



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ

ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ- ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΝΕΩΝ
ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ
RNase κ ΣΕ ΛΕΥΧΑΙΜΙΕΣ**

ΜΕΪΝΤΑΝΗ ΑΓΓΕΛΙΚΗ
ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΣ ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2018



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ

ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ- ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΝΕΩΝ
ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ
RNase κ ΣΕ ΛΕΥΧΑΙΜΙΕΣ**

ΜΕΪΝΤΑΝΗ ΑΓΓΕΛΙΚΗ
ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΣ ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2018



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ & ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗ ΚΑΘΗΓΗΤΗ

Κ.ΣΙΔΕΡΗ ΔΙΑΜΑΝΤΗ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΝΕΩΝ
ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ
RNase κ ΣΕ ΛΕΥΧΑΙΜΙΕΣ**

ΜΕΪΝΤΑΝΗ ΑΓΓΕΛΙΚΗ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: κ. ΣΙΔΕΡΗΣ ΔΙΑΜΑΝΤΗΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

1. ΣΙΔΕΡΗΣ ΔΙΑΜΑΝΤΗΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
2. ΣΚΟΡΙΛΑΣ ΑΝΔΡΕΑΣ, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
3. ΚΟΝΤΟΣ ΧΡΗΣΤΟΣ, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2018

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στον Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ, στο πλαίσιο του Δ.Π.Μ.Σ. «Κλινική Βιοχημεία- Μοριακή Διαγνωστική», υπό την επίβλεψη του Αναπλ. Καθηγητή κ. Σίδηρη Διαμάντη. Οι πειραματικές διαδικασίες έλαβαν χώρα στον εργαστηριακό χώρο του κ. Σίδηρη, τον οποίο ευχαριστώ θερμά για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στο χώρο του και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε σε όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας. Τον ευχαριστώ, επίσης, για τη βοήθειά του, την καθοδήγησή του και τις συμβουλές του σε όλη την πορεία μου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ. Γουργιώτη Δημήτριο για τη συνεργασία του και τη συμβολή του στη διεξαγωγή των παρακάτω πειραμάτων, όπως και την υποψήφια διδάκτορα Μαριέτα Ξαγοράρη του Εργαστηρίου Κλινικής Βιοχημείας - Μοριακής Διαγνωστικής, της Β΄ Παιδιατρικής Κλινικής του Νοσοκομείου Παίδων "Π&Α Κυριακού" (Ιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ) του Καθηγητή κ. Γουργιώτη Δημητρίου, για την πολύτιμη βοήθειά της. Τους ευχαριστώ για τη συλλογή των δειγμάτων των ασθενών με ΟΛΛ, την καταγραφή των κλινικοπαθολογικών δεδομένων των ασθενών και τη διάθεση του χώρου τους για την εκπόνηση μέρους των πειραμάτων.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω και στην τριμελή επιτροπή, στον Καθηγητή κ. Σκορίλα και στον Επίκουρο Καθηγητή κ. Κοντό, του Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Ε.Κ.Π.Α, οι οποίοι δέχτηκαν να διαβάσουν και να αξιολογήσουν την παρούσα εργασία.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στο Δρ. Αυγέρη Μαργαρίτη του Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Ε.Κ.Π.Α, για την άμεση συνεργασία του και την καθημερινή του καθοδήγηση σε πειραματικό επίπεδο. Τον ευχαριστώ, επίσης, για τη συμβολή του στη συγγραφή της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας και τις ουσιαστικές παρατηρήσεις που μου προσέφερε.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της ερευνητικής ομάδας του κ. Σίδηρη, την υποψήφια διδάκτορα Κοκκινοπούλου Ιωάννα για τη συνολική της βοήθεια στο χώρο του εργαστηρίου, τη συνάδελφο Λεονταρίτη Μαρία και τις προπτυχιακές φοιτήτριες Μακρή Χαρά και Χριστοπούλου Νίκη για το άριστο κλίμα,

την ευχάριστη συνεργασία και την εν γένει βοήθειά τους. Ευχαριστώ πολύ όλα τα μέλη του Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος για τη συνεργασία τους σε όλη τη διάρκεια διεξαγωγής των παρακάτω πειραμάτων.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1. ΛΕΥΧΑΙΜΙΕΣ	1
1.2. ΧΡΟΝΙΕΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΕΣ	3
1.2.1. ΧΡΟΝΙΑ ΜΥΕΛΟΕΙΔΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ	3
1.2.2. ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ	6
1.3. ΟΞΕΙΕΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΕΣ	8
1.3.1. ΟΞΕΙΑ ΜΥΕΛΟΕΙΔΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ	8
1.3.2. ΟΞΕΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ	10
1.3.2.1. Εισαγωγικά Σημεία	10
1.3.2.2. Διάγνωση της ΟΛΛ	12
1.3.2.3. Κατηγοριοποίηση της ΟΛΛ	13
1.3.2.4. Οξεία T- λεμφοκυτταρική λευχαιμία	14
1.3.2.5. Οξεία T λεμφοκυτταρική λευχαιμία της παιδικής ηλικίας	17
1.3.2.6. Οξεία B- λεμφοκυτταρική λευχαιμία	18
1.3.2.8. Υποτροπιάζουσα οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία	23
1.3.2.9. Διαχωρισμός ασθενών με ΟΛΛ κατά BFM	25
1.3.2.10. Θεραπεία ασθενών με ΟΛΛ	26
1.4. ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ	28
1.4.1. ΔΡΑΣΗ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΩΝ	29
1.4.2. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΩΝ	32
1.4.3. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗΣ Κ	34
1.4.3.1. Η ανθρώπινη ριβονουκλεάση κ: Δομή και Δράση	35
1.4.4. ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ	37
1.5. ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΟ ΜΑΤΙΣΜΑ	39
1.5.1. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΜΑΤΙΣΜΑΤΟΣ	39
1.5.2. ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΗ ΣΥΡΡΑΦΗ	41
1.6. ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	45
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	46
2.1. ΥΛΙΚΑ	46
2.1.1. ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	46
2.1.2. ΧΗΜΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ	46
2.1.3. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ	46
2.1.4. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ	47
2.1.5. ENZYMA	47
2.1.6. ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ	48

2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ	49
2.2.1. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	49
2.2.1.1. Απόψυξη	49
2.2.1.2. Ανακαλλιέργεια (Split).....	49
2.2.1.3. Ψύξη.....	50
2.2.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA	51
2.2.2.1. Απομόνωση RNA Κυττάρων	51
2.2.2.2. Απομόνωση RNA Μυελού των Οστών	52
2.2.3. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΟΥ RNA	53
2.2.4. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΟΥ RNA	53
2.2.5. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)	54
2.2.5.1. Αντίδραση Αντίστροφης Μεταγραφής (RT).....	56
2.2.5.2. PCR και Nested PCR	58
2.2.5.3. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real – Time PCR)	59
2.2.6. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	63
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	65
3.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA	65
3.1.1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ RNA..	65
3.1.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ RNA ΚΥΤΤΑΡΩΝ	65
3.2. ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΥ 14 ΜΕ PCR ΚΑΙ NESTED PCR	66
3.3. ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ 1, 4 ΚΑΙ 14 ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΟΛΛ	67
3.3.1. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΥ 1, ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΥ 4 ΚΑΙ ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΥ 14 ΣΕ ΠΑΙΔΙΚΕΣ ΟΛΛ.....	70
3.3.2. ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΑΝΑΦΟΡΑΣ <i>HPRT-1</i>	71
3.3.3. ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΥ 1 ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ RNase K	71
3.3.3.1. Μελέτη έκφρασης του μεταγράφου 1 του γονιδίου της RNase κ ως προς τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών	73
3.3.4. ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΥ 4 ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ RNase K	77
3.3.4.1. Μελέτη έκφρασης του μεταγράφου 4 του γονιδίου της RNase κ ως προς τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών	79
3.3.5. ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΥ 14 ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ RNase K	84
3.3.5.1. Μελέτη έκφρασης του μεταγράφου 14 του γονιδίου της RNase κ ως προς τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών	85

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	91
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	103

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΛΕΥΧΑΙΜΙΕΣ

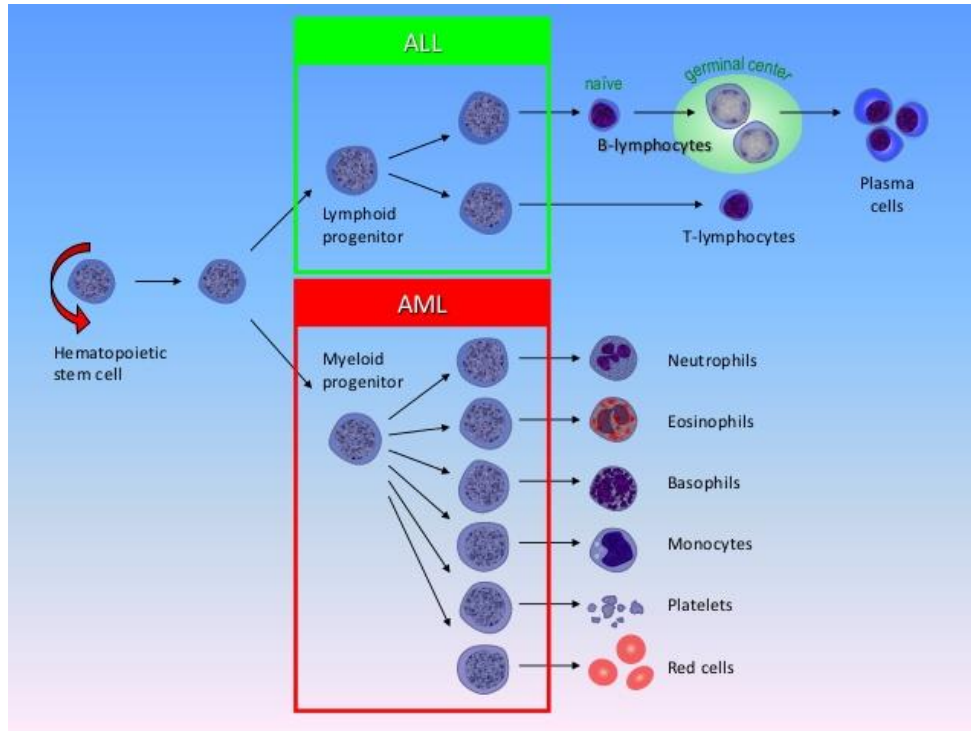
Η λευχαιμία είναι ένας όρος που αναφέρεται σε ένα φάσμα αιματολογικών νεοπλασιών, οι οποίες ξεκινούν σε ιστούς που παράγουν το αίμα, όπως ο μυελός των οστών, με κύριο παθολογικό σύμπτωμα την ανεξέλεγκτη παραγωγή μεγάλου αριθμού άωρων κυττάρων του αίματος και την είσοδο τους στην κυκλοφορία [1]. Ο πολλαπλασιασμός αυτός των άωρων κυττάρων συνεχίζει στο αίμα και σε διάφορα όργανα, με αποτέλεσμα να παρακωλύεται η φυσιολογική αιμοποίηση. Τα κύτταρα του αίματος σχηματίζονται στον μυελό των οστών, έναν σπογγώδη ιστό που βρίσκεται μέσα στα οστά. Τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα διαιρούνται για να παράγουν είτε περισσότερα βλαστοκύτταρα, είτε ώρα κύτταρα που θα ωριμάσουν με την πάροδο του χρόνου. Ένα βλαστοκύτταρο αίματος μπορεί να γίνει μυελοειδές βλαστικό κύτταρο ή λεμφοειδές βλαστικό κύτταρο. Τα μυελοειδή βλαστικά κύτταρα στη συνέχεια μπορούν να διαφοροποιηθούν σε τρεις τύπους ώριμων αιμοποιητικών κυττάρων:

- a) Ερυθρά αιμοσφαίρια, που μεταφέρουν οξυγόνο σε όλους τους ιστούς του σώματος,
- b) Αιμοπετάλια, που σχηματίζουν θρόμβους αίματος για να σταματήσουν την αιμορραγία και
- c) Κοκκιοκύτταρα (λευκά αιμοσφαίρια), που καταπολεμούν τη μόλυνση και τις ασθένειες.

Αντιστοίχως, τα λεμφοειδή βλαστικά κύτταρα γίνονται λεμφοβλαστικά κύτταρα και αυτά με τη σειρά τους μπορούν να ωριμάσουν σε:

- a) Β λεμφοκύτταρα, που παράγουν αντισώματα για την καταπολέμηση λοιμώξεων,
- b) Τ λεμφοκύτταρα, που βοηθούν τα Β λεμφοκύτταρα να παράγουν αντισώματα έναντι λοιμογόνων παραγόντων και
- c) Φυσικά κύτταρα- φονείς, που καταπολεμούν κατά κύριο λόγο καρκινικά κύτταρα και ιούς.

Η λευχαιμία επηρεάζει τα λευκά αιμοσφαίρια και μπορεί να ταξινομηθεί ανάλογα με τον τύπο των λευκών κυττάρων που επηρεάζονται (λεμφοκυτταρική ή μυελοειδής) και από την κυτταρική τους ωριμότητα (οξεία ή χρόνια). Οι προσδιορισμοί «οξεία» και «χρόνια» δεν αναφέρονται στο πόσο σοβαρή είναι η ασθένεια αλλά στο πόσο γρήγορα εξελίσσεται [1,2].



Εικόνα 1.1. Απεικόνιση διαδικασίας φυσιολογικής αιμοποίησης και σημεία στα οποία συνήθως γίνεται λευχαιμογένεση.

Όσον αφορά τις οξείες λευχαιμίες, υπάρχει υπεράριθμη παραγωγή ανώριμων λευκών αιμοσφαιρίων, τα οποία καταλαμβάνουν αρκετό χώρο στο μυελό των οστών. Ως αποτέλεσμα, καθίσταται δύσκολη η παραγωγή αρκετών και υγιών ερυθρών αιμοσφαιρίων, τα οποία μεταφέρουν οξυγόνο, αλλά και άλλων κυτταρικών υποτύπων. Τα κύτταρα αυτά είναι μη λειτουργικά, διότι δεν έχουν φτάσει στο κατάλληλο σημείο ωρίμανσης για την αντιμετώπιση λοιμώξεων και καθίστανται κακοήθη, καθώς δεν μπαίνουν στη διαδικασία της απόπτωσης. Έτσι, αφού κατακλύσουν το μυελό των οστών, εξέρχονται στην κυκλοφορία και εισβάλουν σε άλλα όργανα του σώματος, π.χ. σπλήνα, λεμφαδένες, κεντρικό νευρικό σύστημα, κλπ., γι' αυτό και η γρήγορη αντιμετώπιση της ασθένειας κρίνεται αναγκαία. Οι οξείες μορφές λευχαιμίας συνηθίζονται στις παιδικές ηλικίες. Αντίθετα, οι χρόνιες μορφές λευχαιμίας, χαρακτηρίζονται από σχετικώς ώριμα λευκά αιμοσφαίρια, τα οποία όμως δεν είναι λειτουργικά. Χρειάζονται μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα (μήνες ή και χρόνια) για να αναπτυχθούν και να εκδηλώσουν συμπτώματα, καθώς σταδιακά αυξάνεται ο αριθμός των μη λειτουργικών αιμοσφαιρίων και εμποδίζουν την παραγωγή των αντίστοιχων φυσιολογικών. Η αντιμετώπισή τους δεν κρίνεται άμεση, αλλά οι ασθενείς παρακολουθούνται έτσι ώστε να χορηγηθεί θεραπεία την κατάλληλη χρονική στιγμή.

Οι περισσότεροι ασθενείς είναι ενήλικες, παρόλα αυτά μπορεί να αναπτυχθεί και σε μικρότερες ηλικίες [3].

Οι πρώτες ενδείξεις λευχαιμίας είναι κατά κύριο λόγο ασαφείς. Μπορούν να εμφανιστούν με άλλες καρκινικές και μη καρκινικές διαταραχές. Τα συμπτώματα ποικίλλουν και διαφέρουν για κάθε τύπο λευχαιμίας, υπάρχουν όμως ορισμένα γενικά χαρακτηριστικά που τις διέπουν. Αυτά μπορεί να είναι κούραση, αίσθημα σωματικής δυσφορίας, μη φυσιολογική αιμορραγία, μώλωπες και αδυναμία, μειωμένη ανοχή στην άσκηση, απώλεια βάρους, πόνος των οστών ή των αρθρώσεων, κοιλιακός πόνος, πυρετός και διευρυμένη σπλήνα, λεμφαδένες ή συκώτι. Εκτός από αυτά τα κλινικά συμπτώματα, παθολογικά συνηθισμένα είναι η αναιμία, η ουδετεροπενία, η λευκοπενία και η θρομβοκυτταροπενία [3].

1.2. ΧΡΟΝΙΕΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΕΣ

1.2.1. ΧΡΟΝΙΑ ΜΥΕΛΟΕΙΔΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

Η χρόνια μυελοειδής λευχαιμία (ΧΜΛ) είναι μυελοπολλαπλασιαστική ασθένεια που χαρακτηρίζεται από την υπερπαραγωγή κοκκιοκυττάρων, με αποτέλεσμα να υπάρχουν υψηλά επίπεδα λευκών αιμοσφαιρίων και σπληνομεγαλία στους ασθενείς. Με βάση τα κλινικά συμπτώματα και τα εργαστηριακά ευρήματα, η ΧΜΛ μπορεί να ταξινομηθεί σε τρεις κλινικές φάσεις, ξεκινώντας συχνά με μια χρόνια φάση, ακολουθούμενη από μια επιταχυνόμενη φάση και καταλήγοντας σε μια τελική φάση που ονομάζεται βλαστική κρίση [4]. Κατά τη χρόνια φάση, οι ασθενείς εμφανίζουν λιγότερο από 5-10 % βλαστικά κύτταρα και προμυελοκύτταρα (ανώριμα κοκκιοκύτταρα) στο αίμα και στο μυελό των οστών τους. Χαρακτηριστικό της είναι η αυξανόμενη υπερπαραγωγή των κοκκιοκυττάρων, παρόλα αυτά οι ασθενείς έχουν ήπια συμπτώματα και ανταποκρίνονται καλά στη συμβατική θεραπεία [3]. Η συγκεκριμένη φάση μπορεί να διαρκέσει από μερικούς μήνες έως και αρκετά χρόνια, για αυτό η διάγνωση γίνεται συνήθως σε αυτό το στάδιο. Εάν η νόσος δεν αντιμετωπιστεί εγκαίρως τότε προχωράει στην επιταχυνόμενη φάση, ή ακόμα και στη βλαστική εκτροπή [5]. Κατά την επιταχυνόμενη φάση, ο αριθμός των βλαστικών κυττάρων δε ξεπερνά το 30% (συνήθως 10-19%) στο αίμα και στο μυελό των οστών, τα βασεόφιλα αυξάνουν τον αριθμό τους, όπως αντίστοιχα και τα λευκά αιμοσφαίρια. Τα λευχαιμικά κύτταρα που παράγονται έχουν αρκετές χρωμοσωμικές ανωμαλίες και τα συμπτώματα του ασθενούς αρχίζουν να είναι ελαφρώς πιο έντονα. Μερικά από αυτά είναι πυρετός, αίσθηση βάρους στην κοιλιακή χώρα, ανορεξία, απώλεια βάρους, κούραση και πολλές

φορές εμφανίζουν αναιμία. Δυστυχώς, πολλοί ασθενείς σε αυτή τη φάση αδυνατούν να ανταποκριθούν στη θεραπεία [3,5]. Τέλος, όσων αφορά τη βλαστική κρίση, οι ασθενείς εμφανίζουν βλαστικά κύτταρα σε ποσοστό μεγαλύτερο του 20-30% στο αίμα και στο μυελό των οστών, με αποτέλεσμα αυτά να εξέρχονται στην κυκλοφορία και να προσβάλλουν άλλους ιστούς και όργανα. Ως αποτέλεσμα, τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών είναι πολύ πιο έντονα, με πόνους στα οστά, δυσκολίες στην αναπνοή και αίσθημα δυσφορίας, τα οποία προσομοιάζουν με επιθετική, οξεία λευχαιμία. Αν δεν αντιμετωπιστεί, η ΧΜΛ είναι θανατηφόρα για περίπου το 20% των ασθενών, παρόλα αυτά η έγκαιρη διάγνωση και κατάλληλη θεραπευτική αγωγή συμβάλουν στην εξάλειψη της φάσης αυτής [3,5].

Στο 90% των περιπτώσεων η ΧΜΛ οφείλεται σε μια αντιμετάθεση που συμβαίνει μεταξύ του χρωμοσώματος 9 και του χρωμοσώματος 22. Σε αυτή τη διαδικασία, που οφείλεται σε λάθος κατά τη διαδικασία της αντιγραφής, ένα μέρος του χρωμοσώματος 9 μεταφέρεται στο 22, και αντίστροφα. Πιο συγκεκριμένα, το τμήμα του χρωμοσώματος 9 που προστίθεται στο 22, περιέχει το γονίδιο *ABL* (πρωτο-ογκογονίδιο). Το μικρό μέρος του χρωμοσώματος 22 φέρει το γονίδιο *BCR*. Συνεπώς, σχηματίζεται ένα βραχύτερο χρωμόσωμα, γνωστό ως χρωμόσωμα Φιλαδέλφεια, το οποίο κωδικοποιεί μια υβριδική πρωτεΐνη *ABL-BCR* [5,6]. Αυτή η νέα πρωτεΐνη έχει δράση κινάσης τυροσίνης, η οποία βρίσκεται συνεχώς σε ενεργή μορφή, με αποτέλεσμα να επάγονται πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούν τον (ανεξέλεγκτο) πολλαπλασιασμό των κυττάρων [4].

Για τη διάγνωση της ΧΜΛ μπορούν να γίνουν τόσο αιματολογικές εξετάσεις, όσο και σε δείγμα από το μυελό των οστών του (πιθανού) ασθενούς. Στις εξετάσεις αίματος, ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων είναι αρκετά αυξημένος, τα ερυθρά αιμοσφαίρια σε φυσιολογικά ή μειωμένα επίπεδα, ενώ ο αριθμός των αιμοπεταλίων ποικίλει. Επιπλέον, σε επίχρισμα περιφερικού αίματος, όπου πραγματοποιείται χρώση των κυττάρων και παρατήρηση στο μικροσκόπιο, ο γιατρός μπορεί να αξιολογήσει τον αριθμό, τη μορφολογία και πιθανά πρόδρομα- παθολογικά κύτταρα. Στις εξετάσεις μυελού συμπεριλαμβάνονται [5]:

- a) Μυελόγραμμα: Λήψη μυελού των οστών με ειδική βελόνα, μελέτη επιχρίσματος σε μικροσκόπιο,

- b) Οστεομυελική βιοψία: Λήψη μικρού οστικού κυλίνδρου με ειδική βελόνα και ιστολογική εξέτασή του,
- c) Καρυότυπος: Έλεγχος χρωμοσωμάτων ως προς την ύπαρξη του χρωμοσώματος Φιλαδέλφεια, με λήψη δείγματος μυελού και καλλιέργεια κυττάρων,
- d) Φθορίζων *in situ* υβριδισμός (FISH): Χρήση φθορίζοντων ιχνηθετών που στοχεύουν το γονίδιο *ABL-BCR* και
- e) Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR): Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός του γονιδίου *ABL-BCR* [7].

Όσον αφορά τη θεραπεία της νόσου, η στρατηγική που ακολουθείται εξαρτάται από τη φάση στην οποία βρίσκεται ο ασθενής. Στη χρόνια φάση, τα φάρμακα τα οποία χορηγούνται κατά κύριο λόγο είναι αναστολείς κινασών τυροσίνης, όπως τα imatinib (Gleevec), nilotinib (Tasigna), dasatinib (Sprycel) και bosutinib (Bosulif). Εάν κάποιος αναστολέας δε δράσει, μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάποιος άλλος ως εναλλακτική λύση ή να αυξηθεί η δόση του πρώτου. Σε σπάνιες περιπτώσεις, μπορεί να γίνει μεταμόσχευση αλλογενών βλαστικών κυττάρων. Στην επιταχυνόμενη φάση, η θεραπεία εξαρτάται από το αν και τι είδους θεραπεία είχε χορηγηθεί στη χρόνια φάση της νόσου. Οι επιλογές είναι οι ίδιες, δηλαδή αλλαγή αναστολέα κινάσης τυροσίνης, μεταμόσχευση βλαστικών κυττάρων, ιντερφερόνη, ακόμα και κλασσική χημειοθεραπεία. Τέλος, στη φάση της βλαστικής κρίσης, η θεραπεία είναι ιδιαίτερα δύσκολη. Επειδή, όπως έχει προαναφερθεί, η φάση αυτή παρομοιάζει οξεία λευχαιμία, συνήθως χρησιμοποιούνται θεραπείες για οξεία μυελοειδή ή ακόμα και λεμφοβλαστική λευχαιμία. Παρόλα αυτά, η απόκριση των ασθενών είναι ιδιαίτερα χαμηλή, για αυτό συνήθως δίνεται «παρηγορητική» θεραπεία. Αυτή έχει ως στόχο όχι την ίαση της ασθένειας, αλλά την ανακούφιση από τα επίπονα για τον ασθενή συμπτώματα [8].

1.2.2. ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

Η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ) είναι η πιο κοινή λευχαιμία στη Βόρεια Αμερική και στην Ευρώπη. Πρόκειται για μια ασθένεια ενηλίκων μεγαλύτερης ηλικίας και είναι πολύ σπάνια σε άτομα που δεν έχουν συμπληρώσει το 50^ο έτος ζωής τους. Οι άνδρες είναι πιθανότερο να εκδηλώσουν την ασθένεια, σε σχέση με τις γυναίκες, σε αναλογία 2:1. Η ασθένεια συνήθως ανιχνεύεται κατά λάθος, κατά τη διάρκεια της εξέτασης άλλων προβλημάτων του ασθενούς [3]. Στη ΧΛΛ πάσχουν τα Β λεμφοκύτταρα, τα οποία έχουν από τη μία εντονότερους ρυθμούς πολλαπλασιασμού και από την άλλη, επιβιώνουν για μεγαλύτερες χρονικές περιόδους, με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται σε όλους τους λεμφικούς ιστούς. Αυτή η προοδευτική συσσώρευση των λεμφοκυττάρων, επειδή γίνεται σταδιακά, δεν εμποδίζει σε πρώτη φάση την παραγωγή των υπόλοιπων αιμοποιητικών κυττάρων, με αποτέλεσμα ο ασθενής να μην έχει καθόλου ή ήπια συμπτώματα. Αφού γίνει διάγνωση της νόσου, απαραίτητη είναι η σταδιοποίησή της, έτσι ώστε να καθοριστεί σε τι στάδιο βρίσκεται ο κάθε ασθενής. Υπάρχουν δύο συστήματα, τα οποία χρησιμοποιούνται τόσο στην Αμερική, όσο και στην Ευρώπη, και τα οποία αξιολογούν ευρήματα κυτταρολογικά, από τη γενική αίματος και την εν γένει κλινική εικόνα του ασθενούς (π.χ. διογκωμένο ήπαρ ή λεμφαδένες) [9]. Συνοπτικά παρουσιάζονται παρακάτω:

Σταδιοποίηση κατά Rai

Στάδιο	Κλινικά Ευρήματα (σε γενική αίματος)
0	Αυξημένα (μόνο) τα λεμφοκύτταρα
I	Αυξημένα λεμφοκύτταρα και διογκωμένοι λεμφαδένες
II	Αυξημένα λεμφοκύτταρα και διογκωμένο ήπαρ ή σπλήνας
III	Αιμοσφαιρίνη < 11g/dL
IV	Αιμοπετάλια <100.000

Σταδιοποίηση κατά Binet

Στάδιο	Κλινικά Ευρήματα (σε γενική αίματος)
A	Αιμοσφαιρίνη $\geq 10\text{g/dL}$, αιμοπετάλια ≥ 100.000 , < 3 διογκωμένες περιοχές
B	Αιμοσφαιρίνη $\geq 10\text{g/dL}$, αιμοπετάλια ≥ 100.000 , ≥ 3 διογκωμένες περιοχές

C	Αιμοσφαιρίνη < 10g/dL ή αιμοπετάλια < 100.000
---	---

Το στάδιο στο οποίο βρίσκεται ο ασθενής βοηθάει το γιατρό στην εκτίμηση της έκβασης της νόσου και στη λήψη της θεραπευτικής αγωγής. Τα πρώιμα στάδια, σε οποιαδήποτε από τις δύο κατηγορίες, θεωρούνται καλύτερης πρόγνωσης.

Τα λευχαιμικά B λεμφοκύτταρα παρουσιάζουν πολλές διαφορετικές μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν τη μεταβλητή περιοχή της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών. Επιπλέον, πολλές μεταλλάξεις στον υποδοχέα BCR έχουν βρεθεί, με αποτέλεσμα να επάγεται συνεχής διαφοροποίηση, πολλαπλασιασμός και παραγωγή αντισωμάτων από τα B λεμφοκύτταρα. Με το πέρασμα του χρόνου, όλο και περισσότερες μεταλλάξεις σε γονίδια αναγνωρίζονται οι οποίες έχουν άμεση επιρροή στον πολλαπλασιασμό των B λεμφοκυττάρων [10,11].

Για τη διάγνωση της ΧΛΛ γίνονται κατά κύριο λόγο αιματολογικές εξετάσεις, όπου τυχαία εμφανίζεται αυξημένος αριθμός λεμφοκυττάρων (>4000/ μL), οπότε ο ασθενής θα παραπεμφθεί σε ειδικό αιματολόγο για περαιτέρω διερεύνηση. Ο τελευταίος θα ζητήσει το ιστορικό του ασθενούς, ατομικό και οικογενειακό, θα τον εξετάσει με ψηλάφηση στις περιοχές όπου υπάρχουν λεμφαδένες και θα γράψει ειδικές αιματολογικές εξετάσεις. Η εξέταση που καθιστά οριστική τη διάγνωση της ΧΛΛ είναι η μελέτη του ανοσοφαινότυπου των λεμφοκυττάρων, με τη βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής. Η εξέταση αυτή αναδεικνύει την πιθανή κυκλοφορία B λεμφοκυττάρων με χαρακτηριστικά της ΧΛΛ στο αίμα (απαιτείται εντοπισμός >5000 τέτοιων κυττάρων/ μL). Εάν υπάρχουν λιγότερα τέτοια κύτταρα, αλλά συνυπάρχουν διογκωμένοι λεμφικοί ιστοί, γίνεται βιοψία αυτών, για τη διάγνωση του λεμφώματος από μικρά λεμφοκύτταρα. Επίσης, εάν υπάρχουν λιγότερα από 5000 κύτταρα ΧΛΛ/ μL στο αίμα, χωρίς διογκωμένους λεμφικούς ιστούς, γίνεται διάγνωση μονοκλωνικής B λεμφοκυττάρωσης, η οποία μπορεί μελλοντικά να εξελιχθεί σε ΧΛΛ [9].

Για τη θεραπεία της νόσου, πρέπει να συντρέχουν διάφοροι παράγοντες. Αρχικά, πρέπει ο ασθενής να βρίσκεται σε στάδιο III ή IV κατά Rai ή C κατά Binet, δηλαδή να υπάρχει αναιμία. Επίσης, όταν υπάρχει αυξημένη διόγκωση των λεμφικών ιστών, όπως σπλήνας, λεμφαδένες, και όταν υπάρχουν άλλα συμπτώματα (πυρετός, κόπωση, απώλεια βάρους, κ.ά.) που είναι επίπονα για τον ασθενή, απαιτείται έναρξη της θεραπευτικής αγωγής. Τα φάρμακα τα οποία χορηγούνται είναι τα εξής [9]:

- a) Χημειοθεραπευτικά φάρμακα: Τα πιο συνηθισμένα είναι η χλωραμβουκίλη (χάπι), η φλουνταραμπίνη (χάπι ή ενδοφλέβια χορήγηση), η κυκλοφωσφαμίδη (χάπι ή ενδοφλέβια χορήγηση), η πεντοστατίνη (ενδοφλέβια χορήγηση) και η μπενταμουστίνη (ενδοφλέβια χορήγηση). Στόχος τους είναι η καταστροφή των τάχιστα πολλαπλασιαζόμενων καρκινικών λεμφοκυττάρων,
- b) Μονοκλωνικά αντισώματα: Τα πιο συνηθισμένα είναι το Rituximab (Mabthera), το Ofatumumab (Arzerra) και το Obinutuzumab (Gazyvaro). Ενδείκνυται η χρήση τους σε συνδυασμό με ένα ή περισσότερα χημειοθεραπευτικά φάρμακα,
- c) Αναστολείς σηματοδότησης και
- d) Αλλογενής μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων.

1.3. ΟΞΕΙΕΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΕΣ

1.3.1. ΟΞΕΙΑ ΜΥΕΛΟΕΙΔΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

Όπως και οι περισσότερες μορφές λευχαιμίας, η οξεία μυελοειδής λευχαιμία (ΟΜΛ) είναι μια ετερογενής αιματολογική κακοήθεια που χαρακτηρίζεται από τον κλωνικό πολλαπλασιασμό των μυελοειδών βλαστών στο περιφερικό αίμα, μυελό των οστών ή ακόμα και σε άλλους ιστούς. Πιο συγκεκριμένα, το πρόβλημα εντοπίζεται στους βλάστες των κοκκιοκυττάρων, οι οποίοι δεν ωριμάζουν φυσιολογικά, πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα και εμποδίζουν την αιμοποίηση. Ο μυελός των οστών είναι γεμάτος με τα λευχαιμικά λευκά αιμοσφαίρια, με αποτέλεσμα να μην παράγεται ικανοποιητικός αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων, αιμοπεταλίων και φυσιολογικών λευκών αιμοσφαιρίων. Συνεπώς, ο οργανισμός καθίσταται ευάλωτος σε μολύνσεις και αιμορραγίες, για αυτό η αντιμετώπιση της νόσου πρέπει να είναι ταχύτατη, αμέσως μετά τη διάγνωση [3,12]. Θεωρείται η πιο κοινή μορφή οξείας λευχαιμίας μεταξύ ενηλίκων και αντιπροσωπεύει τον μεγαλύτερο αριθμό ετήσιων θανάτων από λευχαιμίες στην Αμερική. Η μέση ηλικία διάγνωσης είναι τα 67 έτη, αφορά δηλαδή μεγαλύτερες ηλικίες και υπολογίζεται πως όσο ο πληθυσμός γηράσκει, τόσο θα αυξάνεται η συχνότητα εμφάνισης της ΟΜΛ [12]. Τα συμπτώματα της νόσου δε διαφέρουν από τα προαναφερθέντα για τις υπόλοιπες μορφές της νόσου. Όπως και οι υπόλοιπες μορφές λευχαιμίες, έτσι και η ΟΜΛ μπορεί να διαχωρισθεί σε υποκατηγορίες, έτσι ώστε να είναι πιο εύκολη η θεραπευτική προσέγγιση του εκάστοτε θεράποντος ιατρού. Με βάση τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ), η ΟΜΛ χωρίζεται σε :

- a) ΟΜΛ με χαρακτηριστικές γενετικές ανωμαλίες,
- b) ΟΜΛ με πολλαπλή δυσπλασία,
- c) ΟΜΛ και ΜΔΣ θεραπευοσχετιζόμενη και
- d) ΟΜΛ χωρίς ιδιαίτερα κριτήρια

Το παλαιότερο και πιο συνηθισμένο σύστημα κατάταξης είναι το Γαλλο-Αμερικανο-Βρετανικό Σύστημα ή FAB. Εν προκειμένου, η ΟΜΛ διαχωρίζεται σε 8 υποκατηγορίες [3] :

Τύπος	Ονομασία
M0	Ελάχιστα διαφοροποιημένη ή αδιαφοροποίητη ΟΜΛ
M1	ΟΜΛ χωρίς ωρίμανση
M2	ΟΜΛ με κοκκιοκυτταρική ωρίμανση
M3	Προμυελοκυτταρική ή οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία (ΟΠΛ)
M4/M4E	Οξεία μυελομονοκυτταρική λευχαιμία και μυελομονοκυτταρική μαζί με ηωσινοφιλία του μυελού των οστών
M5	Οξεία μονοβλαστική λευχαιμία (M5a) ή οξεία μονοκυτταρική λευχαιμία (M5b)
M6	οξεία ερυθροειδής λευχαιμία (ερυθρολευχαιμία (M6a) και αμιγής ερυθροειδής λευχαιμία (M6b))
M7	Οξεία μεγακαρυωκυτταροβλαστική λευχαιμία
M8	Οξεία βασεοφιλική λευχαιμία

Εκτός από τις παραπάνω κατηγορίες, υπάρχουν και άλλες πιο σπάνιες περιπτώσεις ΟΜΛ, οι οποίες κατατάσσονται βάσει του ΠΟΥ.

Πολλές μεταλλάξεις θεωρούνται υπεύθυνες για την εκδήλωση των διαφόρων μορφών ΟΜΛ, όπως επίσης και διάφορες μεταθέσεις μεταξύ χρωμοσωμάτων. Βάσει αυτών, μπορεί να γίνει διαχωρισμός των ασθενών σε υψηλού, ενδιάμεσου και χαμηλού ρίσκου. Οι ασθενείς χαμηλού ρίσκου (καλύτερης πρόγνωσης) έχουν κατά κύριο λόγο τις μεταθέσεις t(16;16) t(8;21) ή t(15;17) ή ακόμα και την αναστροφή inv(16). Αντιστοίχως, εμφανίζουν μεταλλάξεις στα γονίδια *NPM1* (κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που σχετίζεται με τη δομή πυρηνικών ριβονουκλεοπρωτεϊνών) ή *CEBPA* (κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό παράγοντα). Οι ενδιάμεσου ρίσκου ασθενείς έχουν συνήθως μεταθέσεις t(9;11), φυσιολογικό καρυότυπο ή ακόμα και επιπλέον ένα χρωμόσωμα 8.

Επίσης, μπορούν να εμφανίζουν τις μεταθέσεις και την αναστροφή t(8;21), t(16;16), inv(16) με ταυτόχρονη μετάλλαξη στο γονίδιο *c-KIT* (πρωτο-ογκογονίδιο). Τέλος, η υψηλού ρίσκου (κακής πρόγνωσης) ασθενείς εμφανίζουν πολύπλοκες χρωμοσωμικές μεταλλάξεις, όπως οι -5, 5q-, -7, 7q11q23 - non t(9;11) inv(3), t(3;3), t(6;9) και t(9;22). Χαρακτηριστικό τους είναι επίσης οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *FLT3-ITD* [12,13]. Υπάρχουν ακόμα πολλές μεταλλάξεις οι οποίες ανιχνεύονται και οι οποίες θεωρούνται υπεύθυνες για την πρόκληση της ΟΜΛ (π.χ. *RUNX1*), για αυτό και ο ΠΟΥ συχνά τροποποιεί την κατηγοριοποίηση της συγκεκριμένης νόσου [13].

Για να διαγνωσθεί η ΟΜΛ ο ιατρός βασίζεται στο ιστορικό, στην κλινική εξέταση, στις αναλύσεις αίματος και στις εξετάσεις του μυελού των οστών. Αυτές οι εξετάσεις είναι όμοιες με αυτές που έχουν ήδη αναφερθεί (μυελόγραμμα, οστεομυελική βιοψία, κ.ά.), για την εύρεση των ανώμαλων λευχαιμικών κυττάρων [13].

Η θεραπεία της νόσου εξαρτάται άμεσα από την ηλικία του ασθενούς, τις μεταλλάξεις που παρουσιάζει και την εν γένει κλινική του εικόνα. Χωρίζεται κατά κύριο λόγο σε θεραπεία εφόδου (εξάλειψη καρκινικών κυττάρων που φαίνονται στις εξετάσεις), με τη χρήση χημειοθεραπευτικών φαρμάκων, όπως ανθρακυκλίνες και σε θεραπεία σταθεροποίησης. Η τελευταία έχει ως στόχο την εξάλειψη πιθανών λευχαιμικών κυττάρων που υπάρχουν στον οργανισμό αλλά δεν εμφανίζονται στις συνήθεις εξετάσεις με το μικροσκόπιο. Σε αυτή τη φάση μπορεί να γίνει και αλλογενής μεταμόσχευση μυελού των οστών, βασιζόμενοι στη χορήγηση πολύ υψηλών δόσεων χημειοθεραπευτικών φαρμάκων, με ή χωρίς ταυτόχρονη ακτινοθεραπεία. Αυτή η ειδική θεραπεία μπορεί να συνδυαστεί με υποστηρικτική θεραπεία, δηλαδή με χορήγηση αντιβιοτικών, μετάγγιση αίματος και οτιδήποτε άλλο θα βοηθήσει τον ασθενή από τις παράπλευρες ανωμαλίες που έχει προκαλέσει η νόσος [13,14].

1.3.2. ΟΞΕΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

1.3.2.1. Εισαγωγικά Σημεία

Η οξεία λεμφοκυτταρική (ή λεμφοβλαστική) λευχαιμία (ΟΛΛ) είναι μια μορφή κακοήθους νεοπλασματος των λεμφοκυττάρων που χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση ανώριμων κυττάρων αίματος στο μυελό των οστών. Παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια και μπορεί να προέλθει από πρόβλημα στην ωρίμανση των Β λεμφοκυττάρων στο μυελό των οστών ή των Τ λεμφοκυττάρων στο θύμο. Όπως και σε

άλλα είδη λευχαιμίας, τα κύτταρα αυτά παρουσιάζουν τροποποιημένο πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση, με αποτέλεσμα να καταστέλλεται η φυσιολογική αιματοποίηση [3,15].

Η ΟΛΛ είναι η πιο κοινή κακοήθης νόσος της παιδικής ηλικίας, με κύρια έτη εκδήλωσης της νόσου, μεταξύ 2 και 5. Αντίθετα, η νόσος αντιπροσωπεύει μόνο το 20% των ΟΛΛ σε ενήλικες. Τα μέχρι στιγμής δεδομένα δείχνουν ότι το η συχνότητα εμφάνισης της αυξάνεται σταθερά πάνω από την ηλικία των 50 ετών. Επιπλέον, η συχνότητα εμφάνισης της ΟΛΛ είναι μεγαλύτερη στους Καυκάσιους σε σύγκριση με τους Αφρο-Αμερικανούς. Βάσει γεωγραφικών κριτηρίων, στην Ισπανία και στην Λατινική Αμερική εμφανίζονται υψηλότερα ποσοστά της νόσου, που σχετίζονται με διάφορους παράγοντες συμπεριλαμβανομένης της κοινωνικοοικονομικής, της εθνικής και της αστικής ή αγροτικής ρύθμισης. Μία υψηλότερη συχνότητα της νόσου έχει επίσης καταγραφεί σε βιομηχανικές χώρες και στις αστικές περιοχές. Η ΟΛΛ θεωρείται ελαφρώς πιο συχνή στους άντρες, με αναλογία 1.3:1, σε σχέση με τις γυναίκες [15].

Η κλινική εμφάνιση της ΟΛΛ είναι συνήθως ξαφνική. Οι ασθενείς παρουσιάζουν ένα μικρό ιστορικό κόπωσης ή ξαφνικής αιμορραγίας. Κλασικά συμπτώματα, όπως λήθαργος, απώλεια βάρους, πυρετοί και οι νυχτερινές εφιδρώσεις, είναι συχνά παρόντα χωρίς όμως ιδιαίτερη σοβαρότητα. Συγκριτικά με την ΟΜΛ, ασθενείς με ΟΛΛ εμφανίζουν περισσότερο πόνο των οστών και των αρθρώσεων. Σπανίως, μπορεί να παρουσιάσουν αρθρίτιδα, πόνους χαμηλά στην πλάτη, διάχυτη οστεοπενία ή αλλοιώσεις στα οστά τους [16]. Τα παιδιά φαίνεται να αντιμετωπίζουν αυτά τα συμπτώματα πιο συχνά από ότι ενήλικες, ενώ επίσης μπορεί να έχουν δυσκολία στο περπάτημα λόγω οστικού πόνου [17]. Η λεμφαδενοπάθεια, η σπληνομεγαλία, και η ηπατομεγαλία είναι πιο συχνές από ότι στην ΟΜΛ και επηρεάζουν το ήμισυ των ενηλίκων με ΟΛΛ. Επιπλοκές στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) είναι επίσης πιο διαδεδομένες σε περιπτώσεις ΟΛΛ συγκριτικά με την ΟΜΛ. Οι ασθενείς παρουσιάζουν πολλές φορές κρανιακές νευροπάθειες, που επηρεάζουν κατά κύριο λόγο το 6^ο και 7^ο κρανιακό νεύρο. Η ναυτία, ο έμετος και η κεφαλαλγία είναι συχνά συμπτώματα που οφείλονται σε αυξημένη ενδοκρανιακή πίεση, από τη μηνιγγική διείσδυση και την απόφραξη της εκροής εγκεφαλονωτιαίου ρευστού. Τέλος, στο 2% των αγοριών φαίνεται να υπάρχει εμπλοκή των όρχεων, οι οποίοι παρουσιάζουν μια ανώδυνη, μονομερή μάζα [15].

1.3.2.2. Διάγνωση της ΟΛΛ

Για τη διάγνωση της ΟΛΛ, γίνονται αιματολογικές εξετάσεις και λήψη δείγματος μυελού των οστών. Κατά τη διεξαγωγή των αιματολογικών εξετάσεων, ο ασθενής παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα λευκών αιμοσφαιρίων, ενώ τα ερυθρά και τα αιμοπετάλια είναι μειωμένα σε αριθμό. Επιπλέον, μπορεί να αναγνωριστεί κατά πόσο υπάρχουν βλαστικά κύτταρα στην κυκλοφορία, εκτός δηλαδή μυελού των οστών.

Η μορφολογική αναγνώριση των λεμφοβλαστών στο αίμα και στο μυελό των οστών, αλλά και ο φαινοτυπικός χαρακτηρισμός τους έχουν μεγάλη σημασία για τη σωστή διάγνωση και την ταξινόμηση της ΟΛΛ [15]. Πραγματοποιούνται διάφορες κυτταροχημικές μελέτες με κυτταρομετρία ροής ή ανοσοϊστοχημεία, ελέγχοντας ένα μεγάλο πάνελ επιφανειακών και κυτταροπλασματικών δεικτών. Αρχικά, αξιολογείται η κυτταρική μορφολογία των λεμφοβλαστών, για να μπορέσει να γίνει η κατάταξη βάσει του συστήματος FAB. Οι πιο «κλασικοί» λεμφοβλάστες είναι μικρού έως μεσαίου μεγέθους, με στρογγυλό ή ωοειδές πυρήνα, ιδιαίτερη δομή χρωματίνης και περιορισμένο κυτταρόπλασμα. Υπάρχουν και άλλες μορφολογίες όμως, οι οποίες εντάσσονται σε διαφορετικές κατηγορίες της κατάταξης FAB. Επιπλέον, γίνονται ιστολογικοί χαρακτηρισμοί σε υλικό βιοψίας, όταν υπάρχει μικρός αριθμός κυκλοφορούντων βλαστών στο αίμα. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να αξιολογηθούν πολλές περιοχές εκτός του μυελού, όπως οι λεμφαδένες, οι όρχεις ή και το δέρμα. Η ιστολογική μελέτη μπορεί επίσης να παρέχει πληροφορίες για το βαθμό της φυσιολογικής αιματοποίησης και για την πιθανότητα νέκρωσης του ιστού. Τα τελευταία χρόνια, η ανοσοφαινοτυπική ανάλυση είναι κρίσιμη για την επιβεβαίωση της μορφολογικής διάγνωσης της ΟΛΛ. Βοηθάει ιδιαίτερα στη διαφορική διάγνωση και περαιτέρω υποκατηγοριοποίηση της νόσου σε B- και T- λευχαιμίες. Αυτό γίνεται εφικτό λόγω του μεγάλου αριθμού δεικτών που έχουν αναγνωρισθεί και χρησιμοποιούνται στις αναλύσεις αυτές. Περίπου το 85% των οξείων λεμφοκυτταρικών λευχαιμιών αφορούν τη B- κυτταρική σειρά, με πολλές υποκατηγορίες αναλόγως της ωρίμανσης των B λεμφοκυττάρων. Αντίστοιχα, η T- κυτταρική σειρά παρουσιάζει πρόβλημα στο 15-20% περίπου των περιπτώσεων ΟΛΛ, με επίσης δικές της υποκατηγορίες αναλόγως της κυτταρικής ωρίμανσης. Τέλος, συμπληρωματικά στις παραπάνω αναλύσεις που γίνονται, βοηθούν κυτταρογενετικές και μοριακές μελέτες. Οι ανακατατάξεις, μεταθέσεις, αναστροφές, κλπ που

πραγματοποιούνται στα χρωμοσώματα και στα γονίδια μπορούν να ανιχνευτούν αρκετά εύκολα με την εφαρμογή τεχνικών όπως η FISH και η PCR [15].

Σε διαγνωστικό επίπεδο βοηθούν και οι απεικονιστικές εξετάσεις (ακτίνες X, CT τομογραφία, κλπ.), για την αξιολόγηση της έκτασης της νόσου σε άλλα όργανα, όπως ο εγκέφαλος και η σπονδυλική στήλη.

1.3.2.3. Κατηγοριοποίηση της ΟΛΛ

Όπως και στις υπόλοιπες μορφές της νόσου, η κατάταξη FAB κατηγοριοποίησε σε πρωταρχικό στάδιο τα είδη της ΟΛΛ., βάσει της μορφολογίας των κυττάρων. Έτσι σύμφωνα με αυτή υπάρχουν, 3 κατηγορίες, η L1, η L2 και η L3 [18]:

- a) L1. Περίπου το 25 με 30% των ενήλικων περιπτώσεων και το 85% των παιδικών περιπτώσεων ΟΛΛ ανήκουν σε αυτή την υποκατηγορία. Τα κύτταρα (μικρού μεγέθους) παρουσιάζουν κανονικό σχήμα πυρήνα, ομοιογενή χρωματίνη, μικρούς ή καθόλου πυρήνες και περιορισμένο κυτταρόπλασμα.
- b) L2. Περίπου το 70% των ενήλικων περιπτώσεων και το 14% των παιδικών περιπτώσεων είναι αυτού του υπότυπου. Τα κύτταρα είναι μεγάλα ή ποικίλου μεγέθους με: ακανόνιστο πυρηνικό σχήμα, ετερογενή χρωματίνη και μεγάλο πυρήνα.
- c) L3. Η υποκατηγορία αυτή είναι πολύ σπάνια, καθώς αφορά μόλις το 1-2% των περιπτώσεων ΟΛΛ. Τα κύτταρα είναι μεγάλα και ομοιόμορφα, με κενотоπία στο κυτταρόπλασμα τους, που επικαλύπτουν τον πυρήνα.

Παρόλα αυτά όμως, η ταξινόμηση αυτή εγκαταλείφθηκε από την ΠΟΥ επειδή οι υποτύποι L1 και L2 δεν μπορούσαν να διαφοροποιηθούν όσον αφορά τα κλινικά συμπτώματα, τις προγνώσεις και τις γενετικές ανωμαλίες. Η νέα τροποποιημένη ταξινόμηση που εφαρμόζεται βασίζεται στον ανοσοφαινότυπο και είναι η εξής:

- a) Οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία ή λέμφωμα (πρώην L1 και L2) που περιλαμβάνει την πρόδρομη Β οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία ή (γενετικοί υπότυποι t (12, 21) (p12, q22) TEL / AML-1, t (1; 19) (q23; p13) PBX / E2A, t (q34, q11) ABL / BCR και T (V, 11) (V; q23) V / MLL) και την πρόδρομη T οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία ή λέμφωμα,
- b) Λευχαιμία ή λέμφωμα του Burkitt (πρώην L3) και
- c) Διφαινοτυπική οξεία λευχαιμία

Περαιτέρω ανοσοφαινοτυπικές αναλύσεις γίνονται για το διαχωρισμό της B- από την T- ΟΛΛ, που βασίζονται τόσο στη μελέτη έκφρασης κυτταρικών επιφανειακών μορίων (CD- cluster of differentiation), όσο και σε γενετικές ποικιλομορφίες.

1.3.2.4. Οξεία T- λεμφοκυτταρική λευχαιμία

Η οξεία T λεμφοβλαστική λευχαιμία (T-ΟΛΛ) αντιπροσωπεύει περίπου το 15% και το 25% των παιδικών και ενήλικων ΟΛΛ αντίστοιχα. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι ασθενείς συνήθως παρουσιάζουν υψηλό αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων και μπορεί εμφανίσουν οργανομεγαλία, ιδιαίτερα διεύρυνση του μεσοθωρακίου και συμμετοχή του ΚΝΣ [19]. Η T-ΟΛΛ χαρακτηρίζεται από τον πολλαπλασιασμό λεμφοβλαστών, με ένα μεγάλο φάσμα κυτταρολογικών χαρακτηριστικών (συμπεριλαμβάνουν δηλαδή τις κατηγορίες L1 και L2 που προαναφέρθηκαν). Η εφαρμογή συμβατικής κυτταρογενετικής ανάλυσης και μοριακών μεθόδων υψηλής απόδοσης στη μελέτη της νόσου έδειξε ότι η T-ΟΛΛ παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια, με αποτέλεσμα να καθορίζεται βάσει αυτής η επικινδυνότητα, η πρόγνωση και η θεραπεία των ασθενών [20].

Ο πρώτος επιφανειακός δείκτης της T κυτταρικής σειράς (που εκφράζεται) είναι το CD7, αλλά πιο ειδικός δείκτης θεωρείται το CD3. Το κυτταροπλασματικό CD3 εκφράζεται προγενέστερα κατά τη διαφοροποίηση των T κυττάρων και επομένως είναι πιο χρήσιμο, παρόλα αυτά το επιφανειακό CD3 έχει μεγαλύτερη ειδικότητα. Σε μια προσπάθεια κατάταξης των υπότυπων της T-ΟΛΛ, η Ευρωπαϊκή Ομάδα για τον Ανοσολογικό Χαρακτηρισμό των Λευχαιμιών πρότεινε την ταξινόμηση σε τέσσερις ομάδες: pro-T (CD7 +), pre-T(CD2+ / ή CD5 + και / ή CD8 +), φλοιώδες T (CD1a +) και ώριμο T (επιφανειακό CD3 +, CD1a-). Αυτή η προσέγγιση είναι ιδιαίτερος χρήσιμη για τον ανοσοφαινοτυπικό χαρακτηρισμό των κυττάρων, δεν προσφέρει όμως αρκετές πληροφορίες για την κατανόηση της γενετικής βάσης και της κλινικής ετερογένειας της νόσου [20].

Όσον αφορά τις κυτταρογενετικές ανωμαλίες, εμφανίζονται πολύ συχνά μετατοπίσεις σε γονίδια μεταγραφικών παραγόντων. Αυτοί έρχονται κοντά σε περιοχές ενισχυτών των γονιδίων των T υποδοχέων (TCR), με αποτέλεσμα να επάγεται η έκφρασή τους. Τέτοια γονίδια μπορεί να είναι τα *LMO*, *HOX* και τα γνωστά πρωτο-ογκογονίδια *MYC* και *MYB*. Έχουν βρεθεί πάνω από 30 τέτοια γονίδια που μπορούν να

ανασυνδυαστούν με την περιοχή TCR. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται όλοι οι ανασυνδυασμοί που εμπλέκουν γονίδια των υποδοχέων TCR.

Μετατοπίσεις	Εμπλεκόμενο γονίδιο	Λειτουργία υβριδικού γονιδίου	Συχνότητα εμφάνισης
t(7;10)(q34;q24) και t(10;14)(q24;q11)	<i>TLX1 (HOX11)</i>	Μεταγραφικός παράγοντας	7% παιδιά 31% ενήλικες
t(5;14)(q35;q32)	<i>TLX3 (HOX11L2)</i>	Μεταγραφικός παράγοντας	20% παιδιά 13% ενήλικες
inv(7)(p15q34), t(7;7)	<i>HOXA genes</i>	Μεταγραφικός παράγοντας	5%
t(1;14)(p32;q11) και t(1;7)(p32;q34)	<i>TAL1</i>	Μεταγραφικός παράγοντας	3%
t(7;9)(q34;q32)	<i>TAL2</i>	Μεταγραφικός παράγοντας	<1%
t(7;19)(q34;p13)	<i>LYL1</i>	Μεταγραφικός παράγοντας	<1%
t(14;21)(q11.2;q22)	<i>BHLHB1</i>	Μεταγραφικός παράγοντας	<1%
t(11;14)(p15;q11)	<i>LMO1</i>	Αλληλεπίδραση πρωτεΐνης- πρωτεΐνης	2%
t(11;14)(p13;q11) και t(7;11)(q35;p13)	<i>LMO2</i>	Αλληλεπίδραση πρωτεΐνης- πρωτεΐνης	3%
t(1;7)(p34;q34)	<i>LCK</i>	Μεταγωγή Σήματος	<1%
t(7;9)(q34;q34.3)	<i>NOTCH1</i>	Διαφοροποίηση κυττάρων	<1%
t(7;12)(q34;p13) και t(12;14)(p13;q11)	<i>CCND2</i>	Ενεργοποίηση κυτταρικού κύκλου	<1%

Πίνακας 1.1. Απεικόνιση ανασυνδυασμών που εμπλέκουν τα γονίδια TCR [Πηγή: Sabina Chiaretti and Robin Foà, 2009, *T-cell acute lymphoblastic leukemia, Haematologica, 94(2)*].

Αναλόγως τις μετατοπίσεις που έχουν πραγματοποιηθεί, μπορεί ο κάθε ασθενής να κατηγοριοποιηθεί σε καλής ή κακής πρόγνωσης. Βέβαια, εκτός από αυτές τις δομικές ανωμαλίες, εντοπίστηκαν άλλες μοριακές αλλοιώσεις που μπορούν να επηρεάσουν σηματοδοτικά μονοπάτια ή άλλα σημαντικά μόρια. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται το μονοπάτι του NOTCH, ανωμαλίες του κυτταρικού κύκλου, μεταγραφικοί παράγοντες κυτταρικής ανάπτυξης, καταστολείς όγκων, η μεταγωγή σήματος και η αναδιαμόρφωση χρωματίνης [20]. Από αυτά, το μονοπάτι του NOTCH1 παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον δεδομένου ότι αυτή η οδός ενεργοποιείται συχνά σε

περιπτώσεις T-ΟΛΛ. Ο NOTCH1 είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας που εκφράζεται σε προγονικά T κύτταρα. Η αλληλεπίδραση με το μόριο- προσδέτη του στο μικροπεριβάλλον του θύμου οδηγεί σε πρωτεολυτική διάσπαση, με τη μεσολάβηση των ADAM10/ADAM17 και της γ εκκριτάσης. Αποτέλεσμα είναι η απελευθέρωση μιας υπομονάδας της ενδοκυτταρικής περιοχής του NOTCH1 (NICD1) που μετατοπίζεται στον πυρήνα και ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων στόχων, όπως τα MYC, DTX1 και HES. Έχουν περιγραφεί μετατοπίσεις που περιλαμβάνουν τη θέση NOTCH1, αλλά είναι σπάνιες, όπως η προαναφερθείσα t(7;9)(q34;q34.3). Αντίθετα, μεταλλάξεις που ενεργοποιούν τον NOTCH1 ή μεταλλάξεις που απενεργοποιούν τον αρνητικό ρυθμιστή του (FBXW7), εμφανίζονται σε περίπου 60% των περιπτώσεων T-ΟΛΛ [21-24]. Η στόχευση του σηματοδοτικού μονοπατιού του NOTCH αποτελεί μια περιοχή έρευνας για τις θεραπευτικές προσεγγίσεις της λευχαιμίας [20].

Δεύτερο σε σημασία, είναι το μονοπάτι JAK1, το οποίο φαίνεται να συμμετέχει σε ποσοστό 18% στην εκδήλωση της νόσου. Οι ασθενείς που εμφανίζουν μεταλλάξεις σε αυτό ανήκουν κατά κύριο λόγο σε κακής πρόγνωσης κατηγορίες.

Γονίδια τα οποία φαίνονται να επηρεάζονται λόγω μετατοπίσεων, με αποτέλεσμα την τροποποιημένη έκφραση μορίων, φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Μετατοπίσεις	Εμπλεκόμενο γονίδιο	Λειτουργία υβριδικού γονιδίου	Συχνότητα εμφάνισης
1p32 διαγραφή	<i>SIL-TAL1</i>	Μεταγραφικός Παράγοντας	9-30%
t(10;11)(p13;q14)	<i>CALM-AF10</i>	Μεταγραφικός Παράγοντας	10%
t(9;9)(q34;q34)	<i>NUP214-ABL1</i>	Μεταγωγή Σήματος	Περίπου 5%
t(9;14)(q34;q32)	<i>EML1-ABL1</i>	Μεταγωγή Σήματος	<1%
t(9;22)(q34;q11)	<i>BCR-ABL1</i>	Μεταγωγή Σήματος	<1%
t(9;12)(p24;p13)	<i>ETV6-JAK2</i>	Μεταγωγή Σήματος	<1%

Πίνακας 1.2. Απεικόνιση ανασυνδυασμών διάφορων γονιδίων [Πηγή: Sabina Chiaretti and Robin Foà, 2009, *T-cell acute lymphoblastic leukemia, Haematologica*, 94(2)].

Πολλές ακόμα μοριακές ανωμαλίες έχουν βρεθεί, που εμπλέκουν πολλά γονίδια στην εκδήλωση της T-ΟΛΛ (πάνω από 75 γονίδια). Ο εντοπισμός των νέων μοριακών αλλοιώσεων μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία ειδικών αναστολέων, χρησιμοποιώντας τους στην κλινική πράξη για τη βελτίωση των θεραπευτικών προσεγγίσεων. Τέλος, τα τελευταία χρόνια σημαντικό ρόλο έχει η ανάλυση των

microRNA. Τα μικρά αυτά, μη κωδικά- RNA μόρια είναι πιθανό να εμπλέκονται σε πολλούς μηχανισμούς μετασχηματισμού και σε πολλά μονοπάτια καρκινογένεσης [19].

1.3.2.5. Οξεία T λεμφοκυτταρική λευχαιμία της παιδικής ηλικίας

Η λευχαιμία είναι ο συνηθέστερος παιδιατρικός καρκίνος, που αντιπροσωπεύει το ένα τρίτο όλων των περιπτώσεων, με συχνότητα ~ 4/100.000 παιδιά/έτος. Η συντριπτική πλειοψηφία (80-85%) είναι ΟΛΛ, εκ των οποίων η T-ΟΛΛ έχει συχνότητα 10-15%. Η μέση ηλικία εκδήλωσης της νόσου είναι τα 9 έτη, ενώ τα αγόρια έχουν τριπλάσια πιθανότητα εκδήλωσης της νόσου σε σχέση με τα κορίτσια. Αυτή η διαφορά μεταξύ των δύο φύλων δεν είναι απόλυτα κατανοητή, παρόλα αυτά υποστηρίζεται πως απενεργοποιητικές μεταλλάξεις ή διαγραφές ογκοκατασταλτικών γονιδίων του X χρωμοσώματος διαδραματίζουν κάποιο ρόλο.

Η μόνη επιβεβαιωμένη εξωγενής αιτία της ΟΛΛ είναι η ιονίζουσα ακτινοβολία [25]. Έτσι, τόσο οι προ- όσο και οι μεταγεννητικές εκθέσεις διατηρούνται στο ελάχιστο. Υπάρχουν πολλοί άλλοι παράγοντες κινδύνου όπως το γονικό κάπνισμα, τα χημικά οικιακής χρήσης και χημικές βαφές, τα παρασιτοκτόνα, η μητρική διατροφή, το καυσαέριο και τα ηλεκτρικά πεδία, αλλά μέχρι στιγμής κανένας δεν έχει αποδειχθεί ότι συμβάλει με βεβαιότητα στην εμφάνιση της παιδικής ΟΛΛ [26].

Κατά την ανάλυση του καρυότυπου του ασθενή, η μελέτη των ζωνών των χρωμοσωμάτων αποκαλύπτει κλωνικές ανωμαλίες σε ποσοστό 55-75% της παιδικής T-ΟΛΛ. Αυτό το ποσοστό αυξάνεται, αν χρησιμοποιηθούν πιο ειδικές τεχνικές, όπως η FISH ή η μελέτη πολυμορφισμών (SNPs). Κοντά στο 70% των καρυοτυπικά μη φυσιολογικών παιδιατρικών περιπτώσεων T-ΟΛΛ έχουν 46 χρωμοσώματα, δηλ. είναι ψευδοδιπλοειδή. Στις υπόλοιπες περιπτώσεις, ο αριθμός των χρωμοσωμάτων ποικίλλει, από 45 μέχρι και 47- 49. Οι δομικές μεταβολές των χρωμοσωμάτων είναι πολύ συχνότερες από τις τρισωμίες/μονοσωμίες: Το 65% των περιπτώσεων φέρει μόνο δομικές ανωμαλίες, το 25% τόσο δομικές όσο και αριθμητικές και 10% άλλες ανωμαλίες.

Όπως σε όλες τις περιπτώσεις της T-ΟΛΛ, έτσι και στην παιδική κύριο πρόβλημα αποτελούν οι μετατοπίσεις ή αναστροφές στην περιοχή των γονιδίων TCR (περίπου 30% των περιπτώσεων). Επιπλέον, διαγραφές στον 6q βραχίονα (~ 20%), απώλεια υλικού του 9p βραχίονα μέσω διαγραφών ή μη ισορροπημένων μετατοπίσεων (~ 15%), τρισωμίες 8, διαγραφές του 11q βραχίονα και απώλεια του 12p βραχίονα (5-

10%) απαρτίζουν μερικές από τις δομικές ανωμαλίες της παιδικής T-ΟΛΛ [26,27]. Εκτός από αυτές τις δομικές αλλαγές, σημαντικό σημεία στη νόσο είναι η ενεργοποίηση του μονοπατιού NOTCH1 και επιπλέον βλαβών, όπως η διαγραφή του ογκοκατασταλτικού γονιδίου CDKN2A (που βρίσκεται στο 70% των ασθενών με T-ΟΛΛ). Επιπλέον, οι μεταλλάξεις στο FBXW7, που κωδικοποιούν μια λιγάση της πρωτεΐνης ουμπικουΐτινης (που απαντάται στο 8% -10% των ασθενών με T-ΟΛΛ), εξασθενίζουν την αποικοδόμηση του ενεργοποιημένου NOTCH1, ενισχύοντας περαιτέρω τη συνεχή σηματοδότηση [28,29].

Όσον αφορά την επιβίωση, τα ποσοστά της παιδικής ΟΛΛ έχουν βελτιωθεί δραματικά από τη δεκαετία του 1960, όταν μόνο 5-10% των ασθενών θεραπεύονταν. Η ελεύθερη νόσου και γενική επιβίωση για τα παιδιά, τους εφήβους και τους νεότερους ενήλικες με T-ΟΛΛ κυμαίνεται μεταξύ 70% και 80%. Δυστυχώς, οι υποτροπιάζουσες μορφές T-ΟΛΛ έχουν συνολική επιβίωση μόλις 20%. Τα τελευταία χρόνια, οι θεραπείες που στοχεύουν ειδικές εξειδικευμένες για τη λευχαιμία μεταλλάξεις, πολλές από τις οποίες αναγνωρίζονται από το NGS, θεωρούνται πως θα βελτιώσουν την πρόγνωση της νόσου [26].

1.3.2.6. Οξεία B- λεμφοκυτταρική λευχαιμία

Η οξεία B- λεμφοβλαστική λευχαιμία (B-ΟΛΛ) είναι ένα νεόπλασμα των ανώριμων B προγονικών κυττάρων, που τυπικά επηρεάζει παιδιά ηλικίας κάτω των 6 ετών. Παρόλα αυτά μπορεί να εμφανιστεί και σε μεγαλύτερα παιδιά ή σε ενήλικες πληθυσμούς. Η συχνότητα εμφάνισής της αγγίζει το 80%, ενώ η εκτιμώμενη παγκόσμια επίπτωση της είναι περίπου 1 έως 5, ανά 100.000 άτομα, ανά έτος. Οι ασθενείς συνήθως εμφανίζουν, λόγω ανεπιτυχούς λειτουργίας του μυελού των οστών, κυτταροπενία και λευκοκυττάρωση, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται και σε αυτή την περίπτωση η φυσιολογική αιματοποίηση. Η διάγνωση γίνεται με μελέτη του ανοσοφαινότυπου, συνήθως με κυτταρομετρία ροής, αλλά πολλές φορές οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες είναι αυτές που θα δώσουν πληροφορίες για την πρόγνωση της νόσου [30].

Ο συσχετισμός μεταξύ των διαφόρων τύπων των φυσιολογικών και των λευχαιμικών B-κυττάρων πραγματοποιείται μέσω αξιολόγησης της μικροσκοπικής εμφάνισης και του ανοσοφαινότυπου. Οι κακοήθειες των κυττάρων B φαίνεται να σχετίζονται στις περισσότερες περιπτώσεις, με πολλά από τα διαφορετικά στάδια της

φυσιολογικής διαφοροποίησης των Β-κυττάρων. Τα διαφορετικά αυτά στάδια μπορούν να αναγνωριστούν από την κατάσταση της αναδιάταξης των γονιδίων της ανοσοσφαιρίνης, το μοτίβο έκφρασης των κυτταρικών ανοσοσφαιρινών και από την έκφραση αντιγόνων της κυτταρικής επιφάνειας. Παρόλα αυτά, έχει παρατηρηθεί διασταυρούμενη έκφραση λεμφοειδών δεικτών σε οξείες και μυελοειδείς λευχαιμίες, καθώς μυελοειδές δείκτες αυτοί έχουν βρεθεί σε ποσοστό έως και το ένα τρίτο των προδρόμων Β-ΟΛΛ (π.χ. CD19). Έτσι, ο πραγματικός αριθμός αντιγόνων ειδικών τη Β-ΟΛΛ μειώνεται (π.χ. CD79 και Ig στα Β-κύτταρα) [31]. Πιο συγκεκριμένα:

- a) Στην πρόωρη pre-B εκφράζονται τα : CD19+/CD22+/cyCD3-/MPO CD79α±/CD10+/Igμ-,
- b) Στην pre-B εκφράζονται τα: CD79α+/CD10+/cyIgμ+,
- c) Στην τελική μορφή της pre-B εκφράζονται τα: CD79α+/CD10+/cyIgμ+/sIgμ+ και
- d) Στην ώριμη Β εκφράζονται τα: CD79α+/CD10±/cyIgμ+/sIgμ+/sIgλ+or sIgκ+

Οι κυτταρογενετικές ανωμαλίες οι οποίες εμπλέκονται στην Β-ΟΛΛ είναι συγκεκριμένες και αρκετά καλά χαρακτηρισμένες. Η πιο συνηθισμένη αναδιάταξη είναι η t(12;21) (p13;q22) που κωδικοποιεί το υβριδικό γονίδιο *ETV6-RUNX1* [32]. Αυτή η αναδιάταξη είναι συνήθως «κρυπτική» στην κυτταρογενετική ανάλυση αλλά ανιχνεύεται εύκολα με FISH και άλλες μοριακές τεχνικές. Το ETV6 είναι μέλος της οικογένειας μεταγραφικών παραγόντων ETS και στοχεύονται αρκετά συχνά στη λευχαιμία και σε άλλες κακοήθειες. Αντίστοιχα, παρουσία του C/EBF, το RUNX1 σχηματίζει ένα σύμπλοκο μεταγραφικών παραγόντων που δεσμεύονται στον πυρήνα. Τόσο το ETV6 όσο και το RUNX1 απαιτούνται για την φυσιολογική αιματοποίηση (33,34) και η υβριδική πρωτεΐνη ETV6-RUNX1 μπορεί να διαταράξει την έκφραση των γονιδίων που ρυθμίζονται από το RUNX1, μετατρέποντας το σε μεταγραφικό καταστολέα (35). Η πρωτεΐνη ETV6-RUNX1 προκαλεί επίσης υπερέκφραση του υποδοχέα της ερυθροποιητίνης (EPOR) και ενεργοποίηση της σηματοδότησης του μονοπατιού JAK-STAT (36). Η έκφραση του ETV6-RUNX1 προάγει την αυτοανανέωση σε προγονικά κύτταρα Β αλλά μόνο αυτό δεν επάγει τη λευχαιμογένεση. Πρέπει παράλληλα να υπάρχουν και άλλες μεταλλάξεις, σε άλλα γονίδια, (π.χ. *BTLA*, *TOX*, *BTG1*, κλπ.) έτσι ώστε να αρχίσει η διαδικασία αυτή [32].

Επιπλέον, η μετατόπιση t(1;19)(q23;p13) είναι παρούσα σε ποσοστό έως 6% των περιπτώσεων Β-ΟΛΛ παιδικής ηλικίας και αφορά την περιοχή *TCF3-PBX1* (*E2A-PBX1*). Αυτή η μετατόπιση συγχωνεύει τους τομείς ενεργοποίησης του TCF3 με την καρβόξυ-τελική περιοχή του γονιδίου PBX1. Το TCF3 κωδικοποιεί τους βασικούς παράγοντες μεταγραφής E12 και E47 που απαιτούνται για την πρόιμη ανάπτυξη των λεμφοειδών κυττάρων και η απώλεια του E12 / E47 προάγει την ανάπτυξη λεμφώματος T κυττάρων [37,38]. Το PBX1 αντίστοιχα απαιτείται για την ανάπτυξη των λεμφοειδών προδρόμων κυττάρων [39]. Το υβριδικό TCF3-PBX1 δεσμεύει τις πρωτεΐνες HOX και πιθανώς παρεμβαίνει στην αιμοποιητική διαφοροποίηση διακόπτοντας τη γονιδιακή έκφραση που ρυθμίζεται από το HOX [40].

Όπως και στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία, έτσι και στην Β-ΟΛΛ, σημαντικό ρόλο έχει η έκφραση του υβριδικού γονιδίου *BCR-ABL1*. Έχει ήδη αναφερθεί πως προκύπτει από τη μετατόπιση t(9;22)(q34;q11), η οποία φαίνεται να δημιουργεί ένα καινούργιο χρωμόσωμα, γνωστό και ως Φιλαδέλφεια. Η μετατόπιση αυτή είναι παρούσα στο 95% των ΧΜΛ, στο 25% των ενήλικων περιπτώσεων Β-ΟΛΛ και μόλις στο 3-5% των παιδιατρικών Β-ΟΛΛ. Πρόσθετες γενετικές μεταβολές είναι καθοριστικές για την εκδήλωση λευχαιμίες, παρουσία του υβριδικού γονιδίου *BCR-ABL1*. Η διαγραφή του πρώιμου γονιδίου του λεμφοειδούς μεταγραφικού παράγοντα *IKZF1* (IKAROS), για παράδειγμα, είναι συνηθισμένη σε τέτοιες περιπτώσεις Β-ΟΛΛ. [41,42]. Ο IKAROS είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας δομής δακτύλων ψευδαργύρου, που απαιτείται για την ανάπτυξη όλων των λεμφοειδών κυτταρικών σειρών [43,44].

Πολλά μοτίβα μετατοπίσεων έχουν παρατηρηθεί, τα οποία εμπλέκουν το γονίδιο *MLL* (Mixed Lineage Leukemia). Οι πιο συχνές από αυτές είναι t(4;11)(q21;q23)/*MLL-AFF1* (AF4), που βρέθηκαν σε περίπου 50% η t(9;11)(p22-q23)/*MLL-MLLT3* (AF9), *MLL-ENL* και t(10;11)(p13-15-q14-21)/*MLL-MLLT10* (AF10) [45,46]. Σε αυτές τις περιπτώσεις, εμφανίζεται ένα ξεχωριστό προφίλ γονιδιακής έκφρασης που επηρεάζει (θετικά) τη λειτουργία των γονιδίων HOX I. Πολλές από τις υβριδικές πρωτεΐνες MLL εντοπίζονται σε σύμπλοκα πρωτεϊνών που ρυθμίζουν την μεταγραφική διαδικασία και φαίνεται να είναι εν μέρει να είναι υπεύθυνες για την απορρύθμιση της μεταγραφής και την επαγωγή λευχαιμογένεσης [32].

Ανακατατάξεις της περιοχής της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης (*IGH@*) στο χρωμόσωμα 14q32.33 έχουν παρατηρηθεί, με αποτέλεσμα την επαφή των στοιχείων του ενισχυτή του *IGH@* με μεταγραφικούς παράγοντες και γονίδια υποδοχέων κυτταροκινών. Αυτές οι ανακατατάξεις επάγουν την αύξηση των υποδοχέων κυτταροκινών στην κυτταρική επιφάνεια και συνδέονται με την ύπαρξη ενεργοποιητικών μεταλλάξεων στα γονίδια των Janus κινασών (*JAK1*, *JAK2*) [32].

Εκτός από αυτές τις χρωμοσωμικές ανακατατάξεις, έχουν παρατηρηθεί και αρκετές σημειακές μεταλλάξεις (π.χ. διαγραφές) σε γονίδια που ρυθμίζουν την ανάπτυξη λεμφοειδών κυττάρων, τον κυτταρικό κύκλο συνολικά, την καταστολή της ογκογένεσης και σηματοδοτικών μονοπατιών. Πιο συχνές μεταλλάξεις εμφανίζονται στα γονίδια *PAX5* (31,7% των Β-ΟΛΛ), *IKZF1* (15% των παιδιατρικών Β-ΟΛΛ), *JAK1/2*, *CRLF2* και *CREBBP* σε ποσοστά γύρω στο 20% [32].

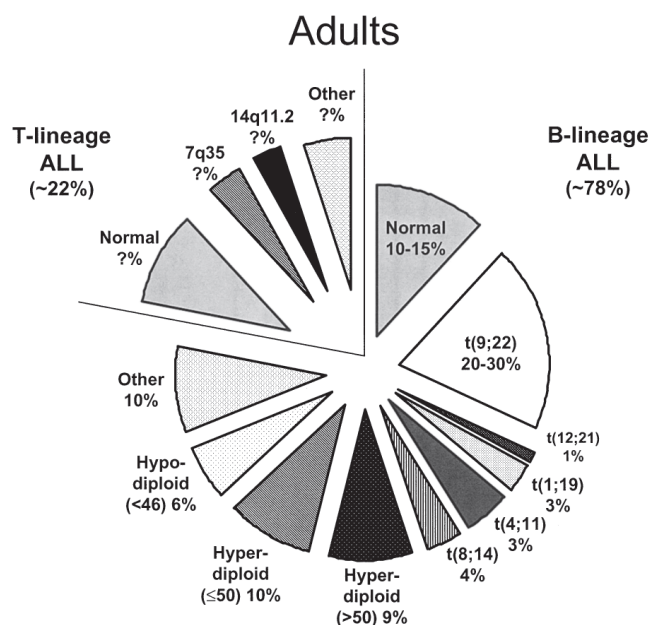
1.3.2.7. Οξεία Β λεμφοκυτταρική λευχαιμία της παιδικής ηλικίας

Η οξεία Β λεμφοκυτταρική λευχαιμία αποτελεί το 85% των ΟΛΛ της παιδικής ηλικίας, παρόμοιο ποσοστό με αυτό του ενήλικου πληθυσμού. Κατά κύριο λόγο προσβάλλονται παιδιά μεταξύ των ηλικιών 2 έως 5 ετών, χωρίς να είναι σαφή τα αίτια της νόσου. Για τη λευχαιμιογένεση κατηγορούνται οι ακτίνες Χ, οι χημειοθεραπείες για άλλους όγκους, ενώ έχει αποδειχτεί πως πολλά σύνδρομα, όπως το σύνδρομο Down και το σύνδρομο Li-Fraumeni, με μεταλλάξεις στο γονίδιο *TP53*, αυξάνουν κατά πολύ την πιθανότητα εμφάνισης της παιδικής ΟΛΛ (πάνω από 20 φορές). Περίπου το 75% των περιπτώσεων της παιδικής Β-ΟΛΛ εμφανίζουν ανευπλοειδία ή πολλαπλές χρωμοσωμικές ανακατατάξεις. Η υπερδιπλοειδία (της οποίας η βιολογική βάση ακόμα είναι άγνωστη), με επιπλέον τουλάχιστον 5 χρωμοσώματα, είναι μία από τις συχνότερες μεταβολές και συνδέεται με ευνοϊκή πρόγνωση για τον ασθενή. Αντίθετα, η υποδιπλοειδία, με λιγότερα από 44 χρωμοσώματα, σχετίζεται με δυσάρεστη πρόγνωση για τον ασθενή. Τα συμπτώματα των ασθενών είναι όμοια με αυτά στις υπόλοιπες ΟΛΛ, όπως κούραση, αιμορραγίες, πόνος στα οστά, πυρετός, κλπ.

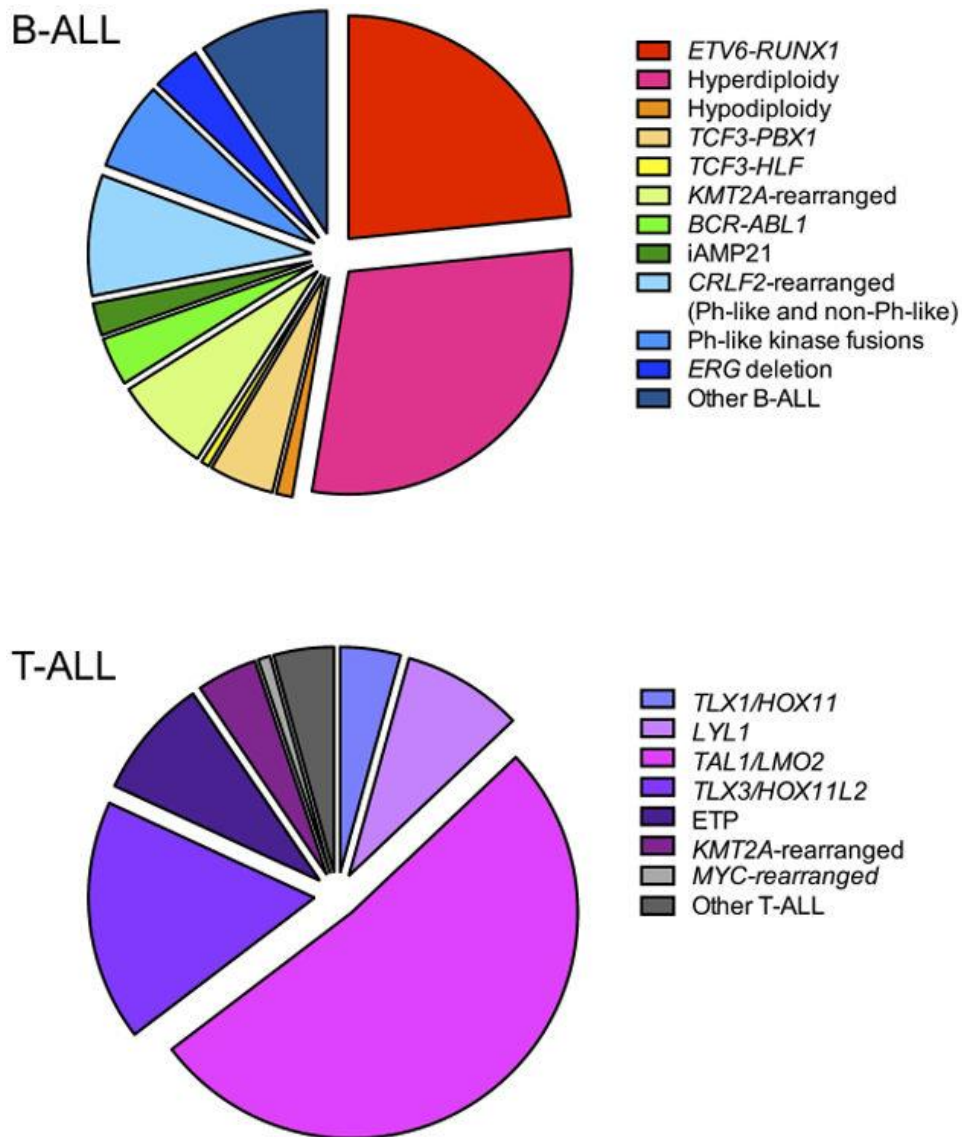
Τα γονίδια τα οποία εμπλέκονται στην παιδική Β-ΟΛΛ είναι τα ίδια, όπως και οι μετατοπίσεις μεταξύ χρωμοσωμάτων, απλώς τα ποσοστά αλλάζουν σε σχέση με τις αντίστοιχες ενήλικες περιπτώσεις. Οι πιο κοινές μετατοπίσεις σε παιδιά με Β-ΟΛΛ περιλαμβάνουν την t(12;21) [*ETV6-RUNX1*] (25%), την t(1;19) [*TCF3-PBX1*], την t(9;11) [*BCR-ABL1*] (3%) και μετατοπίσεις που περιλαμβάνουν το γονίδιο *MLL* (5%).

Η υπερδιπλοειδία (>50 χρωμοσώματα) συναντάται στο 25% της παιδικής ΟΛΛ, ενώ η υποδιπλοειδία (<44 χρωμοσώματα) αντιπροσωπεύει περίπου το 1% των περιπτώσεων. Πολλές από αυτές τις γενετικές αλλαγές έχουν προγνωστική και θεραπευτική αξία, καθώς καθορίζουν το επίπεδο κινδύνου της κάθε μορφής Β-ΟΛΛ. Η συνολική επιβίωση των ασθενών με τη μετατόπιση *ETV6-RUNX1* ή την υπερδιπλοειδία, είναι μεγαλύτερη του 93%. Αντίστοιχα, οι μετατοπίσεις *TCF3-PBX1* και *BCR-ABL1* έχουν σχετικά καλύτερη πρόγνωση σε σχέση με παλαιότερα έτη. Η υποδιπλοειδία εξακολουθεί να αποτελεί κατηγορία υψηλού κινδύνου, καθιστώντας απαραίτητη την περαιτέρω κατανόηση των ογκογόνων μηχανισμών και την ορθολογική χρήση στοχευμένης θεραπείας (π.χ. αναστολή της οδού RAS). Η συχνότητα και η πρόγνωση της αναδιάταξης *MLL*, από την άλλη, ποικίλλει ανάλογα με την ηλικία [28,29]. Εκτός από τις προαναφερθείσες μεταλλάξεις (παρ. 1.2.2.6.), υπάρχουν και άλλες οι οποίες συμμετέχουν στην εκδήλωση της Β-ΟΛΛ, όπως εσωχρωμοσωματική ενίσχυση περιοχής του χρωμοσώματος 21 και η *BCR-ABL1* παρόμοια Β-ΟΛΛ. Η τελευταία, παρόλο που δεν εμφανίζεται υβριδική πρωτεΐνη BCR-ABL1, έχει πολλά αντίγραφα του γονιδίου *IKZF1* και προφίλ γονιδιακής έκφρασης που μοιάζει με τη συγκεκριμένη μετατόπιση [28,29].

Στα παρακάτω γραφήματα, παρουσιάζεται η συχνότητα εμφάνισης των προαναφερθέντων αλλοιώσεων στις ΟΛΛ, τόσο σε ενήλικες, όσο και σε παιδιατρικές περιπτώσεις.



Εικόνα 1.2. Απεικόνιση χρωμοσωμικών αλλοιώσεων σε ενήλικες με ΟΑΛ. [Πηγή: Behm, 2017, *Classification of Acute Leukemias*]



Εικόνα 1.3. Απεικόνιση κυτταρογενετικών αλλοιώσεων σε περιπτώσεις παιδικής ΟΑΛ. (Πηγή: Sarah K Tasian, Mignon L Loh, and Stephen P Hunger, 2015, *Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Integrating Genomics into Therapy, Cancer, 121(20): 3577–3590*)

1.3.2.8. Υποτροπιάζουσα οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία

Στις περισσότερες περιπτώσεις καρκινογένεσης, ένα πολύ μεγάλο ζήτημα είναι η πιθανότητα υποτροπής και η έγκαιρη αντιμετώπισή της. Έτσι και στις οξείες λεμφοκυτταρικές λευχαιμίες της παιδικής ηλικίας, μερικοί ασθενείς παρουσιάζουν υποτροπές, οι οποίες φαίνονται να σχετίζονται με τις διάφορες κυτταρογενετικές ανωμαλίες. Συγκεκριμένοι υποτύποι σχετίζονται με ιδιαίτερα υψηλό κίνδυνο υποτροπής, όπως τη Ph + ΟΑΛ, πριν τη χρήση των TKIs, η υποδιπλοειδία και η ΟΑΛ

που παρομοιάζει με τη Ph+. Χαρακτηριστικό της υποτροπιάζουσας νόσου είναι η μεγαλύτερη ανοχή στη χημειοθεραπεία, είτε λόγω ενός προϋπάρχοντος ανθεκτικού κλώνου, είτε λόγω νέας μετάλλαξης κατά τη διάρκεια της χημειοθεραπευτικής έκθεσης, η οποία προάγει την αντοχή στο φάρμακο. Η πλειονότητα των περιπτώσεων υποτροπής διατηρεί τα βασικά γενετικά χαρακτηριστικά από τη διάγνωση, ιδίως οι μετατοπίσεις των χρωμοσωμάτων διατηρούνται πάντοτε. Σχεδόν όλες οι υποτροπιάζουσες ΟΛΛ παρουσιάζουν και νέες γενετικές αλλοιώσεις, γεγονός που υποδηλώνει τη δυναμική εξέλιξη της λευχαιμογένεσης [47,48]. Είναι ενδιαφέρον ότι ο λευχαιμικός κλώνος κυττάρων εξαλείφεται, ενώ οι πιο σπάνιοι υποκλώνοι παραμένουν και αποκτούν νέες μεταλλάξεις, με αποτέλεσμα να γίνονται οι κύριοι προβληματικοί κλώνοι στην υποτροπή [48]. Πρόσφατες μελέτες συσχέτισης σε επίπεδο γονιδιώματος έχουν εντοπίσει ειδικούς πολυμορφισμούς νουκλεοτιδίων που εμφανίζονται πιο συχνά σε ασθενείς με υποτροπιάζουσα ΟΛΛ.

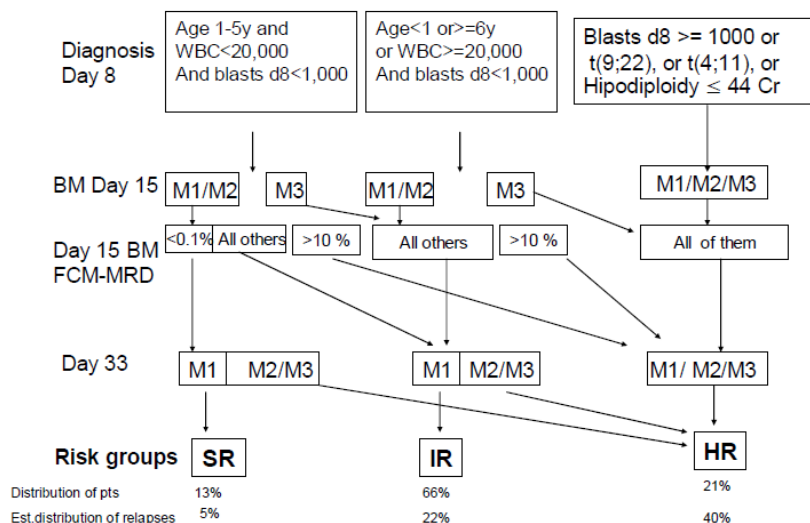
Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *CREBBP* έχουν αναφερθεί σε περίπου 20% των ασθενών με υποτροπιάζουσα ΟΛΛ [50,51]. Η πρωτεΐνη CREBBP (επίσης γνωστή ως CBP) εμπλέκεται στη διαμεσολαβούμενη από κορτικοειδή μετάφραση και στην αποακετυλίωση ιστονών. Προκλινικές μελέτες επιδεικνύουν μια αναστολή στη δράση αποακετυλάσης των ιστονών και στη θεραπεία με αναστολείς μικρού μοριακού βάρους. Η συνυπάρχουσα εμφάνιση των μεταλλάξεων CREBBP και KRAS αναφέρθηκε πρόσφατα σε μεγάλο ποσοστό των υποτροπιαζουσών ΟΛΛ, για αυτό κρίνεται απαραίτητη η μελέτη νέων μορίων μικρού μεγέθους με ανασταλτική δράση. Επιπλέον, έχουν εντοπιστεί μεταλλάξεις στο γονίδιο *NT5C2*, που επάγουν την έκφρασή του, σε σχεδόν 20% των υποτροπών, τόσο σε B- όσο και σε T-ΟΛΛ [52,53]. Το NT5C2 είναι ένα καταλυτικό ένζυμο με δράση 5'-νουκλεοτιδάσης, που μεταβολίζει και απενεργοποιεί νουκλεοσιδικά ανάλογα, όπως η μερκαπτοπουρίνη και η θειογουανίνη. Άλλες επαναλαμβανόμενες σωματικές μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν σε τέτοιες περιπτώσεις περιλαμβάνουν παραλείψεις στο γονίδιο επιδιόρθωσης *MSH6* και στον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών *NR3C1*, καθώς επίσης και μεταλλάξεις στην τριμεθυλοτρανσφεράση H3K36, *SETD2*, την ειδική για λυσίνη απομεθυλάση *KDM6* και επιγενετικό ρυθμιστή *MLL2* [48, 54-56]. Εντοπίστηκαν επίσης σωματικές μεταλλάξεις σε γονίδια που σχετίζονται με το σηματοδοτικό μονοπάτι του Ras (π.χ. *KRAS*, *NRAS*, *FLT3* και *PTPN11*) στο ένα τρίτο έως το ήμισυ των ασθενών με υποτροπιάζουσα ΟΛΛ [28,29].

1.3.2.9. Διαχωρισμός ασθενών με ΟΛΛ κατά BFM

Για τη σωστή και επιτυχή θεραπεία των ασθενών με ΟΛΛ, απαιτείται η κατάταξη των ασθενών σε διάφορες κατηγορίες κινδύνου. Με αυτόν τον τρόπο, μπορεί να χορηγηθεί κατάλληλη θεραπεία σε κάθε ασθενή, όσο δυνατόν πιο εξατομικευμένη γίνεται, βασιζόμενοι σε διάφορα κυτταρολογικά και γενετικά χαρακτηριστικά. Το σύστημα κατάταξης των ασθενών καθιερώθηκε από την ομάδα BFM (Berlin-Frankfurt- Münster), μια ομάδα ερευνητών, οι οποίοι ξεκίνησαν τη θεραπεία ασθενών με ΟΛΛ με μια ποικιλία χημειοθεραπευτικών φαρμάκων. Σε συνεργασία με άλλα παγκόσμια ερευνητικά ιδρύματα, σχηματίστηκε το διεθνές BFM (I-BFM), το οποίο στοχεύει στο σχεδιασμό κοινών στρατηγικών για τη διάγνωση και τη θεραπεία των ασθενών. Κάθε χρόνο πραγματοποιούνται συνέδρια και συναντήσεις, όπου χαράζονται νέες προοπτικές και τεχνικές αντιμετώπισης της νόσου. Μέχρι σήμερα, έχουν θεραπευτεί χιλιάδες παιδιά ανά τον κόσμο επιτυχώς, χάρης σε αυτές τις κλινικές μελέτες της ομάδας I-BFM .

Για την κατηγοριοποίηση των ασθενών, χρησιμοποιείται το σύστημα ALL IC-BFM 2009, το οποίο βασίζεται σε διάφορα κριτήρια, όπως είναι η κατάσταση του μυελού των οστών την ημέρα της διάγνωσης, τη 15^η και τη 33^η μέρα, τα λευκά αιμοσφαίρια, οι βλάστες, η ελάχιστη υπολειπόμενη νόσος (MRD), η ύπαρξη ή όχι συγκεκριμένων κυτταρογενετικών ανωμαλιών, κλπ. Στο παρακάτω γράφημα φαίνεται η κατηγοριοποίηση αυτή:

ALL IC-BFM 2009 CLASSIFICATION



Εικόνα 1.4. Κατάταξη ασθενών με ΟΛΛ αναλόγως κυτταρολογικών και γενετικών κριτηρίων.

Όπως φαίνεται παραπάνω, υπάρχουν τρεις κατηγορίες κινδύνου, υψηλού, ενδιάμεσου και χαμηλού. Βάσει αυτής της κατάταξης θα καθοριστεί και η θεραπεία του εκάστοτε ασθενούς. Οι κατηγορίες M1, M2 και M3 αναφέρονται στο % ποσοστό των βλαστών στο μυελό των οστών, τις διάφορες μέρες που γίνεται λήψη δείγματος αυτού. Η M1 αναφέρεται σε ποσοστό βλαστών μικρότερο του 5%, η M2 σε ποσοστό ίσο με 5% έως και 25% και η M3 σε ποσοστό μεγαλύτερο ή ίσο του 25%. Σημαντικό είναι να αναφερθεί πως όλοι οι ασθενείς ακολουθούν ένα πρωταρχικό πρωτόκολλο θεραπείας με χημειοθεραπευτικά φάρμακα, όπως η prednisone, η μεθοτρεξάνη, η αλλοπουρινόλη, έτσι ώστε να μπορεί να συνεχιστεί η κατηγοριοποίησή τους, αναλόγως της απάντησής τους σε αυτά τα φάρμακα (θεραπεία εφόδου, μέχρι την 33^η ημέρα) [57].

1.3.2.10. Θεραπεία ασθενών με ΟΛΛ

Η θεραπεία των ασθενών με ΟΛΛ καθορίζεται αναλόγως της κατάταξής τους σε υψηλού, ενδιάμεσου ή χαμηλού κινδύνου. Για κάθε μία από αυτές τις κατηγορίες υπάρχουν διαφορετικά πρωτόκολλα, με διαφορετικές δόσεις από κοινά ή ακόμα και διαφορετικά φάρμακα. Η θεραπευτική προσέγγιση χωρίζεται σε τρία στάδια, την επαγωγική θεραπεία, την πρόιμη εντατικοποίηση και τη θεραπεία παγιοποίησης. Κάθε ένα από αυτά στα στάδια έχει διαφορετική χρονική διάρκεια, αναλόγως την κατηγορία του ασθενούς.

Επαγωγική Θεραπεία

Σε αυτή την αρχική θεραπεία ακολουθούνται δύο πρωτόκολλα, το ΓΑ που αφορά τους ασθενείς χαμηλού ρίσκου με BCP-ΟΛΛ και το ΙΑ που αφορά τους ασθενείς χαμηλού, ενδιάμεσου ή υψηλού ρίσκου με T-ΟΛΛ. Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται είναι prednisone/prednisolone, vincristine, daunorubicin και L-asparaginase, σε διαφορετικές δόσεις ή χρονική διάρκεια. Η φάση αυτή διαρκεί συνήθως 29 ημέρες.

Πρόιμη Εντατικοποίηση

Σε αυτό το στάδιο θεραπείας, ακολουθούνται πάλι δύο πρωτόκολλα, το ΙΒ και το ΙΒ Augmented. Το πρώτο αφορά ασθενείς χαμηλού ρίσκου και μερικούς ασθενείς ενδιάμεσου ή υψηλού κινδύνου, οι οποίοι λαμβάνουν φάρμακα όπως cyclophosphamide, 6-mercaptopurine, cytarabine και ενδορραχιαία methotrexate. Η θεραπεία αυτή κρατάει μέχρι και την 64^η μέρα συνολικής θεραπείας. Αντίστοιχα, το ΙΒ Augmented πρωτόκολλο αφορά ασθενείς ενδιάμεσου ή υψηλού κινδύνου, το οποίο

όμως διαρκεί παραπάνω (μέχρι και την 92^η μέρα συνολικής θεραπείας). Τα φάρμακα που χορηγούνται είναι cyclophosphamide, 6-mercaptopurine, cytarabine, ενδορραχιαία methotrexate, vincristine και L-asparaginase.

Θεραπεία παγιοποίησης

Σε αυτό το στάδιο, οι ασθενείς με BCP-OΛΛ ενδιάμεσου ή χαμηλού κινδύνου ακολουθούν το πρωτόκολλο mM (6-mercaptopurine, methotrexate) και οι ασθενείς με T-OΛΛ ενδιάμεσου ή χαμηλού κινδύνου το πρωτόκολλο M (όμοια φάρμακα, διαφορετικές δόσεις). Σε πιο σοβαρές περιπτώσεις (π.χ. υψηλού κινδύνου), συνήθως γίνεται και μεταμόσχευση αλλογενών βλαστικών κυττάρων [57].

Μετά από αυτά τα στάδια θεραπείας, ακολουθεί η συντηρητική θεραπεία, η οποία συνήθως κρατάει κάποια χρόνια, για την πλήρη εξάλειψη της νόσου και την αποφυγή υποτροπής. Σημαντικό είναι να αναφερθεί πως τα παραπάνω πρωτόκολλα τροποποιούνται αναλόγως με τα όργανα τα οποία έχουν προσβληθεί (π.χ. ΚΝΣ) ή με την ύπαρξη υποτροπής.

Χάρη στις παραπάνω εξελίξεις στην ταξινόμηση της νόσου, τη σταδιοποίηση των ασθενών και στην ύπαρξη συγκεκριμένης θεραπευτικής προσέγγισης, το ποσοστό επιβίωσης των ασθενών εντός 5ετίας, χωρίς νόσο, αυξάνεται ταχύτατα. Αντίστοιχα, η επιτυχία στην πλήρη ίαση της νόσου έχει αυξηθεί και προβλέπεται μέσα στα επόμενα χρόνια να βελτιωθεί ακόμα παραπάνω.

1.4. ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ

Όπως το DNA και οι πρωτεΐνες, έτσι και το RNA αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα βιομόρια για τη ζωή και την εξέλιξη των κυττάρων. Η ύπαρξή του σε προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς οργανισμούς, από την αρχή της εξέλιξης των διαφόρων ειδών, δηλώνει πόσο απαραίτητο μόριο είναι. Διάφορα είδη RNA, όπως το mRNA, tRNA, rRNA, miRNA, ncRNA, κλπ., συμμετέχουν σε πολλές βιολογικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένου της πρωτεϊνικής έκφρασης, της αντιγραφής του DNA, της σύνθεσης των ριβοσωμάτων, καθώς επίσης εμπλέκονται σε πολλά μεταβολικά μονοπάτια. Συνεπώς, η σωστή έκφραση, κατανομή και δράση των RNA μορίων καθορίζουν τη φυσιολογική ή μη λειτουργία του κυττάρου, για αυτό κρίνεται απαραίτητη η ρύθμιση της έκφρασης και αποικοδόμησής τους. Όσον αφορά την τελευταία, εξέχοντα ρόλο διαδραματίζουν οι ριβονουκλεάσες, γνωστές και ως RNases. Οι ριβονουκλεάσες ανήκουν στην κατηγορία των νουκλεασών, μόρια τα οποία αποικοδομούν τα RNAs σε μικρότερα τμήματα. Η αποικοδόμηση πραγματοποιείται μέσω υδρόλυσης, διασπώντας τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς μεταξύ των βάσεων του εκάστοτε RNA μορίου.

Εκτός από την αποικοδόμηση των μορίων RNA που δε χρησιμεύουν πλέον ή είναι μη λειτουργικά, οι RNases έχουν βασικό ρόλο στην ωρίμανση όλων των μορίων RNA, όπως τα αγγελιαφόρα RNA (mRNA) και τα μη κωδικά RNA (ncRNA), τα οποία συμμετέχουν σε ποικίλες κυτταρικές διεργασίες. Επιπλέον, μπορούν να δράσουν ως μια πρώτη γραμμή υπεράσπισης έναντι των RNA ιών και συμμετέχουν σε βιολογικές διεργασίες, όπως το RNAi.

Τα γονιδιώματα των περισσότερων οργανισμών κωδικοποιούν μια πληθώρα ριβονουκλεασών, οι οποίες συχνά εμφανίζουν αλληλοεπικαλυπτόμενες δράσεις. Μικρές μεταλλάξεις σε αυτές δε φαίνονται να εμποδίζουν την αποικοδόμηση των διαφόρων RNAs, υποδηλώνοντας πως πολλές διαφορετικές ριβονουκλεάσες αναγνωρίζουν ίδια υποστρώματα. Αυτός ο πλεονασμός στην ύπαρξη των RNases υποδεικνύει πόσο σημαντικά και συντηρημένα είναι τα μονοπάτια αποικοδόμησης των RNAs [58]. Υπολογίζεται ότι ένα μόνο κύτταρο εκφράζει 20 διαφορετικές ριβονουκλεάσες, οι οποίες έχουν δράσει κυρίως ενδοκυτταρικά, αλλά και εξωκυτταρικά. Τροποποιήσεις στην έκφραση των ριβονουκλεασών, και κατ' επέκταση στη διαδικασία της αποικοδόμησης των μορίων RNA, φαίνεται να έχουν σημαντικό

ρόλο στην τροποποίηση της κυτταρικής λειτουργίας, που πολλές φορές συνεπάγεται σε καρκινογένεση.

Η πιο καλά χαρακτηρισμένη και μελετημένη οικογένεια ριβονουκλεασών είναι η RNase A. Αποτελεί μια βόεια παγκρεατική ριβονουκλεάση, από 124 αμινοξέα με σχετική μοριακή μάζα 12.600 Da. Είναι το πρώτο ένζυμο το οποίο συντέθηκε τεχνητά, σε εργαστήριο, και από τις πρώτες πρωτεΐνες που αλληλουχήθηκαν. Διασπάει φωσφοδιεστερικούς δεσμούς μέσω υδρόλυσης, μεταξύ νουκλεοτιδίων συνδεδεμένων με πυριμιδίνες (C και U) [59].

1.4.1. ΔΡΑΣΗ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΩΝ

Οι ριβονουκλεάσες συμμετέχουν σε πολλά βιολογικά μονοπάτια, ελέγχοντας την κυκλοφορία των διαφόρων ειδών RNA, τόσο σε προκαρυωτικούς όσο και ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Η δράση τους εστιάζεται κυρίως στην επεξεργασία και αποικοδόμηση των μορίων RNA, έχοντας ιδιαίτερο ρόλο στις παρακάτω περιπτώσεις:

Επεξεργασία RNA

Αν και η μεταγραφή είναι το πρώτο και το πιο ελεγχόμενο βήμα στην έκφραση των γονιδίων, είναι μόνο η αρχή μιας σειράς των γεγονότων που απαιτούνται για την παραγωγή ενός λειτουργικού RNA. Τα περισσότερα νεοσυντιθέμενα RNAs πρέπει να τροποποιηθούν με διάφορους τρόπους ώστε να μετατραπούν στις λειτουργικές μορφές τους [60].

- a) Επεξεργασία rRNA και tRNA: Η βασική επεξεργασία των ριβοσωμικών και των μεταφορικών RNA σε προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά κύτταρα είναι παρόμοια, όπως αναμένεται, λαμβάνοντας υπόψη τους θεμελιώδεις ρόλους αυτών των RNAs στη σύνθεση πρωτεϊνών. Προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά pre-rRNAs υποβάλλονται σε επεξεργασία σε διάφορα στάδια. Οι αρχικές διασπάσεις του βακτηριακού pre-rRNA δίνουν ξεχωριστούς προδρόμους για τα τρία μεμονωμένα rRNAs, τα οποία στη συνέχεια υφίστανται περαιτέρω επεξεργασία με επιπλέον διασπάσεις, δίνοντας τα τελικά προϊόντα. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, το pre-rRNA διασπάται πρώτα σε μια θέση γειτονική προς το 5.8S rRNA στην 5' πλευρά του, δίδοντας δύο ξεχωριστές πρόδρομες ενώσεις που περιέχουν τα 18S και 28S + 5.8S rRNAs, αντίστοιχα. Περαιτέρω διασπάσεις θα δώσουν τα τελικά προϊόντα, όπως και στους προκαρυώτες. Όπως και τα rRNAs, τα tRNA σε βακτηριακά και ευκαρυωτικά συντίθενται ως

μεγαλύτερα πρόδρομα μόρια (pre-tRNAs). Η επεξεργασία του 5' άκρου των pre-tRNA περιλαμβάνει τη διάσπαση από ένα ένζυμο που ονομάζεται RNase P, ενώ το 3' άκρο των tRNAs παράγεται από τη δράση μίας συμβατικής ριβονουκλεάσης [60,61].

- b) Επεξεργασία mRNA: Σε αντίθεση με την επεξεργασία των rRNAs και tRNAs, η επεξεργασία των αγγελιαφόρων RNAs εμφανίζει μια σημαντική διαφορά μεταξύ των προκαρυωτικών και των ευκαρυωτικών κυττάρων. Στα βακτήρια, τα ριβοσώματα έχουν άμεση πρόσβαση στο mRNA και η μετάφραση ξεκινά από την αναδύομενη αλυσίδα mRNA, ενώ η μεταγραφή βρίσκεται ακόμα σε εξέλιξη. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, το mRNA που συντίθεται στον πυρήνα πρέπει πρώτα να μεταφερθεί στο κυτταρόπλασμα προτού χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο για τη σύνθεση πρωτεϊνών. Τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα υφίσταται αρκετές τροποποιήσεις. Το άκρο 5' των προ-mRNAs τροποποιείται σύντομα μετά την σύνθεσή του με την προσθήκη μιας δομής που ονομάζεται καλύπτρα 7-μεθυλογουανοσίνης. Η κάλυψη αρχίζει με την προσθήκη ενός GTP σε αντίστροφο προσανατολισμό προς το τελικό νουκλεοτίδιο του 5' άκρου του pre-mRNA. Το 3' άκρο των περισσότερων ευκαρυωτικών mRNAs δεν ορίζεται με τον τερματισμό της μεταγραφής, αλλά με διάσπαση του πρωταρχικού μεταγράφου και την προσθήκη μιας πολυ-A ουράς, με μια αντίδραση επεξεργασίας που ονομάζεται πολυαδενυλίωση. Βέβαια, η πιο εντυπωσιακή τροποποίηση των pre-mRNAs είναι η αφαίρεση των ιντρονίων. Οι κωδικές αλληλουχίες των περισσότερων ευκαρυωτικών γονιδίων διακόπτονται από μη κωδικές αλληλουχίες (εσόνια) που αποκόπτονται με ακρίβεια από το ώριμο mRNA, μέσω ματίσματος.
- c) Επεξεργασία miRNA και siRNA: Τα συγκεκριμένα μόρια RNA έχουν μέγεθος 21-25 νουκλεοτίδια και έχουν σημαντικό ρόλο στην καταστολή της μετάφρασης και στην αποικοδόμηση του mRNA. Τα miRNA μεταγράφονται από ενδογενή γονίδια ως pri-miRNA (περίπου 85 νουκλεοτίδια με δομή φουρκέτας). Αυτά γίνονται pre-miRNA όταν τα διασπάσει το ένζυμο Drosha, τα οποία με τη σειρά του θα μετατραπούν στη λειτουργική τους μορφή στο κυτταρόπλασμα, από την Dicer. Αντίστοιχα, τα siRNA προέρχονται από δίκλινα μόρια RNA, τα οποία υφίστανται επεξεργασία με το ένζυμο Dicer, επίσης. Και οι δύο μορφές RNA συμπλέκονται με πρωτεΐνες (π.χ. AGO2) και σχηματίζεται το σύμπλοκο RISC, το οποίο παρουσιάζει δράση ενδονουκλεάσης ή έξωνουκλεάσης. Έτσι,

καθίσταται δυνατή η αποικοδόμηση, συμπληρωματικών με αυτά, μορίων mRNA.

- d) Επεξεργασία άλλων μορφών RNAs (π.χ. ncRNAs)
- e) Εναλλακτικό μάτισμα

Αποικοδόμηση RNA

Από τις κυριότερες λειτουργίες των ριβονουκλεασών είναι η αποικοδόμηση των RNAs. Τα παραπάνω μόρια μπορεί να είναι μη λειτουργικά ή να μη χρησιμεύουν πλέον στο κύτταρο, με αποτέλεσμα να οδηγούνται προς αποικοδόμηση. Στη διαδικασία αυτή συμμετέχει μία πληθώρα ριβονουκλεασών, τόσο σε σύμπλοκα με άλλες πρωτεΐνες όσο και αυτοτελώς.

Τα rRNAs και τα tRNAs είναι πολύ σταθερά μόρια, για αυτό και αντιπροσωπεύουν περίπου το 90% του συνολικού RNA, τόσο σε προκαρυωτικά όσο και σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Αντιθέτως, τα mRNAs πρέπει να διαστούν με ταχύτερους ρυθμούς για να υπάρχει ισορροπία μεταξύ των μεταγραφόμενων μορίων και αυτών που θα οδηγηθούν προς αποικοδόμηση. Όσον αφορά τα βακτηριακά mRNA, αποικοδομούνται ταχέως, συνήθως με χρόνο ημίσειας ζωής μόνο 2 έως 3 λεπτά. Έτσι, επιτρέπεται στο κύτταρο να ανταποκρίνεται γρήγορα σε αλλοιώσεις στο περιβάλλον του, όπως αλλαγές στη διαθεσιμότητα των θρεπτικών ουσιών που απαιτούνται για την ανάπτυξη του. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, ωστόσο, διαφορετικά mRNAs αποικοδομούνται με διαφορετικούς ρυθμούς, αναλόγως τις εκάστοτε ανάγκες του κυττάρου. Η αποικοδόμηση των περισσότερων ευκαρυωτικών mRNA αρχίζει με τη διάσπαση των πολυ-A ουρών τους. Στη συνέχεια ακολουθεί η αφαίρεση της 5' καλύπτρας και η αποικοδόμηση του RNA από νουκλεάσες που δρουν και από τα δύο άκρα (5'→3' και αντίστροφα). Απαραίτητο για να αφαιρεθεί η καλύπτρα, η οποία εμποδίζει την αποικοδόμηση του mRNA είναι να έχει ξεκινήσει η διάσπαση της πολυ-A ουράς. Οι χρόνοι ημίσειας ζωής των mRNA σε κύτταρα θηλαστικών κυμαίνονται από λιγότερο από 30 λεπτά έως περίπου 20 ώρες [60].

Οι ριβονουκλεάσες δρουν επιπλέον σε μόρια mRNA τα οποία έχουν εντοπιστεί με ανερμηνεύσιμες μεταλλάξεις ή δε φέρουν κωδικόνια τερματισμού. Η δράση τους παρόλα αυτά δεν είναι ανεξέλεγκτη. Η καταστροφή κάθε μορίου mRNA καθορίζεται από τη σταθερότητά του, από ειδικές αλληλουχίες στην αλληλουχία του που επάγουν την αποικοδόμησή του σε συνεργασία με siRNA και miRNA ή από τη δράση

συγκεκριμένων ενδοριβονουκλεασών. Επιπρόσθετα, υπάρχουν αρκετοί αναστολείς των ριβονουκλεασών, οι οποίοι προσδένονται με μεγάλη συγγένεια και αναστέλλουν παροδικά τη δράση τους [62]. Λαμβάνοντας υπόψιν την έντονη δράση των RNases στην κυκλοφορία και αποικοδόμηση των mRNAs, φαίνεται η σημασία του σε περιπτώσεις καρκινογένεσης. Η αποικοδόμηση ογκοκατασταλτικών mRNAs λόγω έντονης δράσης των ριβονουκλεασών ή η απουσία αποικοδόμησης ογκογόνων mRNAs, φαίνεται να εμπλέκεται σε αρκετές περιπτώσεις ογκογένεσης.

1.4.2. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΩΝ

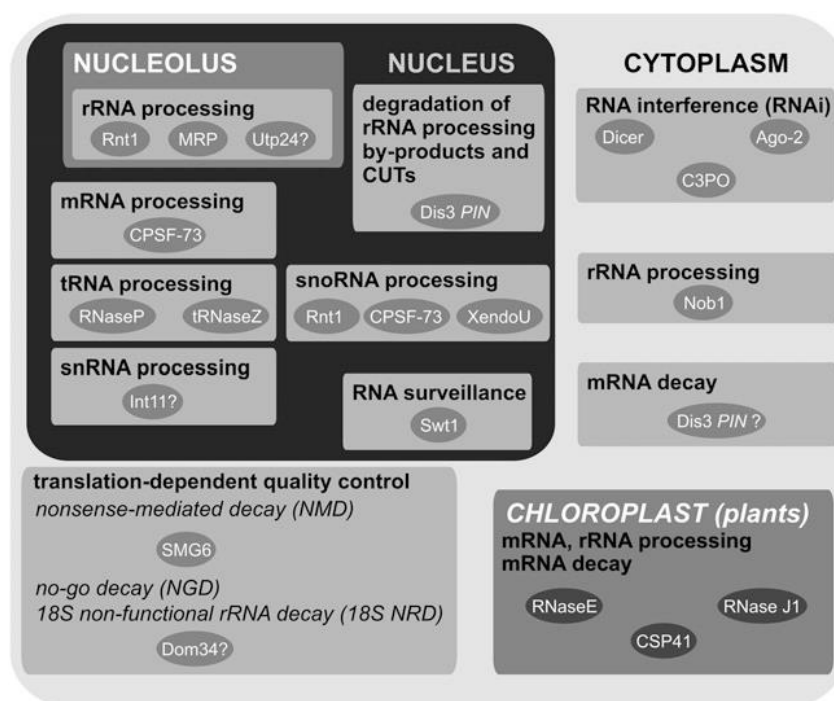
Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι ριβονουκλεάσες (RNases) παίζουν κεντρικό ρόλο σε πολλές πτυχές του μεταβολισμού του RNA. Οι αντιδράσεις που καταλύονται από αυτήν την ομάδα ενζύμων περιλαμβάνουν την επεξεργασία των πρόδρομων RNA στις ώριμες, λειτουργικές μορφές τους, την μετατροπή τους σε διαφορετικές μορφές και την αποικοδόμηση των μη λειτουργικών RNAs. Έτσι, λοιπόν, η αυτή η ομάδα ενζύμων διαχωρίζεται, αναλόγως με τον τρόπο δράσης της, σε δύο μεγάλες κατηγορίες:

Ενδοριβονουκλεάσες

Οι ενδοριβονουκλεάσες είναι ένζυμα τα οποία διασπούν τα μόρια RNA εσωτερικά, απελευθερώνοντας θραύσματα RNA διαφόρων μεγεθών. Η δράση αυτών των ενζύμων μπορεί να είναι ιδιαίτερα εξειδικευμένη, να διασπάται δηλαδή σε ένα ή λίγα σημεία ανά μόριο RNA, ή μη ειδική, όπου γίνονται διασπάσεις σε όλη την αλυσίδα του RNA, οδηγώντας το σε πλήρη αποικοδόμηση. Ανάλογα με τον μηχανισμό αντίδρασης της κάθε RNase, η διάσπαση μπορεί να γίνει και στις δύο πλευρές του φωσφοδιεστερικού δεσμού. Κάποιες ενδοριβονουκλεάσες καταλύουν μια αντίδραση υδρόλυσης, όπου σχηματίζεται ένα ενδιάμεσο κυκλικό 2',3' φωσφορικό μόριο, χωρίς να είναι απαραίτητη η ύπαρξη δισθενών κατιόντων, οι περισσότερες όμως χρειάζονται τα κατιόντα αυτά και παράγουν θραύσματα με υδροξυλιωμένα 3' άκρα και φωσφορικά 5' άκρα [63].

Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν πολλές ριβονουκλεάσες, με πιο καλά χαρακτηρισμένες αυτές της *E. Coli*. Χαρακτηριστικοί αντιπρόσωποι είναι οι RNase I, III, P, E, G, HI, HII, Z, και άλλες, οι οποίες συμμετέχουν στη διαδικασία αποικοδόμησης του RNA, στην ωρίμανσή του και στην επιδιόρθωση του DNA του βακτηρίου [63,64]. Άλλες γνωστές ριβονουκλεάσες είναι η PMR1, που ανήκει στην οικογένεια των υπεροξειδασών, δρα σε σύμπλοκο με άλλες πρωτεΐνες και αποικοδομεί το mRNA, η

IRE1, που ενεργοποιεί το γονίδιο XBP1 με μάτισμα και επάγεται η έκφραση διαφόρων γονιδίων, η RNase L, η οποία διασπά δίκλωνο ιικό RNA, μέσω του μονοπατιού 2-5A και η Dicer, που ανήκει στην οικογένεια ριβονουκλεασών III και εμπλέκεται στη βιογένεση των miRNA και siRNA για γονιδιακή αποσιώπηση μετά τη μεταγραφή. Επιπλέον σε αυτές, σημαντικές είναι η AGO2, που ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών αργοναυτών και εμπλέκεται στο RNAi μέσω του συμπλόκου RISC, η Αλδολάση C, με δράση σε mRNA του εγκεφάλου και νευρικού ιστού και η Αγγειογενίνη, που ανήκει στην οικογένεια των RNase A και διασπά μικρά μόρια RNA από tRNA, που εκφράζονται λόγω στρες. Τέλος, μερικοί αντιπρόσωποι των ενδοριβονουκλεασών είναι οι: ARD-1, G3BP, SMG6, Rrp44, PP11 και APE1 [63,65].



Εικόνα 1.5. Οι ενδοριβονουκλεάσες που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των RNAs και ο κυτταρικός εντοπισμός τους. (Πηγή: R. Tomecki and A. Dziembowski, 2010, *Novel endoribonucleases as central players in various pathways of eukaryotic RNA metabolism*, Cold Spring Harbor Laboratory Press., 16:1692–1724)

Εξωριβονουκλεάσες

Οι εξωριβονουκλεάσες δρουν διασπώντας RNA μόρια από το 3' ή και το 5' άκρο, απελευθερώνοντας υπολείμματα νουκλεοτιδίων. Ορισμένες εξωριβονουκλεάσες δρουν διαδοχικά, απελευθερώνοντας υπολείμματα συνεχώς καθώς περνούν ένα υπόστρωμα χωρίς να διαχωρίζονται. Ανάλογα με το ένζυμο, η πέψη μπορεί να

ολοκληρωθεί ή μπορεί να σταματήσει λόγω της παρουσίας δευτεροταγούς δομής στο RNA. Άλλες εξωριβονουκλεάσες δρουν ξεχωριστά και μπορούν να προσδεθούν αφού έχουν καταφέρει να αποικοδομήσουν μέχρι ενός σημείου το εκάστοτε mRNA. Στα περισσότερα βακτήρια, οι γνωστές εξωριβονουκλεάσες αρχίζουν την αποικοδόμηση από το 3' άκρο του RNA, καθώς τα βακτηριακά mRNA στερούνται καλύπτρας και θα ήταν ιδιαίτερα ευπαθή σε ριβονουκλεάσες 5'→3'. Και σε αυτή την κατηγορία ριβονουκλεασών ανήκουν αρκετές οικογένειες. Αυτές είναι η α) RNR, η οποία περιέχει μη ειδικές ριβονουκλεάσες που επεξεργάζονται το RNA με 3'→5' κατεύθυνση, χρειάζεται μεταλλοκατιόντα και υπάρχει τόσο σε βακτήρια όσο και σε ευκαρυώτες, β) η DEDD οικογένεια, στην οποία περιέχονται οι RNase D, RNase T, oligoribonuclease και άλλες, επίσης με δράση 3'→5' αλλά πιο υψηλή ειδικότητα ως προς το υπόστρωμα, γ) η RBN οικογένεια, η οποία δεν παρουσιάζει ομολογία στους ευκαρυώτες και η δράση της δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένη, δ) η PDX οικογένεια, με δράση 3'→5', αφήνοντας ελεύθερα φωσφορικά δινουκλεοτίδια, στην οποία περιέχονται οι PNPase και RNase PH, ε) η RRP4 οικογένεια και στ) η 5PX οικογένεια, με δράση 5'→3' και ανιπροσώπους τις Xrn1p και Rat1p. Όλες οι παραπάνω κατηγορίες παρουσιάζουν συχνά αλληλοεπικαλυπτόμενες δράσεις, ενώ σημαντικό είναι να αναφερθεί πως η οικογένεια DEDD έχει τουλάχιστον 10 αντιπροσώπους στα ευκαρυωτικά κύτταρα [66].

1.4.3. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗΣ Κ

Η οικογένεια της ριβονουκλεάσης κ (ή RNase κ) περιέχει πρωτεΐνες μεγέθους συνήθως μεταξύ 95-101 αμινοξέων (a.a.), οι οποίες δεν παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες με άλλες ριβονουκλεάσες. Ιδρυτικό μέλος της οικογένειας αυτής θεωρείται η Cc RNase, η οποία εντοπίστηκε πρώτη φορά στο έντομο *Ceratititis capitata*, το 1987 από τους Sideris και Fragoulis. Η ριβονουκλεάση αυτή απομονώθηκε από νεαρές προνύμφες του εντόμου (6 ημερών) και φαίνεται να αποικοδομεί εκλεκτικά poly(U) και poly(C) ουρές, χωρίς να παρουσιάζει την αντίστοιχη δραστηριότητα σε άλλα ομοπολυριβονουκλεοτιδικά υποστρώματα. Η σχετική μοριακή μάζα της είναι 25000 (95 a.a.) και οι βέλτιστες συνθήκες pH για τη δράση της είναι μεταξύ 7-9 [67]. Αντιπροσωπεύεται από ένα ορθόλογο γονίδιο σε πολλούς οργανισμούς, και στο έντομο *Ceratititis capitata* δίνει δύο μετάγραφα, ένα 0,9 και ένα 1,5 kb. Τα ορθόλογα γονίδια αποτελούνται από τρία εξόνια και δύο εσόνια, που έχουν αρκετά συντηρημένες τις θέσεις τους, έτσι και στο έντομο *Ceratititis capitata* και στα περισσότερα γονιδιώματα που μελετήθηκαν [68].

Από ανάλυση που έγινε με βάση τις αλληλουχίες EST, αποδείχτηκε ότι η Cc RNase έχει έντονη ομολογία με άλλες μη χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες, που έχουν απομονωθεί από 20 διαφορετικά ζωικά είδη. Αυτή η ευρεία κατανομή της Cc RNase στο ζωικό βασίλειο συνεπάγεται με ισχυρή επιλογή του ενζύμου κατά την εξέλιξη, υποδηλώνοντας ότι εκτελεί μια πολύ βασική βιολογική λειτουργία. Αντιπρόσωποι της υπάρχουν τόσο στα μετάζωα όσο και στα θηλαστικά, ενώ ένας μεγάλος αριθμός ανθρώπινων ESTs που προέρχονται από ενήλικους ή εμβρυικούς ιστούς, φυσιολογικούς και μη, κωδικοποιούν για τον αντίστοιχο αντιπρόσωπο της οικογένειας αυτής, στον άνθρωπο. Η ευρεία αυτή έκφραση της ριβονουκλεάσης αυτής την καθιστά γονίδιο αναφοράς (housekeeping gene) [69].

1.4.3.1. Η ανθρώπινη ριβονουκλεάση κ: Δομή και Δράση

Η μελέτη της ανθρώπινης RNase κ στο εργαστήριό μας ξεκίνησε το 2007, όπου πραγματοποιήθηκε μοριακή κλωνοποίηση και χαρακτηρισμός του γονιδίου της (Economopoulou, Sideri, Fragoulis). Τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης έδειξαν ότι το ορθόλογο γονίδιο της ριβονουκλεάσης αυτής εδράζεται στο χρωμόσωμα 17, με ακριβή θέση 17p13.1, που αντιστοιχεί στο γενετικό τόπο LOC440400. Σύγκριση της αλληλουχίας του γενωμικού DNA και του cDNA, αποκάλυψε ότι όπως τα περισσότερα ορθόλογα γονίδια, έτσι και το γονίδιο της ριβονουκλεάσης κ αποτελείται από 3 εξώνια και 2 εσώνια. Το πρώτο εσώνιο έχει μήκος 904 ζεύγη βάσεων (base pairs; bp) ενώ το δεύτερο, 402 b.p.. Όσον αφορά το πρώτο εξώνιο, αποτελείται από 118 b.p., εκ των οποίων τα 40 b.p. αντιπροσωπεύουν την 5' αμετάφραστη περιοχή και το υπόλοιπο μέρος κωδικοποιεί τα πρώτα 26 a.a.. Το δεύτερο εξώνιο αποτελείται από 77 b.p., οι οποίες κωδικοποιούν τα επόμενα 26 a.a. της ανθρώπινης πρωτεΐνης. Τέλος, το τρίτο εξώνιο απαρτίζεται από 387 b.p., από τα οποία 139 b.p. κωδικοποιούν τα τελευταία 46 a.a. , ενώ τα υπόλοιπα 245 b.p. ανήκουν στην 3' αμετάφραστη περιοχή. Συγκρίνοντας, λοιπόν, την ανθρώπινη RNase κ με την προηγουμένως χαρακτηρισμένη Cc RNase της ίδιας οικογένειας, εμφανίζεται μια σειρά από σημαντικές ομοιότητες. Η ανθρώπινη πρωτεΐνη είναι κατά τρία αμινοξέα μεγαλύτερη (αποτελείται δηλαδή από 98 a.a.) και εμφανίζει 40% ομοιότητα σε επίπεδο αμινοξέων με την Cc RNase [70].

Η ανάλυση κατά Northern είχε ως αποτέλεσμα την ανίχνευση του κύριου mRNA της ανθρώπινης RNase κ που εμφανίζει μήκος 700 νουκλεοτιδίων, σε όλους τους ιστούς που εξετάστηκαν. Δύο μεγαλύτερα μετάγραφα των 3,1 και 5 kb βρέθηκαν

μόνο στον εγκέφαλο, τον πλακούντα και το πάγκρεας, ενώ ένα τρίτο, με μήκος 1,6 kb, εκφράζεται σε Β κύτταρα [70].

Η RNase κ παρουσιάζει δράση ενδοριβονουκλεάσης διασπώντας ειδικά μονόκλωνες αλυσίδες σε θέσεις με ApU και ApG φωσφοδιεστερικούς δεσμούς, ενώ υδρολύει σε χαμηλότερο βαθμό UpU δεσμούς. Είναι θερμοευαίσθητο ένζυμο, αναστέλλεται από δισθενή κατιόντα, όπως το Zn^{2+} , και λειτουργεί στο ίδιο εύρος pH με τη Cc RNase. Η καταλυτική ενεργότητά της οφείλεται σε μερικά κατάλοιπα κυστεϊνών, τα οποία φαίνονται συντηρημένα μεταξύ της οικογένειας RNase κ, σε πολλούς οργανισμούς. Τα Cys6, Cys14 και Cys69 κατάλοιπα είναι απόλυτα συντηρημένα, ενώ τα Cys7 και Cys85 είναι απόλυτα συντηρημένα μεταξύ των σπονδυλωτών, αμφιβίων, πτηνών και θηλαστικών. Αυτή η συντηρητικότητα υποδεικνύει τη μεγάλη σημασία των καταλοίπων κυστεϊνης, καθώς μεταξύ των Cys6 και Cys69 σχηματίζεται ένας δισουλφιδικός δεσμός που βοηθάει στη σωστή διαμόρφωση του μορίου [71].

Σε πρόσφατα πειράματα (2014) που έγιναν στο εργαστήριό μας, από τους Karousis και Sideris, βρέθηκε μια ακόμα ισομορφή της ριβονουκλεάσης κ, η οποία προκύπτει από ένα καινούργιο μετάγραφο mRNA, λόγω εναλλακτικού ματίσματος. Μέχρι στιγμής, το γνωστό μετάγραφο, το οποίο μελετήθηκε με τη μορφή cDNA, είναι μήκους 466 b.p. και δίνει μια πρωτεΐνη 98 a.a. (RNase κ01) με ενδοριβονουκλεοτιδική δράση. Το νέο μετάγραφο, προκύπτει από εναλλακτικό μάτισμα στο σημείο σύνδεσης του εξωνίου 1 και 2, με αποτέλεσμα να απουσιάζει μια αλληλουχία GTTG. Κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 134 a.a. (RNase κ02), μοριακού βάρους 14.900 Da, η οποία έχει κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης ανοδικά με το αντίστοιχο της κ01. Οι δυο αμινοξικές αλληλουχίες δεν παρουσιάζουν καμία ομοιότητα στο αμινοτελικό τους άκρο, όμως η περιοχή 63-134 a.a. της κ02 είναι απόλυτα ταυτόσημη με τη περιοχή 27-98 a.a. περιοχή της κ01. Και οι δύο ισομορφές εκφράζονται, σε διαφορετικές αναλογίες, σε όλες τις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν, η ισομορφή κ02 όμως φαίνεται να είναι αρκετά πιο υδρόφοβη. Αυτό, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι εντοπίζεται κυτταροπλασματικά, οδηγεί στο συμπέρασμα πως πιθανώς συμμετέχει στο σχηματισμό μακρομοριακών συγκροτημάτων και εντοπίζεται σε μεμβρανικές δομές, όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο [72].

Η ριβονουκλεάση κ, παρόλα αυτά, φαίνεται να εμπλέκεται και σε άλλες διεργασίες, που δεν απαιτούν δράση ριβονουκλεάσης. Συγκεκριμένα, φαίνεται πως βοηθάει την ενδοκύττωση, μεσολαβούμενη από κλαθρίνη, πολλών ιών στο κύτταρο-ξενιστή. Τέτοιοι ιοί είναι του δάγκειου πυρετού, του Δυτικού Νείλου, των ιών της γρίπης, κ. ά.. Δε φαίνεται να συμμετέχει στην προσκόλληση των ιών στο κύτταρο, αλλά βοηθάει πιο πολύ στα αρχικά στάδια της ενσωμάτωσής του. Επιπλέον, υποστηρίζεται πως επηρεάζει άμεσα την αντλία V-ATPase, έχοντας σημαντικό στη ρόλο στη λειτουργία της, ενώ απώλεια της ριβονουκλάσης κ αποτρέπει τα πρώιμα στάδια ενδοκύττωσης και πολλαπλασιασμού πολλών ιών [73,74].

1.4.4. ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Η αλληλεπίδραση μεταξύ διαφόρων ριβονουκλεασών (RNases) επηρεάζει την κυκλοφορία και έκφραση των mRNAs σε πολλούς οργανισμούς. Ελλείπει ρυθμιστικών μηχανισμών, οι ενδοριβονουκλεάσες έχουν σοβαρή επίδραση στην έκφραση γονιδίων, δεδομένου ότι μια μόνο ενδοουκλεολυτική διάσπαση σε ένα μόριο mRNA έχει ως αποτέλεσμα την απενεργοποίηση του. Τα κύτταρα έχουν μηχανισμούς για την αποφυγή τέτοιας ασυνήθιστης αποικοδόμησης των mRNAs, έτσι ώστε οι ριβονουκλεάσες να δρουν μόνο όποτε είναι απαραίτητο για το κύτταρο [75].

Οι RNases εξυπηρετούν πολλές λειτουργίες στο κύτταρο, αλλά η ρύθμισή τους παραμένει άγνωστη σε πολύ μεγάλο βαθμό. Έχει δειχθεί πως επηρεάζουν την έκφραση mRNAs ογκογονιδίων και παραγόντων νέκρωσης όγκων, ενώ εμπλέκονται και στην έκφραση miRNAs τα οποία με τη σειρά τους ρυθμίζουν την κυκλοφορία/«ζωή» πολλών mRNAs [75]. Έτσι, λοιπόν, οι ριβονουκλεάσες έχουν διττό ρόλο στην καρκινογένεση, καθώς μπορούν να την ευνοήσουν διασπώντας ογκοκατασταλτικά mRNAs, ή να την αποτρέψουν, διασπώντας mRNAs ογκογονιδίων. Μερικά παραδείγματα τέτοιων ενζύμων παρουσιάζονται παρακάτω:

- a) PARN: Η δράση της ριβονουκλάσης PARN, σε συνδυασμό τις δράσεις των RBPs, θεωρείται ογκοκατασταλτική, προκαλώντας αποικοδόμηση mRNAs που κωδικοποιούν αυξητικούς παράγοντες όπως IL-8 και VEGF [76]. Επίσης, η PARN, σε σύμπλεγμα με άλλες πρωτεΐνες, προκαλεί την αποσταθεροποίηση διαφόρων mRNAs, συμπεριλαμβανομένων των c-jun και uPA, των οποίων οι αυξήσεις εμπλέκονται σε περιπτώσεις καρκινογένεσης [75].

- b) XRN1: Το XRN1 είναι ένα παράδειγμα ενζύμου που εμπλέκεται στον καρκίνο ως απορυθμισμένο ογκοκατασταλτικό γονίδιο. Σε δείγματα οστεογόνου σαρκώματος και σε κυτταρικές σειρές που προέρχονται από αυτό, υπήρξε εμφανής μείωση των επιπέδων του mRNA του [77].
- c) RNase L: Το γονίδιο της RNase L χαρτογραφείται σε μια περιοχή που συνδέεται με την προδιάθεση του κληρονομικού καρκίνου του προστάτη (HPC). Πολλές μεταλλάξεις και πολυμορφισμοί στο γονίδιο της φαίνονται να είναι υπεύθυνοι για επιθετικές μεταστάσεις. Συμμετέχει σε σηματοδοτικά μονοπάτια της ιντερφερόνης και θεωρείται ότι επάγει την αύξηση της έκφρασης ογκοκατασταλτικών γονιδίων.
- d) PMR1: Το μονοπάτι της PMR1 φαίνεται να χρησιμοποιείται από το πρωτο-ογκογονίδιο c-Src, το οποίο είναι ενεργοποιημένο σε πολλούς καρκίνους, για την καταστροφή ογκοκατασταλτικών mRNAs.
- e) Dicer: Η Dicer θεωρείται ότι μπορεί να δράσει ως πρωτογονογονίδιο ή ογκοκατασταλτικό γονίδιο, λαμβάνοντας υπόψη την ικανότητά της να επεξεργάζεται όλα τα δίκλιωνα RNAs, χωρίς προτίμηση συγκεκριμένης αλληλουχίας. Σε γενικές γραμμές, η υπερέκφραση της έχει συνδεθεί κυρίως με ογκογένεση, αλλά υπάρχουν επίσης στοιχεία που υποστηρίζουν το ρόλο της Dicer ως καταστολέας όγκων.
- f) AGO2: Πρόσφατες αναφορές υπογραμμίζουν τροποποιημένα επίπεδα της AGO2 απορρυθμίζουν τις λειτουργίες των miRNAs στον καρκίνο. Μια μελέτη παρουσίασε αυξημένα τα επίπεδα της σε επιθετικούς όγκους καρκίνου του μαστού.
- g) Αγγειογενίνη: Η μείωση της δραστηριότητάς της εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Σε κυτταρικές σειρές μελανώματος, ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών δεν μπορούσε να επάγει τον πολλαπλασιασμό απουσία αγγειογενίνης, ενώ σε μελέτες καταστολής του γονιδίου της, σε κύτταρα HeLa, εμφανίστηκε αξιοσημείωτη αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων [75].

Οι παραπάνω ριβονουκλεάσες είναι μόνο μερικά παραδείγματα από τον συνολικό αριθμό ενζύμων που εμπλέκονται στην καρκινογένεση. Όπως είναι εμφανές, η απορρύθμιση στην έκφρασή τους μπορεί να συμβάλει θετικά ή αρνητικά στην επαγωγή της καρκινογένεσης.

Διάφορες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί και στο εργαστήριό μας, για το ρόλο της RNase κ στην καρκινογένεση. Πρόσφατα δεδομένα από ανάλυση έκφρασης με μικροσυστοιχίες αποκαλύπτουν ότι το γονίδιο της RNase κ βρίσκεται είτε υπερεκφρασμένο είτε υποκεφρασμένο σε έναν αριθμό ανθρώπινων καρκίνων, υποδεικνύοντας μία πιθανή διαγνωστική ή προγνωστική χρησιμότητα. Σε κυτταρικές σειρές καρκίνου μαστού και ωοθηκών παρουσιάστηκε μία αύξηση στα επίπεδα έκφρασης του mRNA της, μετά τη θεραπεία με τον αντινεοπλασματικό παράγοντα πακλιταξέλη. Αντίθετα, η θεραπεία με τα υπόλοιπα αντικαρκινικά φάρμακα δεν άλλαξε δραστικά τα επίπεδα του mRNA της RNase κ. Με βάση το γεγονός ότι η πακλιταξέλη ασκεί την κυτταροτοξική δράση της προκαλώντας απόπτωση, τα αποτελέσματα θα μπορούσαν να είναι ενδεικτικά μιας πιθανής εμπλοκής της ριβονουκλεάσης κ σε αποπτωτικές οδούς [78].

Έχοντας ως δεδομένα τα παραπάνω, φαίνεται πως πολλές ριβονουκλεάσες είναι χρήσιμες στη θεραπεία ενάντια στον καρκίνο. Πολλές κλινικές μελέτες έχουν γίνει και ορισμένες RNases έχουν φανεί να έχουν ιδιαίτερα αποτελέσματα εναντίον των καρκινικών κυττάρων, όπως η ογκονάση και η RNase P [79].

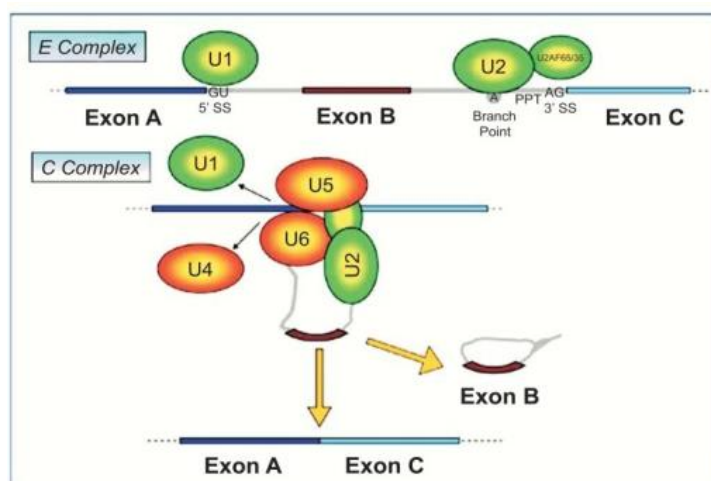
1.5. ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΟ ΜΑΤΙΣΜΑ

1.5.1. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΜΑΤΙΣΜΑΤΟΣ

Είναι γνωστό ότι τα περισσότερα γονίδια των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών απαρτίζονται από εσώνια και εξώνια. Για να σχηματιστεί το πλήρως λειτουργικό ώριμο mRNA, τα εσώνια πρέπει να απομακρυνθούν και τα εξώνια να συνδεθούν μεταξύ τους, με μια διαδικασία που ονομάζεται μάτισμα ή συρραφή. Η συρραφή είναι μια ιδιαίτερα ευαίσθητη διαδικασία, καθώς αν γίνει λάθος στα σημεία ματίσματος, μπορεί να αλλάξει το πλαίσιο ανάγνωσης και δίνεται μια τελείως διαφορετική αμινοξική αλληλουχία. Έτσι, λοιπόν, για όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς υπάρχουν καθορισμένα σημεία όπου πραγματοποιείται η συρραφή, για την αποφυγή λαθών κατά το σχηματισμό του ώριμου mRNA. Τα εσώνια ξεκινούν με τις βάσεις GU (5') και τελειώνουν με AG (3'). Μια σημαντική θέση βρίσκεται ανοδικά της 3' θέσης συρραφής κατά 20-50 νουκλεοτίδια, η οποία ονομάζεται θέση διακλάδωσης. Το μέγεθός τους ποικίλει από 50 έως και 10.000 νουκλεοτίδια, ενώ τα εξώνια είναι αρκετά μικρότερα [80].

Η διαδικασία του ματίσματος είναι μια πολύπλοκη διαδικασία, όπου απαιτείται συνεργασία πολλών μικρών RNA μορίων και πρωτεϊνών, που σχηματίζουν τα σωματίδια συρραφή και ονομάζονται snRNPs (small nuclear ribonucleoprotein particles). Η διαδικασία αυτή πρακτικά αποτελείται από δύο αντιδράσεις τρανσεστεροποίησης. Αρχικά, η 5' θέση συρραφής αναγνωρίζεται από το snRNP U1, το οποίο προσδένεται στη θέση αυτή του pre-mRNA και στρατολογεί το σωματίδιο συρραφής. Στη συνέχεια, το snRNP U2 προσδένεται στη θέση διακλάδωσης και το προσχηματισμένο σύμπλοκο των U4-U5-U6, θα συνδεθεί με το σύμπλοκο U1-U2. Το U5 αλληλεπιδρά με της αλληλουχίες των εξώνιων στη θέση συρραφής του ανοδικού εξώνιου και μετά με το καθοδικό εξώνιο. Το U6 αποσυνδέεται από το U4 και υφίσταται ενδομοριακή αναδιάταξη, η οποία επιτρέπει το ζευγάρωμα των βάσεων με το U2, την αλληλεπίδραση με το 5' άκρο του εσώνιου και την εκτόπιση του U1 από το σωματίδιο συρραφής. Έτσι, προκαλείται μια σχάση του ανοδικού εξώνιου και σχηματίζεται ένα ενδιάμεσο με δομή βρόγχου. Περαιτέρω ανακατατάξεις πραγματοποιούνται στο RNA, στο σωματίδιο συρραφής, έτσι ώστε να ευθυγραμμιστεί το ελεύθερο ανοδικά εξώνιο με το καθοδικό. Έτσι, η 3'-υδροξυλική ομάδα του ανοδικού εξώνιου μπορεί να προσβάλλει πυρηνοφιλικά τη θέση συρραφής 3', για να σχηματιστεί το συρραμμένο προϊόν. Τα U2,U5 και U6, που βρίσκονται συνδεδεμένα στο αποκομμένο εσώνιο με δομή βρόγχου, ελευθερώνονται για την ολοκλήρωση της διαδικασίας [79].

Σε πολλά βήματα των παραπάνω διεργασιών, απαιτείται η υδρόλυση ATP. Η ελεύθερη αυτή ενέργεια που παράγεται ωθεί συγκεκριμένες RNA ελικάσες να εκτυλίξουν τις δίκλωνες δομές RNA που σχηματίζονται, έτσι ώστε να μπορέσουν να απομακρυνθούν τα εκάστοτε snRNP μόρια από το mRNA [79].



Εικόνα 1.6. Απεικόνιση διαδικασίας ματίσματος (Πηγή: La Cognata V, Iemmo R, D'Agata V, Scuderi S, Drago F, Zappia M, Cavallaro S, 2014, Increasing the Coding Potential of Genomes Through Alternative Splicing: The Case of PARK2 Gene., Curr. Genomics, 15(3):203-16)

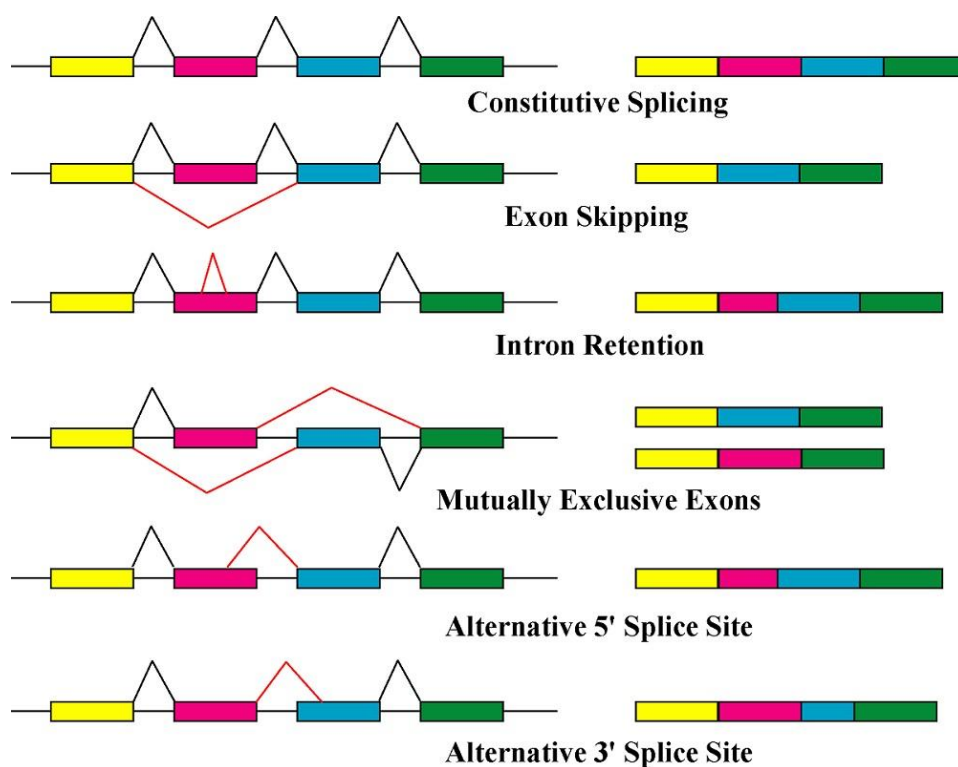
1.5.2. ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΗ ΣΥΡΡΑΦΗ

Ο κεντρικός ρόλος του ματίσματος στην επεξεργασία του pre-mRNA προσφέρει τη δυνατότητα ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης ελέγχοντας τη δραστηριότητα του μηχανισμού ματίσματος. Τα περισσότερα pre-mRNAs περιέχουν πολλαπλά εσώνια, συνεπώς πολλά διαφορετικά mRNAs μπορούν να παραχθούν από το ίδιο γονίδιο με διαφορετικούς συνδυασμούς των θέσεων συρραφής 5' και 3'. Η δυνατότητα σύνδεσης εξωνίων σε ποικίλους συνδυασμούς παρέχει ένα νέο μέσο για τον έλεγχο της έκφρασης των γονιδίων, δημιουργώντας πολλαπλά mRNAs (και κατ' επέκταση πολλαπλές πρωτεΐνες), από το ίδιο pre-mRNA. Αυτή η διαδικασία, που ονομάζεται εναλλακτική συρραφή και εμφανίζεται συχνά στα γονίδια των σύνθετων ευκαρυωτικών οργανισμών, παρέχει έναν σημαντικό μηχανισμό για εξειδικευμένη και ισορροπημένη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων [60].

Το εναλλακτικό μάτισμα είναι ιδιαίτερα χρήσιμο για την παραγωγή διαφορετικών πρωτεϊνών ανάλογα τον ιστό, το αναπτυξιακό στάδιο ή ακόμα και τις διάφορες σηματοδοτικές πορείες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το γονίδιο που κωδικοποιεί την καλσιτονίνη αλλά και το πεπτίδιο σχετιζόμενο με το γονίδιο της καλσιτονίνης (CGRP- calcitonin gene related peptide). Στο θυρεοειδή αδένα, μέσω συρραφής και συμπερίληψης των εξωνίων 1-4, παράγεται η καλσιτονίνη, μια πεπτιδική ορμόνη που ρυθμίζει το μεταβολισμό του ασβεστίου και του φωσφόρου. Σε νευρικά κύτταρα, με διαφορετική πορεία συρραφής, όπου αποκλείεται το εξώνιο 4 και συρράβονται τα 1-3 και 5, παράγεται το CGPR, μια πεπτιδική ορμόνη που δρα ως αγγειοδιασταλτικός παράγοντας. Ένα άλλο ακραίο παράδειγμα αποτελεί το μόριο pre-mRNA της *Drosophila*, το οποίο κωδικοποιεί τη DSCAM, μια πρωτεΐνη των νευρώνων. Υπολογίζεται ότι η εναλλακτική συρραφή του μορίου pre-mRNA μπορεί να δώσει 38.016 συνδυασμούς εξωνίων, στην πραγματικότητα όμως παράγεται μόνο ένα κλάσμα αυτών των δυνατών μορίων mRNA [80].

Η ρύθμιση του εναλλακτικού ματίσματος είναι μια πολύπλοκη διαδικασία στην οποία λειτουργούν πολυάριθμα αλληλεπιδρώντα συστατικά, συμπεριλαμβανομένων *cis*- και *trans*- δρώντων στοιχείων. Πρόσθετα μοριακά χαρακτηριστικά, όπως η δομή της χρωματίνης, η δομή του RNA και η εναλλακτική έναρξη της μεταγραφής ή ο

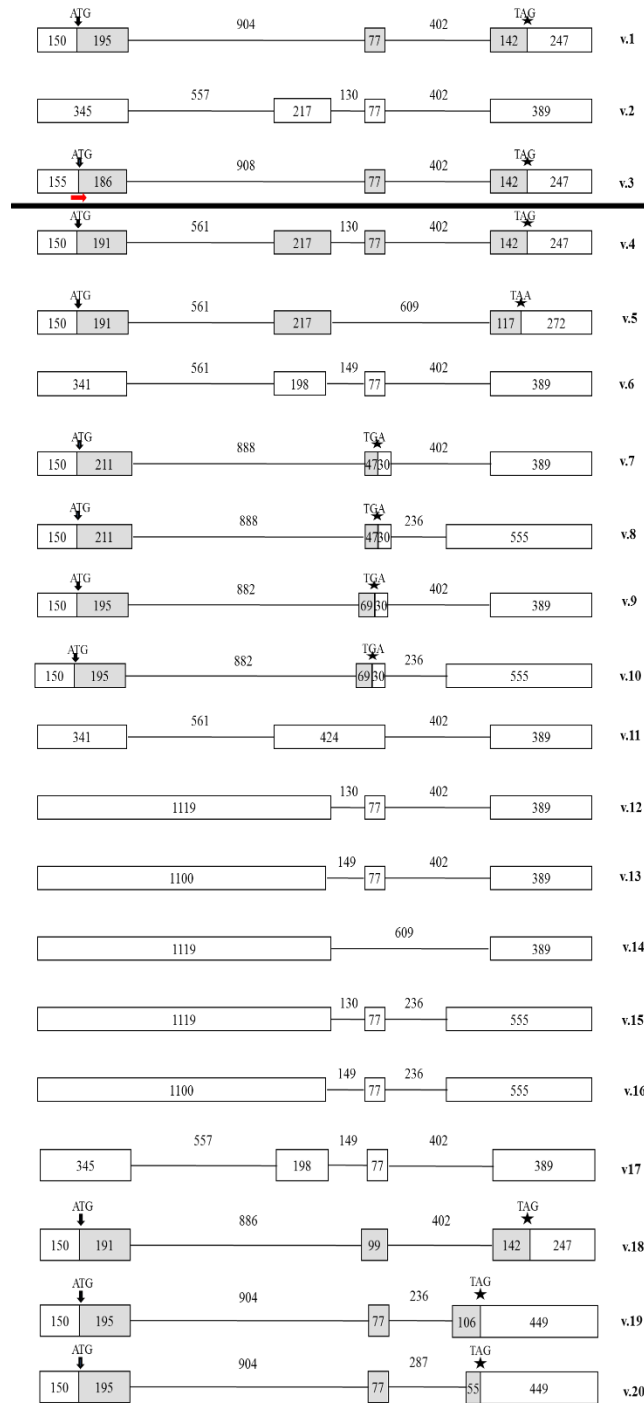
εναλλακτικός τερματισμός της μεταγραφής, συνεργάζονται με αυτά τα βασικά συστατικά για να παραγάγουν μια μεγάλη ποικιλία πρωτεϊνών. Όλοι αυτοί οι παράγοντες που συμβάλλουν σε αυτή τη θεμελιώδη βιολογική διαδικασία συνθέτουν έναν μηχανισμό, κρίσιμο για την καλή λειτουργία των κυττάρων. Οποιαδήποτε τροποποίηση της διαδικασίας μπορεί να οδηγήσει σε διακοπή της φυσιολογικής κυτταρικής λειτουργίας και στην πιθανότητα εμφάνισης ασθένειας. Ο καρκίνος είναι μια από αυτές τις ασθένειες, όπου η εναλλακτική συρραφή μπορεί να αποτελέσει τη βάση για τον εντοπισμό νέων διαγνωστικών και προγνωστικών βιοδεικτών, καθώς και για νέες στρατηγικές θεραπείας. Συστηματικές αναλύσεις των ESTs περιοχών και των δεδομένων μικροσυστοιχιών, έχουν μέχρι στιγμής αποκαλύψει επτά κύριους τύπους εναλλακτικών ματίσματος. Το πιο διαδεδομένο μοτίβο (~ 30%) είναι το τύπου κασέτας εναλλακτικό εξώνιο (skipping exon) σε σπονδυλωτά και ασπόνδυλα, ενώ σε πολλά μετέωρα είναι η κατακράτηση εσωνίου [81].



Εικόνα 1.7. Μορφές εναλλακτικού ματίσματος (Πηγή: https://en.wikipedia.org/wiki/Protein_isoform#/media/File:Alternative_splicing.jpg)

Σε πρόσφατες μελέτες που είχαν γίνει στο εργαστήριό μας, υπήρξαν ισχυρές ενδείξεις για την ύπαρξη νέων μεταγράφων του γονιδίου της ριβουκλεάσης κ, λόγω εναλλακτικού ματίσματος. Σε εργασίες των Adamopoulos P.G., Kontos C.K., Scorilas A. and Sideris D.C., μέσω αλληλούχισης νέας γενιάς (NGS) το 2014, εντοπίστηκαν 17

νέα μετάγραφα σε 19 διαφορετικές κυτταρικές σειρές. Τα νέα αυτά μετάγραφα φαίνονται να έχουν τροποποιημένη έκφραση μεταξύ των διάφορων κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν, υποδηλώνοντας πως το κάθε παραγόμενο mRNA ευνοείται σε συγκεκριμένες περιπτώσεις, π.χ. σε καρκίνο μαστού ή λευχαιμία. Τα νέα μετάγραφα, τα οποία επιβεβαιώθηκαν παρουσιάζονται παρακάτω:



Εικόνα 1.8. Σχηματική απεικόνιση των καταχωρημένων μεταγράφων της RNase κ, 1, 2 και 3 και των υπόλοιπων 17 νέων μεταγράφων που εντοπίστηκαν με NGS και επιβεβαιώθηκαν με PCR.

Ορισμένα από τα παραπάνω μετάγραφα παρουσίασαν τροποποιημένη έκφραση, βάσει της ημιποσοτικής ανάλυσης (PCR), στην κυτταρική σειρά οξείας Τ λευχαιμίας (Jurkatt). Συγκεκριμένα, το μετάγραφο 14 παρουσιάζει έντονη έκφραση στην κυτταρική σειρά Jurkatt και το μετάγραφο 4 του γονιδίου της RNase κ παρουσιάζει μια καθολική έκφραση σε πολλές κυτταρικές σειρές, απουσιάζει όμως από την κυτταρική σειρά Jurkatt [82].

1.6. ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα νέα επιβεβαιωμένα μετάγραφα του γονιδίου της RNase κ παρουσιάζουν διάφορα μοτίβα έκφρασης σε ποικίλες κυτταρικές σειρές. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η έντονη έκφραση του μεταγράφου 14 στην κυτταρική σειρά Jurkatt, αλλά και η απουσία του μεταγράφου 4 από αυτήν. Έχοντας, λοιπόν, ως δεδομένα τα παραπάνω, θεωρήθηκε σκόπιμο να αξιολογηθεί η ποσοτική έκφραση των παραπάνω μεταγράφων, όπως και του μεταγράφου 1 που κωδικοποιεί την RNase κ, σε ασθενείς με ΟΛΛ. Για την αξιολόγηση αυτή, ελήφθησαν δείγματα μυελού των οστών τόσο από παιδιά με ΟΛΛ, όσο και από υγιείς δότες, από όπου έγινε απομόνωση ολικού RNA και στη συνέχεια μέσω αντίστροφης μεταγραφής, παρασκευάστηκε το αντίστοιχο cDNA. Στη συνέχεια, αναπτύχθηκε και βελτιστοποιήθηκε μέθοδος ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο (quantitative real-time PCR; qPCR), με τη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής SYBR-Green I και γονίδιο αναφοράς της *HPRT-1*. Τέλος, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση, για την αξιολόγηση της κλινικής σημασίας των παραπάνω μεταγράφων, με βάση τα κλινικοπαθολογικά δεδομένα που είχαν συλλεχθεί από κάθε ασθενή και με την μετέπειτα πορεία τους (follow-up).

Συνοπτικά, λοιπόν, στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η:

- a) Η ποσοτική μελέτη της έκφρασης του μεταγράφου 1, καθώς και του μεταγράφου 4 και 14 της RNase κ σε δείγματα ασθενών με οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία,
- b) Η σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των παραπάνω μεταγράφων μεταξύ υγιών και ασθενών με ΟΛΛ,
- c) Μελέτη των επιπέδων έκφρασης των μεταγράφων συναρτήσει των διάφορων κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών.
- d) Μελέτη της επιβίωσης των ασθενών και ανταπόκρισης των ασθενών στην θεραπεία σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης των μελετούμενων μεταγράφων.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΥΛΙΚΑ

2.1.1. ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω χημικές ουσίες, με αλφαβητική σειρά:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΕΤΑΙΡΙΑ
Αγαρόζη	NIPPON Genetics
Αιθανόλη	Sigma- Aldrich
Βορικό οξύ	Applichem
Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr)	MP Biomedicals, LLC
Διμεθυλο-σουλφοξειδίο (DMSO)	Applichem
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Biosera
EDTA	Chem Lab
Εμβρυϊκός βόειος ορός (FBS)	Gibco
Θρυψίνη (Trypsin)	Biosera
Ισοπροπανόλη	Applichem
Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη (pen/strep)	Euro-lone
Τρισ-υδροξυμέθυλο αμινο-μεθάνιο (Tris)	Duchefa Biochemie
TRI REAGENT- BD	MRC
RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute)	Biosera
Ρυθμιστικό Διάλυμα Φωσφορικών (PBS)	Biosera
Χλωροφόρμιο	PENTA

Πίνακας 2.1. Χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία.

2.1.2. ΧΗΜΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

10x TBE: 54 g Tris Base, 27,5 g Βορικό οξύ, 20 mL 0,5 M EDTA (pH=8) σε τελικό όγκο 1000 mL

EtBr (6μL/20mL αγαρόζης): 15 μL stock (10 mg/mL) σε 185 μL dH₂O

2.1.3. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στη διπλωματική εργασία αυτή, ήταν δύο:

HEK293: Τα HEK293 (Human Embryonic Kidney cells) είναι εμβρυονικά κύτταρα νεφρού, που αναπτύσσονται σε καλλιέργειες ιστών. Χρησιμοποιούνται στην κυτταρική βιολογία πολλά χρόνια, λόγω του αυξημένου ρυθμού πολλαπλασιασμού τους, καθώς επίσης χρησιμοποιούνται και στη διαδικασία της διαμόλυνσης (ως host για γονιδιακή έκφραση). Προέκυψαν από το μετασχηματισμό και την καλλιέργεια απλών HEK κυττάρων με DNA από τον αδενοϊό 5, καθώς ενσωματώθηκε στο χρωμόσωμα 19 των HEK, υπό γενετικό υλικό περίπου 4,5 kb.

Jurkatt: Τα Jurkatt είναι μια αθανατοποιημένη ανθρώπινη κυτταρική σειρά T λεμφοκυττάρων, η οποία είναι ευρέως χρησιμοποιούμενη για τη μελέτη T- λευχαιμιών, της σηματοδότησης των T- κυττάρων και για την έκφραση διάφορων υποδοχέων χημειοκινών. Η απομόνωσή τους έγινε από το περιφερειακό αίμα ενός 14χρονου αγοριού, που έπασχε από T λεμφοκυτταρική λευχαιμία. Πλέον, υπάρχουν πολλά κυτταρικά παράγωγα των Jurkatt, τα οποία έχουν τροποποιηθεί για να εκφράζουν ή όχι συγκεκριμένα γονίδια.

2.1.4. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

Για την παρασκευή των θρεπτικών υλικών των παραπάνω κυτταρικών σειρών, ακολουθήθηκε η εξής πορεία: Σε 45 mL θρεπτικού μέσου (DMEM και RPMI, για την καλλιέργεια των HEK293 και Jurkatt, αντιστοίχως), προστίθενται 5 mL βόειου εμβρυϊκού ορού (FBS) και 500 μ L των αντιβιοτικών πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Επομένως, οι αναλογίες είναι 10% FBS και 1% pen/strep.

2.1.5. ENZYMA

Για τις ανάγκες της διπλωματικής εργασίας, χρησιμοποιήθηκαν συγκεκριμένα kit με τα αντίστοιχα ένζυμα. Όσον αφορά τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής, χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας των ριβονουκλεασών (RNase OUT) και η αντίστροφη μεταγραφάση M-MLV της Invitrogen, Thermo Fisher Scientific. Αντιστοίχως, για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR και nested PCR) χρησιμοποιήθηκε το KAPA Taq PCR kit της KAPA BIOSYSTEMS. Τέλος, για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real time PCR -qPCR-), χρησιμοποιήθηκε το kit KAPA SYBR FAST Universal της KAPA BIOSYSTEMS.

2.1.6. ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ

Τα ολιγονουκλεοτίδια- εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις πολυμερισμού είναι τα παρακάτω:

ΟΝΟΜΑ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ	ΜΗΚΟΣ
F69 (classical variant)	GATCATGTTGATAATGCTCGGAAT	24
192R (classical variant)	TTGCTCGTAAAGGTTGTATATGTTCTG	27
F(ATG) (PCR variant 14)	GATGGGATGGTTGAGGCCG	19
Ex2/3R (qPCR variant 4)	GAGCATTATTGGATTCGGACTCA	23
FH (nested PCR variant 14)	GCTTGCACCTCGGCGAT	17
Ex4r (PCR variant 14)	AGTTGTAGCTGACTTGCTCGT	21
Ex2/4R (nested & qPCR variant 14)	GCCATTCTGGATTCGGACTCAG	22
Ex2F (qPCR variant 14)	GAAGTGCCGGTTCTCCCTC	19
Ex1(2)/2F (qPCR variant 4)	GAGTGATCATTAAATCCACCCACC	23
2F (qPCR HPRT-1)	TGGAAAGGGTGTATTTCCTCAT	23
3R (qPCR HPRT-1)	ATGTAATCCAGCAGGTCAGCAA	22

Πίνακας 2.2. Αλληλουχίες και μήκος εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις PCR και real-time PCR.

2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1.1. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

2.1.1.1. Απόψυξη

Τα κύτταρα συντηρούνται για μεγάλα χρονικά διαστήματα, σε κατάσταση ψύξης, σε ειδικό δοχείο Dewar υγρού αζώτου. Αναλόγως την κυτταρική σειρά που επιθυμείται να αποψυχθεί, επιλέγεται το αντίστοιχο cryovial. Η διαδικασία που ακολουθεί είναι η εξής:

- i. Αφαίρεση cryovial από το υγρό άζωτο και ταχύτατη απόψυξή του με τριβή, εντός θαλάμου νηματικής ροής (hood).
- ii. Προσθήκη 1 mL ορού FBS στο cryovial και ήπια αναρρόφηση των κυττάρων. Μεταφορά τους σε falcon των 15 mL, το οποίο περιέχει επιπλέον 2 mL ορού FBS.
- iii. Φυγοκέντρηση σε 1450 rpm για 2-3 min, στους 25° C.
- iv. Αφαίρεση υπερκείμενου και προσθήκη 2 mL του αντίστοιχου θρεπτικού υλικού, για διαλυτοποίηση του pellet των κυττάρων.
- v. Μεταφορά των 2 mL κυττάρων σε κατάλληλο τριβλίο (διαμέτρου 100 mm) και προσθήκη 8 mL θρεπτικού υλικού (τελικός όγκος 10 mL).
- vi. Φύλαξη κυττάρων σε κλίβανο, σε σταθερές συνθήκες, 37° C και 5% CO₂.

2.2.1.2. Ανακαλλιέργεια (Split)

Για να πραγματοποιηθεί το split των κυττάρων, πρέπει αυτά να έχουν καλύψει περίπου το 90% του τριβλίου και να έχει αλλάξει το χρώμα του θρεπτικού τους υλικού. Αφού παρατηρηθεί η μορφολογία τους σε ανάστροφο μικροσκόπιο και αξιολογηθεί η κατάστασή τους, ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

- i. Αναρρόφηση παλιού θρεπτικού υλικού με σιφόνιο και πλύση του τριβλίου με 5 mL 1x PBS (Phosphate Buffer Saline). Έτσι, απομακρύνονται υπολείμματα θρεπτικού υλικού που δρουν ανασταλτικά για τη θρυψίνη.
- ii. Προσθήκη 2 mL θρυψίνης 1x (Trypsin EDTA 1x), ανακίνηση τριβλίου για κάλυψη όλης της επιφάνειάς του και επώαση κυττάρων για 5-10 min στον κλίβανο.

- iii. Προετοιμασία νέου τριβλίου και προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας θρεπτικού υλικού.
- iv. Παρατήρηση κυττάρων (αν υπάρχει λευκό εναιώρημα) και προσθήκη 3 mL θρεπτικού υλικού. Καλή ανάδευση με σιφόνιο, έτσι ώστε να ανασηκωθούν όλα τα κύτταρα και να συλλεχθεί όλο το εναιώρημα.
- v. Μεταφορά κυττάρων σε falcon των 15 mL και φυγοκέντρωση σε 1450 rpm, για 3 min σε συνθήκες δωματίου.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ 1: Στο σημεία αυτό, το άδειο τριβλίο ελέγχεται στο μικροσκόπιο για τυχόν μη ανασηκωμένα κύτταρα.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ 2: Εάν το ίζημα των κυττάρων δεν έχει «κάτσει» ομοιόμορφα, μπορεί να φυγοκεντρηθεί ακόμα μια φορά στις ίδιες στροφές, για 1,5 min.

- vi. Απόρριψη υπερκείμενου και προσθήκη ποσότητας νέου θρεπτικού υλικού στο falcon για αναδιαλυτοποίηση του pellet κυττάρων. Αυτή η ποσότητα του θρεπτικού υλικού που προστίθεται εξαρτάται από το split που επιθυμείται (1:6 συνήθως) και το χρόνο διπλασιασμού των κυττάρων.
- vii. Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας κυττάρων στο νέο τριβλίο και τοποθέτηση αυτοί στον κλίβανο.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ 3: Η παραπάνω διαδικασία αφορά κυτταρικές σειρές οι οποίες έχουν την ικανότητα να προσκολλώνται στην επιφάνεια του τριβλίου, π.χ. HEK 293. Για κυτταρικές σειρές οι οποίες παραμένουν στο τριβλίο με τη μορφή εναιωρήματος, η διαδικασία του split είναι αντίστοιχη, παρακάμπτοντας τα βήματα της πλύσης με PBS 1x και της θρυψίνης 1x, π.χ. Jurkatt.

2.2.1.3. Ψύξη

Για να διατηρηθούν οι κυτταρικές σειρές για μεγάλα χρονικά διαστήματα, πρέπει να φυλαχθούν σε ιδιαίτερα χαμηλές θερμοκρασίες, το οποίο επιτυγχάνεται με τη χρήση υγρού αζώτου (-196° C, σε ατμοσφαιρική πίεση). Τα κύτταρα, αφού ελεγχθούν για την πληρότητα του τριβλίου (περίπου 90%) και για τη μορφολογία τους, ανασηκώνονται από το τριβλίο, ακολουθώντας τα βήματα ανακαλλιέργειας, έως το σημείο της φυγοκέντρωσης. Το ίζημα των κυττάρων διαλυτοποιείται σε 1 mL διαλύματος κατάψυξης, το οποίο αποτελείται από 100 μL DMSO και 900 μL FBS ή

θεραπευτικό υλικό. Το DMSO αποτελεί κρυοψυκτικό παράγοντα, απαραίτητο για τη φύλαξη των κυττάρων σε χαμηλές θερμοκρασίες. Χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή όμως, καθώς σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, είναι τοξικό για τα κύτταρα. Στη συνέχεια, το διαλυτοποιημένο ίζημα μεταφέρεται σε cryovial των 2 mL. Η διαδικασία ψύξης γίνεται σταδιακά, καθώς τα cryovial αφήνεται για 24 ώρες στους -80°C και στη συνέχεια μεταφέρεται στο υγρό άζωτο για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα.

2.2.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA

2.2.2.1. Απομόνωση RNA Κυττάρων

Για την απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα χρησιμοποιήθηκε το TRI Reagent της Molecular Research Center, Inc., το οποίο βασίζεται στη δράση φαινολών, ισοθειοκυανικής γουανιδίνης και άλλων αντιδραστηρίων. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- i. Ακολουθούνται τα βήματα ανακαλλιέργειας των κυττάρων μέχρι και το σημείο της φυγοκέντρωσης.
- ii. Στο υπάρχον ίζημα των κυττάρων, και αφού απορριφθεί το υπερκείμενο, προστίθεται 1 mL του αντιδραστηρίου TRI Reagent και το ίζημα διαλυτοποιείται. Επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- iii. Το διάλυμα των κυττάρων μεταφέρεται σε eppendorf των 2 mL, όπου γίνεται προσθήκη 200 μL χλωροφορμίου. Ακολουθεί έντονη ανάδευση για μερικά sec και το διάλυμα αφήνεται στον πάγο για 15 min. Το χλωροφόρμιο βοηθάει στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών και στη διαλυτοποίησή τους στην οργανική φάση, ενώ το RNA θα βρίσκεται διαλυτό στην υδατική φάση.
- iv. Στη συνέχεια, γίνεται φυγοκέντρωση για 15 min στις 13.300 g, στους 4°C .
- v. Η υδατική φάση, η οποία περιέχει κατά κύριο λόγο RNA, μεταφέρεται σε αποστειρωμένο eppendorf των 2 mL και προστίθενται 500 μL ισοπροπανόλης. Ακολουθεί ήπια ανάδευση για μερικά sec και αναμονή στον πάγο για 10 min.
- vi. Επαναλαμβάνεται η διαδικασία της φυγοκέντρωσης για 10 min στις 13.300 g, στους 4°C .
- vii. Το διαυγές υπερκείμενο αφαιρείται και το RNA παραμένει ως λευκό ίζημα.

- viii. Στη συνέχεια, προστίθεται 1 mL αιθανόλης 75%, ελαφριά ανακίνηση του erpendorf και φυγοκέντρωση για 8 min στις 7.500 g, στους 4° C.
- ix. Με χρήση κατάλληλης σύριγγας, αφαιρείται ΠΡΟΣΕΚΤΙΚΑ η αιθανόλη, το erpendrof σκουπίζεται ελαφρώς σε διηθητικό χαρτί για απομάκρυνση υπολειμμάτων αιθανόλης και αφήνεται ανοιχτό για 3 min. Το στάδιο αυτό χρήζει ιδιαίτερης προσοχής, καθώς το ίζημα δε πρέπει να στεγνώσει πλήρως (από λευκό, διαυγές), διότι η μετέπειτα διαλυτοποίησή του θα είναι δύσκολη.
- x. Το ίζημα του RNA διαλυτοποιείται σε κατάλληλο όγκο RSS (RNA Storage Solution) και φυλάσσεται στους -80° C.

2.2.2.2. Απομόνωση RNA Μυελού των Οστών

Για την απομόνωση ολικού RNA από δείγματα μυελού, χρησιμοποιήθηκε επίσης το TRI Reagent BD, αλλά ελαφρώς τροποποιημένο πρωτόκολλο, όπως παρουσιάζεται παρακάτω:

- i. Σε erpendorf των 2 mL προστίθενται 250 μ L δείγματος, 80 μ L RNase/DNase free dH₂O και 990 μ L TRI Reagent BD και ακολουθεί έντονη ανάδευση (vortex) για 1 min.
- ii. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται επώαση σε συνθήκες δωματίου για 5 min.
- iii. Ακολουθεί προσθήκη 264 μ L χλωροφορμίου και έντονη ανάδευση με το χέρι για 15 sec. Τα δείγματα επωάζονται σε συνθήκες δωματίου για 12 min.
- iv. Τα δείγματα φυγοκεντρώνονται στα 12000 g, για 15 min, στους 4° C.
- v. Σε νέο erpendorf του 1,5 mL, μεταφέρεται η υδατική φάση και στη συνέχεια προστίθεται ίση ποσότητα ισοπροπανόλης. Ακολουθεί ανάμιξη, ήπια, περίπου 20 φορές με το χέρι.
- vi. Τα δείγματα επωάζονται σε συνθήκες δωματίου για 10 min και στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται για 10 min, στα 12000 g, στους 4° C.
- vii. Ακολουθεί προσθήκη αιθανόλης 75%, 1320 μ L σε κάθε δείγμα, με σύντομο και ήπιο vortex.

- viii. Τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 5 min, στα 7500 g, στους 4° C, τα υπερκείμενα απορρίπτονται και επαναλαμβάνεται η διαδικασία πλύσης με την αιθανόλη 75%.
- ix. Εάν χρειάζεται, τα δείγματα αναδεύονται (vortex) ελαφρώς και φυγοκεντρώνται πάλι για 5 min, στα 7500 g, στους 4° C. Στο χρονικό διάστημα αυτό, το RSS τοποθετείται στο υδατόλουτρο (55° C).
- x. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα στεγνώνει για 5-10 min στον αέρα (air dry).
- xi. Το pellet επαναδιαλύεται σε 5-8 μ L RSS, αναλόγως αν είναι ορατό ή όχι και τοποθετείται στο υδατόλουτρο (55° C) για 15 min.
- xii. Τα δείγματα, αφού φωτομετρηθούν για τον υπολογισμό της ποσότητάς τους, φυλλάσσονται στους -80° C.

2.2.3. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΟΥ RNA

Πριν το RNA χρησιμοποιηθεί, π.χ. για RT-PCR, πρέπει να είναι γνωστή η συγκέντρωσή του. Η μέτρηση αυτής πραγματοποιείται με ειδικό φωτόμετρο, το BioSpec- nano, το οποίο είναι κατάλληλο για μικρούς όγκους (απαιτείται μόλις 1 μ L για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του RNA) και τα όρια ανίχνευσης είναι ιδιαίτερος χαμηλά. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην απορρόφηση των πουρινών και πυριμιδινών στο υπεριώδες, με μέγιστο τα 260 nm. Μία μονάδα οπτικής απορρόφησης αντιστοιχεί σε 40 μ g/mL RNA. Μαζί με την ποσότητα του RNA, δίνεται και ο λόγος απορρόφησης A_{260}/A_{280} , δηλαδή για τα 260 nm ως προς τα 280 nm. Ο λόγος αυτός αντιπροσωπεύει την καθαρότητα του RNA και είναι επιθυμητό να βρίσκεται μεταξύ των τιμών 1,8-2. Εάν ο λόγος βρεθεί μικρότερος του 1,8 τότε πιθανότατα υπάρχουν προσμίξεις με πρωτεΐνες, ενώ αν ξεπερνάει το 2, τότε υπάρχει πρόσμιξη από γενωμικό DNA. Για τον εύκολο χειρισμό του RNA, αφού πραγματοποιηθεί ο ποσοτικός προσδιορισμός του, φτιάχνονται aliquots με συγκέντρωση 1 μ g/ μ L.

2.2.4. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΟΥ RNA

Για τον ποιοτικό έλεγχο του RNA που θα χρησιμοποιηθεί, απαιτείται η ηλεκτροφόρησή του σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης. Όλα τα νουκλεϊκά οξέα μπορούν να διαχωριστούν βάσει του μεγέθους τους σε πήκτωμα αγαρόζης. Αναλόγως της

πυκνότητας του gel, σχηματίζονται οι αντίστοιχοι πόροι στο υλικό (λόγω πολυμερισμού), όπου όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της αγαρόζης, τόσο μικραίνει το μέγεθος των πόρων. Η διαδικασία ηλεκτροφόρησης είναι η εξής:

- i. Παρασκευή gel αγαρόζης σε κατάλληλη πυκνότητα, και φόρτωση δειγμάτων (μαζί με χρωστική) και marker (εάν αυτός χρειάζεται). Πλήρωση συσκευής ηλεκτροφόρησης με 1x TBE.
- ii. Εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, από τον αρνητικό στο θετικό πόλο. Ως γνωστόν, τα νουκλεϊκά οξέα είναι φορτισμένα αρνητικά, με αποτέλεσμα να κινούνται προς το θετικό πόλο, με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους τους.
- iii. Παρατήρηση ζωνών δειγμάτων σε λαμπτήρα εκπομπής UV ακτινοβολίας. Η παρατήρηση αυτή γίνεται εφικτή λόγω του βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr), το οποίο έχει προστεθεί στο πήκτωμα αγαρόζης. Το EtBr παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και φθορίζει στο υπεριώδες, με αποτέλεσμα οι ζώνες να φαίνονται πορτοκαλί.

Όσον αφορά την ποιοτική ανάλυση του RNA, οι ζώνες οι οποίες πρέπει να εμφανιστούν είναι τέσσερις και αφορούν το tRNA, το 28s RNA, το 18s RNA και το 5,8s RNA. Συνήθως, το gel που παρασκευάζεται είναι 1,5% και φορτώνεται σε αυτό 1 μg δείγματος RNA.

2.2.5. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια συνηθισμένη εργαστηριακή τεχνική που χρησιμοποιείται για την παραγωγή πολλών αντιγράφων μιας συγκεκριμένης περιοχής του DNA (εκατομμυρίων ή δισεκατομμυρίων). Πολλοί κλάδοι της βιολογίας, της ιατρικής και όχι μόνο έχουν ως εργαλείο την παραπάνω τεχνική, καθώς είναι εύκολη η μελέτη οποιουδήποτε τμήματος γενετικού υλικού επιθυμείται κάθε φορά. Στόχος της PCR είναι η ενίσχυση τμημάτων DNA (in vitro αντιγραφή) για περαιτέρω μελέτη τους με άλλες τεχνικές ή ακόμα και η ποσοτικοποίηση τους. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η γνώση της αλληλουχίας που θα ενισχυθεί ή μέρος αυτής, έτσι ώστε να σχεδιαστούν τα κατάλληλα ολιγονουκλεοτίδια-εκκινήτες, από όπου θα ξεκινήσει η αντιγραφή. Έτσι λοιπόν, τα αντιδραστήρια που απαιτούνται για την εφαρμογή της είναι τα εξής:

- a) DNA που θα ενισχυθεί (μήτρα).
- b) Taq πολυμεράση: Όπως και στην in vitro αντιγραφή ενός γενετικού υλικού, απαραίτητη θεωρείται η ύπαρξη ενός ενζύμου, το οποίο θα συνθέσει νέους κλώνους έχοντας ως μήτρα τις ήδη υπάρχουσες αλυσίδες DNA. Το πλέον συνηθισμένο ένζυμο είναι η Taq πολυμεράση, η οποία έχει απομονωθεί από το θερμοανθεκτικό βακτήριο *Thermus aquaticus*. Η ανθεκτικότητα τους ενζύμου σε υψηλές θερμοκρασίες το καθιστά κατάλληλο για την PCR αντίδραση, καθώς υπάρχουν αρκετές εναλλαγές θερμοκρασίες, που φτάνουν μέχρι και τους 95 °C.
- c) Ολιγονουκλεοτίδια- εκκινητές: Όπως και οι περισσότερες DNA πολυμεράσες, έτσι και η Taq χρειάζεται μια αλληλουχία-εκκινητή για να ξεκινήσει τη διαδικασία της αντιγραφής. Αυτές οι αλληλουχίες είναι μικρές, 20-25 νουκλεοτίδια, οι οποίες είναι συμπληρωματικές με την περιοχή του γενετικού υλικού που θα ενισχυθεί. Χρησιμοποιούνται δύο ζεύγη εκκινητών, τα οποία είναι συμπληρωματικά με τις δύο αλυσίδες, έτσι ώστε συντεθούν δίκλιωνα μόρια DNA στο τέλος του κάθε κύκλου αντίδρασης.
- d) Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs): Προστίθενται βάσει του κανόνα συμπληρωματικότητας, από την πολυμεράση, κατά τη σύνθεση των νέων κλώνων.
- e) Ρυθμιστικό διάλυμα: Περιέχει τα κατάλληλα αντιδραστήρια για τη σωστή λειτουργία του ενζύμου, στο σωστό περιβάλλον, π.χ. περιέχει ιόντα Mg^{2+} , τα οποία είναι απαραίτητα για τη δράση της πολυμεράσης.
- f) dH₂O.

Αφού προστεθούν τα παραπάνω αντιδραστήρια σε σωστές αναλογίες, ακολουθεί μια διαδικασία που βασίζεται σε εναλλαγές της θερμοκρασίας (κάθε εναλλαγή αποτελεί έναν κύκλο αντίδρασης), έτσι ώστε στο τέλος κάθε κύκλου να έχει παραχθεί ο διπλάσιος αριθμός των συγκεκριμένων τμημάτων DNA. Πραγματοποιείται σε ένα μηχάνημα που ονομάζεται θερμοκυκλοποιητής και τα βήματα σε κάθε κύκλο είναι τα εξής:

- a) Αποδιάταξη (denaturation): Σε αυτό το βήμα, η θερμοκρασία φτάνει τους 95 °C, έτσι ώστε να σπάσουν οι δεσμοί υδρογόνου που συγκρατούν τις δύο αλυσίδες του δίκλωνου DNA, και να προκύψουν τα μονόκλιωνα τμήματα που

αποτελούν και τη μήτρα της αντίδρασης. Η αποδιάταξη πραγματοποιείται για μερικά δευτερόλεπτα.

- b) Υβριδοποίηση (annealing): Σε αυτό το στάδιο, οι εκκινητές της αντίδρασης έχουν τη δυνατότητα να προσδεθούν στα μονόκλιωνα τμήματα του DNA, για να αρχίσει η διαδικασία της επιμήκυνσης στη συνέχεια. Η θερμοκρασία σε αυτό το βήμα ποικίλει, από 55-65 °C συνήθως, και εξαρτάται άμεσα από το T_m των εκκινητών. Είναι απαραίτητη η σωστή επιλογή της θερμοκρασίας υβριδοποίησης έτσι ώστε οι εκκινητές να προσκολληθούν εκλεκτικά στη συμπληρωματική τους αλυσίδα, αποφεύγοντας πιθανά λάθη. Αντίστοιχα, η διαδικασία αυτή κρατάει για μερικά δευτερόλεπτα.
- c) Επιμήκυνση (extension): Δεδομένου ότι η Taq πολυμεράση έχει βέλτιστη θερμοκρασία δράσης 72 °C, η διαδικασία της επιμήκυνσης πραγματοποιείται σε αυτές τις συνθήκες. Τα dNTPs προστίθενται συμπληρωματικά με προσανατολισμό 5' προς 3', και έτσι το γενετικό υλικό πολλαπλασιάζεται.

Ο αριθμός των κύκλων σε κάθε αντίδραση PCR δε ξεπερνάει τους 40, καθώς το ένζυμο παύει να δουλεύει με σωστούς ρυθμούς και τα αντιδραστήρια έχουν αρχίσει να εξαντλούνται. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι πριν αρχίσουν οι κύκλοι της αντίδρασης, η πολυμεράση πρέπει να ενεργοποιηθεί θερμικά, για αυτό εκτίθεται σε θερμοκρασία 94-98 °C, για μερικά λεπτά. Όταν τελειώσουν όλοι οι κύκλοι της αντίδρασης, τα προϊόντα της PCR διατηρούνται στους 4 °C.

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας εφαρμόστηκαν RT-PCR, απλή PCR, nested PCR και real-time PCR.

2.2.5.1. Αντίδραση Αντίστροφης Μεταγραφής (RT)

Η αντίστροφη μεταγραφή είναι μια διαδικασία η οποία χρησιμοποιεί ως αρχικό μόριο μονόκλινο RNA και το μετατρέπει σε δίκλινο συμπληρωματικό DNA (cDNA). Βασίζεται στη χρήση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση, που ανακαλύφθηκε πρώτη φορά σε ρετροϊούς. Οι τελευταίοι έχουν τη δυνατότητα να μετατρέπουν το μονόκλινο γενετικό τους υλικό σε δίκλινο DNA, έτσι ώστε αυτό να μπορεί να ενσωματωθεί στο DNA του ξενιστή. Εκμεταλλευόμενοι την παραπάνω ιδιότητα, γίνεται και *in vitro*, με τη χρήση του κατάλληλου ενζύμου, να μελετηθεί η έκφραση κάποιων μορίων RNA που επιθυμούνται. Με μια διαδικασία παρόμοια με αυτή της PCR, RNA τμήματα μετατρέπονται σε cDNA, τα οποία στη συνέχεια

χρησιμοποιούνται για περαιτέρω μελέτες. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται είναι τα εξής:

- a) RNA που επιθυμείται να μελετηθεί, ως εκμαγείο.
- b) Αντίστροφη μεταγραφάση: Υπάρχουν διάφορα ένζυμα τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε αυτή τη διαδικασία, στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο M-MLV, από το kit Invitrogen DNA της Thermo Fisher Scientific. Η M-MLV είναι αντίστροφη μεταγραφάση του ιού Moloney, που προκαλεί λευχαιμία σε ποντικούς. Χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο το RNA μόριο συντίθεται αρχικά ένα υβριδικό μόριο RNA-cDNA και στη συνέχεια το τελικό cDNA, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω μελέτες.
- c) Ολιγονουκλεοτίδια- εκκινητές: Υπάρχουν διαφόρων ειδών εκκινητές, όπως τα τυχαία εξαμερή, ειδικά ολιγονουκλεοτίδια στόχοι για συγκεκριμένο γονίδιο, oligo-dTs, κ.ά.. Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιούνται ως εκκινητές, oligo-dTs. Τα τελευταία αποτελούν ολιγονουκλεοτίδια δεοξυθυμιδίνης, τα οποία είναι συμπληρωματικά με την poly-A ουρά των μορίων mRNA. Συνεπώς, κατά την αντίστροφη μεταγραφή, του σύνολο του mRNA θα μετατραπεί σε cDNA.
- d) dNTPs: η χρήση τους είναι όμοια με την απλή PCR.
- e) dH₂O.

Η RT-PCR που πραγματοποιήθηκε ήταν δύο βημάτων, δηλαδή σε πρώτο στάδιο έγινε η σύνθεση του πρωταρχικού μορίου cDNA και στη συνέχεια η περαιτέρω ενίσχυσή του. Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο M-MLV και ως εκκινητής, oligo-dTs. Επιπλέον, προστίθεται στην αντίδραση ρυθμιστικό διάλυμα διθειοθριτόλης (DTT), το οποίο αποτρέπει την οξείδωση των θειολομάδων και ο αναστολέας ριβονουκλεασών RNase Inhibitor. Έτσι, το αρχικό RNA προστατεύεται από αποικοδόμηση και μπορεί στη συνέχεια να ενισχυθεί. Οι αναλογίες των αντιδραστηρίων και οι συνθήκες ήταν οι εξής:

- a) Προσθήκη σε tube των 0,2 mL, 1 μL RNA (1μg/μL), 1 μL oligo-dTs, 1 μL dNTPs (10 mM καθένα) και 10 μL dH₂O.

- b) Επώαση δειγμάτων στο θερμοκυκλοποιητή για 5 min, στους 65 °C. Τοποθέτηση δειγμάτων στον πάγο για 3 min.
- c) Στο ίδιο tube προστίθενται 4 μL 5x FS buffer, 2 μL DTT (0,1 M), 0,5 μL RNase inhibitor (40u/μL) και 0,5 μL M-MLV (200u/μL).
- d) Τα δείγματα επωάζονται στους 37 °C για 52 min (βέλτιστη θερμοκρασία δράσης ενζύμου) και στους 70 °C για 15 min (μη αντιστρεπτή αποδιάταξη ενζύμου).

Το cDNA που έχει παραχθεί φυλάσσεται στους -20 °C μέχρι να χρησιμοποιηθεί στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (απλή PCR ή Real-Time PCR).

2.2.5.2. PCR και Nested PCR

Πριν προχωρήσουμε σε ποσοτική PCR (real-time PCR), κρίθηκε απαραίτητο να επιβεβαιωθεί η σχετική έκφραση του μεταγράφου 14 του γονιδίου της RNase K σε δείγματα μυελού με οξεία λεμφοκυττατική λευχαιμία και σε υγιή δείγματα, καθώς επίσης και στις κυτταρικές σειρές HEK293 και Jurkatt. Σε προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου, είχε φανεί μια αύξηση της έντασης της ζώνης σε gel αγαρόζης, στην αντίστοιχη λευχαιμική σειρά Jurkatt. Συνεπώς, έγιναν κάποια επιβεβαιωτικά πειράματα PCR και nested PCR. Η τελευταία ακολουθεί τους ίδιους κανόνες με την PCR, με τη διαφορά ότι το DNA εκμαγείο είναι το προϊόν μιας πρώτης PCR. Οι εκκινητές αλλάζουν έτσι ώστε να είναι πιο ειδικοί για το μετάγραφο που επιθυμείται να ενισχυθεί και έτσι, αυξάνεται η ειδικότητα της αντίδρασης. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR και nested PCR) χρησιμοποιήθηκε το KAPA Taq PCR kit της KAPA BIOSYSTEMS, με την πολυμεράση Taq.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ 1: Το μετάγραφο 4 δε μελετήθηκε με συμβατική PCR διότι από προηγούμενα πειράματα φαίνεται να απουσιάζει από την κυτταρική σειρά Jurkatt.

Το θερμοκρασιακό πρωτόκολλο που πραγματοποιείτε σε όλες τις περιπτώσεις είναι:

- a) 95 °C για 2 min
- b) 95 °C για 1 min
- c) Θερμοκρασία αναλόγως του Tm των εκκινητών για 30 sec
- d) 72 °C για 1 min

e) 30 επαναλήψεις των βημάτων b-d

f) 72 °C για 5 min

g) 4 °C

Οι συνθήκες των PCR και nested PCR για την ανίχνευση του μετάγραφου 14 φαίνονται παρακάτω:

Μετάγραφο 14

Αντιδραστήρια	Αντίδραση τελικού όγκου 50 μL PCR (μL)	Αντίδραση τελικού όγκου 50 μL nested PCR (μL)
5x Kapa Taq (Mg free) Reaction Buffer	10	10
MgCl₂ (25 mM)	3	3
dNTPs(10mM)	1	1
Forward primer F(ATG)/ FH-nested- (10 μM)	1	1
Reverse Primer Ex4r / Ex2/4R –nested- (10 μM)	1	1
Kapa Taq Polymerase(5u/μL)	0,5	0,5
Template cDNA	1	1
dH₂O	32,5	32,5

Πίνακας 2.3. Ποσότητες αντιδραστηρίων για την ενίσχυση του μετάγραφου 14 με PCR και nested-PCR.

Η PCR αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 30 κύκλους με θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών (annealing) τους 59 °C και η nested PCR για 30 κύκλους με θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών τους 60 °C. Να σημειωθεί ότι τα προϊόντα της PCR αραιώθηκαν 1 στα 25 μ L και αυτό το αραιωμένο προϊόν χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα για την αντίδραση της nested PCR.

2.2.5.3. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real – Time PCR)

Αφού μελετήθηκε/επιβεβαιώθηκε η έκφραση του μεταγράφου 14 με συμβατική και nested PCR, προχωρήσαμε σε ποσοτική μελέτη των συνολικά τριών μεταγράφων

με τη βοήθεια της Real-Time PCR. Το cDNA που παράχθηκε από δείγματα μυελού ασθενών με οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία, χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη τεχνική.

Η real-time PCR η αλλιώς ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (quantitative real-time PCR; qPCR), δίνει τη δυνατότητα παρακολούθησης της αντίδρασης αυτής κατά τη διάρκεια της εξέλιξής της. Η ποσοτικοποίηση γίνεται διότι τα προϊόντα της αντίδρασης ιχνηθετούνται με φθορίζοντα μόρια και γίνεται μέτρηση της έντασης του φθορισμού, όταν αυτός εκπέμπεται. Τα φθορίζοντα αυτά μόρια μπορούν να είναι μη ειδικά, τα οποία προσκολλώνται σε δίκλωνα μόρια DNA ή ειδικά ολιγονουκλεοτίδια-ιχνηθέτες που υβριδίζονται με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες. Όπως και στην απλή PCR, ο αριθμός των αρχικών μορίων του νουκλεϊκού οξέος διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο, με αποτέλεσμα την εκθετική αύξηση του προϊόντος. Η ποσοτική αυτή PCR προϋποθέτει τη σταθερή και επαναλήψιμη σχέση μεταξύ του αναλυτικού σήματος που λαμβάνεται από το προϊόν της αντίδρασης και της αρχικής ποσότητας του DNA στο δείγμα. Ο φθορισμός που μετριέται στο τέλος κάθε κύκλου αντίδρασης, δίνει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot) η οποία αποτελείται από τρία μέρη, την εκθετική φάση, τη γραμμική και το plateau. Αρχικά, στην εκθετική φάση, όλα τα αντιδραστήρια βρίσκονται σε περίσσεια, με αποτέλεσμα να υπάρχει 100% απόδοση στο διπλασιασμό του προϊόντος. Στη συνέχεια, μερικά συστατικά της αντίδρασης αρχίζουν να εξαντλούνται και πέφτει η απόδοση της αντίδρασης, μέχρι να επέλθει η φάση του κορεσμού (plateau), όπου η απόδοση της αντίδρασης είναι μηδενική.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιείται το kit KAPA SYBR FAST Universal της KAPA BIOSYSTEMS, το οποίο βασίζεται στη SYBR-Green I, μια μη ειδική χρωστική, που εκπέμπει φθορισμό στα 520 nm όταν βρίσκεται σε δίκλωνο τμήμα DNA. Κατά τη διάρκεια της PCR, τα μικρά μόρια της χρωστικής προσδένονται επάνω στο δίκλωνο DNA, το οποίο παράγεται χάρις την ύπαρξη ειδικών εκκινητών. Όσο συνεχίζεται η διαδικασία, τόσο παραπάνω δίκλωνο προϊόν σχηματίζεται, με αποτέλεσμα παραπάνω ποσότητα του μορίου της SYBR-Green I να προσδένεται σε αυτό. Έτσι, λοιπόν, προκαλείται μια αύξηση στη φωταύγεια η οποία αντιστοιχεί στο ποσό του γενετικού υλικού που έχει ενισχυθεί. Σημαντικό πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι δεν εκπέμπεται φθορισμός απουσία δίκλωνου DNA, όταν δηλαδή η χρωστική βρίσκεται ελεύθερη στο διάλυμα. Επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για οποιοδήποτε ζεύγος εκκινητών, άρα θεωρητικά μπορεί να

ενισχυθεί οποιαδήποτε περιοχή του DNA επιθυμείται κάθε φορά. Από την άλλη, μεγάλο μειονέκτημα είναι ότι παράλληλα με την ενίσχυση του επιθυμητού προϊόντος, μπορεί να ενισχυθούν και παραπροϊόντα ή να εμφανιστούν διμερή εκκινητών. Για την εξάλειψη αυτού του προβλήματος, αφενός πραγματοποιείται προσεκτικός σχεδιασμός ειδικών εκκινητών για κάθε αλληλουχία και αφετέρου ελέγχονται οι καμπύλες αποδιάταξης (melt curve), οι οποίες διαφέρουν για τα διμερή των εκκινητών και για το επιθυμητό προϊόν. Σε κάθε περίπτωση, απαιτείται προσεκτική εφαρμογή κατάλληλων συνθηκών, έτσι ώστε να μειώνεται ο «θόρυβος».

Όσων αφορά το θερμοκρασιακό πρωτόκολλο, ήταν παρόμοιο με αυτό της απλής PCR και είναι οι παρακάτω:

- a) 95 °C για 3 min
- b) 95 °C για 15 sec
- c) 60 °C για 1 min
- d) 40 επαναλήψεις των βημάτων b-c

Οι συνθήκες για κάθε μετάγραφο που μελετήθηκε ήταν οι εξής:

Αντιδραστήρια	Ποσότητες για <i>HPRT-1</i> , <i>RNase κ variant 4 & variant 14</i> (μL)	Ποσότητες για <i>RNase κ variant 1</i> (μL)
SYBR-Green I	5,0	5,0
dH₂O	2,6	2,8
Forward Primer 1000nM/500nM	1,0 (1000nM)	1,0 (500nM)
Reverse Primer 1000nM/500nM	1,0 (1000nM)	1,0 (500nM)
cDNA	0,4	0,2

*Πίνακας 2.4. Ποσότητες αντιδραστηρίων για την ποσοτική ενίσχυση της *HPRT-1*, var.4, var.14 και var.1, με real-time PCR.*

Η αντίδραση πραγματοποιείται εις διπλούν (duplicate) για κάθε γονίδιο στο σύνολο των δειγμάτων. Οι εκκινητές για την *HPRT-1* είναι οι 2F και 3R, για το *RNase κ* μετάγραφο 1 ο F69 και R192, για το *RNase κ* μετάγραφο 4 ο 1(2)/2F και ο 2/3R και

για το *RNase* κ μετάγραφο 14 ο Ex2F και Ex2/4R. Οι αλληλουχίες των εκκινητών παρουσιάστηκαν στον Πίνακα 2.1..

Η διαδικασία της ποσοτικοποίησης γίνεται στην εκθετική φάση της καμπύλης ενίσχυσης. Βασίζεται σε έναν αριθμό που ονομάζεται Ct value και αντιστοιχεί στο συνολικό αριθμό κύκλων αντίδρασης που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι να ξεπεραστεί ένα συγκεκριμένο όριο φθορισμού (threshold). Όσο πιο μικρό είναι το Ct value, τόσο πιο σύντομα φτάνει η αντίδραση στην επιθυμητή τιμή φθορισμού, άρα τόσο περισσότερο αρχικό υπόστρωμα υπήρχε. Επιπλέον, απαραίτητα για την ποσοτικοποίηση είναι η χρήση ενός γονιδίου αναφοράς και ενός θετικού μάρτυρα. Για την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων πρέπει να χρησιμοποιούνται πάντα γονίδια αναφοράς, τα οποία κανονικοποιούν τα αποτελέσματα. Πολλά λάθη ποσοτικοποίησης μπορούν να πραγματοποιηθούν κατά την απομόνωση RNA ή την RT-PCR, για αυτό τα γονίδια αναφοράς χρησιμεύουν ως εσωτερικός έλεγχος της αντίδρασης. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι να έχουν σχετικά σταθερή έκφραση μεταξύ διαφόρων ιστών του οργανισμού και να μην επηρεάζονται από τους διάφορους παράγοντες της πειραματικής διαδικασίας. Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς (housekeeping gene) το γονίδιο της *HPRT-1* που κωδικοποιεί το ένζυμο φωσφοριβοζυλο-τρανσφεραση της υποξανθίνης. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε cDNA της κυτταρικής σειράς HEK293. Έτσι, γίνεται δυνατή η σχετική ποσοτικοποίηση με τη μέθοδο $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Σε αυτή τη μέθοδο, αρχικά πραγματοποιείται η κανονικοποίηση των τιμών Ct για τα ελεγχόμενα γονίδια και τα γονίδια αναφοράς, και για τα ελεγχόμενα δείγματα, αλλά και για τον θετικό μάρτυρα, βάσει των παρακάτω εξισώσεων:

$$\Delta Ct_{(\text{ελέγχου})} = Ct_{(\text{γονιδίου στόχου, ελεγχόμενου δείγματος})} - Ct_{(\text{γονιδίου αναφοράς, ελεγχόμενου δείγματος})} \quad (2.1) \text{ και}$$

$$\Delta Ct_{(\text{προτύπου})} = Ct_{(\text{γονιδίου στόχου, πρότυπου δείγματος})} - Ct_{(\text{γονιδίου αναφοράς, πρότυπου δείγματος})} \quad (2.2)$$

Στη συνέχεια, ακολουθεί περαιτέρω κανονικοποίηση του $\Delta Ct_{(\text{ελέγχου})}$ με το $\Delta Ct_{(\text{προτύπου})}$, όπου από τις (2.1) και (2.2) προκύπτει:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{ελέγχου})} - \Delta Ct_{(\text{προτύπου})}.$$

Τέλος υπολογίζεται η ποσότητα $2^{-\Delta\Delta Ct}$, η οποία αντιστοιχεί στον αριθμό των φορών που μεταβλήθηκε η έκφραση του ελεγχόμενου γονιδίου στα διάφορα

ελεγχόμενα δείγματα, σε σύγκριση με το πρότυπο δείγμα, το οποίο κανονικοποιείται και ως προς το γονίδιο αναφοράς.

2.2.6. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του λογισμικού SPSS (Statistical Package for the Social Sciences).

Τα τρία μετάγραφα μελετήθηκαν ως προς την έκφρασή τους μεταξύ υγιών και ασθενών, αλλά και μεταξύ ασθενών την ημέρα διάγνωσης και την 33^η μέρα με τη βοήθεια των μη παραμετρικών διαδικασιών Mann-Whitney U test και Wilcoxon Rank test, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, μελετήθηκαν οι ασθενείς με παιδική ΟΛΛ ως προς τα διάφορα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά τους. Οι μη παραμετρικές διαδικασίες Kruskal-Wallis test, Mann-Whitney U test και Wilcoxon Rank test χρησιμοποιήθηκαν, για τη μελέτη των επιπέδων έκφρασης των τριών μεταγράφων σε σχέση με την ηλικία των ασθενών, με το είδος της ΟΛΛ (B- ή T-, CALLA+ ή CALLA-), με τον καρυότυπο του κάθε ασθενούς (μετατοπίσεις t(12,21), t(9,22), υπερδιπλοειδία, υποδιπλοειδισμός), με τον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων την ημέρα διάγνωσης, με την prednisone response την 8^η μέρα, με την κατάσταση μυελού την 15^η μέρα και με την ομάδα κινδύνου (danger score) των ασθενών.

Για την ανάλυση επιβίωσης των ασθενών με παιδική ΟΛΛ, σχεδιάστηκαν καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier και πραγματοποιήθηκε ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox (Cox proportional regression analysis). Πιο συγκεκριμένα, κατασκευάστηκαν δυο ειδών καμπύλες, επιβίωσης χωρίς υποτροπή (Disease-Free Survival; DFS) και ολικής επιβίωσης (Overall Survival; OS) για καθένα από τα τρία μετάγραφα. Σε κάθε καμπύλη παριστάνεται το ποσοστό επιβίωσης των ασθενών (ολικής επιβίωσης ή ελευθέρως νόσου επιβίωσης) για ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, για τους ασθενείς που υπερκεφράζουν και υπόκεφράζουν τα συγκεκριμένα μετάγραφα. Επιπρόσθετα σε αυτά, η ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox δίνει έναν συντελεστή σχετικού κινδύνου (Hazard Ratio, HR) για την εκδήλωση συγκεκριμένου γεγονότος (θανάτου ή υποτροπής), μεταξύ δύο ομάδων ασθενών, στο ίδιο χρονικό διάστημα.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε συσχέτιση της έκφρασης των τριών μεταγράφων του γονιδίου της ριβονουκλεάσης κ, κατά Spearman, όπου δίνεται ο συντελεστής Spearman (R_s), χαρακτηριστικός για τη συσχέτιση δύο συνεχών μεταβλητών.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA

3.1.1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ RNA

Η απομόνωση του RNA τόσο από τις κυτταρικές σειρές HEK293 και Jurkatt, όσο και από τα δείγματα ολικού αίματος, πραγματοποιήθηκε βάσει των οδηγιών του υποκεφαλαίου 2.2.2.1. και 2.2.2.2., αντίστοιχα. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του RNA, επίσης, έγινε με τη βοήθεια του Biospec-nano, όπως περιεγράφηκε στο υποκεφάλαιο 2.2.3.. Το RNA από τις κυτταρικές σειρές, επειδή ήταν αρκετά μεγάλη η συγκέντρωσή του, μοιράστηκε σε aliquots των 1 µg/µL, έτσι ώστε να είναι εύκολη και άμεση η χρήση του. Αντιθέτως, το RNA από δείγματα ολικού αίματος, λόγω χαμηλής συγκέντρωσης, δε μοιράστηκε και κάθε φορά γινόταν λήψη της κατάλληλης ποσότητάς του, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση που θα χρησιμοποιηθεί για την RT-PCR να είναι επίσης 1 µg/µL. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται ενδεικτικά μερικά αποτελέσματα φασματοφωτομετρικού προσδιορισμού ολικού RNA στην κυτταρική σειρά HEK293 και Jurkatt.

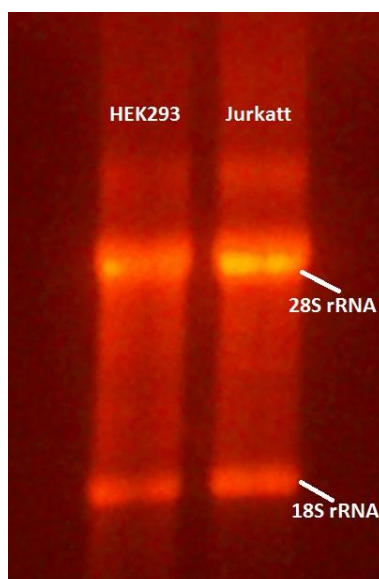
Δείγμα	Συγκέντρωση (ng/µL)	OD260/280	OD260/230
HEK293(1)	2342,00	1,91	1,99
HEK293(2)	2335,64	1,88	1,81
Jurkatt	2341,64	2,00	1,99

Πίνακας 3.1. Ενδεικτικός πίνακας αποτελεσμάτων φασματοφωτομετρικών μετρήσεων με το Biospec-nano, σε δείγματα της κυτταρικής σειράς HEK293 και Jurkatt.

3.1.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ RNA ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Για τον έλεγχο της ποιότητας του RNA, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση του σε πήκτωμα αγαρόζης, συγκέντρωσης 1,5 % w/v. Όπως αναφέρθηκε και στο υποκεφάλαιο 2.2.4., σε κάθε well φορτώνεται 1 µg RNA. Παρακάτω παρουσιάζεται ενδεικτικά μια εικόνα ηλεκτροφόρησης δειγμάτων RNA από HEK293 και Jurkatt. Όπως φαίνεται, δύο έντονες ζώνες εμφανίζονται στο πήκτωμα, οι οποίες αντιπροσωπεύουν το 28S και το 18S rRNA. Στην αριστερή στήλη έχει ηλεκτροφορηθεί ολικό RNA από τα κύτταρα HEK293 και στη δεξιά, από τα Jurkatt. Η έλλειψη πολλών ζωνών, μεγαλύτερου ή μικρότερου μοριακού βάρους, υποδεικνύουν ότι έχει πραγματοποιηθεί επιτυχώς η απομόνωση, δηλαδή απουσιάζει γενωμικό DNA και το RNA δεν έχει κατακερματιστεί. Όσον αφορά το RNA που απομονώθηκε από μυελό

(ολικό αίμα), δεν πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση, διότι η ποσότητα από κάθε δείγμα δεν ήταν επαρκής για έλεγχο και περαιτέρω πειράματα.

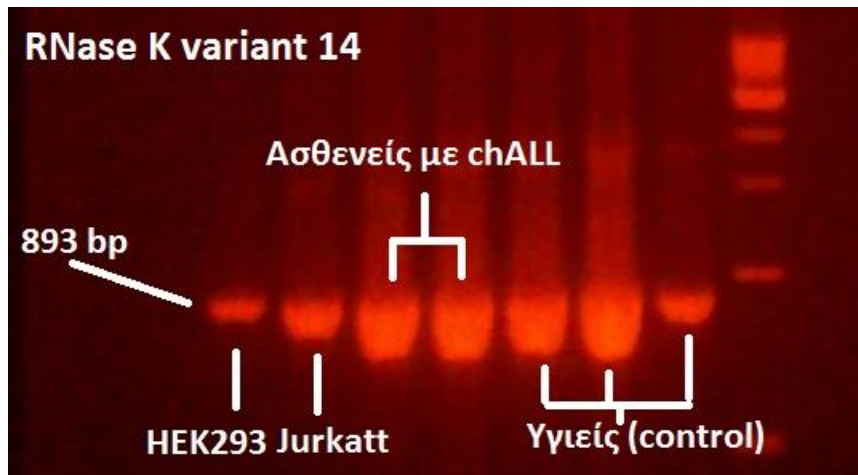


Εικόνα 3.1. Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων 1 μg ολικού RNA HEK293 (αριστερά) και Jurkatt (δεξιά) για τον ποιοτικό έλεγχο του.

Έτσι, διασφαλίζοντας την καλή ποιότητα του RNA, πραγματοποιήθηκε στη συνέχεια RT-PCR, όπως περιεγράφηκε στο υπόκεφαலைο 2.2.5.1., για τη σύνθεση του cDNA που χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

3.2. ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΥ 14 ΜΕ PCR ΚΑΙ NESTED PCR

Όπως αναφέρθηκε στο υποκεφάλαιο 2.2.5.2., πριν προχωρήσουμε σε ποσοτική μελέτη της έκφρασης του μεταγράφου 14 με qPCR, αξιολογήθηκε η παρουσία του σε ασθενείς με ΟΛΛ και σε υγιή άτομα (control). Συνεπώς πραγματοποιήθηκε PCR και nested PCR, όπως περιεγράφηκαν στο υποκεφάλαιο 2.2.5.2., σε δείγματα μυελού των οστών από ασθενείς με παιδική ΟΛΛ και από υγιείς δότες. Η εικόνα της έκφρασης του μεταγράφου 14 φαίνεται μετά από ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%, όπου φορτώθηκαν 10 μL κάθε δείγματος. Τα προϊόντα αναμένονται στις 893 bp, με τη χρήση των συγκεκριμένων εκκινητών.

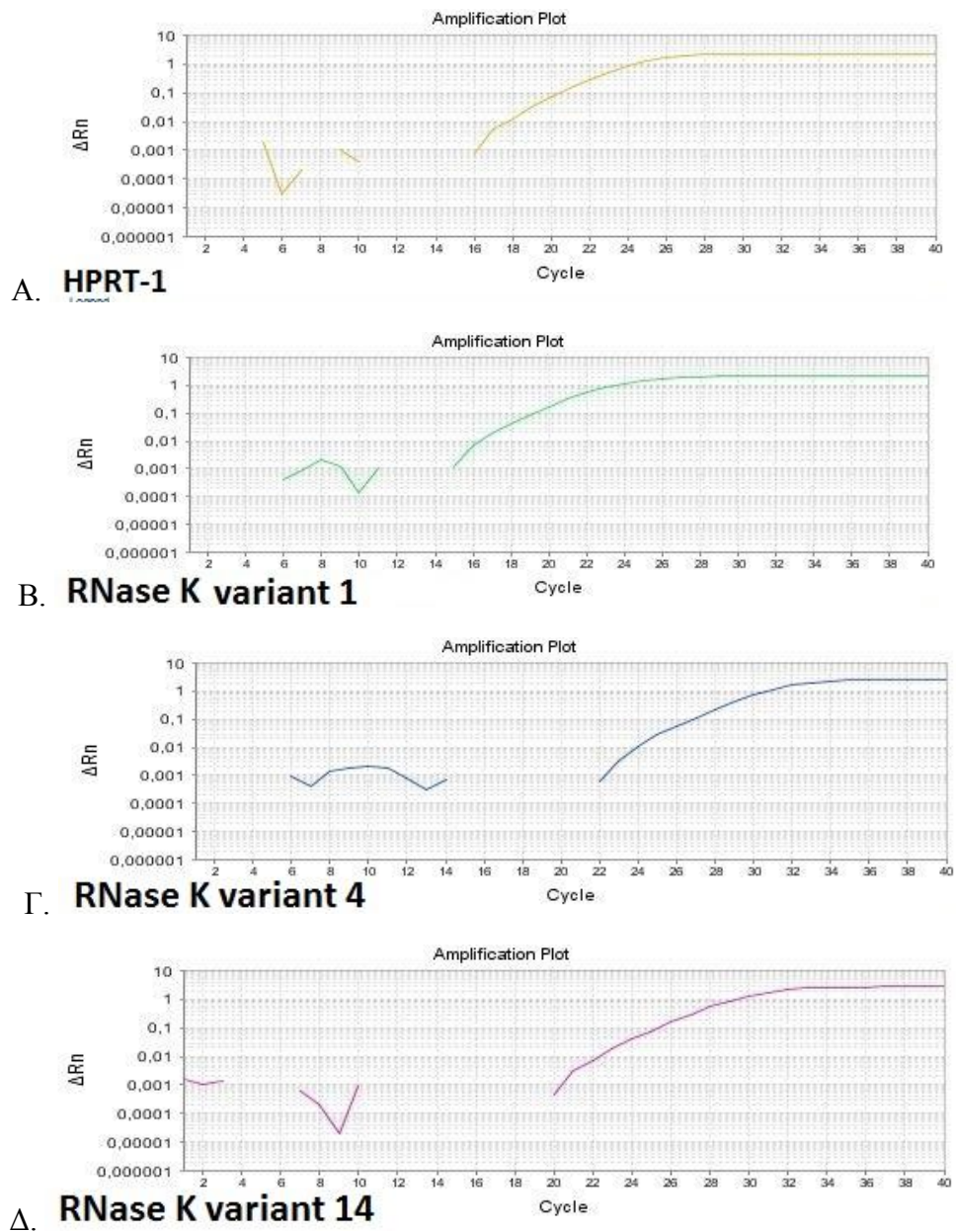


Εικόνα 3.2. Απεικόνιση ηλεκτροφόρησης προϊόντων *nested PCR* για το μετάγραφο 14 σε *gel* αγαρόζης 1,5%.

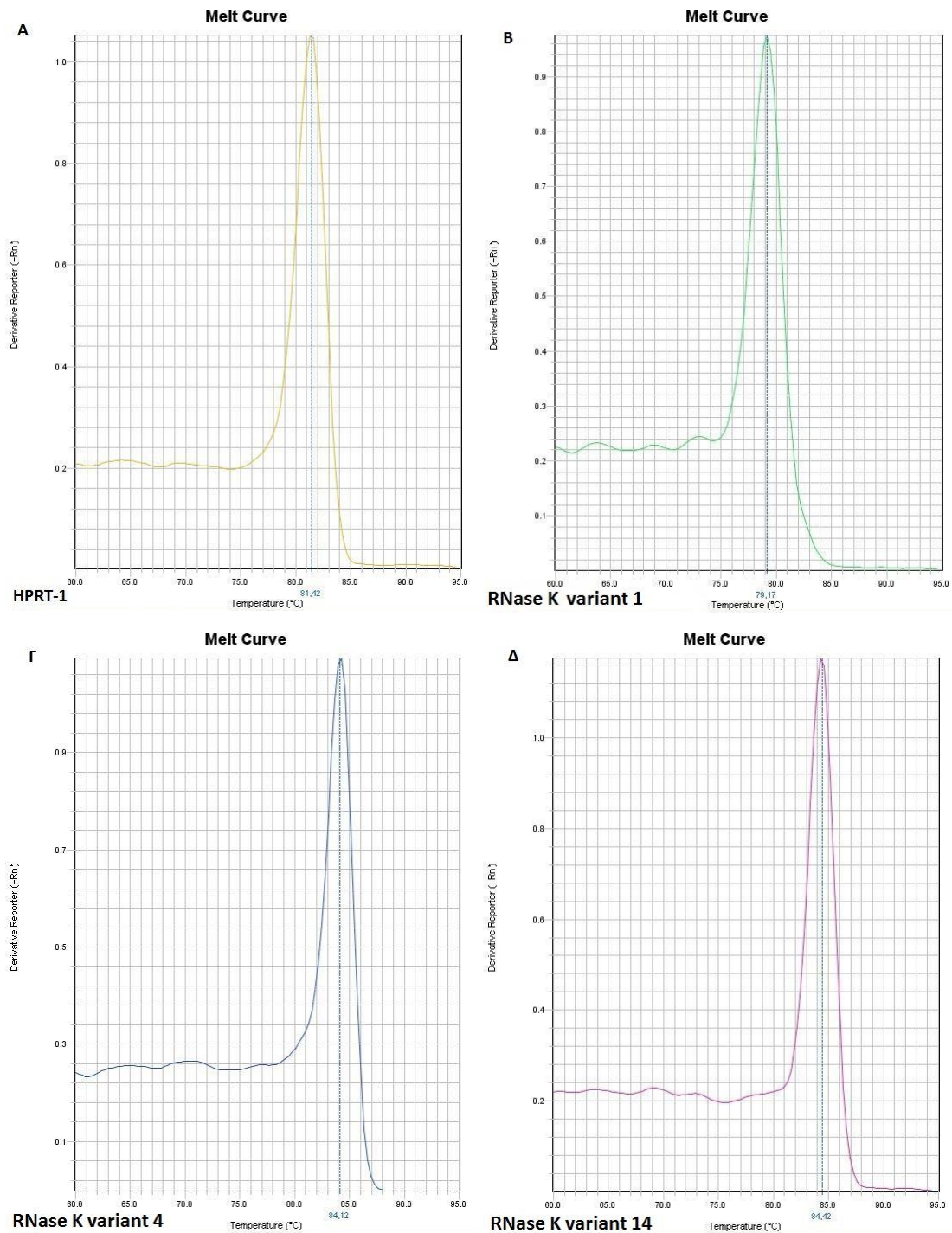
Όπως φαίνεται στην παραπάνω εικόνα, πράγματι η κυτταρική σειρά Jurkatt εμφανίζει πιο έντονη έκφραση, σε σχέση με την κυτταρική σειρά HEK293. Όσον αφορά τα δείγματα μυελού (ολικό αίμα), παρουσιάζουν ακόμα πιο έντονη ζώνη, τόσο για τους υγιείς όσο και για τους ασθενείς. Επομένως, για να μπορεί να διαχωριστεί η έκφραση μεταξύ υγιών και ασθενών, απαιτείται η πιο ευαίσθητη μέθοδος της Real-Time PCR, όπου θα δοθούν ποσοτικά αποτελέσματα για την έκφραση τόσο του μεταγράφου 14 που παρουσιάζεται εδώ, όσο και για το μετάγραφο 1 και το μετάγραφο 4.

3.3. ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ 1, 4 ΚΑΙ 14 ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΟΛΛ

Για την ποσοτική μελέτη των RNase κ μεταγράφων 1, 4 και 14, πραγματοποιήθηκε real-time PCR σε δείγματα cDNA από μυελό ολικού αίματος. Συνολικά μελετήθηκαν 60 ασθενείς με παιδική οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία και 40 υγιείς, από τους οποίους αξιολογήσιμοι ήταν οι 51 ασθενείς και 36 υγιείς. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η *HPRT-1* και ως θετικός μάρτυρας η κυτταρική σειρά HEK293. Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε η qPCR ήταν οι βέλτιστες, έτσι ώστε για κάθε μελετούμενο μετάγραφο να υπάρχει μοναδικό προϊόν και να υπάρχουν όσο το δυνατόν λιγότερα διμερή των εκκινητών. Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζονται ενδεικτικά οι καμπύλες ενίσχυσης και αποδιάταξης για την *HPRT-1*, το κλασικό μετάγραφο, το μετάγραφο 4 και 14, στην κυτταρική σειρά HEK293. Όπως είναι εμφανές, σε κάθε μία περίπτωση υπάρχει μοναδικό προϊόν, με αποτέλεσμα να είναι σωστή η διαδικασία της ποσοτικοποίησης.



Εικόνα 3.3. Καμπύλες ενίσχυσης Real-Time PCR για το γονίδιο HPRT-1 (A), το μετάγραφο 1 (B), το μετάγραφο 4 (Γ) και το μετάγραφο 14 (Δ), σε cDNA από την κυτταρική σειρά HEK293.



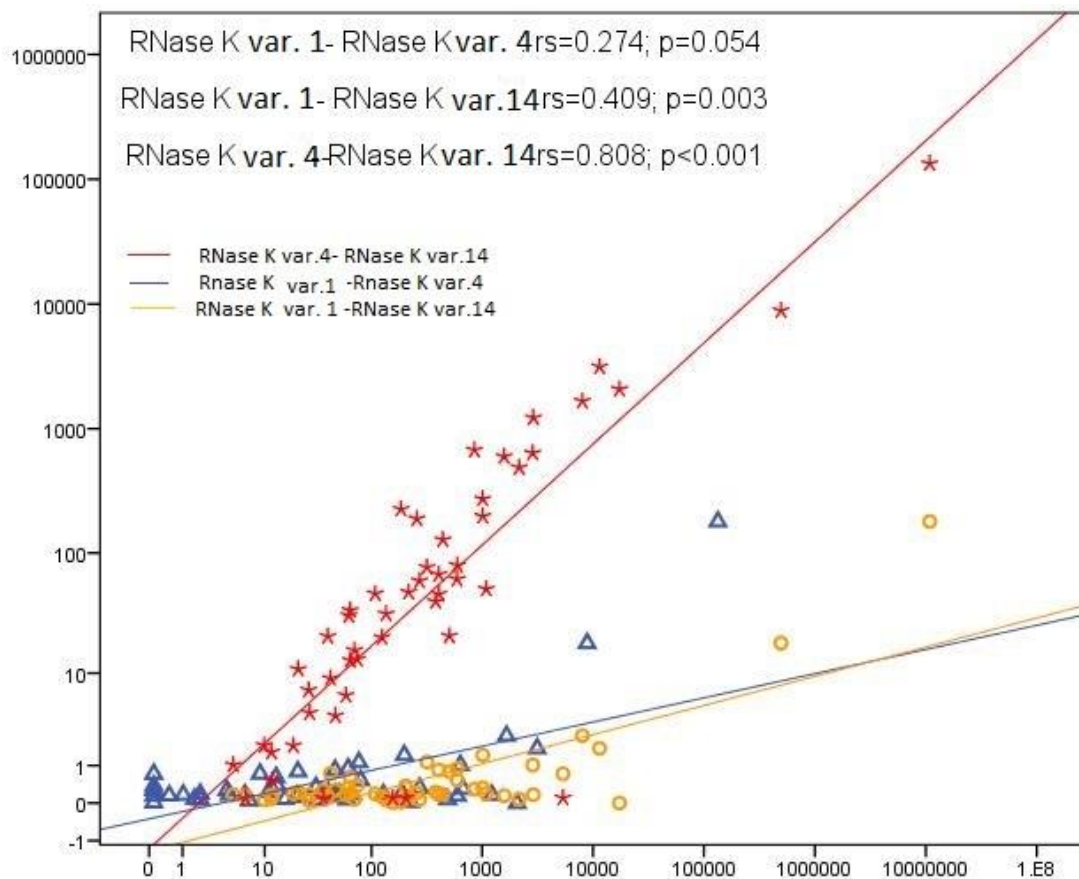
Εικόνα 3.4. Καμπύλες αποδιάταξης Real-Time PCR για το γονίδιο HPRT-1 με $T_m=81,42^{\circ}\text{C}$ (A), το μετάγραφο 1 με $T_m=79,17^{\circ}\text{C}$ (B), το μετάγραφο 4 με $T_m=84,12^{\circ}\text{C}$ (Γ) και το μετάγραφο 14 με $T_m=84,42^{\circ}\text{C}$ (Δ).

Για την περαιτέρω επιβεβαίωση της σωστής ποσοτικοποίησης, τα προϊόντα της real-time PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, έτσι ώστε να ελεγχθεί το προϊόν ως προς τη μοναδικότητά του και ως προς το μέγεθός του.

3.3.1. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΥ 1, ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΥ 4 ΚΑΙ ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΥ 14 ΣΕ ΠΑΙΔΙΚΕΣ ΟΛΛ

Πριν αναλυθεί η ποσοτική έκφραση του κάθε μεταγράφου ξεχωριστά και ως προς τα διάφορα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών, μελετήθηκε η συσχέτισή τους σε επίπεδο έκφρασης, για το σύνολο των ασθενών.

Η συσχέτιση της έκφρασης των τριών μεταγράφων, σε ασθενείς με παιδική ΟΛΛ, έγινε με ανάλυση κατά Spearman. Η ανάλυση αυτή, για συνεχείς μεταβλητές, δείχνει μια θετική συσχέτιση και των τριών μεταγράφων, όπου καλύτερη συσχέτιση παρουσιάζεται μεταξύ των μεταγράφων 4 και 14. Ο συντελεστής συσχέτισης κατά Spearman είναι $rs=0,808$ με $p<0,001$. Αντίστοιχα, το μετάγραφο 1 με το μετάγραφο 4 παρουσιάζει $rs=0,274$, $p=0,054$ και το μετάγραφο 1 με το μετάγραφο 14 έχει $rs=0,409$, $p=0,003$.



Εικόνα 3.5. Συσχέτιση έκφρασης των τριών μεταγράφων του γονιδίου της RNase κ κατά Spearman.

3.3.2. ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΑΝΑΦΟΡΑΣ *HPRT-1*

Όλα τα δείγματα τα οποία ελέγχθηκαν με qPCR για την έκφραση των μεταγράφων της RNase κ, ελέγχθηκαν παράλληλα και για την έκφραση του γονιδίου αναφοράς της *HPRT-1*. Η έκφραση αυτής είναι ενδεικτική για την καλή απομόνωση του RNA και κατ' επέκταση για τη σωστή RT-PCR αντίδραση. Δείγματα τα οποία δεν εξέφραζαν το γονίδιο αναφοράς ή είχαν πολύ αργή έκφρασή του, εξαιρέθηκαν της μελέτης. Ενδεικτικά, ηλεκτροφορήθηκαν μερικά προϊόντα qPCR για την έκφραση της *HPRT-1* σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Οι ζώνες παρατηρούνται στις 151 bp. Ιδιαίτερα σημαντικό είναι ότι τα δείγματα μεταξύ τους δεν παρουσιάζουν μεγάλη διακύμανση ως προς της έκφραση του γονιδίου αναφοράς.

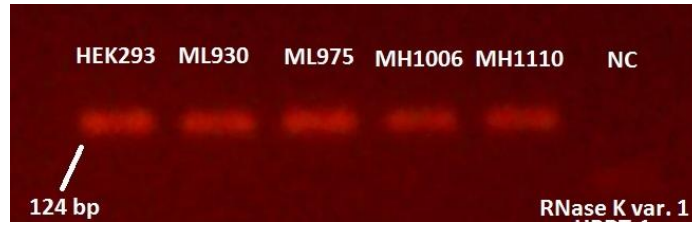


Εικόνα 3.6. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων qPCR για το γονίδιο αναφοράς *HPRT-1* σε gel αγαρόζης 2% w/v, σε cDNA από μυελό ολικού αίματος. Το δείγμα από τα HEK293 είναι ο θετικός μάρτυρας, ενώ το NC ο αρνητικός μάρτυρας. Τα δείγματα ML930, ML975 αναφέρονται σε ασθενείς με παιδική ΟΑΛ, ενώ τα MH1006, MH1110 αναφέρονται σε υγιής (control).

Οι αχνές ζώνες που παρατηρούνται σε χαμηλότερα σημεία (περίπου 30 b) αντιπροσωπεύουν τα διμερή που σχηματίζονται από τους εκκινητές.

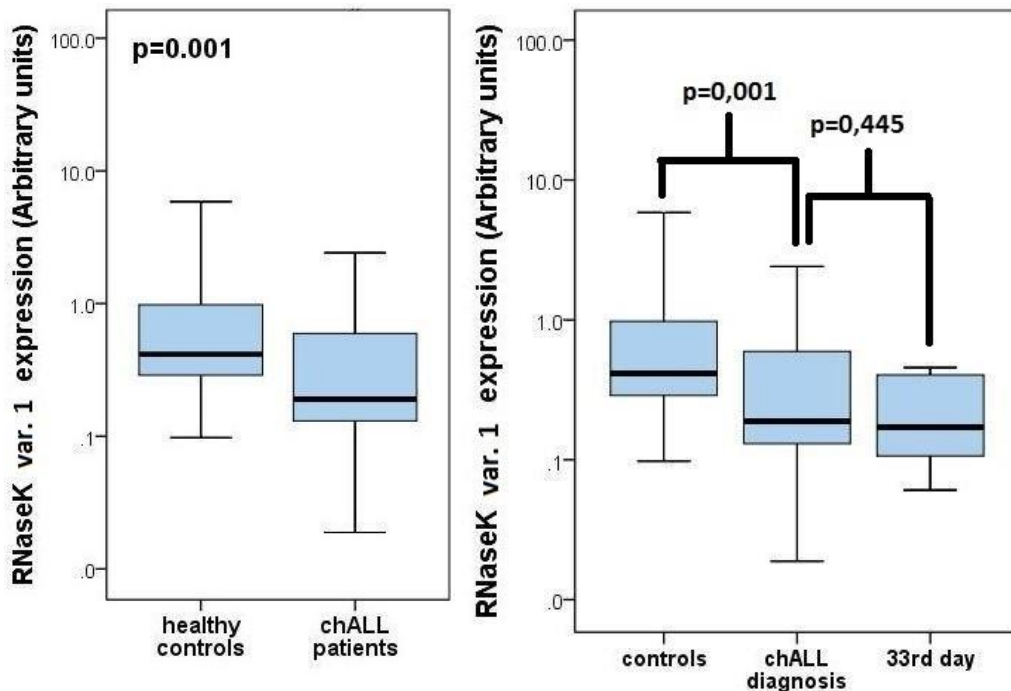
3.3.3. ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΥ 1 ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ RNase K

Όλα τα δείγματα τα οποία είχαν φυσιολογική έκφραση του γονιδίου αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση της έκφρασης του μεταγράφου 1 του γονιδίου της RNase κ. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ο F69 και ο 192R, οι αλληλουχίες των οποίων παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.2., και το προϊόν της αντίδρασης ήταν μεγέθους 124 bp. Με τους συγκεκριμένους εκκινητές ενισχύονται και τα μετάγραφα v.19, v.20, τα οποία όμως είναι πολύ σπάνια σε σχέση με το v.1. Επιπλέον, τα προϊόντα τους είναι στις 239 bp και 290 bp αντίστοιχα, οπότε δεδομένου ότι δεν ήταν παρόντα στην εικόνα της ηλεκτροφόρησης, μπορούμε να μιλάμε για ειδικό προϊόν στις 124 bp. Ενδεικτικά δείγματα ασθενών και υγιών, τα οποία ηλεκτροφορήθηκαν μετά την qPCR παρουσιάζονται παρακάτω:



Εικόνα 3.7. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων qPCR για το μετάγραφο 1 του γονιδίου της RNase κ σε gel αραρόζης 2% w/v, σε cDNA από μυελό ολικού αίματος. Το δείγμα από τα HEK293 είναι ο θετικός μάρτυρας, ενώ το NC ο αρνητικός μάρτυρας. Τα δείγματα ML930, ML975 αναφέρονται σε ασθενείς με παιδική ΟΑΛ, ενώ τα MH1006, MH1110 αναφέρονται σε υγιείς (control).

Κατά την ανάλυση των 51 ασθενών με παιδική ΟΑΛ και των 36 υγιών (control), προκύπτει ότι το μετάγραφο 1 παρουσιάζει στατιστικώς μειωμένα επίπεδα στους ασθενείς την ημέρα της διάγνωσης, σε σχέση με τους υγιείς ($p=0,001$). Επίσης, οι ίδιοι ασθενείς στο τέλος της θεραπείας εφόδου (δηλαδή την 33^η ημέρα), εμφανίζουν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου 1 σε σχέση με την ημέρα της διάγνωσης, δίχως όμως να προκύπτει στατιστική σημαντικότητα στο συγκεκριμένο μέγεθος δείγματος ($p=0,445$). Συγκεκριμένα, από τους 51 ασθενείς, μόνο για τους 10 υπήρχε υλικό κατά την 33^η ημέρα και αναλύθηκε η έκφραση του classical variant, από τους οποίους 6 είχαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης τη μέρα διάγνωσης σε σχέση με την 33^η μέρα και 4, το αντίστροφο.



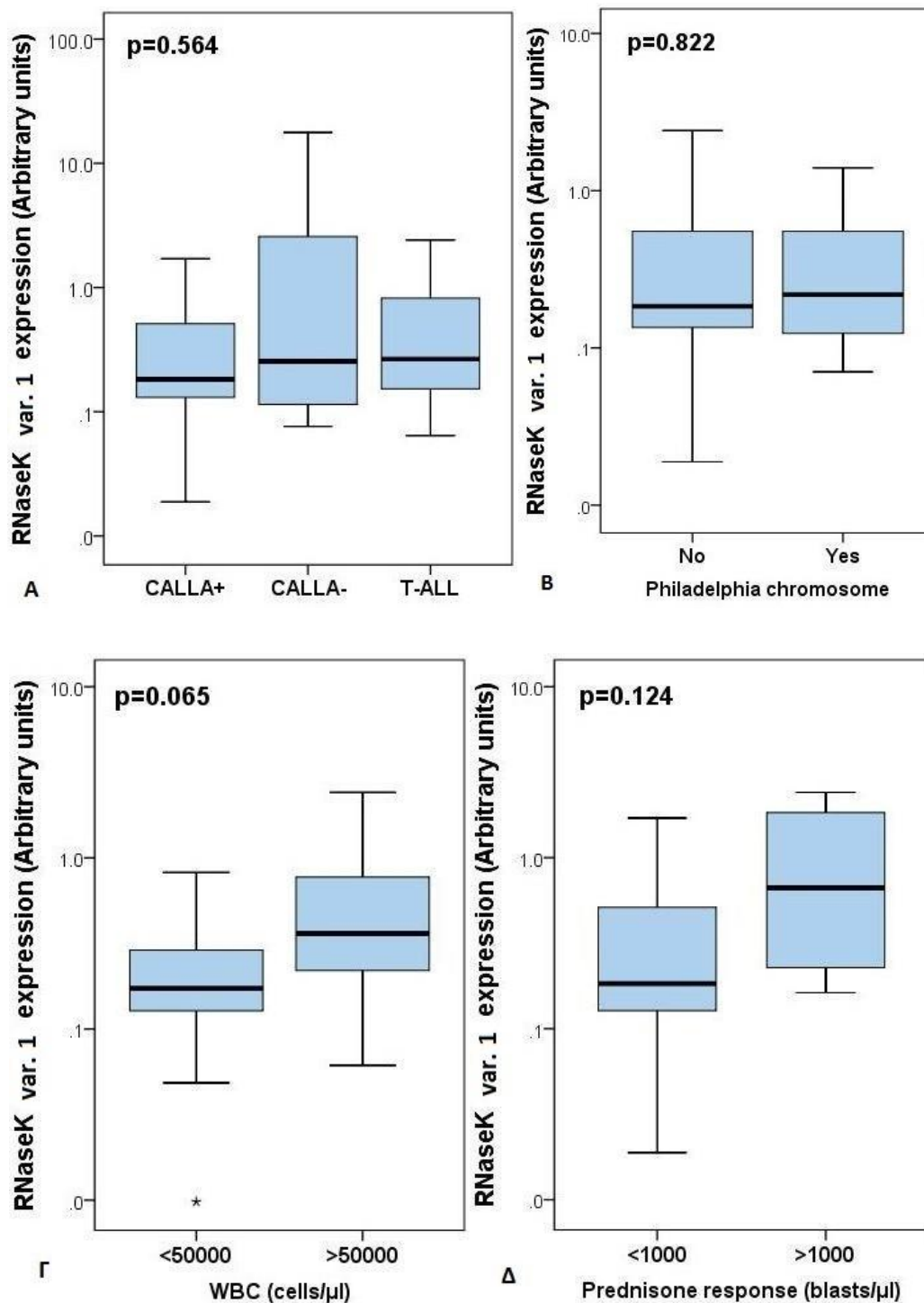
Εικόνα 3.8. Αριστερά: Διάγραμμα έκφρασης του μεταγράφου 1 μεταξύ υγιών και ασθενών με παιδική ΟΛΛ. Το p υπολογίστηκε με τη μη-παραμετρική διαδικασία “Mann-Whitney U test”. **Δεξιά:** Διάγραμμα έκφρασης μεταγράφου 1 για την ημέρα διάγνωσης και την 33^η μέρα των ασθενών με παιδική ΟΛΛ, σε σχέση με τους υγιείς. Το p υπολογίστηκε από τη μη-παραμετρική διαδικασία «Wilcoxon Rank test”.

3.3.3.1. Μελέτη έκφρασης του μεταγράφου 1 του γονιδίου της RNase κ ως προς τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών

Οι 51 ασθενείς με παιδική ΟΛΛ μελετήθηκαν στη συνέχεια ως προς τα διάφορα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά τους. Όσον αφορά την ηλικία διάγνωσης των ασθενών, η έκφραση του μεταγράφου 1 του γονιδίου της RNase κ δεν παρουσιάζει κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στα 1-10 έτη (σχετικά καλός προγνωστικός δείκτης) και σε ηλικίες μεγαλύτερες των 10 ετών (κακός προγνωστικός δείκτης), ($p=0,555$). Στη συνέχεια έγινε μελέτη του καρυοτύπου των ασθενών, μελετώντας την ύπαρξη της μετατόπισης $t(12,21)$, που αποτελεί καλό προγνωστικό δείκτη, την υπερδιπλοειδία (>50 χρωμοσώματα), που αποτελεί επίσης καλό προγνωστικό δείκτη, τον υποδιπλοειδισμό και την μετατόπιση $t(9,22)$, που θεωρούνται πολύ κακοί προγνωστικοί δείκτες (σπάνιες περιπτώσεις). Σε καμία από τις τέσσερις περιπτώσεις δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις, με $p=0,353$ για την μετατόπιση $t(12,21)$, $p=0,607$ για την υπερδιπλοειδία, $p=0,880$ για τον υποδιπλοειδισμό (2 ασθενείς) και $p=0,822$ για την μετατόπιση $t(9,22)$ (3 ασθενείς).

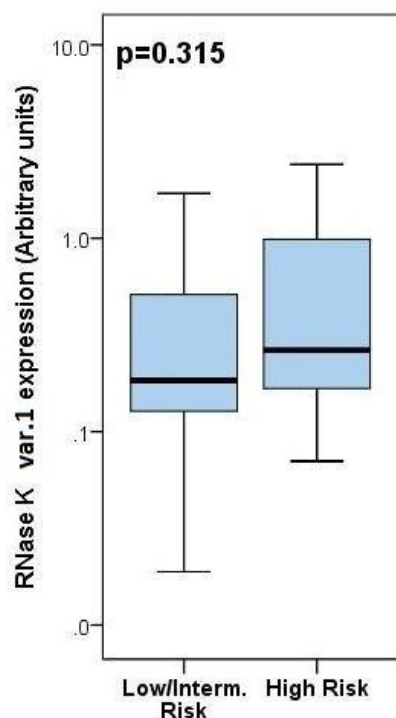
Πιο συγκεκριμένα, η κατηγοριοποίηση των ασθενών σε B-ΟΛΛ/CALLA(+), B-ΟΛΛ/CALLA(-) και T-ΟΛΛ έδειξε πως για τις δύο τελευταίες κατηγορίες, που αποτελούν δυσμενείς δείκτες, το μετάγραφο 1 δεν παρουσιάζει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους ($p=0,584$). Επιπλέον, όσοι ασθενείς παρουσίασαν την ημέρα διάγνωσης τους αριθμό λευκών κυττάρων (WBC) μεγαλύτερο των 50000 (κακός προγνωστικός δείκτης), εμφάνισαν και αυξημένα επίπεδα του variant 1 ($p=0,065$). Όσον αφορά την prednisone response την 8^η μέρα, όπου μετριέται ο αριθμός των βλαστών, οι ασθενείς με >1000 βλάστες/ μL (δυσμενής δείκτης) παρουσίασαν και αυξημένα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου 1 ($p=0,124$). Για τη 15^η μέρα, όπου η κατάσταση του μυελού που χωρίζεται σε M1 και M2-M3, τα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου 1 δεν φαίνονται να παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο κατηγοριών ($p=0,445$). Βάσει της ομάδας κινδύνου των ασθενών (danger

score), το variant 1 φαίνεται να έχει αυξημένη έκφραση, μη στατιστικώς σημαντική ($p=0,315$), για τους ασθενείς υψηλού κινδύνου (high risk).



Εικόνα 3.9. Διάγραμμα έκφρασης του μεταγράφου 1 μεταξύ B-ΟΛΛ/CALLA(+), B-ΟΛΛ/CALLA(-) και T-ΟΛΛ ασθενών. Το p υπολογίστηκε με τη μη-παραμετρική διαδικασία “Kruskal-Wallis test” (A). Διάγραμμα έκφρασης του μεταγράφου 1 μεταξύ t(9,22) θετικών και αρνητικών ασθενών με παιδική ΟΛΛ. Το p υπολογίστηκε με τη μη-παραμετρική διαδικασία

“Mann-Whitney U test” (B). Διάγραμμα έκφρασης του μεταγράφου 1 μεταξύ ασθενών με παιδική ΟΛΛ με WBC την ημέρα διάγνωσης >50000 κντ./μL και <50000 κντ./μL. Το p υπολογίστηκε με τη μη-παραμετρική διαδικασία “Mann-Whitney U test” (Γ). Διάγραμμα έκφρασης του μεταγράφου 1 μεταξύ ασθενών με παιδική ΟΛΛ για PR την 8^η ημέρα με >1000 βλάστες/μL και <1000 βλάστες/μL. Το p υπολογίστηκε με τη μη-παραμετρική διαδικασία “Mann-Whitney U test” (Δ).

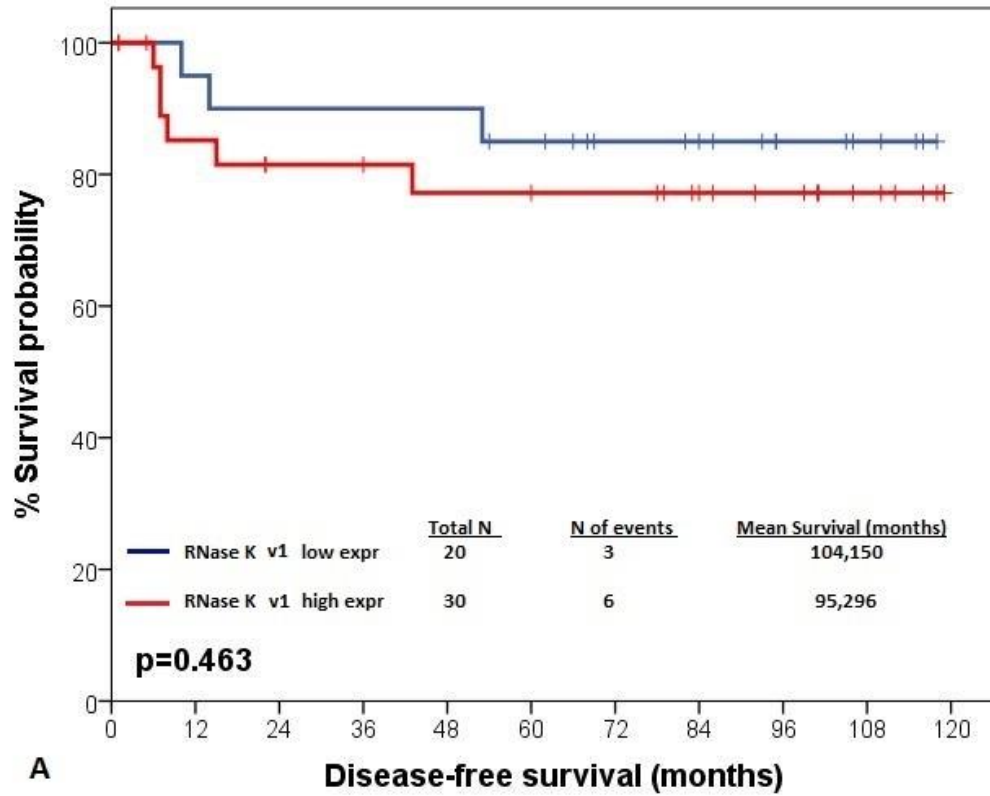


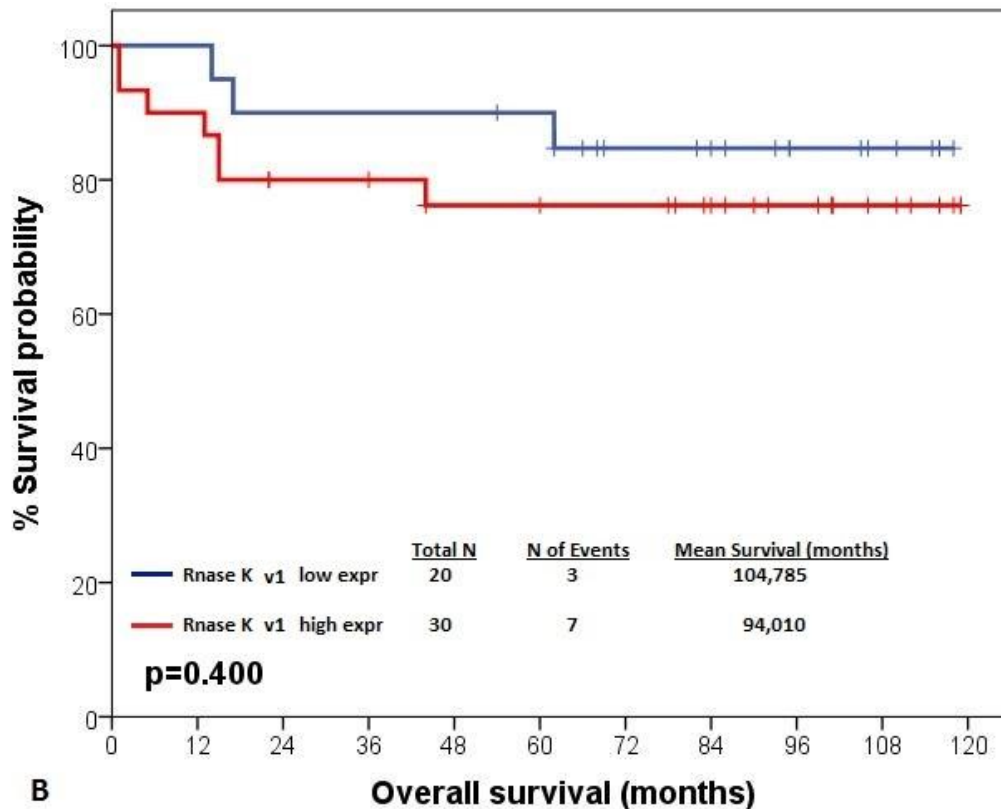
Εικόνα 3.10. Διάγραμμα έκφρασης του μεταγράφου 1 μεταξύ ασθενών με παιδική ΟΛΛ χαμηλού/ενδιάμεσου ρίσκου και υψηλού ρίσκου. Το p υπολογίστηκε με τη μη-παραμετρική διαδικασία “Mann-Whitney U test”.

Όσον αφορά την επιβίωση των ασθενών χωρίς υποτροπή, όσοι υπερεκφράζουν το μετάγραφο 1, με χρήση βέλτιστου ορίου (cut-off) το 40^ο τεταρτημόριο, έχουν μια τάση για αυξημένο κίνδυνο υποτροπής. Πιο συγκεκριμένα, από τους 50 ασθενείς, οι 20 υποεκφράζουν το κλασικό μετάγραφο, με 3 γεγονότα υποτροπής, ενώ οι 30 το υπερεκφράζουν με 6 γεγονότα υποτροπής. Η μέση επιβίωση των ασθενών χωρίς υποτροπή, που έχουν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου 1 είναι 104 μήνες, ενώ όσοι έχουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου αυτού, επιβιώνουν χωρίς υποτροπή για 95 μήνες. Η παραπάνω παρατήρηση δεν είναι στατιστικώς σημαντική (p=0,463), καθώς υπάρχει μικρό ποσοστό υποτροπών, όπως αναμενόταν, σε ένα μικρό δείγμα ασθενών. Όσον αφορά την ολική επιβίωση των ασθενών με παιδική ΟΛΛ, επίσης όσοι υπερεκφράζουν το μετάγραφο 1 φαίνεται να έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο θανάτου, με p=0,400. Συγκεκριμένα, από τους 50 ασθενείς, οι 20 που έχουν υποεκφρασμένο το μετάγραφο 1 παρουσίασαν 3 θανάτους, ενώ οι 30 που το υπερεκφράζουν παρουσίασαν 7 γεγονότα θανάτου. Η μέση ολική επιβίωση των ασθενών με χαμηλότερα επίπεδα του μεταγράφου 1 ανέρχεται στους 105 μήνες, ενώ των ασθενών με υψηλότερα επίπεδα έκφρασής του, στους 94 μήνες.

Επιπλέον, από την ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox (Cox regression analysis), φαίνεται πως στο ίδιο χρονικό διάστημα, οι ασθενείς που υπερεκφράζουν το

μετάγραφο 1 παρουσιάζουν πιο αυξημένο κίνδυνο υποτροπής σε σχέση με τους ασθενείς που το υποεκφράζουν (HR=1,670 με $p=0,469$). Αντίστοιχα, όσον αφορά την ολική επιβίωση, οι ασθενείς που υπερεκφράζουν το μετάγραφο 1 παρουσιάζουν πιο αυξημένο κίνδυνο θανάτου, σε σχέση με όσους το υποεκφράζουν, για το ίδιο χρονικό διάστημα (HR=1,770 με $p=0,408$).





Εικόνα 3.11. Kaplan-Meier καμπύλη για την επιβίωση ελεύθερης νόσου (DFS) των ασθενών με παιδική ΟΛΛ, ως προς την έκφραση του μεταγράφου 1 του γονιδίου της ριβονουκλεάσης κ. Το p value υπολογίστηκε με το “log-rank test” (A). Kaplan-Meier καμπύλη για την ολική επιβίωση (OS) των ασθενών με παιδική ΟΛΛ, ως προς την έκφραση του μεταγράφου 1 του γονιδίου της ριβονουκλεάσης κ. Το p value υπολογίστηκε με το “log-rank test” (B).

Συμπερασματικά, η υπερέκφραση του μεταγράφου 1 του γονιδίου της ριβονουκλεάσης κ φαίνεται να συνδέεται με δυσμενείς προγνωστικούς δείκτες, όπως ο αυξημένος αριθμός λευκών την ημέρα διάγνωσης (>50000 cells/μL) και ο αυξημένος αριθμός βλαστών την 8^η ημέρα (>1000 blast/μL, prednisone response). Επιπλέον, όσοι ασθενείς υπερεκφράζουν το μετάγραφο 1 παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο υποτροπής και θανάτου, συγκριτικά με όσους το υποεκφράζουν, στο ίδιο χρονικό διάστημα. Οι παρατηρήσεις είναι μη στατιστικώς σημαντικές, βέβαια, λόγω του μικρού αριθμού ασθενών που μελετήθηκαν.

3.3.4. ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΥ 4 ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ RNase K

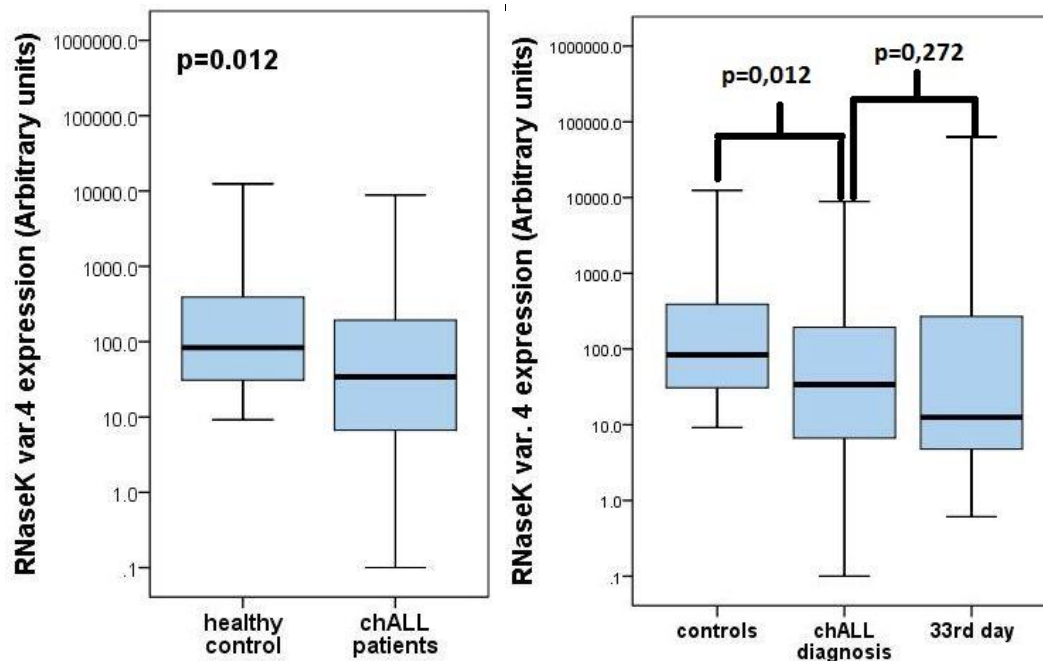
Όπως και για το μετάγραφο 1 του γονιδίου της ριβονουκλεάσης κ, έτσι και για το μετάγραφο 4, χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση έκφρασής του μόνο όσα δείγματα

είχαν φυσιολογική έκφραση του γονιδίου αναφοράς. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ο 1(2)/2F και ο Ex2/3R, οι αλληλουχίες των οποίων παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.2., και το προϊόν της αντίδρασης ήταν μεγέθους περίπου 250 bp. Ενδεικτικά δείγματα ασθενών και υγιών, τα οποία ηλεκτροφορήθηκαν μετά την qPCR παρουσιάζονται παρακάτω:



Εικόνα 3.12. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων qPCR για το μετάγραφο 4 του γονιδίου της RNase κ σε gel αραρόζης 2% w/v, σε cDNA από μωλό ολικού αίματος. Το δείγμα από τα HEK293 είναι ο θετικός μάρτυρας, ενώ το NC ο αρνητικός μάρτυρας. Τα δείγματα ML930, ML975 αναφέρονται σε ασθενείς με παιδική ΟΛΛ, ενώ τα MH1006, MH1110 αναφέρονται σε υγιής (control).

Από την ανάλυση των 51 ασθενών με παιδική ΟΛΛ και των 36 υγιών (control), προκύπτει ότι το μετάγραφο 4 παρουσιάζει στατιστικώς μειωμένα επίπεδα στους ασθενείς την ημέρα της διάγνωσης, σε σχέση με τους υγιείς ($p=0,012$). Επίσης, οι ίδιοι ασθενείς στο τέλος της θεραπείας εφόδου (δηλαδή την 33^η ημέρα), εμφανίζουν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου 4 σε σχέση με την ημέρα της διάγνωσης, δίχως όμως να προκύπτει στατιστική σημαντικότητα στο συγκεκριμένο μέγεθος δείγματος ($p=0,272$). Συγκεκριμένα, από τους 51 ασθενείς, μόνο για τους 12 υπήρχε υλικό κατά την 33^η ημέρα και αναλύθηκε η έκφραση του variant 4, από τους οποίους 7 είχαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης τη μέρα διάγνωσης σε σχέση με την 33^η μέρα και 5, το αντίστροφο.



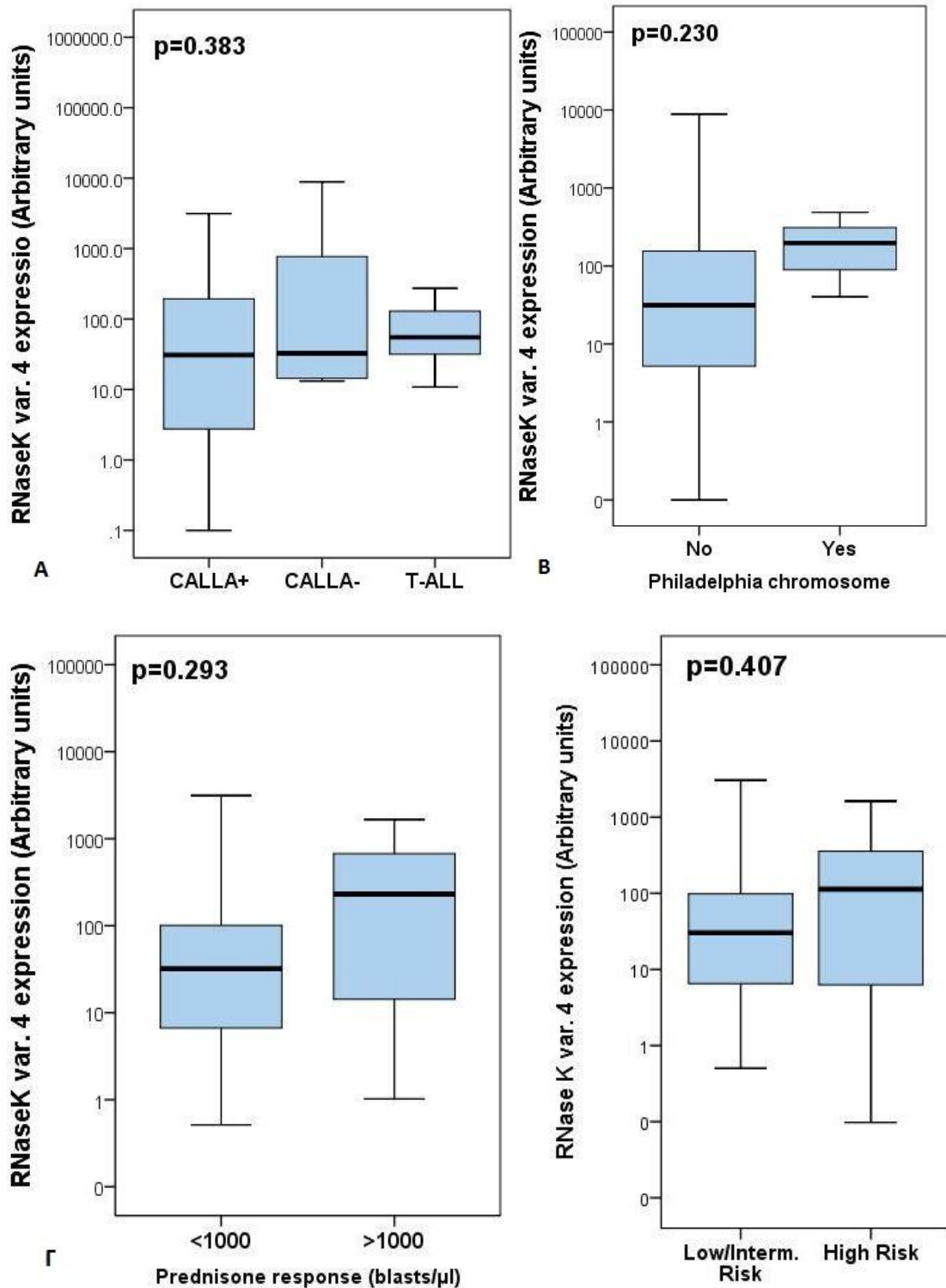
Εικόνα 3.13. Αριστερά: Διάγραμμα έκφρασης του μεταγράφου 4 μεταξύ υγιών και ασθενών με παιδική ΟΛΛ. Το p υπολογίστηκε με τη μη-παραμετρική διαδικασία “Mann-Whitney U test”. **Δεξιά:** Διάγραμμα έκφρασης του μεταγράφου 4 για την ημέρα διάγνωσης και την 33^η μέρα των ασθενών με παιδική ΟΛΛ, σε σχέση με τους υγιείς. Το p υπολογίστηκε από τη μη-παραμετρική διαδικασία «Wilcoxon Rank test”.

3.3.4.1. Μελέτη έκφρασης του μεταγράφου 4 του γονιδίου της RNase κ ως προς τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών

Οι 51 ασθενείς με παιδική ΟΛΛ που μελετήθηκαν για το μετάγραφο 1 ως προς τα διάφορα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά τους, χρησιμοποιήθηκαν και για την αντίστοιχη μελέτη στο μετάγραφο 4. Όσον αφορά την ηλικία διάγνωσης των ασθενών, η έκφραση του μεταγράφου 4 του γονιδίου της RNase κ δεν παρουσιάζει κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στα 1-10 έτη (σχετικά καλός προγνωστικός δείκτης) και σε ηλικίες μεγαλύτερες των 10 ετών (κακός προγνωστικός δείκτης), ($p=0,616$). Στη συνέχεια έγινε μελέτη του καρυοτύπου των ασθενών, μελετώντας την ύπαρξη της μετατόπισης t(12,21), που αποτελεί καλό προγνωστικό δείκτη, την υπερδιπλοειδία (>50 χρωμοσώματα), που αποτελεί επίσης καλό προγνωστικό δείκτη, τον υποδιπλοειδισμό και την μετατόπιση t(9,22), που θεωρούνται πολύ κακοί προγνωστικοί δείκτες (σπάνιες περιπτώσεις). Στις τρεις πρώτες περιπτώσεις δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις, με $p=0,710$ για την μετατόπιση t(12,21), $p=0,615$ για την υπερδιπλοειδία και $p=0,843$ για τον υποδιπλοειδισμό (2

ασθενείς). Για τη μετατόπιση t(9,22) (3 ασθενείς), το μετάγραφο 4 φαίνεται να παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα έκφρασης στους ασθενείς του τη φέρουν ($p=0,230$).

Πιο συγκεκριμένα, η κατηγοριοποίηση των ασθενών σε B-ΟΛΛ/CALLA(+), B-ΟΛΛ/CALLA(-) και T-ΟΛΛ έδειξε πως για τις δύο τελευταίες κατηγορίες, που αποτελούν δυσμενείς δείκτες, το μετάγραφο 4 παρουσιάζει μη στατιστικώς σημαντικά αυξημένα επίπεδα ($p=0,383$). Επιπλέον, όσοι ασθενείς παρουσίασαν την ημέρα διάγνωσής τους αριθμό λευκών κυττάρων (WBC) μεγαλύτερο των 50000 (κακός προγνωστικός δείκτης), δεν εμφάνισαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές της έκφρασης του variant 4 με τους ασθενείς που είχαν $WBC < 50000$. ($p=0,604$). Όσον αφορά την prednisone response την 8^η μέρα, όπου μετριέται ο αριθμός των βλαστών, οι ασθενείς με >1000 βλάστες/ μL (δυσμενής δείκτης) παρουσίασαν και αυξημένα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου 4 ($p=0,293$). Για τη 15^η μέρα, όπου η κατάσταση του μυελού που χωρίζεται σε M1 και M2-M3, τα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου 4 δεν φαίνονται να παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο κατηγοριών ($p=0,812$). Βάσει της ομάδας κινδύνου των ασθενών (danger score), το variant 4 φαίνεται να έχει αυξημένη έκφραση, μη στατιστικώς σημαντική ($p=0,407$), για τους ασθενείς υψηλού κινδύνου (high risk).

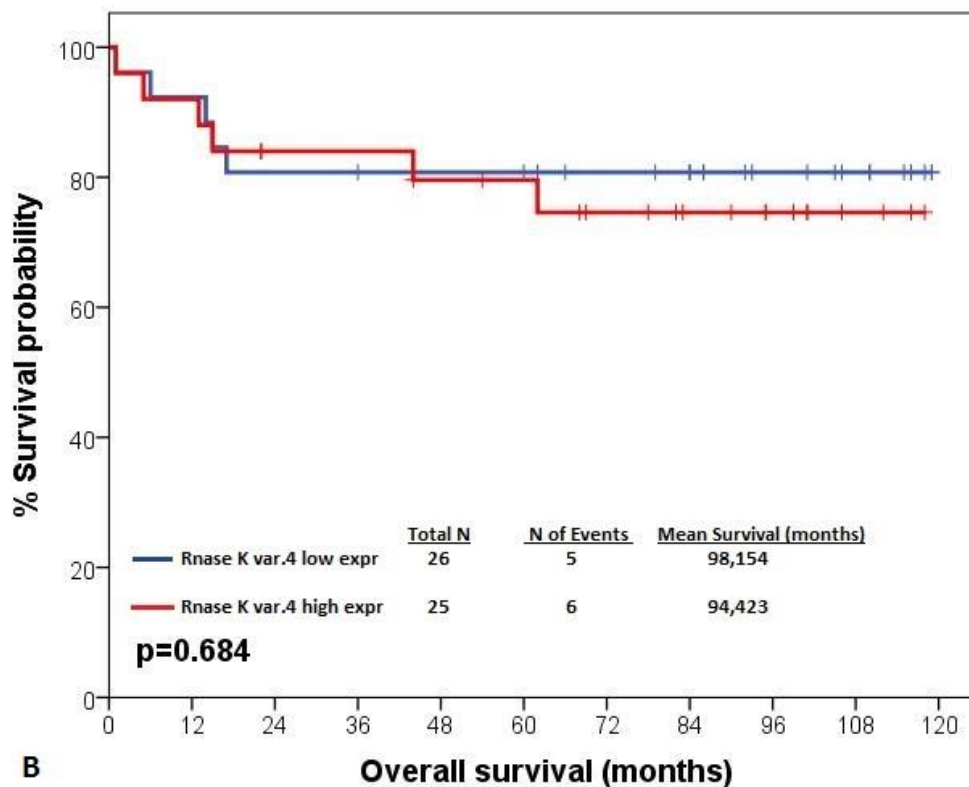
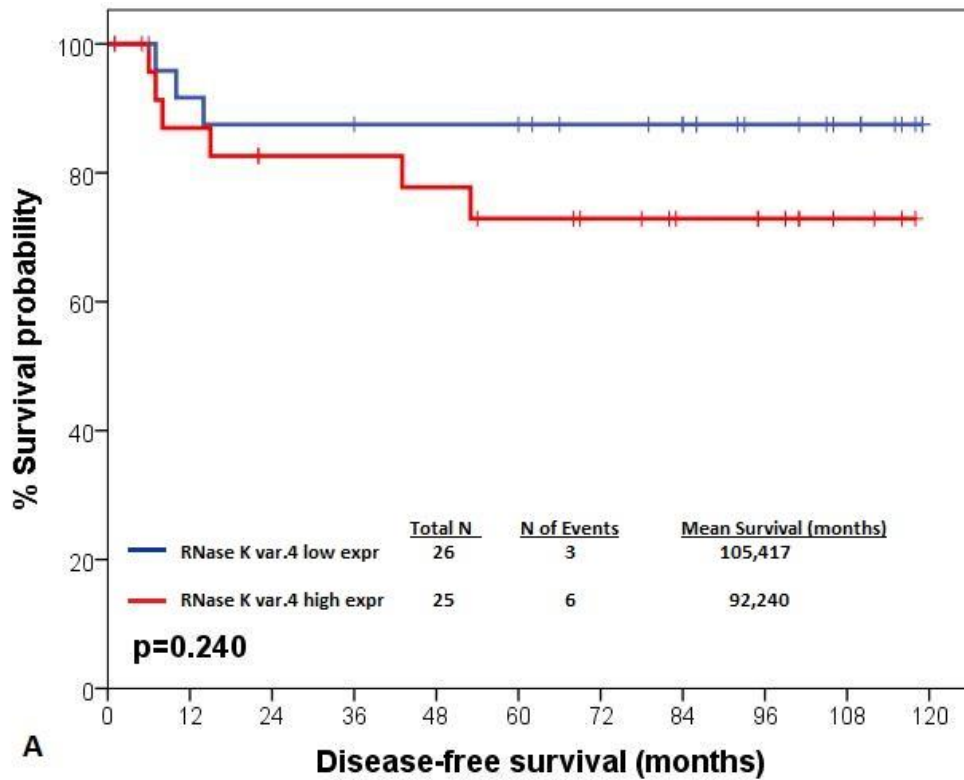


Εικόνα 3.14. Διάγραμμα έκφρασης του μεταγράφου 4 μεταξύ B-ΟΛΛ/CALLA(+), B-ΟΛΛ/CALLA(-) και T-ΟΛΛ ασθενών. Το p υπολογίστηκε με τη μη-παραμετρική διαδικασία “Kruskal-Wallis test” (A). Διάγραμμα έκφρασης του μεταγράφου 4 μεταξύ t(9,22) θετικών και αρνητικών ασθενών με παιδική ΟΛΛ. Το p υπολογίστηκε με τη μη-παραμετρική διαδικασία “Mann-Whitney U test” (B). Διάγραμμα έκφρασης του

μεταγράφου 4 μεταξύ ασθενών με παιδική ΟΛΛ για PR την 8^η ημέρα με >1000 βλάστες/ μ L και <1000 βλάστες/ μ L. Το p υπολογίστηκε με τη μη-παραμετρική διαδικασία “Mann-Whitney U test” (Γ). Διάγραμμα έκφρασης του μεταγράφου 4 μεταξύ ασθενών με παιδική ΟΛΛ χαμηλού/ενδιάμεσου ρίσκου και υψηλού ρίσκου. Το p υπολογίστηκε με τη μη-παραμετρική διαδικασία “Mann-Whitney U test” (Δ).

Όσον αφορά την επιβίωση των ασθενών χωρίς υποτροπή, όσοι υπερεκφράζουν το μετάγραφο 4, με χρήση βέλτιστου ορίου (cut-off) τη διάμεσο, έχουν μια τάση για αυξημένο κίνδυνο υποτροπής. Πιο συγκεκριμένα, από τους 51 ασθενείς, οι 26 υποεκφράζουν το μετάγραφο 4, με 3 γεγονότα υποτροπής, ενώ οι 25 το υπερεκφράζουν με 6 γεγονότα υποτροπής. Η μέση επιβίωση των ασθενών χωρίς υποτροπή, που έχουν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου 4 είναι 105,5 μήνες, ενώ όσοι έχουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου αυτού, επιβιώνουν χωρίς υποτροπή για 92 μήνες. Η παραπάνω παρατήρηση δεν είναι στατιστικώς σημαντική (p=0,240), καθώς υπάρχει μικρό ποσοστό υποτροπών, όπως αναμενόταν, σε ένα μικρό δείγμα ασθενών. Όσον αφορά την ολική επιβίωση των ασθενών με παιδική ΟΛΛ, δε φαίνεται να υπάρχει έντονη συσχέτιση του κινδύνου θανάτου με την υπερέκφραση ή υποέκφραση του μεταγράφου 4 (p=0,684). Συγκεκριμένα, από τους 51 ασθενείς, οι 26 που έχουν υποεκφρασμένο το μετάγραφο 4 παρουσίασαν 5 θανάτους, ενώ οι 25 που το υπερεκφράζουν παρουσίασαν 6 γεγονότα θανάτου. Η μέση ολική επιβίωση των ασθενών με χαμηλότερα επίπεδα του μεταγράφου 4 ανέρχεται στους 98 μήνες, ενώ των ασθενών με υψηλότερα επίπεδα έκφρασής του, στους 94,5 μήνες.

Επιπλέον, από την ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox (Cox regression analysis), φαίνεται πως στο ίδιο χρονικό διάστημα, οι ασθενείς που υπερεκφράζουν το μετάγραφο 4 παρουσιάζουν πιο αυξημένο κίνδυνο υποτροπής σε σχέση με τους ασθενείς που το υποεκφράζουν (HR=2,240 με p=0,254). Αντίστοιχα, όσον αφορά την ολική επιβίωση, οι ασθενείς που υπερεκφράζουν το μετάγραφο 4 παρουσιάζουν πιο αυξημένο κίνδυνο θανάτου, σε σχέση με όσους το υποεκφράζουν, για το ίδιο χρονικό διάστημα (HR=1,278 με p=0,686).



Εικόνα 3.15. Kaplan-Meier καμπύλη για την επιβίωση ελεύθερης νόσου (DFS) των ασθενών με παιδική ΟΑΛ, ως προς την έκφραση του μεταγράφου 4 του γονιδίου της ριβονουκλεάσης κ. Το p value υπολογίσθηκε με το “log-rank test” (A). Kaplan-Meier

καμπύλη για την ολική επιβίωση (OS) των ασθενών με παιδική ΟΛΛ, ως προς την έκφραση του μεταγράφου 4 του γονιδίου της ριβονουκλεάσης κ. Το *p* value υπολογίσθηκε με το “log-rank test” (B).

Συμπερασματικά, η υπερέκφραση του μεταγράφου 4 του γονιδίου της RNase κ φαίνεται να συνδέεται με δυσμενείς προγνωστικούς δείκτες, όπως η ύπαρξη του χρωμοσώματος Φιλαδέλφεια (t9,22) και ο αυξημένος αριθμός βλαστών την 8^η ημέρα (>1000 blast/ μ L, prednisone response). Επιπλέον, όσοι ασθενείς υπερεκφράζουν το μετάγραφο 4 παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο υποτροπής, συγκριτικά με όσους το υποεκφράζουν, στο ίδιο χρονικό διάστημα. Οι παρατηρήσεις είναι μη στατιστικώς σημαντικές, βέβαια, λόγω του μικρού αριθμού ασθενών που μελετήθηκαν.

3.3.5. ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΥ 14 ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ RNase K

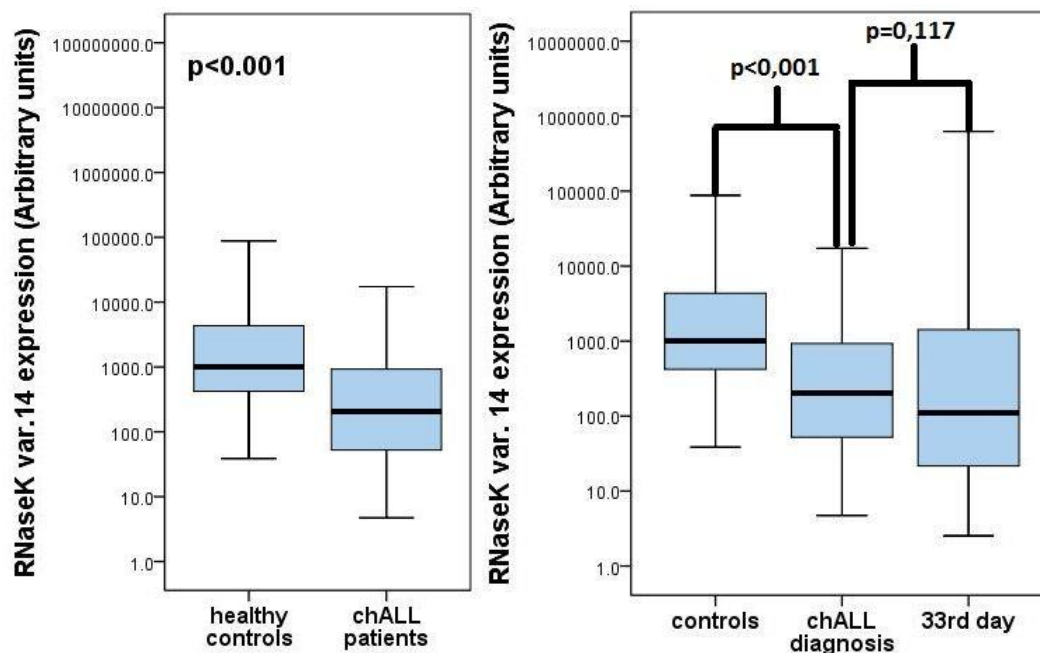
Όπως και για το μετάγραφο 1 και το μετάγραφο 4 του γονιδίου της ριβονουκλεάσης κ, έτσι και για το μετάγραφο 14, χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση έκφρασής του μόνο όσα δείγματα είχαν φυσιολογική έκφραση του γονιδίου αναφοράς. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ο Ex2F και ο Ex2/4R, οι αλληλουχίες των οποίων παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.2., και το προϊόν της αντίδρασης ήταν μεγέθους 185 bp. Ενδεικτικά δείγματα ασθενών και υγιών, τα οποία ηλεκτροφορήθηκαν μετά την qPCR παρουσιάζονται παρακάτω:



Εικόνα 3.16. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων qPCR για το μετάγραφο 14 του γονιδίου της RNase κ σε gel αραρόζης 2% w/v, σε cDNA από μυελό ολικού αίματος. Το δείγμα από τα HEK293 είναι ο θετικός μάρτυρας, ενώ το NC ο αρνητικός μάρτυρας. Τα δείγματα ML930, ML975 αναφέρονται σε ασθενείς με παιδική ΟΛΛ, ενώ τα MH1006, MH1110 αναφέρονται σε υγιής (control).

Από την ανάλυση των 51 ασθενών με παιδική ΟΛΛ και των 36 υγιών (control), προκύπτει ότι το μετάγραφο 14 παρουσιάζει στατιστικώς μειωμένα επίπεδα στους ασθενείς την ημέρα της διάγνωσης, σε σχέση με τους υγιείς ($p < 0,001$). Επίσης, οι ίδιοι

ασθενείς στο τέλος της θεραπείας εφόδου (δηλαδή την 33^η ημέρα), εμφανίζουν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου 14 σε σχέση με την ημέρα της διάγνωσης, δίχως όμως να προκύπτει στατιστική σημαντικότητα στο συγκεκριμένο μέγεθος δείγματος ($p=0,117$). Συγκεκριμένα, από τους 51 ασθενείς, μόνο για τους 12 υπήρχε υλικό κατά την 33^η ημέρα και αναλύθηκε η έκφραση του variant 14, από τους οποίους 9 είχαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης τη μέρα διάγνωσης σε σχέση με την 33^η μέρα και 3, το αντίστροφο.



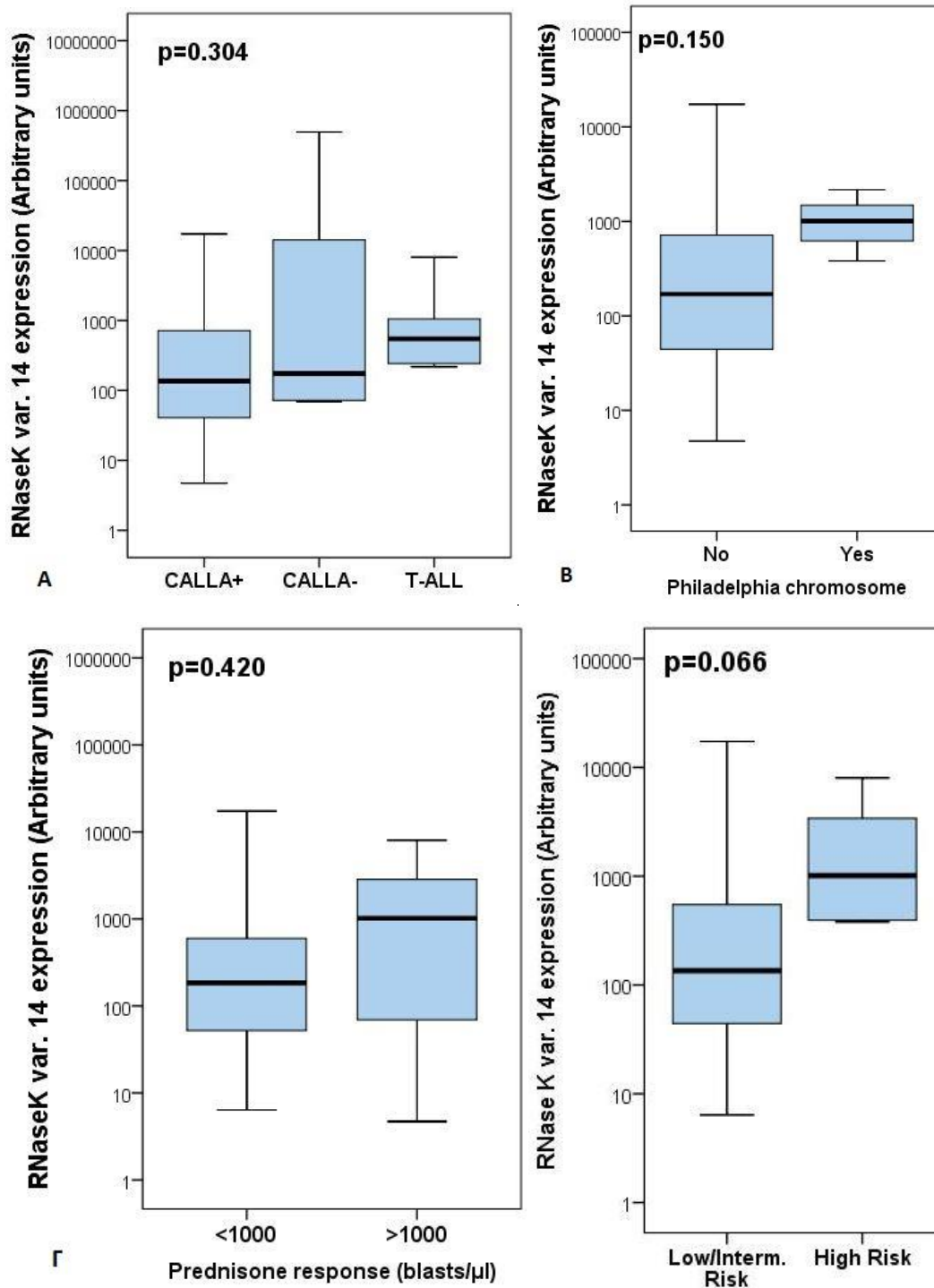
Εικόνα 3.17. Αριστερά: Διάγραμμα έκφρασης του μεταγράφου 14 μεταξύ υγιών και ασθενών με παιδική ΟΑΛ. Το p υπολογίστηκε με τη μη-παραμετρική διαδικασία “Mann-Whitney U test”. **Δεξιά:** Διάγραμμα έκφρασης του μεταγράφου 14 για την ημέρα διάγνωσης και την 33^η μέρα των ασθενών με παιδική ΟΑΛ, σε σχέση με τους υγιείς. Το p υπολογίστηκε από τη μη-παραμετρική διαδικασία «Wilcoxon Rank test”.

3.3.5.1. Μελέτη έκφρασης του μεταγράφου 14 του γονιδίου της RNase κ ως προς τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών

Οι 51 ασθενείς με παιδική ΟΑΛ που μελετήθηκαν για το μετάγραφο 1 και το μετάγραφο 4 ως προς τα διάφορα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά τους, χρησιμοποιήθηκαν και για την αντίστοιχη μελέτη του μεταγράφου 14. Όσον αφορά την ηλικία διάγνωσης των ασθενών, η έκφραση του μεταγράφου 14 του γονιδίου της RNase κ δεν παρουσιάζει κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στα 1-10 έτη (σχετικά καλός προγνωστικός δείκτης) και σε ηλικίες μεγαλύτερες των 10 ετών (κακός

προγνωστικός δείκτης), ($p=0,877$). Στη συνέχεια έγινε μελέτη του καρυοτύπου των ασθενών, μελετώντας την ύπαρξη της μετατόπισης $t(12,21)$, που αποτελεί καλό προγνωστικό δείκτη, την υπερδιπλοειδία (>50 χρωμοσώματα), που αποτελεί επίσης καλό προγνωστικό δείκτη, τον υποδιπλοειδισμό και την μετατόπιση $t(9,22)$, που θεωρούνται πολύ κακοί προγνωστικοί δείκτες (σπάνιες περιπτώσεις). Στις τρεις πρώτες περιπτώσεις δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις, με $p=0,907$ για την μετατόπιση $t(12,21)$, $p=0,937$ για την υπερδιπλοειδία και $p=0,921$ για τον υποδιπλοειδισμό (2 ασθενείς). Για τη μετατόπιση $t(9,22)$ (3 ασθενείς), το μετάγραφο 14 φαίνεται να παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα έκφρασης στους ασθενείς του τη φέρουν ($p=0,150$).

Πιο συγκεκριμένα, η κατηγοριοποίηση των ασθενών σε B-ΟΛΛ/CALLA(+), B-ΟΛΛ/CALLA(-) και T-ΟΛΛ έδειξε πως για τις δύο τελευταίες κατηγορίες, που αποτελούν δυσμενείς δείκτες, το μετάγραφο 4 παρουσιάζει μη στατιστικώς σημαντικά αυξημένα επίπεδα ($p=0,304$). Επιπλέον, όσοι ασθενείς παρουσίασαν την ημέρα διάγνωσης τους αριθμό λευκών κυττάρων (WBC) μεγαλύτερο των 50000 (κακός προγνωστικός δείκτης), δεν εμφάνισαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές της έκφρασης του variant 14 με τους ασθενείς που είχαν $WBC < 50000$. ($p=0,449$). Όσον αφορά την prednisone response την 8^η μέρα, όπου μετριέται ο αριθμός των βλαστών, οι ασθενείς με >1000 βλάστες/ μL (δυσμενής δείκτης) παρουσίασαν και αυξημένα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου 14 ($p=0,420$). Για τη 15^η μέρα, όπου η κατάσταση του μυελού που χωρίζεται σε M1 και M2-M3, τα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου 14 δεν φαίνονται να παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο κατηγοριών ($p=0,489$). Βάσει της ομάδας κινδύνου των ασθενών (danger score), το variant 14 φαίνεται να έχει αυξημένη έκφραση, μη στατιστικώς σημαντική ($p=0,066$), για τους ασθενείς υψηλού κινδύνου (high risk).

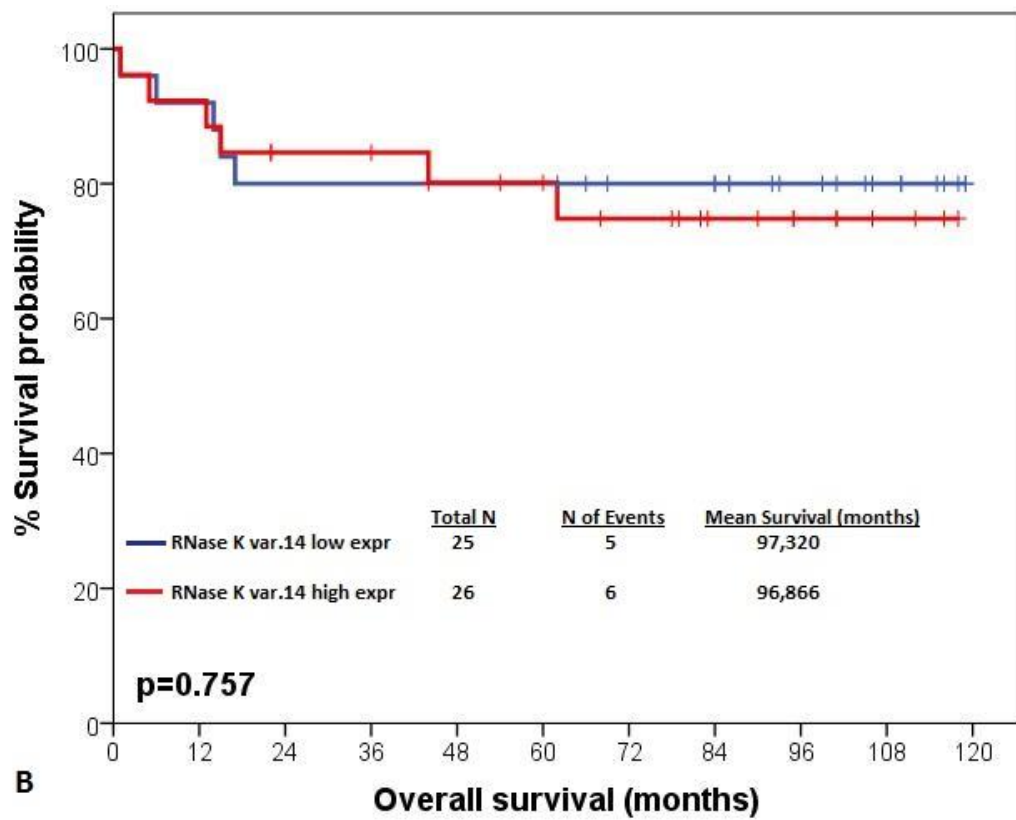
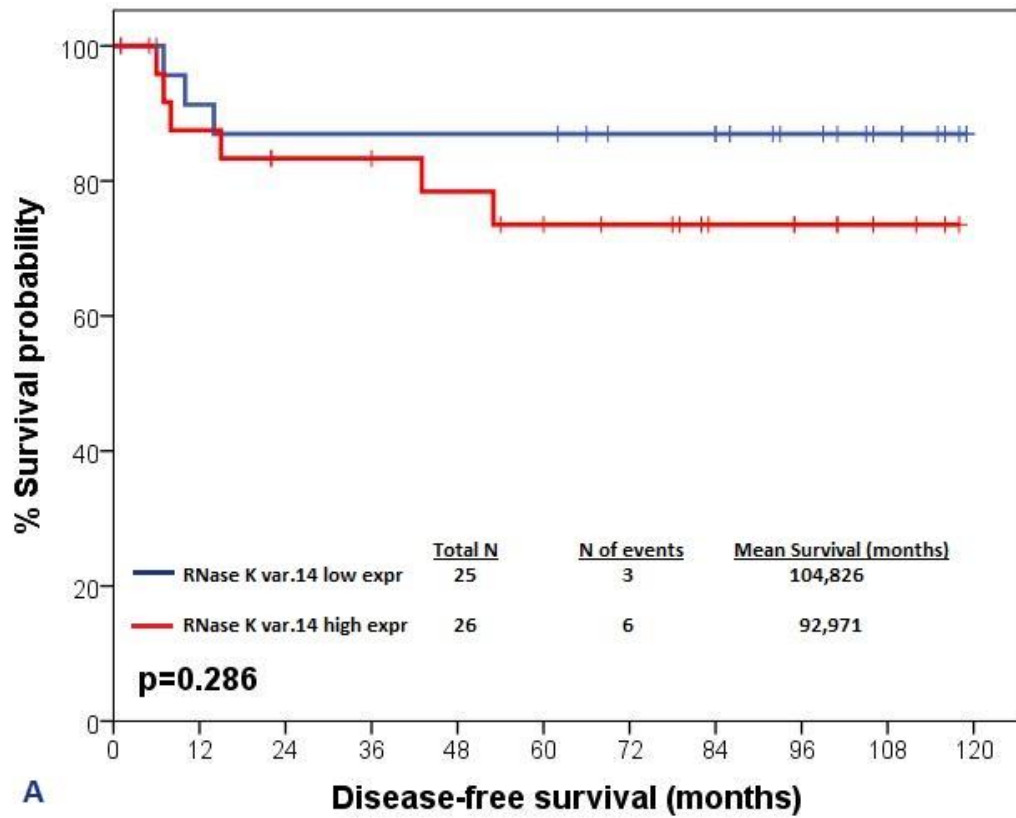


Εικόνα 3.18. Διάγραμμα έκφρασης του μεταγράφου 14 μεταξύ B-ΟΛΛ/CALLA(+), B-ΟΛΛ/CALLA(-) και T-ΟΛΛ ασθενών . Το p υπολογίστηκε με τη μη-παραμετρική διαδικασία “Kruskal-Wallis test” (A). Διάγραμμα έκφρασης του μεταγράφου 14 μεταξύ t(9,22) θετικών και αρνητικών ασθενών με παιδική ΟΛΛ. Το p υπολογίστηκε με τη μη-παραμετρική διαδικασία “Mann-Whitney U test” (B). Διάγραμμα έκφρασης του μεταγράφου 14 μεταξύ ασθενών με παιδική ΟΛΛ για PR την 8^η ημέρα με >1000 βλάστες/μL και <1000 βλάστες/μL. Το p υπολογίστηκε με τη μη-παραμετρική διαδικασία

“Mann-Whitney U test” (Γ). Διάγραμμα έκφρασης του μεταγράφου 14 μεταξύ ασθενών με παιδική ΟΑΛ χαμηλού/ενδιάμεσου ρίσκου και υψηλού ρίσκου. Το p υπολογίστηκε με τη μη-παραμετρική διαδικασία “Mann-Whitney U test” (Δ).

Όσον αφορά την επιβίωση των ασθενών χωρίς υποτροπή, όσοι υπερεκφράζουν το μετάγραφο 14, με χρήση βέλτιστου ορίου (cut-off) τη διάμεσο, έχουν μια τάση για αυξημένο κίνδυνο υποτροπής. Πιο συγκεκριμένα, από τους 51 ασθενείς, οι 25 υποεκφράζουν το μετάγραφο 14, με 3 γεγονότα υποτροπής, ενώ οι 26 το υπερεκφράζουν με 6 γεγονότα υποτροπής. Η μέση επιβίωση των ασθενών χωρίς υποτροπή, που έχουν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου 14 είναι 105 μήνες, ενώ όσοι έχουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου αυτού, επιβιώνουν χωρίς υποτροπή για 93 μήνες. Η παραπάνω παρατήρηση δεν είναι στατιστικώς σημαντική ($p=0,286$), καθώς υπάρχει μικρό ποσοστό υποτροπών, όπως αναμενόταν, σε ένα μικρό δείγμα ασθενών. Όσον αφορά την ολική επιβίωση των ασθενών με παιδική ΟΑΛ, δε φαίνεται να υπάρχει έντονη συσχέτιση του κινδύνου θανάτου με την υπερέκφραση ή υποέκφραση του μεταγράφου 14 ($p=0,757$). Συγκεκριμένα, από τους 51 ασθενείς, οι 25 που έχουν υποεκφρασμένο το μετάγραφο 14 παρουσίασαν 5 θανάτους, ενώ οι 26 που το υπερεκφράζουν παρουσίασαν 6 γεγονότα θανάτου. Η μέση ολική επιβίωση των ασθενών με χαμηλότερα επίπεδα του μεταγράφου 14 ανέρχεται στους 97 μήνες, ενώ των ασθενών με υψηλότερα επίπεδα έκφρασής του, στους 95 μήνες.

Επιπλέον, από την ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox (Cox regression analysis), φαίνεται πως στο ίδιο χρονικό διάστημα, οι ασθενείς που υπερεκφράζουν το μετάγραφο 14 παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο υποτροπής σε σχέση με τους ασθενείς που το υποεκφράζουν (HR=2,089 με $p=0,298$). Αντίστοιχα, όσον αφορά την ολική επιβίωση, οι ασθενείς που υπερεκφράζουν το μετάγραφο 14 παρουσιάζουν πιο αυξημένο κίνδυνο θανάτου, σε σχέση με όσους το υποεκφράζουν, για το ίδιο χρονικό διάστημα (HR=1,205 με $p=0,759$).



Εικόνα 3.19. Kaplan-Meier καμπύλη για την επιβίωση ελεύθερης νόσου (DFS) των ασθενών με παιδική ΟΑΛ, ως προς την έκφραση του μεταγράφου 14 του γονιδίου της

ριβονουκλεάσης κ. Το *p* value υπολογίσθηκε με το “log-rank test” (A). Kaplan-Meier καμπύλη για την ολική επιβίωση (OS) των ασθενών με παιδική ΟΑΛ, ως προς την έκφραση του μεταγράφου 14 του γονιδίου της ριβονουκλεάσης κ. Το *p* value υπολογίσθηκε με το “log-rank test” (B).

Συμπερασματικά, η υπερέκφραση του μεταγράφου 14 του γονιδίου της RNase κ φαίνεται να συνδέεται με δυσμενείς προγνωστικούς δείκτες, όπως η ύπαρξη του χρωμοσώματος Φιλαδέλφεια (t9,22), ο αυξημένος αριθμός βλαστών την 8^η ημέρα (>1000 blast/μL, prednisone response) και οι ασθενείς υψηλού κινδύνου. Επιπλέον, όσοι ασθενείς υπερεκφράζουν το μετάγραφο 14 παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο υποτροπής, συγκριτικά με όσους το υποεκφράζουν, στο ίδιο χρονικό διάστημα. Οι παρατηρήσεις είναι μη στατιστικώς σημαντικές, βέβαια, λόγω του μικρού αριθμού ασθενών που μελετήθηκαν.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η οξεία λεμφοκυτταρική (ή λεμφοβλαστική) λευχαιμία (ΟΛΛ) είναι μια μορφή κακοήθους νεοπλασματος των λεμφοκυττάρων που χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση ανώριμων κυττάρων αίματος στο μυελό των οστών. Παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια και μπορεί να προέλθει από πρόβλημα στην ωρίμανση των Β λεμφοκυττάρων στο μυελό των οστών ή των Τ λεμφοκυττάρων στο θύμο. Οι οξείες λευχαιμίες αποτελούν στις μέρες από τις πιο σημαντικές κακοήθειες νόσους, με την ΟΛΛ να έχει τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης μεταξύ των παιδιών ηλικίας 2 και 5 ετών. Πολλοί δείκτες χρησιμοποιούνται για τη διάγνωσή και τη διαφοροδιάγνωσή της, που βασίζονται στη μορφολογία των κυττάρων, τον καρυότυπο και διάφορες άλλες μοριακές διαταραχές. Επίσης, πολλοί από αυτούς τους δείκτες αποτελούν δυσμενείς προγνωστικούς παράγοντες της νόσου, ενώ άλλοι είναι ευνοϊκότεροι. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η ηλικία, όπου παιδιά 1 έως 6 ετών έχουν καλύτερη πρόγνωση, παιδιά 6 έως 10 ετών μέτρια πρόγνωση και ασθενείς ηλικίας >10 ετών έχουν κακή πρόγνωση. Οι ασθενείς με Β-ΟΛΛ (CALLA+) έχουν επίσης καλύτερη πρόγνωση σε σχέση με ασθενείς με Β-ΟΛΛ (CALLA-) ή Τ-ΟΛΛ. Όσον αφορά τον καρυότυπο, η μετατόπιση t(12,21) και η υπερδιπλοειδία είναι ευνοϊκοί δείκτες, ενώ η το χρωμόσωμα Φιλαδέλφεια και ο υποδιπλοειδισμός, δυσμενείς δείκτες. Επιπλέον, ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων στη διάγνωση >50000 κυτ./μL και ο αριθμός των βλαστών την 8^η μέρα >1000 βλάστες/μL (prednisone response) αποτελούν δείκτες κακής πρόγνωσης. Τέλος, ιδιαίτερη σημασία έχει η κατάσταση του μυελού τη 15^η ημέρα, όπου η κατάσταση M1 είναι καλός δείκτης, η M2 μέτριος και η M3 δυσμενής.

Οι παραπάνω δείκτες έχουν βοηθήσει τα τελευταία χρόνια τους επιστήμονες στην κατασκευή και εφαρμογή των κατάλληλων θεραπευτικών προσεγγίσεων. Πιο συγκεκριμένα, ασθενείς που παρουσιάζουν δυσμενείς προγνωστικούς δείκτες απαιτούν πιο ισχυρή και εντατική χημειοθεραπεία, ενώ όσοι εκφράζουν καλύτερους προγνωστικούς δείκτες μπορούν να ακολουθήσουν ηπιότερες θεραπευτικές προσεγγίσεις. Παρόλα αυτά, στις μέρες μας δεν υπάρχουν επαρκείς δείκτες για περιπτώσεις υποτροπής σε ασθενείς με ΟΛΛ. Το ποσοστό των υποτροπών σε ασθενείς με παιδική ΟΛΛ αγγίζει το 15-20% και το προσδόκιμο ζωής τους είναι μόλις μερικοί μήνες. Επιπλέον, πολλά άτομα παρουσιάζουν έντονα φαινόμενα τοξικότητας απέναντι στα διάφορα είδη χημειοθεραπείας, τα οποία μπορούν να αποβούν μοιραία για τον ασθενή. Συνεπώς, καθίσταται αναγκαία στις μέρες μας η εύρεση νέων δεικτών, οι

οποίοι θα μπορούν να παρέχουν δεδομένα για την πιθανότητα υποτροπής των ασθενών, αλλά και για την πιθανότητα εμφάνισης έντονης τοξικότητας στη χημειοθεραπεία.

Οι ριβονουκλεάσες (RNases) ανήκουν στην κατηγορία των νουκλεασών, μόρια τα οποία αποικοδομούν τα RNAs σε μικρότερα τμήματα. Η αποικοδόμηση πραγματοποιείται μέσω υδρόλυσης, διασπώντας τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς μεταξύ των βάσεων του εκάστοτε RNA μορίου. Οι RNases εξυπηρετούν πολλές λειτουργίες στο κύτταρο, αλλά η ρύθμισή τους παραμένει άγνωστη σε πολύ μεγάλο βαθμό. Έχει δειχθεί πως επηρεάζουν την έκφραση mRNAs ογκογονιδίων και παραγόντων νέκρωσης όγκων, ενώ εμπλέκονται και στην έκφραση miRNAs τα οποία με τη σειρά τους ρυθμίζουν την κυκλοφορία/«ζωή» πολλών mRNAs. Έτσι, λοιπόν, οι ριβονουκλεάσες έχουν διττό ρόλο στην καρκινογένεση, καθώς μπορούν να την ευνοήσουν διασπώντας ογκοκατασταλτικά mRNAs, ή να την αποτρέψουν, διασπώντας mRNAs ογκογονιδίων. Τα τελευταία χρόνια, η οικογένεια της RNase κ αποτελεί αντικείμενο μελέτης του εργαστηρίου μας. Παρουσιάζει δράση ενδοριβονουκλεάσης διασπώντας ειδικά μονόκλωνες αλυσίδες σε θέσεις με ApU και ApG φωσφοδιεστερικούς δεσμούς, ενώ υδρολύει σε χαμηλότερο βαθμό UpU δεσμούς. Σε πρόσφατη διπλωματική εργασία από την Πετροπούλου Χριστίνα, επιβεβαιώθηκαν νέα εναλλακτικά μετάγραφα του γονιδίου της RNase κ, που φαίνεται να παρουσιάζουν διαφορετική έκφραση αναλόγως τη μελετούμενη κυτταρική σειρά. Έχοντας ως δεδομένο ότι οι ριβονουκλεάσες εμπλέκονται σε περιπτώσεις καρκινογένεσης, θέλαμε να μελετήσουμε κατά πόσο τα νέα μετάγραφα της RNase κ που βρέθηκαν, παρουσιάζουν τροποποιημένη έκφραση σε ασθενείς με παιδική οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία. Επιπλέον, θελήσαμε να διαπιστωθεί το κατά πόσο αυτά τα μετάγραφα παρουσιάζουν τροποποιημένη έκφραση σε περιπτώσεις υποτροπής. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν τα μετάγραφα 4 και 14, καθώς επίσης και το μετάγραφο 1 του γονιδίου της RNase κ, τόσο σε ασθενείς με παιδική ΟΛΛ, όσο και σε υγιείς δότες. Επιπλέον, η έκφραση των τριών αυτών μεταγράφων συσχετίστηκε με τους διάφορους δυσμενείς ή ευνοϊκούς δείκτες της νόσου, καθώς επίσης και με την επιβίωση των ασθενών (ολική και ελευθέρως νόσου).

Για την υλοποίηση των παραπάνω, συλλέχθηκε ολικό αίμα από 60 ασθενείς με παιδική ΟΛΛ και 40 υγιείς δότες, που χρησιμοποιήθηκαν ως control. Πραγματοποιήθηκε απομόνωση ολικού RNA από μυελό των οστών των δοτών, υπολογίστηκε η συγκέντρωσή του και η καθαρότητά του και συντέθηκε cDNA με RT-

PCR αντίδραση για κάθε δείγμα. Αντίστοιχα, καλλιεργήθηκαν κύτταρα HEK293, από τα οποία επίσης απομονώθηκε ολικό RNA και πραγματοποιήθηκαν οι παραπάνω διαδικασίες, καθώς η κυτταρική σειρά αυτή αποτελούσε το θετικό μάρτυρα. Στη συνέχεια αναπτύχθηκε πρωτόκολλο ποσοτικής real-time PCR αντίδρασης (qPCR) για την ποσοτική ανάλυση της έκφρασης του μεταγράφου 1, του μεταγράφου 4 και του μεταγράφου 14 στα δείγματα cDNA που είχαν παρασκευαστεί. Τα προϊόντα της qPCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης για τον έλεγχο τους, ενώ τα στοιχεία της έκφρασης των μεταγράφων χρησιμοποιήθηκαν για βιοστατιστική ανάλυση με το λογισμικό SPSS (αξιολογήσιμα ήταν τα δεδομένα για 51 ασθενείς και 36 υγιείς).

Όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου 1 του γονιδίου της RNase κ, προκύπτουν στατιστικώς μειωμένα επίπεδα έκφρασης στους ασθενείς την ημέρα της διάγνωσης, σε σχέση με τους υγιείς ($p=0,001$). Επίσης, οι ίδιοι ασθενείς στο τέλος της θεραπείας εφόδου (33^η ημέρα), εμφανίζουν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου αυτού σε σχέση με την ημέρα της διάγνωσης ($p=0,445$). Συγκεκριμένα, από τους 51 ασθενείς, η παρατήρηση αφορά μόνο 10 ζεύγη δειγμάτων, από τους οποίους 6 είχαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης τη μέρα διάγνωσης σε σχέση με την 33^η μέρα και 4, το αντίστροφο. Όσον αφορά τα προαναφερθέντα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, η έκφραση του μεταγράφου 1 του γονιδίου της RNase κ δεν παρουσιάζει κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στα 1-10 έτη και σε ηλικίες μεγαλύτερες των 10, με $p=0,555$, ενώ κατά τη μελέτη του καρυοτύπου επίσης δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις, με $p=0,353$ για την μετατόπιση $t(12,21)$, $p=0,607$ για την υπερδιπλοειδία, $p=0,880$ για τον υποδιπλοειδισμό (2 ασθενείς) και $p=0,822$ για την μετατόπιση $t(9,22)$ (3 ασθενείς). Επιπλέον, το μετάγραφο 1 παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα σε ασθενείς με T-ΟΛΛ σε σχέση με όσους πάσχουν από B-ΟΛΛ, μη στατιστικώς σημαντικά με $p=0,397$ και πιο συγκεκριμένα, η κατηγοριοποίηση των ασθενών σε B-ΟΛΛ/CALLA(+), B-ΟΛΛ/CALLA(-) και T-ΟΛΛ έδειξε πως για τις δύο τελευταίες κατηγορίες, το variant 1 παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα ($p=0,584$). Ακόμα, όσοι ασθενείς παρουσίασαν την ημέρα διάγνωσης τους αριθμό λευκών κυττάρων μεγαλύτερο των 50000, εμφάνισαν και αυξημένα επίπεδα του variant 1 ($p=0,065$). Οι ασθενείς με >1000 βλάστες/ μL την 8^η ημέρα (prednisone response) παρουσίασαν και αυξημένα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου 1 ($p=0,124$) και τη 15^η μέρα, τα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου 1 δεν φαίνονται να παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των κατηγοριών

M1 και M2-M3 ($p=0,445$). Τέλος, βάσει της ομάδας κινδύνου των ασθενών (danger score), το variant 1 φαίνεται να έχει αυξημένη έκφραση, μη στατιστικώς σημαντική ($p=0,315$), για τους ασθενείς υψηλού κινδύνου (high risk).

Εκτός από τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, συσχετίστηκε η έκφραση του μεταγράφου 1 με την επιβίωση των ασθενών, σε καμπύλες Kaplan-Meier. Ορίζοντας ως cut-off το 40^ο τεταρτημόριο, οι ασθενείς που υπερεκφράζουν το μετάγραφο 1 έχουν μια τάση για αυξημένο κίνδυνο υποτροπής. Πιο συγκεκριμένα, από τους 50 ασθενείς, οι 20 υποεκφράζουν το κλασικό μετάγραφο, με 3 γεγονότα υποτροπής, ενώ οι 30 το υπερεκφράζουν με 6 γεγονότα υποτροπής. Η μέση επιβίωση των ασθενών χωρίς υποτροπή, που έχουν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου 1 είναι 104 μήνες, ενώ όσοι έχουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου αυτού, επιβιώνουν χωρίς υποτροπή για 95 μήνες ($p=0,463$). Επίσης όσοι υπερεκφράζουν το μετάγραφο 1 φαίνεται να έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο θανάτου, με $p=0,400$, καθώς από τους 50 ασθενείς, οι 20 που έχουν υποεκφρασμένο το μετάγραφο 1 παρουσίασαν 3 θανάτους, ενώ οι 30 που το υπερεκφράζουν παρουσίασαν 7 γεγονότα θανάτου. Η μέση ολική επιβίωση των ασθενών με χαμηλότερα επίπεδα του μεταγράφου 1 ανέρχεται στους 105 μήνες, ενώ των ασθενών με υψηλότερα επίπεδα έκφρασής του, στους 94 μήνες. Επιπρόσθετα στην παραπάνω ανάλυση, λειτούργησε η ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox. Όσον αφορά την επιβίωση χωρίς υποτροπή, οι ασθενείς που υπερεκφράζουν το μετάγραφο 1 παρουσιάζουν πιο αυξημένο κίνδυνο υποτροπής σε σχέση με τους ασθενείς που το υπόεκφράζουν, στο ίδιο χρονικό διάστημα (HR=1,670 με $p=0,469$). Αντίστοιχα, για την ολική επιβίωση, οι ασθενείς που υπερεκφράζουν το μετάγραφο 1 παρουσιάζουν 1,770 φορές πιο αυξημένο κίνδυνο θανάτου, σε σχέση με όσους το υποεκφράζουν, για το ίδιο χρονικό διάστημα (HR=1,770 με $p=0,408$).

Στη συνέχεια, μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου 4 του γονιδίου της RNase κ. Από τη στατιστική ανάλυση προκύπτει ότι το μετάγραφο 4 παρουσιάζει στατιστικώς μειωμένα επίπεδα στους ασθενείς την ημέρα της διάγνωσης, σε σχέση με τους υγιείς ($p=0,012$). Επιπλέον, για τα 12 ζεύγη ασθενών που υπήρχε υλικό την ημέρα διάγνωσης και την 33^η ημέρα, εμφανίζονται χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου αυτού για την 33^η ημέρα σε σχέση με την ημέρα της διάγνωσης ($p=0,272$). Συγκεκριμένα, 7 ασθενείς παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης τη μέρα διάγνωσης σε σχέση με την 33^η μέρα και 5, το αντίστροφο. Η

ανάλυση της έκφρασης του μεταγράφου 4 συναρτήσει των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών έδειξε ότι όσον αφορά την ηλικία διάγνωσης των ασθενών, δεν υπάρχει κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στα 1-10 έτη και σε ηλικίες μεγαλύτερες των 10 ετών), με $p=0,616$. Επιπλέον, κατά τη μελέτη του καρυοτύπου δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις για την μετατόπιση t(12,21) ($p=0,710$), για την υπερδιπλοειδία ($p=0,615$) και για τον υποδιπλοειδισμό ($p=0,843$). Για τη μετατόπιση t(9,22), το μετάγραφο 4 φαίνεται να παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα έκφρασης στους ασθενείς του τη φέρουν ($p=0,230$). Ακόμα, το μετάγραφο 4 παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα σε ασθενείς με T-ΟΛΛ σε σχέση με όσους πάσχουν από B-ΟΛΛ, μη στατιστικώς σημαντικά με $p=0,254$ και πιο συγκεκριμένα, η κατηγοριοποίηση των ασθενών σε B-ΟΛΛ/CALLA(+), B-ΟΛΛ/CALLA(-) και T-ΟΛΛ έδειξε πως για τις δύο τελευταίες κατηγορίες, το variant 4 παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα ($p=0,383$). Επιπλέον, όσοι ασθενείς παρουσίασαν την ημέρα διάγνωσης τους αριθμό λευκών κυττάρων μεγαλύτερο των 50000, δεν εμφάνισαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές της έκφρασης του μεταγράφου αυτού με τους ασθενείς που είχαν $WBC < 50000$ ($p=0,604$). Οι ασθενείς με >1000 βλάστες/ μL την 8^η ημέρα (prednisone response) παρουσίασαν και αυξημένα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου 4 ($p=0,293$) και τη 15^η μέρα, τα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου 4 δεν φαίνονται να παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των κατηγοριών M1 και M2-M3 ($p=0,812$). Τέλος, βάσει της ομάδας κινδύνου των ασθενών (danger score), το variant 4 φαίνεται να έχει αυξημένη έκφραση, μη στατιστικώς σημαντική ($p=0,407$), για τους ασθενείς υψηλού κινδύνου (high risk).

Όπως και στο μετάγραφο 1, έγινε συσχέτιση της έκφρασης του μεταγράφου 4 με την επιβίωση των ασθενών με παιδική ΟΛΛ, μέσω των καμπύλων Kaplan-Meier. Ορίζοντας ως cut-off τη διάμεσο, οι ασθενείς που υπερεκφράζουν το μετάγραφο 4 έχουν μια τάση για αυξημένο κίνδυνο υποτροπής. Πιο συγκεκριμένα, από τους 51 ασθενείς, οι 26 υποεκφράζουν το μετάγραφο 4, με 3 γεγονότα υποτροπής, ενώ οι 25 το υπερεκφράζουν με 6 γεγονότα υποτροπής. Η μέση επιβίωση των ασθενών χωρίς υποτροπή, που έχουν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου 4 είναι 105,5 μήνες, ενώ όσοι έχουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου αυτού, επιβιώνουν χωρίς υποτροπή για 92 μήνες ($p=0,240$). Όσον αφορά την ολική επιβίωση των ασθενών με παιδική ΟΛΛ, δε φαίνεται να υπάρχει έντονη συσχέτιση του κινδύνου θανάτου με την υπερέκφραση ή υποέκφραση του μεταγράφου 4 ($p=0,684$).

Συγκεκριμένα, από τους 51 ασθενείς, οι 26 που έχουν υποεκφρασμένο το μετάγραφο 4 παρουσίασαν 5 θανάτους, ενώ οι 25 που το υπερεκφράζουν παρουσίασαν 6 γεγονότα θανάτου. Η μέση ολική επιβίωση των ασθενών με χαμηλότερα επίπεδα του μεταγράφου 4 ανέρχεται στους 98 μήνες, ενώ των ασθενών με υψηλότερα επίπεδα έκφρασής του, στους 94,5 μήνες. Επιπρόσθετα στην παραπάνω ανάλυση, λειτούργησε η ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox. Όσον αφορά την επιβίωση χωρίς υποτροπή, οι ασθενείς που υπερεκφράζουν το μετάγραφο 4 παρουσιάζουν πιο αυξημένο κίνδυνο υποτροπής σε σχέση με τους ασθενείς που το υπόεκφράζουν, στο ίδιο χρονικό διάστημα (HR=2,240 με $p=0,254$). Αντίστοιχα, όσον αφορά την ολική επιβίωση, οι ασθενείς που υπερεκφράζουν το μετάγραφο 4 παρουσιάζουν πιο αυξημένο κίνδυνο θανάτου, σε σχέση με όσους το υποεκφράζουν, για το ίδιο χρονικό διάστημα (HR=1,278 με $p=0,686$).

Τέλος, μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου 14 του γονιδίου της RNase κ. Από τη στατιστική ανάλυση προκύπτει ότι το μετάγραφο 14 παρουσιάζει στατιστικώς μειωμένα επίπεδα στους ασθενείς την ημέρα της διάγνωσης, σε σχέση με τους υγιείς ($p<0,001$). Επιπλέον, για τα 12 ζεύγη ασθενών που υπήρχε υλικό την ημέρα διάγνωσης και την 33^η ημέρα, εμφανίζονται χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου αυτού για την 33^η ημέρα σε σχέση με την ημέρα της διάγνωσης ($p=0,117$). Συγκεκριμένα, 9 ασθενείς είχαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης τη μέρα διάγνωσης σε σχέση με την 33^η μέρα και 3, το αντίστροφο. Η ανάλυση της έκφρασης του μεταγράφου 14 συναρτήσει των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών έδειξε ότι όσον αφορά την ηλικία διάγνωσης των ασθενών, δεν υπάρχει κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στα 1-10 έτη και σε ηλικίες μεγαλύτερες των 10 ετών), με $p=0,877$. Επιπλέον, κατά τη μελέτη του καρυοτύπου δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις για την μετατόπιση t(12,21) ($p=0,907$), για την υπερδιπλοειδία ($p=0,957$) και για τον υποδιπλοειδισμό ($p=0,921$). Για τη μετατόπιση t(9,22), το μετάγραφο 14 φαίνεται να παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα έκφρασης στους ασθενείς του τη φέρουν ($p=0,150$). Ακόμα, το μετάγραφο 14 παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα σε ασθενείς με T-OΛΛ σε σχέση με όσους πάσχουν από B-OΛΛ, μη στατιστικώς σημαντικά με $p=0,177$ και πιο συγκεκριμένα, η κατηγοριοποίηση των ασθενών σε B-OΛΛ/CALLA(+), B-OΛΛ/CALLA(-) και T-OΛΛ έδειξε πως για τις δύο τελευταίες κατηγορίες, το variant 14 παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα ($p=0,304$). Επιπλέον, όσοι ασθενείς παρουσίασαν την ημέρα διάγνωσης τους αριθμό λευκών κυττάρων μεγαλύτερο των 50000, δεν

εμφάνισαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές της έκφρασης του μεταγράφου αυτού με τους ασθενείς που είχαν $WBC < 50000$ ($p=0,449$). Οι ασθενείς με >1000 βλάστες/ μL την 8^η ημέρα (prednisone response) παρουσίασαν και αυξημένα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου 14 ($p=0,420$) και τη 15^η μέρα, τα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου 14 δεν φαίνονται να παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των κατηγοριών M1 και M2-M3 ($p=0,489$). Τέλος, της ομάδας κινδύνου των ασθενών (danger score), το variant 14 φαίνεται να έχει αυξημένη έκφραση, μη στατιστικώς σημαντική ($p=0,066$), για τους ασθενείς υψηλού κινδύνου (high risk).

Όπως και στο μετάγραφο 1 και στο μετάγραφο 4, έγινε συσχέτιση της έκφρασης του μεταγράφου 14 με την επιβίωση των ασθενών με παιδική ΟΛΛ, μέσω των καμπύλων Kaplan-Meier. Ορίζοντας ως cut-off τη διάμεσο, οι ασθενείς που υπερεκφράζουν το μετάγραφο 14 έχουν μια τάση για αυξημένο κίνδυνο υποτροπής. Συγκεκριμένα, από τους 51 ασθενείς, οι 25 υποεκφράζουν το μετάγραφο 14, με 3 γεγονότα υποτροπής, ενώ οι 26 το υπερεκφράζουν με 6 γεγονότα υποτροπής. Η μέση επιβίωση των ασθενών χωρίς υποτροπή, που έχουν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου 14 είναι 105 μήνες, ενώ όσοι έχουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου αυτού, επιβιώνουν χωρίς υποτροπή για 93 μήνες ($p=0,286$). Όσον αφορά την ολική επιβίωση των ασθενών με παιδική ΟΛΛ, δε φαίνεται να υπάρχει έντονη συσχέτιση του κινδύνου θανάτου με την υπερέκφραση ή υποέκφραση του μεταγράφου 14 ($p=0,757$). Συγκεκριμένα, από τους 51 ασθενείς, οι 25 που έχουν υποεκφρασμένο το μετάγραφο 14 παρουσίασαν 5 θανάτους, ενώ οι 26 που το υπερεκφράζουν παρουσίασαν 6 γεγονότα θανάτου. Η μέση ολική επιβίωση των ασθενών με χαμηλότερα επίπεδα του μεταγράφου 14 ανέρχεται στους 97 μήνες, ενώ των ασθενών με υψηλότερα επίπεδα έκφρασής του, στους 95 μήνες. Επιπρόσθετα στην παραπάνω ανάλυση, λειτούργησε η ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox. Όσον αφορά την επιβίωση χωρίς υποτροπή, οι ασθενείς που υπερεκφράζουν το μετάγραφο 14 έχουν πιο αυξημένο κίνδυνο υποτροπής σε σχέση με τους ασθενείς που το υποεκφράζουν ($HR=2,089$ με $p=0,298$). Αντίστοιχα, όσον αφορά την ολική επιβίωση, οι ασθενείς που υπερεκφράζουν το μετάγραφο 14 παρουσιάζουν πιο αυξημένο κίνδυνο θανάτου, σε σχέση με όσους το υποεκφράζουν, για το ίδιο χρονικό διάστημα ($HR=1,205$ με $p=0,759$).

Πριν μελετηθεί η ποσοτική έκφραση των παραπάνω μεταγράφων και γίνει η συσχέτιση αυτών με τους διάφορους προγνωστικούς δείκτες, πραγματοποιήθηκε μια

μελέτη της συσχέτισης της έκφρασης των τριών μεταγράφων μεταξύ τους. Από την ανάλυση κατά Spearman φαίνεται μια θετική συσχέτιση και των τριών μεταγράφων, όπου καλύτερη συσχέτιση παρουσιάζεται μεταξύ των μεταγράφων 4 και 14. Ο συντελεστής συσχέτισής του είναι $r_s=0,808$ με $p<0,001$. Αντίστοιχα, το κλασικό μετάγραφο με το μετάγραφο 4 παρουσιάζει $r_s=0,274$, $p=0,054$ και το κλασικό μετάγραφο με το μετάγραφο 14 έχει $r_s=0,409$, $p=0,003$.

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΝΕΩΝ
ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ RNase
κ ΣΕ ΛΕΥΧΑΙΜΙΕΣ**

Μεϊντάνη Αγγελική

Ερευνητική Εργασία Διπλώματος Ειδίκευσης

Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΟΛΛ) είναι μια μορφή κακοήθους νεοπλασματος των λεμφοκυττάρων που χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση ανώριμων κυττάρων αίματος στο μυελό των οστών. Οι οξείες λευχαιμίες αποτελούν στις μέρες από τις πιο σημαντικές κακοήθειες νόσους, με την ΟΛΛ να έχει τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης μεταξύ των παιδιών ηλικίας 2 και 5 ετών. Πολλοί δείκτες χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση και τη διαφοροδιάγνωσή της. Οι ριβονουκλεάσες ανήκουν στην κατηγορία των νουκλεασών, μόρια τα οποία αποικοδομούν τα RNAs σε μικρότερα τμήματα και έχει αποδειχτεί τα τελευταία χρόνια η συμμετοχή τους πολλές περιπτώσεις καρκινογέννεσης. Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη των επιπέδων έκφρασης των μεταγράφων 1, 4 και 14 του γονιδίου της ριβονουκλεάσης κ σε περιπτώσεις ασθενών με παιδική ΟΛΛ. Συνολικά μελετήθηκαν 60 ασθενείς με παιδική ΟΛΛ και 40 υγιείς δότες (control), από τους οποίους απομονώθηκε ολικό RNA από δείγματα μυελού των οστών και συντέθηκε cDNA με την αντίδραση της RT-PCR. Η μελέτη των επιπέδων έκφρασης των τριών μεταγράφων πραγματοποιήθηκε με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (quantitative real-time PCR; qPCR), με τη χρήση της χρωστικής SYBR-Green I και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων για τη συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά και την επιβίωση των ασθενών.

Τα αποτελέσματα της μελέτης αποδεικνύουν ότι τα επίπεδα έκφρασης των τριών μεταγράφων είναι μειωμένα στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς ($p_1=0,001$, $p_{v4}=0,012$, $p_{v14}<0,001$). Το μετάγραφο 1, παρουσιάζει αυξημένη έκφραση παρουσία δυσμενών δεικτών, όπως ο φαινότυπος B-ALL/CALLA (-) και T-ALL ($p_{clas}=0,564$), ο αριθμός λευκών $WBC>50.000$ cells/ μL ($p_{clas}=0,065$) και η prednisone response την 8^η μέρα με >1000 βλάστες/ μL ($p_{clas}=0,124$). Αντίστοιχα, το μετάγραφο 4 παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα έκφρασης παρουσία των δυσμενών δεικτών B-ALL/CALLA (-) και T-ALL ($p_{v4}=0,383$), του Φιλαδέλφεια χρωμοσώματος ($p_{v4}=0,230$) και της prednisone response την 8^η μέρα με >1000 βλάστες/ μL ($p_{v4}=0,293$). Τέλος, το μετάγραφο 14 υπερεκφράζεται παρουσία των ίδιων δεικτών, δηλαδή του φαινοτύπου B-ALL/CALLA (-) και T-ALL ($p_{v14}=0,304$), του Φιλαδέλφεια χρωμοσώματος ($p_{v14}=0,150$) και της prednisone response την 8^η μέρα με >1000 βλάστες/ μL ($p_{v14}=0,420$). Όπως φαίνεται τα μετάγραφα 4 και 14 ακολουθούν παρόμοιο μοτίβο έκφρασης συγκριτικά με τα κλινικοπαθολογικά δεδομένα των ασθενών, το οποίο αποδεικνύεται και από την ανάλυση συσχέτισης κατά Spearman ($r_s=0,808$, $p<0,001$).

Η ανάλυση επιβίωσης μέσω Kaplan-Meier καμπυλών επιβίωσης και ανάλυσης παλινδρόμησης κατά Cox δείχνουν ότι όσοι ασθενείς υπερεκφράζουν το μετάγραφο 1 εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο θανάτου και υποτροπής (HR=1,670 με $p=0,469$ για υποτροπή και HR=1,770 με $p=0,408$ για θάνατο), ενώ όσοι ασθενείς υπερεκφράζουν τα μετάγραφα 4 και 14 έχουν αυξημένο κίνδυνο θανάτου (HR=2,240 με $p=0,254$ και για το μετάγραφο 4 και HR=2,089 με $p=0,298$ για το μετάγραφο 14).

Συμπερασματικά, τα επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων 1, 4 και 14 μπορούν να παρέχουν πληροφορίες ως προς την πιθανότητα εμφάνισης υποτροπής σε ασθενείς με παιδική ΟΛΛ και να συσχετισθούν με διάφορους δυσμενείς προγνωστικούς δείκτες. Σημαντικό είναι να αναφερθεί πως τα περισσότερα αποτελέσματα δεν είναι στατιστικώς σημαντικά, λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων που αναλύθηκαν και για αυτό καθίσταται ανάγκη ανάλυσης περισσότερων δειγμάτων για πιο αξιόπιστα αποτελέσματα.

STUDY OF EXPRESSION LEVELS OF NEW ALTERNATIVE VARIANTS OF THE RNase κ GENE IN LEYKEMIAS

Meintani Angeliki

Master Thesis

Faculty of Biology, N.K.U.A.

ABSTRACT

Acute lymphocytic leukemia (ALL) is a form of a malignant neoplasm of lymphocytes, characterized by the accumulation of immature blood cells in the bone marrow. Acute leukemias are nowadays one of the most important malignant diseases, with ALL having the highest incidence rate among children aged between 2 and 5 years. Many markers are used to diagnose this disease. Ribonucleases belong to the nuclease class, which means they are molecules that degrade RNAs in smaller segments, and it has been proved that they have a crucial role in some carcinogenic events. The purpose of this postgraduate thesis is to study the expression levels of three new transcripts of the ribonuclease κ gene, in cases of children with ALL. In total, 60 patients with childhood ALL and 40 healthy controls were studied, from which total RNA was extracted from marrow samples and cDNA was synthesized by the RT-PCR reaction. The study of expression levels of the three transcripts (the 1st, the 4th and the 14th variant) was performed by quantitative real-time PCR (qPCR) analysis using the SYBR-Green I dye and then a statistical analysis took place in order to correlate the expression levels of these variants with the clinical/pathological characteristics of each patient and their survival.

The results of the study demonstrate that the expression levels of the three transcripts are reduced in patients in comparison with the healthy ($p_1=0.001$, $p_{v4}=0.012$, $p_{v14}<0.001$). As for the first transcript, it exhibits increased expression in the presence of unfavorable markers such as the B-ALL/CALLA(-) and T-ALL phenotype ($p_1=0.564$), WBC>50.000 cells/ μ L and prednisone response >1000 blasts/ μ L ($p_{clas} = 0.124$). Correspondingly, transcript 4 shows elevated levels of expression in the presence of the B-ALL/CALLA(-) and T-ALL ($p_{v4}=0.383$), Philadelphia chromosome

($p_{v4}=0.230$) and prednisone response >1000 blasts / μ L ($p_{v4}=0.293$). Finally, transcript 14 is overexpressed in the presence of the same markers, namely the B-ALL/CALLA (-) and T-ALL phenotype ($p_{v14}=0.304$), Philadelphia chromosome ($p_{v14}=0.150$) and prednisone response >1000 blasts/ μ L ($p_{v14}=0.420$). As we can see, transcripts 4 and 14 follow a similar pattern of expression compared to patients' clinical and pathological data, as evidenced by Spearman's correlation analysis ($r_s = 0.808$, $p < 0.001$).

Kaplan Meier survival analysis and Cox regression analysis show that those patients that are over-expressing the first transcript have an increased risk of death and relapse (HR=1,670, $p=0,469$ for DFS and HR=1,770, $p = 0.408$ for OS), whereas patients overexpressing transcripts 4 and 14 have an increased risk of death (HR= 2.240, $p=0.254$ for transcript 4 and HR=2,089, $p=0,298$ for transcript 14).

In conclusion, expression levels of the three transcripts, 1, 4 and 14, may provide information on the likelihood of relapse in patients with childhood ALL and can be correlated with various poor prognostic markers. It is important to note that most results are not statistically significant due to the small number of samples analyzed and this is the reason why a bigger amount of patients must be analyzed, in order to provide more reliable results.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. https://www.nature.com/subjects/leukaemia?WT.ac=search_subjects_leukaemia, (τελευταία επίσκεψη Ιούλιος 2018)
2. <https://www.leukaemiacare.org.uk/support-and-information/information-about-blood-cancer/blood-cancer-information/leukaemia/>, (τελευταία επίσκεψη Ιούλιος 2018)
3. http://www.reddlegg.com/Leukemia/leukemia_overview.htm, (τελευταία επίσκεψη Ιούλιος 2018)
4. Yaoyu Chen¹, Cong Peng, Dongguang Li and Shaoguang Li, 2009, Molecular and cellular bases of chronic myeloid leukemia, *Protein Cell*, **1(2)**: 124–132
5. <http://idelhema.gr/wp-content/uploads/2016/11/Hronia-Myelogenisi-Leukaimia.pdf>, (τελευταία επίσκεψη Ιούλιος 2018)
6. Hong Zhou and Rongzhen Xu, 2015, Leukemia stem cells: the root of chronic myeloid leukemia, *Protein Cell*, **6(6)**: 403–412.
7. Morris CM, 2011, Chronic myeloid leukemia: cytogenetic methods and applications for diagnosis and treatment, *Methods Mol Biol.*, **730**:33-61.
8. <https://www.cancer.org/cancer/chronic-myeloid-leukemia/treating/treating-by-phase.html>, (τελευταία επίσκεψη Ιούλιος 2018)
9. <http://idelhema.gr/wp-content/uploads/2016/11/Hronia-Lemfokyttarik-Leukaimia.pdf>, (τελευταία επίσκεψη Ιούλιος 2018)
10. Jan A. Burger and Nicholas Chiorazzi, 2013, B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia, *Trends Immunol*, **34(12)**: 592–601
11. Elisa ten Hacken and Jan A. Burger, 2016, Microenvironment interactions and B-cell receptor signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia: implications for disease pathogenesis and treatment, *Biochim Biophys Acta.*, **1863(3)**: 401–413.
12. Margaret R. O'Donnell, Camille N. Abboud, Jessica Altman, Frederick R. Appelbaum, Daniel A. Arber, Eyal Attar, Uma Borate, Steven E. Coutre, Lloyd E. Damon, Salil Goorha, Jeffrey Lancet, Lori J. Maness, Guido Marcucci, Michael M. Millenson, Joseph O. Moore, Farhad Ravandi, Paul J. Shami, B. Douglas Smith, Richard M. Stone, Stephen A. Strickland, Martin S. Tallman, Eunice S. Wang, Maoko Naganuma, and Kristina M. Gregory, 2012, Acute Myeloid Leukemia, *J Natl Compr Canc Netw*, **10**:984-1021
13. Hartmut Döhner, Daniel J. Weisdorf, and Clara D. Bloomfield, 2015, Acute Myeloid Leukemia, *New Engl J Med* **373**:12

14. <https://www.medlook.net/%CE%9B%CE%B5%CF%85%CF%87%CE%B1%CE%B9%CE%BC%CE%AF%CE%B1/2946.html>, (τελευταία επίσκεψη Ιούλιος 2018)
15. Richard A. Larson and John Anastasi, *Acute Leukemias*, Springer Berlin Heidelberg New York, 2008, pp. 109-118
16. Gur H, Koren V, Ehrenfeld M, Ben-Bassat I and Sidi Y, 1999, Rheumatic manifestations preceding adult acute leukemia: Characteristics and implication in course and prognosis., *Acta Haematol*, **101(1)**:1–6
17. Farhi DC and Rosenthal NS, 2000, Acute lymphoblastic leukemia. *Clin Lab Med*, **20(1)**:17–28, vii
18. <https://www.news-medical.net/health/Acute-Lymphoblastic-Leukemia-Classification.aspx>, (τελευταία επίσκεψη Ιούλιος 2018)
19. Sabina Chiaretti and Robin Foà, 2009, T-cell acute lymphoblastic leukemia, *Haematologica*, **94(2)**
20. M. James You, L. Jeffrey Medeiros and Eric D. Hsi, 2015, T-Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma, *American Journal of Clinical Pathology*, **144(3)**:411-422
21. Van Vlierberghe P. and Ferrando A., 2012, The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia., *J Clin Invest* ., **122**:3398–3406.
22. Roti G. and Stegmaier K., 2011, Targeting NOTCH1 in hematopoietic malignancy., *Crit Rev Oncog.*, **16**:103–115.
23. Weng AP., Ferrando AA., Lee W et al., 2004, Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia., *Science*, **306**:269–271.
24. Fogelstrand L., Staffas A., Wasslavik C et al., 2014, Prognostic implications of mutations in NOTCH1 and FBXW7 in childhood T-ALL treated according to the NOPHO ALL-1992 and ALL-2000 protocols. *Pediatr Blood Cancer*, **61**:424–430.
25. Wakeford R., 2008, Childhood leukaemia following medical diagnostic exposure to ionizing radiation in utero or after birth., *Radiat Prot Dosimetry*, **132(2)**:166-74
26. Kristina Karrman and Bertil Johansson, 2016, *Pediatric T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia*, John Wiley & Sons, pp 1-81
27. Karrman K, Forestier E, Heyman M, Andersen MK, Autio K, Blennow E, Borgström G, Ehrencrona H, Golovleva I, Heim S, Heinonen K, Hovland R, Johannsson JH, Kerndrup G, Nordgren A, Palmqvist L, Johansson B; Nordic

- Society of Pediatric Hematology, Oncology (NOPHO); Swedish Cytogenetic Leukemia Study Group (SCLSG); NOPHO Leukemia Cytogenetic Study Group (NLCSG)., 2009, Clinical and cytogenetic features of a population-based consecutive series of 285 pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemias: rare T-cell receptor gene rearrangements are associated with poor outcome., *Genes Chromosomes Cancer.*, **48(9)**:795-805
28. Deepa Bhojwani, Jun J. Yang, and Ching-Hon Pui, 2015, Biology of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia, *Pediatr Clin North Am.*, **62(1)**: 47–60
 29. Sarah K Tasian, Mignon L Loh, and Stephen P Hunger, 2015, Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Integrating Genomics into Therapy, *Cancer*, **121(20)**: 3577–3590.
 30. Sanam Loghavi, Jeffery L. Kutok and Jeffrey L. Jorgensen, 2015, B-Acute Lymphoblastic Leukemia/Lymphoblastic Lymphoma, *American Journal of Clinical Pathology*, **144(3)**:393–410
 31. Cesar Cobaleda and Isidro Sa´nchez-Garcia, 2009, B-cell acute lymphoblastic leukaemia: towards understanding its cellular origin, *BioEssays* **31**:600–609
 32. Charles G. Mullighan, 2012, Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia, *J Clin Invest.*, **122(10)**: 3407–3415.
 33. Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR., 1996, AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell.*, **84(2)**:321–330.
 34. Wang LC, Kuo F, Fujiwara Y, Gilliland DG, Golub TR, Orkin SH., 1997, Yolk sac angiogenic defect and intra-embryonic apoptosis in mice lacking the Ets-related factor TEL. *EMBO J.*, **16(14)**:4374–4383
 35. Hiebert SW, et al., 1996, The t(12;21) translocation converts AML-1B from an activator to a repressor of transcription. *Mol Cell Biol.*, **16(4)**:1349–1355.
 36. Torrano V, Procter J, Cardus P, Greaves M, Ford AM., 2011, ETV6-RUNX1 promotes survival of early B lineage progenitor cells via a dysregulated erythropoietin receptor. *Blood.*, **118(18)**:4910–4918.
 37. Zhuang Y, Soriano P, Weintraub H., 1994, The helix-loop-helix gene E2A is required for B cell formation., *Cell.*, **79(5)**:875–884.
 38. Bain G, et al., 1997, E2A deficiency leads to abnormalities in alphabeta T-cell development and to rapid development of T-cell lymphomas., *Mol Cell Biol.* **17(8)**:4782–4791.

39. Sanyal M, et al., 2007, B-cell development fails in the absence of the Pbx1 proto-oncogene., *Blood*. **109(10)**:4191–4199.
40. Lu Q. and Kamps MP., 1997, Heterodimerization of Hox proteins with Pbx1 and oncoprotein E2a-Pbx1 generates unique DNA-binding specificities at nucleotides predicted to contact the N-terminal arm of the Hox homeodomain- demonstration of Hox-dependent targeting of E2a-Pbx1 in vivo., *Oncogene*., **14(1)**:75–83.
41. Mullighan CG, et al., 2008, BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros., *Nature*., **453(7191)**:110–114.
42. Iacobucci I, et al., 2009, Identification and molecular characterization of recurrent genomic deletions on 7p12 in the IKZF1 gene in a large cohort of BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia patients: on behalf of Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto Acute Leukemia Working Party (GIMEMA AL WP)., *Blood*., **114(10)**:2159–2167.
43. Georgopoulos K, et al., 1994, The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell*., **79(1)**:143–156.
44. Molnar A and Georgopoulos K., 1994, The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins., *Mol Cell Biol*., **14(12)**:8292–8303
45. Chessells JM, et al., 2002, Clinical features, cytogenetics and outcome in acute lymphoblastic and myeloid leukaemia of infancy: report from the MRC Childhood Leukaemia working party., *Leukemia*., **16(5)**:776–784
46. Moorman AV, et al., 2005, No prognostic effect of additional chromosomal abnormalities in children with acute lymphoblastic leukemia and 11q23 abnormalities., *Leukemia*., **19(4)**:557–563.
47. Mullighan CG, Phillips LA, Su X, et al., 2008, Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia., *Science*., **322**:1377–1380.
48. Ma X, Edmonson M, Yergeau D, et al., 2015, Rise and fall of subclones from diagnosis to relapse in pediatric B-acute lymphoblastic leukaemia., *Nat Commun*., **6**
49. Yang JJ, Cheng C, Yang W, et al., 2009, Genome-wide interrogation of germline genetic variation associated with treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia., *JAMA*., **301**:393–403.

50. Mullighan CG, Zhang J, Kasper LH, et al., 2011, CREBBP mutations in relapsed acute lymphoblastic leukaemia., *Nature*, **471**:235–239
51. Malinowska-Ozdowy K, Frech C, Schonegger A, et al., 2015, KRAS and CREBBP mutations: a relapse-linked malicious liaison in childhood high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia., *Leukemia*.
52. Tzoneva G, Perez-Garcia A, Carpenter Z, et al., 2013, Activating mutations in the NT5C2 nucleotidase gene drive chemotherapy resistance in relapsed ALL., *Nat Med.*, **19**:368–371.
53. Meyer JA, Wang J, Hogan LE, et al., 2013, Relapse-specific mutations in NT5C2 in childhood acute lymphoblastic leukemia., *Nat Genet.*, **45**:290–294.
54. Yang JJ, Bhojwani D, Yang W, et al., 2008, Genome-wide copy number profiling reveals molecular evolution from diagnosis to relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia., *Blood.*, **112**:4178–4183.
55. Mar BG, Bullinger LB, McLean KM, et al., 2014, Mutations in epigenetic regulators including SETD2 are gained during relapse in paediatric acute lymphoblastic leukaemia., *Nat Commun.*, **5**:3469.
56. Bhatla T, Jones CL, Meyer JA, Vitanza NA, Raetz EA, Carroll WL., 2014, The biology of relapsed acute lymphoblastic leukemia: opportunities for therapeutic interventions., *J Pediatr Hematol Oncol.*, **36**:413–418.
57. ALL IC-BFM 2009 – TRIAL STEERING COMMITTEE, 2009, A Randomized Trial of the I-BFM-SG for the Management of Childhood non-B Acute Lymphoblastic Leukemia.
58. Jonathan Houseley and David Tollervey, 2009, The Many Pathways of RNA Degradation, *Cell* **136**: 763–776
59. <http://agscientific.com/blog/2017/02/17-need-to-know-facts-about-rnase-a/>, (τελευταία επίσκεψη Ιούλιος 2018)
60. Cooper GM., *The Cell: A Molecular Approach.*, Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2nd edition., 2000
61. Allen W. Nicholson, 1999, Function, mechanism and regulation of bacterial ribonucleases, *FEMS Microbiology Reviews*, **23**:371-390
62. Kimberly A. Dickson, Marcia C. Haigis, and Ronald T. Raines, 2005, Ribonuclease Inhibitor: Structure and Function, *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.*, **80**:349–374

63. Zhongwei Li and Murray P. Deutscher, 2004, Exoribonucleases and Endoribonucleases, *EcoSalPlus*
64. Cecilia M. Arraiano, Jose M. Andrade, Susana Domingues, Ines B. Guinote, Michal Malecki, Rute G. Matos, Ricardo N. Moreira, Vania Pobre, Filipa P. Reis, Margarida Saramago, Ines J. Silva and Sandra C. Viegas, 2010, The critical role of RNA processing and degradation in the control of gene expression, *FEMS Microbiol Rev.*, **34**:883–923
65. Wai Ming Li, Tavish Barnes and Chow H. Lee., 2010, Endoribonucleases – enzymes gaining spotlight in mRNA metabolism, *FEBS Journal*, **277**:627–641
66. Yuhong Zuo and Murray P. Deutscher, 2001, Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution, *Nucleic Acids Res.*, **29(5)**: 1017–1026
67. Diamantis C. Sideris and Emmanuel G. Fragoulis, 1987, Purification and characterization of a ribonuclease specific for poly(U) and poly(C) from the larvae of *Ceratitis capitata*, *Eur. J. Biochem.*, **264**:309-315
68. Theodoros N. Rampias, Emmanuel G. Fragoulis and Diamantis C. Sideris, 2008, Genomic structure and expression analysis of the RNase κ family ortholog gene in the insect *Ceratitis capitata*, *FEBS Journal*, **275**:6217–6227
69. Theodoros N. Rampias, Diamantis C. Sideris and Emmanuel G. Fragoulis, 2003, Cc RNase: the *Ceratitis capitata* ortholog of a novel highly conserved protein family in metazoans, *Nucleic Acids Research*, **31(12)**: 3092-3100
70. Marie-angela I. Economopoulou, Emmanuel G. Fragoulis and Diamantis C. Sideris, 2007, Molecular cloning and characterization of the human RNase κ , an ortholog of Cc RNase, *Nucleic Acids Research*, **35(19)**:6389–6398
71. Marianna N. Kiritsi, Emmanuel G. Fragoulis and Diamantis C. Sideris, 2012, Essential cysteine residues for human RNase κ catalytic activity, *FEBS Journal*, **279**:1318–1326
72. Evangelos D. Karousis and Diamantis C. Sideris, 2014, A Subtle Alternative Splicing Event Gives Rise to a Widely Expressed Human RNase κ Isoform, *PLOS ONE*, 9(5)
73. Brent A. Hackett, Ari Yasunaga, Debasis Panda, Michael A. Tartell, Kaycie C. Hopkins, Scott E. Hensley and Sara Cherrya, 2015, RNASEK is required for internalization of diverse acid-dependent viruses, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **112(25)**:7797–7802

74. Jill M. Perreira, Aaron M. Aker, George Savidis, ..., Annick Gauthier, Michael Franti, Abraham L. Brass, 2015, RNASEK Is a V-ATPase-Associated Factor Required for Endocytosis and the Replication of Rhinovirus, Influenza A Virus, and Dengue Virus, *Cell Reports*, **12**:850–863
75. Wan-Cheol Kim and Chow H. Lee, 2009, The role of mammalian ribonucleases (RNases) in cancer, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1796**: 99–113
76. E. Suswam, Y. Li, X. Zhang, G.Y. Gillespie, X. Li, J.J. Shacka, L. Lu, L. Zheng and P.H. King, 2008, Tristetraprolin down-regulates interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in malignant glioma cells, *Cancer Res.*, **68**:674–682.
77. K. Zhang, N. Dion, B. Fuchs, T. Damron, S. Gitelis, R. Irwin, M. O'Connor, H. Schwartz, S.P. Scully, M.G. Rock, M.E. Bolander and G. Sarkar, 2002 The human homolog of yeast SEP1 is a novel candidate tumor suppressor gene in osteogenic sarcoma, *Gene*, **298**:121–127.
78. Gkratsou AS, Fragoulis EG and Sideris DC, 2013, The effect of cytostatic Drugs on the mRNA Expression levels of Ribonuclease κ in breast and ovarian cancer cell lines , *Anticancer Agents Med Chem.*, **14(3)**:400-408
79. Shlyakhovenko VO., 2016, Ribonucleases. Possible new approach in cancer therapy., *Exp Oncol.*, **38(1)**:2-8.
80. Berg J.M., Tymoczko J.L. and Stryer L., Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 7^η Έκδοση, 2012, σελ. 903-909.
81. Yan Wang, Jing Liu, Bo Huang, Yan-Mei Xu, Jing Li, Lin-Feng Huang, Jin Lin, Jing Zhang, Qing-Hua Min, Wei-Ming Yang and Xiao-Zhong Wang, 2015, Mechanism of alternative splicing and its regulation, *Biomed Rep.*, **3(2)**: 152–158.
82. Πετροπούλου Χριστίνα, 2017, Διπλωματική εργασία, ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΝΕΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΤΗΣ RNase κ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ, ΕΚΠΑ.