

Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Ιατρική Σχολή










Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής
Χωρέμιο Ερευνητικό Εργαστήριο
Νοσοκομείο Παιδών «Αγία Σοφία»
Διευθύντρια: Καθηγήτρια Έλενα Φρυσίρα-Κανιούρα

«Μοριακοί δείκτες διάγνωσης, εξέλιξης και θεραπευτικής
αντιμετώπισης παιδιών με αιματολογικές κακοήθειες»

Διδακτορική διατριβή

Άννα Παπαδοπούλου
Αθήνα 2019

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

 ΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ, ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ,
ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝ
ΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙ
ΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ
ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ ἨΓΗΣΑΣΘΕ
ΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗ
Ν ἸΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΑΣΘΑΙ, Κ
ΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ, Κ
ΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΕΥΤΕΡΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ἸΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝ
ΕΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ, ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ,
ἩΝ ΧΡΗΖΟΥΣΙ ΜΑΘΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥ
ΓΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ
ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣ
ΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝ
ΤΟΣ, ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ἸΡ
ΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ, ΙΗΤΡΙΚΩ, ἈΛΛΩ, ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ
ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ὈΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟ
ΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗ
ΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΙΗ, ΕΙΡΞΕΙΝ.  ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ
ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕΥ
ΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ ὈΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥ
ΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ.  ΑΓΝΩΣ Δ
Ε ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝ
ΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ.  ΟΥ ΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘ
ΙΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ἈΝΔΡΑΣΙ ΠΡ
ΗΪΙΟΣ ΤΗΣΔΕ.  ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ἈΝ ΕΣΩ,
ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ὈΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤ
ΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΗΣ, Τ
ΗΣ ΤΕ ἈΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥ
ΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ἈΝΔΡΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡ
ΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ.  Ἀ Δ' ἈΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ,
Ἡ ἸΔΩ, Ἡ ἈΚΟΥΣΩ, Ἡ ΚΑΙ ἈΝΕΥ ΘΕΡΑΠΗΤΗΣ ΚΑΤΑ Β
ΙΟΝ ἈΝΘΡΩΠΩΝ, Ἀ ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ
ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ἈΡΡΗΤΑ ἨΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟ
ΙΑΥΤΑ.  ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕ
Ἀ ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘ
ΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ Π
ἈΣΙΝ ἈΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΔΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙ
ΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

Ημερομηνία αίτησης για εκπόνηση διδακτορικής διατριβής: 20/5/2011

Ημερομηνία ορισμού Α' τριμελούς επιτροπής: 17/10/2011

Μέλη Α' τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής:

Αριάδνη Καλπίνη-Μαύρου Καθηγήτρια

Εμμανουήλ Καναβάκης Καθηγητής

Μαρία Τζέτη Επίκουρη Καθηγήτρια

Καθορισμός θέματος διδακτορικής διατριβής και κατάθεση πρωτοκόλλου:

16/11/2011

Ημερομηνία ορισμού Β' τριμελούς επιτροπής:

17/11/2011

Μέλη Β' τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής (λόγω αφυπηρέτησης 2 εκ των

3 μελών της Α'):

Έλενα Φρυσίρα Καθηγήτρια

Ευρυδίκη Δρογκάρη Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Μαρία Μοσχόβη Επίκουρη Καθηγήτρια

Ημερομηνία κατάθεσης Διατριβής:

Μέλη επταμελούς εξεταστικής επιτροπής:

Κωνσταντόπουλος Κωνσταντίνος

Καθηγητής

Παναγιωτίδης Παναγιώτης

Καθηγητής

Φρυσίρα Κανιούρα Έλενα

Καθηγήτρια

Δρογκάρη Ευριδίκη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Βασιλακόπουλος Θεόδωρος του Παναγιώτη

Αναπληρωτής Καθηγητής

Αγγελοπούλου Μαρία

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Μαρία Μοσχόβη

Επίκουρη Καθηγήτρια

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Προσωπικά στοιχεία

Ημερομηνία γέννησης: 28/8/1983

Διεύθυνση κατοικίας: Γεωργίου Πώπ 8, 11525 Αθήνα.

Τηλέφωνο: 6972256390

E-mail: annapapad83@gmail.com

Εκπαίδευση

2011-2019: Διδάκτωρ της Ιατρικής Σχολής Αθηνών.

Θέμα Διατριβής: «Μοριακοί δείκτες διάγνωσης, εξέλιξης και θεραπευτικής αντιμετώπισης παιδιών με αιματολογικές κακοήθειες».

2015-σήμερα: Διδασκαλία στο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής «Βιοϊατρικές Μέθοδοι και Τεχνολογία στη Διάγνωση» στην ενότητα «Μοριακή Ιστοπαθολογία και Ογκολογία»

2012-2016: Καθηγήτρια Βιολογίας-Χημείας στην Μέση Εκπαίδευση

2011-2013: Μεταπτυχιακό δίπλωμα ειδίκευσης «Αναπαραγωγική – Αναγεννητική Ιατρική» της Ιατρικής Σχολής Αθηνών.

2010: Πρακτική άσκηση σε διαγνωστικά εργαστήρια (ΜΗΤΕΡΑ, ΧΩΡΕΜΕΙΟ)

2003-2009: Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας

1996-2001: Γερμανική Σχολή Αθηνών

Βαθμός Ελληνικού Απολυτηρίου :**17,1**

Βαθμός Γερμανικού Απολυτηρίου :**1,9**

Ξένες γλώσσες

- Αγγλικά

First Certificate in English, University of Cambridge (**Lower**) (June 1996)

Certificate of Proficiency in English (**Proficiency**) (June 1999)

- Γερμανικά

Γερμανικό Απολυτήριο , Ιούνιος 2001

Πιστοποιητικό ξένης γλώσσας από την Γερμανική Σχολή Αθηνών (**Sprachdiplom, 2001**)

Συμμετοχή σε συνέδρια και ημερίδες

- **Ιανουάριος 2016:** 2ο Επιμορφωτικό Σεμινάριο Γενετικής (Χωρέμειο Ερευνητικό Εργαστήριο)
- **Ιανουάριος 2015:** 1^ο Επιμορφωτικό Σεμινάριο Γενετικής (Χωρέμειο Ερευνητικό Εργαστήριο)
- **Φεβρουάριος 2014:** 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παιδιατρικής Αιματολογίας –Ογκολογίας.
- **Απρίλιος 2013:** 40^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού:
«Η επίδραση της βισφατίνης στην φωσφορυλίωση του υποδοχέα της ινσουλίνης παρουσία και απουσία ινσουλίνης κατά την ωθυλακιογένεση»
(διπλωματική εργασία του Μεταπτυχιακού Προγράμματος).
- **Σεπτέμβριος 2012:** παρακολούθηση του 12^{ου} Μετεκπαιδευτικού Σεμιναρίου Γενετικής με θέμα: «Επιγενετικοί μηχανισμοί στην Βιολογία και την Ιατρική» του εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών.
- **Δεκέμβριος 2011:** παρακολούθηση του 8^{ου} Ετησίου Συμποσίου της Γ' Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής με θέμα: «Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή: το σήμερα και το αύριο»
- **Μάιος 2010:** παρακολούθηση της διημερίδας «20 χρόνια Προεμφυτευτική Γενετική Διάγνωση» που πραγματοποιήθηκε από το εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής και την Α' Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Δημοσιεύσεις σε ξενόγλωσσα επιστημονικά περιοδικά

1. Impaired degradation and aberrant phagocytosis of necrotic cell debris in the peripheral blood of patients with primary Sjögren's syndrome

George E. Fragoulis , ¹ , *Aigli G. Vakrakou* , ¹ , *Anna Papadopoulou* , ² , *Anastasios Germenis* ,³ *Emmanouel Kanavakis* ,² , *Haralampos M. Moutsopoulos* , ¹ *Menelaos N. Manoussakis* ,⁴

Article in

Journal of Autoimmunity 56 · September 2014, *impact factor* 2014: 8,410.

2. Activation of inflammasome correlating with the presence of non-degraded cell-free DNA in the peripheral blood and the salivary glands of patients with severe primary SjOgren's syndrome

¹ AG Vakrakou, ¹ S Boiu, ² A Papadopoulou, ² E Kanavakis, ¹ MN Manoussakis.

Article in Annals of Rheumatic Diseases 74 February 2015, *impact factor* 2015: 12,384.

3. The Patients with Primary Sjögren's Syndrome Display Inflammasome Activation in the Peripheral Blood and the Salivary Glands that Correlates With Deficient Degradation of DNA

A.G. Vakrakou ¹, S. Boiu ¹, A. Papadopoulou ², E. Kanavakis ², M.N. Manoussakis ³

Article in Annals of Rheumatic Diseases 74 June 2015, *impact factor* 2015: 12,384

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1.

Annual European Congress of Rheumatology (EULAR) – 10 th -13 nd June 2015, Italy, Rome

Oral presentation:

A. G. Vakrakou¹, S. Boiu¹, **A. Papadopoulou**², E. Kanavakis ², M. N. Manoussakis¹

The patients with primary Sjögren's syndrome display inflammasome activation in the peripheral blood and the salivary glands that correlates with deficient degradation of DNA.

¹Department of Pathophysiology, University of Athens, Athens, Greece

²Department of Medical Genetics, Choremio Research Laboratory

2.

The 13th International Symposium on Sjögren's Syndrome 19th- 22nd May 2015, Bergen, Norway

Poster presentation:

AG Vakrakou¹, S Boiu¹, **A. Papadopoulou**², E. Kanavakis², M.N. Manoussakis¹

Primary Sjögren's syndrome patients display inflammasome activation in the peripheral blood and the salivary glands that correlates with deficient degradation of DNA.

¹Department of Pathophysiology, University of Athens, Athens, Greece

²Department of Medical Genetics, Choremio Research Laboratory

3.

35th European Workshop for Rheumatology Research (EWRR), March 5 th – 7 nd, 2015 Budapest, Hungary

Poster presentation:

AG Vakrakou¹, S Boiu¹, **A. Papadopoulou**², E. Kanavakis², M.N. Manoussakis¹

Activation of inflammasome correlating with the presence of non-degraded cell-free DNA in the peripheral blood and the salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome.

¹Department of Pathophysiology, University of Athens, Athens, Greece

²Department of Medical Genetics, Choremio Research Laboratory

4.

XV. Mediterranean Congress of Rheumatology (MCR), August 28 th - 31nd, 2014, Istanbul.

Poster presentation:

AG. Vakrakou¹, GE. Fragoulis¹, **A. Papadopoulou**², E. Kanavakis², MN. Manoussakis¹

Impaired degradation and increased immunologic exposure to necrotic cell debris in the peripheral blood of patients with primary Sjögren's syndrome.

¹Department of Pathophysiology, University of Athens, Athens, Greece

²Department of Medical Genetics, Choremio Research Laboratory

5.

**40^o Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού
Απρίλιος 17-30, 2013, Αθήνα**

Oral presentation:

A. Παπαδοπούλου¹, E. Κιαπέκου¹, M. Νομικός², Δ.Μαυρογιάννη³, E. Ζαπάντη⁴,
M. Θεοδωρίδου², Δ. Λουτράδης^{1,3}

Η επίδραση της βισφατίνης στην φωσφορυλίωση του υποδοχέα της ινσουλίνης παρουσία και απουσία ινσουλίνης κατά την ωθυλακιογένεση.

¹Μεταπτυχιακό πρόγραμμα «Αναπαραγωγική –Αναγεννητική Ιατρική», Α΄ Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, ΓΝΑ «Αλεξάνδρα»

²Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος»

³ Α΄ Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής, ΓΝΑ «Αλεξάνδρα»

⁴ Ενδοκρινολογικό Τμήμα ΓΝΑ «Αλεξάνδρα»

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Αιμοποίηση στο ληκυθικό σάκο	σελ.1
1.2. Αιμοποίηση στο εμβρυϊκό ήπαρ	σελ.2
1.3. Αιμοποίηση στον εμβρυϊκό σπλήνα	σελ.3
1.4. Αρχιτεκτονική του μυελού των οστών	σελ.3
1.4.A. Νευροαγγειακός σκελετός	σελ.3
1.4.B. Μυελικό παρέγχυμα	σελ.6
1.4.Γ. Ζώνες κυτταροβρίθειας του μυελού των οστών	σελ.8
1.5.Αιμοποιητική λειτουργία του μυελού των οστών σε επίπεδο μητρικού κυττάρου	σελ.10
1.6. Ερυθροκυτταροποίηση	σελ.11
1.6.A. Ωρίμανση της ερυθράς σειράς	σελ.12
1.6.B. Λεμφοκυτταρική σειρά	σελ.13
1.7. Οξεία λευχαιμία	σελ.16
1.8 Λεμφαδένας	σελ.20
1.8.A Ιστοπαθολογία των T-περιοχών	σελ.21
1.8.B Λεμφοκύτταρα	σελ.23
1.9 Η ΟΞΕΙΑ ΛΕΜΦΟΒΛΑΣΤΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ ΟΛΛ	σελ.25
1.10 Μοριακοί δείκτες στις αιματολογικές κακοήθειες	σελ.27
1.11 Η μεθυλίωση του DNA και η αποσιώπηση γονιδίων	σελ.28
1.12 Μεθυλιωμένα γονίδια στον καρκίνο	σελ.33
1.13 Η υπερμεθυλίωση των νησίδων CpG στην ΟΛΛ	σελ.35
1.14 Οι RasGTPάσες	σελ.36
1.15 Γονίδιο <i>Rassf6</i>	σελ.40
1.16 Σίγαση του γονιδίου <i>Rassf6</i> στον καρκίνο	σελ.41

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

2.1 Συλλογή δειγμάτων	σελ.43
2.2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ	σελ.44
2.2.A Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (<i>quantitative real-time PCR</i>)	σελ.44
2.2.B Τεχνική ανάλυσης θραυσμάτων DNA (<i>fragment analysis</i>)	σελ.45
2.2.Γ Τεχνική ανάλυσης της αλληλουχίας του DNA κατά Sanger (<i>Sanger sequencing</i>)	σελ.46
2.2.Δ Καθαρισμός με το ένζυμο <i>Exosap</i>	σελ.47
2.2.E Αντίδραση Sequencing	σελ.48
2.2.ΣΤ Απομόνωση γενετικού υλικού	σελ.49
2.2.Η Τροποποίηση γενετικού υλικού	σελ.49
2.3 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ PCR ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ	σελ.53
2.3.A Πρωτόκολλο για την ποσοτική μέτρηση του ολικού cell-free DNA	σελ.53
2.3.B Πρωτόκολλο για την ανίχνευση καρκινικού πυρηνικού DNA και cell-free DNA στο αίμα	σελ.54
2.3.Γ Πρωτόκολλο για την ανάλυση των μεθυλιωμένων θέσεων στον υποκινητή του <i>Rassf6</i> σε DNA και cell-free DNA	σελ.56
2.3.Δ Ποσοτική μέτρηση του λευχαιμικού φορτίου	σελ.57

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Αιματολογικά στοιχεία ασθενών	σελ.58
3.2 Ποσοτική μέτρηση του cell-free DNA του πλάσματος	σελ.58
3.3 Ποσοτική μέτρηση του μεθυλιωμένου DNA	σελ.61
3.4 Ποσοτική μέτρηση του μεθυλιωμένου cell free DNA των λευχαιμικών κυττάρων	σελ.63
3.5 Ανίχνευση θραυσμάτων DNA με χρήση μάρτυρα (<i>Fragment analysis</i>)	σελ.65

3.6 Ανάλυση της μεθυλίωσης στην αλληλουχία του υποκινητή του γονιδίου <i>Rassf6</i> (Sequencing)	σελ.63
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	σελ.75
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	σελ.95
6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	σελ.96
7. ZUSAMMENFASSUNG	σελ.98
8. ABSTRACT	σελ.100
9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	σελ.101

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Αιμοποίηση στο ληκυθικό σάκο

Η αιμοποίηση, κατά την ενδομήτρια ζωή, αναπτύσσεται εξελικτικά σε τρεις κύριες ανατομικές θέσεις: το εξωεμβρυονικό μεσόδερμα, το εμβρυϊκό ήπαρ και τον εμβρυϊκό μυελό των οστών. Στο εξωεμβρυονικό μεσόδερμα η αιμοποίηση αρχίζει στην επιφάνεια του ληκυθικού σάκου τη 14^η και 19^η ημέρα της ενδομήτριας ζωής και τελειώνει τη 12^η εβδομάδα (Gilmour 1941). Ως πρώτες εστίες αιμοποίησης αναφαίνονται τα αρχέγονα μεσεγγυματικά κύτταρα (αιματικές νησίδες) υπό μορφή στρογγυλών μαζών και χορδών που προβάλλουν μέσα στη χοριονική κοιλότητα. Στην αρχή οι παραπάνω μάζες είναι συμπαγείς, αργότερα όμως εξελίσσονται σε κοιλότητες επενδυμένες με ενδοθήλιο που περιέχουν την πρώτη γενιά κυττάρων του αίματος. Αυτές οι μεμονωμένες αιματικές νησίδες του ληκυθικού σάκου συρρέουν και σχηματίζουν αγγειακό δίκτυο το οποίο συνιστά την αγγειακή ζώνη (area vasculosa). Το έμβρυο αποκτά δικό του αίμα απ' τη στιγμή που το εμβρυονικό αγγειακό σύστημα θα αναπτύξει επικοινωνία με τις αιματικές νησίδες και την αγγειακή ζώνη (4^η εβδομάδα της εγκυμοσύνης).

Έχει αποδειχθεί ότι οι συμπαγείς αιματικές νησίδες αναπτύσσονται σε καλλιέργειες, μόνο όταν το εξώδερμα συνυπάρχει με το ενδόδερμα. Τα κύτταρα του εξωμεσοδέρματος είναι αυτά που παράγουν τα αιματικά (ερυθροβλάστες) ενώ τα ενδοδερμικά κύτταρα στερούνται αυτής της ικανότητας. Οποσδήποτε η επίδραση του ενδοδέρματος επάνω στο μεσοεξώδερμα για την παραγωγή αιματικών κυττάρων δεν εξαρτάται από την άμεση επαφή μεταξύ τους. Αυτό αποδείχθηκε *in vitro*, όταν σε ξεχωριστές καλλιέργειες κυττάρων του ενδοδέρματος και του μεσοδέρματος που επικοινωνούσαν μεταξύ τους μέσα από φίλτρο Millipore, αναπτύσσονταν αιματικές νησίδες από κύτταρα του μεσοδέρματος (Miura και Wilt 1969).

Τα κύτταρα των αιματικών νησίδων υφίστανται διαφοροποίηση προς δύο κατευθύνσεις:

1) Τα κύτταρα που βρίσκονται στην περιφέρεια και συνδέονται μεταξύ τους σχηματίζουν λεπτή επιθηλιακή στοιβάδα, το ενδοθήλιο των μελλοντικών αιμοφόρων αγγείων.

2) Τα κύτταρα που βρίσκονται στο κέντρο των νησίδων απομακρύνονται το ένα από το άλλο και διαφοροποιούνται σε αιματικά κύτταρα. Τα παραπάνω δείχνουν ότι τα έμμορφα στοιχεία του αίματος βρίσκονται απ' την αρχή μέσα σε αιμοφόρα αγγεία.

Η αιμοποιητική λειτουργία στο ληκυθικό σάκο περιορίζεται κατά κύριο λόγο στην ερυθρά σειρά. Σπανίως ανευρίσκονται εστίες πρόδρομων μορφών κοκκιοκυττάρων ενώ ουδέποτε βρέθηκαν εστίες κυττάρων της λεμφικής σειράς (Gilmour 1941).

Η γνώση γύρω από τους βιοχημικούς μηχανισμούς που ρυθμίζουν την ερυθροποίηση στο ληκυθικό σάκο είναι περιορισμένη. Λογικά πριν αρχίσει οποιαδήποτε σύνθεση αιμοσφαιρίνης, θα πρέπει να υπάρξει σύνθεση του σχετικού μ' αυτήν mRNA. Παρ' όλα αυτά, ενώ υπάρχει σύνθεση mRNA, παρατηρείται καθυστέρηση στην έναρξη συνθέσεως αιμοσφαιρίνης. Αυτό φαίνεται ότι οφείλεται σε καθυστέρηση επαγωγής ενός μόνου ενζύμου, της ALA – συνθετάσης, η οποία είναι απαραίτητη για τη σύνθεση της αίμης (Laverre και Granick 1967).

Η προσθήκη ερυθροποιητίνης σε καλλιέργειες κυττάρων της αγγειακής ζώνης (area vasculosa) διεγείρει τη σύνθεση αιμοσφαιρίνης μέσα σε 24 ώρες (Malroix 1967). Αντίθετα, η σύνθεση αίμης από τα κύτταρα του ληκυθικού σάκου ποντικού δεν προάγεται με την παρουσία της ερυθροποιητίνης (Cole και Paul 1966). Είναι πιθανό ο βραδύς ρυθμός με τον οποίο συντίθεται η αίμη στο ληκυθικό σάκο να μην αυξάνεται περισσότερο με την προσθήκη της ερυθροποιητίνης.

1.2 Αιμοποίηση στο εμβρυϊκό ήπαρ

Το ήπαρ αποτελεί το πιο βασικό όργανο ερυθροποίησης κατά την περίοδο μεταξύ του 3^{ου} και 6^{ου} μήνα της εγκυμοσύνης. Ακολούθως, η παραγωγή ερυθροκυττάρων στο ήπαρ προοδευτικά μειώνεται μέχρι το τέλος

της 1^{ης} μετά τον τοκετό εβδομάδας (Gilmour 1941). Οι ερυθροβλάστες βρίσκονται έξω από τα αγγεία στο ηπατικό παρέγχυμα και αποτελούν κατά τον 7^ο εμβρυϊκό μήνα το 50% των εμπύρηνων κυττάρων του ηπατικού ιστού (Thomas και Yoffey 1964).

Η ηπατική ερυθροποίηση είναι νορμοπλαστική και προσομοιάζει εκείνη του μυελού των οστών. Τα παραγόμενα κατ' αυτή την περίοδο ερυθρά αιμοσφαίρια είναι απύρρηνα αλλά σημαντικά μεγαλύτερα από τα αντίστοιχα ερυθροκύτταρα του ενήλικα. Από τη 14^η ως τη 18^η εβδομάδα της ενδομήτριας ζωής η ηπατική ερυθροποίηση εξαρτάται σημαντικά από την παρουσία ερυθροποιητίνης (Basch 1972). Ελάχιστα στοιχεία κοκκιοκυτταροπαραγωγής ανευρίσκονται τόσο στο ηπατικό παρέγχυμα όσο και στο πυλαίο σύστημα από την 7^η εμβρυϊκή εβδομάδα μέχρι και την 5^η μετεμβρυϊκή ημέρα.

1.3 Αιμοποίηση στον εμβρυϊκό σπλήνα

Ο σπλήνας, όργανο μικρότερης σημασίας για την αιμοποίηση, αρχίζει να λειτουργεί συγχρόνως με το ήπαρ, ενώ από την 20^η εβδομάδα παρατηρείται βαθμιαία κάμψη της αιμοποιητικής του λειτουργίας, η οποία τελειώνει πριν από τον τοκετό. Κατά την περίοδο μεταξύ 3^{ου} εμβρυϊκού μήνα και 5^{ης} μετεμβρυϊκής ημέρας ανευρίσκονται στο σπλήνα και ιδιαίτερα στον ερυθρό πολφό του οργάνου, ελάχιστες εστίες ερυθροποίησης. Λεμφοκυτταροποίηση αρχίζει στα μαλπιγγιανά σωμάτια του σπλήνα κατά τον 5^ο εμβρυϊκό μήνα, ενώ η μεγακαρυοκυτταροποίηση εμφανίζεται στην περίοδο μεταξύ της 6^{ης} και 7^{ης} εμβρυϊκής εβδομάδας και διαρκεί μέχρι το τέλος της εγκυμοσύνης.

1.4 Αρχιτεκτονική του μυελού των οστών

1.4.A Νευροαγγειακός σκελετός

Οι πληροφορίες γύρω από την οργάνωση του χώρου του ανθρώπινου μυελού των οστών είναι φτωχές. Από μελέτες σε ζώα είναι σήμερα γνωστό ότι ο μυελός έχει υψηλού βαθμού οργάνωση, ο δε ιστός που φιλοξενείται εκεί

εμφανίζει σημαντική προσαρμοστικότητα σε ό,τι αφορά μεταβολές της σύστασης και λειτουργίας, ιδιαίτερα όταν υποστεί διέγερση από εξωγενείς επιδράσεις. Τόσο η ωρίμανση των διαφόρων κυτταρικών στοιχείων όσο και η μετακίνησή τους προς το περιφερειακό αίμα ρυθμίζονται από τη νευροαγγειακή κατάσταση του μυελού. Η μυελική κοιλότητα είναι επενδυμένη με μονόστοιβη κυτταρική μεμβράνη, το ενδόστεο. Η αιμοποιητική λειτουργία είναι συγκεντρωμένη στην περιοχή που πρόσκειται στο ενδόστεο. Αντίθετα η κεντρική περιοχή όπου υπάρχει η κεντρική αρτηρία και φλέβα καταλαμβάνεται στο σύνολό της από λιπώδη ιστό. Από τους τροφοφόρους σωλήνες των οστών διέρχονται τα τροφοφόρα αγγεία (μία αρτηρία και δύο φλέβες). Μόλις οι αρτηρίες φθάσουν στη μυελική κοιλότητα διχάζονται σε ανιόντες και κατιόντες κλάδους οι οποίοι περιελίσσονται ελικοειδώς γύρω από την κεντρική επιμήκη φλέβα. Οι κλάδοι αυτοί απολήγουν στα αρτηριόλια και τα τριχοειδή τα οποία πορεύονται ακτινοειδώς προς την επιφάνεια του ενδοστέου. Το μεγαλύτερο μέρος των τριχοειδών εκβάλλει μέσα σε πλέγμα κολποειδών (sinusoids) το περιεχόμενο των οποίων παροχετεύεται από τα συλλεκτικά φλεβικά αγγεία προς μεγαλύτερα συλλεκτικά φλεβικά αγγεία τα οποία εκβάλλουν κάθετα μέσα στην κεντρική φλέβα. Ecoiffier με συνεργ. 1957, Branemark 1959, Kinosita με συνεργ. 1961, De Bruyn με συνεργ. 1970, McCyskey με συνεργ. 1971).

Η κεντρική φλέβα, αφού διατρέξει ολόκληρο το μήκος της οστικής κοιλότητας, εκβάλλει μέσα στην τροφοφόρα φλέβα. Η κεντρική φλέβα και η τροφοφόρα αρτηρία επικοινωνούν με τα αγγεία της οστικής επιφύσεως και διαφύσεως. Τα τελευταία αγγεία εισέρχονται στο εσωτερικό του οστού μέσα από μικρά τροφοφόρα τρήματα και αρδεύουν το μυελό των επιφύσεων και διαφύσεων.

Ολόκληρο το αγγειακό δίκτυο που βρίσκεται μέσα από το ενδόστεο αναστομώνεται με περισοτικά αγγεία μέσω λεπτών φλεβών οι οποίες διέρχονται διά μέσου του συμπαγούς οστού (Nelson με συνεργ. 1960). Πολλά τριχοειδή της ενδοοστικής ζώνης που προέρχονται από την τροφοφόρα αρτηρία διέρχονται τους Χαβέρσιους σωλήνες για να επανακάμψουν προς τα κολποειδή του μυελού ή τα μικρά συλλεκτικά φλεβικά αγγεία. Μέσα στους

Χαβέρσιους σωλήνες τα τριχοειδή αυτά συνδέονται με αγγεία που προέρχονται από το περιόστεο (Branemark 1959).

Από το αγγειακό σύστημα του μυελού των οστών ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν κολποειδή, το τοίχωμα των οποίων επικαλύπτεται με μονόστοιβο ενδοθήλιο από πλατιά τυπικά ενδοθηλιακά κύτταρα, περισσότερο πρωτόγονα σε σχέση με τα δικτυοκύτταρα και τα οποία προσομοιάζουν στα δικτυοκύτταρα των σπληνικών κολποειδών και χορδών (Zamboni και Pease 1961, Weiss 1965).

Συνήθως δεν υπάρχει βασική μεμβράνη που να τα υποστηρίζει. Άλλοτε το τοίχωμα των κολποειδών αποτελείται από διπλή στοιβάδα αποτελούμενη από ενδοθηλιακά κύτταρα και βασική μεμβράνη ή ενδοθηλιακά κύτταρα και τοιχωματικά κύτταρα. Τέλος σε ορισμένα κολποειδή το τοίχωμα αποτελείται από τριπλή στοιβάδα: τη στοιβάδα των ενδοθηλιακών κυττάρων, τη στοιβάδα των κυττάρων του έξω χιτώνα και τη βασική μεμβράνη.

Οι συνδέσεις μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι απλές. Αποτελούνται από κυτταροπλασματικές προσεκβολές, οι οποίες απλώς εφάπτονται μεταξύ τους ή επικαλύπτονται ελάχιστα. Ανάμεσα στα ενδοθηλιακά κύτταρα υπάρχουν χάσματα μέσα από τα οποία γίνεται η απευθείας επικοινωνία του ενδοαγγειακού χώρου και του μυελικού παρεγχύματος (Zamboni και Pease 1961, Weiss 1965). Η παρουσία τέτοιων χασμάτων και στον ανθρώπινο μυελό αποδεικνύεται από την απορρόφηση του αίματος που μεταγγίζεται ενδοστερνικώς (Tocantin και O' Neill 1941). Πλασματοκύτταρα βρίσκονται σε στενή επαφή με το τοίχωμα των κολποειδών, όπου πολλαπλασιάζονται και εκτείνονται προς το εξωτερικό της μεμβράνης. Τα σιτευτικά κύτταρα με τα χαρακτηριστικά πολυάριθμα μεταχρωματικά κοκκία γειτνιάζουν προς τα μικρά αγγεία του μυελού.

Το μικροαγγειακό σύστημα του μυελού υφίσταται συνεχείς μεταβολές (McClugage με συν. 1971). Τα φλεβικά κολποειδή εκτελούν ρυθμικές μεταβολές του όγκου τους σύμφωνα με τις αιμοποιητικές ανάγκες του οργανισμού (Brenemark 1959). Όταν δραστηριοποιηθεί ο μυελός από διάφορες αιτίες (αιμορραγίες κ.λπ.), περισσότερα αρτηριόλια και τριχοειδή παίρνουν μέρος στην κυκλοφορία του, τα κολποειδή διευρύνονται και αρχίζει

αναρρόφηση μυελικών στοιχείων που περιβάλλουν τους μυελικούς χώρους. Η διάμετρος των κολποειδών αυξάνεται 2-3 φορές μέσα σε χρονικό διάστημα 2-3 πρώτων λεπτών και η ροή του αίματος μέσα από αυτά ελαττώνεται ή παύει εντελώς. Η λειτουργία αυτή των κολποειδών μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη συσταλτών ινιδίων και μικροσωληναρίων στα τοιχωματικά κύτταρα που περιβάλλουν τα κολποειδή (Weiss 1970).

Έτσι οι μυελικοί χώροι αυξάνονται τελικά σε όγκο, γεμίζουν από αιμοποιητικά κύτταρα και λίπος, για να επανέλθουν στην αρχική τους κατάσταση αφού παύσει η δράση του ερεθίσματος. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η ερυθροποιητίνη αποτελεί βασικό ερέθισμα για την έναρξη μιας τέτοιας αγγειοϋπερπλαστικής δραστηριότητας (Falerra 1970) και ότι την αύξηση της κυκλοφορίας σ' ένα σημείο του σκελετού, ακολουθεί αύξηση της αιμοποιητικής του λειτουργίας (Van Dyke και Harris 1969). Συνεπώς ερυθροποιητίνη και τοπικοί παράγοντες μπορούν να συμβάλουν σημαντικά στη λειτουργία της αιμοποίησης, μόνο εφόσον υπάρξουν προϋποθέσεις επαρκούς αγγειώσεως.

Η νεύρωση του μυελού των οστών γίνεται από νευρικές ίνες γυμνές ή επενδυμένες με μυελίνη και οι οποίες έρχονται σε στενή επαφή με το ενδοθήλιο πολλών κολποειδών. Πολλές από αυτές τις ίνες, συνήθως τις επενδυμένες με μυελίνη, απολήγουν ανάμεσα στα αιμοποιητικά κύτταρα. Υπάρχουν ορισμένες θεωρητικές ενδείξεις ότι μεταβολές στην αιμοποιητική δραστηριότητα του μυελού ή τη διαπερατότητα των κολποειδών μπορεί να συμβαίνουν μέσω χημικών ουσιών που ελκύονται στις νευρικές απολήξεις.

1.4.B Μυελικό παρέγχυμα

Το μυελικό παρέγχυμα βρίσκεται ανάμεσα στο νευροαγγειακό σκελετό του μυελού και αποτελείται από αιμοποιητικά κύτταρα, λιπώδη κύτταρα, καθώς και άλλα μη αιμοποιητικά στοιχεία, όπως πλασματοκύτταρα, ινίδια (fibrils) και σιτευτικά κύτταρα (mast cells) (Trubowitz και Masek 1970). Τα κύτταρα του έξω χιτώνα των κολποειδών εκβάλλουν πρωτοπλασματικές προεκβολές οι οποίες παρεμβάλλονται ή περιβάλλουν τα αιμοποιητικά κύτταρα

και τα οποία αντιστοιχούν στα δικτυοκύτταρα που ανευρίσκονται στα μυελικά επιχρίσματα (Weiss 1965). Τα αιμοποιητικά κύτταρα της ερυθράς και της κοκκιδώδους σειράς με τις ώριμες μορφές τους είναι διαταγμένα κατά μήκος του τοιχώματος των κολποειδών του μυελού.

Τόσο τα ώριμα κοκκιοκύτταρα όσο και τα δικτυοκύτταρα, διέρχονται μέσα από τρήματα που υπάρχουν στο τοίχωμα των κολποειδών (Weiss 1965). Η εκपुरήνωση των οξεόφιλων ερυθροβλαστών λαμβάνει χώρα έξω από το τοίχωμα των κολποειδών, ακριβώς τη στιγμή που το νεοσχηματιζόμενο δικτυοερυθροκύτταρο εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος. Ο εκβαλλόμενος πυρήνας με ελάχιστο πρωτόπλασμα φαγοκυτταρώνεται από παρακείμενα τοιχωματικά κύτταρα. Τα μεγακαρυοκύτταρα του μυελού βρίσκονται προσκολλημένα στο τοίχωμα των κολποειδών (Weiss 1965) και τροφοδοτούν απευθείας το περιφερικό αίμα με αιμοπετάλια μέσα από χάσματα που υπάρχουν ανάμεσα στα κύτταρα του τοιχώματος των κολποειδών.

Τέλος τα λεμφοκύτταρα βρίσκονται στο μυελό υπό μορφή λεμφικών οζιδίων ή λεμφικών διηθήσεων (Werner 1960, Rohr 1960, Rywlin με συνεργ. 1974). Τα λεμφικά οζίδια είναι σαφώς περιγραμμένοι, στρογγυλοί όζοι από μικρά λεμφοκύτταρα με αγγεία στο κέντρο τους και δικτυοκύτταρα, πλασματοκύτταρα και ιστιοκύτταρα στην περιφέρεια. Η διάταξη αυτή προσομοιάζει εκείνη των μαλπιγγιανών θυλακίων του σπλήνα (Rywlin με συνεργ. 1974). Μικρό ποσοστό αυτών των οζιδίων διαθέτουν βλαστικό κέντρο, ενώ σχεδόν όλα είναι στερεωμένα επάνω σε πλέγμα από δικτυωτές ίνες. Οι λεμφικές διηθήσεις είναι λεμφοκύτταρα διασπαρμένα ανάμεσα σε λιπώδη κύτταρα, περιέχουν λιγότερες δικτυωτές ίνες ενώ ουδέποτε περιέχουν βλαστικό κέντρο (Rywlin με συνεργ. 1974). Τα σιτευτικά κύτταρα (mast cells) είναι αφθονότερα κάτω ακριβώς από το ενδόστεο και λιγότερα προς το κέντρο της μυελικής κοιλότητας (Johnstone 1954).

Στον ενήλικα ποσοστό 50% του μυελού αποτελείται από λιπώδη ιστό (κίτρινος μυελός). Τα λιποκύτταρα προσφέρουν το βασικό ρυθμιστικό μηχανισμό με τον οποίο αυξομειώνεται ο χώρος της μυελικής κοιλότητας όταν δημιουργούνται ανάγκες αυξημένης αιμοποίησης. Η μετακίνηση λίπους από το

μυελικό ιστό είναι ταχύτατη. Στην αρχή ο μυελός μεταμορφώνεται περνώντας σε μία ζελατινώδη φάση λόγω μαζικής αυξήσεως του όγκου των κυττάρων του τοιχώματος των κολποειδών. Η αύξηση αυτή του όγκου των κυττάρων αποδίδεται σε αύξηση του νερού των κυττάρων (Weiss 1965) καθώς και σε συσσώρευση σταγονιδίων λίπους στα τοιχωματικά κύτταρα των κολποειδών.

Το ενδόστεο επαλείφει την οστική κοιλότητα και αποτελείται από δικτυοκύτταρα. Είναι ο βασικός ιστός ο οποίος ανανεώνει συνεχώς το οστό και επουλώνει τα οστικά κατάγματα. Στο μυελό παρατηρούνται συνεχείς μεταμορφώσεις ανάμεσα στα δικτυοκύτταρα του ενδοστέου, τους οστεοβλάστες, τα οστεοκύτταρα και τους οστεοκλάστες. Κύτταρα με έντονα βασεόφιλο πρωτόπλασμα, οι οστεοβλάστες, θεωρούνται υπεύθυνοι για τη συνεχή ανανέωση του οστού, ενώ αντίθετα οι οστεοκλάστες, γιγάντια κύτταρα με 15-20 ή και περισσότερους πυρήνες συμβάλλουν στην απορρόφηση του οστού κατά τη διάρκεια οστεολυτικών εξεργασιών ή και σε φυσιολογικές καταστάσεις (McLean και Uritz 1968). Η απελευθέρωση κυττάρων από το μυελό προς την περιφερική κυκλοφορία εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη σχέση χώρου που υπάρχει μεταξύ των αιμοποιητικών κυττάρων και των κολποειδών. Η αποδιοργάνωση αυτής της σχέσης θεωρείται υπεύθυνη για την παρουσία άωρων αιμοποιητικών κυττάρων στην περιφερική κυκλοφορία αρρώστων με κακοήθεις νόσους ή ίνωση του μυελού.

Τα κύτταρα δικτύου του μυελού φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην καταστροφή γερασμένων ερυθροκυττάρων, τη φαγοκυττάρωση εκβαλλόμενων πυρήνων ερυθροβλαστών ή την κάθαρση μικροοργανισμών οι οποίοι εισέβαλαν στην κυκλοφορία του περιφερικού αίματος.

1.4.Γ Ζώνες κυτταροβρίθειας του μυελού των οστών

Κατά τη νεογνική περίοδο ολόκληρος ο μυελός είναι εξίσου αιμοποιητικός. Με την πάροδο του χρόνου ο δραστικός μυελός ελαττώνεται παραμένοντας τελικά μόνο σε ορισμένα σημεία των οστών. Το στέρνο, το λαγόνιο οστό, οι πλευρές και οι σπόνδυλοι διατηρούν περισσότερη ερυθροποίηση και για μικρότερο χρόνο παρά οποιαδήποτε άλλα οστά. Οι

διαφύσεις των οστών, όπως της κνήμης ή του μηριαίου, είναι δραστήριες από άποψη ερυθροποίησης κατά την παιδική ηλικία μέχρι σχεδόν την εφηβεία. Αργότερα ελαττώνεται προοδευτικά μέχρι τελικής εξαφανίσεως. Η δραστηριότητα του μυελού του ενήλικα είναι σχεδόν στο σύνολό της η ίδια με εκείνη του παιδιού. Η διαφορά έγκειται στο ότι η δραστηριότητα του μυελού στα παιδιά, υπάρχει σε όλες τις οστικές περιοχές, ενώ στους ενήλικες η δραστηριότητα αυτή εξαφανίζεται νωρίς από τις διαφύσεις των μακρών οστών. Σε αυξημένες απαιτήσεις αιμοποίησης, όπως κατά τις αιμολυτικές αναιμίες, συμβαίνει επέκταση της ερυθροποίησης προς τις υπόλοιπες περιοχές των οστών.

Όταν γίνεται αναφορά στο μυελό εξυπακούεται ο ερυθροποιητικός μυελός. Πέρα όμως από τον ερυθροποιητικό, ο μυελός αποτελείται και από λιπώδη ιστό ο οποίος αποκαλείται λιπώδης μυελός. Η σχέση κατανομής του ερυθρού προς το λιπώδη μυελό καθορίζει το ποσό της κυτταροβρίθειας. Όταν γίνεται αναφορά σε κάποια περιοχή του μυελού εννοείται το ποσοστό του λιπώδους σε σχέση προς το κυτταρικό του μέρος. Φυσιολογικά πρέπει να υπάρχει ίση κατανομή ποσοστών λιπώδους και κυτταρικού μυελού. Όταν το ποσοστό του λιπώδους στοιχείου υπερβαίνει το 75%, μπορούμε να πούμε ότι στο σημείο εκείνο ο μυελός είναι υποκυτταρικός. Όταν αντίθετα το ποσοστό της περιοχής που καταλαμβάνεται από κυτταρικό ιστό υπερβαίνει το 75%, ο μυελός αυτός θεωρείται υπερκυτταρικός. Επίσης κατά τη μελέτη του μυελού πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η διαφορά κυτταροβρίθειας που μπορεί να εμφανιστεί από περιοχή σε περιοχή και από ηλικία σε ηλικία. Απ' αυτό συνάγεται ότι, εφόσον επιχειρηθεί η διάγνωση πολυκυτταραιμίας ή αντίθετα απλασίας, με βάση τα παραπάνω κριτήρια, πρέπει να γίνεται αναφορά σε συγκεκριμένη θέση ή ορισμένο οστόν όπου φυσιολογικά αναμένεται μία ορισμένη κυτταροβρίθεια.

Η κυτταροβρίθεια συνεπώς του μυελού των οστών πρέπει να κρίνεται από μία ορισμένη θέση του μυελού προκειμένου να υπάρξει τόσο η πείρα όσο και η δυνατότητα σύγκρισης. Παρά το γεγονός ότι η κυτταροβρίθεια του μυελού των οστών διαφέρει σε διάφορες οστικές περιοχές, εντούτοις η

αναλογική σχέση των διαφόρων κυτταρικών σειρών είναι σε μεγάλο βαθμό παντού η ίδια (Nordenson 1935, 1951).

1.5 Αιμοποιητική λειτουργία του μυελού των οστών σε επίπεδο μητρικού κυττάρου

Όλες οι σειρές των αιμοποιητικών κυττάρων προέρχονται από κοινό προγονικό κύτταρο, το αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο (stem cell). Πριν λίγα χρόνια υπήρχε διάσταση απόψεων γύρω από το αν όλα τα κύτταρα του αίματος προέρχονται από ένα ή περισσότερα προγονικά κύτταρα (μονοφυλετική ή πολυφυλετική Σχολή) (Downy 1938, Wintrobe 1967).

Οι απόψεις αυτές υπέστησαν κατά καιρούς διάφορες επικρίσεις. Σήμερα θεωρείται βέβαιο ότι όλες οι σειρές των αιμοποιητικών κυττάρων προέρχονται από κοινό προγονικό κύτταρο, το αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο (stem cell) ή την αρχέγονη πολυδύναμη κυτταροβλάστη (ΑΠΚ).

Σήμερα υπάρχουν ενδείξεις ότι στον αριθμητικό χώρο του αρχέγονου κυττάρου υφίστανται τόσο μονοδύναμα όσο και πολυδύναμα αιμοποιητικά αρχέγονα κύτταρα. Για το συγκεκριμένο ζήτημα διατυπώθηκαν πολλές θεωρίες τις οποίες ο αναγνώστης μπορεί να μελετήσει στις εξής δημοσιεύσεις: Maximow (1924), Doan (1932), Bloom και Bartelmez (1940), Knoll και Pingel (1949).

Οι αρχέγονες πολυδύναμες κυτταροβλάστες έχουν δύο βασικές σημαντικές ιδιότητες:

1) δυνατότητα να αυτοανανεώνονται και 2) δυνατότητα να διαφοροποιούνται σε ώριμα κύτταρα του αίματος και του ανοσολογικού συστήματος. Τα κύτταρα αυτά με το πέρασμα του χρόνου χάνουν τη δυνατότητα να αυτοανανεώνονται και να διαφοροποιούνται. Αρχικά διαφοροποιούνται σε πολυδύναμα (CFU-GEMM) και ολιγοδύναμα (CFU-GM) κύτταρα και τελικά σε μονοδύναμα κύτταρα που πολλαπλασιάζονται και παράγουν τις διάφορες ώριμες κυτταρικές σειρές.

1.6 Ερυθροκυτταροποίηση

Βασικά συστατικά της ερυθροποιητικής συσκευής θεωρούνται 1) το πολυδύναμο αρχέγονο κύτταρο (stem cell), 2) το με προκαθορισμένη αιμοποιητική λειτουργία αρχέγονο κύτταρο (erythroid committed cell) και 3) οι διαφοροποιημένες μορφές των πρόδρομων κυττάρων της ερυθράς σειράς (ερυθροβλάστες). Η ερυθροποίηση ρυθμίζεται με τη βοήθεια συστήματος ορμονών όπως η ερυθροποιητίνη (E.S.F. = Erythropoiesis Stimulating Factor), οι ορμόνες του αδενούποφυσιακού συστήματος, τα ανδρογόνα κ.ά. (Alexanian 1969). Οι ορμόνες αυτές δρώντας επάνω στους νεφρούς και το ήπαρ προκαλούν αύξηση της εκκρίσεως της E.S.F. Η ερυθροποιητίνη δρα στο δεύτερο κυτταρικό διαμέρισμα επιφέροντας διαφοροποίηση του αρχέγονου κυττάρου προς την κατεύθυνση συνθέσεως αιμοσφαιρίνης. Η διαφοροποίηση αυτή των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων *in vitro* συνίσταται αρχικά μεν στη σύνθεση σειράς από πέντε ως έξι διαφορετικά RNA, στη συνέχεια δε στην έναρξη συνθέσεως αιμοσφαιρίνης (Kranz με συνεργ, 1963, Kranz και Goldwasser 1965, Gross και Goldwasser 1969).

Η διαφοροποίηση εξελίσσεται σε τρεις φάσεις: Η πρώτη περιλαμβάνει την καθήλωση της E.S.F. πάνω σε ειδικούς υποδοχείς (receptors) του αρχέγονου κυττάρου. Υπάρχουν ενδείξεις ότι πριν γίνει η καθήλωση, το αρχέγονο κύτταρο παράγει βραχύβιο mRNA απαραίτητο στην κατασκευή κατάλληλου υποδοχέα με τον οποίο θα μπορέσει ακολούθως να συνδεθεί η E.S.F. στην επιφάνεια του κυττάρου (Goldwasser 1966, Duckes 1967).

Στη δεύτερη φάση η E.S.F. δρώντας σαν αποκατασταλτής (derepressor) εκκινεί αποκωδικοποίηση της γενετικής πληροφορίας σχετικά με τη διαφοροποίηση του αρχέγονου κυττάρου σε ώριμη ερυθροβλάστη. Αυτό επιτυγχάνεται ύστερα από δράση της ερυθροποιητίνης επάνω στο γένωμα (genome). Εν συνεχεία αίρεται η αποκατασταλτική (derepressing) δράση δηλαδή ενεργοποιείται η σύνθεση του mRNA στον πυρήνα και πιθανό να προωθείται η αύξηση των t και mRNA με τα οποία ξεκινάει η σύνθεση ειδικών ενζύμων. Τα τελευταία συμμετέχουν στη διαφοροποίηση του ερυθροκυττάρου, ιδιαίτερα στη σύνθεση αίμης (Gross και Goldwasser 1969,

Gordon 1971). Κατά την τρίτη (τελευταία) φάση γίνεται αναγνώριση (ταυτοποίηση) της ερυθροβλάστης βάσει μορφολογικών και βιοχημικών κριτηρίων. Αυτό επιτυγχάνεται με αναγνώριση διαφόρων μορφών RNA που ρυθμίζουν τη μεταφορά σιδήρου μέσα στο κύτταρο (Hrinda και Goldwasser 1969), την ενσωμάτωση του κυττάρου (Dukes με συνεργ. 1963) και τέλος την παραγωγή αιμοσφαιρίνης (Duckes 1967). Σπουδαίος ρυθμιστικός παράγοντας στην περαιτέρω σύνθεση αιμοσφαιρίνης είναι η ίδια η αίμη η οποία συντίθεται μέσα στα μιτοχόνδρια της ερυθροβλάστης κάτω από τον έλεγχο ενζύμων, από τα οποία το σπουδαιότερο είναι η ALA – συνθετάση (Nakao με συνεργ. 1968, Bottomley και Smithee 1969). Ακόμη στη διαδικασία συνθέσεως αιμοσφαιρίνης συμβάλλουν η σύνθεση από τα ριβοσώματα πολυπεπτιδικών αλυσίδων του μορίου της αιμοσφαιρίνης (Winterhalter με συνεργ. 1969) καθώς και η ενσωμάτωση του σιδήρου στο μόριο της πρωτοπορφυρίνης – IX μέσα στα μιτοχόνδρια κάτω από τον έλεγχο του ενζύμου αίμη – συνθετάση (Travell με συνεργ. 1967, London με συνεργ. 1967). Κατά την πρόοδο της ωρίμανσης, τα υποκυτταρικά στοιχεία της ερυθροβλάστης (μιτοχόνδρια, ριβοσώματα κ.ά.) ελαττώνονται προοδευτικά μέχρις εξαφανίσεως, οπότε κάθε συνθετική δραστηριότητα του κυττάρου παύει εντελώς.

1.6.A Ωρίμανση της ερυθράς σειράς

Στο μυελό των οστών υπάρχει καθορισμένος αριθμός αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων τα οποία δέχονται την επίδραση ρυθμιστικών μηχανισμών που καθορίζουν την περαιτέρω εξέλιξή τους σε ώριμα κύτταρα. Ορισμένο ποσοστό των αρχέγονων κυττάρων θα εξελιχθεί σε δύο ανόμοια δευτερογενή αρχέγονα κύτταρα της ερυθράς σειράς: αυτό που αντιδρά δυναμικά και εκείνο που αντιδρά ουσιαστικά στην ερυθροποιητίνη [Potential Erythropoietin Responsive (PER) και Erythropoietin Responsive (ER)]. Η προερυθροβλάστη είναι το πρώτο κύτταρο της ερυθράς σειράς που αναγνωρίζεται μορφολογικά και προέρχεται από το ER-κύτταρο επάνω στο οποίο έδρασε προηγουμένως η ερυθροποιητίνη. Από την προερυθροβλάστη

θα προκύψουν οι πιο ώριμες μορφές κυττάρων της σειράς όπως η βασεόφιλη, η πολυχρωματόφιλη και η οξεόφιλη ορθοβλάστη. Από την τελευταία θα προκύψει το μυελικό δικτυοερυθροκύτταρο το οποίο, αφού παραμείνει μέσα στο χώρο του μυελού των οστών για 24 ως 48 ώρες, θα μετακινηθεί προς την περιφερική κυκλοφορία.

Μετρώντας το συνολικό αριθμό εμπύρηνων μυελικών κυττάρων και λαβαίνοντας υπόψη τον όγκο της μυελικής κοιλότητας στο σύνολό της καθώς και την κυτταροβρίθεια μιας μονάδας μυελικής ουσίας υπολογίστηκε ότι υπάρχουν $8,1 \times 10^9$ εμπύρηννα μυελικά κύτταρα ανά χιλιόγραμμο βάρους σώματος, στο φυσιολογικό ενήλικα (Pegg 1962). Ποσοστό περίπου 23,5% των εμπύρηνων κυττάρων του μυελού είναι ερυθροβλάστες. Συνεπώς ο συνολικός αριθμός των ερυθροβλαστών στο ανθρώπινο σώμα είναι περίπου $2,5 \times 10^9$ κύτταρα/kg. Ο Messener με συνεργάτες (1969) διαίρεσαν τους ερυθροβλάστες με βάση τη διάμετρο του πυρήνα σε πέντε ομάδες: E₁, E₂, E₃, E₄ και E₅. Έτσι από μετρήσεις σε 4 υγιείς μάρτυρες υπολογίστηκε ότι ο αριθμός των ερυθροβλαστών σχεδόν διπλασιάζεται από τη μία προς την επόμενη κυτταρική σειρά. Η αναλογική σχέση μεταξύ των κυτταρικών ομάδων μεταβάλλεται στις διάφορες παθολογικές καταστάσεις.

Συνεπώς ωρίμανση των κυττάρων της ερυθράς σειράς σημαίνει μετάβαση μιας άωρης σε άλλη πιο ώριμη κυτταρική σειρά. Χαρακτηρίζεται, αφενός μεν από προκαθορισμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αφετέρου δε από ανάλογη αύξηση σύνθεσης DNA, RNA, διαφόρων πυρηνικών και άλλων πρωτεϊνών καθώς και μικρής ποσότητας αιμοσφαιρίνης.

1.6.B Λεμφοκυτταρική σειρά

I. Προέλευση των B- κυττάρων

Ο μυελός των οστών και το εμβρυϊκό ήπαρ αποτελούν τις πιθανότερες πηγές προέλευσης των B-λεμφοκυττάρων. Στον άνθρωπο τα πρώτα λεμφοκύτταρα με ανοσοσφαιρίνη επιφάνειας είναι τα κύτταρα που φέρουν

IgM και τα οποία παράγονται στο εμβρυϊκό ήπαρ κατά την 9^η εβδομάδα της εγκυμοσύνης. Τα κύτταρα με IgG επιφάνειας εμφανίζονται περί τη 10^η εβδομάδα και εκείνα με IgA την 11^η εβδομάδα της εγκυμοσύνης. Ακολουθεί η εμφάνιση κυττάρων με IgM, IgG, και IgA στο σπλήνα, το θύμο και το περιφερικό αίμα.

Μετά από 2-4 εβδομάδες ο λεμφοκυτταρικός αυτός υποπληθυσμός εκφράζεται τόσο με μ όσο και δ καθοριστές βαριών αλυσίδων. Τα μ -θετικά B-κύτταρα είναι τα πρόδρομα κύτταρα που απαντούν με την ανοσοσφαιρίνη M στα μη εξαρτημένα από το θύμο αδένια αντιγόνα, ενώ τα μ - και δ -θετικά B-κύτταρα δίνουν την πρωτογενή απάντηση προς τα θυμοεξαρτημένα αντιγόνα με παραγωγή αντισώματος. Η έκφραση των μ , δ και γ αλυσίδων δείχνει το βαθμό ωριμάνσεως των B-κυττάρων. Κατά τη 15^η εβδομάδα της εγκυμοσύνης ο αριθμός των B-κυττάρων που φέρουν στην επιφάνειά τους ανοσοσφαιρίνες είναι ίδιος με εκείνον ενός εμβρύου που βρίσκεται στον τελευταίο μήνα της εγκυμοσύνης. Λεμφοκύτταρα ομφάλιου λώρου εξεταζόμενα για ανοσοσφαιρίνες επιφάνειας είναι θετικά για με IgM σε ποσοστό 10%, ενώ για IgG και IgA με ποσοστά 8 και 2% αντίστοιχα. Η παρουσία IgG επάνω στην κυτταρική μεμβράνη δείχνει προχωρημένο βαθμό ωριμάνσεως των B-κυττάρων. Το μεγαλύτερο ποσοστό των εμβρυϊκών λεμφοκυττάρων φέρουν στην επιφάνειά τους IgD παρά το γεγονός ότι ο ορός του εμβρύου περιέχει ελάχιστη ποσότητα ανοσοσφαιρίνης D.

II. Προέλευση των T- λεμφοκυττάρων

Κύρια πηγή προέλευσης των T-λεμφοκυττάρων θεωρείται ο θύμος αδένας ο οποίος προκαθορίζει και τη λειτουργία τους.

III. Διαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων στο μυελό των οστών

Η διαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων στο μυελό των οστών εξελίσσεται σταδιακά σε τρεις περιόδους, ελέγχεται με ανοσοφθορισμό και αυτοραδιογραφία. Χρονολογικά η πρόσληψη και ακολούθως η ενσωμάτωση τριτιούχου θυμιδίνης ($^3\text{H-TdR}$) και μετέπειτα η εμφάνιση ανοσοσφαιρίνης στην επιφάνεια των λεμφοκυττάρων χαρακτηρίζουν διαφορετικά στάδια ανάπτυξης. Τα στάδια αυτά είναι 1) τα μεγάλα προ-B κύτταρα του μυελού των οστών, 2) τα μικρά προ-B κύτταρα και 3) τα νεαρά B-κύτταρα. Ως μεγάλα προ-B κύτταρα ορίζονται τα μεγάλα λεμφοειδή κύτταρα (με μέση διάμετρο $14,2\pm 1,3\mu$) που δείχνουν έντονη δραστηριότητα διαιρέσεως και έχουν την ιδιότητα να συνθέτουν IgM στο πρωτόπλασμα τους αλλά που δεν εκφράζονται με υποδοχείς Ig στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταρικής τους μεμβράνης. Ως μικρά προ-B κύτταρα θεωρούνται τα μικρά λεμφοειδή κύτταρα (με μέση διάμετρο $8,3\pm 0,6\mu$). Συνθέτουν μη επανακυκλούμενο πληθυσμό μεταμιτωτικών κυττάρων που διατηρούν την ικανότητα σύνθεσης πρωτοπλασματικής IgM ενώ στερούνται ικανότητας να εκφραστούν με ανοσοσφαιρίνη επιφάνειας M. Τα κύτταρα αυτά παριστάνουν το νεαρότερο πληθυσμό μικρών λεμφοκυττάρων μέσα στο μυελό των οστών. Μορφολογικά είναι απολύτως όμοια με τα μικρά ώριμα B-ή T- λεμφοκύτταρα. Η μεταμιτωτική ωρίμανση των μη επανακυκλούμενων μικρών προ-B κυττάρων ολοκληρώνεται όταν αυτά αποκτήσουν ορισμένο αριθμό δεικτών επιφάνειας, όπως Ig, Fc και C3 μέσα σε χρονικό διάστημα 72 ωρών. Τα λεμφοκύτταρα του μυελού των οστών, τα θετικά για πρωτοπλασματική Ig αλλά αρνητικά για Ig επιφάνειας, μελετούμενα με ανοσοφθορισμό εμφανίζουν σημαντικές διαφορές μεγέθους και μορφολογίας. Αντίθετα τα ίδια κύτταρα μελετούμενα με $^3\text{H-TdR}$ κατατάσσονται με βάση το μέγεθος σε δύο κατηγορίες: τα κυκλούμενα μεγάλα και τα μη κυκλούμενα μικρά προ-B λεμφοκύτταρα.

Τα κυκλούμενα μεγάλα B- κύτταρα είναι τα μόνα κύτταρα που είναι ικανά να προχωρήσουν σε αυτόματη σύνθεση DNA. Τα μη κυκλούμενα μικρά B- κύτταρα προέρχονται από τα μεγάλα προ-B κύτταρα ύστερα από μιτωτικές διεργασίες. Τελικά αποδείχθηκε ότι ο μυελός των οστών περιέχει μικρά λεμφοκύτταρα που βρίσκονται σε διαφορετικά στάδια ωρίμανσης και

διαφοροποίησης. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται και κύτταρα που βρίσκονται σε στάδιο πλήρους ωριμότητας και που έχουν τις ίδιες ιδιότητες με τα αντίστοιχα κύτταρα του περιφερικού αίματος. Από τα μικρά αυτά κύτταρα του μυελού των οστών θα προκύψουν διάφορες κυτταρικές σειρές, οι πληθυσμοί των οποίων θα αναπτύξουν περαιτέρω ορισμένες χαρακτηριστικές ικανότητες (B, T, Null λεμφοκύτταρα). Σήμερα συζητείται ο ρόλος αυτών των προ-B κυττάρων στη γένεση διαφόρων παθολογικών καταστάσεων. Έτσι μερικές φορές, εκτός από τη μελέτη των δεικτών επιφάνειας απαιτείται ο έλεγχος παρουσίας ή μη πρωτοπλασματικής ανοσοσφαιρίνης καθώς και ο έλεγχος της κινητικής ωρίμανσης των κυττάρων με σήμανση του DNA του πυρήνα τους με $^3\text{H-TdR}$

1.7 Οξεία Λευχαιμία

Τα κύτταρα της λευκής σειράς του μυελού των οστών είναι ιδιαίτερα επιρρεπή σε κάθε είδους νεοπλασματική αλλαγή η οποία έχει σαν αποτέλεσμα τη συσσώρευση άωρων λεμφοκυττάρων στους διάφορους ιστούς κυρίως όμως στο μυελό των οστών.

Η νεοπλασματική αλλαγή μπορεί να συμβεί σε οποιαδήποτε από τις τρεις ποικιλίες λεμφοκυττάρων – τα κοκκιοκύτταρα, τα λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα – και σε οποιοδήποτε πρώιμο ή όψιμο στάδιο της αναπτύξεώς τους. Η αιτιολογία της οξείας λευχαιμίας είναι άγνωστη, αν και φαίνεται ότι παίζουν ρόλο στη γέννησή της παράγοντες γενετικοί καθώς και περιβαλλοντικοί. Η σημασία των γενετικών παραγόντων διαφαίνεται μέσα από πειράματα που έγιναν σε ζώα. Ακόμη οι εκδηλώσεις λευχαιμίας σε άτομα με χρωμοσωμικές ανωμαλίες όπως το σύνδρομο Down (Merrit με συνεργ. 1956), η αναιμία Fanconi (Fanconi 1927), το σύνδρομο Bloom (Bloom 1954) και το σύνδρομο Louis-Bar βοηθούν αυτόν το συσχετισμό. Στους περιβαλλοντικούς παράγοντες περιλαμβάνονται η ιονίζουσα ακτινοβολία, διάφορες ουσίες με ιδιότητες ιού που μπορούν να μεταβιβαστούν από τον ένα οργανισμό στον άλλο, το βενζόλιο καθώς και ουσίες που προκαλούν απλασία του μυελού όπως η χλωραμφενικόλη και η φαινυλβουταζόνη. Η ιονίζουσα ακτινοβολία

συσχετίζεται με την οξεία λευχαιμία σύμφωνα με παρατηρήσεις που έγιναν σε άτομα τα οποία λόγω επαγγέλματος λαμβάνουν μεγάλες δόσεις ακτινοβολίας ή που θεραπεύτηκαν με ακτινοβολία στα οστά, όπως εκείνα που έλαβαν ραδιενεργό φωσφόρο για θεραπεία της πολυκυτταραιμίας Rubra Vera καθώς και την υψηλή συχνότητα λευχαιμίας που παρατηρήθηκε στον πληθυσμό της Hiroshima μετά την έκρηξη ατομικής βόμβας. Τελευταία παρατηρήθηκαν πολλά κρούσματα οξείας λευχαιμίας σε αρρώστους με μυέλωμα ή νόσο του Hodgkin που θεραπεύτηκαν για μακρό χρονικό διάστημα με αλκυλιούντες παράγοντες. Στις περιπτώσεις αυτές δεν είναι γνωστό αν η λευχαιμία αποτελεί συνέχεια της ίδιας νόσου ή είναι αποτέλεσμα της χορηγηθείσας θεραπείας.

Η διάγνωση της οξείας λευχαιμίας θα τεθεί βασικά από την παρουσία άωρων μυελικών κυττάρων στο μυελό των οστών τα οποία αντικαθιστούν προοδευτικά και με γρήγορο ρυθμό τα στοιχεία των υπόλοιπων κυτταρικών σειρών. Το δυσκολότερο διαγνωστικό πρόβλημα δημιουργείται κατά την ταξινόμηση του υπεύθυνου λευχαιμικού κυττάρου. Πριν από την χορήγηση οποιασδήποτε θεραπείας ο μυελός των αρρώστων είναι υπερκυτταρικός και περιέχει ελάχιστο λιπώδη ιστό. Ποσοστό 30-95% των εμπύρηνων μυελικών κυττάρων είναι βλάστες. Στην οξεία μυελοβλαστική λευχαιμία τα κακοήθη κύτταρα εμφανίζουν ομοιομορφία από πλευράς μεγέθους και ομαλό περίγραμμα σε σχέση με τα αντίστοιχα κύτταρα της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας. Επίσης οι μυελοβλάστες περιέχουν περισσότερα πυρήνια (3-5) ανά πυρήνα, η δε πυρηνοπλασματική τους σχέση είναι χαμηλότερη σε σύγκριση με εκείνη των λεμφοβλαστών. Υπάρχει μικρό ποσοστό μυελοβλαστών ή μονοβλαστών οι οποίοι περιέχουν στο πρωτόπλασμά τους σωμάτια Auer τα όποια είναι διαγνωστικά της μυελοβλαστικής και της μυελομονοκυτταρικής λευχαιμίας. Με τις χρωστικές Romanowsky εμφανίζονται σαν αζουρόφιλα ραβδία τα οποία δίνουν θετική την αντίδραση υπεροξειδάσης και έντονα θετική την αντίδραση με τη χρωστική Sudan black. Τα σωμάτια Auer περιέχουν όξινη φωσφατάση (White 1967), σχηματίζονται δε κατά τη σύντηξη των πρωτογενών κοκκίων (Freeman 1966). Οι μυελοβλάστες βάφονται αδρά με τη χρωστική black, ενώ οι βλάστες της μυελομονοκυτταρικής λευχαιμίας εμφανίζουν λεπτή κοκκιώδη όψη (ποσοστό θετικών κυττάρων >5%). Οι

μυελοβλάστες δίνουν θετική την αντίδραση υπεροξειδάσης σε ποσοστό επίσης μεγαλύτερο του 5%, ενώ είναι αρνητικοί στην αντίδραση PAS. Αντίθετα οι λεμφοβλάστες δίνουν αρνητική την αντίδραση στη χρώση τόσο με Sudan black όσο και με υπεροξειδάση. Τα ουδετερόφιλα κοκκιοκύτταρα του περιφερικού αίματος των αρρώστων με οξεία μυελοβλαστική λευχαιμία δίνουν αρνητική ή εξαιρετικά μειωμένη την αντίδραση της αλκαλικής φωσφατάσης (Hayhoe με συνεργ. 1964). Τα παραπάνω στοιχεία δείχνουν ότι στην οξεία λευχαιμία υπάρχει βαθιά διατάραξη του μηχανισμού παραγωγής τόσο των πρωτογενών όσο και των ειδικών κοκκίων.

Το επίπεδο της μουραμιδάσης τόσο στην μυελοβλαστική όσο και τη μονοβλαστική λευχαιμία είναι υψηλό.

Το μεγαλύτερο ποσοστό μυελοβλαστών έχουν διπλοειδές DNA στον πυρήνα τους (Müller 1966). Επίσης, ένα μεγάλο ποσοστό αυτών που ενσωματώνουν ισότοπο κατά τη σήμανσή τους με τριτιούχο θυμιδίνη είναι μορφολογικά τυπικά κύτταρα λευχαιμίας, ενώ τα κύτταρα που δεν ενσωματώνουν το ισότοπο είναι άτυπα βλαστικά κύτταρα (Killman 1965). Τα μεγάλα βλαστικά κύτταρα βρίσκονται σε δραστήρια φάση του κυτταρικού κύκλου, ενώ τα μικρά βρίσκονται σε φάση ηρεμίας. Μετά τη χορήγηση του ισότοπου ο αριθμός των σημανθέντων (μεγάλων) βλαστικών κυττάρων αρχίζει να μειώνεται προοδευτικά, ενώ ταυτόχρονα αρχίζει ανάλογη προοδευτική αύξηση των σεσημασμένων μικρών βλαστικών κυττάρων. Αυτό δείχνει ότι τα μικρά βλαστικά κύτταρα προέρχονται από τη διαίρεση των μεγάλων κυττάρων. Το γεγονός δε ότι υπάρχει προϊούσα μείωση του ποσοστού των σεσημασμένων μεγάλων κυττάρων σημαίνει ότι αυτά δεν ανήκουν στον πληθυσμό των μητρικών αρχέγονων κυττάρων (stem cells), τουλάχιστον όσον αφορά το λευχαιμικό κυτταρικό κλώνο αλλά ότι ο αριθμητικός τους χώρος συμπληρώνεται συνεχώς με κύτταρα που προέρχονται από το χώρο των stem cells (Maner και Fisher 1966). Ο Killman (1968) λαμβάνοντας υπόψη το μιτωτικό δείκτη, το δείκτη σήμανσεως και το χρόνο συνθέσεως DNA των λευχαιμικών βλαστικών κυττάρων υπολόγισε το χρόνο μιτώσεως σε μία ώρα, ενώ η περίοδος S των φυσιολογικών αιμοποιητικών κυττάρων υπολογίσθηκε σε 13-14 ώρες (Clarkson με συνεργ. 1967, Saunders με συνεργ. 1967,

Gavosto με συνεργ. 1967). Ο κυτταρικός κύκλος ποσοστού 95% των λευχαιμικών βλαστικών κυττάρων είναι σημαντικά επιμηκυσμένος (25-360h) σε σύγκριση μ' εκείνον των φυσιολογικών πρόδρομων κοκκιοκυττάρων (15-20h).

Από άποψη ταξινόμησης υπάρχουν τρεις (οι πιο συνήθεις) τύποι λευχαιμίας: η μυελογενής, η λεμφογενής και η μονοκυτταρική· καθένας δε από τους τρεις τύπους υποδιαιρείται σε οξεία και χρόνια μορφή. Οι χρόνιες μορφές είναι σπανιότερες στις μικρότερες ηλικίες, ενώ οι οξείες κατανέμονται περισσότερο ομοιόμορφα στις ομάδες των διαφόρων ηλικιών. Συνήθως η χρόνια μυελογενής λευχαιμία αφορά τη σειρά των ουδετορόφιλων κοκκιοκυττάρων. Ενίοτε όμως αναφέρονται περιπτώσεις ηωσινοφιλικής και βασεοφιλικής λευχαιμίας. Τόσο η μεγακαρυοκυτταρική όσο και η πλασματοκυτταρική λευχαιμία αποτελούν σπάνιες μορφές λευχαιμίας.

Ποσοστό 5-10% των περιπτώσεων οξείας λευχαιμίας χαρακτηρίζεται σαν λευχαιμία του αρχέγονου μητρικού κυττάρου (stem cell leukaemia). Η κατάταξη γίνεται με βάση την πλήρη έλλειψη κοκκίων από το πρωτόπλασμα των βλαστικών κυττάρων καθώς και τη διαφοροποίησή τους απέναντι στις κυτταροχημικές (ιστοχημικές) χρωστικές (Hayhoe και Flemans 1969). Οι πληροφορίες αυτές που είναι χρήσιμες για την κατάταξη των κυττάρων αποδεικνύουν ότι για τα κύτταρα αυτά υφίσταται πρόβλημα διαφοροποίησης κι αυτή είναι η αιτία που χαρακτηρίζονται σαν αρχέγονα κύτταρα (stem cells) και η λευχαιμία τους σαν stem cell leukaemia.

Η παραγωγή μεγάλου αριθμού λευχαιμικών βλαστικών κυττάρων στο μυελό των οστών οδηγεί σε εκσεσημασμένη και συχνά σοβαρή πτώση της παραγωγής φυσιολογικών κοκκιοκυττάρων. Ανάλογη είναι η ελάττωση παραγωγής ερυθροποιητικών στοιχείων καθώς και μεγακαρυοκυττάρων με αποτέλεσμα την ανάπτυξη αναιμίας και θρομβοκυτταροπενίας αντίστοιχα. Και η μεν αναιμία εκδηλώνεται με τα γνωστά συμπτώματα και σημεία της αναιμίας (ωχρότητα δέρματος και βλεννογόνων, βραχύπνοια, ταχεία κόπωση, οιδήματα άκρων κ.λπ.), ενώ η θρομβοκυτταροπενία με αιμορραγίες (ούλων, ρινορραγίες, πετέχειες κ.λπ.). Όταν ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων ανέλθει στις 200.000/μL, δημιουργούνται αποφράξεις στα αγγεία του

εγκεφάλου με ενδοκρανιακές αιμορραγίες (McKee και Colins 1974). Οι άρρωστοι με λεμφοκυτταρική λευχαιμία εμφανίζουν σε υψηλή συχνότητα λευχαιμία στις μήνιγγες (Skeel με συνεργ. 1968), ενώ συχνά ανευρίσκονται μέσα στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό παθολογικά κύτταρα πριν ακόμη εμφανιστούν τα συμπτώματα της νόσου. Επί οξείας λευχαιμίας οι άρρωστοι είναι επιρρεπείς σε λοιμώξεις ιδιαίτερα με Gram (-) βακτηρίδια και μύκητες. Οι λευχαιμικοί άρρωστοι παθαίνουν λοιμώξεις από την ίδια τη δική τους χλωρίδα· συνήθως όμως προσβάλλονται από νοσοκομειακές λοιμώξεις, ιδιαίτερα την ψευδομονάδα (Bodey 1966, Schimpff με συνεργ. 1972).

Οι λοιμώξεις οφείλονται σε κακή λειτουργία των ώριμων ουδετερόφιλων κοκιοκυττάρων.

Ενίοτε αναπτύσσονται μάζες κυττάρων υπό μορφήν όγκων κάτω από το περιόστεο, οι οποίες φέρνουν την επωνυμία «χλώρωμα». Όταν τέτοιοί όγκοι αναπτυχθούν μέσα στους οφθαλμικούς κόγχους, μπορούν να προκαλέσουν τύφλωση από αύξηση της πίεσεως και η διήθηση ορισμένων ανατομικών στοιχείων του οφθαλμού. Εξαιτίας αυτών των διηθήσεων αναπτύσσεται υπερασβεστιαμία η οποία μαζί με την υπερουριχαιμία μπορούν να προκαλέσουν αποφρακτική ουροπάθεια. Οι άρρωστοι αναπτύσσουν βλάβες τόσο στο μηχανισμό διήθησης των μαλπιγιανών σωματίων όσο και στη λειτουργία των εγγύς νεφρικών σωληναρίων. Τα χορηγούμενα φάρμακα εναντίον της νόσου θεωρούνται στην πλειονότητά τους νεφροτοξικά. Ακόμη οι ασθενείς με οξεία λευχαιμία και κυρίως οξεία προμυελοκυτταρική αναπτύσσουν σύνδρομο υπερπηκτικότητας (consumption coagulopathy), το οποίο υποχωρεί μόνο όταν η νόσος εισέλθει σε περίοδο υφέσεως.

1.8 Λεμφαδένας

Ο λεμφαδένας είναι κατασκευασμένος από κάψα, φλοιώδη και μυελώδη ουσία καθώς και λεμφοκόλπους. Η κάψα αποτελείται από ινώδη συνδετικό ιστό ο οποίος καταδύεται κατά τόπους βαθιά στο παρέγχυμα του λεμφαδένα σχηματίζοντας έτσι τις ινώδεις δοκίδες. Η φλοιώδης μοίρα κείται στην περιφέρεια και αποτελείται από συρρέοντα μικρά λεμφοκύτταρα.

Χαρακτηριστικό της γνώρισμα είναι η ύπαρξη λεμφοζιδίων τα οποία εκπροσωπούν το Β-κυτταρικό σύστημα ενώ παλαιότερα θεωρούνταν τόπος παραγωγής λεμφοκυττάρων. Ο περιφερικός λεμφόκολλπος κείται αμέσως κάτω από την κάψα του λεμφαδένα, περιβάλλει το λεμφαδενικό ιστό και δέχεται τα προσαγωγά λεμφαγγεία. Ο λεμφόκολλπος αναστομώνεται με πλήρες δίκτυο κολλποειδών που υπάρχει τόσο στη φλοιώδη όσο και τη μυελώδη μοίρα. Τελικά ολόκληρο το δίκτυο των κολλποειδών παροχετεύει τη λέμφο προς τα απαγωγά λεμφαγγεία της πύλης του αδένα. Συνέχεια του φλοιού υπάρχει ο παραφλοιός ο οποίος εκπροσωπεί το Τ-κυτταρικό σύστημα (θυμοεξαρτημένη ζώνη). Αποτελείται από μικρά λεμφοκύτταρα τα οποία δείχνουν μεγαλύτερη διασπορά σε σύγκριση με την πυκνή διάταξή τους στο φλοιό. Δεν υφίσταται σαφής διαχωρισμός μεταξύ φλοιού και μυελώδους μοίρας. Η μυελώδης μοίρα στερείται λεμφοζιδίων, αποτελείται δε από λεμφοκύτταρα τα οποία διατάσσονται σε δοκίδες οι οποίες τελικά κατευθύνονται προς την πύλη του λεμφαδένα. Ανάμεσά τους υπάρχει μικρό ποσοστό πλασματοκυττάρων. Ο χώρος μεταξύ των λεμφοκυττάρων δοκίδων καταλαμβάνεται από λεμφικά κολλποειδή.

1.8.A Ιστοπαθολογία των Τ-περιοχών

Η κυτταρική ανοσία εκφράζεται μέσω της Τ-κυτταρικής σειράς. Η απουσία του θύμου αδένα επιφέρει ερήμωση από λεμφοκύτταρα ορισμένων περιοχών του λεμφικού ιστού. Τέτοιες περιοχές είναι εκείνες που κατοικούνται από Τ-λεμφοκύτταρα (θυμοεξαρτημένες περιοχές), βρίσκονται δε στην παραφλοιώδη μοίρα του λεμφαδένα. Σε μερικούς (επιλογής) λεμφαδένες η συγκρότηση των Τ-περιοχών είναι κατά όζους οι οποίοι ονομάζονται τριτογενή λεμφοζίδια (Τ-όζοι). Διάχυτη οζώδης υπερπλασία της Τ-περιοχής αναφέρεται σε ορισμένες παθολογικές καταστάσεις (ιώσεις, λιπομελανωτική δερματοπάθεια).

Ιστολογικά χαρακτηριστικά της Τ-περιοχής είναι τα ιστοκύτταρα που συμπλέκονται μεταξύ τους με πλατιές θηλώδεις προεκβολές του πρωτοπλάσματος (interdigitation) οι οποίες φέρνουν σε επαφή το ένα

κύτταρο με το άλλο. Ενδέχεται τα κύτταρα αυτά να αποτελούν το μικροπεριβάλλον που είναι απαραίτητο για τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των Τ-λεμφοκυττάρων. Ένα δεύτερο ιστολογικό στοιχείο της Τ-περιοχής είναι τα PAS-θετικά μετατριχοειδικά φλεβίδια τα οποία φαίνεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην επανακυκλοφορία των λεμφοκυττάρων. Σήμερα πιστεύεται ότι η κυκλοφορία των λεμφοκυττάρων γίνεται στους μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων χώρους. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα υφίστανται συνεχείς μεταβολές του σχήματος και του μεγέθους τους όταν βρίσκονται σε πλήρη δραστηριότητα. Όταν η επανακυκλοφορία των λεμφοκυττάρων σταματήσει, όπως μετά από χορήγηση ακτινοβολίας ή στην περίπτωση ανοσολογικών διαταραχών, τα ενδοθηλιακά κύτταρα αποπλατύνονται. Αντίθετα όταν υπάρχει δραστήρια κυκλοφορία, τα κύτταρα διογκώνονται και αυξάνεται το πάχος της κυτταρικής τους μεμβράνης.

Παρά το γεγονός ότι οι δύο βασικές ομάδες λεμφοκυττάρων (B και T) δείχνουν σε ορισμένο βαθμό χωροταξική αυτοτέλεια (B και T περιοχές), εντούτοις σε επίπεδο λειτουργίας υπάρχει στενή συνεργασία μεταξύ τους. Όταν υπάρξει αντιγονική διέγερση, η ανοσολογική απάντηση είναι αποτέλεσμα συνεργασίας τόσο των T και B λεμφοκυττάρων όσο και των μακροφάγων. Η παραγωγή λ.χ. αντισώματος σαν απάντηση σε αντιγονική διέγερση είναι το αποτέλεσμα μιας τέτοιας συνεργασίας. Ο ρόλος των μακροφάγων φαίνεται ότι είναι ρυθμιστικός.

Με τη βοήθεια της ιστοχημείας επιτυγχάνεται η αναγνώριση των T και B κυτταρικών περιοχών σε ιστολογικά παρασκευάσματα λεμφαδένα.

Κατάλληλες ιστοχημικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για το σκοπό αυτό είναι η μη ειδική εστεράση, η όξινη φωσφατάση (Leder 1967), η αδενοσίνη – τριφωσφατάση (Lennert και Rinneberg 1961, Møller – Hermelink με συνεργ. 1974), η 5- νουκλεοτιδάτη (Lennert και Rinneberg 1961) και η αλκαλική φωσφατάση.

B-κυτταρική περιοχή

Τα δενδριτικά δικτυοκύτταρα παρουσιάζουν έντονη αντίδραση στην 5-νουκλεοτιδάση. Τα λεμφοκύτταρα της περιλεμφοζυδιακής ζώνης δίνουν επίσης

θετική την αντίδραση της 5-νουκλεοτιδάσης. Αντίθετα τα λεμφοκύτταρα και τα δικτυο-κύτταρα της T-περιοχής είναι αρνητικά ως προς το συζητούμενο ένζυμο. Η ATP-άση είναι αυξημένη στα λεμφοκύτταρα της περιλεμφοζιδιακής ζώνης και τα πλασματοκύτταρα.

T-κυτταρική περιοχή

Τα δικτυοκύτταρα παρουσιάζουν έντονη την αντίδραση ATP-άσης, ασθενή την αντίδραση όξινης φωσφατάσης γύρω από τον πυρήνα και μόλις ανιχνεύσιμη αντίδραση μη ειδικής εστεράσης.

1.8.B Λεμφοκύτταρα

Ο πληθυσμός των λεμφοκυττάρων είναι μορφολογικά και λειτουργικά ανομοιογενής. Για να γίνει ο χαρακτηρισμός και η ομαδοποίησή τους χρειάστηκαν διάφορες τεχνικές που η καθεμιά τους βασίζεται σε διαφορετική αρχή όπως είναι το μέγεθος των κυττάρων, το ηλεκτροφορητικό τους φορτίο, η παρουσία αντιγονικών καθοριστών στην κυτταρική μεμβράνη, η κινητική και η ευαισθησία τους στα φάρμακα ή την ακτινοβολία κ.ά.

Σήμερα ανάλογα με το μέγεθός τους τα λεμφοκύτταρα ταξινομούνται σε μικρά, μεσαία και μεγάλα. Ο διαχωρισμός αυτός είναι αυθαίρετος εφόσον υπάρχει συνεχόμενο φάσμα μεγέθους από το μικρό μέχρι το μεγάλο λεμφοκύτταρο. Τα λεμφοκύτταρα κατανέμονται στο περιφερικό αίμα και τα λεμφικά όργανα, αποτελούν δε το κυριότερο κυτταρικό υλικό των λεμφαδένων, του γαστρεντερικού λεμφικού ιστού (αμυγδαλών, σκωληκοειδούς αποφύσεως, παύερειων πλακών), του θύμου αδένου, του σπλήνα και του μυελού των οστών. Σ' αυτά τα όργανα, εκτός από το θύμο αδένου, τα λεμφοκύτταρα είναι διασπαρμένα και υποστηρίζονται από ένα τρισδιάστατο πλέγμα δικτυωτών ινών που κατασκευάζεται από τα λεγόμενα κύτταρα δικτύου. Τα τελευταία, εκτός από την ικανότητά τους να κατασκευάζουν το δικτυωτό πλέγμα, διαθέτουν έντονη φαγοκυτταρική ικανότητα και εξειδικευμένη λειτουργικότητα όπως ικανότητα εγκλωβισμού διαφόρων αντιγόνων κ.α.

Είναι απόλυτα παραδεκτό σήμερα ότι τα λεμφοκύτταρα είναι υπεύθυνα για τις ανοσολογικές αντιδράσεις. Ως προς τις τελευταίες τα κύτταρα αυτά θεωρούνται ως ανομοιογενής πληθυσμός που αποτελείται από δύο τουλάχιστον είδη κυττάρων με διαφορετικές λειτουργίες και ιδιότητες, τα T και B λεμφοκύτταρα. Και ενώ τα κύτταρα αυτά παριστάνουν ξεχωριστούς πληθυσμούς, διάφορες μελέτες αποδεικνύουν ότι υφίστανται πολλές περιοχές συνεργασίας μεταξύ τους.

Πιστεύεται ότι και τα δύο είδη προέρχονται από το ίδιο αρχέγονο κύτταρο (stem cell) του μυελού των οστών. Πιστεύεται ακόμη ότι υπάρχουν ξεχωριστές «δεξαμενές» μεταναστευτικών μητρικών κυττάρων (stem cells) για τα B και T λεμφοκύτταρα χωρίς προκαθορισμένη λειτουργία (precommitted stem cells).

Έτσι οι όροι T- και B-λεμφοκύτταρα χαρακτηρίζουν δύο ξεχωριστές λειτουργίες των λεμφοκυττάρων. Τα T-λεμφοκύτταρα προερχόμενα από το θύμο αδένι μεταναστεύουν προς τα περιφερικά λεμφικά όργανα (λεμφαδένες, σπλήνας και αίμα) κατά τη διάρκεια της εμβρυονικής ζωής. Τα B-λεμφοκύτταρα ωριμάζουν κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης μέσα σε ισοδύναμο προς το θύλακα του Fabricius όργανο. Τα T-λεμφοκύτταρα λειτουργούν ως δραστικά κύτταρα στις αντιδράσεις της κυτταρικής ανοσίας, συνεργάζονται με τα B-κύτταρα στην παραγωγή αντισωμάτων (βοηθητική λειτουργία) και καταστέλλουν ορισμένες λειτουργίες των B-κυττάρων (κατασταλτική λειτουργία). Ύστερα από κατάλληλη αντιγονική διέγερση τα B-λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται προς πλασματοκύτταρα τα οποία ακολούθως εκκρίνουν αντισώματα.

Οι διάφορες κατηγορίες λεμφοκυττάρων φέρουν στην επιφάνεια τους αναγνωριστικά μόρια (δείκτες επιφάνειας) των οποίων η σύνθεση ρυθμίζεται γενετικώς.

1.9 Η ΟΞΕΙΑ ΛΕΜΦΟΒΛΑΣΤΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ ΟΛΛ

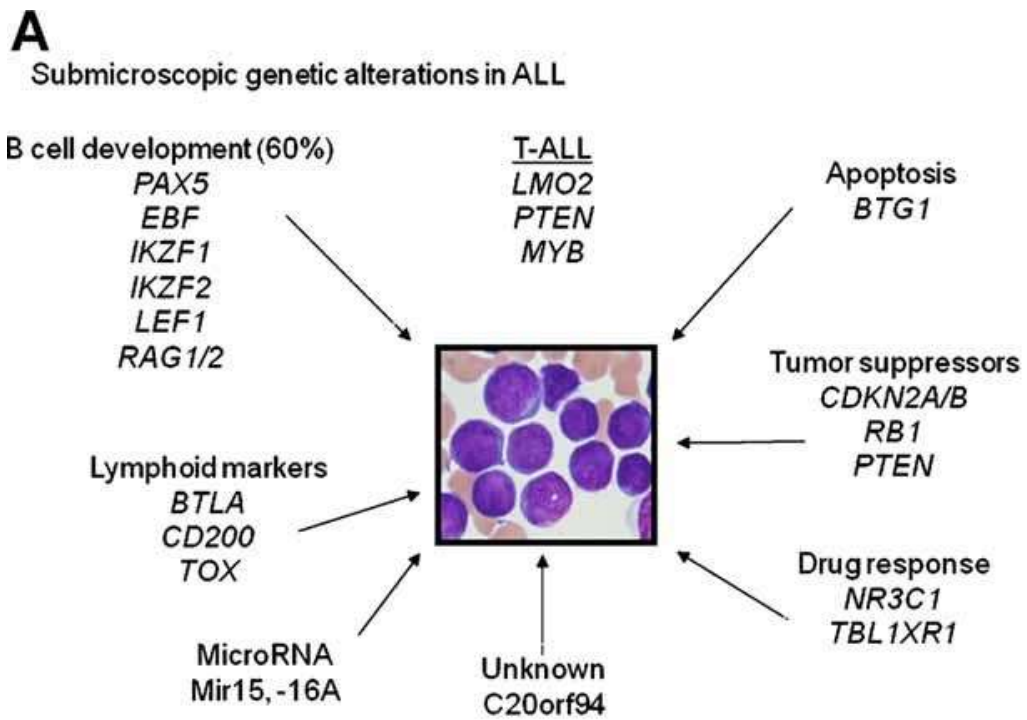
Η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία ΟΛΛ είναι ο πιο διαδεδομένος τύπος καρκίνου, όπως επίσης η πιο κοινή μορφή λευχαιμίας της παιδικής ηλικίας (Pui et al 1998). Στην πλειονότητα των ασθενών με ΟΛΛ τα λευχαιμικά κύτταρα εκφράζουν στην επιφάνειά τους πληθώρα αντιγονικών πρωτεϊνών, οι οποίες εντοπίζονται σε διακριτά στάδια κατά την ωρίμανση των φυσιολογικών προγονικών Β – ή Τ – λεμφοκυττάρων.

Έτσι οι λευχαιμικές σειρές των ασθενών με ΟΛΛ θεωρείται ότι προέρχονται από οποιοδήποτε λεμφοειδές κύτταρο του οποίου η ανάπτυξη σταματά σε αρχικό στάδιο (Pui et al 1993). Τα χαρακτηριστικά της ΟΛΛ και άλλων τύπων καρκίνου είναι η προοδευτική εμφάνιση ενός κακοήθους κυττάρου του οποίου η συμπεριφορά πυροδοτείται από την ανάπτυξη μιας παραλλαγμένης γονιδιακής λειτουργίας (Ponder et al 2001).

Πολλές αλλαγές στη γονιδιακή λειτουργία προέρχονται από γενετικές ανωμαλίες που διακόπτουν κωδικές περιοχές του γονιδίου. Κυτταρογενετικές και μοριακές μελέτες στην ΟΛΛ αποκαλύπτουν μια μεγάλη ετερογένεια μεταθέσεων που περιλαμβάνονται στη συγκεκριμένη νόσο, οι οποίες μπορούν ή να απορυθμίσουν ένα άθικτο γονίδιο διακόπτοντας ή απομακρύνοντας και επανατοποθετώντας γενετικά στοιχεία ελέγχου ή να δημιουργήσουν ένα νέο γονίδιο διάχυσης (χειμαιρικό γονίδιο-fusion gene).

Οι χρωμοσωμικές μεταθέσεις είναι ένα σαφώς σημαντικό στάδιο ογκογένεσης στην ΟΛΛ και τα δομικώς μεταλλαγμένα γονίδια παίζουν ρόλους κλειδιά στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Pui et al 1990), στην διαφοροποίηση, την απόπτωση και στην μεταγραφή του γονιδίου. Αν και αυτές οι μοριακές ανωμαλίες μπορούν να χρησιμεύσουν ως διαγνωστικοί και προγνωστικοί δείκτες στην παρακολούθηση της ελάχιστης υπολειμματικής νόσου (MRD), την πρόιμη υποτροπή και απόκριση στη θεραπεία, είναι ανιχνεύσιμοι σε χαμηλά επίπεδα, και σε συγκεκριμένους μορφολογικούς υποτύπους της ΟΛΛ (Faderl et al 1998). Επομένως, ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια που συχνά εμφανίζονται μεταλλαγμένα σε συμπαγείς όγκους όπως το *p53* και το *RAS*, σπανίως εμφανίζονται

μεταλλαγμένα στην ΟΜ (Wada et al 1993). Η εικόνα 1 παρουσιάζει γενετικές αλλαγές που απαντώνται σε διάφορα γονίδια τα οποία σχετίζονται ή εμφανίζονται σε διάφορους τύπους οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας όπως η Τ-λευχαιμία, η λευχαιμία BCR-ABL1 κλπ.



- B**
Genetic alterations in BCR-ABL1-like ALL
- BCR-ABL1, IKZF1 deletion (80%), CDKN2A/B deletion, PAX5 deletion
 - CLRF2 rearrangement, JAK mutation, [other mutations], IKZF1 deletion/mutation
 - Kinase/cytokine receptor rearrangements [e.g. STRN3-JAK2, NUP214-ABL1] IKZF1 deletion/mutation

Εικόνα 1: Κυτταρογενετικές αλλαγές στην ΟΜ (από Hunger et. al.,2011).

Ωστόσο είναι καταφανές ότι επιγενετικά γεγονότα ή κληρονομήσιμες αλλαγές της γονιδιακής έκφρασης βασίζονται σε παράγοντες διαφορετικούς από την αλληλουχία του DNA και είναι κρίσιμοι στην ανάπτυξη του όγκου (Jones et al, 1993 ; Woltte et al 1999 ; Tycko et al, 2000, Jones et al, 2002).

1.10 Μοριακοί δείκτες στις αιματολογικές κακοήθειες

Από γενετική σκοπιά η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία είναι μια εκ των καλύτερα χαρακτηρισμένων αιματολογικών κακοηθειών. Αριθμητικές και δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες εντοπίζονται με τεχνικές κυτταρογενετικής, με φθορίζοντα *in situ* υβριδισμό (FISH), με PCR και προσφάτως με αλληλούχιση νέας γενιάς (next generation sequencing) (Juarez et al., 2014).

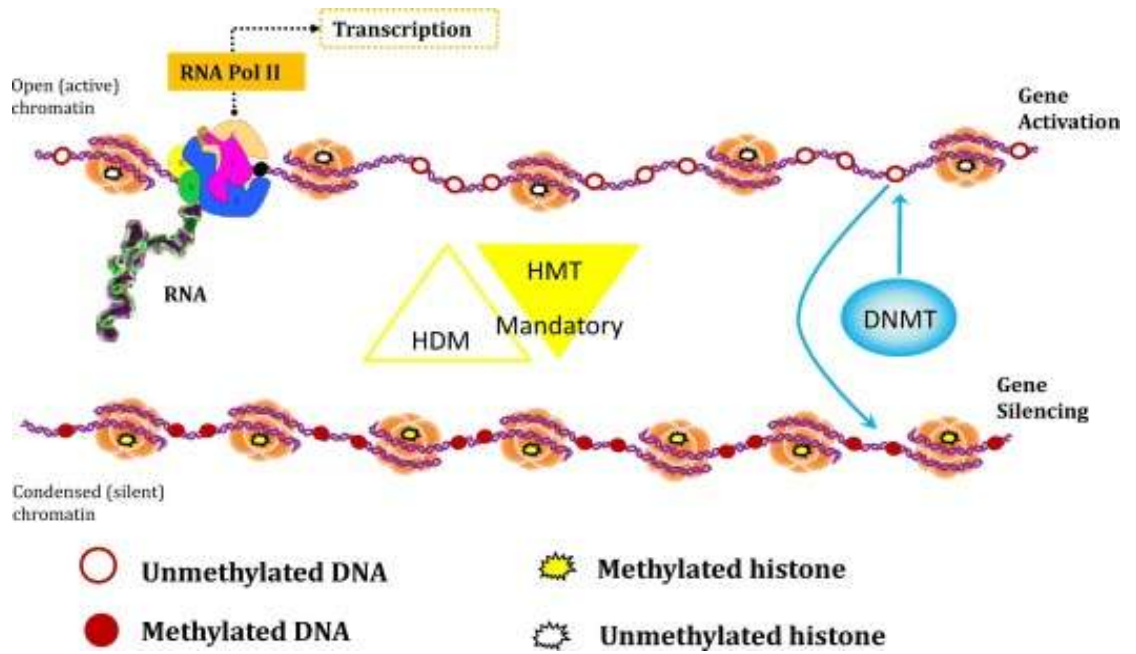
Η πιο γνωστή δομική χρωμοσωμική ανωμαλία στην ΟΛΛ, που εντοπίζεται με την βοήθεια της κυτταρογενετικής, δηλαδή με ανάλυση των χρωμοσωμάτων των καρκινικών κυττάρων (τους βλάστες) είναι το χρωμόσωμα Philadelphia. Προκαλείται από την αμοιβαία μετατόπιση του γονιδίου *BCR* (*Breakpoint cluster region*), που εδράζεται στην χρωμοσωμική περιοχή 22q11.23 και του γονιδίου *ABL1* (*Abelson tyrosine-protein kinase 1*) της χρωμοσωμικής ζώνης 9q34.1. Το αποτέλεσμα είναι ένα χειμαιρικό γονίδιο 22 που ονομάζεται χρωμόσωμα Philadelphia (Ph) (Juarez et al., 2014).

Στην ΟΛΛ ανιχνεύονται επίσης ελλείψεις ή διπλασιασμοί ολόκληρων γονιδίων ή τμημάτων αυτών. Αντιπροσωπευτικότερο παράδειγμα είναι ελλείψεις τμημάτων ή ολόκληρου του γονιδίου *IKZF1* (*IKAROS family zinc finger 1*) που ανευρίσκονται στην πλειονότητα της ΟΛΛ (Mullighan et al. 2008), ειδικά στους ασθενείς που φέρουν το χρωμόσωμα Philadelphia (Ph+). Ελλείψεις στο γονίδιο *IKZF1* ταυτοποιούνται στο 70% των παιδιών με (Ph+) ΟΛΛ και στο 2%-4% όλων των ΟΛΛ παιδικού τύπου (Bernt and Hunger 2014). Επιπροσθέτως ελλείψεις και διπλασιασμοί τμημάτων έχουν εντοπιστεί σε γονίδια που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο όπως για παράδειγμα τα *PAX5*, *ETV6*, *RB1*, *BTG1*, *EBF1* και *CDKN2A/2B*.

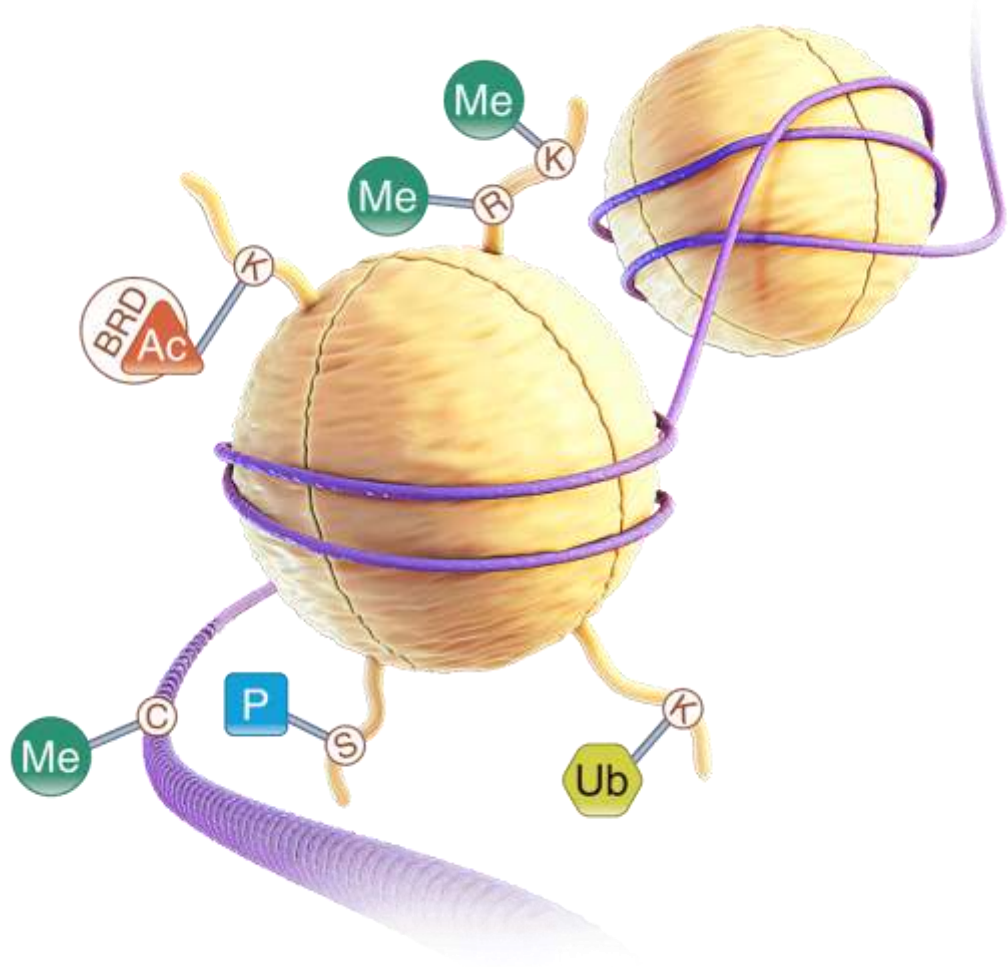
1.11 Η μεθυλίωση του DNA και η αποσιώπηση γονιδίων

Η πιο ευρέως μελετημένη ανωμαλία στην ογκογένεση είναι η αποσιώπηση της γονιδιακής μεταγραφής και σχετίζεται με τα οφέλη της μεθυλίωσης του DNA σε φυσιολογικώς αμεθυλιώτες γονιδιακές περιοχές υποκινητών (Baylin et al 2000 ; Momparler et al 2000 ; Costello et al 2001). Μεθυλίωση ορίζεται ως η προσθήκη της χημικής ομάδας $-CH_3$ σε κατάλοιπα κυτοσίνης στο DNA.

Στο γονιδίωμα των θηλαστικών η μεθυλίωση λαμβάνει χώρα μόνο στις βάσεις κυτοσίνης που βρίσκονται στο 5' άκρο μιας γουανοσίνης σε ένα δινουκλεοτίδιο CpG (Bird et al, 2002) και το πρότυπο μεθυλίωσης εγκαθίσταται κατά την διάρκεια της εμβρυογένεσης με την συμβολή τουλάχιστον τριών DNA μεθυλοτρανσφερασών (Dnmt 1, Dnmt 3a, Dnmt 3b) (εικόνα 2) και πιθανώς και με τους παράγοντες που συνδέονται με αυτά τα ένζυμα, παράγοντες οι οποίοι στοχεύουν και ρυθμίζουν την ενζυμική ενεργότητα των παραπάνω μεθυλοτρανσφερασών. Έχει προταθεί ότι τα ένζυμα Dnmt 3a και Dnmt 3b ενεργούν ως *de novo* μεθυλοτρανσφεράσες για να εγκαταστήσουν πρότυπα μεθυλίωσης κατά την εμβρυογένεση (Okano et al, 1999). Εν αντιθέσει με αυτά, η Dnmt 1 μεθυλοτρανσφεράση θεωρείται ότι διατηρεί τα πρότυπα μεθυλίωσης κατά την αντιγραφή του DNA. Σχηματική απεικόνιση της μεθυλίωσης στο επίπεδο του DNA δίνεται στην εικόνα 3.



Εικόνα 2: Η μεθυλίωση στο επίπεδο της διπλής έλικας του DNA με την συμμετοχή των μεθυλοτρανσφερασών (DNMT) (από *Mina Rahmani et. al., 2018*).

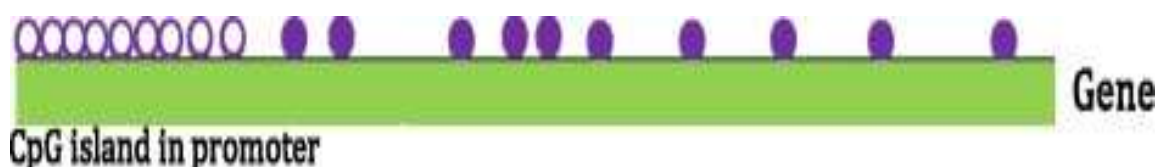


Εικόνα 3: Μεθυλίωση (σημαίνεται με Me) σε κατάλοιπα κυτοσίνης (σημαίνεται με C) στο δίκλωνο DNA (μωβ χρώμα) το οποίο είναι τυλιγμένο γύρω από οκταμερές ιστονών (υποκίτρινες σφαίρες).

(από: <https://worldwide.promega.com/products/epigenetics/methylation-analysis/methyledge-bisulfite-conversion-system/?catNum=N1301>)

Η μεγάλη πλειονότητα των CpG δινουκλεοτιδίων (~70%) στο γονιδίωμα των θηλαστικών είναι μεθυλιωμένη και εδράζεται εκτός των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών (repetitive elements). Αυτού του είδους η μεθυλίωση είναι ένας μηχανισμός – δείκτης που υποβοηθά να σιωπήσουν μεταγραφικώς αυτές οι αλληλουχίες και έτσι, θεωρείται ότι αποτελεί μηχανισμό άμυνας του ξενιστή για να εμποδίσει την μεταφορά γονιδιώματος και ίσως να καταστείλει τον ομόλογο ανασυνδυασμό (Voder et al, 1997). Η μεθυλίωση κυτοσινών, τις κάνει πιο δεκτικές στην απαμίνωση, γεγονός που μειώνει την συνολική συχνότητα εμφάνισης CpG στο γονιδίωμα του όγκου (Bird, et al, 1986).

Εν αντιθέσει, μικρές λωρίδες DNA ή “νησίδες CpG” εμπεριέχουν την αναμενόμενη συχνότητα CpG. Αυτές οι περιοχές προστατεύονται από την μεθυλίωση και βρίσκονται στις περιοχές που ονομάζονται υποκινητής του γονιδίου στο 40 – 50% όλων των γονιδίων του ανθρώπου (εικόνα 3). Αυτή η έλλειψη μεθυλίωσης ίσως είναι προαπαιτούμενη για έντονη μεταγραφή. Πλήρως μεθυλιωμένες νησίδες CpG ανευρίσκονται μόνο στον υποκινητή αποσιωπημένων αλληλομόρφων αυτοσωμικών γονιδίων που φέρουν το γενετικό εντύπωμα, σε πολλαπλά αποσιωπημένα γονίδια στα ανενεργά X χρωμοσώματα των θηλέων ατόμων, σε γονίδια συγκεκριμένης γαμετικής σειράς και σε ιστοειδικά γονίδια (Tycko et al, 1997 ; Goto et al, 1998 ; De Smet et al, 1999 ; Tores et al, 2000), δηλαδή σε γονίδια τα οποία θα πρέπει να μην λειτουργούν ή να λειτουργούν σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα και για ορισμένο χρόνο ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου.



Εικόνα 4: Γραφική απεικόνιση των νησίδων CpG στον υποκινητή ενός γονιδίου (από *Mina Rahmani et. al., 2018*).

Η μεθυλίωση του DNA φαίνεται πως είναι ικανή να αποτρέψει την απ' ευθείας σύνδεση κάποιων μεταγραφικών παραγόντων στις ειδικές θέσεις πρόσδεσής τους στο DNA. Ωστόσο, η εμπόδιση της μεταγραφής σε συνδυασμό με την μεθυλίωση του DNA εμφανίζεται να επισυμβαίνει μέσω σύνθετων και έμμεσων μηχανισμών που περιλαμβάνουν αλλαγές στον σχηματισμό της χρωματίνης.

Έχει ταυτοποιηθεί μία ομάδα πρωτεϊνών οι methyl-CpG binding domain proteins (MBDs) που συνδέονται εκλεκτικά στις μεθυλιωμένες CpG (Hendrick et al, 2000). Ένα μέλος αυτής της οικογένειας, η πρωτεΐνη MeCP2, κωδικοποιεί για έναν μεταγραφικό καταστολέα που πιθανώς επηρεάζει απ' ευθείας την γονιδιακή αποσιώπηση, αν και ο κύριος μηχανισμός αυτής της περιοχής και άλλων MBD στη μεταγραφική καταστολή γίνεται εν μέρει από τη στρατολόγηση των αποακετυλασών των ιστονών HDAC1 και HDAC2 ως μέρος ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλέγματος, το οποίο επίσης περιλαμβάνει το Msin3 (Jones et al, 1998 ; Lountree et al, 2001).

Η αποακετυλίωση της ουράς των ιστονών H3 και H4 θεωρείται ότι προκαλεί την σύμπτυξη της χρωματίνης μειώνοντας το φορτίο τους. Εν συνεχεία το DNA καθίσταται λιγότερο προσιτό σε μεταγραφικούς παράγοντες οδηγώντας στην παύση της μεταγραφής. Αυτά τα ευρήματα καταδεικνύουν ότι η μεθυλίωση διενεργείται με την συνεργασία των MBD και HDAC στην μεταγραφική αποσιώπηση των γονιδίων τα οποία είναι υπερμεθυλιωμένα στον καρκίνο. Ωστόσο η έντονη μεθυλίωση στις νησίδες CpG των υποκινητών εμφανίζεται να είναι κυρίαρχη έναντι της ενεργότητας αποακετυλίωσης των ιστονών σε αυτήν την διαδικασία. Συνήθως, οι υποκινητές των περισσότερων μεταγραφομένων γονιδίων δεν παρουσιάζουν μεθυλίωση διότι μεταγράφονται συνεχώς για τις ανάγκες του κυττάρου.

1.12 Μεθυλιωμένα γονίδια στον καρκίνο

Στα καρκινικά κύτταρα, η ανώμαλη υπερμεθυλίωση των νησίδων CpG που περιβάλλουν τις περιοχές του υποκινητή του γονιδίου είναι σήμερα η πιο καλώς μελετημένη επιγενετική αλλαγή που μπορεί να συμβεί σε όγκους κυττάρων. Ανευρίσκονται σε σχεδόν κάθε τύπο νεοπλασίας στον άνθρωπο και σχετίζεται με ανώμαλη μεταγραφική αποσιώπηση γονιδίων.

Η υπερμεθυλίωση του υποκινητή είναι τόσο συχνή όσο η αποδιοργάνωση κλασσικών ογκοκατασταλτικών γονιδίων στον ανθρώπινο καρκίνο μέσω μετάλλαξης ή έλλειψης και λοιπών αλλαγών. Η υπερμεθυλίωση του υποκινητή για γονίδια γνωστά για τον κρίσιμο ρόλο τους στην ογκογένεση και τα οποία είναι αμεθυλιωτα σε φυσιολογικούς ιστούς σε κάθε ηλικία, μπορεί να ανιχνευθεί αρκετά νωρίς στην ογκογένεση. Αυτές οι πρώιμες επιγενετικές αλλαγές μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα την αρχική απώλεια του ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, την μεταλλαγμένη ρύθμιση μεταγραφικών παραγόντων, την διαταραχή της σχέσης κυττάρου – κυττάρου ή κυττάρου – υποστρώματος, την αποδιοργάνωση του μηχανισμού επιδιόρθωσης του DNA, την ανθεκτικότητα στα φάρμακα, την απόπτωση, την αγγειογένεση και ακόμα πολλαπλούς τύπους γονιδιακής αστάθειας, χαρακτηριστική συμπεριφορά στις κακοήθειες ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων.

Η απώλεια μεταγραφής σε ένα γονίδιο, που συνδέεται με ανώμαλη μεθυλίωση των νησίδων CpG στον υποδοκινητή, εξαρτάται από την ένταση της μεθυλίωσης εντός αυτής της περιοχής (Hsieh et al, 1994). Αυτή η ένταση μπορεί να αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου (Vertino et al, 1996 ; Graff et al, 1997) και έτσι συνδέεται με αυξημένο βαθμό μεταγραφικής απώλειας έναντι της άμεσης απώλειας που προκαλούν οι γονιδιακές μεταλλάξεις. Έτσι η απώλεια της γονιδιακής λειτουργίας που συνδέεται με την ανώμαλη μεθυλίωση του υποκινητή εμφανίζει πλεονέκτημα έναντι των μεταλλάξεων στο γονίδιο κατά την διάρκεια της εξέλιξης του όγκου. Επί πλέον, η υπερμεθυλίωση του υποκινητή και η συνεπακόλουθη γονιδιακή αποσιώπηση παραμένουν, σε γενικές γραμμές, σταθερές στα καρκινικά κύτταρα (Myohanen

et al, 1998). Αυτές οι αλλαγές, αντιθέτως με τις μεταλλάξεις, είναι δυνητικά αντιστρεπτές.

Επιπροσθέτως, τα πρότυπα μεθυλίωσης των γονιδίων παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για το καρκινικό κύτταρο, διότι κάθε καρκινικός τύπος έχει μια χαρακτηριστική ομάδα γονιδίων με αυξημένη τάση να μεθυλιωθεί (Esteller et al 2001). Το πρότυπο υπερμεθυλίωσης του υποκινητή των γονιδίων διαφέρει στον κάθε καρκινικό τύπο, υποστηρίζοντας ένα ιστοειδικό και γονιδιακό πρότυπο. Κάποια γονίδια, όπως ο καταστολέας του κυτταρικού κύκλου *p16ink4a*, το γονίδιο επιδιόρθωσης του DNA *MGMT* ή το προαποπτωτικό γονίδιο *DAPK*, είναι υπερμεθυλιωμένα σε πολλούς καρκινικούς τύπους (Merlo et al, 1995 ; Esteller et al, 1999).

Ωστόσο η υπερμεθυλίωση των γονιδίων *p14* και *APC* είναι συχνότερη στους γαστροοισοφαγικούς όγκους (Esteller et al, 2000). Οι αιματολογικές κακοήθειες εμφανίζουν σημαντικά διαφορετικές επιγενετικές αλλοιώσεις απ' ότι οι όγκοι που προέρχονται από συμπαγή όργανα. Αυτό φαίνεται στην υψηλή συχνότητα υπερμεθυλίωσης των γονιδίων *p73*, *p21* και *p15* σε αυτές τις κακοήθειες που δεν εμφανίζονται στους όγκους του επιθηλίου (Rush et al, 2002 ; Shteper et al ; 2002).

1.13 Η υπερμεθυλίωση των νησίδων CpG στην ΟΛΛ

Η μεθυλίωση στα ανθρώπινα ΟΛΛ κύτταρα συμμετέχει στην απενεργοποίηση τριών σημαντικών κυτταρικών μονοπατιών, δηλαδή συμβάντων που:

1) απορρυθμίζουν την ανάπτυξη του κυττάρου και στοχεύουν στην ύστερη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου και συγκεκριμένα στα σημεία ελέγχου της φάσης αυτής, απευθείας μέσω των γονιδίων *p21*, *p16* και *p57* που απενεργοποιούνται ή εμμέσως μέσω του γονιδίου *p73*

2) επιδρούν στο αποπτωτικό πρόγραμμα (μέσω της απενεργοποίησης των *p14*, *TMS1* και *DAPK*) και

3) επηρεάζουν την επαφή – προσκόλληση των κυττάρων μεταξύ τους (μεθυλίωση των *CDH13* και *CDH1*).

Πρότυπο μεθυλίωσης νησίδων CpG σε συγκεκριμένα γονίδια όπως τα *CALCA* και *p21* έχουν βρεθεί να σχετίζονται με δυσμενή πρόγνωση (Roman – Gomez et al, 2001 ; Roman Gomez et al, 2002). Αυτά τα γονίδια ωστόσο, δεν είναι γνωστό αν σχετίζονται με την ΟΛΛ λόγω του προτύπου μεθυλίωσης τους ή λόγω πιθανής συμμετοχής τους σε μονοπάτι ογκογένεσης στην ΟΛΛ. Γί' αυτόν τον σκοπό 4 μελέτες που διενεργήθηκαν, εξέτασαν πολλαπλά καρκινικά γονίδια-κλειδιά που υφίστανται επιγενετική απενεργοποίηση, με στόχο να βρεθεί ένας "χάρτης αλλαγών" στην ΟΛΛ (Siraj et al, 2002 ; Garcia – Manero et al, 2002 ; Roman-Gomez et al., 2003; Garcia-Manero et al., 2002).

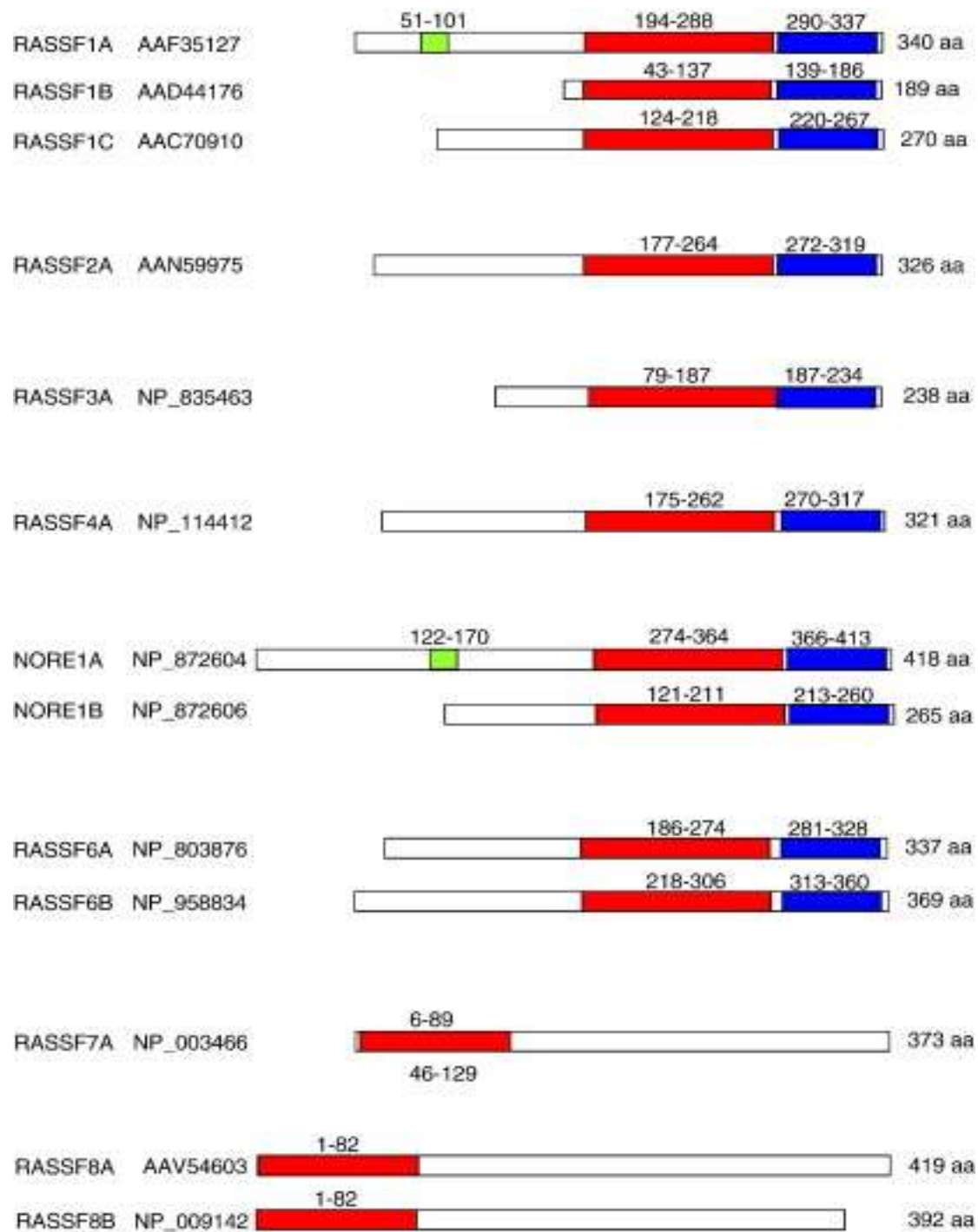
Τα αποτελέσματα αυτών των 4 μελετών κατέδειξαν πως η μεθυλίωση πολλαπλών γονιδίων, δηλαδή πολλά γονίδια ταυτοχρόνως είναι μεθυλιωμένα και όχι μόνο ένα γονίδιο, είναι κοινό φαινόμενο στην ΟΛΛ και πιθανώς ο πιο σημαντικός τρόπος για να απενεργοποιηθούν καρκινικά γονίδια που αφορούν την ΟΛΛ. Συγκεκριμένα το 70 – 93% των περιπτώσεων ΟΛΛ εμφανίζουν μεθυλίωση σε ένα γονίδιο, ενώ 25 – 42% σε δύο με τρία γονίδια.

1.14 Οι RasGTPάσες

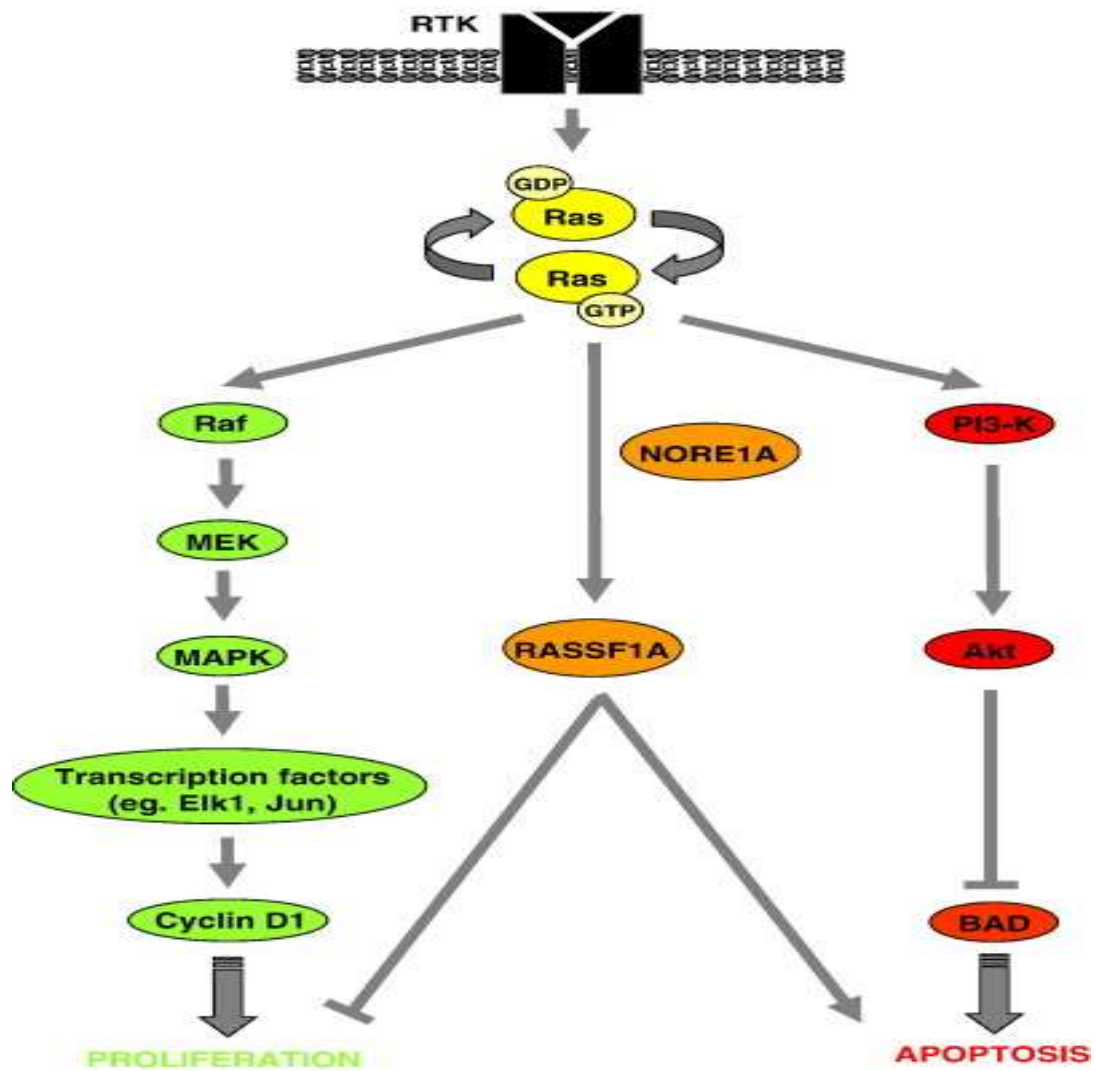
Οι RasGTPάσες είναι υπεροικογένεια μοριακών διακοπών που ρυθμίζουν μεγάλο εύρος λειτουργιών, περιλαμβανομένων του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και της απόπτωσης ως απάντηση σε εξωκυττάρια σήματα. Οι πρωτεΐνες Ras υφίστανται σε δύο μορφές: στην συνδεδεμένη με το GTP ενεργή μορφή και την συνδεδεμένη με το GDP ανενεργή μορφή. Στην GTP ενεργή μορφή η πρωτεΐνη Ras είναι ικανή να αλληλεπιδρά με επόμενους ενεργοποιητές του μονοπατιού και να ενεργοποιεί κάποια συστατικά των κυτταρικών της δράσεων μέσω ενός σύνθετου καταρράκτη μεταγωγής σήματος.

Οι ενεργοποιητές της Ras (εικόνα 6) είναι πρωτεΐνες που συνδέονται εκλεκτικά στην GTP μορφή της Ras μέσω της ειδικής ενεργοποιητικής περιοχής της. Δύο από τις ευρύτερα μελετημένες ενεργοποιητές της Ras είναι η πρωτεΐνη Raf, μία κινάση σερίνης – θρεονίνης που ελέγχει το μονοπάτι MEK – ERK το οποίο ενεργοποιεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Kolch et al, 2000) και η φωσφατιδυλοϊνσιτολ-3 κινάση (PI3-K), της οποίας η ενεργότητα απαιτείται για την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης B, Akt, που εμποδίζει την απόπτωση που προκαλείται από μέλη της οικογένειας Bcl (όπως το BAD). Οι πρωτεΐνες Raf και PI3-K αλληλεπιδρούν με την Ras μέσω των συνδεδεμένων με την Ras περιοχών τους (ονομάζονται αντιστοίχως RBD και PIk-rbd).

Υπάρχει μια ακόμα ομάδα ενεργοποιητών Ras, που μοιράζονται επίσης ένα συντηρημένο μοτίβο, και ονομάζονται RasGDS/AF6 Ras association (RA) περιοχές, και ορίζονται από ομολογίες στις αλληλουχίες των ενεργοποιητών Ras : τον παράγοντα Ral guanosine nucleotide – exchange factor (RalGDS) και τον παράγοντα διάχυσης ALL-1 από το χρωμόσωμα 6 (AF6) (Ponting et al, 1996 ; Yamamoto et al, 1999). Προσφάτως, ταυτοποιήθηκαν νέα γονίδια που κωδικοποιούν για την RA περιοχή και συγκροτούν οικογένεια συνδεδεμένη με την Ras – περιοχή, που αποτελείται από 8 μέλη *Rassf1* (123F2), *Rasfedlin/KIA AO168*, *Rassf3*, *Rassf4* (AD037), *Rassf* (NORE1), *Rassf7* (HRC1) και *Rassf4*. Τα περισσότερα μέλη αυτής της οικογένειας παρουσιάζονται στην εικόνα 5.

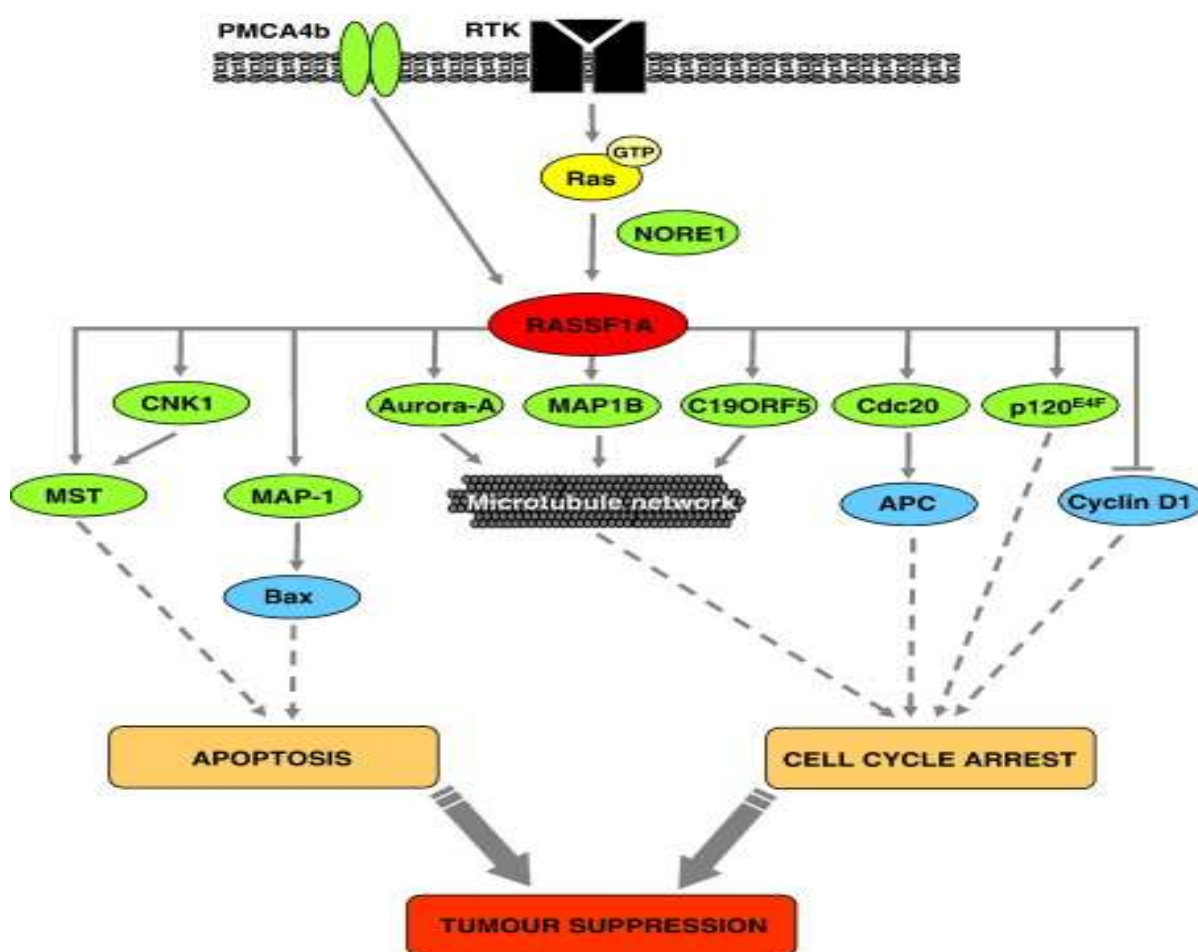


Εικόνα 5: Οικογένεια Rassf (από: *Weyden L et. al., 2007*).



Εικόνα 6: Σηματοδοτικό μονοπάτι RAS (από: *Weyden L et. al., 2007*).

Ωστόσο, τα γονίδια αυτά, αν και αλληλεπιδρούν αμέσως ή εμμέσως με την ενεργοποιημένη πρωτεΐνη Ras, ο ρόλος τους στη μετάδοση των βιολογικών επιδράσεων παραμένει ασαφής, αν και φαίνεται ότι πρόκειται περί ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Έτσι οι πρωτεΐνες *Rassf* είναι ογκοκαταστολείς, όπως για παράδειγμα το γονίδιο *Rassf1* η δράση του οποίου παρουσιάζεται στην εικόνα7, εν αντιθέσει με παραδοσιακούς ενεργοποιητές της Ras, όπως οι πρωτεΐνες Raf και PI3-K, που είναι ογκοπρωτεΐνες (Wenden et al, 2007).

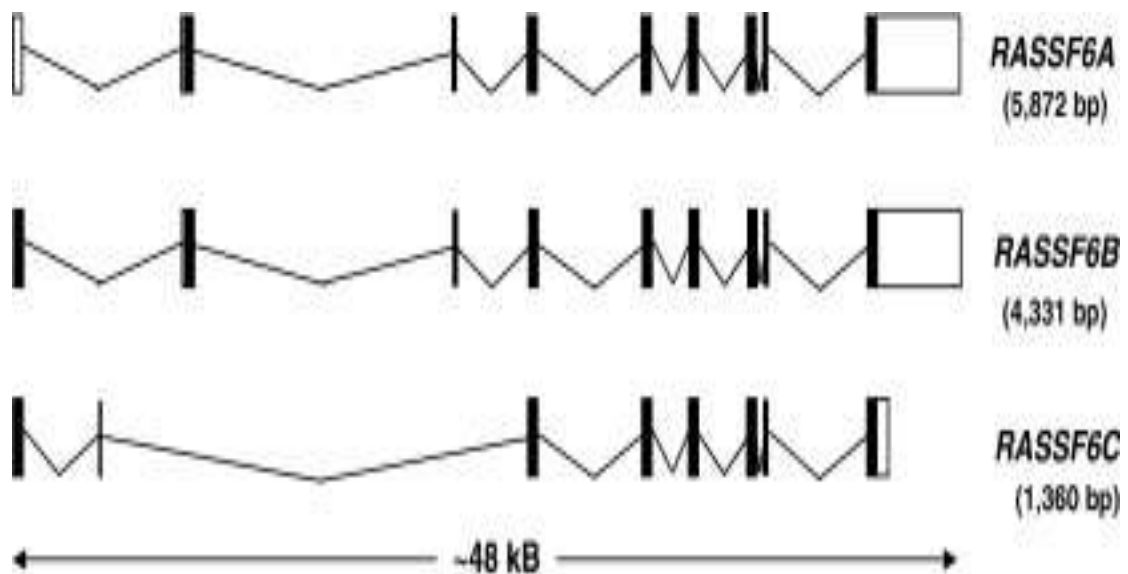


Εικόνα 7: Σχεδιαγραμματική απεικόνιση της επίδρασης του *Rassf1A* στην καταστολή του όγκου (από: Weyden L et. al., 2007).

1.15 Γονίδιο *Rassf6*

Το γονίδιο *Rassf6* αποτελείται από 13 εξώνια και εδράζεται στην χρωμοσωμική περιοχή 4q13.3 (εικόνες 9 και 10). Τα 3 μετάγραφα που φαίνονται στην εικόνα 8 θεωρείται ότι παράγονται στον γενετικό τόπο του *Rassf6* και ονομάζονται *Rassf6A*, *Rassf6B* και *Rassf6C*. Το μετάγραφο *Rassf6B* έχει ένα πρόσθετο υπόλοιπο 32 αμινοξέων στο αμινοτελικό άκρο εν συγκρίσει με το *Rassf6A* και το *Rassf6C* έχει διαφορετικό αμινοτελικό άκρο και από το *Rassf6A* και το *Rassf6B*. Ωστόσο όλες οι ισομορφές κατέχουν τις συντηρημένες περιοχές RA και SARAH που είναι χαρακτηριστικές για την οικογένεια *Rassf*.

Η περιοχή RA του *Rassf 6* ομοιάζει περισσότερο σε αυτήν την *Rassf 2* και *Rassf 4* (~ 50% ομοιότητα) απ' ότι του *Rassf1A* (~ 30% ομοιότητα). Η ομολογία του *Rassf 6* με άλλα μέλη είναι μικρότερη στην περιοχή SARAH (η οποία είναι ~ 40% ταυτόσημη με αυτή του *Rassf 2* και *Rassf 4* και ~ 20% ταυτόσημη με αυτήν του *Rassf 1A* και *NORE1*) (Ikreda et al, 2007).



Εικόνα 8 : Τα μετάγραφα του γονιδίου *Rassf6* (από: Weyden L et. al., 2007).

1.16 Σίγαση του γονιδίου *Rassf6* στον καρκίνο

Το μετάγραφο του *Rassf6* ανιχνεύτηκε σε αρκετές καρκινικές κυτταρικές σειρές συμπεριλαμβανομένων των *Hela*, *MCF-7*, *U373*, *A549* και *HepG2* (IKrda et al, 2007). Μειωμένα επίπεδα ανιχνεύτηκαν στο 30 – 60% πρωτογενών όγκων σε ιστούς του μαστού, κόλον, νεφρού, ήπατος, παγκρέατος, στομάχου και θυροειδούς αδένα (Allen et al, 2007). Το 1/7 εξ αυτών παρουσίασαν μερική μεθυλίωση του υποκινητή και δεδομένου ότι η περιοχή 4q21.21 έχει αναφερθεί ως έχουσα ελλείψεις κατά την ανάπτυξη του όγκου (Dier et al, 2004) έχει προταθεί ότι η απώλεια της έκφρασης του γονιδίου *Rassf6* σε πρωτογενείς όγκους μπορεί να περιλαμβάνει ελλείψεις όπως και επιγενετικούς μηχανισμούς αποσιώπησης (Allen et al, 2017).

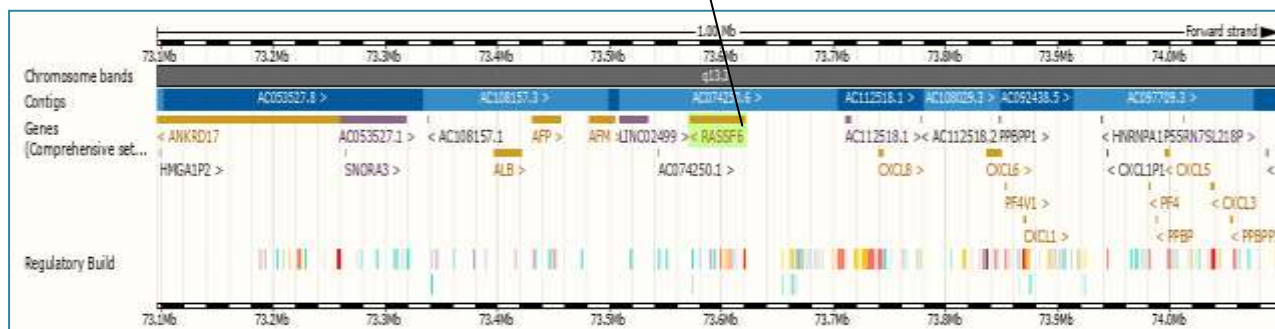
Chromosome 4:73,571,550-73,620,631

Rassf6



Εικόνα 9: Το χρωμόσωμα 4, στα μακρά σκέλη του οποίου εδράζεται το υπό μελέτην γονίδιο *Rassf6* (από *Ensembl*).

Gene: *Rassf6* ENSG00000169435



Εικόνα 10: Η χρωμοσωμική περιοχή (ζώνη) 4q13.3 όπου φαίνεται λεπτομερώς ο εντοπισμός του γονιδίου *Rassf6* (από *Ensembl*).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

2.1 Συλλογή δειγμάτων

Περιφερικό αίμα από 30 ασθενείς με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία παιδικού τύπου (ΟΛΛ) και 19 δότες που χρησίμευσαν ως μάρτυρες συνελέγη σε σωληνάρια που περιείχαν EDTA ως αντιπηκτικό μέσο. Οι ασθενείς αξιολογήθηκαν και απορρίφθηκαν οι 10, διότι από αυτούς δεν παρελήφθησαν δείγματα και τις 4 ημέρες θεραπείας (κάποιοι αδυνατούσαν λόγω της βεβαρημένης κατάστασης τους), όπως απαιτεί το πρωτόκολλο της συγκεκριμένης διατριβής. Οι υπόλοιποι 20 ασθενείς, κάθε ένας εκ των οποίων παρέδωσε δείγμα κατά τις ημέρες 0, 8, 15,33 της θεραπευτικής του αγωγής, προχώρησαν στην ανάλυση και επεξεργασία του γενετικού υλικού στην παρούσα εργασία.

Αμέσως μετά την συλλογή το αίμα υπεβλήθη σε φυγοκέντρηση (3.000 rpm για 15 λεπτά) ώστε να διαχωριστεί το πλάσμα του αίματος από τα έμμορφα συστατικά του, και μάλιστα ταχέως ώστε να ανακτηθεί το cell-freeDNA σε μεταγενέστερο στάδιο και να μην διασπαστεί από τις DNAσες του πλάσματος.

Για την αποφυγή επιμόλυνσης του πλάσματος από λευκά αιμοσφαίρια που θα αλλοίωναν το αποτέλεσμα ακολούθησαν δυο φυγοκεντρήσεις στις 14.000rpm για 10 λεπτά. Το πλάσμα που ανακτήθηκε αποθηκεύτηκε στους -80°C για περαιτέρω επεξεργασία.

2.2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ

2.2.A Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (quantitative real-time PCR)

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για την ανίχνευση εξαιρετικά μικρών ποσοτήτων DNA στο δείγμα (στο επίπεδο του ενός κυττάρου) και για την ποσοτικοποίηση αυτού. Το δείγμα DNA πολλαπλασιάζεται με ειδικούς εκκινητές (primers) που πολλαπλασιάζουν ένα συγκεκριμένο τμήμα DNA στο σύνολο του γονιδιώματος και η ποσοτικοποίηση του δείγματος γίνεται βάσει του φθορισμού που εκπέμπει το κομμάτι που πολλαπλασιάζεται και ο οποίος ανιχνεύεται από το ειδικό μηχάνημα Light Cycler. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται μόρια που είναι σεσημασμένα με φθορίζουσες χρωστικές (probes) και τα οποία είναι συμπληρωματικά και για αυτό προσδένονται, στην αλληλουχία που πολλαπλασιάζεται.

Όσο περισσότερα είναι τα κομμάτια DNA που πολλαπλασιάζονται (άρα όσο πυκνότερο είναι το δείγμα άγνωστης συγκέντρωσης), τόσο περισσότερος ο φθορισμός που εκπέμπεται. Για την ποσοτικοποίηση απαραίτητη είναι η πρότυπη καμπύλη, δηλαδή δείγματα γνωστής συγκέντρωσης που τοποθετούνται στα τριχοειδή, έτσι ώστε τα άγνωστα δείγματα να υπολογιστούν από το ειδικό λογισμικό που είναι εγκατεστημένο στον υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με το μηχάνημα Light Cycler. Η ποσότητα που μετρείται αποδίδεται ως ng/μl βάσει μαθηματικής εξίσωσης που χρησιμοποιεί το λογισμικό.

Απαραίτητος εξοπλισμός:

- **εκκινητές (primers)** κατάλληλοι για την αλληλουχία που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε
- **ανιχνευτές (probes)** που προσδένονται εσωτερικά της επιθυμητής αλληλουχίας
- **ένζυμο** κατάλληλο για την qrt-PCR
- **τριχοειδή** στα οποία θα γίνει η αντίδραση

- **μηχάνημα Light Cycler** που αποτελεί τον θερμικό κυκλοποιητή αυτής της μεθόδου
- **υπολογιστής** συνδεδεμένος με το μηχάνημα Light Cycler με εγκατεστημένο το κατάλληλο λογισμικό.

2.2.B Τεχνική ανάλυσης θραυσμάτων DNA (*fragment analysis*)

Πρόκειται περί τεχνικής εξαιρετικά ευαίσθητης που χρησιμοποιήθηκε στην δική μας μελέτη, γιατί μπορεί να ανιχνεύσει μικροποσότητες νουκλεϊκών οξέων και στην δική μας εργασία σχεδιάστηκε να ανιχνεύει την παρουσία ακόμα και ενός καρκινικού κυττάρου.

Η τεχνική βασίζεται σε θραύσματα γνωστού μεγέθους (sizer) που χρησιμοποιούνται για την σύγκριση του επιθυμητού κομματιού DNA που πολλαπλασιάστηκε από την PCR. Απαραίτητο για αυτό είναι η χρήση εκκινήτων (primers) σεσημασμένων με φθορίζουσες χρωστικές και η ανάλυση των τμημάτων που πολλαπλασιάστηκαν με PCR γίνεται στο μηχάνημα ABI, που αποδίδει το αποτέλεσμα με μορφή καμπυλών. Το επιθυμητό κομμάτι μετρείται με ακρίβεια ζευγών βάσεων (bp).

Απαραίτητος εξοπλισμός:

- **εκκινήτες (primers) σεσημασμένους με 6-FAM**
- **MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate** (N8010560)
- **Γκρι πλαστικό κάλυμμα** για το 96-Well Reaction Plate
- **HiDi**
- **Size Standard GeneScan** (sizer) 500 ROX ή Size Standard GeneScan 500 LIZ

2.2.Γ Τεχνική ανάλυσης της αλληλουχίας του DNA κατά Sanger (*Sanger sequencing*)

Η μέθοδος βασίζεται στη σύνθεση πολλών τμημάτων της περιοχής του DNA που μας ενδιαφέρει, ακριβώς όπως γίνεται και με την PCR. Χρησιμοποιώντας ένα ζεύγος εκκινητών μπορούμε να κατευθύνουμε την DNA πολυμεράση στο να μας αντιγράψει ένα συγκεκριμένο τμήμα του DNA. Το δείγμα αποδιατάσσεται στους 95 °C για ένα σύντομο χρονικό διάστημα. Στη συνέχεια η θερμοκρασία πέφτει στους 50-60°C έτσι ώστε να ξεκινήσει ο υβριδισμός. Με τη περίσσεια των εκκινητών εξασφαλίζουμε πως στο στάδιο αυτό, η αποδιατεταγμένη αλυσίδα θα υβριδιστεί με τον εκκινητή και ύστερα η DNA πολυμεράση θα αρχίσει να προσθέτει νουκλεοτίδια στο 3' άκρο του εκκινητή.

Με τη χρήση πολλών κύκλων αποδιάταξης, υβριδισμού και προσθήκης επιτυγχάνεται η δημιουργία πανομοιότυπων αλυσίδων με εκθετικό βαθμό. Η PCR λειτουργεί ιδανικά σε αλυσίδες έως 1000 bp με το όριο της να είναι πρακτικά οι 2000bp. Πρέπει να σημειωθεί πως η επιτυχία της PCR εξαρτάται άμεσα από τους εκκινητές, καθώς οι τελευταίοι πρέπει να συνδέονται μόνο με τον επιθυμητό στόχο και όχι με άλλες περιοχές, καθώς σε διαφορετική περίπτωση δύναται να δημιουργηθούν παραπροϊόντα.

Μπορούμε να διακρίνουμε 3 στάδια για την αντίδραση Sequencing :

1. Χρήση ενός αρχικού υλικού που είναι ένα σύνολο από πανομοιότυπα τμήματα DNA. Αυτό επιτυγχάνεται με την χρήση της PCR που περιγράφηκε ανωτέρω.
2. Δημιουργία πολλών μονόκλωνων αντιγράφων DNA. Για να το επιτύχουμε χρησιμοποιούμε μόνο έναν εκκινητή και όχι 2 όπως στην PCR.
3. Με τη χρήση του εκμαγείου που προκύπτει από το στάδιο 2, γίνεται προσθήκη A, T, G, και C. Όμως σε αυτό το στάδιο έχουμε και προσθήκη ειδικά τροποποιημένων A, T, G και C τα οποία έχουν την ιδιότητα να εμποδίζουν την αύξηση της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας. Η τροποποίηση αυτή δεν είναι άλλη από την αφαίρεση από το 3' της δεσοξυριβόζης της ομάδας -OH και η αντικατάστασή της από -H. Η υδροξυλομάδα στη θέση αυτή είναι η θέση σύνδεσης για το επόμενο νουκλεοτίδιο, επομένως η απουσία της συνεπάγεται τη μη προσθήκη

άλλου. Τα τροποποιημένα αυτά νουκλεοτίδια ονομάζονται διδεοξύνουκλεοτίδια. Σημειώνεται πως για να έχει επιτυχία η μέθοδος αυτή είναι αναγκαίο να ενσωματωθούν συγκεκριμένες αναλογίες κανονικών και τροποποιημένων νουκλεοτιδίων. Η μετεξέλιξη της μεθόδου αυτής, περιλαμβάνει τη χρήση σεσημασμένων με φθορίζουσες χρωστικές για την αποφυγή χρήσεως ραδιενεργών ισοτόπων.

Η εφαρμογή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) έγινε με την χρήση των παρακάτω αντιδραστηρίων:

- Multiplex Polymerase, Qiagen
- Q-Solution, Qiagen
- RNase-Free Water, Qiagen & [UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water, ThermoFischer](#)
- Εκκινητές
- Ο θερμοκυκλοποιητής που χρησιμοποιήθηκε είναι ο Veriti® 96-Well Thermal Cycler της Applied Biosystems

Ο καθαρισμός του προϊόντος της PCR έγινε με το ένζυμο exosap της εταιρίας ThermoFischer, *ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent*

2.2.Δ Καθαρισμός με το ένζυμο Exosap

Σε 2.3μl προϊόντος PCR προστέθηκε 0.7μl ενζύμου *ExoSAP-IT* προκειμένου να καθαριστεί από γενετικό υλικό που δεν αντέδρασε ή από παραπροϊόντα. Το μίγμα τοποθετήθηκε στον θερμοκυκλοποιητή Veriti® 96-Well Thermal Cycler με τις παρακάτω συνθήκες:

1. 37 °C / 15 min
2. 80 °C / 15 min

2.2.E Αντίδραση *sequencing*

Η αντίδραση sequencing έγινε στο μηχάνημα Veriti® 96-Well thermal cycler χρησιμοποιώντας τα ακόλουθα αντιδραστήρια: 0.25μl BigDye term v3.1 mix (ThermoFischer), 1.75μl BigDye terminator 5x seq buffer (ThermoFischer), 6.60 μl RNase-Free Water (Qiagen) και 0.4μl primers (Bioanalytica) ανά 1.25μl καθαρισμένο με exosap προϊόν PCR.

Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

- | | |
|--------------------------|--------------------|
| 1. 96°C / 1 min | |
| 2. 96 °C / 10 sec | } 24 κύκλοι |
| 3. 55 °C / 5 sec | |
| 4. 60 °C / 4 min | |

Η τελική ανάλυση έγινε στο μηχάνημα ABI-3500 Vs.1 (Applied Biosystems) με τη χρήση POP 7 (Applied Biosystems). Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του προγράμματος BioEdit sequence alignment editor v7.2.5 (Tom Hall).

2.2.ΣΤ Απομόνωση γενετικού υλικού

Η απομόνωση του πυρηνικού DNA καθώς και του cf-DNA έγινε με τα ακόλουθα kit του εμπορίου κατά τις οδηγίες του κατασκευαστή.

για την απομόνωση πυρηνικού DNA

Qiamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen

για την απομόνωση cf-DNA

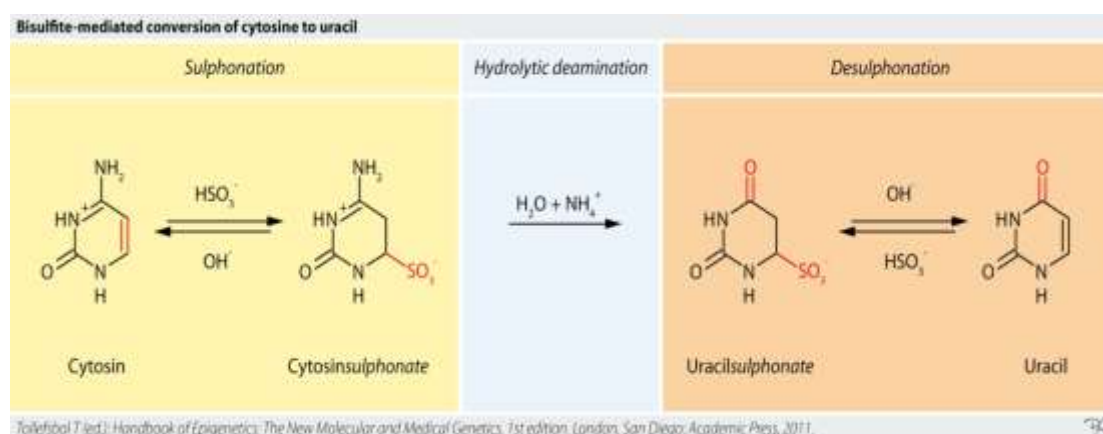
QIAamp DSP Virus Kit, Qiagen

2.2.Η Τροποποίηση γενετικού υλικού

Για την τροποποίηση των δειγμάτων μας χρησιμοποιήσαμε το πρωτόκολλο της Kate Patterson et al. κατά τις οδηγίες των συγγραφέων.

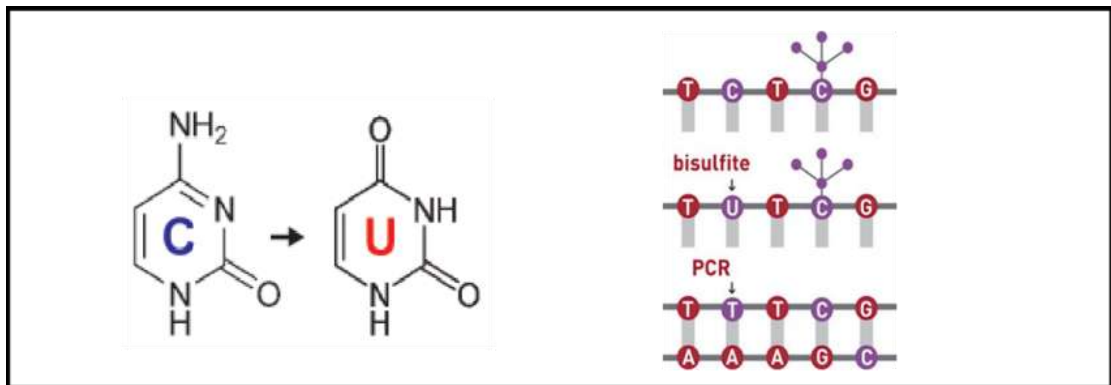
Τροποποίηση γενετικού υλικού

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για να μελετηθεί η μεθυλίωση σε ένα κομμάτι γενετικού υλικού και συγκεκριμένα για να εντοπιστούν κυτοσίνες που φέρουν την ομάδα του μεθυλίου (-CH₃). Συγκεκριμένα οι κυτοσίνες που βρίσκονται στην αλληλουχία του DNA τροποποιούνται σε ουρακίλες, παρουσία πυκνού μεταδιθειώδους νατρίου σε αλκαλικό περιβάλλον και στο σκοτάδι, ώστε να αποφευχθεί η οξειδωση που θα κατέστρεφε την τροποποίηση της κυτοσίνης (εικόνα 11).

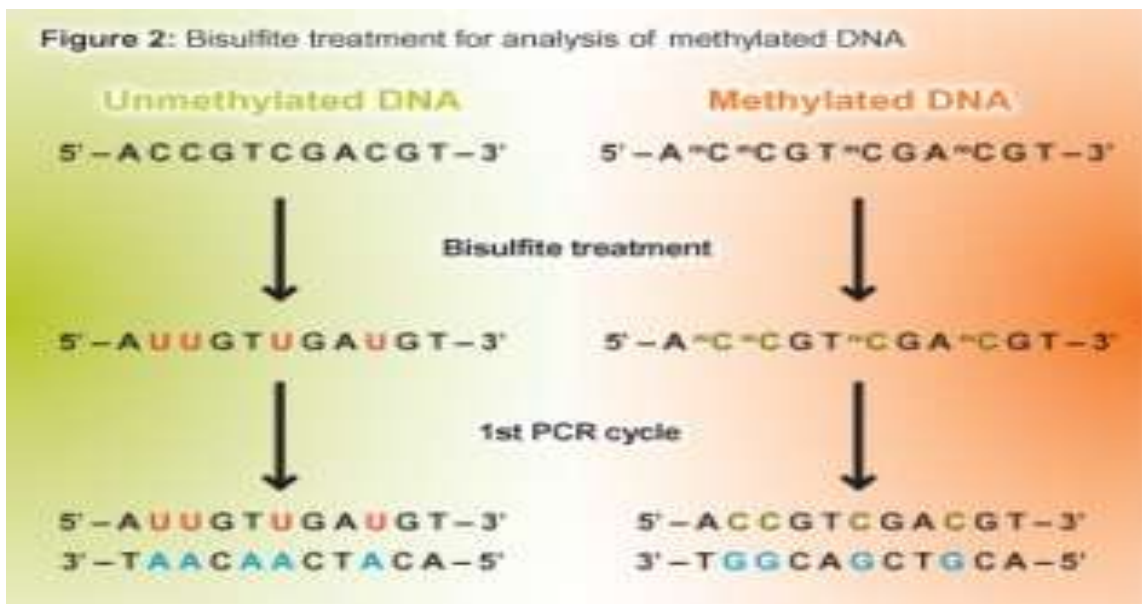


Εικόνα 11: Τροποποίηση της κυτοσίνης σε ουρακίλη σε αλκαλικό περιβάλλον στο σκοτάδι για την αποφυγή οξειδωσης. (από:<http://core-genomics.blogspot.gr/2016/10/controlling-for-bisulfite-conversion.html>).

Η κυτοσίνη τροποποιείται σε ουρακίλη και σε ακόλουθη PCR αντικαθίσταται από θυμίνη και η αλληλουχία αναλύεται κατά Sanger (sequencing). Έτσι η θέση στο DNA που καταλαμβάνει η κυτοσίνη τώρα καλύπτεται από θυμίνη. Ωστόσο σε περίπτωση που η κυτοσίνη είναι μεθυλιωμένη δεν τροποποιείται και παραμένει κυτοσίνη (εικόνες 12 και 13) και έτσι σε τμήματα αλληλουχίας όπου μελετάται πιθανή μεθυλίωση με την μέθοδο αλληλούχισης κατά Sanger (εικόνα 14), όταν ανιχνεύεται κυτοσίνη αυτή φέρει μεθύλιο (-CH₃).



Εικόνα 12: Μετατροπή της κυτοσίνης σε ουρακίλη και το αποτέλεσμα της ακόλουθης PCR(από:https://www.researchgate.net/figure/Bisulfite-treatment-and-PCR-Unmethylated-cytosine-was-converted-to-uracil-during_fig6_260002949).

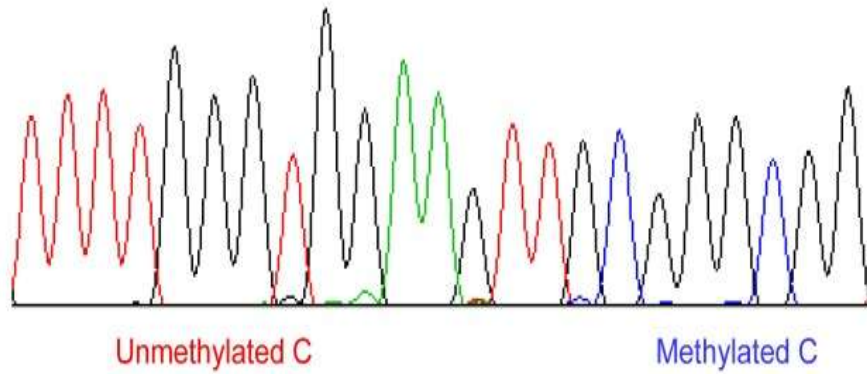


Εικόνα 13:PCR σε αμεθυλίωτο και μεθυλιωμένο DNA (από:<https://www.gatc-biotech.com/en/expertise/epigenetics/bisulfite-profiling.html>).

Ανάλυση αλληλουχίας με μεθυλιωμένες και μη μεθυλιωμένες κυτοσίνες

Original sequence **C C C** **C G** G G **C G** G A A G **C** T G **C G** G G **C G** G

Bisulfite converted sequence T T T **T G** G G **T G** G A A G T T G **C G** G G **C G** G



C Cytosine not in CpG site **C G** CpG site

Εικόνα 14: Αλληλούχιση κατά Sanger τμήματος DNA που περιέχει αμεθυλιωτες (γαλάζιο χρώμα) και μεθυλιωμένες (κίτρινο χρώμα) κυτοσίνες C.

2.3 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ PCR ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ

2.3.A Πρωτόκολλο για την ποσοτική μέτρηση του ολικού cell-free DNA

Η μέτρηση έγινε με **quantitative real time-PCR** κατά τον ακόλουθο τρόπο:

Γονίδιο: β-σφαιρίνη

Primers: Forward 5'-AGTCAGGGCAGAGCCATCTA-3'
Reverse 5'-CAACTTCATCCACGTTACC-3'

Probes: 5'-LC705-CCTCAAACAGACACCATGGTGACCTG-PH
5'-TTCTGACACAACACTGTGTTCACTAGCA-FL

Συνθήκες qrt-PCR

95 °C-10'

95 °C-10'

58 °C-5'

72 °C-6'



50 κύκλοι

2.3.B Πρωτόκολλο για την ανίχνευση καρκινικού πυρηνικού DNA και cell-free DNA στο αίμα

Η μέτρηση έγινε με την τεχνική **fragment analysis** και αφορούσε πυρηνικό DNA και cell-free DNA

καρκινικό πυρηνικό DNA (μεθυλιωμένο)

Γονίδιο: *Rassf 6* (wt)

Primers: Forward 6-Fam-GCACAGGGAGTGGCTCAGGTTTCTTGACAC-3'
Reverse 5'-ATCCCCATTTTTACCTGTTATTCACACTGTG-3'

Μέγεθος προϊόντος PCR: 359bp

καρκινικό cell-free DNA (μεθυλιωμένο)

Γονίδιο: *Rassf 6* (wt)

Primers: Forward 6-FAM-CAGCTGAGCCATGCTCTGGGAG-3'
Reverse 5'-AACCAGTGCCCTGTCTCTGCC-3'

Μέγεθος προϊόντος PCR: 119bp

Συνθήκες PCR

Για το πυρηνικό DNA

95°C-15'
95°C-1' }
55°C-1' } 40 κύκλοι
72°C-1' }
72°C-10'

Για το cell-free DNA

95°C-15'
95°C-30" }
55°C-45" } 40 κύκλοι
72°C-45" }
72°C-10'

Εσωτερικό γονίδιο που πιστοποιεί την πέψη του περιοριστικού ενζύμου *AciI*

Γονίδιο: *actb*

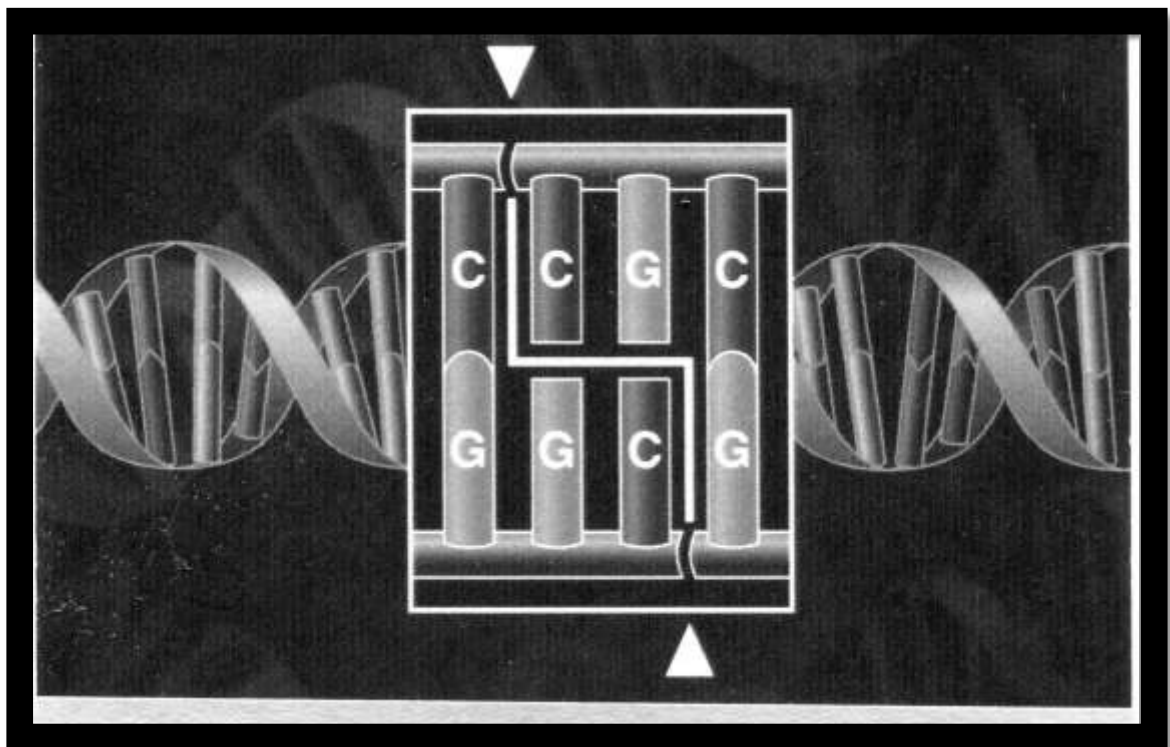
Primers: Forward 6-FAM-GCGCCGTTCCGAAAGTT-3'

Reverse 5'-GGGTGTGGACGGGCG-3'

Πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *AciI*

Κατά τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας NEB (NEW ENGLAND BioLabs)

Αλληλουχία πέψης:



2.3.Γ Πρωτόκολλο για την ανάλυση των μεθυλιωμένων θέσεων στον υποκινητή του *Rassf6* σε DNA και cell-free DNA

Η μελέτη έγινε αρχικώς τροποποιώντας το πυρηνικό DNA και cell-free DNA ώστε οι μεθυλιωμένες κυτοσίνες να παραμείνουν κυτοσίνες και οι αμεθυλιώτες να τροποποιηθούν σε ουρακίλες και εν συνεχεία, με την PCR, σε θυμίνες. Ύστερα ακολούθησε PCR για το τροποποιημένο τμήμα και για αυτό οι εκκινητές (primers) είναι τροποποιημένοι. Το τροποποιημένο τμήμα υπεβλήθη σε αντίδραση **sequencing**.

Για το πυρηνικό DNA

Γονίδιο *Rassf6*

Primers τροποποιημένοι

Primers: Forward 5'-GTATAGGGAGTGGTTTAGGTTTTTTGATAT-3'
Reverse 5'-ATCCCCATTTTTTACCTATTATTCACACTATA-3'

Μέγεθος προϊόντος PCR: 359bp

Για το cell-free DNA

Γονίδιο *Rassf6*

Primers τροποποιημένοι

Primers: Forward 5'-TAGTTGAGTTATGTTTTGGGAG-3'
Reverse 5'-AACCAATACCCTATCTCTACC-3'

Μέγεθος προϊόντος PCR: 119bp

Συνθήκες PCR

95°C-15'

95°C-1'

60°C-1'

72°C-1'

72°C-10'

40 κύκλοι

2.3.Δ Ποσοτική μέτρηση του λευχαιμικού φορτίου

Η μέτρηση βασίζεται στον ποσοτικό προσδιορισμό του καρκινικού (μεθυλιωμένου) πυρηνικού DNA και cell-free DNA στο αίμα των ασθενών με την τεχνική **quantitative real-time PCR**.

καρκινικό πυρηνικό DNA (μεθυλιωμένο)

Γονίδιο: *Rassf6* (wt)

Primers: Forward 5'-GCACAGGGAGTGGCTCAGGTTTCTTGACAC-3'
Reverse 5'-ATCCCCATTTTTACCTGTTATTCACACTGTG-3'

Μέγεθος προϊόντος PCR: 359bp

καρκινικό cell-free DNA (μεθυλιωμένο)

Γονίδιο: *Rassf6* (wt)

Primers: Forward 5'-CAGCTGAGCCATGCTCTGGGAG-3'
Reverse 5'-AACCAGTGCCCTGTCTCTGCC-3'

Μέγεθος προϊόντος PCR: 119bp

Probes:

5'-LC705-GACTCGCGGAGTCCCAGCC-PH

5'-CTCGGACCTCCCCTACAGGTGAG-FL

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Αιματολογικά στοιχεία ασθενών

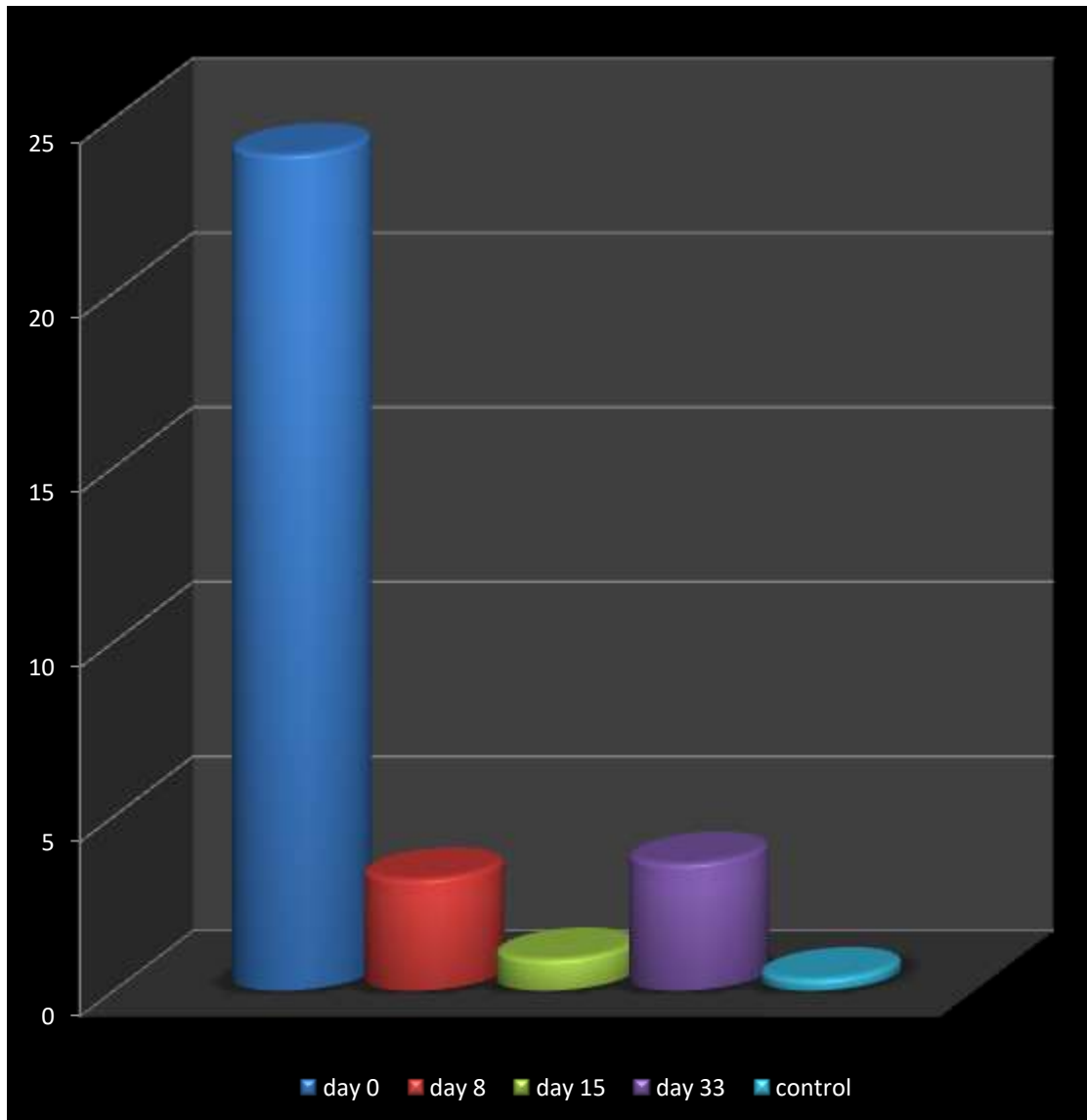
20 ασθενείς με πρώιμη Β λευχαιμία παιδικού τύπου υπεβλήθησαν σε χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής ακολουθώντας το πρωτόκολλο ALL BFM 95 protocol. Κατά τις ημέρες θεραπείας 0 (πρωτοδιάγνωση), 8, 15 και 33 η απόκριση των ασθενών στην θεραπευτική αγωγή εκτιμήθηκε με βάση τους ακόλουθους παράγοντες:

- 1) Αριθμός βλαστών τις ημέρες 0 και 8
- 2) Διήθηση μυελού στην πρωτοδιάγνωση (ημέρα 0)
- 3) Διήθηση μυελού (Bone marrow infiltration) και ελάχιστη υπολειμματική νόσος (MRD) τις ημέρες 15 και 33.

3.2 Ποσοτική μέτρηση του cell-free DNA του πλάσματος

Η ποσοτική μέτρηση του cell-free DNA στο πλάσμα του αίματος των ασθενών έγινε με τις 4 λήψεις των δειγμάτων αίματος δηλαδή την ημέρα 0, στην πρωτοδιάγνωση, πριν οι ασθενείς ξεκινήσουν την θεραπεία τους και ακολούθως τις ημέρες 8, 15, 33 πριν λάβουν την θεραπευτική τους αγωγή την ημέρα εκείνη.

Όπως φαίνεται στο 1ο γράφημα το cell-free DNA στο αίμα των ασθενών έχει, πριν την θεραπευτική αγωγή, πολύ υψηλές τιμές, ασυγκρίτως μεγαλύτερες από τις τιμές των υγιών ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου. Ο μέσος όρος του cell-free DNA την ημέρα 0 είναι 23,95 ng/ml με εύρος τιμών (1,6 – 148,4 ng/ml). Καθώς ξεκινά η θεραπευτική αγωγή και λαμβάνεται εκ νέου δείγμα από τους ασθενείς, οι τιμές του cell-free DNA μειώνονται δραματικά την ημέρα 8 στα 3,2 ng/ml (εύρος: 0,17 – 16,08 ng/ml), η πτώση εξακολουθεί, με μικρότερο όμως ρυθμό, την ημέρα 15 και αγγίζει την τιμή 0,9 ng/ml (εύρος 0,46 – 6,55 ng/ml) και αυξάνεται ελαφρώς την ημέρα 33 στα 3,65 ng/ml (εύρος 0,46 – 12,26 ng/ml). 12 μήνες μετά την θεραπεία 18 παιδιά έχουν ομαλή εξέλιξη στην υγεία τους, δηλαδή η νόσος βρίσκεται σε ύφεση, όμως 2 παιδιά υποτροπίασαν από τη νόσο και κατέληξαν.



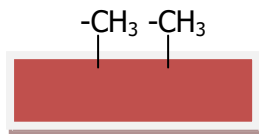
Γράφημα 1: Ποσοτική μέτρηση του ολικού cell-free DNA στο αίμα των ασθενών κατά την πρωτοδιάγνωση (ημέρα 0), καθώς και τις ημέρες 8,15,33 και δείγματα μαρτύρων, δηλαδή υγιών ατόμων ώστε να γίνει σύγκριση.

Σχεδιάγραμμα που απεικονίζει την μέθοδο και τις τεχνικές που αυτή περιλαμβάνει για την μελέτη της **μεθυλίωσης** του γονιδίου **Rassf6** στα λευχαιμικά κύτταρα. Η κατωτέρω μέθοδος σχεδιάστηκε εξ' ολοκλήρου στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής και δεν απαντάται στην διεθνή βιβλιογραφία ούτε αποτελεί τμήμα κάποιας άλλης μελέτης.

Απομόνωση DNA/cell-free DNA



Πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *AciI*, το οποίο πέπτει μόνο αμεθυλίωτα τμήματα DNA και έτσι διαχωρίζεται το καρκινικό από το φυσιολογικό DNA, το οποίο και δεν πολλαπλασιάζεται με PCR. Με αυτόν τον τρόπο αναλύεται μελετάται μόνο το λευχαιμικό DNA τις παρακάτω τεχνικές



ΛευχαιμικόDNA: δεν πέπτεται και πολλαπλασιάζεται



ΦυσιολογικόDNA: πέπτεται, δεν πολλαπλασιάζεται



q real-time PCR
Ποσοτική μέτρηση του καρκινικού φορτίου, πολλαπλασιάζοντας τον υποκινητή του *Rassf6*

Fragment analysis
Ανίχνευση έστω και ενός καρκινικού κυττάρου, πολλαπλασιάζοντας τον υποκινητή του *Rassf6*

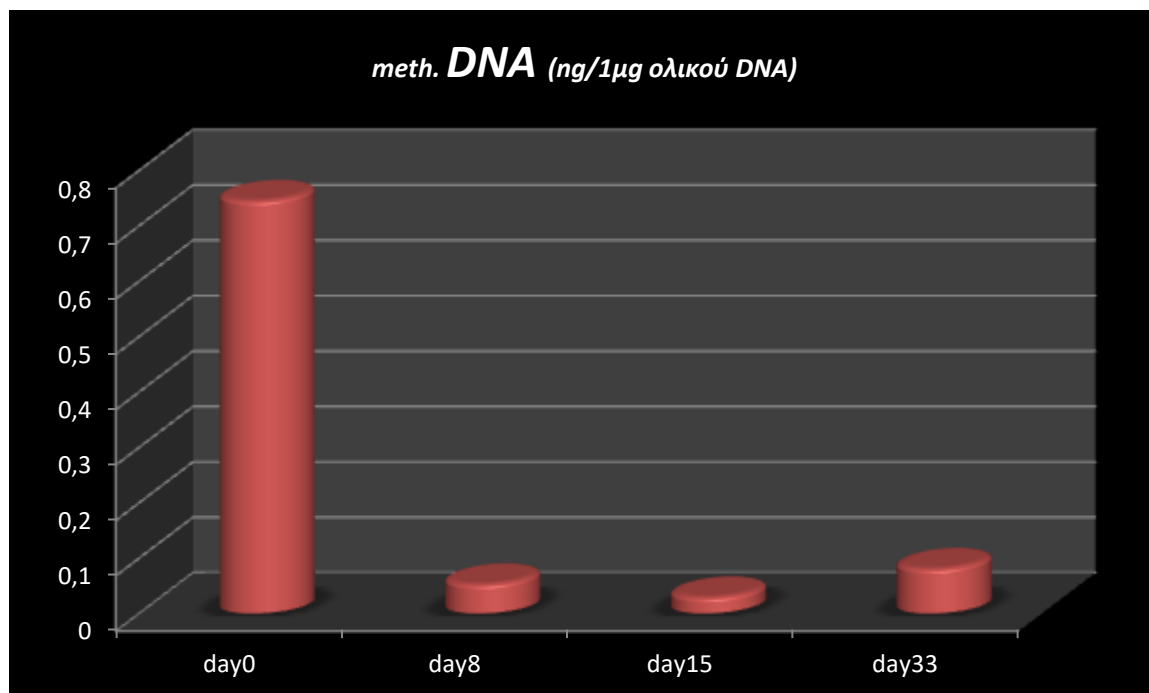
Τροποποίηση
Η C γίνεται T εκτός αν έχει -CH₃ και τότε παραμένει C

Sequencing
Ανάλυση του υποκινητή του *Rassf6*, πόσα -CH₃ έχει

3.3 Ποσοτική μέτρηση του μεθυλιωμένου πυρηνικού DNA

Η ποσοτική μέτρηση του μεθυλιωμένου DNA αφορά το γονίδιο που βρίσκεται στον πυρήνα του καρκινικού κυττάρου και μετρείται χρησιμοποιώντας το γονίδιο *Rassf6* και συγκεκριμένα τα μετάγραφα του υποδοχέα του *Rassf6*, που δεν θρυμματίστηκαν από το περιοριστικό ένζυμο AclI (σελ.64), λόγω της μεθυλίωσης που αυτά έφεραν. Αυτό δείχνει ότι πρόκειται περί λευχαιμικού DNA, διότι τα λευχαιμικά κύτταρα φέρουν μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου *Rassf6*, εν αντιθέσει προς τα υγιή κύτταρα του οργανισμού που παρουσιάζουν αμεθυλίωτο τον υποκινητή του συγκεκριμένου γονιδίου, διότι το συγκεκριμένο γονίδιο λειτουργεί συνεχώς παράγοντας ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη (σελ.39).

Όπως φαίνεται στο 2^ο γράφημα το λευχαιμικό πυρηνικό DNA, δηλαδή το DNA που φέρει μεθυλίωση στον υποκινητή του *Rassf6* και έχει μέγεθος 360 bp, και επομένως αντιπροσωπεύει το DNA που έχει το καρκινικό κύτταρο στον πυρήνα του, ξεκινά από υψηλές τιμές δηλαδή 0,8 ng στα 1000 ng συνολικού DNA στο αίμα των ασθενών την ημέρα 0 πριν ξεκινήσει η αγωγή (εύρος 0,3 ng/μg – 2,1 ng/μg), μειώνεται καθώς ξεκινά η θεραπεία του ασθενούς και την 8^η ημέρα αγγίζει την τιμή 0,05 (εύρος 0,03ng/μg-0,09ng/μg), η μειωμένη τιμή εξακολουθεί την 15^η ημέρα και υπολογίστηκε στα 0,03 ng/μg (εύρος 0,01 ng/μg – 0,04 ng/μg) και την 33^η ημέρα που είναι και η τελευταία αυξάνεται ελαφρώς και μάλιστα λίγο περισσότερο από την ημέρα 8 δηλαδή φτάνει τα 0,08 ng/μg (εύρος 0,06 ng/μg – 0,1 ng/μg). Οι τιμές αποδίδονται ως ng καρκινικού DNA σε 1000 ng (ή 1 μg) φυσιολογικού DNA, ώστε να καταδειχθεί η ποσότητα του μεθυλιωμένου στο σύνολο του αμεθυλιώτου – φυσιολογικού DNA.



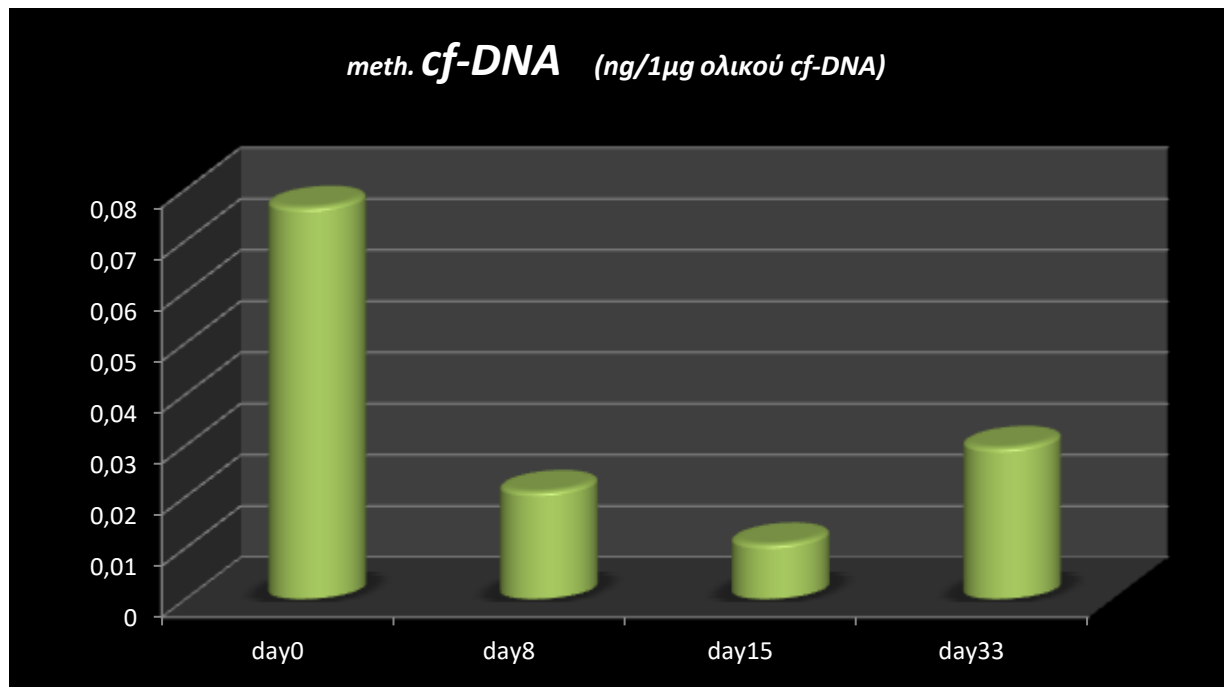
Γράφημα 2: Ποσοτική μέτρηση με *quantitative real-time PCR* του μεθυλιωμένου πυρηνικού DNA, δηλαδή του DNA που έχουν τα καρκινικά κύτταρα στον πυρήνα τους, στην πρωτοδιάγνωση (ημέρα 0) και κατά την θεραπεία τους (ημέρες 8, 15, 33).

3.4 Ποσοτική μέτρηση του μεθυλιωμένου cell free DNA των λευχαιμικών κυττάρων

Η ποσοτική μέτρηση του μεθυλιωμένου cell-free DNA των λευχαιμικών κυττάρων γίνεται με μέτρηση του cell-free DNA που δεν θρυμματίστηκε από το περιοριστικό ένζυμο AciI, πράγμα που σημαίνει πως τα θραύσματα που πολλαπλασιάζονται και μετρώνται με την quantitative real time PCR φέρουν μεθυλίωση στον υποδοχέα του γονιδίου *Rassf6* (σελ.60). Εξαιτίας του γεγονότος ότι το cell-free DNA, που κυκλοφορεί στο αίμα, είναι κατακερματισμένο, το θραύσμα που ανιχνεύεται με την quantitative real time PCR σχεδιάστηκε να είναι μεγέθους 119 bp.

Επιπροσθέτως, καθώς είναι γνωστό επιστημονικά (Jahr S et. al, 2001), πως τα cell-free DNA προέρχονται από απόπτωση ή νέκρωση κυττάρων τα οποία γι' αυτόν τον λόγο, απελευθερώνουν κατακερματισμένα νουκλεϊκά οξέα, αποτελεί μια πρώτη εικόνα της καταστροφής του όγκου, λόγω της χημειοθεραπείας στην οποία υποβάλλεται ο ασθενής, δηλαδή λευχαιμικά κύτταρα καταστρέφονται και απελευθερώνουν καρκινικό DNA.

Στην δική μας μέτρηση βλέπουμε πως στο 3^ο γράφημα οι ασθενείς ξεκινούν στην πρωτοδιάγνωση (ημέρα 0) με καρκινικό cell –free DNA, στα 0,08 ng/μg (εύρος 0,05 ng/μg – 0,08 ng/μg), συνεχίζουν να παρουσιάζουν τιμές την 8^η ημέρα θεραπείας της τάξεως του 0,02 ng (εύρος 0,02 ng/μg – 0,03 ng/μg), εξακολουθούν, καθώς η χημειοθεραπεία εξελίσσεται, να διατηρούν χαμηλά την τιμή και να εμφανίζουν την 15^η ημέρα 0,01 ng/μg (εύρος 0,01 ng/μg – 0,02 ng/μg) και την 33^η ημέρα θεραπείας η μέση τιμή του καρκινικού cell-free DNA αυξάνεται ελαφρώς στα 0,03 ng/μg (εύρος 0,02 ng/μg – 0,03 ng/μg). Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι το cell-free DNA που μετρείται σε αυτό το στάδιο είναι πολύ λιγότερο του πυρηνικού DNA, αν και πρόκειται για λευχαιμικά νουκλεϊκά οξέα και στις δυο περιπτώσεις, δηλαδή ξεκινά με μέση τιμή τα 0,08 ng/μg ενώ την ίδια στιγμή το πυρηνικό DNA ξεκινά από 0,8 ng/μg, κάτι που επιβεβαιώνει την διεθνή βιβλιογραφία περί ελαχίστων ποσοτήτων cell-free DNA στο αίμα του οργανισμού.



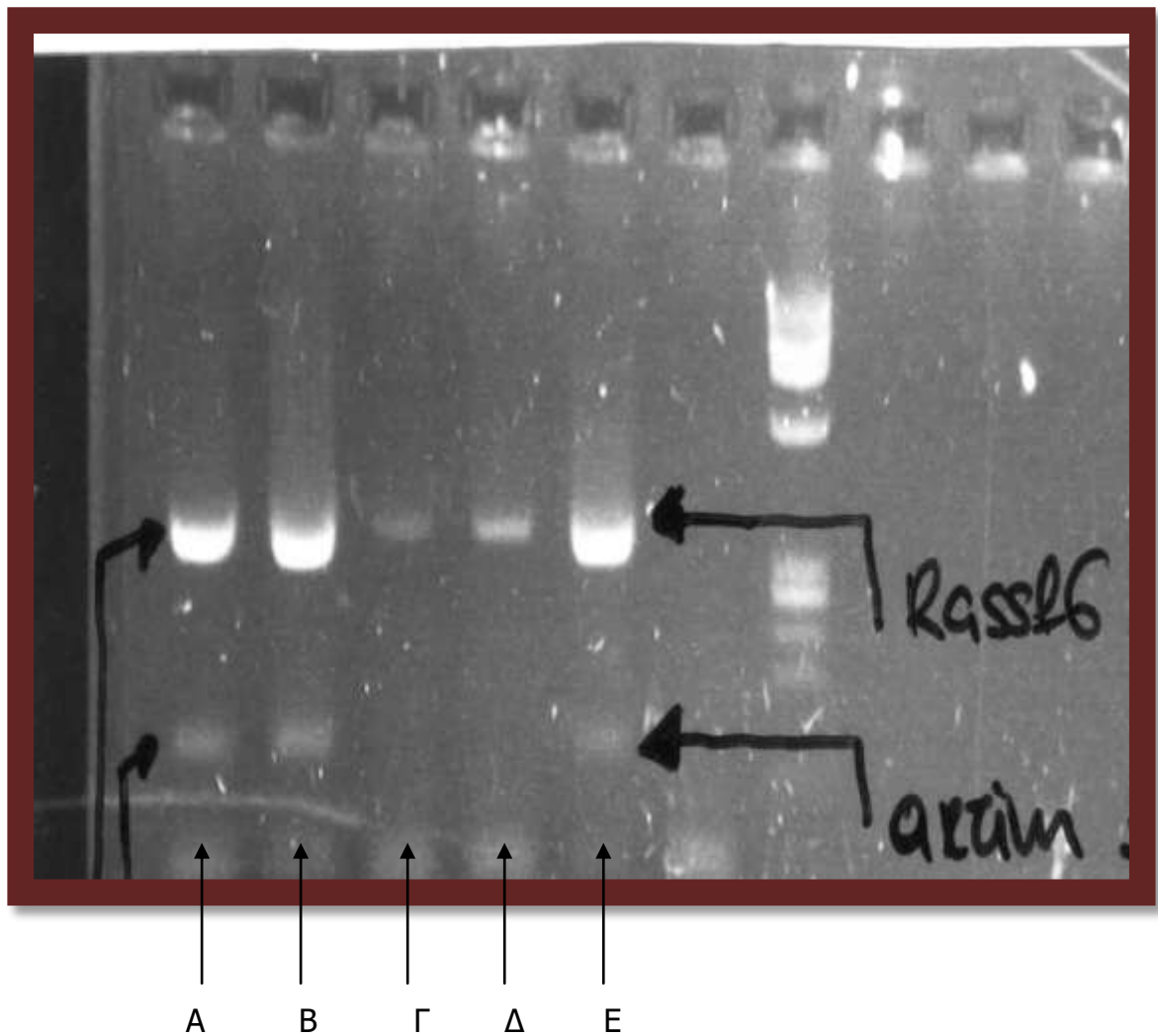
Γράφημα 3^ο: Ποσοτική μέτρηση του μεθυλιωμένου cell-free DNA που κυκλοφορεί στο αίμα του ασθενούς, δηλαδή του DNA που αποβάλλεται υπό μορφήν θραυσμάτων κατά την καταστροφή του καρκινικού κυττάρου. Φέρει την μεθυλίωση του καρκινικού κυττάρου (σελ. 71,72,73,74) και για αυτό δεν πέπτεται από το περιοριστικό ένζυμο. Συνεπεία αυτού, το τμήμα που φέρει την μεθυλίωση παραμένει άθικτο και πολλαπλασιάζεται σε ακόλουθη *quantitative real time PCR*.

3.5 Ανίχνευση θραυσμάτων DNA με χρήση μάρτυρα (*Fragment analysis*)

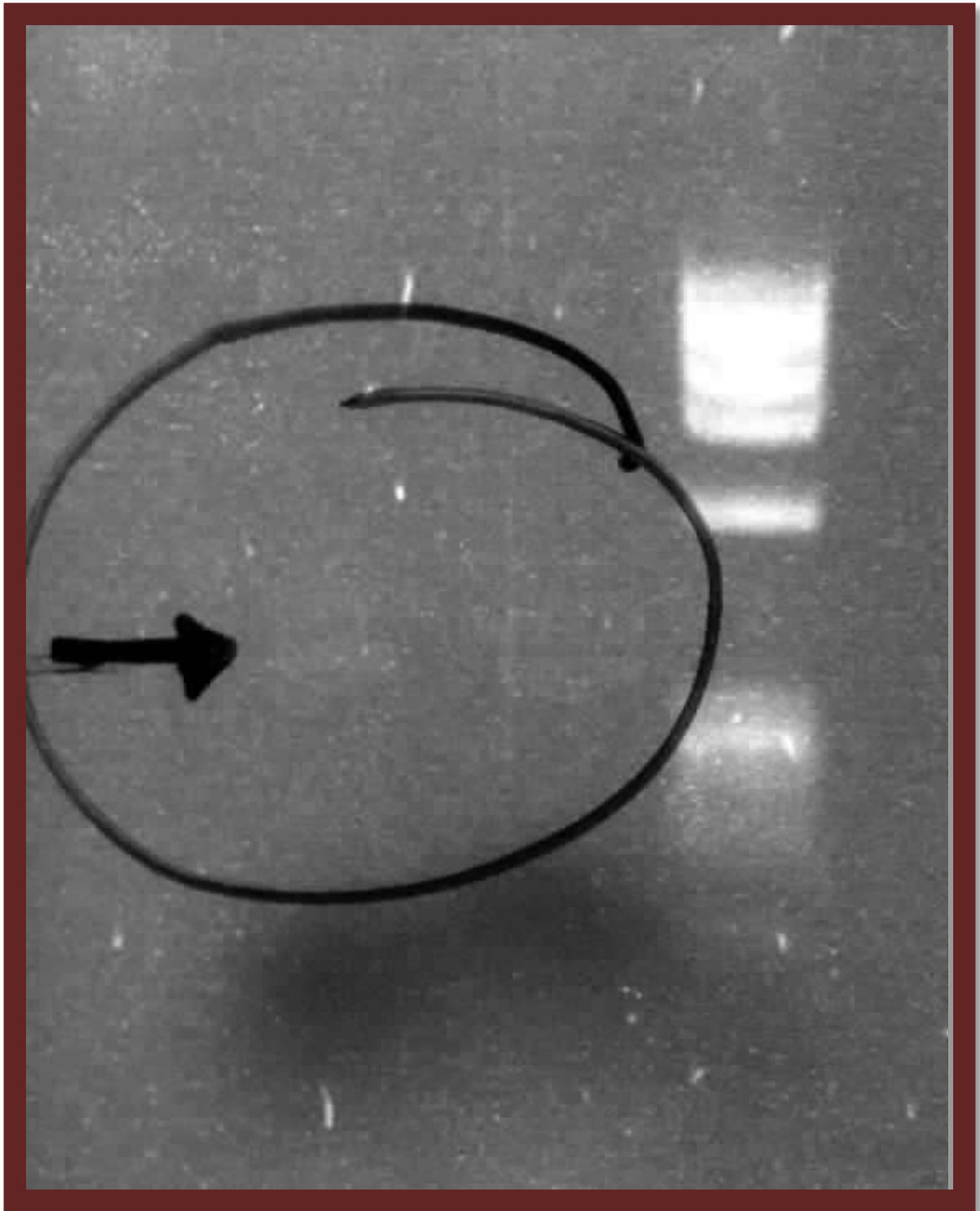
Ακολουθήθηκε η τεχνική αυτή για το λευχαιμικό DNA με σκοπό την ανίχνευση καρκινικού πυρηνικού και cell-free DNA, σε όλες τις ημέρες θεραπείας (0 – 33), έτσι ώστε να εντοπιστούν μικροποσότητες λευχαιμικού φορτίου της τάξεως του ενός κυττάρου. Όπως βλέπουμε στα διαγράμματα που ακολουθούν, μεθυλιωμένο (λευχαιμικό) DNA ανιχνεύεται σε όλες τις ημέρες θεραπείας και στα δύο είδη δειγμάτων (πυρηνικό DNA και cell-free DNA), το οποίο παρουσιάζει μεταβολή και μάλιστα μειώνεται κατά την πρόοδο της θεραπείας, ανιχνεύεται όμως και την τελευταία ημέρα (33) της αγωγής των ασθενών.

Η εικόνα 15 είναι η απεικόνιση της βασικής αρχής που ακολουθήθηκε σε αυτήν την μελέτη, για να διερευνηθεί το λευχαιμικό γενετικό υλικό. Απαραίτητο, και άρα πρωταρχικό στάδιο για την μελέτη, ήταν να διαχωριστεί το λευχαιμικό DNA από το DNA των υγιών κυττάρων που βρίσκονται στο αίμα του ασθενούς. Για τον σκοπό αυτόν το φυσιολογικό DNA πέπτεται με το περιοριστικό ένζυμο AciI και απομένει το καρκινικό DNA το οποίο συνεχίζει στην περαιτέρω κατεργασία και μελέτη του (σελ.60).

Απόδειξη της επιτυχούς πέψης είναι το γονίδιο *ακτίνη (ACTB)* το οποίο, ενώ εμφανίζεται στα δυο πρώτα δείγματα A και B τα οποία είναι δείγματα ασθενών προ πέψεως, εν τούτοις εξαφανίζεται στα δείγματα Γ και Δ, διότι έχει κατακερματιστεί και άρα δεν πολλαπλασιάζεται από την PCR. Είναι αξιοσημείωτη η ζώνη που εμφανίζει το υπό μελέτην γονίδιο *Rassf6*. Ενώ στα δείγματα προ πέψης A και B η ζώνη παρουσιάζει μεγάλο πάχος, διότι πολλαπλασιάζεται το καρκινικό και το φυσιολογικό DNA μαζί, μετά την πέψη, στα δείγματα Γ και Δ, η ζώνη είναι σημαντικά αχνή διότι αντιπροσωπεύει μόνο το καρκινικό DNA, το οποίο είναι σημαντικά λιγότερο, τόσο ώστε για να ανιχνευτεί χρησιμοποιήθηκαν οι εξαιρετικά ευαίσθητες τεχνικές, *fragment analysis* και *quantitative real-time PCR*.

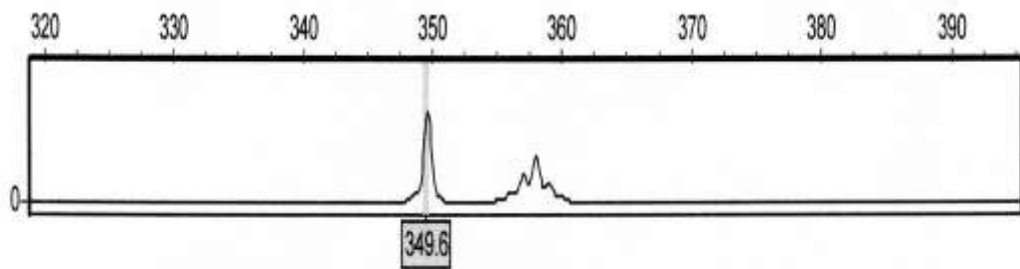


Εικόνα 15 : Φαίνεται η βασική αρχή για την μελέτη του λευχαιμικού DNA που είναι ο διαχωρισμός του από το φυσιολογικό DNA. Το δείγμα E είναι ο μάρτυρας στον οποίον φαίνονται οι δυο ζώνες της PCR δηλαδή το γονίδιο που μας ενδιαφέρει, το *Rassf6* και η *ακτίνη* που αποτελεί το εσωτερικό γονίδιο. Τα δείγματα A και B είναι δείγματα ασθενών πριν την πέψη με το AclI και τα Γ και Δ είναι τα ίδια δείγματα μετά την πέψη.



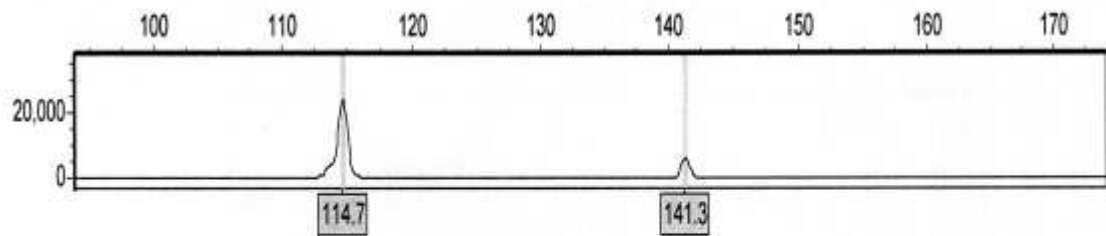
Εικόνα 16: Φαίνονται πολύ αχνές ζώνες στα 360bp οι οποίες αντιπροσωπεύουν το λευχαιμικό DNA και οι οποίες είναι αδύνατο να μελετηθούν με απλή PCR. Για αυτόν τον λόγο η μελέτη έγινε με *fragment analysis* (εικόνα 17). Η ζώνη της *ακτίνης* απουσιάζει εντελώς καθώς κατακερματίστηκε από το περιοριστικό ένζυμο AciI.

Sample 5: E08_13.fsa

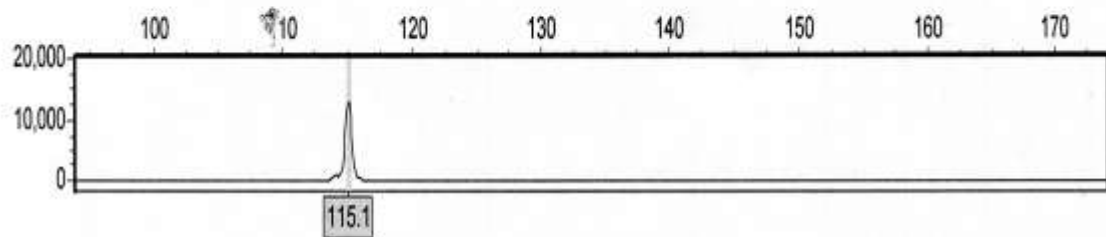


Εικόνα 17: Ανίχνευση της ζώνης που αχνοφάνεται στην εικόνα 16 με την τεχνική ανάλυσης θραυσμάτων (*fragment analysis*).

Sample 3: 0.5_H11.fsa



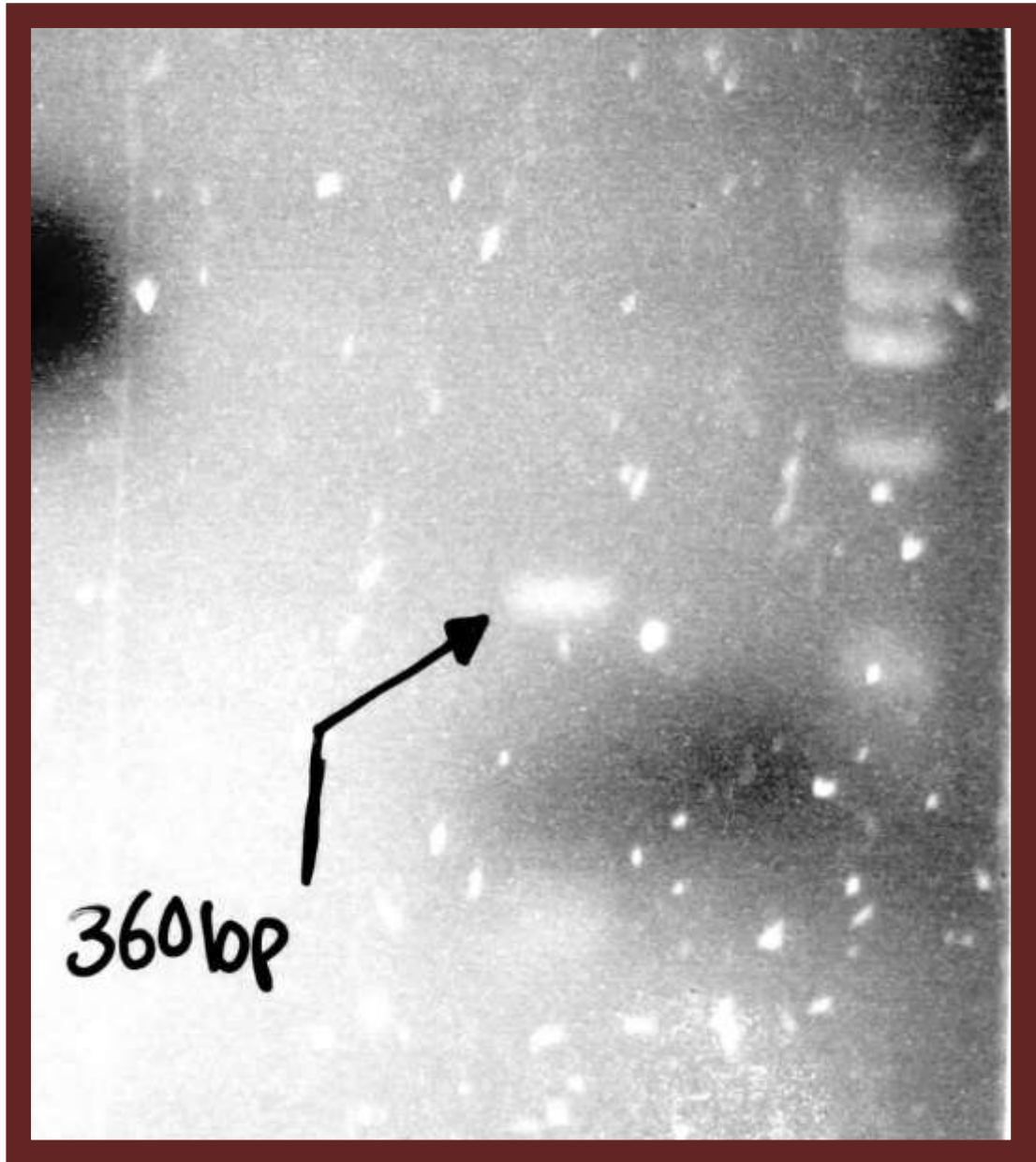
Sample 4: 0.05_A12.fsa



Εικόνα 18: Ανάλυση των θραυσμάτων στο cell-free DNA προ και μετά την πέψη. Προ πέψεως ανιχνεύεται το θραύσμα της *ακτίνης* στα 141 bp και το κομμάτι του γονιδίου *Rassf6* στα 115bp. Μετά την πέψη απουσιάζει εντελώς το θραύσμα της *ακτίνης* και απομένει το *Rassf6* που πλέον αντιπροσωπεύει το λευχαιμικό cell-free DNA.

3.6 Διερεύνηση της μεθυλίωσης που φέρει η αλληλουχία του υποκινητή του γονιδίου *Rassf6* (τεχνική *Sequencing*)

Για τον σκοπό αυτόν χρησιμοποιήθηκαν δύο προϊόντα PCR μεγέθους 360 bp και 119 bp, τα οποία αφορούν το πυρηνικό και το cell-free DNA αντιστοίχως.



Εικόνα 19: Ζώνη τροποποιημένου DNA το οποίο θα αναλυθεί κατά βάση με την τεχνική *sequencing*.

Όπως βλέπουμε στο παρακάτω σχήμα, στο **πυρηνικό DNA**, ο υποκινητής του γονιδίου *Rassf6* εμφανίζεται υπερμεθυλιωμένος με 14 μεθύλια (-CH₃), γεγονός που δίνει την εικόνα καρκινικού κυττάρου .

Προϊόν PCR = 359bp



C =κυτοσίνη μεθυλιωμένη

Gene: RASSF6 ENSG00000169435

Chromosome 4: 73,571,550-73,620,631 reverse strand

ACTGAGGCACAGGGAGTGGCTCAGGTTTCTTGACACTTCCCTGCTGTGGCGAAAAGGAGA
AATAATTAACAGCTCCTGGGGCTCCAGGATCGCTGATCGCGTCGGGGGCACTGCAAGCGC
CCAGCTGAGCCATGCTCTGGGAGGAGACAGGCGCCGCCCTGCGCCCGCGCGGGCCTCGG
ACCTCCCCTACAGGTGAGTGAAGTACTCGCGGAGTCCCAGCCCGGCAGAGACAGGGCACTGGTT
TCCCTCTACCAGAGTTCCTGACCCAGCCGAGAACAACCGCGAAGCAAGTTCAGCCGAAC
AACGATGGTGAAAAGGGTCCTCCTGCTCACAGTGTGAATAACAGGTAAAAAATGGGGATG

Το παρακάτω σχήμα παρουσιάζει **cell-free DNA**, που φέρει το ίδιο πρότυπο μεθυλίωσης με αυτό του πυρηνικού DNA, ένδειξη ότι πιθανότατα προέρχεται από τον όγκο. Το cell free DNA είναι μικρότερο σε μέγεθος από το πυρηνικό καθώς είναι κατακερματισμένο και έτσι το προϊόν PCR είναι μικρότερου μεγέθους 119bp.

Προϊόν PCR = 119bp

Gene: RASSF6 ENSG00000169435

Chromosome 4: 73,571,550-73,620,631 reverse strand



Τα παραπάνω πρότυπα μεθυλίωσης του **πυρηνικού** και του **cell-free DNA** αφορούν τον υποκινητή του γονιδίου, ο οποίος εμφανίζεται υπερμεθυλιωμένος και παρουσιάστηκε σε δυο ασθενείς με δυσμενή εξέλιξη, δηλαδή τα άτομα αυτά υποτροπίασαν μετά την θεραπευτική αγωγή και κατέληξαν.

Στα παρακάτω σχήματα, στο **πυρηνικό DNA** ο υποκινητής του γονιδίου *Rassf6* εμφανίζεται μεθυλιωμένος με 5 ή 7 μεθύλια (-CH₃).

Προϊόν PCR = 359bp

5 μεθύλια (-CH₃)

Gene: RASSF6 ENSG00000169435

Chromosome 4: 73,571,550-73,620,631 reverse strand

ACTGAGGCACAGGGAGTGGCTCAGGTTTCTTGACACTTCCCTGCTGTGGCGAAAAGGAGA
AATAATTAACAGCTCCTGGGGCTCCAGGATCGCTGATCGCGTCGGGGGCACTGCAAGCGC
CCAGCTGAGCCATGCTCTGGGAGGAGACAGGCGCCGCCCTGCGCCCGCGCGGGCCTCGG
ACCTCCCCTACAGGTGAGTGACTCGCGGAGTCCCAGCCCGCAGAGACAGGGCACTGGTT
TCCCTCTACCAGAGTTCTTGACCCAGCCGAGAAACAAACCGCGAAGCAAGTTCAGCCGAAC
AACGATGGTGAAAAGGGTCCTCCTGCTCACAGTGTGAATAACAGGTAAAAAATGGGGATG

Το **cell-free DNA** του παραπάνω κυττάρου

Προϊόν PCR = 119bp

5 μεθύλια (-CH₃)

Gene: RASSF6 ENSG00000169435

Chromosome 4: 73,571,550-73,620,631 reverse strand

CCAGCTGAGCCATGCTCTGGGAGGAGACAGGCGCCGCCCTGCGCCCGCGCGGGCCTCGG
ACCTCCCCTACAGGTGAGTGACTCGCGGAGTCCCAGCCCGCAGAGACAGGGCACTGGTT

Προϊόν PCR = 359bp

7 μεθύλια (-CH₃)

Gene: RASSF6 ENSG00000169435

Chromosome 4: 73,571,550-73,620,631 reverse strand

```
ACTGAGGCACAGGGAGTGGCTCAGGTTTCTTGACACTTCCCTGCTGTGGCGAAAAGGAGA
AATAATTAACAGCTCCTGGGGCTCCAGGATCGCTGATCGCGTCGGGGGCACTGCAAGCGC
CCAGCTGAGCCATGCTCTGGGAGGAGACAGGCGCCGCCCTGCGCCCGCGCGGGCCTCGG
ACCTCCCCTACAGGTGAGTGACTCGCGGAGTCCCAGCCCGGCAGAGACAGGGCACTGGTT
TCCCTTACCAGAGTTCTTGACCCAGCCGAGAACAACCGCGAAGCAAGTTCAGCCGAAC
AACGATGGTGAAAAGGGTCCTCCTGCTCACAGTGTGAATAACAGGTAAAAAATGGGGATG
```

Το **cell-free DNA** του παραπάνω κυττάρου

Προϊόν PCR = 119bp

7 μεθύλια (-CH₃)

Gene: RASSF6 ENSG00000169435

Chromosome 4: 73,571,550-73,620,631 reverse strand

```
CCAGCTGAGCCATGCTCTGGGAGGAGACAGGCGCCGCCCTGCGCCCGCGCGGGCCTCGG
ACCTCCCCTACAGGTGAGTGACTCGCGGAGTCCCAGCCCGGCAGAGACAGGGCACTGGTT
```

Τα παραπάνω πρότυπα μεθυλίωσης παρουσίασαν ασθενείς με καλή εξέλιξη στην θεραπεία.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ΟΛΛ) είναι η πιο κοινή μορφή καρκίνου στην παιδική ηλικία. Η ΟΛΛ κατηγοριοποιείται σε γενετικούς υποτύπους αναλόγως των κυτταρογενετικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών, από τις οποίες η πιο συχνή είναι η πρώιμη Β- λεμφοβλαστική λευχαιμία (BCP – ALL) και οι μεταθέσεις *ETV6/RUNX1* δηλαδή t (12;21) (p13;q22), *EZA/PBX1* δηλαδή t (1;19) (q23;q13) και BCR/ABL δηλαδή t (9;22) (q34;q11), υψηλή υπερδιπλοειδία (HeH) και ανακατατάξεις του γονιδίου *MLL* στην χρωμοσωμική περιοχή 11;23 (Pui et al, 2004). Ανακατατάξεις οδηγούν στην δημιουργία ενός υβριδικού γονιδίου (λόγω διάχυσης – fusion gene) του *TEL-AML1* (Zheng et al, 2004). Το γονίδιο *AML1* μετονομάστηκε σε *RUNX1* και βρίσκεται στην θέση 21q22. Η μετάθεση που περιλαμβάνει τα 2 προαναφερθέντα γονίδια είναι t (12 ; 21) (9p13, q22) και απαντάται στο 20 – 30% των παιδιών με πρώιμη Β οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (Loh et al, 2012).

Αυτές οι εκτεταμένες γενετικές αλλαγές είναι σημαντικό χαρακτηριστικό στην παρακολούθηση της θεραπείας των ασθενών με BCP-ALL. Η Τ-ΟΛΛ χαρακτηρίζεται από κρυπτικές ανακατατάξεις σε πολλαπλές γενωμικές περιοχές, συμπεριλαμβανομένων περιοχών στο γονίδιο του υποδοχέα του Τ -λεμφοκυττάρου (T-cell receptor gene) στα χρωμοσώματα 14q11 και 7q32 (Graux et al, 2006 ; Karman et al ; 2009). Μελέτες έχουν καταδείξει ενθαρρυντικά αποτελέσματα σχετικά με την υπερμεθυλίωση νησίδων CpG σε συγκεκριμένα γονίδια όσον αφορά την ταυτοποίηση του τύπου της παιδικής ΟΛΛ και την πρόγνωση της εξέλιξης της νόσου (Gutierrez et al, 2009 ; Roman-Gomez et al, 2004). Επίσης εκτεταμένες αναλύσεις στη μεθυλίωση έχουν αναδείξει πρότυπα μεθυλίωσης που διακρίνουν τα κύτταρα της ΟΛΛ από τα φυσιολογικά κύτταρα (Kuang et al, 2008 ; Taylor et al, 2007) όπως επίσης και από άλλους τύπους λευχαιμίας, όπως την ΟΜΛ (Fingueroa et al, 2008), ΧΛΛ και ΧΜΛ (Taylor et al, 2007). Επιπροσθέτως η μεθυλίωση του γονιδίου DDX51 βρέθηκε να διαφοροποιεί ασθενείς με Β-ΟΛΛ και Τ-ΟΛΛ (Taylor et al, 2007).

Η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ΟΛΛ) προκαλείται όταν τα πρόδρομα B- και T- λεμφοκύτταρα αδυνατούν να διαφοροποιηθούν σε ώριμα κύτταρα και χαρακτηρίζονται από ραγδαίο πολλαπλασιασμό ανώριμων λεμφοβλαστών (Jaffe et al, 2001 ; Graux et al, 2006). Πολλοί οι πιθανοί παράγοντες που παίζουν ρόλο στην λευχαιμογένεση, περιλαμβανομένων χρωμοσωμικών μεταθέσεων καθώς και γενετικών ή επιγενετικών τροποποιήσεων που μεταβάλλουν την λειτουργία ενός γονιδίου ή ομάδας γονιδίων. Πολλές, όχι τυχαίες, χρωμοσωμικές μεταθέσεις είναι γνωστό ότι τροποποιούν τον πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση, την απόπτωση και την μεταγραφή γονιδίων στην ΟΛΛ (Pui et al ; 1990).

Η ανώμαλη μεθυλίωση νησίδων CpG του υποδοχέα του γονιδίου (CGI) είναι μία επιγενετική τροποποίηση του DNA, που είναι δυνατόν να καταστείλει ή να μειώσει την γονιδιακή έκφραση και μπορεί να έχει δυσμενή αποτελέσματα για τον οργανισμό, εάν τα γονίδια – στόχοι έχουν τον ρόλο ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Ωστόσο οι μηχανισμοί με τους οποίους επισυμβαίνει η μεθυλίωση του DNA στην ΟΛΛ, τότε συμβαίνει και ποια γονίδια αφορά δεν είναι πλήρως κατανοητοί.

Θεωρείται ωστόσο ότι τα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα υφίστανται διάφορες μοριακές αλλαγές συμπεριλαμβανομένης της αύξησης της έκφρασης της DNA μεθυλοτρανσφεράσης 1 (Wagner et al, 2005), η οποία ευθύνεται για την εγκατάσταση και την διατήρηση της μεθυλίωσης στο DNA (Taylor et al, 2007). Παλαιότερες μελέτες που μελέτησαν την ανώμαλη μεθυλίωση στις ΟΛΛ, συσχέτισαν τους υπερμεθυλιωμένους υποκινητές με την πρόγνωση (Roman-Gomez et al, 2003), τις κυτταρογενετικές αλλοιώσεις (Shteper et al, 2001), τον υπότυπο (Zheng et al, 2009), και την υποτροπή (Matsuhita et al, 2004). Οι παραπάνω μελέτες αναφέρουν ότι είναι συχνό το φαινόμενο οι πολλές νησίδες CpG του υποκινητή να είναι μεθυλιωμένες με ανώμαλο τρόπο. Όπως το γονίδιο *ABCB1* το οποίο βρέθηκε μεθυλιωμένο στον υποκινητή σε ασθενείς με ΟΛΛ και σχετίστηκε η μεθυλίωσή του με καταστολή της γονιδιακής έκφρασης (Garcia – Manero et al, 2002).

Η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ΟΛΛ) προέρχεται από ανώμαλο πολλαπλασιασμό ανώριμων λεμφοβλαστικών κυττάρων της B ή T σειράς. Είναι

ο πιο κοινός και θεραπεύσιμος τύπος καρκίνου της παιδικής ηλικίας. Η μεθυλίωση του DNA παίζει κεντρικό ρόλο στην ρύθμιση της μεταγραφής του γονιδίου. Η ανώμαλη μεθυλίωση του γονιδιώματος έχει παρατηρηθεί στα καρκινικά κύτταρα και ενοχοποιείται για μεταγραφική σίγαση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, παραδείγματος χάριν τα γονίδια *p15 (CDKN2B)*, *p16 (CDKN2A)*, *p57 (CDCN160)*, *p73 (TP73)*, *SHR-1* και *DAPK* εμφανίζονται συχνά υπερμεθυλωμένα και γι' αυτό σχετίζονται με την εξέλιξη του όγκου σε λεμφοβλαστικές κακοήθειες (Zhao et al, 2013).

Μεταλλάξεις σε πρωτεΐνες της υπεροικογένειας Ras ή σε προγενέστερους και μεταγενέστερους σηματοδοτικούς ενεργοποιητές του μονοπατιού που συμμετέχουν, παίζουν σπουδαίο ρόλο στην παθογένεση των περισσότερων μορφών καρκίνου.

Οι πρωτεΐνες Ras αλληλεπιδρούν με πλειονότητα μεταγενέστερων ενεργοποιητών, έτσι ώστε να ρυθμίσουν διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια, σημαντικά για την φυσιολογική κυτταρική ανάπτυξη (Dawnward, 2003). Ωστόσο οι πρωτεΐνες Ras ρυθμίζουν επίσης την απόπτωση μέσω διαφόρων προσφάτως αναγνωρισμένων ενεργοποιητών, που συνιστούν την οικογένεια ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών RASSF.

Η οικογένεια RASSF αποτελείται από 6 γνωστά μέλη, τα *Rassf1 – 6*, τα οποία περιλαμβάνουν τις πρωτεϊνικές περιοχές αλληλεπίδρασης α) καρβοξυτελικό άκρο C-terminal RA (του τύπου RaIGDs/AF-6) και β) Sav/RASSF/Hippo (SARAH) (Weyden et al, 2007).

Επιπροσθέτως έχει καταδεχθεί πως κάποια μέλη της οικογένειας RASSF (τα *RASSF1A*, *RASSF2*, *RASSF4* και *RASSF5A*) παρουσιάζουν συχνά επιγενετική απενεργοποίηση μέσω υπερμεθυλίωσης των νησίδων CpG στην περιοχή του υποκινητή, σε μεγάλο εύρος συμπαγών όγκων (Weyden, Adams, 2007 ; Hesson et al, 2007). Οι πρωτεΐνες αυτές ρυθμίζουν την απόπτωση μέσω μιας σειράς μεταγενέστερων, του μονοπατιού, ενεργοποιητών, όπως οι κινάσες σερίνης / θρεονίνης των θηλαστικών MST1 και MST2 και ο ρυθμιστής της απόπτωσης 1 (MOAP-1) (Khokhlatcher et al, 2004 ; Vos et al, 2006 ; Baksh et al, 2005 ; Matallanas et al, 2007 ; O' Neill et al, 2004).

Προσφάτως ταυτοποιήθηκαν πρόσθετα μέλη της οικογένειας RA-domain containing family τα *RASSF7* (γνωστά και ως *HRC1* που εδράζεται στο 11p15.5), *Rassf8* (γνωστό και ως *HOJ-1* ή *C12ORF2* στο 12p12.1) *RASSF9* (γνωστό και ως *P-CTP1* ή *PAMCI* στο 12q21.31) και *RASSF10* (γνωστό και ως *LOC644943* στο 11p15.2). Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που αποκλίνουν και δομικά διαφέρουν από τα μέλη *RASSF 1-6* και περιέχουν την περιοχή RA εντός του εκτεταμένου αμινοτελικού τους άκρου αλλά στερούνται την περιοχή SARAH. Για αυτόν τον λόγο οι πρωτεΐνες *RASSF 7-10* αναφέρονται ως “αμινοτελική” οικογένεια *RASSF* για να διακρίνονται από τα κλασσικά μέλη *RASSF 1-6* (Hesson et al, 2009).

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια να μελετηθούν δείκτες, οι οποίοι θα μπορούσαν να δώσουν αξιόπιστα αποτελέσματα για την πορεία ασθενών με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία παιδικού τύπου, και να αποτελέσουν ένα αξιόπιστο εργαλείο για τον αιματολόγο-ογκολόγο παρέχοντας του ακριβείς πληροφορίες για τα καρκινικά κύτταρα στο αίμα του ασθενούς του κατά την διάρκεια της θεραπείας πρώτης γραμμής. Για τον σκοπό αυτό αναζητήθηκαν στην διεθνή βιβλιογραφία μοριακοί δείκτες που σχετίζονται με τις αιματολογικές κακοήθειες. Εκτός από τα κυτταρογενετικά στοιχεία (χρωμόσωμα Philadelphia), όπως επίσης και τις ελλείψεις και διπλασιασμούς σε κάποια γονίδια (π.χ. *IKAROS*) που αναφέρθηκαν στην σελίδα 26, η μεθυλίωση σε συγκεκριμένα γονίδια παρουσίαζε αδύναμη εικόνα.

Αρκετές μελέτες π.χ. Taylor et al., 2007, Milani et al., 2010 ασχολήθηκαν με την μεθυλίωση γονιδίων στην ΟΛΛ και μάλιστα μελετώντας με methylation- array CGH πληθώρα γονιδίων, σαρώνοντας το γονιδίωμα, στην προσπάθειά τους να βρουν γονίδια των οποίων η μεθυλίωση έπαιζε ρόλο στην εμφάνιση της κακοήθειας. Το πρόβλημα ωστόσο στις περισσότερες μελέτες ήταν ότι τα γονίδια αυτά εμφανίζονταν μεθυλιωμένα σε μικρό αριθμό λευχαιμικών ασθενών (π.χ. στο 11% των δειγμάτων), καθιστώντας αυτά τα γονίδια αναξιόπιστους δείκτες.

Στην δική μας μελέτη έγινε προσπάθεια να μελετηθεί στοχευμένα κάποιο γονίδιο που θα μας έδινε πληροφορία σε όλα τα δείγματα των ασθενών μας και τις 4 ημέρες λήψεως του αίματος. Για τον σκοπό αυτό

σχεδιάστηκε στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής ειδική μέθοδος, σχεδιάγραμμα της οποίας παρουσιάζεται στην σελίδα 60. Η μέθοδος αποτελείται από αρκετές τεχνικές υψηλής ευαισθησίας (*fragment analysis, quantitative real-time PCR*), διότι είναι σχεδιασμένη να ανιχνεύει την παρουσία ακόμα και ενός καρκινικού κυττάρου στο δείγμα. Η σχεδιασθείσα μέθοδος δεν απαντάται στην διεθνή βιβλιογραφία, ούτε αποτελεί κομμάτι κάποιας άλλης μελέτης.

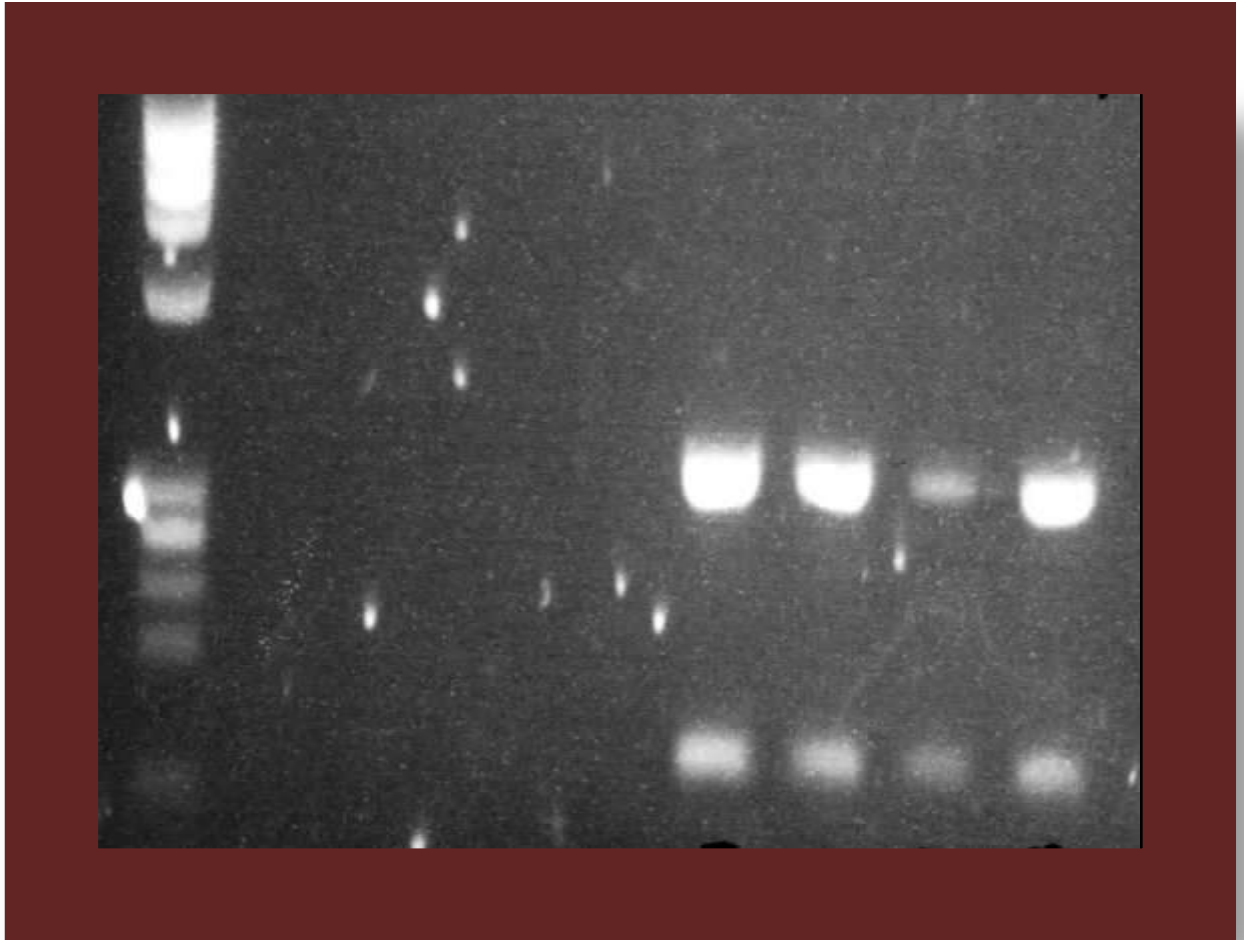
Επιλέχθηκε το γονίδιο *RASSF 6* διότι σε δείγματα ασθενών (Hesson et al., 2009) με πρώιμη Β-λευχαιμία παιδικού τύπου, παρουσίαζε μεθυλίωση στον υποκινητή του ενώ σε δείγματα υγιών ατόμων εμφανιζόταν εντελώς αμεθυλίωτος ο συγκεκριμένος υποκινητής, εύρημα που διαχώριζε τα υγιή από τα λευχαιμικά κύτταρα. Για να γίνει εφικτός ο διαχωρισμός αυτός στα δείγματα του αίματος που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, ακολουθήθηκε η στρατηγική της πέψης του DNA των υγιών κυττάρων, ώστε να μελετηθεί περαιτέρω και ενδελεχώς το DNA της λευχαιμίας.

Το περιοριστικό ένζυμο *AciI* επιλέχθηκε διότι θραύει το τμήμα του DNA που μας ενδιαφέρει, δηλαδή τον υποκινητή του *Rassf6*, σε 5 θέσεις, αλλά αδυνατεί να το πράξει αν υπάρχουν μεθυλιωμένες κυτοσίνες. Αυτή η ιδιότητα του ενζύμου μας έδωσε την δυνατότητα να διαχωρίσουμε τα μετάγραφα του *Rassf6* που προέρχονται από φυσιολογικά κύτταρα, και δεν είναι μεθυλιωμένα άρα κατακερματίζονται, από τα μετάγραφα του υποκινητή του κυττάρου της λευχαιμίας που φέρουν ικανή έως και έντονη μεθυλίωση και για αυτό δεν πέπτονται, επομένως παραμένουν ανέπαφα και μπορούν να πολλαπλασιαστούν με PCR.

Το στάδιο αυτό είναι το αρχικό σχεδόν αυτής της μεθόδου και είναι κομβικό σημείο διότι διαχωρίζει τα υγιή από τα καρκινικά κύτταρα στο DNA των οποίων εφαρμόζονται οι τεχνικές υψηλής ευαισθησίας *fragment analysis, quantitative real-time PCR* και *Sanger sequencing*. Αξίζει να σημειωθεί πως στην διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται πως για να κατεργαστεί και να μελετηθεί το καρκινικό DNA απομονώνονται λευχαιμικά κύτταρα μέσω φυγοκεντρήσεων χρησιμοποιώντας φικόλλη (Milani et. al., 2010) ή χρησιμοποιούνται καλλιέργειες καρκινικών σειρών που δίνουν αρκετό DNA

λόγω του μεγάλου αριθμού καρκινικών κυττάρων στην καλλιέργεια (Hesson et al., 2009). Για να ελεγχθεί η ενεργότητα του ενζύμου και η αξιοπιστία αυτού του σταδίου, δηλαδή ότι η πέψη πραγματοποιήθηκε επιτυχώς, χρησιμοποιήσαμε στην PCR και ένα εσωτερικό γονίδιο – ελέγχου, το οποίο πέπτεται από το ένζυμο που επιλέξαμε.

Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε την *ακτίνη (ACTB)*, γονίδιο το οποίο εκφράζεται σε όλους τους ιστούς του οργανισμού και για αυτόν τον λόγο, παραμένει αμεθυλίωτο. Το τμήμα της *ακτίνης* που χρησιμοποιήσαμε πέπτεται από το περιοριστικό ένζυμο σε 10 θέσεις, δηλαδή κατακερματίζεται και άρα σε ακόλουθη PCR δεν πολλαπλασιάζεται και δεν μας δίνει ζώνη στην ηλεκτροφόρηση και καμπύλη στην τεχνική *fragment analysis*. Αυτό σημαίνει πως όλες οι επόμενες τεχνικές ανίχνευσαν και ερεύνησαν το μεθυλιωμένο *Rassf6*, δηλαδή το μετάγραφο του καρκινικού κυττάρου, διότι η *ακτίνη*, που αποτέλεσε το γονίδιο ελέγχου της πέψης καθώς και το αμεθυλίωτο *Rassf6*, που βρίσκεται στον πυρήνα των υγιών κυττάρων, κατακερματίστηκαν από το περιοριστικό ένζυμο *AciI* και επομένως δεν πολλαπλασιάστηκαν κατά την PCR. Θα πρέπει να σημειωθεί πως οι τεχνικές υψηλής ευαισθησίας *fragment analysis* και *quantitative real time PCR* επιλέχθηκαν σε αυτήν την μελέτη καθώς το λευχαιμικό φορτίο είναι εξαιρετικά χαμηλό, εν αντιθέσει με την βιβλιογραφία στην οποία αναφέρεται εισαγωγή του επιθυμητού τμήματος σε φορείς κλωνοποίησης (clone vectors) και πολλαπλασιασμός αυτού (Hesson et al., 2009) και επομένως δεν απαιτούνται ιδιαίτερα ευαίσθητες τεχνικές όπως αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.



Εικόνα 20: Ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αгарόζης όπου φαίνονται οι δυο ζώνες, στα 360bp που αντιπροσωπεύει το υπό μελέτην γονίδιο *Rassf6* και στα 150bp που αντιπροσωπεύει την ακτίνη που κρατά τον ρόλο του γονιδίου που ελέγχει την ενεργότητα του περιοριστικού ενζύμου *AciI*.

Ποσοτικοποίηση του Λευχαιμικού πυρηνικού και cell-free DNA

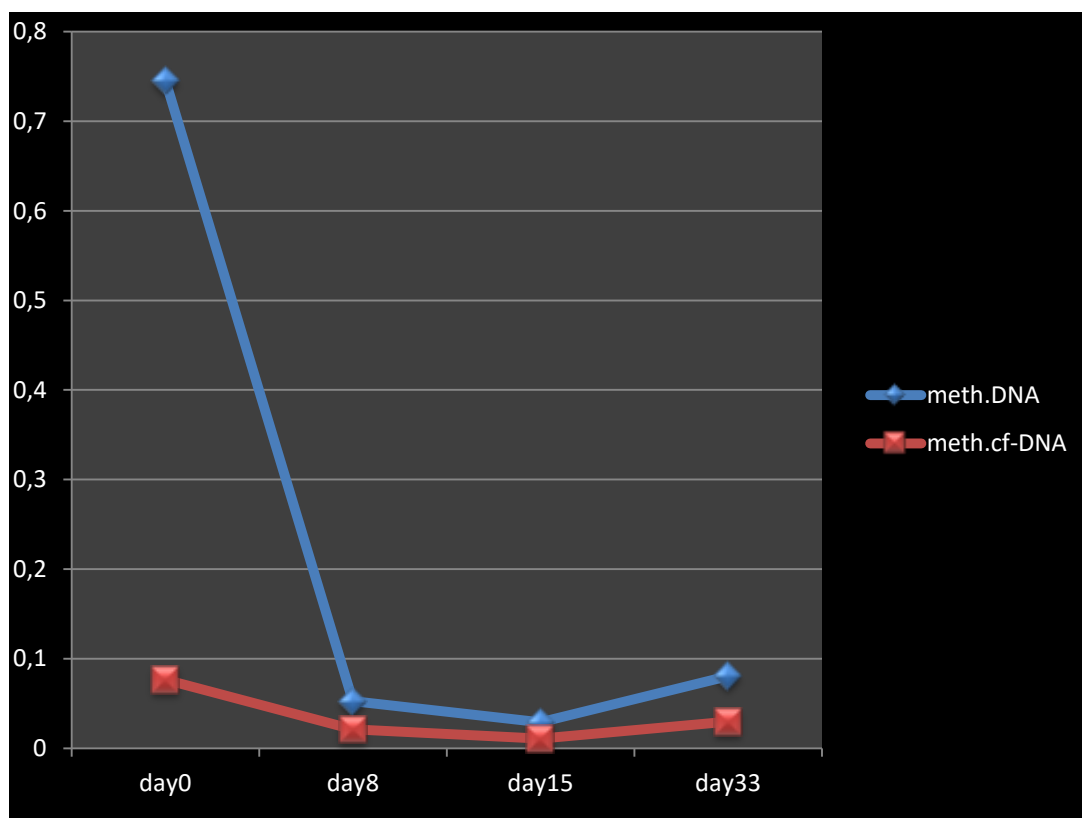
Η δική μας μελέτη στηρίχθηκε στην ανίχνευση και μελέτη του μεθυλιωμένου DNA για να μπορέσει να δώσει αξιόπιστα αποτελέσματα, τα οποία ενδεχομένως να βοηθούσαν τον θεράποντα αιματολόγο-ογκολόγο στο έργο του. Το μεθυλιωμένο, πυρηνικό και cell-free DNA, που αποτελεί το λευχαιμικό φορτίο, είναι ένδειξη για την πρόοδο της νόσου όπως επίσης και για την απόκριση των ασθενών στην θεραπεία και παρουσιάζουν παράλληλη πορεία δηλαδή οι τιμές και η συμπεριφορά του πυρηνικού μεθυλιωμένου DNA που προέρχεται από τα καρκινικά κύτταρα της λευχαιμίας ταυτίζεται με την πορεία του μεθυλιωμένου cell-free DNA. Επιπλέον το cell-free DNA παρουσιάζει το ίδιο πρότυπο μεθυλίωσης με του πυρηνικού DNA, πράγμα που σημαίνει πως το μεθυλιωμένο cell-free DNA προέρχεται από την καταστροφή των λευχαιμικών κυττάρων, και όχι από κάποια άλλη πηγή, και για αυτόν τον λόγο αμφότερα τα πρότυπα μεθυλίωσης ταυτίζονται .

Το cell-free DNA προέρχεται από απόπτωση ή νέκρωση των κυττάρων, τα οποία απελευθερώνουν νουκλεϊκά οξέα στην κυκλοφορία. Καθώς όμως τα χρωμοσώματα του πυρήνα δεν είναι ακέραια αλλά ορισμένα τμήματα αυτών, το cell-free DNA εμφανίζεται σε μικρή ποσότητα και κατακερματισμένο. Λόγω της πηγής που δημιουργεί το cell-free DNA (απόπτωση ή νέκρωση) κρίθηκε σκόπιμο να μετρηθεί σε αυτήν τη μελέτη το λευχαιμικό cell-free DNA, ώστε να δώσει, αν είναι αυτό δυνατόν, μια εικόνα της καταστροφής του όγκου.

Πράγματι, ο όγκος εμφανίζεται να μειώνεται κατά τη διάρκεια της θεραπευτικής αγωγής των ασθενών και γι' αυτόν τον λόγο το cell-free DNA μειώνεται, δηλαδή ξεκινά από μέση τιμή 0,08 ng/μg την ημέρα 0 (στην πρωτοδιάγνωση, πριν την χημειοθεραπεία) και μειώνεται σε 0,02 ng/μg την ημέρα 8, συνεχίζοντας σε χαμηλά επίπεδα, 0,01 ng/μg, την ημέρα 15 και παρουσιάζοντας ελαφριά αύξηση την ημέρα 33 της τάξεως των 0,03 ng/μg. Είναι ωστόσο αξιοσημείωτο το γεγονός, πως ενώ το λευχαιμικό DNA που βρίσκεται στον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων την ημέρα 0, δηλαδή πριν ξεκινήσει η χημειοθεραπεία, υπολογίζεται πως είναι της τάξεως των 0,6 ng ανά 1 μg (1000 ng) φυσιολογικού DNA, το καρκινικό cell-free DNA την ίδια ημέρα,

μετρήθηκε σε 0,08 ng ανά 1 μg φυσιολογικού cell-free DNA, πράγμα που σημαίνει ότι ο όγκος ελάχιστα διασπάται πριν την χημειοθεραπεία.

Τις ημέρες που ακολουθούν, το πυρηνικό και το cell-free DNA του λευχαιμικού κυττάρου ακολουθούν παράλληλες πορείες όπως φαίνεται στο παρακάτω γράφημα, εύρημα που δείχνει την διάσπαση του όγκου και την ανίχνευσή του στο cell-free DNA.



Γράφημα 4ο: Σύγκριση της πορείας των μεθυλιωμένων νουκλεϊκών οξέων, δηλαδή του λευχαιμικού DNA και cell-free DNA κατά την εξέλιξη της θεραπείας, όπου αποδεικνύεται η παράλληλη συμπεριφορά των δυο δεικτών.

Η ποσοτικοποίηση του πυρηνικού μεθυλιωμένου DNA όπως και του μεθυλιωμένου cell-free DNA ακολουθεί παράλληλη με την χημειοθεραπεία πορεία, δηλαδή παρουσιάζονται πολύ υψηλές τιμές πριν την χημειοθεραπεία, μειώνονται ραγδαία με την έναρξη αυτής (ημέρα 8), συνεχίζεται η χαμηλή πορεία (ημέρα 15) και παρουσιάζεται πολύ μικρή αύξηση την ημέρα 33. Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζονται από μελέτες σε άλλους τύπους καρκίνου, όπως ωοθηκών (Kavan et. al., 2010) και οισοφάγου (Tomita et al, 2007) όπου το ολικό cell-free DNA στο αίμα των ασθενών, ενώ ήταν σημαντικά αυξημένο στην διάγνωση εν συγκρίσει με τα δείγματα – μάρτυρες, μειωνόταν ραγδαίως μετά την θεραπεία.

Ανίχνευση λευχαιμικών θραυσμάτων

Η πορεία της κλινικής εικόνας των ασθενών αποτυπώνεται από τους δείκτες που χρησιμοποιούνται ευρέως, για την αξιολόγηση της απόκρισης του οργανισμού στο θεραπευτικό σχήμα που λαμβάνει και την μετέπειτα εξέλιξη της υγείας του.

Ειδικότερα όπως φαίνεται στον πίνακα 2 η διήθηση μυελού (Bone Marrow infiltration) σε ασθενείς, των οποίων τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη μελέτη, μετρείται στην πρωτοδιάγνωση σε ποσοστό 90-95%, δηλαδή η πλειονότητα του μυελού των οστών καταλαμβάνεται από καρκινικά κύτταρα (βλάστες) και τις ημέρες 15 και 33 σχεδόν μηδενίζεται. Ακολουθώς οι βλάστες ξεκινούν από υψηλότερες τιμές και μειώνονται ταχέως κατά την θεραπεία. Την ίδια εικόνα παρουσιάζουν τα λευκά αιμοσφαίρια, των οποίων ο αριθμός ξεκινά από υψηλή τιμή και καθώς η θεραπεία εξελίσσεται η τιμή πέφτει σημαντικά. Η ελάχιστη υπολειμματική νόσος (MRD) η οποία αντιπροσωπεύει το ποσοστό των καρκινικών κυττάρων που παραμένουν στην κυκλοφορία του αίματος του ασθενούς μετρείται τις ημέρες 15 και 33 σε ποσοστό 0-4%.

		day0	day8	day15	day33
<i>BMInfiltration</i>		90%-95%	\	0-2%	0%
<i>Blasts (μl)</i>		60-82.500	0-663	\	\
<i>WBC (BLOOD)</i>		25.459	3.622	2.417	5.411
<i>MRD</i>		\	\	0-4%	<0,01%
Nuclear DNA		√	√	√	√
Cell-free DNA		√	√	√	√

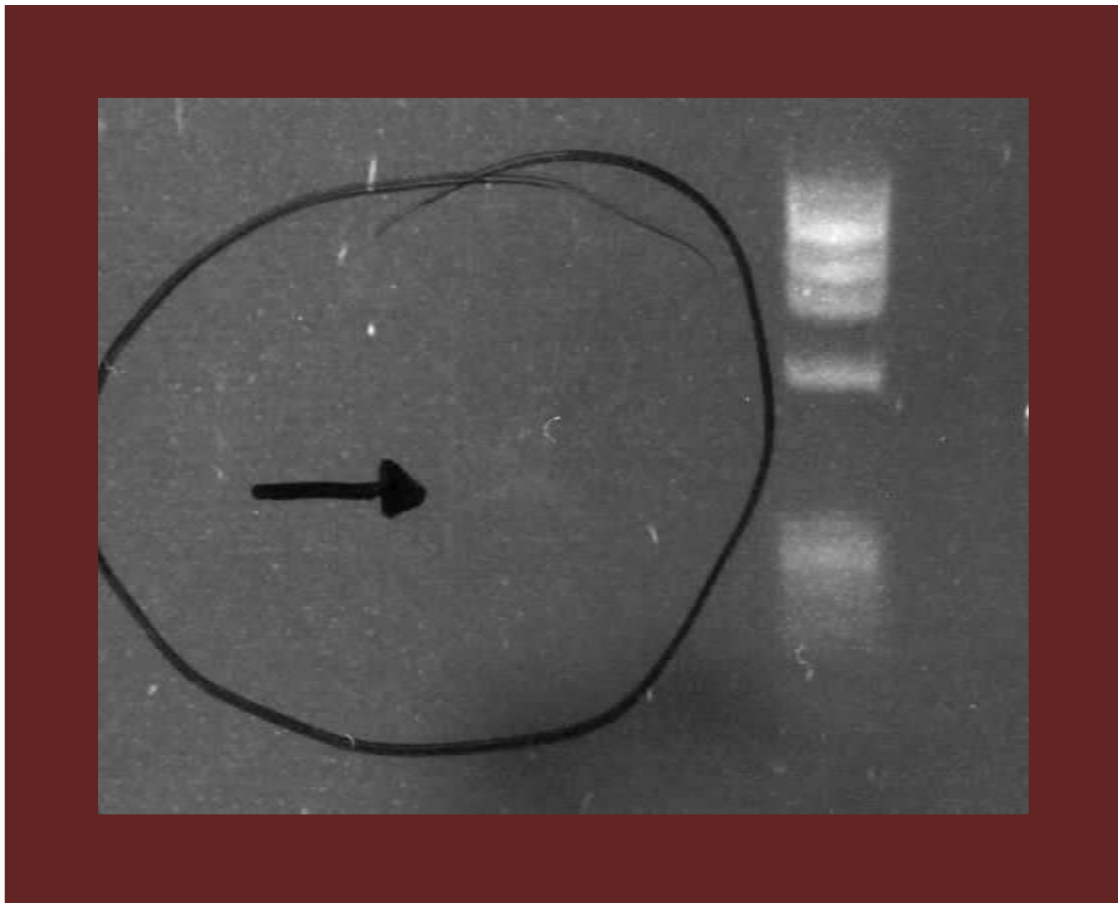
Πίνακας 2: Κλινικοί δείκτες που εκτιμούν την κατάσταση του ασθενούς και την απόκρισή του στην θεραπεία που ακολουθείται, όπως επίσης και η παρουσία πυρηνικού και cell-free DNA των λευχαιμικών κυττάρων και τις 4 ημέρες θεραπείας.

Τα δικά μας αποτελέσματα από την μοριακή ανάλυση έρχονται να συμπληρώσουν την κλινική εικόνα των ασθενών. Συγκρίνοντας τους κλινικούς δείκτες του Πίνακα 2 με τα δικά μας ευρήματα, φαίνεται σημαντική αύξηση στο καρκινικό DNA πριν οι ασθενείς λάβουν θεραπεία η οποία υποχωρεί σημαντικά κατά την διάρκεια της θεραπείας αν και ανιχνεύεται μεθυσίωση κατά το τέλος αυτής (ημέρα 33^η), κάτι που δείχνει την παρουσία καρκινικού (μεθυλιωμένου) DNA στην κυκλοφορία του αίματος, στοιχείο που υποδηλώνει την παρουσία και παραμονή, έστω και μικρού αριθμού, καρκινικών κυττάρων στο αίμα των ασθενών και την τελευταία ημέρα (33^η) της θεραπείας πρώτης γραμμής. Το γεγονός αυτό είναι ιδιαίτερης σημασίας καθώς, ενώ ο δείκτης MRD δείχνει πως το ποσοστό των βλαστών που παραμένουν στην κυκλοφορία του αίματος, να είναι 0-4%, η μοριακή μέθοδος που ακολουθήσαμε ανιχνεύει καρκινικό DNA, έστω και σε πολύ μικρή ποσότητα και τις 4 ημέρες θεραπείας στα δείγματα όλων των ασθενών, ανεξάρτητα από την περαιτέρω εξέλιξη της υγείας τους.

Το ανωτέρω εύρημα, δηλαδή η παραμονή βλαστών στο αίμα του ασθενούς και την τελευταία ημέρα θεραπείας (33^η), που ανιχνεύονται με την εξαιρετικά ευαίσθητη τεχνική *fragment analysis*, η οποία σχεδιάστηκε για να ανιχνεύει ακόμα την παρουσία ακόμα και ενός καρκινικού κυττάρου, έρχεται να προστεθεί σε μελέτες που αναφέρουν πως ο αριθμός των βλαστών στο μυελό των οστών ή στην περιφέρεια του αίματος των ασθενών μια εβδομάδα μετά την χημειοθεραπεία, συσχετίζεται με τον κίνδυνο υποτροπής (*Dördelmann et al., 1999*) και σήμερα αποτελεί σημαντικό προγνωστικό παράγοντα (*Juarez et al., 2014*).

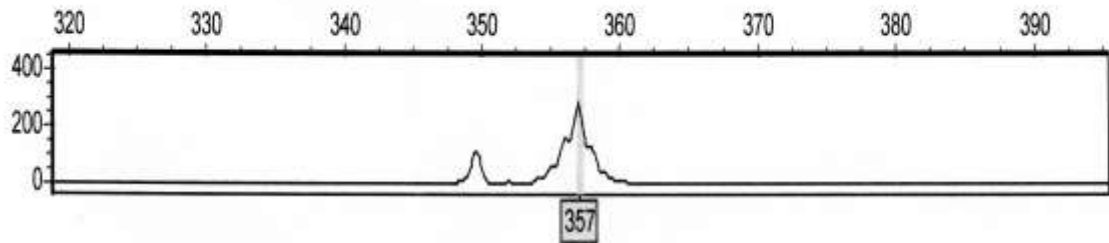
Βεβαίως πρέπει να σημειωθεί, πως το καρκινικό DNA ανιχνεύεται σε ικανή ποσότητα στην πρωτοδιάγνωση (ημέρα 0) και καθώς η θεραπεία εξελίσσεται, μειώνεται ραγδαίως και ανιχνεύεται με την τεχνική *fragment analysis* σε μικροποσότητες, κατά τις ημέρες 15 και 33, κάτι που επιβεβαιώνεται και από την τεχνική *quantitative real-time PCR* (σελ.82). Θα πρέπει να σημειωθεί εδώ, πως η διεθνής βιβλιογραφία αναφέρει, ότι ο ρυθμός «κάθαρσης» του οργανισμού από λευχαιμικά κύτταρα μετά την θεραπεία

εφόδου αποτελεί δείκτη της απόκρισης του ασθενούς στην χημειοθεραπεία (Pui et al., 2010).

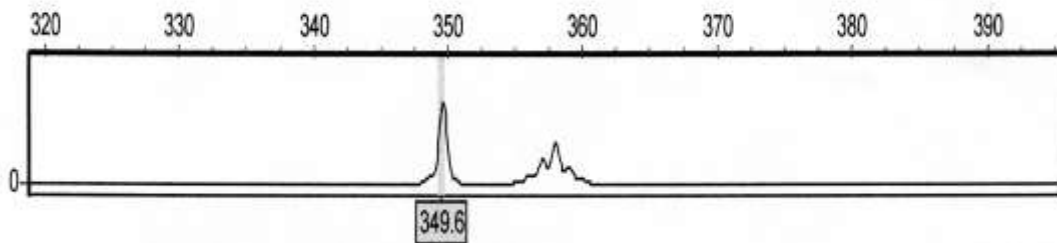


Εικόνα 21: Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR που αντιπροσωπεύει καρκινικό DNA και για αυτό το λόγο η ζώνη είναι εξαιρετικά αχνή. Ως εκ τούτου ακολουθήθηκε η τεχνική fragment analysis για την ανίχνευση της μικροποσότητας γενετικού υλικού.

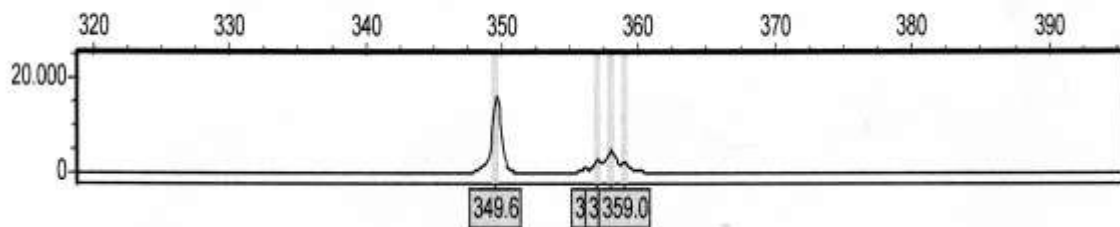
Sample 2: B08_10.fsa



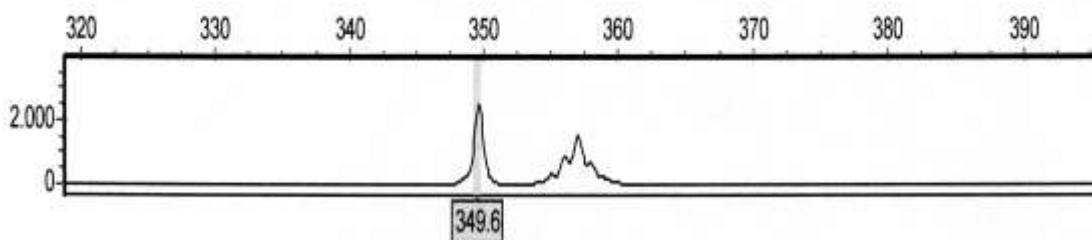
Sample 5: E08_13.fsa



Sample 6: F08_14.fsa



Sample 7: G08_15.fsa



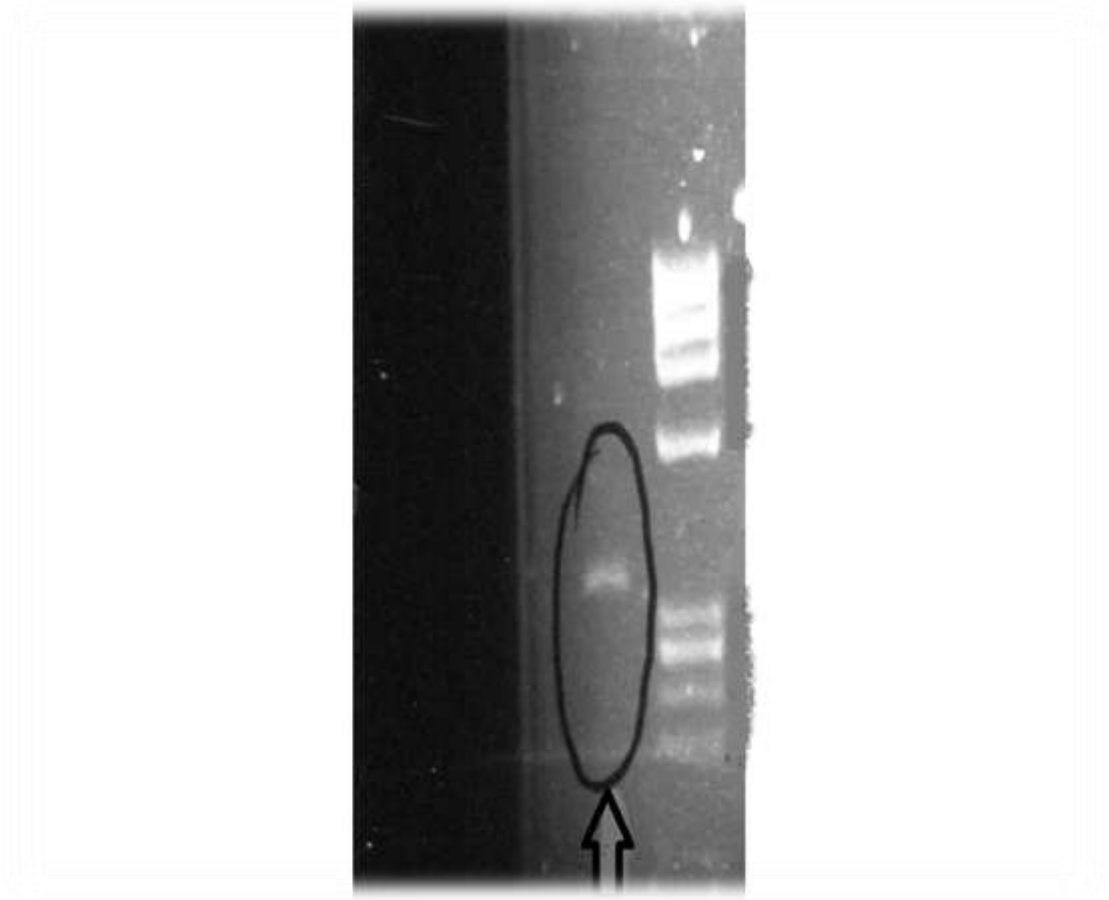
Εικόνα 22: Παρουσιάζονται οι 4 ημέρες θεραπείας και ανιχνεύεται το μεθυλιωμένο τμήμα του γονιδίου *Rassf6* που μελετάμε.

Η μεθυλίωση του υποκινητή

Το πρότυπο μεθυλίωσης που ανιχνεύτηκε με την κατά βάση αλληλούχιση (sequencing) του καρκινικού DNA , τόσο του πυρηνικού όσο και του cell-free DNA (εικόνες 25, 26) θα μπορούσε να αποτελέσει έναν ενθαρρυντικό παράγοντα εκτίμησης της κατάστασης του ασθενούς, διότι όπως φαίνεται στον Πίνακα 3 η παρουσία πολλών (14)ομάδων μεθυλίου στις νησίδες CpG του υποκινητή, δηλαδή ένας υπερμεθυλιωμένος υποκινητής, ακολουθήθηκε από κακή πορεία του ασθενούς (υποτροπή-θάνατος), ενώ ένας λιγότερο μεθυλιωμένος υποκινητής με 5 ή 7 μεθύλια, έδωσε καλή απάντηση στην θεραπεία, κάτι που δείχνει ότι ίσως το πρότυπο μεθυλίωσης αποτελεί ένδειξη με ειδική σημασία στην ΟΛΛ όσον αφορά την πορεία του ασθενούς και την εξέλιξη της νόσου κατά τον ίδιο τρόπο με τον οποίο η μεθυλίωση στα γονίδια *CALCA* (Roman-Gomez, et al, 2001) και *p21* (Roman-Gomez et al, 2002) συσχετίστηκε με δυσμενή πρόγνωση στην οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία.

Αριθμός –CH₃ στον υποκινητή του γονιδίου <i>Rassf6</i>			
Πυρηνικό DNA καρκινικού κυττάρου	14	7	5
Cell-free DNA καρκινικού κυττάρου	10	7	5
Πορεία ασθενούς	Υποτροπή-Θάνατος	Καλή	Καλή

Πίνακας 3: Συσχέτιση αριθμού μεθυλίων ($-CH_3$) και κλινική πορεία του ασθενούς.



Εικόνα 23: Αντίδραση PCR σε τμήμα *πυρηνικού DNA* τροποποιημένου ώστε να μελετηθεί ακολούθως με την τεχνική *sequencing* το πρότυπο μεθυλίωσης που φέρει.



Εικόνα 24: Αντίδραση PCR σε τμήμα *cell-free DNA* τροποποιημένου ώστε να μελετηθεί ακολούθως με την τεχνική *sequencing* το πρότυπο μεθυλίωσης που φέρει και αν αυτό ταυτίζεται με το αντίστοιχο πρότυπο του πυρηνικού DNA (για να διαπιστωθεί αν προέρχεται από τον υπό μελέτην όγκο).

ACTGAGGCACAGGGAGTGGCTCAGGTTTCTTGACACTTCCCTGCTGTGGCGAAAAGGAGA
AATAATTAACAGCTCCTGGGGCTCCAGGATCGCTGATCGCGTCGGGGGCACTGCAAGCGC
CCAGCTGAGCCATGCTCTGGGAGGAGACAGGCGCCGCCCTGCGCCCGCGCGGGCCTCGG
ACCTCCCCTACAGGTGAGTGACTCGCGGAGTCCCAGCCCGGCAGAGACAGGGCACTGGTT
TCCCTCTACCAGAGTTCCCTGACCCAGCCGAGAACAACCGCGAAGCAAGTTCAGCCGAAC
AACGATGGTGAAAAGGGTCCTCCTGCTCACAGTGTGAATAACAGGTAAAAAATGGGGATG

ACTGAGGCACAGGGAGTGGCTCAGGTTTCTTGACACTTCCCTGCTGTGGCGAAAAGGAGA
AATAATTAACAGCTCCTGGGGCTCCAGGATCGCTGATCGCGTCGGGGGCACTGCAAGCGC
CCAGCTGAGCCATGCTCTGGGAGGAGACAGGCGCCGCCCTGCGCCCGCGCGGGCCTCGG
ACCTCCCCTACAGGTGAGTGACTCGCGGAGTCCCAGCCCGGCAGAGACAGGGCACTGGTT
TCCCTCTACCAGAGTTCCCTGACCCAGCCGAGAACAACCGCGAAGCAAGTTCAGCCGAAC
AACGATGGTGAAAAGGGTCCTCCTGCTCACAGTGTGAATAACAGGTAAAAAATGGGGATG

ACTGAGGCACAGGGAGTGGCTCAGGTTTCTTGACACTTCCCTGCTGTGGCGAAAAGGAGA
AATAATTAACAGCTCCTGGGGCTCCAGGATCGCTGATCGCGTCGGGGGCACTGCAAGCGC
CCAGCTGAGCCATGCTCTGGGAGGAGACAGGCGCCGCCCTGCGCCCGCGCGGGCCTCGG
ACCTCCCCTACAGGTGAGTGACTCGCGGAGTCCCAGCCCGGCAGAGACAGGGCACTGGTT
TCCCTCTACCAGAGTTCCCTGACCCAGCCGAGAACAACCGCGAAGCAAGTTCAGCCGAAC
AACGATGGTGAAAAGGGTCCTCCTGCTCACAGTGTGAATAACAGGTAAAAAATGGGGATG

Εικόνα 25: Ο υποκινητής του γονιδίου *Rassf6* σε **πυρηνικό DNA**, φέρων τις μεθυλομάδες στις νησίδες CpG.

CCAGCTGAGCCATGCTCTGGGAGGAGACAGGCGCCGCCCTGCGCCCGCGGGCCTCGG
ACCTCCCCTACAGGTGAGTGACTCGCGGAGTCCCAGCCCGGCAGAGACAGGGCACTGGTT

CCAGCTGAGCCATGCTCTGGGAGGAGACAGGCGCCGCCCTGCGCCCGCGGGCCTCGG
ACCTCCCCTACAGGTGAGTGACTCGCGGAGTCCCAGCCCGGCAGAGACAGGGCACTGGTT

CCAGCTGAGCCATGCTCTGGGAGGAGACAGGCGCCGCCCTGCGCCCGCGGGCCTCGG
ACCTCCCCTACAGGTGAGTGACTCGCGGAGTCCCAGCCCGGCAGAGACAGGGCACTGGTT

Εικόνα 26: Ο υποκινητής του γονιδίου *Rassf6* σε **cell-free DNA**, φέρων τις μεθυλομάδες στις νησίδες CpG.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια να μελετηθεί μοριακός δείκτης ο οποίος θα μπορούσε να δώσει χρήσιμα στοιχεία για την πρόοδο και ενδεχομένως την εξέλιξη της θεραπείας ασθενών με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία. Για τον σκοπό αυτό μελετήθηκε η μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου *Rassf6* καθώς προηγούμενη δημοσίευση (Hesson et al, 2009) το κατέτασσε στα γονίδια με σημαντικό ρόλο στις οξείες λεμφοβλαστικές λευχαιμίες παιδικού τύπου, καθώς η μεθυλίωση σε αυτόν τον υποδοχέα παρουσιαζόταν στην πλειονότητα των δειγμάτων.

Η δική μας εργασία επιβεβαίωσε το παραπάνω στοιχείο, δηλαδή όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν, σε όλες τις ημέρες θεραπείας, έφεραν μεθυλίωση στον υποδοχέα του συγκεκριμένου γονιδίου. Οι μοριακές μέθοδοι που εφαρμόστηκαν μας έδωσαν την δυνατότητα να ερευνήσουμε με ακρίβεια και ενδελεχώς και την ποσότητα αλλά και την ποιότητα του καρκινικού DNA, δηλαδή την έκταση της μεθυλίωσής του και αποκάλυψαν την παρουσία λευχαιμικού φορτίου στο αίμα του ασθενούς ακόμα και την τελευταία ημέρα θεραπείας του, γεγονός που αδυνατεί να ανιχνευτεί με τους υπάρχοντες δείκτες που χρησιμοποιούνται (δείκτες MRD και Bone Marrow infiltration).

Το γεγονός αυτό, μαζί με τα άλλα στοιχεία που προέκυψαν από αυτήν την μελέτη ευελπιστούμε ότι θα μπορούσαν να αποτελέσουν χρήσιμα και αξιόπιστα εργαλεία για τον θεράποντα ιατρό και έναυσμα για τον μελλοντικό ερευνητή που θα θελήσει να μελετήσει και να ανεύρει μοριακούς δείκτες για τις αιματολογικές κακοήθειες.

6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν καρκινικά κύτταρα από δείγματα ασθενών με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία παιδικού τύπου. Τα δείγματα ελήφθησαν την ημέρα 0 (πρωτοδιάγνωση) και τις ημέρες 8, 15 και 33 όταν οι ασθενείς υποβάλλονταν σε χημειοθεραπεία. Στις ημέρες αυτές μελετήθηκε το λευχαιμικό πυρηνικό DNA καθώς και το λευχαιμικό cell-free DNA και συγκεκριμένα μελετήθηκε ο υποκινητής του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *Rassf6* για τον οποίον σχεδιάστηκε ειδική μέθοδος στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής, που περιελάμβανε αρκετές τεχνικές (πέψη, fragment analysis, quantitative real-time PCR και Sanger sequencing).

Τα αποτελέσματα της μεθόδου έδειξαν την παρουσία καρκινικού DNA και τις 4 ημέρες θεραπείας, εύρημα αξιοσημείωτο καθώς τις ημέρες 15 και 33 οι δείκτες διήθηση μυελού (bone marrow infiltration) και ελάχιστη υπολειμματική νόσος (MRD) μηδενίζονται. Η ποσοτική μέτρηση του λευχαιμικού φορτίου μας δίνει πολύ υψηλές τιμές στην πρωτοδιάγνωση (ημέρα 0) οι οποίες μειώνονται ραγδαίως τις ημέρες 8, 15 και 33 όταν δηλαδή οι ασθενείς υποβάλλονται σε χημειοθεραπεία, παρά το γεγονός ότι και την ημέρα 33, καθώς και τις προηγούμενες ημέρες ανιχνεύεται λευχαιμικό φορτίο το οποίο ποσοτικοποιείται. Τέλος η κατά βάση αλληλούχιση του υποκινητή του γονιδίου *Rassf6* μας αποκάλυψε την παρουσία των χημικών ομάδων του μεθυλίου (CH_3) ο αριθμός των οποίων διέφερε μεταξύ των ασθενών με θετική έκβαση και των ασθενών που κατέληξαν. Οι πρώτοι ασθενείς είχαν αρκετές μεθυλομάδες, εν συγκρίσει με την δεύτερη ομάδα ασθενών, με την δυσμενή εξέλιξη, η οποία έφερε τον διπλάσιο αριθμό μεθυλίων στον υποκινητή. Εν αντιθέσει προς αυτά τα δείγματα υγιών ατόμων δεν έφεραν καμία μεθυλομάδα στον υποκινητή του συγκεκριμένου γονιδίου, κάτι που δείχνει ότι το υπό μελέτην ογκοκατασταλτικό γονίδιο μεταφράζεται συνεχώς σε πρωτεΐνη.

Εν κατακλείδι θα μπορούσαμε να πούμε ότι η σχεδιασθείσα μέθοδος μας έδωσε εικόνα των λευχαιμικών κυττάρων που κυκλοφορούν στο αίμα των ασθενών τόσο ως προς την παρουσία και την ποσότητά τους όσο και ως προς το πρότυπο μεθυλίωσης τους και καταδεικνύουν το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *Rassf6* ως πιθανό μοριακό δείκτη στην οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία παιδικού τύπου.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Epigenetische Veränderungen können zur Entstehung und Progression von Krebs beitragen. Aberrante DNA-Methylierung von CpG-reichen Abschnitten der DNA in Promotorregionen kann zur Repression von Tumorsuppressorgenen oder Aktivierung von Onkogenen führen. In vorliegender Arbeit wurden Krebszellen aus Patientenproben, die unter akuten Kinderleukaemie erleiden, untersucht. Die Patientengruppen, wurden am ersten Tag (Tag 0, vor der Chemotherapie) genommen, als auch in die Tagen 8, 15 und 33 während der Chemotherapie. In diesen Tagen wurde das DNA des Kerns als auch das cell-free DNA der Krebszellen untersucht und zwar der Promoter des Tumorsuppressorgens *Rassf6*, wofür eine neue Methode entwickelt wurde, die mehrere molecular Verfahren beinhaltet (fragment analysis, quantitative real-time PCR und Sanger sequencing).

Die Ergebnisse der neu entwickelten Methode haben die Anwesenheit von Krebszellen in der vier Tagen der Probensammlung (Tage 0, 8,15,33) gezeigt, eine Funde, die bemerkenswert ist, als die Indikator die weit verbreitet sind, nämlich Bone Marrow Infiltration und MRD, zeigten null Werte in diesen Tagen. Die quantitative Bestimmung der Krebszellen wird durch die quantitative real-time PCR erreicht, als sie die Messung des leukamischen DNAs ermöglicht und beweist sehr hohe Werte am ersten Tag (Tag0), die wegen der Chemotherapie zufallen (Tage 8, 15, 33), obwohl auch am letzten Tag (Tag 33) noch Krebszellen festgestellt werden können.

Die Methylierungsuntersuchung des Promoterbereiches verrät ein Methylierungsmuster, das sich unter zwei verschiedenen Patientengruppen ändert. Die Patientengruppe mit einem guten Ausgang der Krankheit, scheinen weniger Methylgruppe im CpG-reichen Bereich der Promoter zu haben, als die Gruppe der Patienten mit ungünstigem Ergebnis, wo der Promoter des *Rassf6*gens stellt sich hypermethyliert vor. Die vorgenannte Ergebnisse stehen der Kontrolle gegenüber, die keine Methylgruppe auf

Promoter enthalten, etwas was bewiest, dass das bestimmte Tumorsuppressorgen *Rassf6* standig transkriptionell aktiviert ist.

Zusammenfassend, können wir sagen, dass diese neu entwickelte Methode, die viele molekular Verfahren enthält, in der Lage ist, die Anwesenheit von Krebszellen im Blut der Patienten als auch die quantitative Bestimmung des leukamischen DNAs und das Methylierungsmuster des Promoter zu erreichen und so das *Rassf6*gen als molekular Indikator der akuten Kinderleukamie Bedeutung zu erlangen.

8. ABSTRACT

This report describes a newly-designed molecular method based on the high sensitive techniques Fragment analysis and Quantitative real-time PCR that is able to scan leukemic DNA at very low levels in the blood of patients with pediatric acute lymphoblastic leukemia.

Our study presents tracks of leukemic burden at diagnosis and on days 8, 15, 33 when the commonly used markers Bone marrow infiltration and Minimal Residual Disease (MRD) reduce the value (day 8) and eliminate it (days 15 and 33) giving the impression that blasts disappear from patient's organism. Cell-free leukemic DNA can also be scanned on these days and appears to follow the same procession and behavior as nuclear leukemic DNA although at significantly lower levels.

The detection of blasts on days 15 and 33, when the number of white blood cells reduces significantly, is crucial for the progression and response to chemotherapy. The analysis of the methylation status of the promoter of *Rassf6* gene reveals a methyl-CpG-domain that carries methylgroups the number of which differs between two major groups of patients. Those with favorable and those with unfavorable outcome. Therefore the detection of nuclear and cell-free leukemic DNA in blood circulation of patients with acute lymphoblastic leukemia using the hypermethylated promoter of *Rassf6* gene adds prognostic value to minimal residual disease status and gives hope of potential marker in ALL to become as it follows the reduce of leukemic burden and the presence or absence of blasts in blood circulation during chemotherapy and for long time afterwards.

9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ιστοσελίδες στο διαδίκτυο:

1)<https://worldwide.promega.com/products/epigenetics/methylation-analysis/methyledge-bisulfite-conversion-system/?catNum=N1301>

2)<http://core-genomics.blogspot.gr/2016/10/controlling-for-bisulfite-conversion.html>

3)https://www.researchgate.net/figure/Bisulfite-treatment-and-PCR-Unmethylated-cytosine-was-converted-to-uracil-during_fig6_260002949

4)<https://www.gatc-biotech.com/en/expertise/epigenetics/bisulfite-profiling.html>

Άρθρα:

- 1) Pui, C-H. and Evans, W.E. (1998) "Acute lymphoblastic leukemia", *N. Engl. J. Med.* 339, 605–615.
- 2) Pui, C-H., Behm, F.G. and Crist, W.M. (1993) "Clinical and biologic relevance of immunologic marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia", *Blood* 82, 343–362.
- 3) Ponder, B.A.J. (2001) "Cancer genetics", *Nature* 411, 336–341.
- 4) Pui, C-H., Crist, W.M. and Look, A.T. (1990) "Biology and clinical significance of cytogenetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia", *Blood* 76, 1449–1463.
- 5) Faderl, S., Kantarjian, H.M., Talpaz, M. and Estrov, Z. (1998) "Clinical significance of cytogenetic abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia", *Blood* 91, 3995–4019.
- 6) Wada, M., Bartram, C.R., Nakamura, H., Hachiya, M., Chen, D.L., Borenstein, J., Miller, C.W., Ludwig, L., Hansen-Hagge, T.E. and Ludwib, W.D. (1993) "Analysis of p53 mutations in a large series of lymphoid hematologic malignancies of childhood", *Blood* 82, 3163–3169.
- 7) Jones, P.A. and Laird, P.W. (1999) "Cancer epigenetics comes of age", *Nat. Genet.* 21, 163–167.

- 8) Wolffe, A.P. and Matzke, M.A. (1999) "Epigenetics: regulation through repression", *Science* 286, 481–486.
- 9) Tycko, B. (2000) "Epigenetic gene silencing in cancer", *J. Clin. Investig.* 105, 401–407.
- 10) Jones, P.A. and Baylin, S.B. (2002) "The fundamental role of epigenetic events in cancer", *Nat. Rev. Genet.* 3, 415–428.
- 11) Baylin, S.B. and Herman, J.G. (2000) "DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics", *Trends Genet.* 16, 168–174.
- 12) Mompalao, R.L. and Bovenzi, V. (2000) "DNA methylation and cancer", *J. Cell. Physiol.* 183, 145–154.
- 13) Costello, J.F. and Plass, C. (2001) "Methylation matters", *J. Med. Genet.* 38, 285–303.
- 14) Bird, A. (2002) "DNA methylation patterns and epigenetic memory", *Genes Dev.* 16, 6–21.
- 15) Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A. and Li, E. (1999) "DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development", *Cell* 99, 247–257.
- 16) Yoder, J.A., Walsh, C.P. and Bestor, T.H. (1997) "Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites", *Trends Genet.* 13, 335–340.
- 17) Bird, A.P. (1986) "CpG-rich islands and the function of DNA methylation", *Nature* 321, 209–213.
- 18) Tycko, B. (1997) "DNA methylation in genomic imprinting", *Mutat. Res.* 386, 131–140.
- 19) Goto, T. and Monk, M. (1998) "Regulation of X-chromosome inactivation in development in mice and humans", *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 362–378.
- 20) De Smet, C., Lurquin, C., Lethe, B., Martelange, V. and Boon, T. (1999) "DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter", *Mol. Cell. Biol.* 19, 7327–7335.
- 21) Torres, L., Lopez-Rodas, G., Latasa, M.V., Carretero, M.V., Rodriguez, J.L., Franco, L., Mato, J.M. and Avila, M.A. (2000) "DNA methylation

- and histone acetylation of rat methionine adenosyltransferase 1A and 2A genes is tissue-specific”, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 32, 397–404.
- 22)Hendrich, B. and Bird, A. (2000) “Mammalian methyltransferases and methyl-CpG binding domains: proteins involved in DNA methylation”, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 249, 55–74.
- 23)Jones, P.L., Veenstra, G.J., Wade, P.A., Vermaak, D., Kass, K.U., Landsberger, N., Stroboulis, J. and Wolffe, A.P. (1998) “Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription”, *Nat. Genet.* 19, 187–191.
- 24)Nan, X., Ng, H.H., Johnson, C.A., Laherty, C.D., Turner, B.M., Eisenman, R.N. and Bird, A. (1998) “Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex”, *Nature* 393, 386–389.
- 25)Rountree, M.R., Bachman, K.E., Herman, J.G. and Baylin, S.B. (2001) “DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer”, *Oncogene* 20, 3156–3165.
- 26)Hsieh, C.L. (1994) “Dependence of transcriptional repression on CpG methylation density”, *Mol. Cell Biol.* 14, 5487–5494.
- 27)Vertino, P.M., Yen, R.W., Grao, J. and Baylin, S.B. (1996) “De novo methylation of CpG island sequences in human fibroblasts overexpressing DNA (cytosine-5)-methyltransferase”, *Mol. Cell Biol.* 16, 4555–4565.
- 28)Graff, J.R., Herman, J.G., Myohanen, S., Baylin, S.B. and Vertino, P.M. (1997) “Mapping patterns of CpG island methylation in normal and neoplastic cells implicates both upstream and downstream regions in de novo methylation”, *J. Biol. Chem.* 272, 22322–22329
- 29)Myohanen, S.K., Baylin, S.B. and Herman, J.G. (1998) “Hypermethylation can selectively silence individual p16ink4a alleles in neoplasia”, *Cancer Res.* 58, 591–593.
- 30)Esteller, M., Corn, P.G., Baylin, S.B. and Herman, J.G. (2001) “A gene hypermethylation profile of human cancer”, *Cancer Res.* 61, 3225–3229
- 31)Merlo, A., Herman, J.G., Mao, L., Lee, D.J., Gabrielson, E., Burger, P.C., Baylin, S.B. and Sidransky, D. (1995) “50 CpG island

- hypermethylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers*", *Nat. Med.* 1, 686–692.
- 32) Esteller, M., Hamilton, S.R., Burger, P.C., Baylin, S.B. and Herman, J.G. (1999) "Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia", *Cancer Res.* 59, 793–797.
- 33) Esteller, M., Tortola, S., Toyota, M., Capella, G., Peinado, M.A., Baylin, S.B. and Herman, J.G. (2000) "Hypermethylation associated inactivation of p14ARF is independent of p16INK4a methylation and p53 mutational status", *Cancer Res.* 60, 129–133.
- 34) Rush, L.J. and Plass, C. (2002) "Alterations of DNA methylation in hematologic malignancies", *Cancer Lett.* 185, 1–12.
- 35) Shteper, P.J. and Ben-Yehuda, D. (2002) "Methylation of gene promoters in leukemogenesis", *Isr. Med. Assoc. J.* 4, 1066–1071.
- 36) Roman-Gomez, J., Castillejo, J.A., Jimenez, A., Gonzalez, M.G., Reina, M.L., Rodriguez, M.C., Bornstein, R., Maldonado, J. and Torres, A. (2001) "Hypermethylation of the calcitonin gene in acute lymphoblastic leukemia is associated with unfavourable clinical outcome", *Br. J. Haematol.* 113, 329–338.
- 37) Roman-Gomez, J., Castillejo, J.A., Jimenez, A., Gonzalez, M.G., Moreno, F., Rodriguez, M.C., Barrios, M., Maldonado, J. and Torres, A. (2002) "50 CpG island hypermethylation is associated with transcriptional silencing of the p21CIP1/WAF1/SDI1 gene and confers poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia", *Blood* 99, 2291–2296.
- 38) Siraj, A.J., Gutierrez, M.I., Bhargava, M., Advani, S., Ozbek, V., Chaudhary, A.M., Solh, E.H. and Bhatia, K. (2002) "Analyses of concurrent hypermethylation of multiple genes identify E-cadherin as the most common epigenetic lesion in childhood ALL", *Blood* 100, 761a.
- 39) Garcia-Manero, G., Shen, L., Toyota, M., Kondo, Y., Obata, T., Daniel, S., Pierce, S., Imai, K., Kantarjian, H. and Issa, J-P. (2002) "Aberrant DNA methylation of a cell cycle regulatory pathway composed of p73,

- p15 and p57kip2 identifies adult patients with Philadelphia-chromosome negative acute lymphoblastic leukemia and poor prognosis*, *Blood* 100, 755a.
- 40) Roman-Gomez, J., Castillejo, J.A., Jimenez, A., Cervantes, F., Boque, C., Hermosin, L., Leon, A., Gran *~*ena, A., Colomer, D., Heiniger, A. and Torres, A. (2003) "Cadherin-13, a mediator of calcium-dependent cell-cell adhesion, is silenced by methylation in chronic myeloid leukemia a correlates with pretreatment risk profile and cytogenetic response to interferon-alpha", *J. Clin. Oncol.*, In press.
- 41) Garcia-Manero, G., Daniel, I., Smith, T.L., Kornblau, S.M., Kantarjian, H.M. and Issa, J-P. (2002) "DNA methylation of multiple promoter-associated CpG islands in adult acute lymphocytic leukemia", *Clin. Cancer Res.* 8, 2217–2224.
- 42) W. Kolch, *Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions*, *Biochem. J.* 351 (2000) 289–305.
- 43) C.P. Ponting, D.R. Benjamin, *A novel family of Ras-binding domains*, *Trends Biochem. Sci.* 21 (1996) 422–425
- 44) T. Yamamoto, S. Taya, K. Kaibuchi, *Ras-induced transformation and signaling pathway*, *J. Biochem. (Tokyo)* 126 (1999) 799–803.
- 45) L. van der Weyden, D.J. Adams / *Biochimica et Biophysica Acta* 1776 (2007) 58–85
- 46) Downward J: *Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy*. *Nat Rev Cancer* 2003, 3:11-22.
- 47) Weyden L van der, Adams DJ: *The Ras-association domain family (RASSF) members and their role in human tumourigenesis*. *Biochim Biophys Acta* 2007, 1776:58-8
- 48) Hesson LB, Cooper WN, Latif F: *The role of RASSF1A methylation in cancer*. *Dis Markers* 2007, 23:73-8
- 49) Khokhlatchev A, Rabizadeh S, Xavier R, Nedwidek M, Chen T, Zhang XF, Seed B, Avruch J: *Identification of a novel Ras-regulated proapoptotic pathway*. *Curr Biol* 2002, 12:253-265

- 50) Praskova M, Khoklatchev A, Ortiz-Vega S, Avruch J: Regulation of the MST1 kinase by autophosphorylation, by the growth inhibitory proteins, RASSF1 and NORE1, and by Ras. *Biochem J* 2004, 381:453-462.
- 51) Vos MD, Dallol A, Eckfeld K, Allen NP, Donninger H, Hesson LB, Calvisi D, Latif F, Clark GJ: The RASSF1A tumor suppressor activates Bax via MOAP-1. *J Biol Chem* 2006, 281:4557-4563.
- 52) Baksh S, Tommasi S, Fenton S, Yu VC, Martins LM, Pfeifer GP, Latif F, Downward J, Neel BG: The tumor suppressor RASSF1A and MAP-1 link death receptor signaling to Bax conformational change and cell death. *Mol Cell* 2005, 18:637-650
- 53) Matallanas D, Romano D, Yee K, Meissl K, Kucerova L, Piazzolla D, Baccarini M, Vass JK, Kolch W, O'Neill E: RASSF1A elicits apoptosis through an MST2 pathway directing proapoptotic transcription by the p73 tumor suppressor protein. *Mol Cell* 2007, 27:962-975
- 54) O'Neill E, Rushworth L, Baccarini M, Kolch W: Role of the kinase MST2 in suppression of apoptosis by the proto-oncogene product Raf-1. *Science* 2004, 306:2267-2270
- 55) Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JE. *World health organization classification of tumors. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press; 2001.*
- 56) Graux C, Cools J, Michaux L, Vandenberghe P, Hagemeijer A. *Cytogenetics and molecular genetics of T-cell acute lymphoblastic leukemia: from thymocyte to lymphoblast. Leukemia* 2006;9:1496–510.
- 57) Pui CH, Crist WM, Look AT. *Biology and clinical significance of cytogenetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood* 1990;76: 449–63.
- 58) Wagner W, Saffrich R, Wirkner U, et al. *Hematopoietic progenitor cells and cellular microenvironment: behavioral and molecular changes upon interaction. Stem Cells* 2005;23:1180–91.
- 59) Roman-Gomez J, Castillejo JA, Jimenez A, Barrios M, Heiniger A, Torres A. *The role of DNA hypermethylation in the pathogenesis and prognosis of acute lymphoblastic leukemia. Leuk Lymphoma* 2003;44:1855–64.

- 60) Shteper PJ, Siegfried Z, Asimakopoulos FA, et al. ABL1 methylation in Ph-positive ALL is exclusively associated with the P210 form of BCR-ABL. *Leukemia* 2001;15:575–82
- 61) Zheng S, Ma X, Zhang L, et al. Hypermethylation of the 5' CpG island of the FHIT gene is associated with hyperdiploid and translocation-negative subtypes of pediatric leukemia. *Cancer Res* 2004;64:2000–6.
- 62) Matsushita C, Yang Y, Takeuchi S, et al. Aberrant methylation in promoter-associated CpG islands of multiple genes in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Oncol Rep* 2004;12:97–9.
- 63) Garcia-Manero G, Daniel J, Smith TL, et al. DNA methylation of multiple promoter-associated CpG islands in adult acute lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 2002;8:2217–24.
- 64) Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2004;350(15): 1535-1548.
- 65) Graux C, Cools J, Michaux L, Vandenberghe P, Hagemeijer A. Cytogenetics and molecular genetics of T-cell acute lymphoblastic leukemia: from thymocyte to lymphoblast. *Leukemia*. 2006; 20(9):1496-1510.
- 66) Karrman K, Forestier E, Heyman M, et al. 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*. 2009; 48(9):795-805.
- 67) Gutierrez MI, Siraj AK, Bhargava M, et al. Concurrent methylation of multiple genes in childhood ALL: correlation with phenotype and molecular subgroup. *Leukemia*. 2003;17(9):1845-1850.
- 68) Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Castillejo JA, et al. Promoter hypermethylation of cancer-related genes: a strong independent prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2004;104(8):2492-2498.
- 69) Kuang SQ, Tong WG, Yang H, et al. Genomewide identification of aberrantly methylated promoter associated CpG islands in acute lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2008;22(8):1529-1538

- 70) Taylor KH, Pena-Hernandez KE, Davis JW, et al. Large-scale CpG methylation analysis identifies novel candidate genes and reveals methylation hotspots in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.* 2007;67(6):2617-2625.
- 71) Figueroa ME, Reimers M, Thompson RF, et al. An integrative genomic and epigenomic approach for the study of transcriptional regulation. *PLoS ONE.* 2008;3(3):e1882.
- 72) Taylor KH, Kramer RS, Davis JW, et al. Ultradeep bisulfite sequencing analysis of DNA methylation patterns in multiple gene promoters by 454 sequencing. *Cancer Res.* 2007;67(18):8511-8518.
- 73) Hunger P. Stephen, Elizabeth A. Raetz, Mignon L. Loh, Charles G. Mullighan, *Improving Outcomes for High-Risk ALL: Translating New Discoveries Into Clinical Care. Pediatr Blood Cancer* 2011;56:984–993
- 74) Mina Rahmania, Mehdi Talebi, Majid Farshdousti Hagh, Abbas A. Hosseinpour Feiz, Saeed Solalia, *Aberrant DNA methylation of key genes and Acute Lymphoblastic Leukemia Biomedicine & Pharmacotherapy* 97 (2018) 1493–1500
- 75) Aparna A. Kamat, Mathew Baldwin, Diana Urbauer, Diana Dang, Liz Y. Han, Andrew Godwin, Beth Y. Karlan, Joe L. Simpson, David M. Gershenson, Robert L. Coleman, Farideh Z. Bischoff, Anil K. Sood, *Plasma Cell-Free DNA in Ovarian Cancer Cancer* April 15, 2010
- 76) Bernt KM and Hunger SP (2014). Current concepts in pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Front Oncol.* 4:54
- 77) Mullighan CG et al. (2008). BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature.* 453:110-114.
- 78) Dördelmann M, Reiter A, Borkhardt A, Ludwig WD, Götz N, Viehmann S, et al. Prednisone response is the strongest predictor of treatment outcome in infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1999 Aug 15;94(4):1209–17.
- 79) Pui C-H. Recent research advances in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J. Formos. Med. Assoc.* 2010 Nov;109(11):777–87.
- 80) Hesson LB, Dunwell TL, Cooper WN, et al: The novel RASSF6 and RASSF10 candidate tumour suppressor genes are frequently

epigenetically inactivated in childhood leukaemias. Mol Cancer 2009, 8:42.

81) Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmeyer FD, Hesch RD et al (2001) DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 61:1659–1665