLU1 expression analysis adds prognostic information to risk prediction in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2007 Jun 1;109(11):4973-9.

113. Juliusson G, Oscier DG et al. Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. N Engl J Med. 1990 Sep 13;323(11):720-4.

114. Kanduri, M., Cahill, N., Goransson, H. et al. Differential genome-wide array-based methylation profiles in prognostic subsets of chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2010; 115: 296–305.

115. Karakosta M, Delicha EM et al. Association of various risk factors with chronic lymphocytic leukemia and its cytogenetic characteristics Arch Environ Occup Health. 2016 Nov;71(6):317-329

116. Karakosta M, Tsakiridou A et al. Deletion of 5q as a rare abnormality in chronic lymphocytic leukemia. Cancer Genet Cytogenet. 2010 Jul 15;200(2):175-9.

117. Kiall S, Choudhury A et al. Signaling molecules and cytokine production in T cells of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL): Comparison of indolent and progressive disease. Med Oncol 2005, 22:291–302.

118. Kipps TJ, Carson DA. Autoantibodies in chronic lymphocytic leukemia and related systemic autoimmune disease. Blood 1993, 81:2475–2487.

119. Kipps TJ. The B-cell receptor and ZAP-70 in chronic lymphocytic leukemia.Best Pract Res Clin Haematol. 2007 Sep;20(3):415-24.

120. Klein U, Lia M et al. The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. Cancer Cell. 2010 Jan 19;17(1):28-40.

121. Köhnke T, Wittmann VK et al. Diagnosis of CLL revisited: increased specificity by a modified five-marker scoring system including CD200. Br J Haematol. 2017 Nov;179(3):480-487.

122. Krajinovic M, Sinnett H, Richer C et al. Role of NQO1, MPO and CYP2E1 genetic polymorphisms in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. Int J Cancer. 2002;97:230–236.

123. Kröber A, Seiler T et al. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2002 Aug 15;100(4):1410-1416.

124. Kujawski L, Ouillette P et al. Genomic complexity identifies patients with aggressive chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2008 Sep 1;112(5):1993-2003.

125. Kulis M, Heath S et al. Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. Nat Genet. 2012 Nov;44(11):1236-1242.

126. Kuss BJ, Tam CS et al. Management of high risk chronic lymphocytic leukaemia (CLL) patients in Australia. Intern Med J. 2017 Dec;47 Suppl 6:5-10.

127. Landau DA, Wu CJ. Chronic lymphocytic leukemia: molecular heterogeneity revealed by high-throughput genomics. Genome Med. 2013 May 29;5(5):47.

128. Lavin MF. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008 Oct;9(10):759-69.

129. Lawrence MS et al. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med. 2011 Dec 29;365(26):2497-506.

130. Leviev I, Deakin S, James RW. Decreased stability of the M54 isoform of paraoxonase as a contributory factor to variations in human serum paraoxonase concentrations. J Lipid Res. 2001;42:528–35.

131. Liang X, Moseman EA, Farrar MA, Bachanova V, Weisdorf DJ, et al. Toll-like receptor 9 signaling by CpG-B oligo-deoxynucleotides induces an apoptotic pathway in human chronic lymphocytic leukemia B cells. Blood. 2010;115:5041–52

132. Lichter P, Cremer T et al. Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. Hum Genet. 1988 Nov;80(3):224-34.

133. Lin, K., Sherrington, P.D., Dennis, M. et al. Relationship between p53 dysfunction, CD38 expression, and IgV(H) mutation in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2002; 100: 1404–1409.

134. Lipsanen, V., Leinonen, P., Alhonen, L. et al. Hypomethylation of ornithine decarboxylase gene and erb-A1 oncogene in human chronic lymphatic leukemia. Blood. 1988; 72: 2042–2044.

135. Liu Y, Corcoran M et al. Cloning of two candidate tumor suppressor genes within a 10 kb region on chromosome 13q14, frequently deleted in chronic lymphocytic leukemia. Oncogene. 1997 Nov 13;15(20):2463-73.

136. Lyko, F., Stach, D., Brenner, A. et al. Quantitative analysis of DNA methylation in chronic lymphocytic leukemia patients. Electrophoresis. 2004; 25: 1530–1535.

137. Magnac, C., Porcher, R., Davi, F. et al. Predictive value of serum thymidine kinase level for Ig-V mutational status in B-CLL. Leukemia. 2003; 17: 133–137.

138. Malek SN. The biology and clinical significance of acquired genomic copy number aberrations and recurrent gene mutations in chronic lymphocytic leukemia.Oncogene. 2013 Jun 6; 32(23):2805-17.

139. Manzel L, Macfarlane DE. CpG-oligodeoxynucleotide-resistant variant of WEHI 231 cells. J Leukoc Biol. 1999;66:817–21.

140. Marasca R, Maffei R et al. Clinical heterogeneity of de novo 11q deletion chronic lymphocytic leukaemia: prognostic relevance of extent of 11q deleted nuclei inside leukemic clone. Hematol Oncol. 2013 Jun;31(2):88-95.

141. Marasca R, Maffei R et al. Clinical heterogeneity of de novo 11q deletion chronic lymphocytic leukaemia: prognostic relevance of extent of 11q deleted nuclei inside leukemic clone. Hematol Oncol. 2013 Jun;31(2):88-95.

142. Martín-Subero JI, López-Otín C et al. Genetic and epigenetic basis of chronic lymphocytic leukemia. Curr Opin Hematol. 2013 Jul;20(4):362-8.

143. Matutes E, Polliack A. Morphological and immunophenotypic features of chronic lymphocytic leukemia. Rev Clin Exp Hematol. 2000 Mar;4(1):22-47.

144. Matutes E, Oscier D et al. Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients. Br J Haematol. 1996 Feb;92(2):382-8.

145. Matutes E, Owusu-Ankomah K et al. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. Leukemia. 1994 Oct;8(10):1640-5.

146. Mayr C, Speicher MR et al. Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2006 Jan 15;107(2):742-51.

147. Mercurio, C., Minucci, S., and Pelicci, P.G. Histone deacetylases and epigenetic therapies of hematological malignancies. Pharmacol Res. 2010; 62: 18–34.

148. Mertens D, Wolf S et al. Allelic silencing at the tumor-suppressor locus 13q14.3 suggests an epigenetic tumor-suppressor mechanism. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 May 16;103(20):7741-6.

149. Mertens, D., Wolf, S., Schroeter, P. et al. Down-regulation of candidate tumor suppressor genes within chromosome band 13q14.3 is independent of the DNA methylation pattern in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2002; 99: 4116–4121.

150. Merup M, Juliusson G et al. Amplification of multiple regions of chromosome 12, including 12q13-15, in chronic lymphocytic leukaemia. Eur J Haematol. 1997 Mar;58(3):174-80.

151. Messmer BT, Messmer D et al. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. J Clin Invest 2005, 115:755–764.

152. Migliazza A, Bosch F et al. Nucleotide sequence, transcription map, and mutation analysis of the 13q14 chromosomal region deleted in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2001 Apr 1;97(7):2098-104.

153. Miller CR, Heerema NA,. Culture and Harvest of CpG-Stimulated Peripheral Blood or Bone Marrow in Chronic Lymphocytic Leukemia. Methods Mol Biol. 2019;1881:27-34

154. Mina A, Sandoval Sus J et al. Using prognostic models in CLL to personalize approach to clinical care: Are we there yet? Blood Rev. 2018 Mar;32(2):159-166

155. Minot GR, Isaacs R. Lymphatic leukemia: age incidence, duration and benefit derived from irradiation. Boson Med Surg Jour 1924;191:1-10.

156. Moreau EJ, Matutes E et al. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). Am J Clin Pathol. 1997;108(4):378-82.

157. Mosca L, Fabris S et al. Integrative genomics analyses reveal molecularly distinct subgroups of B-cell chronic lymphocytic leukemia patients with 13q14 deletion. Clin Cancer Res. 2010 Dec 1;16(23):5641-53.

158. Mould S.J. et al. Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. Blood. 2002; 100: 1177–1184.

159. Mullenders J, Aranda-Orgilles B, Lhoumaud P, et al. Cohesin loss alters adult hematopoietic stem cell homeostasis, leading to myeloproliferative neoplasms. The Journal of Experimental Medicine. 2015;212(11):1833-1850.

160. Muñoz L, Lasa A et al. Comparative analysis of ZAP-70 expression and Ig VH mutational status in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Cytometry B Clin Cytom. 2007 Mar;72(2):96-102. Iran Red Crescent Med J. 2014 Nov 16;16(11):e22528.

161. Nana-Sinkam, S.P. and Croce, C.M. MicroRNA in chronic lymphocytic leukemia: transitioning from laboratory-based investigation to clinical application. Cancer Genet Cytogenet. 2010; 203: 127–133.

162. NCI, National Cancer Institute "Leukemia". 2014. "What You Need To Know About™ Leukemia".

163. NCI, National Cancer Institute "Leukemia". 2014. "A Snapshot of Leukemia".

164. Nicoloso, M.S., Kipps, T.J., Croce, C.M. et al. MicroRNAs in the pathogeny of chronic lymphocytic leukaemia. Br J Haematol. 2007; 139: 709–716.

165. Nik-Zainal S, Alexandrov LB et al. Mutational processes molding the genomes of 21 breast cancers. Cell. 2012 May 25;149(5):979-93.

166. Nik-Zainal S, Van Loo P et al. The life history of 21 breast cancers. Cell. 2012 May 25;149(5):994-1007,

167. Orchard JA, Ibbotson RE et al. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. Lancet. 2004 Jan 10;363(9403):105-11.

168. Oscier D, Wade R et al. Prognostic factors identified three risk groups in the LRF CLL4 trial, independent of treatment allocation. Haematologica. 2010 Oct;95(10):1705-12.

169. Oscier DG, Rose-Zerilli MJ et al. The clinical significance of NOTCH1 and SF3B1 mutations in the UK LRF CLL4 trial. Blood 2013;121(3):468e75.

170. Oscier, D.G., Gardiner, A.C., Mould, S.J. et al. Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. Blood. 2002; 100: 1177–1184

171. Ouillette P, Erba H et al. Integrated genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia identifies subtypes of deletion 13q14. Cancer Res. 2008 Feb 15;68(4):1012-21.

172. Pallasch, C.P., Patz, M., Park, Y.J. et al. miRNA deregulation by epigenetic silencing disrupts suppression of the oncogene PLAG1 in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2009; 114: 3255–3264.

173. Panayiotidis P, Jones D et al. Human bone marrow stromal cells prevent apoptosis and support the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro. Br J Haematol 1996, 92:97–103.

174. Papageorgiou, S.G., Lambropoulos, S., Pappa, V. et al. Hypermethylation of the p15INK4B gene promoter in B-chronic lymphocytic leukemia. Am J Hematol. 2007; 82: 824–825.

175. Papakonstantinou N, Mpelessi C. Chronic Lympocytic Leukemia: biology and prognostic markers. Haema 2013; 4(2):135-143

176. Parker H, Rose-Zerilli MJ et al.13q deletion anatomy and disease progression in patients with chronic lymphocytic leukemia. Leukemia. 2011 Mar;25(3):489-97.

177. Patz, M., Pallasch, C.P., and Wendtner, C.M. Critical role of microRNAs in chronic lymphocytic leukemia: overexpression of the oncogene PLAG1 by deregulated miRNAs. Leuk Lymphoma. 2010;51: 1379–1381.

178. Pfeifer D, Pantic M et al. Genome-wide analysis of DNA copy number changes and LOH in CLL using high-density SNP arrays. Blood. 2007 Feb 1;109(3):1202-10.

179. Pleasance ED, Stephens PJ et al. A small-cell lung cancer genome with complex signatures of tobacco exposure. Nature. 2010 Jan 14;463(7278):184-90.

180. Précourt LP, Amre D et al. The threegene paraoxonase family: physiologic roles, actions and regulation. Atherosclerosis. 2011 Jan;214(1):20-36.

181. Puente XS. Pinyol M, Quesada V et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia, Nature, 2011;475; 7354:101–105.

182. Puiggros A, Blanco G, Espinet B. Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia: where we are and where we go. Biomed Res Int. 2014;2014:435983.

183. Quesada V, Conde L et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. Nat Genet. 2011 Dec 11;44(1):47-52.

184. Quesada V, Ramsay AJ et al. The genomic landscape of chronic lymphocytic leukemia: clinical implications. BMC Med. 2013 May 9;11:124.

185. Rahmatpanah F.B. Carstens, S., Hooshmand, S.I. et al. Large-scale analysis of DNA methylation in chronic lymphocytic leukemia. Epigenomics. 2009; 1: 39–61.

186. Ramsay AJ, Rodríguez D et al. Frequent somatic mutations in components of the RNA processing machinery in chronic lymphocytic leukemia. Leukemia. 2013 Jul;27(7):1600-3.

187. Rankin S, Complex elaboration: making sense of meiotic cohesin dynamics, FEBS J. 2015;282(13):2426-43.

188. Raval, A., Lucas, D.M., Matkovic, J.J. et al. TWIST2 demonstrates differential methylation in immunoglobulin variable heavy chain mutated and unmutated chronic lymphocytic leukemia. J Clin Oncol. 2005; 23: 3877–3885.

189. Raval, A., Tanner, S.M., Byrd, J.C. et al. Downregulation of death-associated protein kinase 1 (DAPK1) in chronic lymphocytic leukemia. Cell. 2007; 129: 879–890.

190. Raveche ES, Salerno E et al. Abnormal microRNA-16 locus with synteny to human 13q14 linked to CLL in NZB mice. Blood. 2007 Jun 15;109(12):5079-86.

191. Rawstron A.C. Monoclonal B cell Lymphocytosis ASH 2009; 430-439.

192. Rigolin GM, Saccenti E et al. In chronic lymphocytic leukaemia with complex karyotype, major structural abnormalities identify a subset of patients with inferior outcome and distinct biological characteristics. Br J Haematol. 2018 Apr;181(2):229-233.

193. Robak T. et al. Inhibitors of B-Cell receptor signaling for the treatment of chronic lymphocytic leukemia J. Leuk., 1 (2013), p. 101.

194. Robertson, K.D. and Jones, P.A. DNA methylation: past, present and future directions.Carcinogenesis. 2000; 21: 461–467.

195. Rodríguez AE, Hernández JA et al. Molecular characterization of chronic lymphocytic leukemia patients with a high number of losses in 13q14. PLoS One. 2012;7(11):e48485.

196. Rodríguez D, Bretones G, Arango JR et al. Molecular pathogenesis of CLL and its evolution, Int J Hematol. 2015;101(3):219-28.

197. Rodríguez-Vicente AE, Díaz MG, et al. Chronic lymphocytic leukemia: a clinical and molecular heterogenous disease Cancer Genet., 206 (2013), p. 49.

198. Rossi D, Rasi S, Spina V et al. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia, Blood, 2013;121;8:1403– 1412.

199. Rossi D, Cerri M et al.The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del17p13: implications for overall survival and chemorefractoriness. Clin Cancer Res. 2009 Feb 1;15(3):995-1004.

200. Roussou P, Tzoura E. B-chronic lymphocytic leukemia – latest developments, Athens Medical Society www.mednet.gr/archives, ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE: ISSN 11-05-3992. 2008, 25(1):60¯72.

201. Rowswell-Turner RB, Barr PM. Treatment of chronic lymphocytic leukemia in older adults. J Geriatr Oncol. 2017;S1879-4068(17)30068-1.

202. Rozovski U et al. Personalized medicine in CLL: current status and future perspectives Cancer Lett. 2014;28;352(1):4-14.

203. Rozovski U, Hazan-Halevy I et al. Personalized medicine in CLL: current status and future perspectives. Cancer Lett. 2014 Sep 28;352(1):4-14.

204. Rush, L.J., Raval, A., Funchain, P. et al. Epigenetic profiling in chronic lymphocytic leukemia reveals novel methylation targets. Cancer Res. 2004; 64: 2424–2433.

205. Samimi A, Kalantari H. et al. Oxidative stress in normal hematopoietic stem cells and leukemia. APMIS. 2018 Apr;126(4):284-294.

206. Sarkar M, Liu Y et al. Targeting Stereotyped B Cell Receptors from Chronic Lymphocytic Leukemia Patients with Synthetic Antigen Surrogates.J Biol Chem. 2016 Apr 1;291(14):7558-70.

207. Schroeder HW Jr, Dighiero G. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. Immunol Today. 1994 Jun;15(6):288-94.

208. Schroeder HW Jr, Zoon KC et al. The launch of the American Journal of Clinical and Experimental Immunology. Am J Clin Exp Immunol. 2012 Jun 21;1(1):i. Print 2012.

209. Schuh A, Becq J et al. Monitoring chronic lymphocytic leukemia progression by whole genome sequencing reveals heterogeneous clonal evolution patterns. Blood. 2012 Nov 15;120(20):4191-6.

210. Schwaenen C, Nessling M et al. Automated array-based genomic profiling in chronic lymphocytic leukemia: development of a clinical tool and discovery of recurrent genomic alterations. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jan 27;101(4):1039-44.

211. Schweighofer CD, Huh YO et al. The B cell antigen receptor in atypical chronic lymphocytic leukemia with t(14;19)(q32;q13) demonstrates remarkable stereotypy. Int J Cancer. 2011 Jun 1;128(11):2759-64.

212. Seymour JF, Kipps TJ et al.Venetoclax-Rituximab in Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. N Engl J Med. 2018 Mar 22;378(12):1107-1120.

213. Shanafelt TD, Witzig TE et al. Prospective evaluation of clonal evolution during long-term follow-up of patients with untreated early-stage chronic lymphocytic leukemia. J Clin Oncol. 2006 Oct 1;24(28):4634-41.

214. Shciemann WP, Rotzer D et al. Transforming growth factor-beta (TGF-beta)-resistant B cells from chronic lymphocytic leukemia patients contain recurrent mutations in the signal sequence of the type I TGFbeta receptor. Cancer Detect Prev 2004, 28:57–64.

215. Slager SL, Benavente Y, Blair A, et al. Medical history, lifestyle, family history, and occupational risk factors for chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma: the InterLymph Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes Project. J. Natl. Cancer Inst. Monogr. 2014;48:41-51.

216. Solomon DA, Kim J-S, Waldman T. Cohesin gene mutations in tumorigenesis: from discovery to clinical significance. BMB Reports. 2014;47(6):299-310.

217. Speedy HE, Di Bernardo MC et al. A genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia. Nat Genet. 2014 Jan;46(1):56-60.

218. Sportoletti P, Baldoni S et al A revised NOTCH1 mutation frequency still impacts survival while the allele burden predicts early progression in chronic lymphocytic leukemia.. Leukemia. 2014 Feb; 28(2):436-9.

219. Stach, D., Schmitz, O.J., Stilgenbauer, S. et al. Capillary electrophoretic analysis of genomic DNA methylation levels. Nucleic Acids Res. 2003; 31: E2.

220. Stamatopoulos K, Agathangelidis A et al. Antigen receptor stereotypy in chronic lymphocytic leukemia.Leukemia. 2017 Feb;31(2):282-291.

221. Sthoeger ZM, Sthoeger D et al. Mechanism of autoimmune hemolytic anemia in chronic lymphocytic leukemia. Am J Hematol 1993, 43:259–264.

222. Stilgenbauer S, Dohner H. Molecular genetics and its clinical relevance. Hematol Oncol Clin North Am 2004, 18:827–848.

223. Stilgenbauer S, Bullinger Let al. Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and V(H) gene mutation status in pathogenesis and clinical course. Leukemia. 2002 Jun;16(6):993-1007.

224. Stilgenbauer S, Sander S et al. Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia: acquisition of high-risk genomic aberrations associated with unmutated VH, resistance to therapy, and short survival. Haematologica. 2007 Sep;92(9):1242-5.

225. Stilgenbauer S, Bullinger L et al. Incidence and clinical significance of 6q deletions in B cell chronic lymphocytic leukemia. Leukemia. 1999 Sep;13(9):1331-4.

226. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press; 2008.

227. Swerdlow SH, Campo E et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. Blood. 2016 May 19;127(20):2375-90.

228. Tari K, Shamsi Z, et al. The role of the genetic abnormalities, epigenetic and microRNA in the prognosis of chronic lymphocytic leukemia. Exp Oncol. 2018 Dec;40(4):261-267.

229. Thota S, Viny AD, Makishima H, et al. Genetic alterations of the cohesin complex genes in myeloid malignancies. Blood. 2014;124(11):1790-1798.

230. Tomatir AG, Pehlivan S, Sahin HH et al. Q192R and L55M Polymorphisms of Paraoxonase 1 Gene in Chronic Myelogenous Leukemia and Chronic Lymphocytic Leukemia. Anticancer Res. 2015;35(9):4807-12.

231. Tsirigotis, P., Pappa, V., Labropoulos, S. et al. Mutational and methylation analysis of the cyclin-dependent kinase 4 inhibitor (p16INK4A) gene in chronic lymphocytic leukemia. Eur J Haematol. 2006; 76: 230–236.

232. Tsukada N, Burger JA et al. Distinctive features of “nurse-like” cells that differentiate in the context of chronic lymphocytic leukemia. Blood 2002, 99:1030–1037.

233. Van Bockstaele F, Verhasselt B et al. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia: a comprehensive review.Blood Rev. 2009 Jan;23(1):25-47.

234. Van Dyke DL, Shanafelt TD et al. A comprehensive evaluation of the prognostic significance of 13q deletions in patients with B-chronic lymphocytic leukaemia. Br J Haematol. 2010 Feb;148(4):544-50.

235. Wahlfors, J., Hiltunen, H., Heinonen, K. et al. Genomic hypomethylation in human chronic lymphocytic leukemia. Blood. 1992; 80: 2074–2080.

236. Wang DM, Miao KR et al. Intermediate prognosis of 6q deletion in chronic lymphocytic leukemia. Leuk Lymphoma. 2011 Feb;52(2):230-7.

237. Wąsik-Szczepanek E, Szymczyk A et al. Richter syndrome: A rare complication of chronic lymphocytic leukemia or small lymphocytic lymphoma. Adv Clin Exp Med. 2018 Aug 29.

238. Wong, K.Y., So, C.C., Loong, F. et al. Epigenetic inactivation of the miR-124-1 in haematological malignancies. PLoS One. 2011; 6: e19027.

239. World Health Organization World Cancer Report. 2014; 5.13. ISBN 9283204298.

240. Younes A, Snell V,et al. Elevated levels of biologically active soluble CD40 ligand in the serum of patients with chronic lymphocytic leukaemia. Br J Haematol 1998, 100:135–141.

241. Yu, M.K., Bergonia, H., Szabo, A. et al. Progressive disease in chronic lymphocytic leukemia is correlated with the DNA methylation index. Leuk Res. 2007; 31: 773–777.

242. Yuille, M.R., Condie, A., Stone, E.M. et al. TCL1 is activated by chromosomal rearrangement or by hypomethylation. Genes Chromosomes Cancer. 2001; 30: 336–341.

243. Zenz T, Mertens D et al. From pathogenesis to treatment of Chronic Lymphocytic leukemia. Nature Reviews Cancer 2009;10:37-50.

244. Zenz T, Vollmer D et al. TP53 mutation profile in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a disease specific profilefrom a comprehensive analysis of 268 mutations. Leukemia. 2010 Dec;24(12):2072-9.

245. Zenz T, Mertens D et al. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. Nat Rev Cancer. 2010 Jan;10(1):37-50.

246. Zenz T, Mertens D et al. Importance of genetics in chronic lymphocytic leukemia. Blood Rev. 2011 May;25(3):131-7.

247. Zenz T, Kröber A et al. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. Blood. 2008 Oct 15;112(8):3322-9.

248. Ziech D, Franco R et al. Reactive oxygen species (ROS)--induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. Mutat Res. 2011 Jun 3;711(1-2):167-73.