



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

***ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΑΙ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΟΞΕΙΑΣ
ΜΥΕΛΟΓΕΝΟΥΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑΣ***

Αικατερίνη Α. Κακοσαίου

ΑΘΗΝΑ

ΑΠΡΙΛΙΟΣ 2019



NATIONAL AND KAPODISTRIAN UNIVERSITY OF ATHENS

SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

DEPARTMENT OF MEDICINE

PROGRAM OF POSTGRADUATE STUDIES

PHD THESIS

***CYTOGENETICAL, MOLECULAR AND EPIGENETICAL INVESTIGATION OF
ACUTE MYELOGENOUS LEUKEMIA***

Aikaterini A. Kakosaiou

ATHENS

APRIL 2019

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΑΙ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΟΞΕΙΑΣ
ΜΥΕΛΟΓΕΝΟΥΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑΣ**

Αικατερίνη Α. Κακοσαίου

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: Βασιλική Παππά (Αναπ. Καθηγήτρια ΕΚΠΑ)

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

**Βασιλική Παππά, Αναπ. Καθηγήτρια ΕΚΠΑ
Γεώργιος Δημητριάδης, Καθηγητής ΕΚΠΑ
Καλλιόπη Μανωλά, Ερευνήτρια 'Α, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος**

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**Βασιλική Παππά, Αναπ. Καθηγήτρια ΕΚΠΑ
Γεώργιος Δημητριάδης, Καθηγητής ΕΚΠΑ
Καλλιόπη Μανωλά, Ερευνήτρια 'Α, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος
Νόρα-Αθηνά Βύνιου, Αναπ. Καθηγήτρια ΕΚΠΑ
Φωτεινή Κοντοπίδου, Αναπ. Καθηγήτρια ΕΚΠΑ
Μαρία Αγγελοπούλου, Αναπ. Καθηγήτρια ΕΚΠΑ
Παναγιώτης Τσιριγώτης, Αναπ. Καθηγητής ΕΚΠΑ**

Ημερομηνία Εξέτασης: 01/04/2019

PhD THESIS

**CYTOGENETICAL, MOLECULAR AND EPIGENETICAL INVESTIGATION OF ACUTE
MYELOGENOUS LEUKEMIA**

Aikaterini A. Kakosaïou

SUPERVISOR: Vasiliki Pappa, Associate Professor UoA

THREE-MEMBER ADVISORY COMMITTEE:

Vasiliki Pappa, Associate Professor UoA
George Demetriades, Professor UoA
Kalliopi Manola, Investigator A, NCSR Democritos

SEVEN-MEMBER COMMITTEE

Vasiliki Pappa, Associate Professor UoA
George Demetriades, Professor UoA
Kalliopi Manola, Investigator A, NCSR Democritos
Nora-Athena Biniou, Associate Professor UoA
Foteini Kontopidou, Associate Professor UoA
Maria Aggelopoulou, Associate Professor UoA
Panagiotis Tsirigotis, Associate Professor UoA

Examination Date: 01/04/2019

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τις τελευταίες δεκαετίες η έρευνα της ΟΜΛ εστιάζεται στις γενετικές και επιγενετικές αλλαγές, οι οποίες φαίνεται να εμπλέκονται στην ανάπτυξη και εξέλιξη της νόσου. Αυτές οι μοριακές αλλοιώσεις μπορεί να επηρεάσουν την ανταπόκριση στη θεραπεία και την ολική επιβίωση, αλλά και να χρησιμεύσουν ως προγνωστικοί παράγοντες ή θεραπευτικοί στόχοι για νέες στοχευόμενες θεραπείες.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι:

- Η ταυτοποίηση των μεταλλάξεων του γονιδίου *ASXL1*, η διερεύνηση της συμβολής τους στην ανάπτυξη ΟΜΛ και η συσχέτισή τους με τα κυτταρογενετικά, δημογραφικά (φύλο και ηλικία διάγνωσης) και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών.

- Η ταυτοποίηση της μεθυλίωσης του γονιδίου *RAD21* στην δημιουργία ΟΜΛ και των ειδικών χρωμοσωμικών αλλοιώσεών της. Πιο συγκεκριμένα, μελετάται η μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου *RAD21* σε ασθενείς με ΟΜΛ ως πιθανό μηχανισμό αποσιώπησης της γονιδιακής έκφρασης του *RAD21* ο οποίος μπορεί να συμβάλει στην ανάπτυξη της ΟΜΛ. Η παρουσία μεθυλιωμένου ή μη υποκινητή του *RAD21* σχετίζεται, επίσης, με τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών και με τις ειδικές χρωμοσωμικές τους αλλοιώσεις.

Στα πλαίσια εκπόνησης της παρούσας διδακτορικής διατριβής παρελήφθησαν δείγματα μυελού των οστών 360 ενήλικων ασθενών με πρωτοπαθή ή/και δευτεροπαθή ΟΜΛ προερχόμενα από τα όλα τα νοσοκομεία της χώρας και δείγματα μυελού των οστών 10 υγιών μη-συγγενικών ατόμων ελληνικής καταγωγής αντίστοιχης ηλικίας και φύλου.

Η ανίχνευση των μεταλλάξεων στο εξόνιο 12 του γονιδίου *ASXL1* πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο αλληλούχισης κατά Sanger. Η μελέτη της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου *RAD21* πραγματοποιήθηκε με το kit EpiTech methyl II restriction της Qiagen. Η ανάλυση έγινε σε ασθενείς με πρωτοπαθή και δευτεροπαθή ΟΜΛ. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν 60 δείγματα μυελού των οστών ενήλικων ασθενών με ΟΜΛ, εκ των οποίων 42 είχαν πρωτοπαθή ΟΜΛ και 18 δευτεροπαθή ΟΜΛ.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής αναδεικνύουν τη συμβολή των γονιδίων *ASXL1* και *RAD21* στην παθογένεση της ΟΜΛ και στην εμφάνιση συγκεκριμένων χρωμοσωμικών αλλοιώσεών της. Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, αναμένεται να συμβάλλουν στην κατανόηση των μηχανισμών

λευχαιμογένεσης στην ΟΜΛ καθώς και στη σχεδίαση κατάλληλων εξατομικευμένων θεραπευτικών πρωτοκόλλων ανάλογα με τις επίκτητες γενετικές και επιγενετικές αλλοιώσεις των ασθενών.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία

Λέξεις κλειδιά: οξεία λευχαιμία, επιγενετική, κυτταρογενετική, μοριακή διερεύνηση, ASXL1

ABSTRACT

Over the last few decades, AML research has focused on genetic and epigenetic changes, which appear to be involved in the development and progression of the disease. These molecular alterations can affect response to treatment and overall persistence, but also serve as predictors or therapeutic targets for new targeted therapies.

The purpose of this PhD thesis is:

- The identification of the *ASXL1* gene mutations, the investigation of their contribution to the development of AML and their correlation with cytogenetic, demographic (age and gender) and clinical properties of patients.
- The identification of *RAD21* promoter methylation in AML patients and its correlation with specific chromosomal alterations. More specifically, *RAD21* gene promoter methylation is studied in patients with AML as a possible mechanism for silencing of the *RAD21* gene expression which may contribute to the development of AML. The presence of a methylated or non-methylated promoter of *RAD21* also correlates with the demographic characteristics of patients and their specific chromosomal alterations.

In the framework of this PhD dissertation, bone marrow samples of 360 adult patients with primary and / or secondary AML from all hospitals in the country and bone marrow samples of 10 healthy non-relatives of Greek origin of respective age and sex were taken.

The detection of mutations in exon 12 of the *ASXL1* gene was performed by using the Sanger sequencing method. The study of methylation of the *RAD21* gene promoter was performed with Qiagen's EpiTech methyl II restriction kit. The analysis was performed in patients with primary and secondary AML. More precisely, 60 bone marrow samples of adult patients with AML were studied, of which 42 had primary AML and 18 secondary AML. The results of this PhD thesis highlight the contribution of the *ASXL1* and *RAD21* genes to the pathogenesis of AML and the presence of specific chromosomal alterations. The results of this PhD are expected to contribute to the understanding of leukemogenesis' mechanisms in as well as to the design of appropriate personalized therapeutic protocols depending on acquired genetic and epigenetic lesions of patients.

SUBJECT AREA: Acute Myeloid Leukemia

KEYWORDS: acute leukemia, epigenetics, cytogenetics, molecular investigation, ASXL1

Στους γονείς μου, Αντώνη και Καίτη

Στον σύντροφό μου, Τάκη

ΟΡΚΟΣ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ



ὈΜΝΥΜΙ ΔΙΟΛΛΩΝΑ ΗΙΤΡΟΝ
ΚΑΙ ΥΓΙΕΙΑΝ ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ
ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΔΑΙΣΤΟΡΑΣ
ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΙΝ ΚΑΤΑ
ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ
ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΖΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ ΗΤΗΣ
ΑΣΘΑΙΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΧΗΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ
ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ
ΚΑΙ ΒΙΟΝ ΚΟΙΝΩΣΑΣ ΘΑΙ ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ
ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣ ΘΑΙ
ΚΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΖ ΟΥΤΕΟΝ ΑΔΕΛΦΟΙΣ

ΙΣΩΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΕΙΝ ΑΡΡΣΙ ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ
ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΖΥΓΓΡΑΦΗΣ
ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ ΔΡΑΣΗΣ
ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣ ΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ
ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΝ ΕΜΕ ΔΙΔΑΧΑΝΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕ
ΓΡΑΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΩΡΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ ΙΗΤΡΙΚΟ ΑΛΛΟ
ΔΕΟΝΔΕ ΜΙ ΔΙΑΙΤΗ ΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ ΟΦΕΛΕΙΑ ΚΑΝΟΝΩΝ
ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ ΕΠΙΔΗΛΑΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΔΔΙ
ΚΙΗ ΕΙΡΖΕΙΝ ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΝΩΗΓΗΣΟΜΑΙ ΣΥΜΒΟΥΛΙΗΝ
ΤΟΙΗΝΔΕ ΟΜΟΙΟΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΘΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ
ΑΓΝΟΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΟΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ
ΤΗΝ ΕΜΗΝ ΟΥΤΕ ΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘΙΟΝΤΑΣ ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ
ΕΡΓΑ ΤΗΣΙ ΑΝΔΡΑΣΙ ΠΡΗΖΙΟΣ ΤΗΣ ΔΕ ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ
ΕΣΩ ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠΩΦΕΛΕΙΑ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ
ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΗΣ ΚΑΙ ΘΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙ
ΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ ΕΛΕΥ
ΦΕΡΩΝΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ ΔΔ ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΗΗ ΚΑΙ ΙΩ Η Α
ΚΟΥΣΩ Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΗΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ ΑΜΗ
ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΑΔΑΛΕΣΘΑΙ ΕΖΩΣΙΓΗΣΟΜΑΙ ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ
ΕΙΜΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ
ΠΟΙΚΟΝΤΙ ΚΑΙ ΜΗ ΖΥΓΧΟΝΤΙ ΕΙΗ ΕΠΑΝΡΑΣΟΔΙ ΚΑΙ ΒΙΟΝ
ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ ΠΑΡΑΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΙΣ ΤΟΝ
ΔΙΕΙ ΧΡΟΜΟΝ ΠΑΡΑ ΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΚΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ ΤΑΝΑΝΤΙΑ
ΤΟΥΤΕΩΝ

ΛΙΣΤΑ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΩΝ

- 2018 ASXL1 mutations in AML are associated with specific clinical and cytogenetic characteristics. **K Kakosaïou**, F Panitsas, A Daraki, M Pagoni, P Apostolou, A Ioannidou, I Vlachadami, T Marinakis, C Giatra, D Vasilatou, C Sambani, V Pappa, KN. Manola, *Leukemia & Lymphoma*. Impact factor:2.755
- 2017 Polymorphisms and haplotypes of the CYP2B6 detoxification gene in the predisposition of Acute Myeloid Leukemia (AML) and induction of its cytogenetic abnormalities A. Daraki, **K. Kakosaïou**, S. Zachaki, C. Sambani, V. Aleporou-Marinou, P. Kollia, K. Manola, *Cancer Genetics*, 2016 Nov;209(11):525-533. Impact factor: 2.981
- 2016 A novel variant translocation t(8;16;21)(q22;q24;q22) in Acute Myeloid Leukemia expressing both myeloid and lymphoid markers. **K. Kakosaïou**, A. Daraki, A. Zomas, KN. Manola, *Hospital Chronicles*, 10(3):165-167.

Πίνακας Περιεχομένων

Πίνακας Περιεχομένων	22
Πρόλογος.....	24
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	26
A1. Λευχαιμίες.....	27
A2. Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία (ΟΜΛ).....	28
A2.1 Πρωτοπαθής και δευτεροπαθής ΟΜΛ	28
A2.2 Επιδημιολογία	29
A2.3 Διάγνωση	29
A2.4 Κλινική εικόνα	31
A2.5 Ταξινόμηση της ΟΜΛ	32
A2.5.1 Ταξινόμηση κατά FAB.....	32
A2.5.2 Ταξινόμηση κατά WHO.....	33
A2.6 Ανοσοφαινοτυπική παθογένεια της ΟΜΛ	34
A3. Κυτταρογενετική.....	36
A3.1 Κλασσική Κυτταρογενετική στην ΟΜΛ.....	36
A3.2. Μοριακή κυτταρογενετική στην ΟΜΛ.....	48
A5. Μοριακές αλλαγές στην ΟΜΛ.....	49
A5.1 Προγνωστικοί παράγοντες στην ΟΜΛ	44
A5.2 Αλλαγές μεταγωγής σήματος και μεταγραφικών παραγόντων.....	52
A5.2.1 Μεταλλάξεις του γονιδίου FLT3.....	52
A5.2.2 Μεταλλάξεις του γονιδίου NPM1	53
A5.2.3 Μεταλλάξεις του γονιδίου CEBPA	53
A5.2.4 Αλλαγές στο σηματοδοτικό μονοπάτι RAS	54
A5.2.5 Μεταλλάξεις του γονιδίου BAALC.....	54
A5.2.6 Μεταλλάξεις του γονιδίου WT1	54
A5.2.7 Μεταλλάξεις των γονιδίων IDH1-IDH2.....	55
A5.3 Επιγενετικές αλλαγές στην ΟΜΛ.....	55
A5.3.1 Ακετυλίωση ιστονών	55
A5.3.2 Μεθυλίωση DNA	56
A5.3.2.1 Μεταλλάξεις στο γονίδιο ASXL1.....	58
A6. Αιτιολογία & παθογένεση της ΟΜΛ.....	59
A7. Γενετική προδιάθεση και ανάπτυξη ΟΜΛ.....	62
A7.1 Μηχανισμοί αποτοξικοποίησης τοξικών παραγόντων	64
A7.2 Μηχανισμοί επιδιόρθωσης του DNA	64
A7.2.1 Cohesin complex-RAD21	66
A8. Σκοπός της εργασίας.....	67
B. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	69
B1. Δείγματα.....	70
B2. Μέθοδοι	71
B2.1 Κυτταρογενετική	71
B2.1.1 Κλασσική Κυτταρογενετική – Καρυότυπος.....	71
B2.1.1.1 Παραλαβή και καλλιέργεια κυτάρων	72
B2.1.1.2 Συλλογή και μονιμοποίηση κυτάρων	72
B2.1.1.3 Προετοιμασία των χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων για κυτταρογενετική ανάλυση.....	73
B2.1.1.4 Ζωνοποίηση χρωμοσωμάτων: μέθοδος GTG.....	73

B2.1.1.5 Μικροσκοπική παρατήρηση και καρυοτυπική ανάλυση χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων.....	75
B2.1.2 Μοριακή Κυτταρογενετική – FISH.....	75
B2.1.2.1 Προετοιμασία κυτταρογενετικών παρασκευασμάτων.....	75
B2.1.2.2 Υβριδισμός του μοριακού ιχνηθέτη στην περιοχή – στόχο.....	76
B2.1.2.3 Εκπλύσεις και ανίχνευση σήματος υβριδισμού.....	76
B2.1.2.4 Μικροσκοπική παρατήρηση, ανάλυση και αξιολόγηση χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων.....	77
B2.2 Γονοτυπική ανάλυση.....	77
B2.2.1 Απομόνωση γενωμικού DNA.....	78
B2.2.2 Αλληλούχιση DNA κατά Sanger στο εξόνιο 12 του γονιδίου ASXL1.....	78
B2.3 Μελέτη μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου RAD21.....	82
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	84
Γ1. Κυτταρογενετική ανάλυση ασθενών με OML.....	85
Γ1.1 Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών με OML.....	86
Γ1.2 Κλασσική κυτταρογενετική ανάλυση ασθενών με OML.....	87
Γ2. Μεταλλάξεις του γονιδίου ASXL1.....	89
Γ2.1 Συχνότητες και τύποι μεταλλάξεων στο γονίδιο.....	89
Γ2.1.2 Συσχέτιση των μεταλλάξεων του γονιδίου ASXL1 με τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών.....	90
Γ2.1.3 Συσχέτιση των μεταλλάξεων του γονιδίου ASXL1 με τα καρυοτυπικά ευρήματα των ασθενών.....	94
Γ3. Μελέτη μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου RAD21.....	98
Γ3.1 Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών με OML και συσχέτιση με τη μεθυλίωση του γονιδίου RAD21.....	98
Γ3.2. Συσχέτιση μεθυλίωσης του γονιδίου RAD21 με τα καρυοτυπικά ευρήματα των ασθενών.....	101
Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	108
Δ1. Κυτταρογενετική ανάλυση ασθενών με OML.....	108
Δ2. Μελέτη μεταλλάξεων του γονιδίου ASXL1 σε ασθενείς με OML.....	108
Δ3. Μελέτη μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου RAD21.....	112
Δ4. Γενικά συμπεράσματα – Μελλοντικές προοπτικές.....	115
Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	117

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε υπό την επίβλεψη της κυρίας Βασιλικής Παππά, Αναπληρώτρια Καθηγήτριας Αιματολογίας της Ιατρικής Σχολής Αθηνών του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Ε.Κ.Π.Α.). Η διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Υγειοφυσικής, Ραδιοβιολογίας & Κυτταρογενετικής, του Ινστιτούτου Πυρηνικών & Ραδιολογικών Επιστημών & Τεχνολογίας, Έρευνας & Ασφάλειας (Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α.) του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών (Ε.Κ.Ε.Φ.Ε.) «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ» με Επιστημονική Υπεύθυνη την Δρ. Καλλιόπη Μανωλά, Βιολόγο-Κυτταρογενετίστρια, Ερευνήτρια Α΄ βαθμίδας.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κυρία Β. Παππά για την αποδοχή της επίβλεψης της διδακτορικής μου εργασίας, τη στήριξη και την καθοδήγηση όλο αυτό το διάστημα. Επίσης να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Γ. Δημητριάδη, Καθηγητή Παθολογίας, Διευθυντή της Β΄ Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου «Αττικόν», μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη Δρ. Κ. Μανωλά, Επιστημονική Υπεύθυνη της διδακτορικής μου διατριβής και μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, για την υπόδειξη του θέματος, την ουσιαστική βοήθεια στην εκπόνηση της διατριβής, την καλή συνεργασία, τις εποικοδομητικές επιστημονικές συζητήσεις και την υπομονή της να μοιραστεί μαζί μου την μεγάλη της επιστημονική εμπειρία. Επίσης την ευχαριστώ για την συμβολή της στη διεξαγωγή των πειραμάτων καθώς και για την υποστήριξη και τις εύστοχες παρατηρήσεις της οι οποίες συνέβαλλαν στην τελική μορφή της διδακτορικής μου διατριβής και των δημοσιεύσεων που προέκυψαν σε επιστημονικά περιοδικά, καθώς και των ανακοινώσεων σε ελληνικά και διεθνή συνέδρια.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Υπεύθυνο του Εργαστηρίου Υγειοφυσικής, Ραδιοβιολογίας & Κυτταρογενετικής, κ. Γ. Παντελιά, Ερευνητή Α΄ για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω τη διδακτορική διατριβή μου στο εργαστήριό του. Παράλληλα θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην κ. Κ. Σαμπάνη, Ερευνήτρια Α΄, για τις εύστοχες παρατηρήσεις της καθόλη τη διάρκεια της ερευνητικής μου δραστηριότητας στο Εργαστήριο.

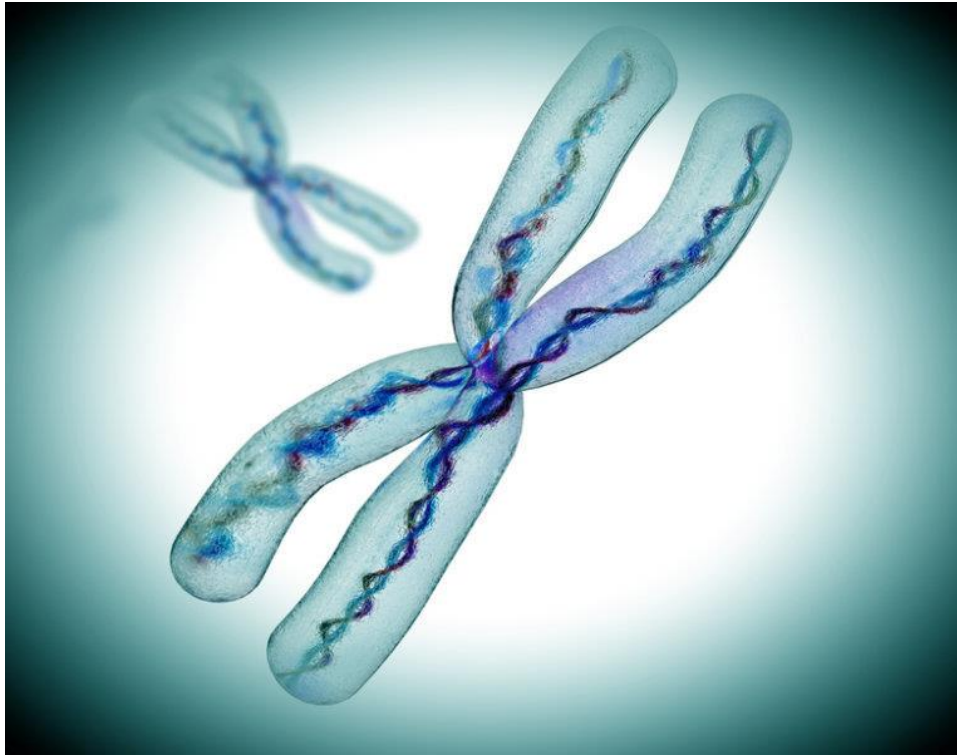
Να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως την φίλη και συνάδελφο κ. Α. Δαράκη, Ph.D. για την βοήθειά της στη διεξαγωγή του πειραματικού μέρους της εργασίας και για την αμέριστη συμπαράσταση καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής. Τη

συνάδελφο κ. Παρασκευή Αποστόλου Ph.D. για τη σημαντική της συμβολή στην διεξαγωγή του πειραματικού μέρους και τη συνάδελφο κ. Σ. Ζαχάκη Ph.D. για τη σημαντική βοήθεια στο ξεκίνημα της εργασίας αυτής. Θερμές ευχαριστίες, επίσης, σε όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Κυτταρογενετικής για τη διευκόλυνση, την άρτια επιστημονική και τεχνική κατάρτιση και την προθυμία τους να με βοηθήσουν, ξεκινώντας με την κ. Μ. Καρακώστα Ph.D, την κ. Β. Χατζή PhD, την κ. Katarzyna Barszczewska MSc, την κ. Π. Διαμαντοπούλου, την κ. Μ. Μαργαρίτη, την κ. Δ. Παντελιά, την κ. Ν. Παναγιωτοπούλου, τον κ. Π. Νακόπουλο, και την κ. Α. Ιωαννίδου υποψήφια Διδάκτωρ.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους φίλους μου για την στήριξη τους. Ιδιαίτερως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους αγαπημένους μου φίλους Κωνσταντίνο Αγιαννιτόπουλο και τη Καρολίνα-Μαρία Καρλετίδη για την απόλυτη κατανόηση, τη στήριξη και συμπαράσταση τους σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

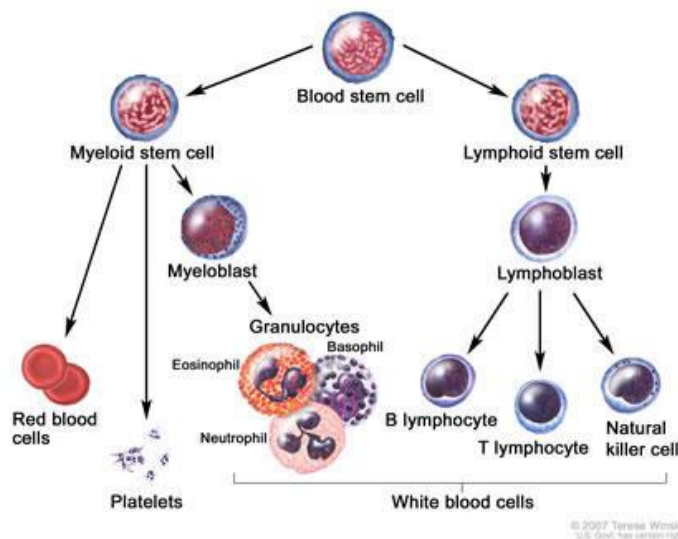
Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου, και ιδιαίτερως στους γονείς μου και στον αδερφό μου καθώς και στον σύντροφό μου για την αμέριστη συμπαράσταση, τη στήριξη, την υπομονή και την κατανόηση που δείχνουν καθώς και για όσα έχουν κάνει για μένα μέχρι σήμερα.

Α. ΕΙΣΑΓΩΓΗ



A1 Λευχαιμίες

Οι αιματολογικές κακοήθειες είναι νεοπλασματικές νόσοι που επηρεάζουν το αίμα, το μυελό των οστών και τους λεμφαδένες. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν και οι λευχαιμίες, οι οποίες ορίζονται ως κακοήθη νεόπλασμα του αίματος ή του μυελού των οστών, που χαρακτηρίζονται από εξαλλαγή των αρχέγονων πολυδύναμων ή των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων, κυρίως των λευκοκυττάρων (εικόνα 1).



Εικόνα 1. Πορεία προέλευσης των αιμοποιητικών κυττάρων

Οι λευχαιμίες ανάλογα με την κλινική τους πορεία και την παθολογική τους εικόνα διακρίνονται σε οξείες και χρόνιες (Jameson J. et al. 2005). Οι οξείες χαρακτηρίζονται από ραγδαία αύξηση άωρων λευχαιμικών κυττάρων με βαρύτερη πρόγνωση, ενώ οι χρόνιες από συσσώρευση σχετικά διαφοροποιημένων ώριμων κυττάρων με βραδεία εξέλιξη και καλύτερη πρόγνωση. Επιπλέον, με βάση τον κυτταρικό τύπο που νοσεί, οι λευχαιμίες υποδιαιρούνται σε μυελογενείς όπου νοσούν τα κύτταρα της μυελικής σειράς και σε λεμφογενείς όπου νοσούν τα κύτταρα της λεμφικής σειράς. Συνδυάζοντας τις παραπάνω ταξινομήσεις, οι λευχαιμίες διακρίνονται σε τέσσερις βασικές κατηγορίες που παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Κυτταρικός τύπος	Οξεία	Χρόνια
Λεμφική σειρά	Οξεία λεμφοκυτταρική ή λεμφοβλαστική λευχαιμία (ΟΛΛ)	Χρόνια λεμφοκυτταρική ή λεμφοβλαστική λευχαιμία (ΧΛΛ)
Μυελική σειρά	Οξεία μυελογενής λευχαιμία (ΟΜΛ)	Χρόνια μυελογενής λευχαιμία (ΧΜΛ)

Πίνακας 1.
Τύποι λευχαιμιών

ών

A2 Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία (ΟΜΛ)

Η Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία (ΟΜΛ) περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Velreau το 1827 (Naegeli O. 1900; Wang Z. et al. 2003). Αποτελεί μια νόσο με μεγάλη ετερογένεια, γνωστή ως ο καρκίνος της μυελικής σειράς των κυττάρων του αίματος που χαρακτηρίζεται από τη ραγδαία ανάπτυξη των ανώμαλων λευκοκυττάρων που συσσωρεύονται στο μυελό των οστών και παρεμβάλλονται στην παραγωγή των φυσιολογικών κυττάρων του αίματος. Οι λευχαιμικοί βλάστες παρουσιάζουν μορφολογικές διαφορές που οφείλονται στη φαινοτυπική και βιολογική ετερογένεια τους, γεγονός που ίσως ερμηνεύει και τις παραλλαγές στην κλινική εικόνα και την έκβαση της νόσου.

A2.1 Πρωτοπαθής και δευτεροπαθής ΟΜΛ

Η ΟΜΛ μπορεί να διακριθεί σε πρωτοπαθή (de novo ΟΜΛ) και σε δευτεροπαθή (secondary, s-ΟΜΛ) ΟΜΛ. Πρωτοπαθής ΟΜΛ παρατηρείται σε ασθενείς οι οποίοι δεν έχουν έρθει σε επαφή με κάποιο γενοτοξικό παράγοντα καθώς επίσης και ασθενείς που πρωτοδιαγιγνώσκονται ως ΟΜΛ χωρίς προηγούμενο ιστορικό κακοήθους νόσου. Η δευτεροπαθής ΟΜΛ (secondary,

s-OML) αναπτύσσεται α) μετά από προηγούμενη αιματολογική νόσο όπως Μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο (ΜΔΣ), Μυελοϋπερπλαστική νόσο (ΜΥΝ) ή Απλαστική αναιμία (ΑΑ) με ή χωρίς θεραπεία η β) ως προϊόν προηγούμενης έκθεσης σε αποδεδειγμένο λευχαιμογόνο χημειοθεραπευτικό παράγοντα (Boddu P et al 2017). Τα συσχετιζόμενα με θεραπεία Μυελογενή Νεοπλάσματα- (Therapy Related Myeloid Neoplasms, t-MNs) αποτελούν μια ξεχωριστή κατηγορία στην ταξινόμηση κατά ΠΟΥ και συμπεριλαμβάνει τα θεραπευοσυσχετιζόμενα Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα (t-ΜΔΣ) καθώς και την θεραπευοσυσχετιζόμενη ΟΜΛ (therapy related-ΟΜΛ, t-ΟΜΛ). Η t-ΟΜΛ είναι μια καλά αγαγνωρισμένη κλινική οντότητα που αναπτύσσεται σαν επιπλοκή μετά από κυτταροτοξική θεραπεία για μια νεοπλασματική νόσο ή μια μη-νεοπλασματική διαταραχή. Τελευταίες επιδημιολογικές μελέτες εκτιμούν ότι το 7% των νεοδιαγνωσθέντων ΟΜΛ, αποτελούν περιστατικά t-ΟΜΛ η συχνότητα των οποίων ολοένα και αυξάνεται εξαιτίας του αυξανόμενου αριθμού των επιζώντων καρκινοπαθών και των αλλαγών στην χημειοθεραπεία (Döhner et al. 2016).

A2.2 Επιδημιολογία

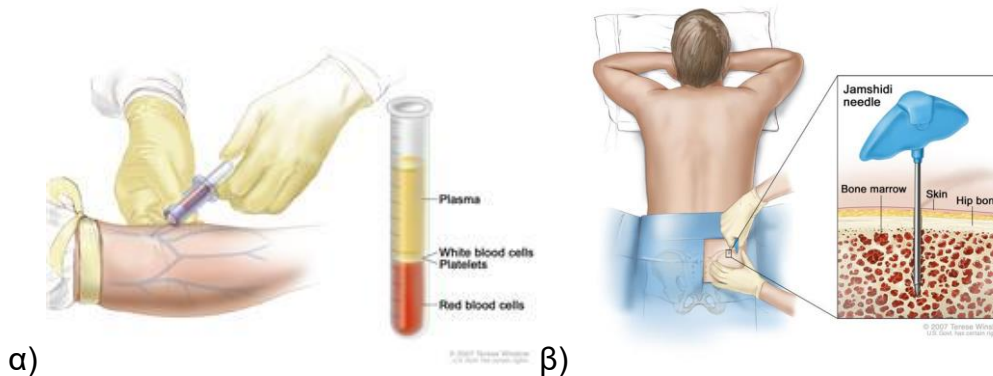
Σύμφωνα με την Αμερικάνικη Καρκινική Εταιρεία εκτιμάται ότι περίπου 31.500 άτομα στις ΗΠΑ θα διαγνωστούν με κάποια μορφή λευχαιμίας ετησίως, ενώ περίπου 21.500 ασθενείς θα καταλήξουν από την νόσο. Παρόλο που η συχνότητα λευχαιμίας αντιπροσωπεύει <3% όλων των μορφών καρκίνου παγκοσμίως, ωστόσο είναι η κύρια αιτία θανάτου λόγω καρκίνου σε παιδιά και σε ενηλίκους <39 ετών (Deschler and Lübbert 2006). Στην Ευρώπη αντίστοιχα έχει υπολογιστεί ότι εμφανίζονται κάθε χρόνο περίπου 18.300 νέα περιστατικά ΟΜΛ (Smith M. et al., 2004). Η πιθανότητα εμφάνισης Ο.Μ.Λ αυξάνεται με την ηλικία με την μέση ηλικία διάγνωσης να είναι τα 65 έτη (Forman et al. 2003). Η ΟΜΛ αποτελεί το 90% των μορφών οξείας λευχαιμίας σε όλους τους ενήλικες, είναι πολύ σπάνια σε παιδιά (Jemal et al. 2002) και ίναι πιο συχνή στους άνδρες σε σχέση με τις γυναίκες, σε αναλογία 3:2 (Estey et al. 2006).

Υπάρχει γεωγραφική διαφοροποίηση στα κρούσματα ΟΜΛ. Στους ενήλικες, τα περισσότερα κρούσματα εμφανίζονται σε Βόρεια Αμερική, Ευρώπη και Ωκεανία, ενώ είναι σπανιότερη σε Ασία και Λατινική Αμερική. Αντιθέτως η παιδική ΟΜΛ είναι σπανιότερη σε Βόρεια Αμερική, αλλά και στην Ινδία, απ'ότι σε άλλα μέρη της Ασίας. Αυτές οι γεωγραφικές διαφοροποιήσεις πιθανόν να οφείλονται στα διαφορετικά φυλετικά γονίδια, σε περιβαλλοντικούς παράγοντες ή σε συνδυασμό των παραπάνω (Linnet MS. 1985).

A2.3 Διάγνωση

Η πρώτη ένδειξη για τη διάγνωση της ΟΜΛ είναι συνήθως ένα μη φυσιολογικό αποτέλεσμα μιας γενικής αίματος που μπορεί να περιλαμβάνει υπερβολική αύξηση των λευκών αιμοσφαιρίων του αίματος (λευκοκυττάρωση), μείωση των αιμοπεταλίων, των ερυθρών αιμοσφαιρίων, ή ακόμα και λευκοπενία.

Μια πιθανή διάγνωση ΟΜΛ μπορεί να γίνει με επίχρισμα περιφερικού αίματος όταν οι λευκοβλάστες κυκλοφορούν στα αγγεία. Η οριστική διάγνωση όμως απαιτεί βιοψία του μυελού των οστών .



Εικόνα 2. α) Λήψη περιφερικού αίματος. β) Λήψη μυελού των οστών για βιοψία

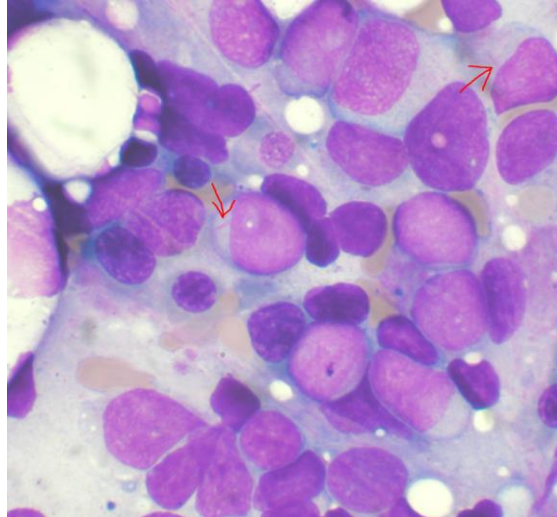
Ο μυελός ή/και το αίμα εξετάζονται τόσο με οπτικό μικροσκόπιο όσο και με κυτταρομετρία ροής για να διαγνωσθεί η παρουσία λευχαιμίας και να γίνει η διαφοροδιάγνωση της ΟΜΛ από τους άλλους τύπους λευχαιμιών, όπως και για να προσδιοριστεί ο τύπος της. Το δείγμα του μυελού ή του αίματος συνήθως ελέγχεται και για χρωμοσωμικές ανωμαλίες με μεθόδους κλασικής κυτταρογενετικής (καρυότυπος) ή/και μοριακής κυτταρογενετικής [FISH

(fluorescent in situ hybridization)]. Επίσης, μοριακές αναλύσεις μπορεί να πραγματοποιηθούν ώστε να προσδιοριστούν μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα γονίδια όπως είναι οι μεταλλάξεις στα γονίδια *FLT3*, *NPM1* και *KIT*, που μπορεί να επηρεάσουν την πορεία και την κατάληξη της νόσου (Baldus CD. et al. 2007). Σύμφωνα με τα κριτήρια του παγκόσμιου οργανισμού υγείας 2016 (WHO), η διάγνωση της ΟΜΛ γίνεται όταν εντοπίζονται λευχαιμικοί μυελοβλάστες σε ποσοστό μεγαλύτερο του 20% στο αίμα ή/και στο μυελό των οστών με εξαίρεση τη κατηγορία των ΟΜΛ με επαναλαμβανόμενες αλλοιώσεις [πχ. t(15;17), t(8;21), t(16;16)/inv(16)] στην οποία η διάγνωση γίνεται ανεξάρτητα του αριθμού των βλαστών (Vardiman JW. et al. 2009). Σύμφωνα όμως με το έως πρόσφατα χρησιμοποιούμενο σύστημα κατάταξης της ΟΜΛ, την ταξινόμηση FAB του Γαλλο-Αμερικανο-Βρετανικού συστήματος που είναι πιο αυστηρή, για τη διάγνωση της ΟΜΛ απαιτείται ποσοστό βλαστών τουλάχιστον 30% στο μυελό των οστών ή στο περιφερικό αίμα (Αθανασίου Α. 2008). Η ΟΜΛ πρέπει να διαφοροποιείται προσεκτικά από "προλευχαιμικές" καταστάσεις, όπως είναι τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα ή τα μυελοϋπερπλαστικά νοσήματα, τα οποία αντιμετωπίζονται με διαφορετική αγωγή (Amin HM. et al. 2005).

A2.4 Κλινική εικόνα ΟΜΛ

Η κλινική εικόνα των ασθενών με ΟΜΛ είναι αποτέλεσμα κυρίως της διήθησης του μυελού των οστών αλλά και άλλων ιστών και οργάνων από τα βλαστικά κύτταρα. Επίσης παρατηρούνται κλινικές εκδηλώσεις λόγω διαταραχής της μικροκυκλοφορίας ή του μηχανισμού πήξεως.

Η διήθηση του μυελού των οστών οδηγεί σε αναιμία, ουδετεροπενία και θρομβοπενία. Οι ασθενείς προσέρχονται στο ιατρείο συνήθως επικαλούμενοι αίσθημα καταβολής, ωχρότητα, δύσπνοια, κόπωση ή στηθαλγικά ενοχλήματα, παρατεταμένο εμπύρετο, λοιμώξεις αναπνευστικού κ.α. που οφείλονται στην ουδετεροπενία, αλλά και αιμορραγίες εξαιτίας της θρομβοπενίας. Πιο σπάνια ή σε προχωρημένες καταστάσεις, οι ασθενείς εμφανίζουν σπληνομεγαλία., ενώ περίπου το 1/3 των ασθενών εμφανίζει ηπατομεγαλία (Taylor PR. et al. 1995).



Εικόνα 3. Επίχρισμα μυελού των οστών μετά από διήθηση από παθολογικά κύτταρα (βλάστες). Πολλοί βλάστες έχουν ραβδία Auer.

Στην οξεία μυελομονοκυτταρική λευχαιμία είναι επίσης συχνή η διήθηση του δέρματος, που εκδηλώνεται με το μορφή ανώδυνων ιωδών πλακών ή οζιδίων ή ως διάχυτη διήθηση. Επίσης, στον τύπο αυτό ΟΜΛ παρατηρείται πιο συχνά και το σύνδρομο της λευκόστασης, σε ασθενείς με αυξημένο αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων. Κατά το σύνδρομο αυτό, τα μικρά αγγεία φράζουν από έμβολα βλαστικών κυττάρων ή ρήξεις με επακόλουθο την αιμορραγία τους. Το σύνδρομο αυτό μπορεί να επηρεάσει και το κεντρικό νευρικό σύστημα (Mauritzson N. et al. 2002).

A2.5 Ταξινόμηση της ΟΜΛ

A2.5.1 Ταξινόμηση κατά FAB

Το 1976 πρώτη η Γαλλική – Αμερικανική – Βρετανική (French – American – British, FAB) συνεργατική ομάδα πρότεινε την ταξινόμηση της ΟΜΛ σε υποομάδες με βάση την πορεία διαφοροποίησης των αιμοποιητικών κυττάρων της λεμφικής σειράς (Bennett J. et al. 2004). Η FAB ταξινόμηση βασίζεται κυρίως στα μορφολογικά και κυτταροχημικά χαρακτηριστικά των βλαστών και χρησιμοποιείται έως σήμερα. Στα πλεονεκτήματα της περιλαμβάνεται η ταχύτητα, η ευκολία στην εκτίμηση και η μεγάλη συμφωνία μεταξύ των μελετητών, σε ποσοστό >80%. Ωστόσο, παρουσιάζει μειονεκτήματα, όπως η δυσχέρεια αναγνώρισης ορισμένων μορφών ΟΜΛ

(M0, M7, διφαινοτυπική) (Matutes E. et al. 1997) και η περιορισμένη αξία στην πρόγνωση της νόσου ή την ανίχνευση υπολειμματικής νόσου (Head DR. 2004). Στον πίνακα που ακολουθεί συνοψίζονται οι 8 υπότυποι της ΟΜΛ με βάση την ταξινόμηση κατά FAB.

Πίνακας 2. Ταξινόμηση κατά FAB της ΟΜΛ

Υπότυπος	Κυτταρικός τύπος	Μορφολογία	Συχνότητα	Πρόγνωση
M0	Οξεία μυελοβλαστική λευχαιμία χωρίς ωρίμανση	Μη ώριμοι μυελοβλάστες που στερούνται οριστικής μυελογενούς διαφοροποίησης.	3-5%	Δυσμενής
M1	Οξεία μυελοβλαστική λευχαιμία με ελάχιστη διαφοροποίηση	Ανώριμοι μυελοβλάστες. <10% προμυελοκύτταρα, μυελοκύτταρα ή μονοκύτταρα. Ελάχιστοι ράβδοι Auer.	15-20%	Ενδιάμεση
M2	Οξεία μυελοβλαστική λευχαιμία με ωρίμανση	Ανώριμοι μυελοβλάστες, περισσότεροι ώριμοι από ότι στη M1. >10% προμυελοκύτταρα/μυελοκύτταρα. <20% μονοκύτταρα. Ράβδοι Auer μπορεί να είναι παρόντες.	25-30%	Ευνοϊκή
M3	Οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία	Κυριαρχούν προμυελοκύτταρα. Αδρά βασεόφιλα κοκκία σε περισσότερα από 30% των κυττάρων. Συχνές δέσμες των ραβδίων Auer.	10-15%	Ευνοϊκή
M3v	Οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία με λεπτή κοκκίωση	Οι κόκκοι δεν είναι ορατοί με μικροσκόπιο.		
M4	Οξεία μυελομονοκυτταρική λευχαιμία	Μίγμα ανώμαλων μονοκυτταρικών στοιχείων (>20%) και μυελοβλάστες / προμυελοβλάστες (>20%).	20-30%	Ευνοϊκή /Ενδιάμεση
M4eo	Οξεία μυελομονοκυτταρική λευχαιμία με παθολογικά ηωσινόφιλα στον μυελό	1–30% ηωσινόφιλα.		Ευνοϊκή /Ενδιάμεση
M5a	Οξεία μονοκυτταρική λευχαιμία, ελαφρά διαφοροποιημένη	>80% μονοκύτταρα.	2-9%	Ενδιάμεση
M5b	Οξεία μονοκυτταρική λευχαιμία,	>80% μη ερυθροποιητικά κύτταρα και >20% είναι πιο		

	διαφοροποιημένη	ώριμα (μονοκύτταρα).		
M6	Οξεία ερυθρολευχαιμία	Κυριαρχούν μυελοβλάστες και ερυθλοβλάστες (>50%).	3-5%	Δυσμενής
M7	Οξεία μεγακαρυοβλαστική λευχαιμία	Βλάστες >30% των εμπύρηνων κυττάρων που είναι μεγακαρυοβλάστες με ανοσολογικούς δείκτες.	3-5%	Δυσμενής

A2.5.2 Ταξινόμηση κατά WHO

Το 1999 ξεκίνησαν προσπάθειες για μια νέα ταξινόμηση της ΟΜΛ η οποία θα στηρίζονταν περισσότερο στη βιολογία της νόσου. Δημιουργήθηκε έτσι από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ) [World Health Organization (WHO)] η νέα ταξινόμηση κατά WHO. Η συγκεκριμένη ταξινόμηση βασίζεται τόσο στα κυτταρογενετικά και μοριακά ευρήματα και την παρουσία δυσπλαστικών χαρακτηριστικών όσο και στην προηγούμενη ιστορία της νόσου. Στην τελευταία αναθεωρημένη κατάταξη της WHO του 2016 κάποια εξατομικευμένα χαρακτηριστικά της νόσου εμφανίζονται απλουστευμένα, αλλά η κατάταξη είναι συνολικά πιο περίπλοκη και γι' αυτό ακόμη και σήμερα πολλές φορές χρησιμοποιείται η FAB ως πιο εύχρηστη (Flandrin G. 2002; Swerdlow SH. et al. 2008; Vardiman JW. 2010). Η ταξινόμηση κατά WHO 2016 περιλαμβάνει 7 βασικές κατηγορίες (Arber et al. 2016).

“The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia”

1. ΟΜΛ με επαναλαμβανόμενες γενετικές ανωμαλίες

- a. ΟΜΛ με t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1
- b. ΟΜΛ με inv(16)(p13.1q22) ή t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11
- c. ΟΠΜΛ με PML-RARA
- d. ΟΜΛ με t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A
- e. ΟΜΛ με t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214
- f. ΟΜΛ με inv(3)(q21.3q26.2) ή t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM
- g. ΟΜΛ (Μεγακαρυοβλαστική) με t(1;22)(p13.3;q13.3); RBM15-MKL1
- h. ΟΜΛ με BCR-ABL1
- i. ΟΜΛ με μεταλλάξεις στο NPM1
- j. ΟΜΛ με μεταλλάξεις στο CEBPA
- k. ΟΜΛ με μεταλλάξεις στο RUNX1

2. ΟΜΛ συσχετιζόμενη με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο

3. ΟΜΛ συσχετιζόμενη με θεραπεία (t-ΟΜΛ)

4. ΟΜΛ μη ταξινομούμενη διαφορετικά

- l. ΟΜΛ ελάχιστα διαφοροποιημένη
- m. ΟΜΛ χωρίς ωρίμανση
- n. ΟΜΛ με ωρίμανση
- o. Οξεία Μυελομονοκυτταρική λευχαιμία
- p. Οξεία Μονοκυτταρική/Μονοβλαστική λευχαιμία
- q. Οξεία ερυθροβλαστική λευχαιμία
- g. Οξεία μεγακαρυοβλαστική λευχαιμία
- h. Οξεία βασεοφιλική λευχαιμία
- i. Οξεία μεγακαρυοβλαστική πανμυέλωση με μυελοϊνωση

5. Μυελοβλαστικό σάρκωμα

6. ΟΜΛ σχετιζόμενη με σύνδρομο Down

7. ΟΜΛ ασαφούς σειράς

- a. Οξεία Αδιαφοροποίητη Λευχαιμία, AUL
- b. Οξεία Λευχαιμία Μεικτού Φαινοτύπου:
 - MPAL MPAL με t(9;22)(q34;q11.2),
 - BCR-ABL1 MPAL με t(v;11q23),
 - MLL αναδιατάξεις,
 - MPAL, B/Μυελικής σειράς, μη περαιτέρω ταυτοποιούμενη,
 - MPAL, T/Μυελικής σειράς, μη περαιτέρω ταυτοποιούμενη,
 - MPAL μη περαιτέρω ταυτοποιούμενη, σπάνιοι τύποι.

A2.6 Ανοσοφαινοτυπική παθογένεια της ΟΜΛ

Ανοσολογικά η ΟΜΛ χαρακτηρίζεται από την έκφραση δύο ή περισσότερων από τους κάτωθι μυελομονοκυτταρικούς δείκτες: Anti-Myeloperoxidase (Anti-MPO), CD117 (c-kit), CD13, CD33, καθώς επίσης από την απουσία ειδικών δεικτών για τη λεμφική σειρά. Ο πιο ειδικός δείκτης είναι το Anti-MPO και ακολουθεί το CD117 (c-kit). Έχουν γίνει προσπάθειες για συσχέτιση συγκεκριμένων ανοσολογικών δεικτών με τους διάφορους υποτύπους της ΟΜΛ σύμφωνα με τη FAB κατάταξη αλλά μόνο οι υπότυποι M0, M6, και M7 έχουν χαρακτηρισθεί ανοσοφαινοτυπικά μέχρι σήμερα.

Πιο συγκεκριμένα, η άωρη μυελική σειρά (M0) καθορίζεται με ανοσολογικούς δείκτες, έχει φαινότυπο όπως οι άλλες ΟΜΛ αλλά παρουσιάζει αρνητική κυτταροχημεία και αρνητικά αποτελέσματα στους ειδικούς λεμφικούς

δείκτες. Η μυελομονοκυτταρική σειρά παρουσιάζει θετικότητα σε τουλάχιστον 2 από τους μυελικούς δείκτες που έχουν προαναφερθεί. Η ερυθρά σειρά (M6) δεν φέρει ειδικούς δείκτες στα άωρα κύτταρα σε αντίθεση με τα ώριμα που παρουσιάζουν θετικότητα στο anti-glycophorin A. Στη μεγακαρυοκυτταρική σειρά (M7) αναγνωρίζονται οι γλυκοπρωτεΐνες Ib, το σύμπλεγμα IIb/IIIa και IIIa στην μεμβράνη των αιμοπεταλίων και μεγακαρυοκυττάρων. Επίσης παρουσιάζεται θετικότητα στους δείκτες CD41, CD42 και CD61. Ο CD61 είναι ο δείκτης εκλογής για τη διάγνωση της M7 γιατί εμφανίζεται στα πιο πρώιμα στάδια ωρίμανσης και ανιχνεύεται σε υψηλότερο ποσοστό βλαστικών κυττάρων χωρίς να έχουν διαστραυρώμενες αντιδράσεις με άλλα αιμοποιητικά κύτταρα.

Άλλοι δείκτες που έχουν αναφερθεί ότι εκφράζονται σε κάποιους από τους υποτύπους της ΟΜΛ χωρίς να είναι ειδικοί για αυτούς είναι:

- CD14+ και anti-lysozyme+ στις περιπτώσεις με μονοκυτταρική διαφοροποίηση όπως M4-ΟΜΛ και M5-ΟΜΛ.
- HLA-DR- στις περιπτώσεις με έντονη μυελική διαφοροποίηση όπως η ΟΜΛ-M3 και η ΟΜΛ-M2.
- CD19+ εμφανίζεται στις περισσότερες περιπτώσεις ΟΜΛ-M2 με t(8;21).
- CD2+ πολύ συχνό στην ΟΜΛ-M3 με t(15;17) και στη ΟΜΛ-M4Εο.
- CD9+ εκφράζεται χαρακτηριστικά στα βλαστικά κύτταρα της ΟΜΛ-M3.
- CD36+ σε συνδυασμό με αρνητικό HLA-DR και CD13/CD33 παρουσιάζεται σε περιπτώσεις ΟΜΛ-M6.

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζεται η συσχέτιση των αποτελεσμάτων της ανοσοφαινοτυπικής ανάλυσης με τους διάφορους κατά FAB υποτύπους της ΟΜΛ (Κοντοπίδου Φ. 2004).

Πίνακας 3. ΟΜΛ – Συσχέτιση δεικτών με FAB ταξινόμηση (Κοντοπίδου Φ., 2004).

	M0	M2	M3	M4Εο	M5	M6	M7
MPO	+/-	+	+	+	-/+	-	-
CD2	-			+/-			

CD13	+/-	+	+	+	+/-	-	+/-
CD14	-	-	-	+/-	+/-	-	-
CD15	-	+/-	-/+	+/-		+	-
CD19	-	+/-					
CD33	+/-	+/-	+	+	+	+	+/-
CD34	+/-	+/-	-	-/+			
CD56		+/-					
CD61	-	-	-	-	-	-	+
CD64	-	-	+/-	+	+	+	
CD117	+/-	+/-	-/+	+/-			
HLA-DR	+/-	+	-	+	+	+	+/-

A3 Κυτταρογενετική

Η Κυτταρογενετική (Cytogenetics) αποτελεί κλάδο της βιολογίας που μελετά τη σύσταση του γονιδιώματος των ατόμων σε επίπεδο κυρίως χρωμοσωμάτων αλλά και κυττάρων, αποκαλύπτοντας κληρονομικές ή επίκτητες χρωμοσωμικές αλλοιώσεις.

Διακρίνεται στην Κλασσική Κυτταρογενετική (καρυότυπος), βάση της οποίας αποτελούν οι τεχνικές ζωνοποίησης (banding techniques) των μεταφασικών χρωμοσωμάτων και στην Μοριακή Κυτταρογενετική που περιλαμβάνει τις καινοτόμες τεχνικές του φθορίζοντος in situ υβριδισμό (Fluorescence in situ Hybridization, FISH), του πολυχρωματικού υβριδισμού (multicolour FISH), του συγκριτικό υβριδισμό του γονιδιώματος (Comparative Genomic Hybridization, CGH) και τέλος τη μέθοδο array-CGH.

A3.1 Κλασσική Κυτταρογενετική στην ΟΜΛ

Η κυτταρογενετική ανάλυση του μυελού των οστών σε ασθενείς με ΟΜΛ παίζει σπουδαίο ρόλο στην έγκαιρη διάγνωση, στη σωστή ταξινόμηση, στην πρόγνωση και επιλογή κατάλληλου θεραπευτικού σχήματος, στην εκτίμηση του θεραπευτικού αποτελέσματος και στον καθορισμό της υπολειπόμενης νόσου. Στη διάγνωση, κλωνικές χρωμοσωματικές αλλοιώσεις ταυτοποιούνται

στο 55-70% των ενήλικων ασθενών με de novo OML, στο 85-90% των ενήλικων ασθενών με s-OML και στο 79-85% των παιδιών με OML. Περίπου το 55% των ασθενών με παθολογικό καρυότυπο φέρει μόνο μία κυτταρογενετική ανωμαλία, ενώ το 45% φέρει δύο ή περισσότερους τύπους χρωμοσωματικών αλλοιώσεων. Οι καρυότυποι περιγράφονται σύμφωνα με το Διεθνές Σύστημα Ονοματολογίας ISCN 2016 (International System for Human Cytogenetic Nomenclature, 2016). Στο παράρτημα Ι, συνοψίζονται οι βασικοί κανόνες ονοματολογίας των χρωμοσωμάτων.

Οι σύνθετοι καρυότυποι (complex karyotype) χαρακτηρίζονται από την παρουσία τριών τουλάχιστον τυχαίων χρωμοσωματικών ανωμαλιών απουσία των ειδικών χρωμοσωματικών αλλοιώσεων, $t(8;21)$, $inv(16)/t(16;16)$, $t(9;11)$, $t(v;11)(v;q23.3)$, $t(6;9)$, $inv(3)/t(3;3)$ (ELN recommendations for AML, 2017, Döhner et al., 2016). Ασθενείς που φέρουν σύνθετους καρυότυπους παρουσιάζουν κακή πρόγνωση (Orozco JJ et al., 2012). Πρόσφατα έχει εισαχθεί στη βιβλιογραφία ο όρος μονοσωμικός καρυότυπος (monosomal karyotype, MK). Για να χαρακτηριστεί ένας καρυότυπος ως μονοσωμικός (MK) πρέπει να φέρει δύο τουλάχιστον αυτοσωμικές μονοσωμίες ή μια μονοσωμία συνοδευόμενη από δομικές ανωμαλίες στις οποίες όμως δεν περιλαμβάνονται οι αλλοιώσεις καλής πρόγνωσης $t(15;17)$, $t(8;21)$, $t(16;16)/inv(16)$. Οι μονοσωμικοί καρυότυποι χαρακτηρίζονται από εξαιρετικά δυσμενή πρόγνωση (Manola KN. et al. 2013; Kayser S. et al. 2012).

Οι συχνότερες καρυοτυπικές αλλοιώσεις των ασθενών με OML παρουσιάζονται στον πίνακα 4. Οι αλλοιώσεις αυτές μπορεί να είναι ισοζυγισμένες ή μη ισοζυγισμένες. Οι μη ισοζυγισμένες συνήθως αφορούν έλλειψη ολόκληρου χρωμοσώματος (μονοσωμία) ή κάποιου χρωμοσωμικού τμήματος, ή ακόμα και παράγωγα χρωμοσώματα. Οι ισοζυγισμένες αλλοιώσεις αφορούν αμοιβαίες μεταθέσεις όπως οι $t(8;21)$, $t(16;16)$, $t(15;17)$ ή αναστροφές όπως το $inv(16)$. Στο 30-45% των περιπτώσεων δεν ανιχνεύεται στο καρυότυπο κάποια χρωμοσωματική αλλοίωση και συνιστάται ο μοριακός έλεγχος συγκεκριμένων γονιδίων που σχετίζονται με OML.

Πίνακας 4. Οι κυριότερες κυτταρογενετικές ανωμαλίες της OML (Martens JH. and Stunnenberg HG. 2010; ELN recommendations 2017)

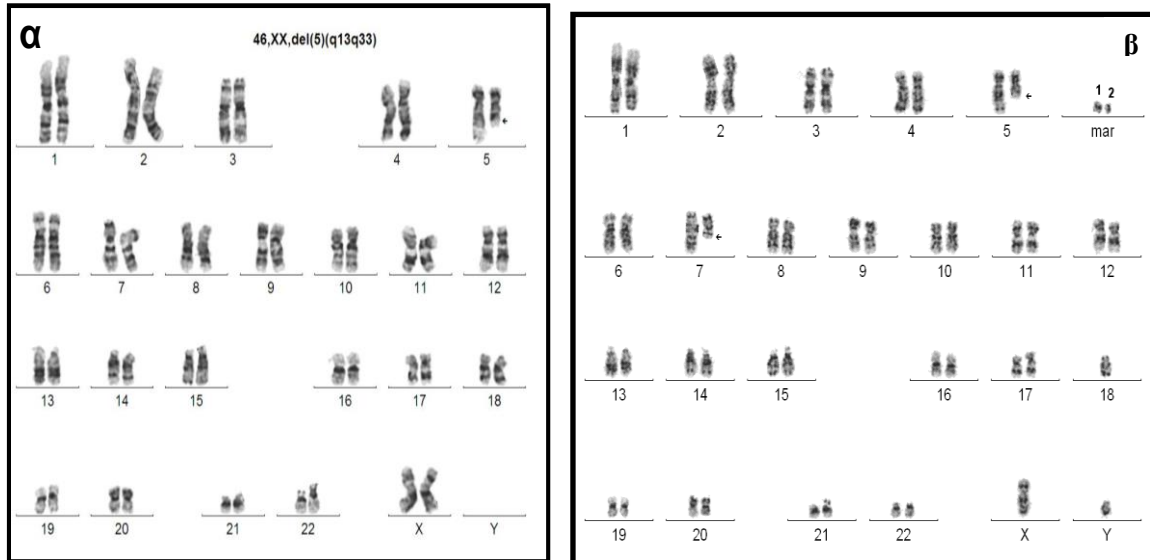
Κυτταρογενετική ή ανωμαλία	Πρόγνωση	Εμπλεκόμενα γονίδια	FAB ταξινόμηση	Συχνότητα % σε Ενήλικες
Φυσιολογικός καρυότυπος	<i>ενδιάμεση</i>	<i>πολλαπλά</i>	-	30-45%
t(8;21)	<i>Καλή</i>	<i>ETO;AML1</i>	<i>M1, M2</i>	10%
inv(16), t(16;16)	<i>Καλή</i>	<i>MYH11;CBFB</i>	<i>M4, M2</i>	5-8%
t(15;17)	<i>Καλή</i>	<i>PML;RARa</i>	<i>M3</i>	10-13%
Αναδιατάξεις του 11q23 εκτός της t(9;11)	<i>Κακή</i>	<i>MLL με άλλα γονίδια</i>	<i>M4/M5</i>	4%
t(9;22)	<i>Κακή</i>	<i>BCR;ABL1</i>	<i>M5, M4, M2</i>	2%
t(6;9)	<i>Κακή</i>	<i>DEK;CAN</i>	<i>M4/M2</i>	<1%
t(1;22)	<i>Κακή</i>	<i>RBM15;MKL1</i>	<i>M7</i>	<1%
t(9;11)	<i>Ενδιάμεση</i>	<i>MLLT3;MLL</i>	<i>M1</i>	<1%
-7/del(7q)	<i>Κακή</i>	<i>πολλαπλά</i>	<i>M2, M4, M5</i>	6-8%
-5/del(5q)	<i>κακή</i>	<i>πολλαπλά</i>	<i>M1, M2, M4, M6</i>	4-6%
Τρισωμία 8	<i>ενδιάμεση</i>	<i>πολλαπλά</i>	<i>M 1-6</i>	9-11%

Οι πιο χαρακτηριστικές αλλοιώσεις που παρατηρούνται στην ΟΜΛ αναλύονται παρακάτω και είναι οι εξής:

Μονοσωμία 5/del(5q)

Η μονοσωμία του χρωμοσώματος 5 (-5) είναι μια από τις πιο κοινές αριθμητικές ανωμαλίες που παρατηρούνται στην ΟΜΛ. Η έλλειψη στην χρωμοσωμική περιοχή 5q [del(5q)] (εικόνα 4) αντιπροσωπεύει το 5 με 10% των ασθενών με ΟΜΛ και παρατηρείται συνήθως μαζί με τις αλλοιώσεις -7, del(7q), -17, del(17p) και -18. Επίσης παρατηρείται και ως δευτερογενής αλλοίωση σε ασθενείς με ΟΜΛ που φέρουν inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26) ή t(9;22)(q34;q11.2). Πρόσφατα η έλλειψη στο 5q συσχετίστηκε παθογενετικά με τα τον αυξητικό παράγοντα *EGFR1*, τα γονίδια της ριβοσωμικής πρωτεΐνης S14 (RPS14) καθώς και με την απώλεια του γονιδίου της catenin alpha 1 (*CTNNA1*) (Λαζαρίδου Α. 2009; Liu TX. et al. 2007). Ασθενείς με ΟΜΛ που φέρουν -5/del(5q) έχουν συσχετιστεί με δυσμενή πρόγνωση και αντιμετωπίζονται ως ασθενείς υψηλού κινδύνου στα θεραπευτικά πρωτόκολλα. Μελέτες επίσης έχουν δείξει ότι οι αλλοιώσεις αυτές

παρατηρούνται σε υψηλά ποσοστά σε ασθενείς με s-ΟΜΛ. Ανοσοφαινοτυπικά οι λευχαιμικοί βλάστες που φέρουν είτε μονοσωμία 5 είτε έλλειψη στην 5q περιοχή, χαρακτηρίζονται από τη έκφραση των CD2, CD7, CD13, CD14, CD15, CD18, CD33 και CD34 (Hrusak O. και Porwit-MacDonald A. 2002).

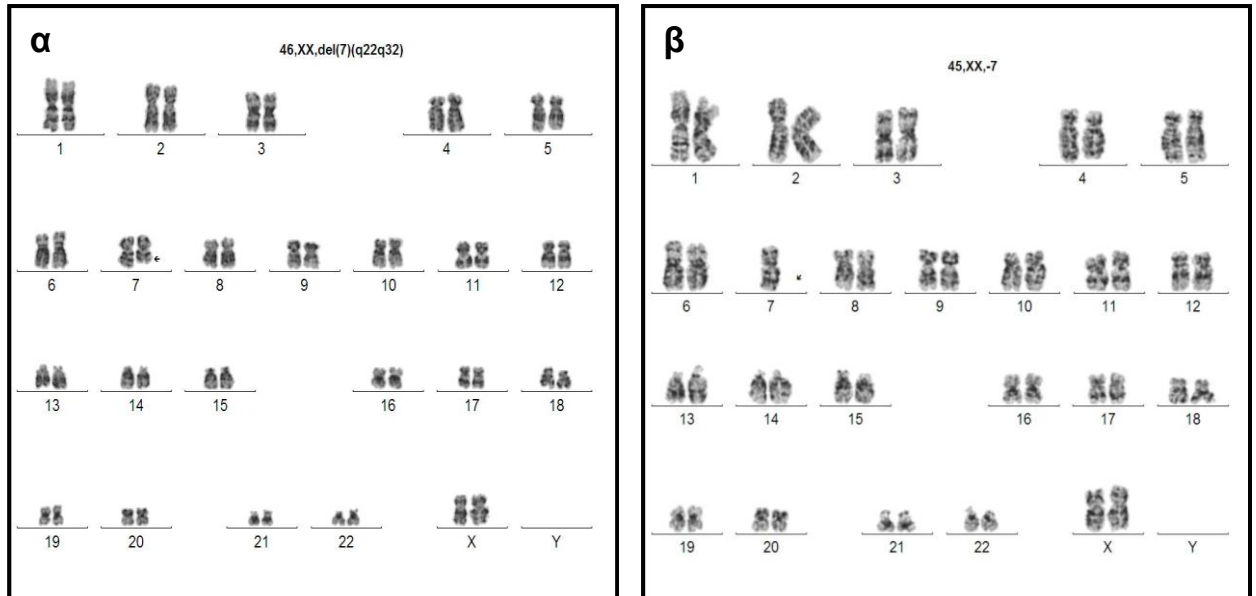


Εικόνα 4. Καρυότυποι ασθενών με ΟΜΛ και αλλοιώσεις στο χρωμόσωμα 5. α) 45,XX,del(5q)(q13q33). β) 47,XY,del(5)(q13q33),del(7)(q22),-18,+mar1,+mar2,inc.

Μονοσωμία 7/ del(7q)

Η μονοσωμία 7 (-7) (εικόνα 5β) παρατηρείται ως μεμονωμένη αλλοίωση στο 5% των περιπτώσεων ασθενών με ΟΜΛ και σε ποσοστό περίπου 10% σε περιπτώσεις ασθενών που φέρουν και άλλες αλλοιώσεις (κυρίως -5, del(5q) και -17). Επίσης εμφανίζεται ως δευτερογενής ανωμαλία στο 50% των περιπτώσεων με $inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26)$ και στο 35% των περιπτώσεων με $t(2;3)(p11-23;q23-28)$. Η έλλειψη χρωμοσωμικής περιοχής στο 7q [del(7q)] (εικόνα 5α), ως πρωτογενή αλλοίωση, αντιπροσωπεύει το 5% των περιπτώσεων με ΟΜΛ που φέρουν επιπλέον και άλλες αλλοιώσεις (συνήθως -5 και -17). Ως δευτερογενής ανωμαλία παρατηρείται στο 15% των περιπτώσεων που φέρουν $t(3;12)(q26;p13)$, στο 8% με $t(3;21)(q26;q22)$ και στο 5% με $inv(16)(p13q22)$. Συχνά τόσο η μονοσωμία 7 όσο και το del(7q) παρατηρούνται στους υπότυπους της FAB ταξινόμησης M2, M4 και M5 (ELN, 2017). Ανοσοφαινοτυπικά οι βλάστες τους είναι θετικοί στους δείκτες CD7, CD13, CD15, CD18, CD33 και CD34. Στις αρχές της δεκαετίας του '80 έγινε αντιληπτό ότι η αλλοίωση -7/del(7q) συνδέεται με δυσμενή πρόγνωση (Larson

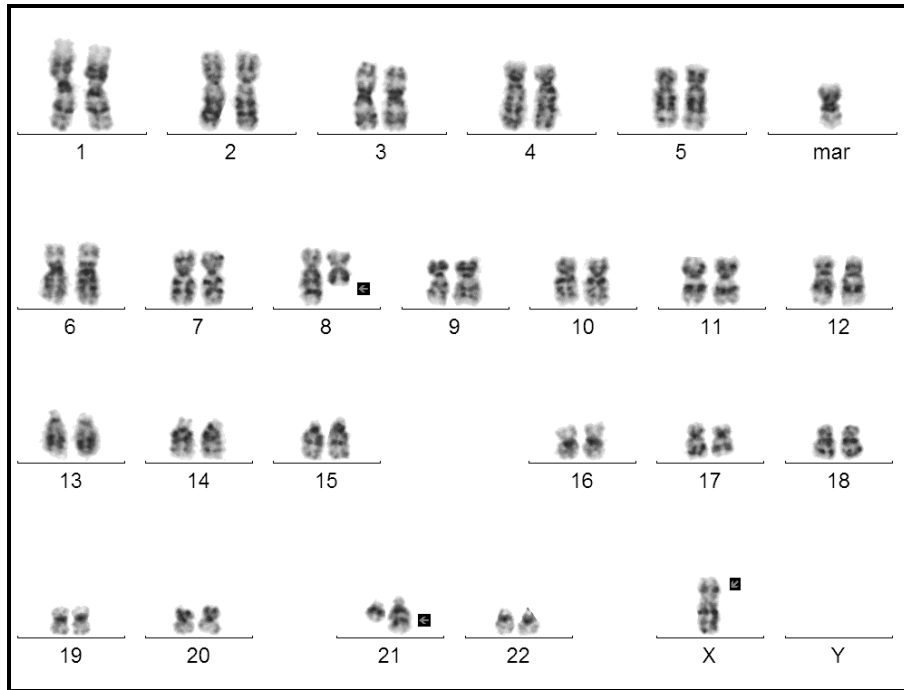
RA. et al. 1983). Τα τελευταία χρόνια είναι γνωστό ότι ασθενείς με del(7q) έχουν καλύτερη πρόγνωση σε σχέση με ασθενείς με μονοσωμία 7. Η μονοσωμία 7 έχει εξαιρετικά κακή πρόγνωση και το 82% των ασθενών με υποτροπιάζουν μέσα στο πρώτο χρόνο (Cordoba et al. 2012).



Εικόνα 5. Καρυότυποι ασθενών με ΟΜΛ και αλλοιώσεις στο χρωμόσωμα 7.
α) 46,XX,del(7)(q22q32), (β) 45,XX,-7.

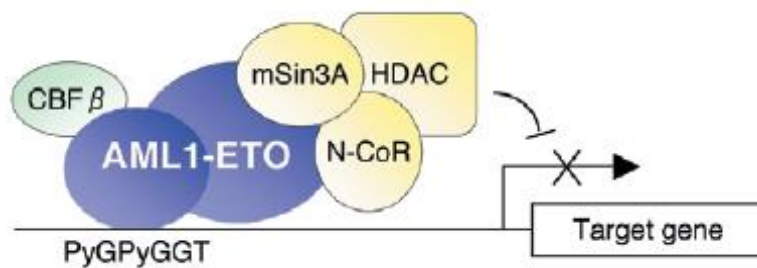
t(8;21)(q22;q22)

Η αμοιβαία μετάθεση t(8;21)(q22;q22) (Εικόνα 6) παρατηρείται στο 7% των περιπτώσεων ασθενών με ΟΜΛ και παθολογικό καρυότυπο. Η ειδική αυτή αλλοίωση για την ΟΜΛ έχει συσχετιστεί με τον υπότυπο M2 κατά FAB. Ως μεμονωμένη αλλοίωση παρατηρείται σε ποσοστό 40%. Συχνά ως δευτερογενείς αλλοιώσεις της t(8;21)(q22;q22) συναντάμε τις αλλοιώσεις -Y, -X, +8, del(9q), del(7q) και +21. Αποτέλεσμα της μετάθεσης αυτής είναι η σύντηξη του AML1 γονιδίου της χρωμοσωματικής περιοχής 21q22 (γνωστό και ως *RUNX1*) με το γονίδιο *ETO* που εδράζεται στη χρωμοσωματική περιοχή 8q22 που οδηγεί στη δημιουργία του υβριδικού γονιδίου και κατ' επέκταση στη παραγωγή της χιμαιρικής πρωτεΐνης AML1-ETO (Mauritzson N. et al. 2002).



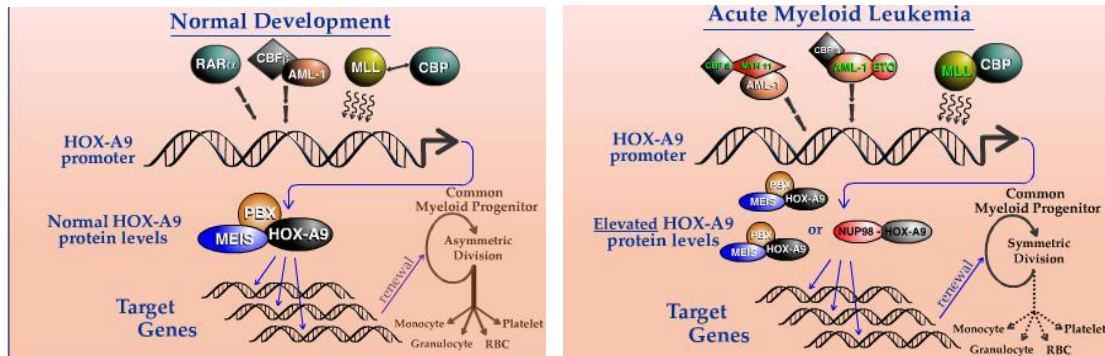
Εικόνα 6.: Καρυότυπος με G ζωνοποίηση 46,X,-X,t(8;21)(q22;q22),+mar

Η χιμαιρική πρωτεΐνη AML1-ETO, παρεμβαίνει στη δράση των φυσιολογικών πρωτεϊνών AML1 και ETO διαταράσσοντας την έκφραση των γονιδίων στόχων τους και οδηγώντας σε λευχαιμική εξαλλαγή. Συγκεκριμένα, η χιμαιρική πρωτεΐνη διατηρεί την ικανότητα να προσκολλάται στη ρυθμιστική περιοχή διάφορων γονιδίων αναστέλλοντας όμως την μεταγραφή τους. Η μεταβολή στην έκφραση των γονιδίων πραγματοποιείται μέσω μηχανισμού που περιλαμβάνει την πρόσθεση του συμπλόκου N-CoR και της αποακετυλάσης των ιστονών, HDAC (εικόνα 7). Η αποακετυλάση των ιστονών (HDAC) αφαιρεί ακετυλομάδες από τις ιστόνες και τους επιτρέπει να τυλιχθούν πολύ σφιχτά γύρω από το DNA, μειώνοντας έτσι την επαφή του με τους μεταγραφικούς παράγοντες και καταστέλλοντας εν τέλει την μεταγραφή.



Εικόνα 7. Το υβριδικό γονίδιο *AML1/ETO* προσελκύει το πυρηνικό σύμπλοκο καταστολής *N-CoR* και την αποακετυλάση των ιστονών, καταστέλλοντας έτσι την έκφραση διάφορων γονιδίων.

Αποτέλεσμα της μη έκφρασης των γονιδίων της ερυθροποίησης είναι η καταστολή της διαφοροποίησης στα κύτταρα αυτά, κάτι που παρατηρούμε σε οξείες λευχαιμίες τύπου M2 που φέρουν την μετάθεση t(8;21) (εικόνα 8).



Εικόνα 8. α) Φυσιολογική ανάπτυξη των κυττάρων του μυελού των οστών. β) Υπερέκφραση του γονιδίου *HOXA9*, η οποία οφείλεται στην ενεργοποίηση του χιμαιρικού γονιδίου *AML/ETO*. Η απορύθμιση της έκφρασης του *HOXA9* οδηγεί σε επέκταση των πρώιμων κυττάρων κατά την αιμοποίηση και εν τέλει στην ανάπτυξη λευχαιμίας.

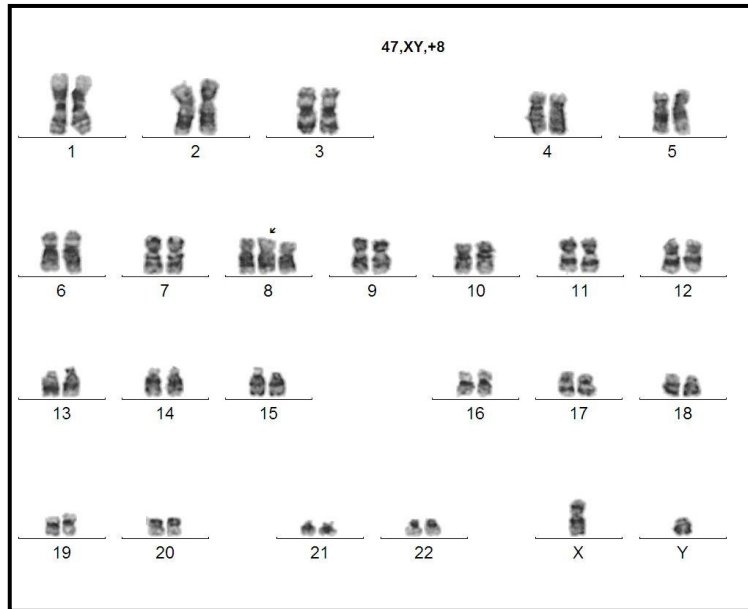
Η αμοιβαία μετάθεση t(8;21) θεωρείται γενικά καλής πρόγνωσης και συνήθως επιτυγχάνεται πλήρης ίαση μετά από συμβατική χημειοθεραπεία (Zhu et al., 2013). Εν τούτοις όταν η αλλοίωση t(8;21) συνοδεύεται από μεταλλάξεις στο γονίδιο *KIT*, ειδικά όταν συνοδεύεται από υπερέκφραση του γονιδίου *KIT* παρουσιάζει δυσμενή πρόγνωση (Dohner et al. 2017).

Τρισωμία 8

Η τρισωμία (+8), η πιο συχνή χρωμοσωματική ανωμαλία στην ΟΜΛ (εικόνα 9), παρατηρείται στο 5% των περιπτώσεων ασθενών με ΟΜΛ ως μεμονωμένη αλλοίωση και στο 10% περίπου των περιπτώσεων που φέρουν και άλλες αλλοιώσεις [κυρίως *der(1;7)(q10;p10)*, *t(3;21)(q26;q22)*, *t(7;12)(q36;p13)*, *t(9;11)(p21;q23)*, *t(9;22)(q34;q11)*, *t(11;17)9q23;q21)*, *t(11;19)9q23;p13.1)*, *t(15;17)(q22;q21)* και *inv(16)(p13q22)*].

Η τρισωμία 8 ως μεμονωμένη αλλοίωση είναι εξίσου συχνή σε άντρες όσο και σε γυναίκες και εμφανίζεται σε άτομα με μέση ηλικία τα 50 έτη.

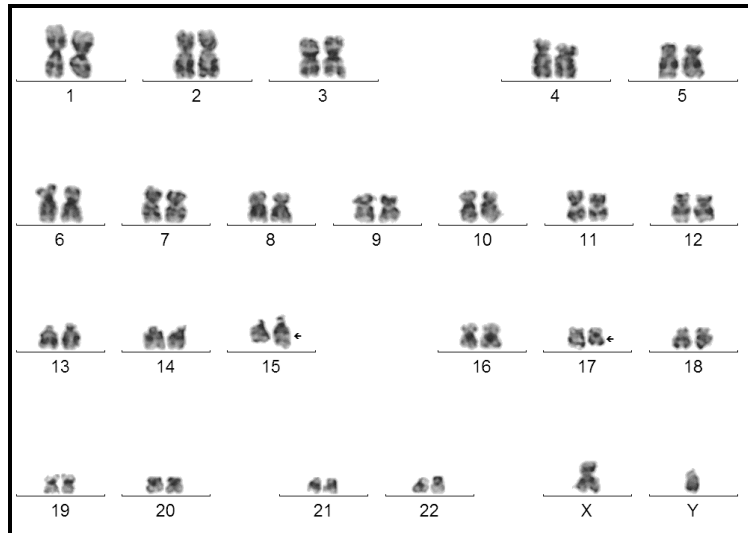
Παρατηρείται ιδιαίτερα στους υποτύπους M1, M2, M4 και M5 σύμφωνα με τη FAB ταξινόμηση (Dastugue N. et al., 2002) και πιο συχνά σε πρωτοπαθείς παρά σε δευτεροπαθείς ΟΜΛ. Όσο αφορά την προγνωστική αξία της τρισωμίας 8, έχει χαρακτηριστεί ως αλλοίωση με ενδιάμεση πρόγνωση (Grimwade D. et al. 1998; Wolman SR. et al. 2002).



Εικόνα 9. Καρυότυπος ασθενούς με τρισωμία του χρωμοσώματος 8 (+8).

t(15;17)(q22;q21)

Από τις πιο καλά μελετημένες μορφές της ΟΜΛ, η οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία (ΟΠΛ), υπότυπος M3 κατά FAB, αποτελεί το 5-8% όλων των περιπτώσεων της ΟΜΛ. Η αμοιβαία μετάθεση t(15;17)(q22;q21) (εικόνα 10) είναι ειδική αλλοίωση της ΟΠΛ και περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1957. Σε αυτή την μετάθεση το γονίδιο *PML*, που εδράζει στην 15q21 χρωμοσωμική θέση, ενώνεται με το γονίδιο *RARα* που εδράζει στην 17q21 χρωμοσωμική θέση, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός μεταγραφικού ενεργού υβριδικού γονιδίου, του *PML/RARα* (Martens JH. and Stunnenberg HG. 2010) .



Εικόνα 10. Καρυότυπος με G ζωνοποίηση: $46,XY,t(15;17)(q22;q21)$

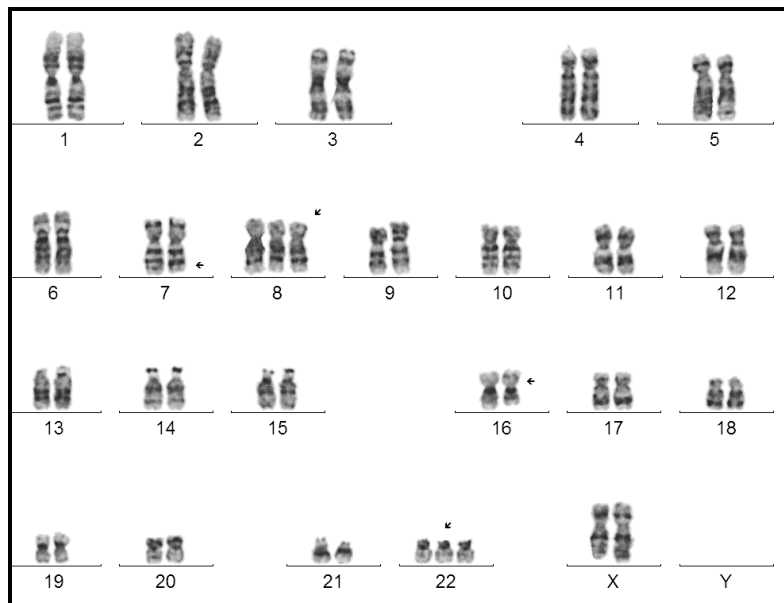
Ο υποδοχέας α του ρετινοϊκού οξέος (RAR α) ο οποίος είναι μέλος της ομάδας υποδοχέων στεροϊδικών/θυρεοειδικών ορμονών, έχει την ικανότητα ρύθμισης της διαφοροποίησης των μυελικών κυττάρων. Ο υποδοχέας RAR α προσκολλάται σε μια χαρακτηριστική αλληλουχία DNA στους εκκινητές διάφορων γονιδίων προκαλώντας τη μεταγραφή τους. Κατά την αντιμετάθεση $t(15;17)(q22;q21)$, η χιμαιρική πρωτεΐνη (PML/RAR α) που σχηματίζεται, κινητοποιεί τις DNA μεθυλοτρασφεράσες στους εκκινητές των γονιδίων-στόχων καταστέλλοντας την έκφραση τους με αποτέλεσμα την αναστολή της διαφοροποίησης της μυελικής σειράς στο επίπεδο προμυελοκυττάρου.

Ως μεμονωμένη αλλοίωση η μετάθεση $t(15;17)(q22;q21)$ παρατηρείται στο 75% των περιπτώσεων ασθενών με ΟΜΛ-Μ3. Σε ποσοστό 10-15%, ως δευτερογενή αλλοίωση της $t(15;17)$ συναντάμε την τρισωμία 8. Μια κατηγορία ασθενών, που παρουσιάζουν μορφολογικά χαρακτηριστικά όμοια με αυτά της οξείας προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας, φέρουν μεταθέσεις, παραλλαγές της μετάθεσης $t(15;17)$. Οι πιο συχνές παραλλαγές είναι η $t(11;17)(q23;q21)$ και η $t(5;17)$. Οι ασθενείς με $t(11;17)$ παρουσιάζουν αντίσταση στη θεραπεία με ATRA. Η αμοιβαία μετάθεση $t(15;17)$ παρατηρείται το ίδιο συχνά σε άνδρες όσο και σε γυναίκες και κυρίως σε άτομα με μέση ηλικία τα 40 έτη. Παρά το γεγονός ότι τα τελευταία χρόνια θεωρείται μια αλλοίωση καλής πρόγνωσης, αρκετές μελέτες αναφέρουν ότι η χαμηλή επιβίωση ορισμένων ασθενών οφείλεται στην παρουσία δευτερογενών χρωμοσωματικών αλλοιώσεων και

μεταλλάξεων στο γονίδιο *FLT3* (Grimwade D. et al. 1998; De Botton S. et al. 2000).

inv(16)(p13q22) / t(16;16)(p13;q22)

Ασθενείς με περικεντρική αναστροφή του χρωμοσώματος 16 [*inv(16)(p13q22)*] (εικόνα 11) ή αμοιβαία μετάθεση μεταξύ των δύο ομόλογων χρωμοσωμάτων 16 [*t(16;16)(p13;q22)*] συνήθως ανήκουν στον υπότυπο ΟΜΛ-M4 σύμφωνα με τη FAB ταξινόμηση. Η ανίχνευσή της με κλασσική κυτταρογενετική είναι πολλές φορές δύσκολη και χρειάζεται FISH ή RT-PCR για την ταυτοποίησή της.



Εικόνα 11. Καρυότυπος με *G* ζωνοποίηση:
48,XX,del(7)(q32),+8,*inv(16)(p13q22)*,+22

Οι αλλοιώσεις *inv(16)* και *t(16;16)* συμβάλουν στην δημιουργία του υβριδικού γονιδίου *CBFBeta/MYH11*. Η έκφραση του *CBFB-MYH11* στα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα μπλοκάρει τη διαφοροποίηση της μυελικής από τη λεμφική σειρά. Πρόσθετες γενετικές αλλαγές σε συνεργασία με το *CBFB-MYH11* μπορούν να προκαλέσουν λευχαιμία.

Οι αλλοιώσεις *inv(16)* και *t(16;16)* παρατηρούνται στο 4% των περιπτώσεων ασθενών με ΟΜΛ με την αναστροφή να είναι πολύ πιο συχνή (95%) από την αντιμετάθεση (5%). Οι αλλοιώσεις *inv(16)(p13q22)* και *t(16;16)(p13;q22)* είναι πιο συχνές στους άντρες σε σχέση με τις γυναίκες.

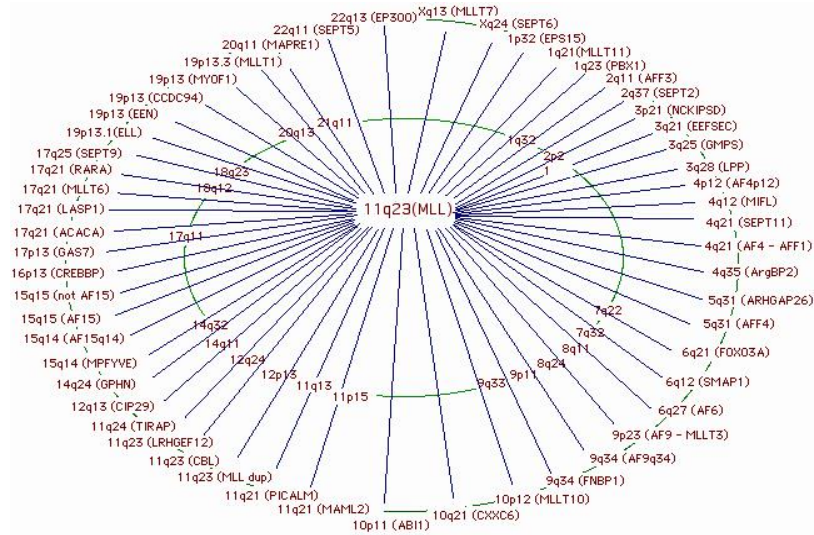
Εμφανίζονται σε όλες τις ηλικίες και κυρίως σε άτομα με μέση ηλικία τα 35 έτη. Ασθενείς με ΟΜΛ που φέρουν την αλλοίωση $inv(16)/t(16;16)$ έχουν εξαιρετικά καλή πρόγνωση και την πιο υψηλή επιβίωση σε σχέση με άλλους υποτύπους ΟΜΛ (Grimwade D. et al., 1998; Marcucci G. et al. 2005).

Αναδιατάξεις της χρωμοσωματικής περιοχής 11q23

Αναδιατάξεις της χρωμοσωματικής περιοχής 11q23, παρατηρούνται στο 7-8% των κυτταρογενετικά παθολογικών καρυοτύπων ασθενών με ΟΜΛ. Ως μεμονωμένη αλλοίωση παρατηρείται σε ποσοστό 60% των περιπτώσεων με αναδιατάξεις 11q23. Οι πιο συχνές δευτερογενείς αλλοιώσεις που ανευρίσκονται μαζί με αναδιατάξεις της περιοχής 11q23 είναι οι τρισωμίες 8, 19, 21 καθώς και η μονοσωμία 7.

Το γονίδιο *MLL*, εδράζεται στην 11q23 χρωμοσωμική περιοχή και ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων *homeobox (HOX)*, τα οποία λειτουργούν ως ενεργοποιητές της μεταγραφής. Η διαταραχή της έκφρασης τους έχει καθοριστική επίδραση στα αιμοποιητικά κύτταρα. Η *MLL* πρωτεΐνη προσδένεται στη χρωματίνη αλλάζοντας τη δομή της με αποτέλεσμα τη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων-στόχων. Μελέτες έχουν δείξει ότι το γονίδιο *MLL* είναι το πιο συχνά εμπλεκόμενο γονίδιο σε χρωμοσωμικές μεταθέσεις που σχετίζονται με λευχαιμίες. Έχουν περιγραφεί έως σήμερα, περισσότερα από 80 διαφορετικά γονίδια που συμμετέχουν στη δημιουργία υβριδικών γονιδίων με το *MLL* (εικόνα 12).

Αναδιατάξεις της χρωμοσωματικής περιοχής 11q23, έχουν παρατηρηθεί τόσο σε *de novo* όσο και σε *s-OML* μετά από χημειοθεραπεία, κυρίως μετά από τη χορήγηση αναστολέων της τροποϊσομεράσης II (Zatkona A. et al., 2009). Οι αναδιατάξεις αυτές μπορούν να παρατηρηθούν σε όλους τους υποτύπους κατά FAB. Συνήθως σε ποσοστό 30-45% παρατηρούνται στους M5 και M4 υποτύπους, ενώ σε μικρότερο ποσοστό (~10%) σε όλους τους υπόλοιπους. Ασθενείς με ΟΜΛ που παρουσιάζουν αναδιατάξεις της περιοχής 11q23 παρουσιάζουν δυσμενή πρόγνωση εκτός από τους ασθενείς με την ειδική αλλοίωση $t(9;11)(p21;23)$ που παρουσιάζουν ενδιάμεση πρόγνωση.



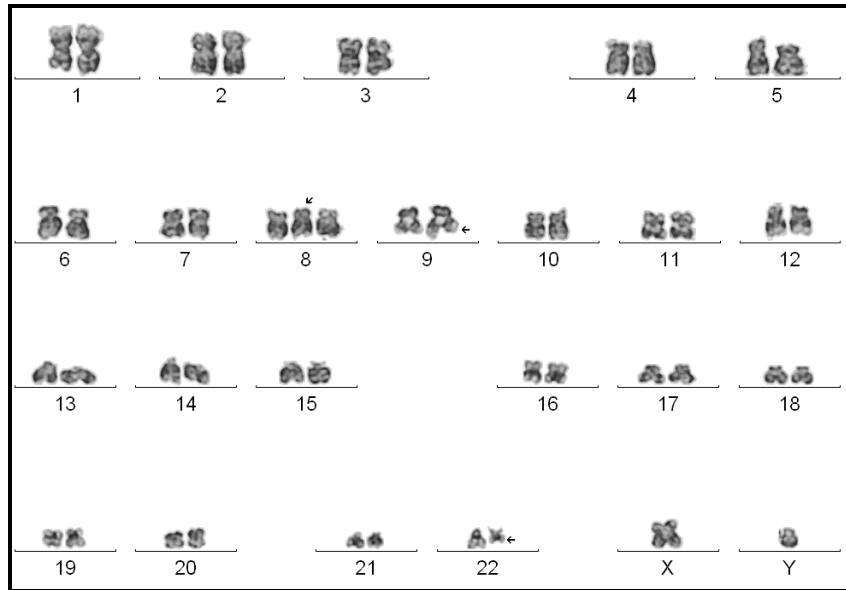
MLL and partners - 73 recurrent translocations and 54 partner genes. Editor: 06/2000; last update 10/2007

Εικόνα 12. Περισσότερα από 80 διαφορετικά γονίδια συμμετέχουν στη δημιουργία υβριδικών γονιδίων με το MLL

t(9;22)(q34;q11)

Εκτός από τις περιπτώσεις ΧΜΛ αλλά και των ενήλικων σθενών με ΟΛΛ, το χρωμόσωμα Φιλαδέλφεια που είναι αποτέλεσμα της μετάθεσης t(9;22)(q34;q11.2) (εικόνα 13), παρατηρείται και στο 2% όλων των αλλοιωμένων καρυοτύπων σε περιπτώσεις ΟΜΛ. Ως μεμονωμένη αλλοίωση παρατηρείται στο 40% των ασθενών αυτών, ενώ το ποσοστό αυξάνεται όταν υπάρχουν δευτερογενείς αλλοιώσεις όπως +8, -7, +19 και der(22)t(9;22). Οι περισσότερες περιπτώσεις ΟΜΛ με t(9;22) ταξινομούνται ως M1 ή M2 κατά FAB ενώ λιγότερο συχνά παρατηρούνται σε περιπτώσεις M0, M4 και M7.

Ασθενείς με ΟΜΛ, θετικοί για την αντιμετάθεση t(9;22)(q34;q11.2), εμφανίζουν φτωχή απόκριση στη χημειοθεραπεία και χαμηλό ποσοστό επιβίωσης (Bloomfield CD. et al. 1977). Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σχετικά με την πρόγνωση των συγκεκριμένων ασθενών με ΟΜΛ, αναφέρουν ότι σε ασθενείς με t(9;22) σπάνια επιτυγχάνεται πλήρης ίαση μετά από συμβατική χημειοθεραπεία και η αλλοίωση t(9;22) κατατάσσεται στην ομάδα ανωμαλιών με κακή πρόγνωση (Soupir CP. et al. 2007).



Εικόνα 13. Καρυότυπος με G ζωνοποίηση: 47,XY,+8,t(9;22)(q34;q11.2)

A4 Μοριακή Κυτταρογενετική στην ΟΜΛ

Η πρόοδος της κυτταρογενετικής στην ΟΜΛ στηρίζεται όχι μόνο σε μεθόδους κλασσικής κυτταρογενετικής, αλλά και στις μεθόδους της μοριακής κυτταρογενετικής, με κυρίαρχη την τεχνική του φθορίζοντος *in situ* υβριδισμού (Fluorescence *in situ* Hybridization, FISH). Αρκετές μελέτες έχουν αναδείξει τη χρησιμότητα των τεχνικών της μοριακής κυτταρογενετικής, όπως είναι η ανάλυση FISH με ειδικούς κεντρομεριδιακούς ανιχνευτές (centromeric probes) ή ανιχνευτές ειδικών χρωμοσωμικών περιοχών (locus-specific probes), η τεχνική της φασματικής καρυοτυπίας (Spectral Karyotyping, SKY) και η τεχνική του πολυχρωματικού FISH (M-FISH), για την ακριβέστερη ανίχνευση χρωμοσωματικών αλλοιώσεων.

Η ανάλυση FISH χρησιμοποιείται ως συμπληρωματική του συμβατικού καρυοτύπου για την ακριβέστερη διάγνωση και λεπτομερέστερη παρακολούθηση των ασθενών με λευχαιμία και παρέχει πρόσθετες ιδιαίτερες χρήσιμες πληροφορίες σε σημαντικό ποσοστό των περιστατικών, ιδίως για (α) την ανίχνευση υπομικροσκοπικών αλλοιώσεων, (β) την ανίχνευση χρωμοσωματικών αλλοιώσεων σε περιπτώσεις που δεν υπάρχουν μεταφάσεις ή οι μεταφάσεις έχουν κακή ποιότητα και (γ) τον λεπτομερέστερο χαρακτηρισμό σύνθετων αλλοιώσεων.

Ιδιαίτερα χρήσιμη είναι η FISH στην ΟΜΛ για την ταυτοποίηση του *inv(16)/t(16;16)* καθώς και για τις αναδιατάξεις του *MLL* γονιδίου. Δεδομένου

λοιπόν, ότι η FISH χρησιμοποιείται στοχευμένα για συγκεκριμένες αλλοιώσεις και κυρίως υπομικροσκοπικές αλλοιώσεις ενώ η ανάλυση καρυότυπου αποκαλύπτει χρωμοσωματικές αλλοιώσεις σε όλο το γονιδίωμα, είναι φανερό ότι οι μέθοδοι της κλασσικής και της μοριακής κυτταρογενετικής πρέπει να χρησιμοποιούνται συνδυαστικά.

A5 Μοριακές αλλαγές στην ΟΜΛ

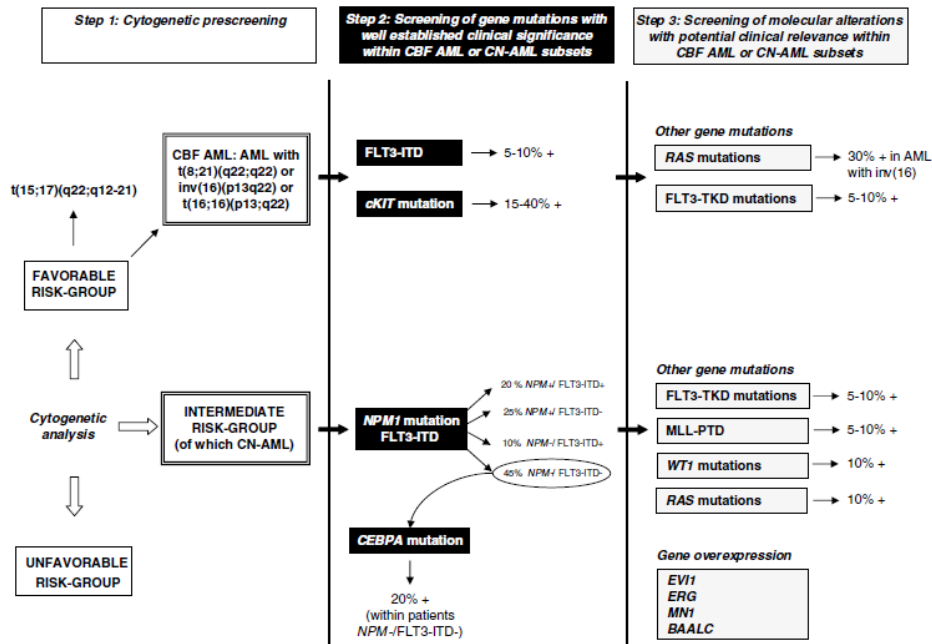
Η πολυσταδιακή πορεία της ΟΜΛ αντανακλά τη συσσώρευση κυτταρικών και μοριακών βλαβών κατά την ανάπτυξη και την εξέλιξη της νόσου. Σύμφωνα με το μοντέλο Knudson που αναφέρεται και ως θεωρία των «δύο χτυπημάτων», απαιτούνται δύο τουλάχιστον «χτυπήματα» για την ανάπτυξη καρκίνου. Το μοντέλο αυτό στηρίζεται σε παρατηρήσεις κληρονομικών μορφών καρκίνου, και αναφέρει ότι η απώλεια ή η αδρανοποίηση του ενός αλληλομόρφου σπανίως είναι αρκετή ώστε να αναπτυχθούν όγκοι ή να επεκταθεί ένας αλλοιωμένος κλώνος, ενώ η απώλεια και του άλλου αλληλομόρφου ή επιπρόσθετες μεταβολές είναι αναγκαίες για την διεισδυτικότητα των κυτταρικών κλώνων (Knudson AG. 1996). Σύμφωνα με το μοντέλο Knudson σχετικά με την ανάπτυξη και την εξέλιξη της ΟΜΛ, η αρχική γενετική αλλαγή μπορεί να προκληθεί από χημικά, έκθεση σε ακτινοβολία, κυτταροτοξικά φάρμακα ή τυχαίες ενδογενείς μεταλλάξεις. Η συσσώρευση αρκετών αλλαγών που επηρεάζουν τον κυτταρικό κύκλο ή τη μεταγραφή ογκοκατασταλτικών γονιδίων έχει ως αποτέλεσμα την επέκταση του κλώνου και σε άλλα κύτταρα, τα οποία παρουσιάζουν αυξημένη απόπτωση και μειωμένη διαφοροποίηση. Η εξέλιξη σε ΟΜΛ δεν εξαρτάται από τη σειρά με την οποία συμβαίνουν οι γενετικές αλλαγές αλλά κυρίως από τα γονίδια τα οποία πλήττονται. Το τελικό βήμα προς την ΟΜΛ μπορεί να ενδυναμωθεί από επιπρόσθετες μεταλλάξεις σε πρωτοογκογονίδια, ογκοκατασταλτικά γονίδια ή/και από υπερμεθυλίωση υποκινητών σημαντικών ρυθμιστικών γονιδίων. Το τελευταίο στάδιο σχετίζεται με μειωμένη απόπτωση και αυξημένη διαφοροποίηση.

Δεδομένου ότι η κλασσική κυτταρογενετική ανάλυση ανιχνεύει χρωμοσωματικές αλλοιώσεις μόνο στο 50% περίπου των ασθενών με ΟΜΛ, καθώς και ότι η εφαρμογή της μοριακής κυτταρογενετικής (FISH) έχει

περιορισμένη χρησιμότητα (Costa D. et al. 2010), εισηχθησαν νέες, μεγαλύτερης διακριτικής ικανότητας τεχνικές στην έρευνα για την ανάδειξη της μοριακής βάσης της ΟΜΛ. Σήμερα, αρκετές είναι οι μοριακές μεταλλάξεις που έχουν περιγραφεί και μελετούνται κυρίως σε περιπτώσεις ασθενών με ΟΜΛ και φυσιολογικό καρυότυπο. Ο φυσιολογικός καρυότυπος για την ΟΜΛ, θεωρείται ενδιάμεσης πρόγνωσης και περιλαμβάνει μια ετερογενή ομάδα ασθενών των οποίων η ολική επιβίωση στα 5 χρόνια κυμαίνεται από 24-42%. Η διαφορετική επιβίωση αυτών των ασθενών μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη επιπρόσθετων επίκτητων γενετικών και επιγενετικών αλλαγών που δεν διακρίνονται με την κυτταρογενετική ανάλυση, όπως είναι οι μεταλλάξεις γονιδίων ή υπερμεθυλίωση των υποκινητών σε συγκεκριμένα γονίδια. Οι μοριακές αλλοιώσεις μπορεί να επηρεάσουν την ανταπόκριση στη θεραπεία και την ολική επιβίωση, αλλά και να χρησιμεύσουν ως προγνωστικοί παράγοντες ή θεραπευτικοί στόχοι για νέες στοχευμένες θεραπείες. Σήμερα θεωρείται ότι ασθενείς κυρίως με φυσιολογικό καρυότυπο πρέπει να ελέγχονται μοριακά ιδιαίτερα για μεταλλάξεις των γονιδίων *FLT3*, *c-KIT*, *NPM1*, *MLL-PTD* (partial tandem duplications of *MLL*) και *CEBPA*. Οι μεταλλάξεις αυτές μέσα από μελέτες έχουν ομαδοποιηθεί σε δύο κατηγορίες :

A) Σημειακές μεταλλάξεις τύπου I (*FLT3/ITD*, *FLT3/TKD*, *KIT*, *RAS*, *PTPN11*, *JAK2*). Προσφέρουν πολλαπλασιαστικό πλεονέκτημα ή πλεονέκτημα επιβίωσης στα κύτταρα και προκαλούν διαταραχές μεταβίβασης σήματος (Σταυρογιάννη Ν. 2007).

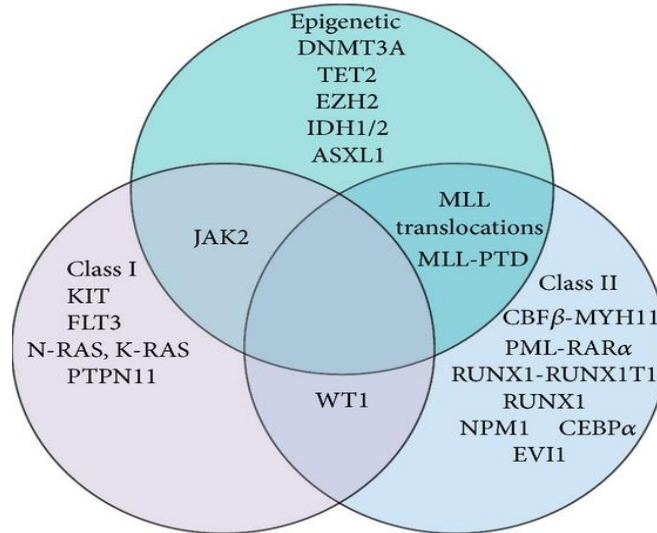
B) Μεταλλάξεις μεταγραφικών παραγόντων τύπου II (*PML/RARA*, *RUNX1/RUNX1T1*, *CBFB/MYH11*, *MLL fusions*, *CEBPA*, *NPM1*). Επηρεάζουν τη διαφοροποίηση και προσδίδουν την ιδιότητα της αυτοανανέωσης στα κύτταρα (εικόνα 14).



Εικόνα 14. Μοριακό μοντέλο για ασθενείς με ΟΜΛ (Pangiotou JP. et al., 2000)

Και οι δύο τύποι μεταλλάξεων συμβάλλουν στην ανάπτυξη σε ΟΜΛ. Μεταλλάξεις της ίδιας κατηγορίας σπάνια συμβαίνουν στον ίδιο ασθενή, ενώ συχνά συνυπάρχουν μεταλλάξεις των δύο διαφορετικών ομάδων (Σταυρογιάννη Ν., 2007). Οι μεταλλάξεις τύπου I ανιχνεύονται στο 50% των περιπτώσεων με ΟΜΛ. Συγκεκριμένα, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο *KIT* βρίσκονται στο 12-47% των ασθενών με t(8;21) και σχετίζονται με κακή πρόγνωση, και στο 22-38% με inv(16)(p13.1q22)/t(16;16)(p13.1;q22). Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *FLT-3* ανιχνεύονται σε ποσοστό 20-38% των περιπτώσεων ΟΜΛ. Οι μεταλλάξεις *FLT3-ITD* και *FLT3-TKD* βρίσκονται στο 2-9% και στο 2-7% των ασθενών με t(8;21) αντίστοιχα, καθώς επίσης στο 0-7% και στο 6-24% σε ασθενείς με inv(16). Μεταλλάξεις *FLT-3* έχουν επίσης παρατηρηθεί στο 35-45% των περιπτώσεων ΟΜΛ-M3 (O'Connor HE., 1998). Στις μεταλλάξεις τύπου II συμπεριλαμβάνεται η *CBF* (Core-binding factor) ΟΜΛ η οποία χαρακτηρίζεται από την παρουσία των αλλοιώσεων t(8;21)(q22;q22), και inv(16)(p13.1q22)/t(16;16)(p13.1;q22) που οδηγούν στη δημιουργία των υβριδικών γονιδίων *RUNX1-RUNX1T1* και *CBFB-MYH11* αντιστοίχως. Η ΟΜΛ με inv(16)(p13.1q22) ή t(16;16)(p13.1;q22), συναντάται στο 5-10% των ασθενών με ΟΜΛ και κυρίως σε νεότερες ηλικίες. Η ανίχνευσή της με

κλασική κυτταρογενετική είναι πολλές φορές δύσκολη και χρειάζεται FISH ή RT-PCR για την ταυτοποίησή ή την επιβεβαίωσή της. Παρακάτω, περιγράφονται συνοπτικά οι σημαντικότερες μοριακές αλλαγές στην ΟΜΛ (εικόνα 15).



Εικόνα 15. Διάγραμμα βασικότερων μοριακών μεταλλάξεων στην ΟΜΛ

A5.1 Προγνωστικοί παράγοντες στην ΟΜΛ

Οι κυτταρογενετικές αλλοιώσεις θεωρούνται σήμερα ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης για την ΟΜΛ, παρόλα αυτά υπάρχουν και άλλοι προγνωστικοί παράγοντες, όπως η ηλικία του ασθενούς, ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων, η προϋπαρξη ΜΔΣ ή τοξικής θεραπείας, η παρουσία ίνωσης κλπ (Sekeres MA. et al., 2004). Στον πίνακα 5 παρουσιάζονται οι προγνωστικοί παράγοντες της ΟΜΛ που παρουσιάζουν δυσμενείς

Προγνωστικοί παράγοντες της ΟΜΛ	Δυσμενής επίπτωση
---------------------------------	-------------------

επιπτώσεις. Πρόσφατες μελέτες έχουν διερευνήσει τη σχετική συμβολή των μοριακών αλλαγών στην πρόγνωση των ασθενών. Οι μοριακές μεταλλάξεις αποτελούν ισχυρό προγνωστικό δείκτη, σήμερα, ενώ η μελέτη του μοριακού προφίλ των γονιδίων NPM1, FLT3, and CEBPA έχει ενσωματωθεί στη πρακτική ρουτίνας (Dohner et al. 2017).

Ηλικία	>60 ετών
Αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων	>10x10 ⁹ /l
Καρυότυπος	del(5q), -5, del(7q), -7, inv(3q)/t(3;3), αναδιατάξεις του 11q23 [εκτός της t(9;11)], t(6;9)(p23;q34), del(17p) σύνθετοι καρυότυποι
Αιτιολογία	Δευτεροπαθής ή σχετιζόμενη με χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία
Ίνωση	παρούσα
Μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα γονίδια	FLT3, c-KIT, BAALC και ERG

Πίνακας 5. Προγνωστικοί παράγοντες ΟΜΛ

Κατά την εξέλιξη της νόσου εμφανίζονται βαριές λοιμώξεις και αιμορραγίες. Οι λοιμώξεις είναι κατά βάση βακτηριακές, μπορεί να προκαλέσουν προβλήματα στη σωστή λειτουργία των πνευμόνων αλλά και πυρετό, ενώ συχνά παρουσιάζεται και σηψαιμία. Οι αιμορραγίες είναι συνήθως δερματικές, ενίοτε όμως αιμορραγεί το πεπτικό ή το γεννητικό σύστημα και σπανιότερα το ουροποιητικό ή το αναπνευστικό. Οι ασθενείς με ΟΜΛ καταλήγουν μετά από λοιμώξεις και αιμορραγίες, σε περιόδους που εμφανίζονται σοβαρές κυτταροπενίες, λόγω της χημειοθεραπείας, σε συνδυασμό πολλές φορές με την παρουσία ανθεκτικής νόσου. Σπανιότερες αιτίες θανάτου είναι οι ανεπιθύμητες ενέργειες της θεραπείας, όπως ασθενών που έχουν υποβληθεί σε αλλογενή μεταμόσχευση προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων (Bradstock K. et al. 1994).

A5.2 Αλλαγές μεταγωγής σήματος και μεταγραφικών παραγόντων

A5.2.1 Μεταλλάξεις του γονιδίου FLT3

Το γονίδιο *FLT3* εδράζεται στη χρωμοσωματική περιοχή 13q12 και είναι το γονίδιο που μεταλλάσσεται πιο συχνά στην ΟΜΛ, με συχνότητα εμφάνισης μεταλλαγών 35%. Το γονίδιο *FLT3* κωδικοποιεί τον υποδοχέα τυροσινικής κινάσης τύπου III, ο οποίος εκφράζεται σε ανώριμα αιμοποιητικά κύτταρα και είναι απαραίτητος για την αύξηση και διαφοροποίηση των προγονικών κυττάρων. Ο προσδέτης FL (*FLT3* Ligand) του *FLT3* είναι μια πρωτεΐνη η οποία κατά τη σύνδεσή της προκαλεί τον διμερισμό του υποδοχέα. Ο διμερισμός του υποδοχέα *FLT3* οδηγεί στην αυτοφωσφορυλίωση

ενδοκυτταρικών αμινοξέων τυροσίνης, με αποτέλεσμα να επάγεται ένας καταρράκτης αντιδράσεων κυτταρικής σηματοδότησης. Ο ενεργοποιημένος *FLT3*, μαζί με αυξητικούς αιμοποιητικούς παράγοντες προάγει τον πολλαπλασιασμό των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων (Gilliland DG. and Griffin JD. 2002).

Μέχρι τώρα έχουν αναγνωριστεί δύο τύποι μεταλλάξεων που σχετίζονται με το γονίδιο *FLT3*. Ο πρώτος τύπος αφορά στο διαδοχικό διπλασιασμό αλληλουχιών (Internal Tandem Duplications, ITDs), που βρίσκονται ανάμεσα στα εξόνια 11 και 12 και έχουν μήκος 3-40bp. Ο δεύτερος τύπος μεταλλάξεων αφορά σημειακές μεταλλάξεις που συμβαίνουν στον ενεργό βρόγχο του *FLT3*. Ο ενεργός βρόγχος υπό φυσιολογικές συνθήκες εμποδίζει την πρόσβαση του ATP και του υποστρώματος στην περιοχή της κινάσης, έως ότου συνδεθεί ο προσδέτης στον υποδοχέα και προκύψει η φωσφορυλίωση. Η αντικατάσταση της ασπαραγίνης στη θέση 835 από τυροσίνη (Asp835Tyr) είναι η πιο συχνή σημειακή μετάλλαξη του ενεργού βρόγχου και οδηγεί στη συνεχή ενεργοποίηση του υποδοχέα *FLT3* (*FLT3-TKD*) (Gilliland DG. and Griffin JD., 2002). Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό πιθανό να εμφανίζονται σε όλους τους υποτύπους της ΟΜΛ (20-40%) αλλά κυρίως συνάδουν με τις αλλοιώσεις t(6;9), t(15;17) αλλά και με φυσιολογικό καρυότυπο. Το 75-80% των περιπτώσεων εμφανίζουν την μετάλλαξη *FLT3-ITD* η οποία θεωρείται κακής πρόγνωσης ενώ το 20-35% εμφανίζουν τη μετάλλαξη *FLT3-TKD* η πρόγνωση της οποίας είναι αμφιλεγόμενη (Thiede C. et al. 2002).

A5.2.2 Μεταλλάξεις του γονιδίου *NPM1*

Το γονίδιο της νουκλεοφωσμίνης τύπου 1 (*NPM1*) εδράζεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 5 (5q35) και έχει κύριο ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Οι μεταλλάξεις του *NPM1* γονιδίου ανιχνεύονται στο 50% περίπου των ενηλίκων ασθενών με ΟΜΛ και φυσιολογικό καρυότυπο (CN-AML) και στο 35% περίπου του συνόλου των περιπτώσεων ΟΜΛ, ενώ είναι σπανιότερες στην παιδική ΟΜΛ (<10%) (Chou WC. et al., 2007; Dvorakova D. et al. 2009).

Οι μεταλλάξεις στο *NPM1* γονίδιο είναι σημαντικά συσχετισμένες με την ηλικία, με υψηλό αριθμό λευκοκυττάρων του αίματος και την παρουσία των

FLT3-ITD μεταλλάξεων. Όταν συνυπάρχουν οι δυο αυτές μεταλλάξεις η πρόγνωση είναι ενδιάμεση, ενώ απουσία της *FLT3-ITD* μετάλλαξης η πρόγνωση είναι καλή, κυρίως στους ηλικιωμένους άνω των 70 ετών. Επίσης συσχετίζονται αρνητικά με την εμφάνιση των αλλοιώσεων *inv(16)*, *t(8;21)* και *t(15;17)* καθώς και με μεταλλάξεις στα γονίδια *CEBPA* και *RAS* (Falini B. et al. 2010).

A5.2.3 Μεταλλάξεις του γονιδίου *CEBPA*

Το γονίδιο *CEBPA* εδράζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 19q13.1 και κωδικοποιεί την ομώνυμη πρωτεΐνη με δραστικότητα μεταγραφικού παράγοντα, η οποία έχει σημαντική συμβολή στη διαφοροποίηση της μυελικής σειράς. Οι μεταλλάξεις στο συγκεκριμένο γονίδιο οδηγούν σε διαταραχή της λειτουργικότητας του *CEBPA* μεταγραφικού παράγοντα, με συνέπεια την αναστολή διαφοροποίησης της μυελικής σειράς. Συνήθως (>90% των περιπτώσεων) πρόκειται για προσθήκες ή ελλείψεις μικρού αριθμού βάσεων. Το ποσοστό των *CEBPA* μεταλλάξεων στο σύνολο των περιπτώσεων με ΟΜΛ κυμαίνεται στο 10%, ενώ το 15% από αυτές αφορούν ενήλικους ασθενείς με φυσιολογικό καρυότυπο (Smith LL. et al. 2006). Ασθενείς με ΟΜΛ που φέρουν μεταλλάξεις στο *CEBPA* σχετίζονται με καλή πρόγνωση ενώ η πρόγνωση είναι ακόμα καλύτερη όταν οι μεταλλάξεις αυτές είναι διαλληλικές (~7%) (Li HY. et al. 2015; Pabst T. et al. 2001; Taskesen E. et al. 2011).

A5.2.4 Αλλαγές στο σηματοδοτικό μονοπάτι *RAS*

Η υποοικογένεια *RAS* αποτελείται κυρίως από τα γονίδια *H-*, *N-* και *K-RAS*. Μεταλλάξεις του γονιδίου *N-RAS*, κατά κύριο λόγο στα κωδικόνια 12, 13 και 61, και λιγότερο συχνά μεταλλάξεις του γονιδίου *K-RAS*, στα κωδικόνια 12 και 61, έχουν βρεθεί στο 15-25% των ΟΜΛ περιπτώσεων. Οι μεταλλάξεις αυτές έχουν συσχετιστεί με την παρουσία των αλλοιώσεων *inv(3)* και *inv(16)* ενώ η προγνωστική τους αξία παραμένει άγνωστη. Επιπλέον οι μεταλλάξεις των γονιδίων *RAS* έχουν συσχετιστεί με την εκτροπή των ΜΔΣ σε ΟΜΛ (Bacher U. et al. 2007; Padua RA. & West RR. 2000).

A5.2.5 Μεταλλάξεις του γονιδίου BAALC

Το γονίδιο *BAALC* εδράζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 8q22.3 και διαδραματίζει καίριο ρόλο στη λευχαιμογένεση δεδομένου ότι συμμετέχει στο μονοπάτι διαφοροποίησης των αιμοποιητικών αρχέγονων κυττάρων. Έχει προταθεί ως παράγοντας πρόβλεψης της κλινικής έκβασης ασθενών με ΟΜΛ. Οι ασθενείς με υψηλό δείκτη έκφρασης της *BAALC* πρωτεΐνης φαίνεται να έχουν μικρότερο προσδόκιμο ζωής, με μέσο όρο τα 1.7 έτη έναντι των 5.8 ετών απουσία υπερέκφρασης. Γενικότερα η υπερέκφραση του *BAALC* αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα κακής πρόγνωσης κυρίως σε ασθενείς με ΟΜΛ και φυσιολογικό καρυότυπο (Aref S. et al. 2015).

A5.2.6 Μεταλλάξεις του γονιδίου WT1

Το γονίδιο *Wilms Tumor 1 (WT1)* εδράζεται στη χρωμοσωματική περιοχή 11p13 και κωδικοποιεί ένα παράγοντα μεταγραφής που παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση (Sugiyama H. 2001). Το γονίδιο *WT1* εκφράζεται σε υψηλό βαθμό στην πλειοψηφία των περιπτώσεων ΟΜΛ και ΟΛΛ. Σήμερα, θεωρείται ότι έχει ογκογόνο ρόλο στην λευχαιμογένεση και ογκογένεση (Di Stasi A. et al. 2015). Έρευνες έχουν δείξει ότι η υπερέκφραση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου μπορεί να θεωρηθεί δείκτης κακής πρόγνωσης σε ασθενείς ΟΜΛ και φυσιολογικό καρυότυπο, αν και η πραγματική προγνωστική αξία αυτού του δείκτη είναι ακόμα ασαφής. Η μετάλλαξη του γονιδίου αυτού σχετίζεται με τον υπότυπο M6 της ΟΜΛ και την ειδική αλλοίωση t(7;11)(p15;p15) (Hou HA. et al. 2010).

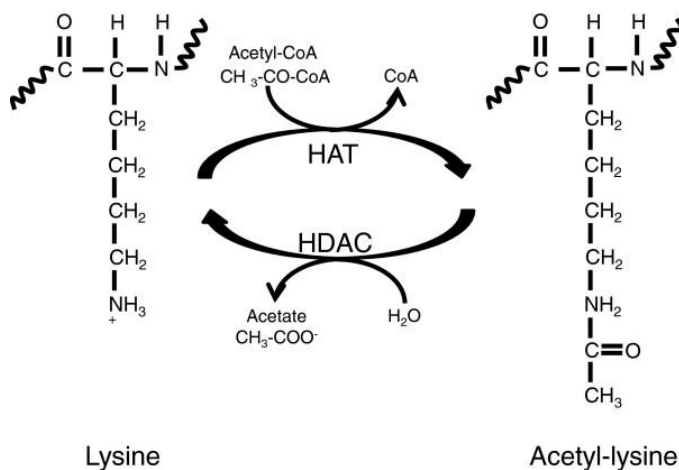
A5.2.7 Μεταλλάξεις των γονιδίων IDH1-IDH2

Το γονίδιο *IDH1* εδράζεται στη χρωμοσωματική περιοχή 2q33.3, ενώ το γονίδιο *IDH2* στη χρωμοσωμική περιοχή 15q26.1. Τα δύο αυτά γονίδια εμπλέκονται στην άμυνα του κυττάρου έναντι του οξειδωτικού στρες. Μεταλλάξεις των γονιδίων παρατηρούνται στο 16% των ενήλικων ασθενών με ΟΜΛ ενώ ένα ποσοστό 3% παρατηρείται στην παιδική ΟΜΛ (Shang Z. et al. 2013). Η προγνωστική αξία των μεταλλάξεων αυτών δεν έχεις πλήρως διευκρινιστεί.

A5.3 Επιγενετικές αλλαγές στην ΟΜΛ

A5.3.1 Τροποποίηση ιστονών

Η ακετυλίωση των αμινοξέων των ιστονών που καταλύεται από τις ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών (Histone acetyltransferases, HATs), οδηγεί σε αποσταθεροποίηση της σύνδεσης ιστόνης-DNA και αυτή με τη σειρά της οδηγεί σε αποδιάταξη της δομής του νουκλεοσώματος με αποτέλεσμα την έναρξη της μεταγραφής. Οι ακετυλο-ομάδες μπορούν να απομακρυνθούν από τις ιστόνες με τη βοήθεια των αποακετυλασών των ιστονών (Histone Deacetyl Transferases, HDACs), οι οποίες σταθεροποιούν τοπικά τη δομή της χρωματίνης και καθιστούν τις αλληλουχίες του υποκινητή δυσπρόσιτες, με αποτέλεσμα την αποσιώπηση της έκφρασης των γονιδίων που εδράζονται στην εν λόγω περιοχή (εικόνα 17) (Fenrick R. and Hiebert SW. 1998). Οι αναστολείς των HDAC, όπως το βαλπροϊκό οξύ (valproic acid, VPA), είναι σε θέση να προκαλέσουν διαφοροποίηση και απόπτωση των λευχαιμικών κυτταρικών σειρών *in vitro*. Δεδομένου ότι η μεθυλίωση του DNA και η ακετυλίωση των ιστονών είναι στενά συνδεδεμένες, υπάρχουν ενδείξεις ότι ο συνδυασμός του VPA με απομεθυλιωτικούς παράγοντες έχει επιπρόσθετα θετικά αποτελέσματα στην θεραπεία της ΟΜΛ (Baxter EJ. et al., 2005; Garcia-Manero G. et al., 2006).

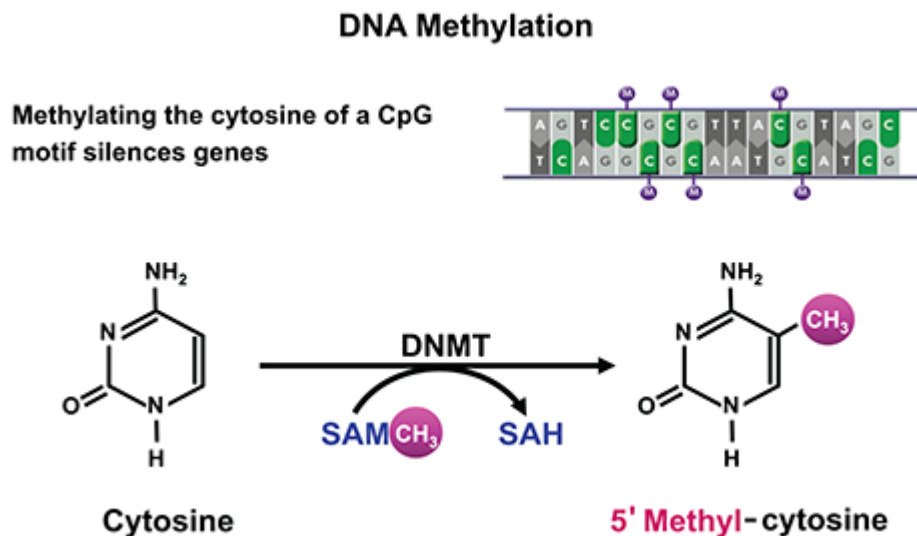


Εικόνα 17. Ακετυλίωση ιστονών. Σύμπλοκα ακετυλοτρανσφεράσης των ιστονών (HATs) καταλύουν τη μεταφορά μιας ομάδας ακετυλίου από ακετυλο-

CoA σε ε-αμινο ενός καταλοίπου λυσίνης. Απομάκρυνση μίας ακετυλομάδας από τα αμινοξέα λυσίνης σε μια πρωτεΐνη ιστόνης πραγματοποιείται από τα σύμπλοκα αποακετυλάσης των ιστονών (HDACs).

A5.3.2 Μεθυλίωση του DNA

Η μεθυλίωση του DNA είναι ένας τύπος χημικής τροποποίησης που δεν επιφέρει αλλαγή στην αλληλουχία του DNA. Περιλαμβάνει την προσθήκη μιας μεθυλομάδας στη θέση 5 του άνθρακα του δακτυλίου της κυτοσίνης με τη δράση μεθυλοτρανσφερασών (DNA methyltransferases, DNMTs). Στον ανθρώπινο οργανισμό, η μεθυλίωση του DNA καταλύεται από τα ένζυμα DNMT1, DNMT3a και DNMT3b (Bird A. 2002). Η μεθυλίωση λαμβάνει χώρα μόνο όταν η κυτοσίνη ακολουθείται από μία βάση γουανίνης, δηλαδή μόνο το δινουκλεοτίδιο CpG μπορεί να αποτελέσει θέση μεθυλίωσης. Η μεθυλίωση του DNA συμβαίνει στις νησίδες CpG οι οποίες είναι μικρά τμήματα DNA, μήκους 1-2 kb, που βρίσκονται σε περιοχές υποκινητών γονιδίων (εικόνα 16). Η μεθυλίωση αυτών των περιοχών αποτελεί έναν σημαντικό επιγενετικό μηχανισμό ελέγχου της μεταγραφής. Ο μηχανισμός αυτός συχνά απορρυθμίζεται στον καρκίνο καθώς παίζει κρίσιμο ρόλο στην μεταγραφική αποσιώπηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων (Herman JG. and Baylin SB., 2003), την επιδιόρθωση του DNA, τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, την απόπτωση και την αποτοξικοποίηση.



Εικόνα 16. Η μεθυλίωση του DNA συμβαίνει στις νησίδες CpG που βρίσκονται σε περιοχές υποκινητών γονιδίων και περιλαμβάνει την προσθήκη μιας

μεθυλομάδας στη θέση 5 του άνθρακα του δακτυλίου της κυτοσίνης με τη δράση μεθυλοτρανσφερασών (*DNA methyltransferases, DNMTs*).

Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι η υπερμεθυλίωση των υποκινητών συγκεκριμένων γονιδίων όπως των ογκοκατασταλτικών, διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην αποσιώπηση αυτών των γονιδίων και θα μπορούσε να παρέχει επιπρόσθετες πληροφορίες σχετικά με το κίνδυνο ανάπτυξης της ΟΜΛ και την κλινική πορεία των ασθενών (Toyota M. et al. 2001; Kroeger H. et al. 2008; Bullinger L. et al. 2010; Figueroa ME. et al., 2010; Shen L. et al. 2010). Οι περιορισμένες μελέτες μεθυλίωσης που έχουν πραγματοποιηθεί στην ΟΜΛ έχουν συνδέσει την υπερμεθυλίωση ογκοκατασταλτικών γονιδίων γενικά με κακή πρόγνωση. Επίσης η προγνωστική αξία της μεθυλίωσης δεν έχει συνεκτιμηθεί με τις κυτταρογενετικές αλλοιώσεις, ενώ πιστεύεται ότι θα αποτελέσει στο μέλλον ισχυρό προγνωστικό εργαλείο στην κλινική πράξη (Figueroa ME. et al. 2010). Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει το γεγονός ότι μελέτες έχουν δείξει ότι ασθενείς με ΟΜΛ που φέρουν συγκεκριμένες γενετικές μεταλλάξεις, όπως τα υβριδικά γονίδια *PML-RARα* και *AML1-ETO* ή μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα γονίδια όπως τα γονίδια *TET2* και *DMT3A* παρουσιάζουν υψηλό ποσοστό μεθυλίωσης (Schoofs T. et al. 2014).

Η μεθυλίωση του DNA φαίνεται να διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην εμφάνιση και εξέλιξη της ΟΜΛ καθώς και ανάπτυξη δευτεροπαθούς ΟΜΛ. Σε αντίθεση με τη δημιουργία μεταλλάξεων, η αποσιώπηση των γονιδίων μέσω μεθυλίωσης του DNA είναι αναστρέψιμη διαδικασία. Το γεγονός αυτό χρησιμοποιείται στην προσπάθεια θεραπευτικής αντιμετώπισης περιπτώσεων με ΟΜΛ, με την εισαγωγή απομεθυλιωτικών παραγόντων, όπως είναι οι 5-αζακετιδίνη και 5-αζα-2'-δεοξυκυτιδίνη, με ενθαρρυντικά αποτελέσματα στη βελτίωση της αιμοποίησης και την παράταση του χρόνου επιβίωσης των ασθενών (Daskalakis M. et al. 2002; Fenaux P. et al. 2009; Silverman LR. et al. 2002).

Μεταλλάξεις απαντώνται σε γονίδια που μετέχουν στη μεθυλίωση των ιστονών πρωτεϊνών. Η μεθυλίωση των μορίων λυσίνης και αργινίνης σε ιστόνες και μη ιστόνες πρωτεΐνες ρυθμίζει τη δομή της χρωματίνης και κατ'

επέκταση τη γονιδιακή έκφραση. Τα στοιχεία Polycomb (PcG), που απαρτίζονται από ομάδες πρωτεϊνών καταστολέων, ρυθμίζουν την προσβασιμότητα των ρυθμιστικών περιοχών των γονιδίων, στο μεταγραφικό μηχανισμό. Η πρωτεΐνη EZH2, σε συνδυασμό με τις SUZ12 και EED, καθώς και με τους συμπαράγοντες RBBP4, BBP7 και AEBP2, απαρτίζουν από κοινού το κατασταλτικό σύμπλοκο polycomb(PRC2), που μεθυλιώνει την ιστόνη H3 στα μόρια λυσίνης και (H3K και H3K27). Η τριπλή μεθυλίωση των συγκεκριμένων ιστονών πρωτεϊνών (H3K9me3,H3K27me3) αποτελεί σημάδι μεταγραφικής καταστολής γονιδίων που παίζουν ρόλο στη δέσμευση των στελεχιαίων κυττάρων, καθώς και την αυτοανανέωσή τους. Μεταλλάξεις που οδηγούν σε απώλεια λειτουργικότητας έχουν αναφερθεί στο γονίδιο *EZH2*, και λιγότερο στα γονίδια *SUZ12*, *EED* και *JARID2*. Επιπλέον το *PRC2* υποβοηθά την πρόσδεση των στοιχείων που απαρτίζουν τις DNMTs, στα γονίδια που πρόκειται να κατασταλούν (Pardanani et al. 2006; Ernst et al. 2010; Guglielmelli et al. 2011).

A5.3.2.1 Μεταλλάξεις στο γονίδιο ASXL1

Μεταλλάξεις έχουν περιγραφεί και στο γονίδιο *ASXL1*, που αποτελεί μέλος των στοιχείων PcG (Score et al. 2012). Η πρωτεΐνη *ASXL1* σχετίζεται με τη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που μετέχουν στην ανάπτυξη, μέσω αναδιαμόρφωσης της δομής της χρωματίνης. Επιπλέον, τα γονίδια που ρυθμίζονται από το *ASXL1*, συμμετέχουν στην καταστολή της έκφρασης των υποδοχέων του ρετινοϊκού οξέος (retinoic acid receptors, RARs) και αλληλεπιδρούν με τους γαμα ενεργοποιημένους υποδοχείς πολλαπλασιασμού των υπεροξισωμάτων (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPARG), προς καταστολή της λιπογένεσης. Η πρωτεΐνη *ASXL1* εκφράζεται στα περισσότερα αιμοποιητικά κύτταρα, όμως η πλήρης λειτουργία της παραμένει αδιευκρίνιστη. Ωστόσο, πρόσφατα πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι η απώλεια της λειτουργίας της έχει ως αποτέλεσμα απώλεια της σήμανσης H3K27me3 σε υποκινητές γονιδίων του κυττάρου. Τέλος, αποτελεί μη καταλυτικό στοιχείο του συμπλόκου PR-DUB που συμμετέχει στην απο-ουβικιουτίνωση της λυσίνης 119 της ιστόνης H2A (H2AK119ub1) (Abdel-Wahab et al., 2012).

Το γονίδιο *ASXL1* εδράζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 20q11 και η κωδικοποιούσα πρωτεΐνη ανήκει στο σύμπλεγμα πρωτεϊνών Polycomb. Το γονίδιο *ASXL1* θεωρείται ογκοκατασταλτικό και κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη που προσδένεται στο DNA και ενεργοποιεί ή αδρανοποιεί τη μεταγραφή σημαντικών γονιδίων μέσω τροποποίησης της δομής της χρωματίνης (Metzeler et al, 2011).

Μεταλλάξεις σε κωδικοποιούσες περιοχές του γονιδίου έχουν σαν αποτέλεσμα την απώλεια της ρυθμιστικής λειτουργίας του *ASXL1*, είναι κατά βάση ετερόζυγες (μεταλλάξεις μετατόπισης πλαισίου και μεταλλάξεις χωρίς νόημα) και εντοπίζονται κυρίως στο εξόνιο 12. Οι σωματικές μεταλλάξεις του γονιδίου *ASXL1* βρέθηκαν σε αρκετές μυελογενείς κακοηθείες, συμπεριλαμβανομένης της χρόνιας μυελομονοκυτταρικής λευχαιμίας (CMML, 45%), των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων (MDS, 16%), της μυελοϊνώσεως (35%) και της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας (30% δευτεροπαθή ΟΜΛ και 6,5% πρωτοπαθή ΟΜΛ) (Pashca et al., 2015). Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *ASXL1* θεωρούνται πρώιμα γεγονότα στη λευχαιμογένεση και έχουν συσχετιστεί με κακή πρόγνωση (Döhner et al., 2016). Ωστόσο η προγνωστική αξία των παραπάνω μεταλλάξεων σε συσδιασμό με τη παρουσία χρωμοσωμικών αλλοιώσεων δεν έχει ακόμη πλήρως διευκρινισθεί και δεν έχουν ενσωματωθεί στο διαγνωστικό έλεγχο των ασθενών.

A6 Αιτιολογία & παθογένεση της ΟΜΛ

Οι αιτιολογικοί παράγοντες ανάπτυξης της ΟΜΛ δεν έχουν πλήρως αποσαφηνιστεί. Ωστόσο στην πολυσταδιακή πορεία της νόσου, έρευνες έχουν δείξει ότι πιθανόν να εμπλέκονται κληρονομικοί, γενετικοί, επιγενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες. Στον πίνακα 7 συνοψίζονται οι παράγοντες κινδύνου που έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση ΟΜΛ (Deschler B. and Lubbert M., 2006).

Πίνακας 6. Παράγοντες κινδύνου που συνδέονται με ΟΜΛ (Deschler B. & Lubbert M., 2006).

<u>Κληρονομικοί γενετικοί παράγοντες</u>	<p>Σύνδρομο Down</p> <p>Σύνδρομο Klinefelter</p> <p>Σύνδρομο Patau</p> <p>Σύνδρομο Shwachman</p> <p>Σύνδρομο Kostman</p> <p>Νευροϊνωμάτωση</p> <p>Αναιμία Fanconi</p> <p>Σύνδρομο Li-Fraumeni</p>
<u>Χημική έκθεση</u>	<p>Βενζόλιο</p> <p>Κάπνισμα</p> <p>Φυτοφάρμακα</p> <p>Ζιζανιοκτόνα</p>
<u>Ακτινοβολία</u> μη)	<p>Ιονίζουσα ακτινοβολία (θεραπευτική ή</p>
<u>Χημειοθεραπεία</u>	<p>Αλκυλιωτικοί παράγοντες</p> <p>Αναστολείς τοποϊσομεράσης II</p> <p>Ανθρακυκλίνες</p> <p>Ταξάνες</p>
<u>Ανοσακατασταλτική θεραπεία</u>	<p>Κορτικοστεροειδή</p> <p>Πολυκλωνικά αντισώματα</p>

Κληρονομικοί παράγοντες

Διάφορα γενετικά σύνδρομα σχετίζονται με την εμφάνιση οξείας μυελογενής λευχαιμίας. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα άτομα με σύνδρομο Down που εμφανίζουν 10 με 20 φορές υψηλότερο κίνδυνο σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό, ανάπτυξης ΟΜΛ. Στα παιδιά ηλικίας μικρότερης των 3 ετών με σύνδρομο Down η λευχαιμία που αναπτύσσεται

είναι συνήθως η ΟΜΛ-M7 σύμφωνα με τη FAB ταξινόμηση (Evans D. and Steward J., 1972). Άλλα κληρονομικά σύνδρομα που σχετίζονται με την εμφάνιση της ΟΜΛ είναι:

- i. Σύνδρομο Bloom όπου εμφανίζει ΟΜΛ σε ποσοστό 25%.
- ii. Άτομα που πάσχουν από αναιμία Fanconi εμφανίζουν ΟΜΛ σε ποσοστό 50% μέχρι την ηλικία των 40 ετών.
- iii. Η νευροϊνωμάτωση που προκαλείται από μεταλλάξεις του ογκοκατασταλτικού γονιδίου NF1, σχετίζεται με την ανάπτυξη ΟΜΛ αλλά και με την ανάπτυξη ΟΛΛ, λεμφωμάτων και μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων.
- iv. Το σύνδρομο Li-Fraumeni που προκαλείται από μεταλλάξεις του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53, σχετίζεται με την ανάπτυξη πολλών νεοπλασμάτων συμπεριλαμβανομένης και της ΟΜΛ.

Επίσης, άλλα σύνδρομα που σχετίζονται με εμφάνιση της ΟΜΛ είναι τα σύνδρομα Klinefelter, Patau, Shwachman και Kostman (Deschler B. and Lubbert M. 2006).

Περιβαλλοντικοί και χημικοί παράγοντες

Μεγάλη ποικιλία περιβαλλοντικών και χημικών παραγόντων θεωρούνται ότι είναι συνδεδεμένες με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΟΜΛ σε ενήλικες. Χρόνια έκθεση σε οργανικούς διαλύτες και παράγωγα πετρελαίου έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης οξείας λευχαιμίας και κυρίως ΟΜΛ. Το βενζόλιο είναι μία από τις καλύτερα μελετημένες ουσίες και έχει αποδειχθεί ότι έχει λευχαιμογόνο δράση. Τα άτομα που εκτίθενται σε οξειδία του αιθυλενίου, σε φυτοφάρμακα καθώς και σε ζιζανιοκτόνα, επίσης, φαίνεται να διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ΟΜΛ. Επιπλέον, το κάπνισμα φαίνεται να σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ΟΜΛ κυρίως του υπότυπου M2 ιδιαίτερα σε άτομα ηλικίας 60-75 ετών.

Η έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία συνδέεται επίσης με την ανάπτυξη της ΟΜΛ (Linnet MS., 1985). Απόδειξη αποτελούν οι παρατηρήσεις σε επιζώντες των εκρήξεων των ατομικών βομβών στο Ναγκασάκι και τη Χιροσίμα (Bizzozero O. et al., 1966). Στη Χιροσίμα υπήρξε αύξηση κατά 30 φορές των

περιπτώσεων ΟΜΛ σε χρονικό διάστημα 5 με 7 χρόνια μετά την έκθεση στην ιονίζουσα ακτινοβολία. Στο Ναγκασάκι όπου τα θύματα εκτέθηκαν σε μεγαλύτερες δόσεις ακτινοβολίας οι περιπτώσεις ΟΜΛ ήταν περισσότερες. Έρευνες επίσης έχουν δείξει αυξημένο ποσοστό ακτινολόγων με ΟΜΛ που είχαν εκτεθεί σε υψηλά επίπεδα Χ ακτινοβολίας πριν την υιοθέτηση των σύγχρονων μεθόδων ακτινοπροστασίας (Yoshinaga S. et al. 2004).

Χημειοθεραπεία - Ακτινοθεραπεία

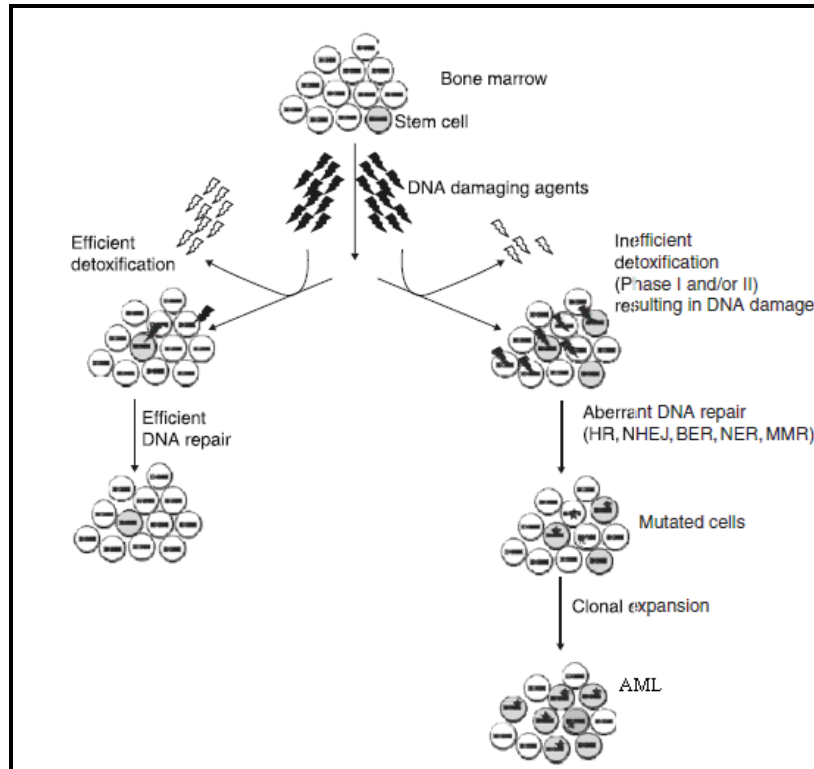
Έκθεση σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες όπως είναι οι αλκυλιωτικοί παράγοντες και οι αναστολείς της τοποϊσομεράσης II, μπορεί να αυξήσουν τον κίνδυνο εμφάνισης ΟΜΛ, ο οποίος είναι μεγαλύτερος περίπου 3-5 χρόνια μετά τη χημειοθεραπεία (Le Beau M. et al., 1986). Άλλοι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες, όπως η ποδοφιλοτοξίνη και οι ανθρακυκλίνες, έχουν επίσης συνδεθεί με την θεραπευοσχετιζόμενη λευχαιμία. Αυτές οι θεραπευοσχετιζόμενες (θεραπευο-επαγόμενες ορθότερα) λευχαιμίες σχετίζονται συχνά με συγκεκριμένες χρωμοσωμικές ανωμαλίες στα λευχαιμικά κύτταρα (Thirman et al. 1993).

Οι παράγοντες αυτοί οδηγούν σε χρωμοσωματικές αλλοιώσεις ή κακοήθεις μεταλλάξεις ενός αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου (stem cell) ή ενός σχετικά πιο διαφοροποιημένου άωρου προγονικού κυττάρου του αίματος. Οι αλλοιώσεις αυτές προσφέρουν στο λευχαιμικό κύτταρο ένα πλεονέκτημα επιβίωσης και αυτοανανέωσης σε συνδυασμό με αναστολή της διαφοροποίησής του. Έτσι, προκύπτει ένας λευχαιμικός πληθυσμός που κυριαρχεί και καταστέλλει τους φυσιολογικούς πληθυσμούς των αιμοποιητικών κυττάρων. Η αναστολή της ανάπτυξης των φυσιολογικών αιμοποιητικών κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση αναιμίας, ουδετεροπενίας και θρομβοπενίας. Τα κυριότερα συμπτώματα, εργαστηριακά ευρήματα και αίτια θανάτου των ασθενών με ΟΜΛ οφείλονται στη μεγάλη καταστολή της φυσιολογικής αιμοποίησης (Wingo PA. et al. 2003; Shipley JL. et al. 2009; Heim S. and Mitelman F. (2009); Stirewalt DL. et al. 2003).

A7 Γενετική προδιάθεση και ανάπτυξη ΟΜΛ

Τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί ιδιαίτερη έμφαση στην ανάδειξη γενετικών παραγόντων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη ΟΜΛ. Τα αποτελέσματα των σχετικών ερευνών συγκλίνουν στο ότι οι γενετικοί πολυμορφισμοί γονιδίων που εμπλέκονται στην προστασία των κυττάρων από τοξικούς παράγοντες και στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA προδιαθέτουν γενετικά τα άτομα για την ανάπτυξη ΟΜΛ (Εικόνα 18).

Αν και έχουν περιγραφεί σπάνιες οικογενείς περιπτώσεις ΟΜΛ, φαίνεται ότι αρκετές οι λευχαιμογόνες μεταλλάξεις είναι κληρονομικές. Μια σημαντική προσθήκη μετά την αναθεώρηση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ) το 2016 είναι η γενετική προδιάθεση της ΟΜΛ, η οποία περιλαμβάνει περιπτώσεις ΜΔΣ, ΜΔΣ/ΜΥΝ και Οξείες Λευχαιμίες. Η Οξείες λευχαιμίες σε αυτή την περίπτωση, αναπτύσσονται σε έδαφος μιας κληρονομικής μετάλλαξης (germ-line mutation). Η παρουσία μιας τέτοιας μετάλλαξης πρέπει να γίνει μέρος της διάγνωσης και απαιτείται ευαισθητοποίηση σχετικά με την ανάγκη εξέτασης των μελών της οικογένειας για αυτές τις κληρονομικές γενετικές εκτροπές (WHO 2016; Arber et al., 2016). Γονίδια τα οποία εμφανίζουν κληρονομικές μεταλλάξεις είναι τα : *CEBPA*, *ETV6*, *RUNX1*, *GATA2*, *TP53*, *SRP72*, *ANKRD26* και *DDX41*. Η μοριακή διαγνωστική πρέπει πάντοτε να συνοδεύεται με ένα πλήρες ατομικό και οικογενειακό ιστορικό σε στενή πάντοτε συνεργασία με ένα γενετικό σύμβουλο. Ασθενείς με υποψία γενετικής προδιάθεσης για ΟΜΛ, αρνητικοί όμως στα παραπάνω γονίδια, πρέπει να εισάγονται σε κλινικές μελέτες για την καλύτερη κατανόηση αυτής της οντότητας ασθενών.



Εικόνα 18. Πιθανός μηχανισμός γενετικής προδιάθεσης για την ανάπτυξη ΟΜΛ. Ανεπαρκής αποτοξικοποίηση έχει σαν αποτέλεσμα τη συσσώρευση βλαβών στο DNA και ακολούθως την μη αποτελεσματική επιδιόρθωση. Η γενετική αστάθεια που προκαλείται πιθανόν να οδηγήσει σε εξαλλαγή των αλλοιωμένων κυττάρων και τελικά σε ΟΜΛ.

A7.1 Μηχανισμοί αποτοξικοποίησης τοξικών παραγόντων

Για να εκδηλώσει μια ουσία την τοξική της δράση θα πρέπει η ίδια ή τα προϊόντα βιομετατροπής της να φθάσουν στα όργανα-στόχους και να παραμείνουν εκεί, σε επαρκείς συγκεντρώσεις, για ικανό χρονικό διάστημα. Η βιομετατροπή τόσο των ενδογενών όσο και εξωγενών τοξικών ουσιών συμβαίνει με τις ίδιες οδούς και χωρίζεται σε δύο φάσεις, τις φάσεις αποτοξικοποίησης I και II (detoxification phase I and II (Watson et al. 1998). Οι μηχανισμοί αποτοξικοποίησης στηρίζονται στη δράση πρωτεϊνών, προστατεύοντας το κύτταρο από βλάβες που μπορούν να προκληθούν από ενδογενείς ή εξωγενείς παράγοντες. Όταν η δράση των ενζύμων αποτοξικοποίησης είναι μη αποτελεσματική, μπορεί να προκληθεί χρωμοσωμική αστάθεια που οδηγεί σε σοβαρή βλάβη των κυτταρικών λειτουργιών και εν τέλει σε απόπτωση ή ογκογένεση. Πολυμορφισμοί που μεταβάλλουν την ενεργότητα των ενζύμων αποτοξικοποίησης είναι

πρωταρχικοί υποψήφιοι σε μελέτες που πραγματοποιούνται για τη διερεύνηση της προδιάθεσης της ΟΜΛ (Nebert DW and Dalton TP. 2006).

A7.2 Μηχανισμοί επιδιόρθωσης του DNA

Είναι γνωστό ότι το DNA υφίσταται αλλαγές από διάφορους ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες προκαλώντας βλάβες στη δομή του που μπορεί να οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο ή μεταλλάξεις (Spry M. et al. 2007). Οι ενδογενείς βλάβες που προκαλούνται κατά τη διάρκεια ενδογενών κυτταρικών διαδικασιών, όπως είναι η αντιγραφή του DNA και ο κυτταρικός μεταβολισμός, καθώς και οι εξωγενείς βλάβες που προκαλούνται από εξωγενείς παράγοντες, όπως η υπεριώδης ακτινοβολία (UV), η θερμική διάσπαση, οι τοξίνες, το κάπνισμα και τα χημικά μεταλλαξογόνα, κάνουν τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA να παίζουν πρωτεύοντα ρόλο για την επιβίωση και την ομαλή ζωή του κυττάρου. Η αποκατάσταση βλαβών του DNA είναι κρίσιμη καθώς μειωμένη επιδιόρθωση μπορεί να οδηγήσει σε γενετική αστάθεια και δημιουργία μεταλλάξεων, ενώ υπέρμετρη επιδιόρθωση μπορεί να καταστεί εξίσου επιβλαβής λόγω αναστολής του αποπτωτικού μονοπατιού και επιβίωσης του εξαλλαγμένου κυττάρου.

Είναι γνωστό ότι η συσσώρευση βλαβών στο DNA αυξάνεται όσο αυξάνεται η ηλικία, καθώς με το πέρασμα του χρόνου οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης είναι αναποτελεσματικοί οδηγώντας τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα (Hematopoietic Stem Cell, HSC) σε εξαλλαγή. Ανεπαρκής απομάκρυνση ενδογενών και εξωγενών τοξικών ουσιών οδηγεί στην αύξηση των βλαβών του DNA και σε γενετική αστάθεια των κυττάρων. Αποτυχία των μηχανισμών επιδιόρθωσης έχουν ως αποτέλεσμα τα μεταλλαγμένα κύτταρα να συνεχίσουν την ανάπτυξή τους οδηγώντας τελικά σε κακοήθεια, όπως η ΟΜΛ. Πρόσφατες μελέτες υπογραμμίζουν τη σημασία των γονιδίων που εμπλέκονται στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA για τη διατήρηση της σωστής λειτουργίας των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων (HSC) (Niedernhofer LJ. 2008).

Οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης του DNA διακρίνονται σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης θραύσης της μίας αλυσίδας του DNA (single strand breaks, SSB) και σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης θραύσεων των δύο αλυσίδων του

DNA (double strand breaks, DSB). Οι βλάβες της μίας αλυσίδας οφείλονται κυρίως στην οξείδωση και διάσπαση του δακτυλίου της δεσοξυριβόζης. Ανάμεσα στους παράγοντες που την προκαλούν περιλαμβάνονται οι ρίζες οξυγόνου, η ιονίζουσα ακτινοβολία και τα κυτταροστατικά φάρμακα. Οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης βλαβών της μίας αλυσίδας του DNA περιλαμβάνουν τους μηχανισμούς (α) διόρθωσης λανθασμένων νουκλεοτιδίων (Mismatch repair, MMR), οι οποίοι διορθώνουν σφάλματα κατά την αντιγραφή του DNA που οδηγούν στην εισαγωγή ενός ή λίγων λανθασμένων και όχι αλλοιωμένων νουκλεοτιδίων, (β) αντικατάστασης αλλοιωμένης βάσης νουκλεοτιδίου (Nucleotide Excision Repair, NER), που διορθώνουν αλλοιώσεις δύο ή περισσότερων νουκλεοτιδίων, όπως για παράδειγμα τα διμερή θυμίνης και (γ) επισκευής μέσω εκτομής βάσης νουκλεοτιδίου (Base Excision Repair, BER), που διορθώνουν αλλοιώσεις ενός μόνο νουκλεοτιδίου λόγω οξείδωσης, μεθυλίωσης, αποπουρίνωσης ή απαμίνωσης (Εικόνα 19).

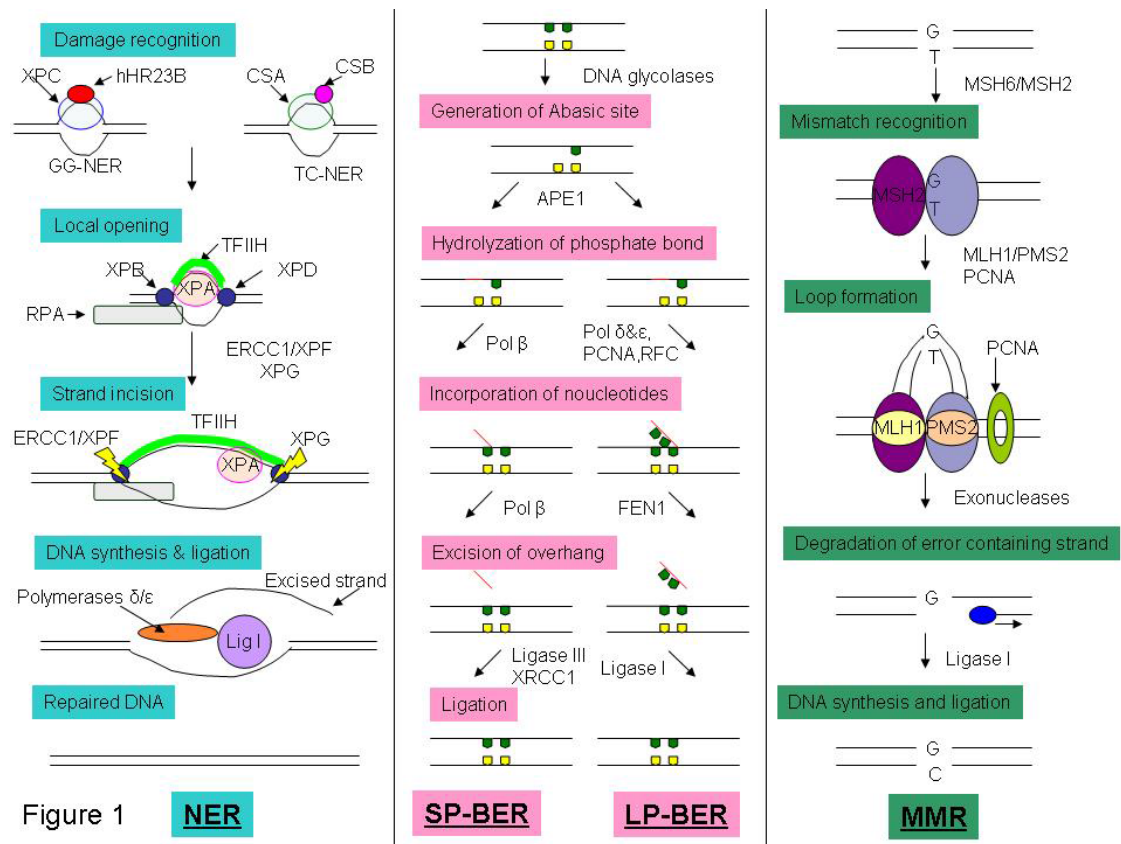


Figure 1

Εικόνα 19. Οι μηχανισμοί αντικατάστασης αλλοιωμένης βάσης νουκλεοτιδίου (Nucleotide Excision Repair, NER) μέσω εκτομής βάσης νουκλεοτιδίου (Base Excision Repair, BER) και διόρθωσης λανθασμένων νουκλεοτιδίων (Mismatch repair, MMR).

Ο μηχανισμός επιδιόρθωσης με εκτομή νουκλεοτιδίων (NER) είναι ο κύριος μηχανισμός για την απομάκρυνση ογκωδών παραγώγων των βάσεων (όπως αυτά που σχηματίζονται από την ακτινοβολία, διάφορα περιβαλλοντικά μεταλλαξιγόνα και μερικούς χημειοθεραπευτικούς παράγοντες) (E.J. Duell EG. et al. 2000; Friedberg EC. 2001).

Ο ομόλογος ανασυνδυασμός θεωρείται ο πιο σημαντικός μηχανισμός επιδιόρθωσης του DNA κατά τη διάρκεια της κυτταρικής αντιγραφής, όπου παρατηρείται επιδιόρθωση μέσω της αλληλεπίδρασης των ελεύθερων άκρων του DNA με μια ομόλογη αλληλουχία που χρησιμοποιείται ως πρότυπο για την επιδιόρθωση (Rollinson S. et al. 2007).

A7.2.1 Cohesin complex-RAD21

Το γονίδιο *RAD21* ανήκει στο σύμπλεγμα cohesin (cohesin complex) και συμμετέχει στην ένωση και στον διαχωρισμό των χρωματίδων κατά τη μίτωση, στο σημείο ελέγχου του κυτταρικού κύκλου καθώς και στην επιδιόρθωση DSBs (Xu et al 2011; Michaelis et al 1997; Guacci 2007). Επομένως, εικάζεται ότι μεταλλάξεις του γονιδίου *RAD21* ή υπερμεθυλίωση του υποκινητή του, οδηγούν σε γονιδιακή αστάθεια και ενδεχομένως σε ανάπτυξη ΟΜΛ. Πρόσφατες μελέτες σε ασθενείς με ΟΜΛ με επιγενετικές ή γενετικές αλλαγές στο γονιδίωμά τους υποδεικνύουν το σημαντικό ρόλο του συμπλέγματος cohesin στην ανάπτυξη της ΟΜΛ (Ley et al. 2013). Η απώλεια *RAD21* έχει συσχετιστεί με την αδυναμία αναγέννησης των βλαστοκυττάρων στο μυελό των οστών, ενώ η ομόζυγη εξάλειψη έχει ως αποτέλεσμα τον πρώιμο εμβρυϊκό θάνατο σε ποντίκια (Xu et al. 2012). Επιπλέον, η υπερέκφραση του *RAD21* στον καρκίνο του μαστού σχετίζεται με κακή πρόγνωση και αντοχή στη χημειοθεραπεία (Xu et al. 2011). Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, μεταλλάξεις του *RAD21* έχουν παρατηρηθεί στο 3-6% των ασθενών με πρωτοπαθή ΟΜΛ και στο 22% των ασθενών με οξεία μεγακαρυοβλαστική λευχαιμία (Kon A. et al, 2013). Αυτές οι μεταλλάξεις εντοπίστηκαν σε ολόκληρο το γονίδιο και δεν συσσωρεύτηκαν σε κανένα

συγκεκριμένο εξόνιο (Thota et al. 2014, Solomon et al. 2014, Thol et al. 2014, Dolnik et al. 2012). Μεταλλάξεις στα γονίδια του συμπλέγματος cohesin συνυπάρχουν με άλλες μεταλλάξεις και οδηγούν σε ανάπτυξη ΟΜΛ. Επιπλέον, σε μια πρόσφατη μελέτη, οι μεταλλάξεις *RAD21* έχουν συσχετιστεί με μεταλλάξεις του *NPM1* και μεταλλάξεις του χρωμοσώματος 8 (Dolnik et al. 2012; Thol et al, 2014). Το *RAD21* αναγνωρίστηκε πρόσφατα ως λειτουργικός επιγενετικός παράγοντας σίγασης μαζί με άλλα γονίδια όπως το *DNMT3A* και το *TRIM24* τα οποία έχουν βρεθεί μεταλλαγμένα σε περιπτώσεις ασθενών με ΟΜΛ. (Anna Dolnik, 2012).

A8 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Τις τελευταίες δεκαετίες η έρευνα της ΟΜΛ εστιάζεται στις γενετικές και επιγενετικές αλλαγές, οι οποίες φαίνεται να εμπλέκονται στην ανάπτυξη και εξέλιξη της νόσου. Αυτές οι μοριακές αλλοιώσεις μπορεί να επηρεάσουν την ανταπόκριση στη θεραπεία και την ολική επιβίωση, αλλά και να χρησιμεύσουν ως προγνωστικοί παράγοντες ή θεραπευτικοί στόχοι για νέες στοχευόμενες θεραπείες.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι:

- Η ταυτοποίηση των μεταλλάξεων του γονιδίου *ASXL1*, η διερεύνηση της συμβολής τους στην ανάπτυξη ΟΜΛ και η συσχέτισή τους με τα κυτταρογενετικά, δημογραφικά (φύλο και ηλικία διάγνωσης) και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών.
- Η ταυτοποίηση της μεθυλίωσης του γονιδίου *RAD21* στην δημιουργία ΟΜΛ και των ειδικών χρωμοσωμικών αλλοιώσεών της. Πιο συγκεκριμένα, μελετάται η μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου *RAD21* σε ασθενείς με ΟΜΛ ως πιθανό μηχανισμό αποσιώπησης της γονιδιακής έκφρασης του *RAD21* ο οποίος μπορεί να συμβάλει στην ανάπτυξη της ΟΜΛ. Η παρουσία μεθυλιωμένου ή μη υποκινητή του *RAD21* σχετίζεται, επίσης, με τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών και με τις ειδικές χρωμοσωμικές τους αλλοιώσεις.

Η μελέτη και ο εντοπισμός των σωματικών μεταλλάξεων του γονιδίου *ASXL1* καθώς και η μελέτη της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου

επιδιόρθωσης *RAD21*, αναμένεται να συμβάλλει στη διερεύνηση του ρόλου των γενετικών και επιγενετικών αλλαγών στην λευχαιμογένεση και θα βοηθήσει στη βαθύτερη κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών της ΟΜΛ. Επιπλέον, η αναγνώριση νέων γενετικών και επιγενετικών βιοδεικτών σε ασθενείς με ΟΜΛ όπως αυτοί που μελετώνται στην παρούσα διατριβή, συμβάλει στην προσπάθεια καθορισμού της πρόγνωσης των ασθενών με μεγαλύτερη ακρίβεια, στην δημιουργία νέων θεραπευτικών πρωτοκόλλων αλλά και στη δημιουργία στοχευμένων και εξατομικευμένων θεραπειών στην ΟΜΛ

Β. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ



B1. Δείγματα

Το υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση της συγκεκριμένης μελέτης περιλαμβάνει:

- i) Δείγματα μυελού των οστών 360 ενήλικων ασθενών με πρωτοπαθή ή/και δευτεροπαθή ΟΜΛ προερχόμενα από τα όλα τα νοσοκομεία της χώρας. Τα δείγματα, παρελήφθησαν από το Εργαστήριο Υγειοφυσικής, Ραδιοβιολογίας & Κυτταρογενετικής του Ινστιτούτου Πυρηνικών & Ραδιολογικών Επιστημών & Τεχνολογίας, Έρευνας & Ασφάλειας (ΙΠΡΕΤΕΑ) του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος», προκειμένου να ελεγχθούν για την ύπαρξη κλωνικών δομικών και/ή αριθμητικών χρωμοσωμικών αλλοιώσεων (καρυοτυπική ανάλυση). Η διάγνωση ΟΜΛ πραγματοποιήθηκε σε Ελληνικά Νοσοκομεία, κατά το διάστημα Ιανουάριος 2009-Δεκέμβριος 2014, βάση των προϋποθέσεων του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (Π.Ο.Υ) με ποσοστό βλαστών $\geq 20\%$ στο μυελό των οστών ή στο περιφερικό αίμα, εκτός των περιπτώσεων που φέρουν τις επαναλαμβανόμενες κυτταρογενετικές αλλοιώσεις t(15;17), t(8;21), inv(16) ή t(16; 16). Από το σύνολο των ασθενών, 278 ασθενείς έφεραν πρωτοπαθή ΟΜΛ και 82 δευτεροπαθή ΟΜΛ.
- ii) Δείγματα μυελού των οστών 10 υγιών μη-συγγενικών ατόμων ελληνικής καταγωγής αντίστοιχης ηλικίας και φύλου.

B2. Μέθοδοι

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, τα δείγματα μυελού των οστών ασθενών με πρωτοπαθή ή/και δευτεροπαθή ΟΜΛ, καλλιεργήθηκαν και επεξεργάστηκαν κατάλληλα προκειμένου να πραγματοποιηθεί κυτταρογενετική ανάλυση με μεθόδους κλασσικής ή/και μοριακής κυτταρογενετικής.

B2.1 Κυτταρογενετική**B2.1.1 Κλασσική Κυτταρογενετική – Καρυότυπος**

Η μεθοδολογία της κλασσικής κυτταρογενετικής που χρησιμοποιήθηκε περιλαμβάνει την παραλαβή και καλλιέργεια κυττάρων μυελού των οστών, τη συλλογή και μονιμοποίηση των κυττάρων, την προετοιμασία των χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων για κυτταρογενετική ανάλυση, τη

ζωνοποίηση των χρωμοσωμάτων με τη μέθοδο G-banding-Trypsin-Giemsa (GTG banding) και τέλος τη μικροσκοπική και καρυοτυπική ανάλυση και αξιολόγηση. Οι καρυότυποι περιγράφηκαν σύμφωνα με το διεθνές σύστημα ονοματολογίας Κυτταρογενετικής (International System for Human Cytogenetic Nomenclature 2013, ISCN 2016) (Shaffer LG. et al. 2013). Η κυτταρογενετική ανάλυση θεωρείται επιτυχής, όταν αναλυθούν τουλάχιστον 20 μεταφάσεις. Ως σύνθετοι καρυότυποι ορίζονται εκείνοι που φέρουν τουλάχιστον 3 χρωμοσωμικές αλλοιώσεις στον καρυότυπο, απουσία όμως των:

- Κυτταρογενετικών ανωμαλιών που αναφέρονται στο διεθνές σύστημα Π.Ο.Υ. στην ομάδα “ΟΜΛ με επαναλαμβανόμενες γενετικές ανωμαλίες” όπως :t(8;21), inv(16) ή t(16;16), t(9;11), t(v;11)(v;q23.3), t(6;9), inv(3) ή t(3;3);
- ΟΜΛ με BCRABL1
- Μη ισοροπημένες ανωμαλίες όπως : 2x7 or del(7q); 2x5 ή del(5q); i(17q) ή t(17p); 2x13 ή del(13q); del(11q); del(12p) ή t(12p); idic(X)(q13).
- Ισοποπημένες ανωμαλίες, όπως : t(11;16)(q23.3;p13.3); t(3;21)(q26.2;q22.1); t(1;3)(p36.3;q21.2); t(2;11)(p21;q23.3); t(5;12)(q32;p13.2); t(5;7)(q32;q11.2); t(5;17)(q32;p13.2); t(5;10)(q32;q21.2); t(3;5)(q25.3;q35.1) (Dohner et al., 2017:ENL 2017 recommendations)

Μονοσωμικοί καρυότυποι (ΜΚ) θεωρούνται εκείνοι που φέρουν στον καρυότυπο δύο τουλάχιστον αυτοσωμικές μονοσωμίες ή μία αυτοσωμική μονοσωμία παρουσία μίας τουλάχιστον δομικής χρωμοσωμικής ανωμαλίας (Kayser S. et al. 2012).

Βάσει καρυοτύπου, οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν σε τρεις ομάδες σχετικά με την πρόγνωση της νόσου (Grimwade D. et al. 2010):

- i) Καλής πρόγνωσης: ασθενείς που φέρουν τις αλλοιώσεις t(8;21), t(15;17), inv(16).
- ii) Ενδιάμεσης πρόγνωσης: ασθενείς με φυσιολογικό καρυότυπο, t(9;11), t(11;19), -Y, +8, +11, +13, +21 και άλλες αλλοιώσεις με άγνωστη πρόγνωση.

iii) Κακής πρόγνωσης: ασθενείς που φέρουν στον καρυότυπο $inv(3)/t(3;3)$, $t(9;22)$, $del(5q)$, -5 , $del(7q)$, -7 , $-17/abn(17p)$ και σύνθετους καρυότυπους.

B2.1.1.1 Παραλαβή και καλλιέργεια κυττάρων

Από κάθε ασθενή συλλέγεται δείγμα μυελού των οστών 2-3ml υπό άσηπτες συνθήκες σε ηπαρινισμένο σωληνάριο. Για κάθε δείγμα πραγματοποιούνται δύο ανεξάρτητες καλλιέργειες με διάρκεια επώασης 24 και 48 ωρών.

Για κάθε καλλιέργεια, προστίθενται ~0,5ml μυελού των οστών σε φιάλη καλλιέργειας 25cm² που περιέχει 6ml πλήρες θρεπτικό υλικό [Mc Coy's 5A modified medium (1x) (Gibco, Life Technologies), εμβρυϊκό ορό μόσχου 10% (FCS-Fetal Calf Serum) (Gibco, Life Technologies), L-γλουταμίνη (20mM), διάλυμα αντιβιοτικών πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης, 10000U/10000 μg/μl (Biochrom)].

Οι καλλιέργειες μεταφέρονται σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C ($\pm 0.2^\circ\text{C}$) και σε ατμόσφαιρα 5% ($\pm 0.1\%$) CO₂. Η θερμοκρασία των 37°C ($\pm 0.2^\circ\text{C}$) είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική αύξηση και πολλαπλασιασμό των κυττάρων, ενώ το ποσοστό 5% CO₂ ($\pm 0.1\%$) στον αέρα απαιτείται για την επίτευξη κατάλληλου pH (7.4-7.7) στις καλλιέργειες, διατηρώντας τη συγκέντρωση διττανθρακικών ανιόντων και μερικής πίεσης CO₂ σε ισορροπία.

B2.1.1.2 Συλλογή και μονιμοποίηση κυττάρων

1. Μία ώρα πριν τη λήξη της επώασης κάθε καλλιέργειας (24h, 48h) προστίθενται 50μl κολχικίνης σε PBS σε τελική συγκέντρωση 0.02μg/ml (Biochrom GmbH).

Τα επιτρεπτά όρια δράσης του κοσλεμιδίου είναι 1-3 ώρες. Η δράση για μικρό χρονικό διάστημα έχει ως αποτέλεσμα ο αριθμός των μεταφασικών κυττάρων να μην είναι ικανοποιητικός και επαρκής, παρόλο που η μορφολογία των χρωμοσωμάτων είναι καλή. Σε αντίθεση, η δράση για μεγάλο χρονικό διάστημα έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μεταφάσεων με πολύ συσπειρωμένα χρωμοσώματα, στα οποία η ζωνοποίηση και η ανάλυση είναι δύσκολη.

2. Μετά το πέρας της επώασης, τα κύτταρα μεταφέρονται σε ειδικό σωληνάριο (Falcon 14mL) και φυγοκεντρούνται για 10min στις 1300rpm (στροφές/min).

3. Ακολουθεί έγχυση του υπερκείμενου και στάγδην προσθήκη 8-10mL υποτονικού διαλύματος KCl (75mM), έτσι ώστε να επιτευχθεί η διόγκωση των κυττάρων, λόγω της διαφοράς στην οσμωτική πίεση μεταξύ ενδοκυττάρου και εξωκυττάρου χώρου. Περιορισμένη ή παρατεταμένη επώαση με υπότονο διάλυμα έχει ως αποτέλεσμα τη μη διόγκωση ή βίαιο σπάσιμο των κυτταρικών μεμβρανών, αντίστοιχα, και επομένως η καταμέτρηση του διπλοειδούς αριθμού των χρωμοσωμάτων (2n) των φυσιολογικών κυττάρων είναι ιδιαίτερα δύσκολη.
4. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 min στις 1300 rpm και έγχυση του υπερκείμενου, ενώ στη συνέχεια στάγδην προσθήκη 8-10ml διαλύματος Carnoy's (μεθανόλη/οξικό οξύ, 3/1) που επιτρέπει τη μονιμοποίηση των κυττάρων. Ακολουθεί φυγοκέντρηση, έγχυση του υπερκείμενου και εκ νέου προσθήκη μονιμοποιητή.

B2.1.1.3 Προετοιμασία των χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων για κυτταρογενετική ανάλυση

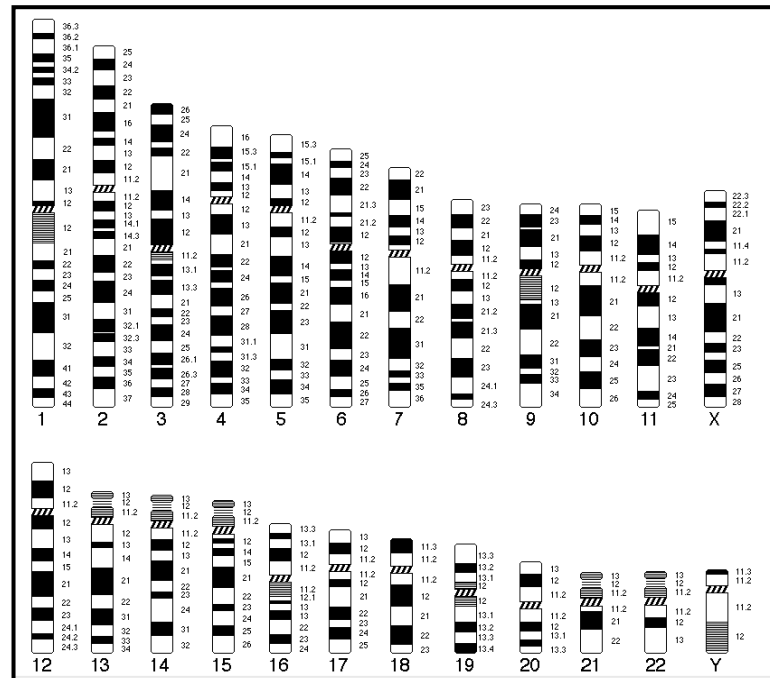
Η επίστρωση του χρωμοσωμικού υλικού γίνεται με 1-2 σταγόνες εναιωρήματος κυττάρων πάνω σε καθαρή και υγρή αντικειμενοφόρο πλάκα. Η ποιότητα των πλακακίων (πυκνότητα πυρήνων, ποιότητα μεταφάσεων) ελέγχεται με παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο αντίθετης φάσης. Οι πλάκες αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Για κάθε δείγμα που προορίζεται για κυτταρογενετική ανάλυση επιστρώνονται τουλάχιστον δύο αντικειμενοφόροι πλάκες από κάθε καλλιέργεια. Τέλος, τα πλακάκια τοποθετούνται στους 90°C για 1h σε ξηρό κλίβανο, προκειμένου να επιτευχθεί η παλαίωση των χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων.

B2.1.1.4 Ζωνοποίηση χρωμοσωμάτων: μέθοδος GTG

Για τον προσδιορισμό των χρωμοσωμάτων και την ανάλυση της δομής τους, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ζωνοποίησης GTG. Η ζώνωση G αποτελεί την πλέον διαδεδομένη μέθοδο ζωνοποίησης και χρώσης. Περιλαμβάνει κατεργασία των χρωμοσωμάτων με ισοτονικό διάλυμα θρυψίνης/EDTA [0.05%/0.02% (w/v)] σε PBS για να μετουσιωθούν οι χρωμοσωμικές πρωτεΐνες και χρώση με Giemsa [Giemsa Azur-Eosin-Methylene Blue Solution]· (διάλυμα Sorensen 1x (pH=6.8) και 5% Giemsa) (G-banding-

Trypsin-Giemsa, GTG). Κάθε ζεύγος χρωμοσωμάτων χαρακτηρίζεται από μία συγκεκριμένη και σταθερή αλληλοδιαδοχή σκουρόχρωμων και ανοιχτόχρωμων ζωνών (ζώνες G). Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 20) απεικονίζεται διαγραμματικά η ζώνωση G ανθρώπινων χρωμοσωμάτων με 550 περίπου ζώνες ανά απλοειδή καρυότυπο. Τα στάδια της μεθόδου είναι τα εξής:

1. Τα χρωμοσωμικά παρασκευάσματα επωάζονται σε ισοτονικό διάλυμα θρυψίνης 0.05% για 1min περίπου και κατόπιν το ένζυμο απομακρύνεται με απόπλυση σε φυσιολογικό ορό.
2. Ακολουθεί χρώση των παρασκευασμάτων σε διάλυμα Giemsa για 15 min.
3. Στη συνέχεια πραγματοποιείται έκπλυση με νερό βρύσης.
4. Τα πλακάκια αφήνονται να στεγνώσουν. Προστίθενται 2 σταγόνες Entellan (υλικό επικόλλησης καλυπτρίδων, Merck kGaA, Trajan) ανά αντικειμενοφόρο πλάκα και στη συνέχεια τοποθετείται υάλινη καλυπτρίδα (24x50mm).



Εικόνα 20. Διαγραμματική απεικόνιση ανθρώπινων χρωμοσωμάτων με G ζωνοποίηση (550 περίπου ζώνες ανά απλοειδή καρυότυπο). Τα χρωμοσώματα αναπαριστώνται ως μονοχρωματιδικές δομές και όχι με δύο χρωματίδες, όπως φαίνονται τα μιτωτικά χρωμοσώματα στο μικροσκόπιο. Τα

κεντρομερή υποδηλώνονται με τις σκούρες στικτές περιοχές. Οι ανοιχτόχρωμες στικτές περιοχές δείχνουν τις ζώνες στικτής χρώσης και συχνά αντιστοιχούν σε θέσεις ετερομορφισμών.

B2.1.1.5 Μικροσκοπική παρατήρηση και καρυοτυπική ανάλυση χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων

Τα χρωμοσωμικά παρασκευάσματα μελετώνται σε οπτικό μικροσκόπιο (Zeis-Axioscop 40) συνδεδεμένο με ψηφιακή κάμερα μικροσκοπίου και με λογισμικό σύστημα ανάλυσης ψηφιακής εικόνας IKAROS (Metasystems, Germany). Με τη χρήση του αντικειμενικού φακού 10x η αντικειμενοφόρος πλάκα σαρώνεται και ανιχνεύονται οι περιοχές που φέρουν μεταφάσεις με σχετικά καλή μορφολογία και διάταξη χρωμοσωμάτων, καθώς και με όσο το δυνατόν μικρότερο αριθμό αλληλεπικαλυπτόμενων χρωμοσωμάτων. Με τη χρήση του καταδυτικού φακού 100x μεγενθύνεται η εικόνα της επιλεγμένης μεταφάσης, η οποία και αποθηκεύεται σε ηλεκτρονική μορφή.

Για κάθε ασθενή με αιματολογική κακοήθεια, πλήρης καρυοτυπικός έλεγχος μυελού θεωρείται η καρυοτύπιση 20 μεταφάσεων όταν υπάρχει κλωνική αλλοίωση και 25 μεταφάσεων όταν ο καρυότυπος είναι φυσιολογικός. Ο καρυότυπος περιγράφεται σύμφωνα με το ισχύον σύστημα κυτταρογενετικής ονοματολογίας ανθρώπου ISCN 2013. Για τη στοιχειοθέτηση κυτταρογενετικά αλλοιωμένου κλώνου απαιτείται η ανίχνευση τουλάχιστον δύο κυτάρων με την ίδια αλλοίωση, όταν αυτή είναι δομική ή υπεραριθμία, ενώ θα πρέπει να ανιχνευθούν τουλάχιστον τρία κύτταρα με την ίδια αλλοίωση όταν πρόκειται για απώλεια χρωμοσώματος (μονοσωμία).

B2.1.2 Μοριακή Κυτταρογενετική – FISH

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε, επίσης, η μέθοδος του φθορίζοντος *in situ* υβριδισμού (FISH) είτε για τον εντοπισμό υπομικροσκοπικών αλλοιώσεων που δεν ήταν διακριτές στην καρυοτυπική ανάλυση, είτε για την ταυτοποίηση των εμπλεκόμενων σημείων θραύσης των αλλοιώσεων ή τέλος για την ταυτοποίηση τυχόν πολλαπλασιασμών γονιδίων.

Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε περιλαμβάνει αρχικά την καλλιέργεια κυτάρων μυελού των οστών, στη συνέχεια ακολουθεί η προετοιμασία των κυτταρογενετικών παρασκευασμάτων για FISH, ο υβριδισμός του κατάλληλου

κάθε φορά μοριακού ιχνηθέτη, η μικροσκοπική παρατήρηση, ανάλυση και αξιολόγηση των χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων σε μικροσκόπιο φθορισμού (AxioPlan 2, Zeiss).

B2.1.2.1 Προετοιμασία κυτταρογενετικών παρασκευασμάτων

1. Για κάθε δείγμα, επιστρώνεται σε αντικειμενοφόρο πλάκα μικρή ποσότητα (~20-30μl) μονιμοποιημένων κυτάρων. Η ποιότητα των επιστρωμένων παρασκευασμάτων (πυκνότητα κυττάρων, ανάπτυξη μεταφάσεων) ελέγχεται με οπτικό μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης.
2. Τα πλακίδια επωάζονται σε θερμική πλάκα, στους 60°C για 60min, προκειμένου να επέλθει παλαίωση (ageing).
3. Ακολουθεί έκπλυση σε διάλυμα SSC (2x), [20x SSC, pH=5.3: 0.3M Trisodium citrate dihydrate, 3M NaCl] σε θερμοκρασία δωματίου για 5-10min.
4. Εν συνεχεία, πραγματοποιούνται εκπλύσεις 3min των αντικειμενοφόρων πλακών σε θερμοκρασία δωματίου, σε σειρά διαλυμάτων αιθανόλης 70%, 90% και 100% με ανακίνηση, προκειμένου να γίνει αφυδάτωση των δειγμάτων και οι αντικειμενοφόροι αφήνονται να στεγνώσουν σε όρθια θέση.

B2.1.2.2 Υβριδισμός του μοριακού ιχνηθέτη στην περιοχή – στόχο

1. Στο κέντρο της αντικειμενοφόρου πλάκας προστίθενται 10 μL διαλύματος του ειδικού μοριακού ιχνηθέτη (Vysis[®], Abbot Molecular Diagnostics Providers, U.S.A), το οποίο περιλαμβάνει σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρίας 7μL κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος, 1μL διαλύματος ιχνηθέτη και 2μL απεσταγμένο νερό. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιείται σε περιβάλλον χαμηλού φωτισμού.
2. Η περιοχή καλύπτεται με αποστειρωμένη καλυπτρίδα 22x22 και στεγανοποιείται με την τοποθέτηση ειδικής κόλλας στην περιφέρεια της καλυπτρίδας.
3. Τα πλακίδια τοποθετούνται σε ειδική επωαστική συσκευή (Thermobrite Statspin, Metrocal), σε περιβάλλον υγρασίας, για την αποδιάταξη της χρωματίνης και τον υβριδισμό του μοριακού ιχνηθέτη στην περιοχή-στόχο
4. Το πρόγραμμα αποδιάταξης-υβριδισμού περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- ✓ Φάση αποδιάταξης: 75°C, για 1 min
- ✓ Φάση υβριδισμού: 37°C, καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας

B2.1.2.3 Εκπλύσεις και ανίχνευση σήματος υβριδισμού

1. Τα πλακάκια εξάγονται από τον επωαστικό θάλαμο υβριδισμού, αφαιρείται με λεπτή λαβίδα η κόλλα ελαστικού από κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα και απομακρύνεται η καλυπτρίδα. Πριν την αφαίρεση της καλυπτρίδας σημειώνονται με μολύβι τα όρια των περιοχών υβριδισμού.
2. Έκπλυση στο διάλυμα A₁ [0.4xSSC(20x), 0.3% Nonidet P450 (NP-40)], για 2 min σε θερμοκρασία δωματίου, υπό κυκλική ανακίνηση και σε περιβάλλον χαμηλού φωτισμού.
3. Έκπλυση στο διάλυμα A₂ [0.4xSSC(20x), 0.1% Nonidet P450 (NP-40)], για 1 min (+/- 30sec), στους 73°C (±1°C).
4. Έκπλυση υπό ανακίνηση, σε θερμοκρασία δωματίου στο διάλυμα A₁ για 2 min.
5. Αφυδάτωση σε σειρά διαλυμάτων αιθανόλης 70%, 90% και 100% για 2min σε θερμοκρασία δωματίου με ανακίνηση (εκτός του διαλύματος της 100% EtOH). Τα πλακάκια αφήνονται να στεγνώσουν στον αέρα, σε σκοτεινό περιβάλλον και σε όρθια θέση.
6. Σε κάθε πλακάκι προστίθενται 10 µL μίγματος αντίχρωσης DAPI (1µg/µl) (Mountant/Counterstain), στην περιοχή υβριδισμού. Η περιοχή-στόχος καλύπτεται με γυάλινη αποστειρωμένη καλυπτρίδα 24x50 mm.
7. Πριν από την παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού, οι αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετούνται σε σκοτεινό περιβάλλον στο ψυγείο (+4°C), σε ειδικές χάρτινες θήκες.

B2.1.2.4 Μικροσκοπική παρατήρηση, ανάλυση και αξιολόγηση χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων

Τα παρασκευάσματα μελετώνται σε μικροσκόπιο φθορισμού (Zeiss AxioPlan 2 microscope system), χρησιμοποιώντας τα ενδεδειγμένα φίλτρα φθορισμού και το λογισμικό σύστημα ανάλυσης ψηφιακής εικόνας ISIS (Metasystems, Germany), σε περιβάλλον μειωμένου φωτισμού. Με τη χρήση του αντικειμενικού φακού 20x, σαρώνεται η αντικειμενοφόρος πλάκα και ανιχνεύονται οι βέλτιστες περιοχές υβριδισμού (καλή κατανομή πυρήνων,

φωτεινά και ευκρινή σήματα). Στη συνέχεια, με τη χρήση αντικειμενικού 100X, σαρώνεται η περιοχή και καταμετράται ο αριθμός των σημάτων εντός του πυρήνα κάθε αξιολογήσιμου μεσοφασικού κυττάρου. Η διαδικασία καταμέτρησης επαναλαμβάνεται για 200 πυρήνες. Τέλος, εφόσον είναι εφικτό, πραγματοποιείται και αξιολόγηση 10 μεταφάσεων.

B2.2 Γονοτυπική ανάλυση

1. Γονοτυπική ανάλυση του γονιδίου *ASXL1*

Για τη διερεύνηση του πιθανού ρόλου των σωματικών μεταλλάξεων του γονιδίου *ASXL1*, ακολουθήθηκε μεθοδολογία η οποία συνοπτικά περιλαμβάνει την απομόνωση DNA από ασθενείς με ΟΜΛ και υγιείς μάρτυρες, την αλληλούχιση κατά Sanger, τον υπολογισμό των συχνοτήτων και τη στατιστική ανάλυση για την ανάδειξη πιθανών συσχετίσεων. Οι συχνότητες των μεταλλάξεων μελετήθηκαν επίσης σε σχέση με τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών και τα κυτταρογενετικά τους ευρήματα.

2. Γονοτυπική αναλυση του υποκινητή του γονιδίου *RAD21*

Για τη διερεύνηση του πιθανού ρόλου της μεθυλίωσης του γονιδίου *RAD21* ακολουθήθηκε μεθοδολογία η οποία συνοπτικά περιλαμβάνει την απομόνωση DNA από ασθενείς με ΟΜΛ και υγιείς μάρτυρες, και την μελέτη της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου, τον υπολογισμό των συχνοτήτων και τη στατιστική ανάλυση για την ανάδειξη πιθανών συσχετίσεων. Οι συχνότητες των μεταλλάξεων μελετήθηκαν επίσης σε σχέση με τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών και τα κυτταρογενετικά τους ευρήματα.

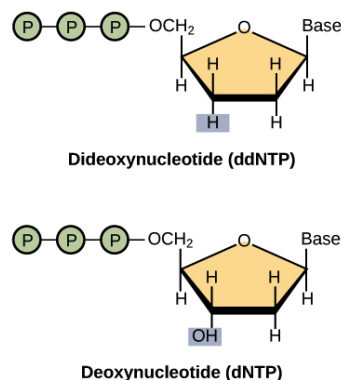
B2.2.1 Απομόνωση γενωμικού DNA

Ολικό γενωμικό υλικό (gDNA) απομονώθηκε από δείγματα μυελού των οστών ασθενών με ΟΜΛ και από ολικό περιφερικό αίμα υγιών ατόμων μετά από ενημέρωση και γραπτή συγκατάθεση των ασθενών ή σε περίπτωση που αυτό δεν ήταν εφικτό, στενού συγγενικού προσώπου, καθώς και των υγιών δοτών. Η διαδικασία απομόνωσης πραγματοποιήθηκε με το kit Gentra® Puregene® (Qiagen, Hilden, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Μετά από την απομόνωση, το DNA επαναιωρήθηκε σε Tris-EDTA, pH 8.0 και αποθηκεύθηκε στους -20°C μέχρι τη χρήση του. Η ποιότητα

και ποσότητα του DNA που απομονώθηκε ελέγχθηκε με φωτομέτρηση σε 260/280nm και με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα 1% αγαρόζης.

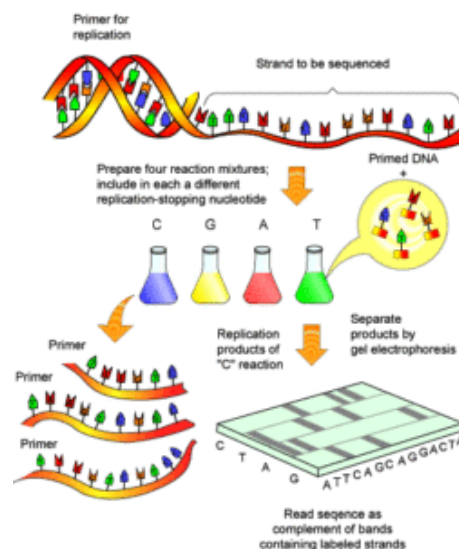
B2.2.2 Αλληλούχιση DNA κατά Sanger στο εξόνιο 12 του γονιδίου ASXL1

Η ενζυμική μέθοδος κατά Sanger ή η μέθοδος των διδεοξυ αντιδράσεων βασίστηκε σε προηγούμενη εργασία του Arthur Kornberg (<http://www.dnalc.org/ddnalc/resources/sangerseq.html>) στην αντιγραφή του DNA καθώς και στην ικανότητα της DNA πολυμεράσης να χρησιμοποιεί εκτός των τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs) και τα 2',3'-τριφωσφορικά διδεοξυνουκλεοτίδια (ddNTPs) σαν υποστρώματα. Κατά την διαδικασία αντιγραφής του DNA το άτομο άνθρακα στο 5' άκρο του εισερχόμενου δεοξυνουκλεοτιδίου (dNTP) ενώνεται με το άτομο άνθρακα στο 3' άκρο στο τέλος της αλυσίδας (www.dnalc.org/ddnalc/resources/sangerseq.html). Οι ομάδες υδροξυλίου σε κάθε θέση σχηματίζουν εστερικούς δεσμούς με ένα κεντρικό άτομο φωσφόρου και η αλυσίδα επιμηκύνεται. Το «κλειδί» στη μέθοδο του Sanger είναι η ιδιαίτερη χημεία των διδεοξυνουκλεοτιδίων (ddNTP). Όπως γίνεται με ένα δεοξυνουκλεοτίδιο, έτσι και ένα ddNTP ενσωματώνεται στην αλυσίδα σχηματίζοντας έναν φωσφοδιεστερικό δεσμό στο 5' άκρο. Ωστόσο το ddNTP δεν έχει ομάδα υδροξυλίου (OH) στη θέση 3' που είναι απαραίτητη για τη δημιουργία δεσμού με ένα εισερχόμενο νουκλεοτίδιο. Έτσι η προσθήκη ενός ddNTP σταματά την επιμήκυνση της αλυσίδας (Εικόνα 21).



Εικόνα 21. Δομή ddNTP και δεοξυνουκλεοτιδίου dNTP.

Για την αντίδραση του προσδιορισμού της αλληλουχίας του DNA, ένας ολιγονουκλεοτιδικός φορέας- εκκινήτης υβριδίζεται στον 3'- 5' κλάδο του προς προσδιορισμό DNA και με τη βοήθεια του ενζύμου DNA πολυμεράση επεκτείνεται σε κατεύθυνση 5'- 3', συμπληρωματικά στον αντιγραφόμενο κλάδο με την ανάπτυξη φωσφοδιεστερικών δεσμών ανάμεσα στο 3' άκρο του εκκινήτη και το 5' άκρο του προστιθέμενου νουκλεοτιδίου που δρα ως δομικός λίθος. Εκτελούνται ταυτόχρονα τέσσερις αντιδράσεις, στις οποίες το ένα είδος από τα τέσσερα χρησιμοποιούμενα 65 dNTPs είναι επισημασμένο (συνήθως με ³⁵S). Επίσης, κάθε μία από τις τέσσερις αντιδράσεις φέρει εκτός των τεσσάρων dNTPs και ένα από τα τέσσερα ddNTPs το οποίο εξ' αιτίας της έλλειψης 3' υδροξυλομάδας τερματίζει την αντίδραση νουκλεϊκής σύνθεσης όπως προαναφέρθηκε και χαρακτηρίζει την τελευταία βάση αυτού του κομματιού. Το συγκεκριμένο ddNTP είναι και αυτό που δίνει το όνομα της κάθε αντίδρασης. Τελικά, τα σχηματιζόμενα προϊόντα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υψηλής διακριτικής ικανότητας (τα προϊόντα κάθε αντίδρασης σταματούν σε διαδοχικές θέσεις εντός του πηκτώματος ανάλογα με το μοριακό τους βάρος) και η αλληλουχία του DNA μπορεί να διαβαστεί απ' ευθείας από το πήκτωμα (Εικόνα 22).

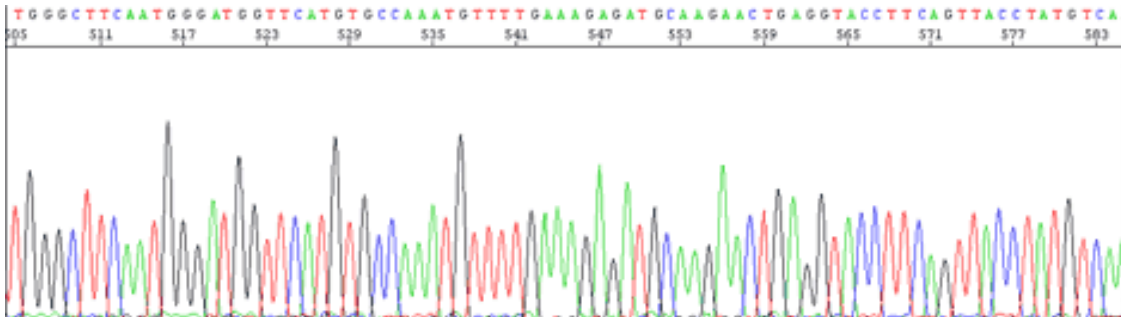


Εικόνα 22. Αρχή ενζυμικής μεθόδου DNA sequencing κατά Sanger.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήσαμε αποτελεί τροποποίηση την ενζυμικής μεθόδου του Sanger. Σε αυτή την μέθοδο η επισήμανση έγινε όπως και πριν, δηλαδή οι φθορίζουσες ουσίες βρίσκονται στα ddNTPs. Ο διαχωρισμός των πολυνουκλεοτιδικών μορίων που παράχθηκαν κατά την ενζυμική σύνθεση,

πραγματοποιήθηκε με αυτοματοποιημένους sequencers, με τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (capillary electrophoresis) (Εικόνα 23). Τέλος η ανάγνωση της αλληλουχίας έγινε μέσω μέτρησης της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας φθορισμού, που εκπέμπουν τα επισημασμένα τμήματα DNA κατά την ηλεκτροφόρηση, όταν περνούν από ορισμένο σημείο έπειτα από την διέγερση με κατάλληλη πηγή laser. Σύμφωνα με αυτή την μέθοδο χρησιμοποιείται

- Ταq πολυμεράση
- Ένας μόνο εκκινητής
- Διδεόξυ νουκλεοτίδια
- Και αντίδραση cycle sequencing για 35 κύκλους



Εικόνα 23. Ηλεκτροφογράφημα από DNA Sequencing.

Πιο συγκεκριμένα για την ενίσχυση τμήματος του εξονίου 12 του γονιδίου *ASXL1* χρησιμοποιήθηκε ένα ζεύγος εκκινητών όπως περιγράφηκε από τον

Γονίδιο	Αλληλουχίες εκκινητών (5'→3')	T _m υβριδοπ.	Προϊόν PCR	Reference
ASXL1	F: AGGTCAGATCACCCAGTCAGTT	61°C	561bp	Gelsi-Boyer et al., Br J Haematol 2009
	R: TAGCCCATCTGTGAGTCCAAGTGT			

Gelsi-Boyer και τους συνεργάτες του. Η ενίσχυση του γονιδίου έγινε στον θερμοκυκλοποιητή C1000TM Thermal Cycler (BIO-RAD). Για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων χρησιμοποιήθηκε η Taq DNA

πολυμεράση (Qiagen, Hilden, Germany). Συνοπτικά η διαδικασία ενίσχυσης περιλαμβάνει: αποδιάταξη στους 95°C για 3 min, στη συνέχεια πραγματοποιούνται 35 κύκλοι με αποδιάταξη στους 95°C για 45 sec, σύνδεση των εκκινητών στην κατάλληλη θερμοκρασία για κάθε πολυμορφική θέση για 45 sec και επιμήκυνση στους 72°C για 1 min. Ακολουθεί η τελική επιμήκυνση των προϊόντων PCR στους 72°C για 7 min. Οι συγκεντρώσεις των εκκινητών σε κάθε αντίδραση είναι 20 pM. Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 7) συνοψίζονται οι αλληλουχίες των εκκινητών, η θερμοκρασία σύνδεσης των εκκινητών και το μέγεθος του προϊόντος αντίδρασης PCR.

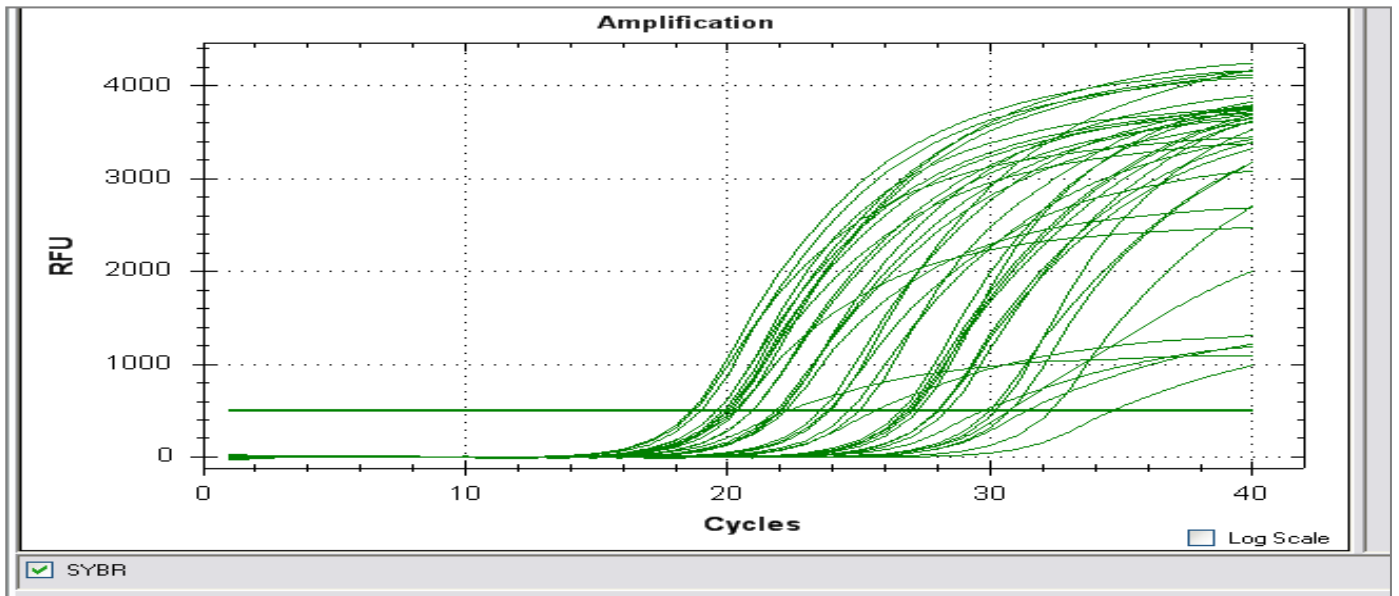
Πίνακας 7. Οι αλληλουχίες των εκκινητών, η θερμοκρασία σύνδεσης των εκκινητών και το μέγεθος του προϊόντος αντίδρασης PCR.

Το προϊόν PCR καθαρίζεται από νουκλεοτίδια, εκκινητές και άλλα προϊόντα της PCR αντίδρασης με το προϊόν ExoSAP-IT (Affymetrix). Χρησιμοποιώντας αυτό το προϊόν επιτυγχάνεται η απομάκρυνση των διμερών των εκκινητών που προκύπτουν από την μη ειδική υβριδοποίηση κατά τη διάρκεια της αντίδρασης PCR. Τα προϊόντα αυτά μπορούν να προκαλέσουν προβλήματα σε περαιτέρω αναλύσεις. Μόλις έχουμε ένα καθαρό προϊόν PCR, είμαστε έτοιμοι να προχωρήσουμε στην αντίδραση αλληλούχησης χρησιμοποιώντας το πακέτο αντιδραστηρίων BigDye Terminator v3.1. Ready Reaction kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) το οποίο περιέχει το απαραίτητο μίγμα συστατικών της αντίδρασης (DNA πολυμεράση, ρυθμιστικό διάλυμα για τη δράση του ενζύμου, μίγμα ddNTPs και σημασμένων με φθορίζουσες χρωστικές ddNTPs) με εξαίρεση το εκμαγείο του κατάλληλου εκκινητή. Ακολούθως τα προϊόντα της αλληλούχησης καθαρίζονται από μη ειδικά προϊόντα της αντίδρασης με κολώνες σεφαρόζης (G- 50 Sephadex columns). Τέλος η αλληλούχηση του γονιδίου πραγματοποιείται στον γενετικό αναλυτή ABI 3130xl genetic analyzer (Applied Biosystems). Στη συνέχεια τα ηλεκτρογραφήματα αναλύονται με τη βοήθεια του προγράμματος sequencer και καταγράφεται η παρουσία μεταλλάξεων. Στην συνέχεια, μελετήθηκε η συχνότητα μεταλλάξεων ανάμεσα στους ΟΜΛ ασθενείς και η συσχέτιση αυτών με τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών και με τις κυτταρογενετικές αλλοιώσεις.

B2.3 Μελέτη μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου *RAD21*

Για τον έλεγχο της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου *RAD21* ακολουθήθηκε μεθοδολογία η οποία συνοπτικά περιλαμβάνει: την επιλογή δειγμάτων DNA ασθενών και υγιών μαρτύρων, την απομόνωση DNA με το QIAamp DNA-extraction midi kit (Qiagen, Hilden, Germany) και στη συνέχεια την κατεργασία των επιλεγμένων δειγμάτων με το EpiTect Methyl II PCR Array της Qiagen.

Για την ταυτοποίηση της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου *RAD21* χρησιμοποιήθηκε το PCR EpiTect Methyl II για το γονίδιο *RAD21* (Qiagen, Hilden, Germany) το οποίο επιτρέπει την ταχεία και ακριβή ανίχνευση της μεθυλίωσης του DNA στις περιοχές CpG. Οι διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Εν συντομία, μετά την πέψη του DNA με ένζυμο ευαίσθητο στη μεθυλίωση και ένζυμο περιορισμού εξαρτώμενο από τη μεθυλίωση, το DNA ποσοτικοποιήθηκε με Real-time PCR σε κάθε μεμονωμένη ενζυματική αντίδραση χρησιμοποιώντας εκκινητή ειδικό του υποκινητή (Εικόνα 24). Η ανάλυση δεδομένων βασίζεται στη μέθοδο $\Delta\Delta C_t$ με το λογισμικό EpiTect Methyl II PCR Data Analysis που διατίθεται από την Qiagen (Hilden, Germany). Η σειρά PCR EpiTect Methyl II παρέχει τη δυνατότητα ανάλυσης της κατάστασης μεθυλίωσης του γονιδίου (ποσοστό μη μεθυλιωμένου (UM) και ποσοστού μεθυλιωμένου (M) κλάσματος DNA. Το "UM" αντιπροσωπεύει το κλάσμα του γονιδιωματικού DNA που δεν περιέχει μεθυλιωμένες θέσεις CpG στον υποκινητή του. Το "M" αντιπροσωπεύει το κλάσμα του γενωμικού DNA που περιέχει δύο ή περισσότερες μεθυλιωμένες θέσεις CpG στον υποκινητή. Το σύστημα EpiTect Methyl II PCR Array, χρησιμοποιώντας την τεχνολογία MethylScreen, βασίζεται στη διαφορική διάσπαση των αλληλουχιών στόχων από δύο διαφορετικές ενδονουκλεάσες περιορισμού των οποίων οι δραστηριότητες απαιτούν είτε την παρουσία ή την απουσία μεθυλιωμένων κυτοσίνων. Με τον τρόπο αυτό υπολογίστηκε το ποσοστό μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου *RAD21* σε κάθε έναν από τους υπό μελέτη ασθενείς. Ακολούθως με βάση το προφίλ μεθυλίωσης των ασθενών, πραγματοποιήθηκαν συσχετίσεις τόσο με τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών όσο και με τα κυτταρογενετικά ευρήματα.



Εικόνα 24. Ποσοτικοποίηση με Real-Time PCR.

Γ.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Γ1. Κυτταρογενετική ανάλυση ασθενών με ΟΜΛ

Γ1.1 Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών με ΟΜΛ

Στα πλαίσια της διερεύνησης της εμφάνισης ΟΜΛ στον Ελληνικό πληθυσμό, αναλύθηκαν 360 δείγματα μυελού των οστών και/ή περιφερικού αίματος από ενήλικες ασθενείς με πρωτοπαθή και δευτεροπαθή ΟΜΛ καθώς και δείγματα περιφερικού αίματος 10 υγιών, μη-συγγενικών ατόμων, αντίστοιχης ηλικίας και φύλου. Τα δείγματα ΟΜΛ συγκεντρώθηκαν κατά το διάστημα Ιανουάριος 2010-Δεκέμβριος 2014.

Η υπό μελέτη ομάδα ασθενών περιλαμβάνει 201 άντρες (201/360, 55.8%) και 159 γυναίκες (159/360, 44.2%), με αναλογία αντρών/γυναικών 1.2/1. Η ομάδα των μαρτύρων αποτελείται από 6 άντρες (6/10, 60%) και 4 γυναίκες (4/10, 40%), με αναλογία αντρών/γυναικών 1.5/1. Η μέση ηλικία ήταν 63 έτη (εύρος 18-95 έτη) για τους ασθενείς και 64.8 έτη (εύρος 18-93 έτη) για την ομάδα των υγιών δοτών. Από την ομάδα των ασθενών 278 ασθενείς (278/360, 77.2%) έπασχαν από πρωτοπαθή ΟΜΛ και 82 ασθενείς (82/360, 22.8%) από δευτεροπαθή ΟΜΛ από τους οποίους 63 ασθενείς είχαν προηγουμένως διαγνωσθεί με Μυελοδυσπλαστικό Σύνδρομο (ΜΔΣ), 4 ασθενείς με Χρόνια Μυεομονοκυτταρική Λευχαιμία (ΧΜΜΛ), 9 ασθενείς με Ιδιοπαθή Θρομβοκυττάρωση (ΙΘ), 2 ασθενείς με Μυελοίνωση (ΜΙ) και 4 ασθενείς με Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία (ΧΜΛ). Στον Πίνακα 8 συνοψίζονται τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών.

Πίνακας 8. Δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΟΜΛ και των υγιών μαρτύρων.

	ΟΜΛ ασθενείς (%)			Μάρτυρες (%)	p-value
	Συνολικά n = 360	Πρωτοπαθής n = 278	Δευτεροπαθής n = 82	n = 10	
Φύλο					
Άρρεν	201 (55.83)	159 (57.2)	42 (51.2)	6 (60)	ns
Θήλυ	159 (44.17)	119 (42.8)	40 (48.8)	4 (40)	
Αναλογία Α/Θ	1.2/1	1.3/1	1/1	1.5/1	
Ηλικία (έτη)					
Μέση ηλικία	64.2	59.46	68.9	64.8	ns
Εύρος	18-95	16-93	29-95	18-93	
Ηλικιακές ομάδες					
<60	173 (48)	160 (57.6)	22 (22.2)	4 (40)	ns
≥61	187 (52)	118 (42.4)	60 (77.8)	6 (60)	

Γ1.2 Κλασσική κυτταρογενετική ανάλυση ασθενών με ΟΜΛ

Στην παρούσα μελέτη επιτυχής καρυοτυπική ανάλυση υπήρξε σε 352 από τους 360 ασθενείς (97.8%), ενώ η ανάλυση των υπολοίπων (8/360, 2.2%) ήταν αδύνατη λόγω κακής ποιότητας ή απουσίας μεταφάσεων. Από τους 352 ασθενείς με κυτταρογενετικό αποτέλεσμα, οι 252 εμφάνισαν παθολογικό καρυότυπο (252/352, 71.5%) ενώ οι υπόλοιποι 100 ασθενείς έφεραν φυσιολογικό καρυότυπο (100/352, 28.4%). Από τους 278 ασθενείς με πρωτοπαθή ΟΜΛ, οι 180 εμφάνισαν παθολογικό καρυότυπο (180/278, 65%) και οι 98 (98/278, 35%) φυσιολογικό. Ως προς τους ασθενείς με δευτεροπαθή

ΟΜΛ, από τους 82 ασθενείς οι 72 (72/82, 87.8%) είχαν παθολογικό καρυότυπο, ενώ οι υπόλοιποι 10 (10/82, 12.2%) φυσιολογικό.

Σύνθετους καρυοτύπους παρουσίασε το 15.1% (53/352) των ασθενών, όπου οι 38 είχαν πρωτοπαθή (38/271, 14%) και οι 15 (15/81, 15%) δευτεροπαθή ΟΜΛ. Μονοσωμικοί καρυότυποι βρέθηκαν στο 17% των ασθενών και πιο συγκεκριμένα στο 14.7% και 24.6% των ασθενών με πρωτοπαθή και δευτεροπαθή ΟΜΛ, αντίστοιχα. Η ταξινόμηση κατά FAB ήταν διαθέσιμη στο 49.3% (137/278) των ασθενών με πρωτοπαθή ΟΜΛ. Ο πιο κοινός υπότυπος κατά FAB ήταν ο M2 σε ποσοστό 27.7% ακολουθούμενος από τον M3 σε ποσοστό 23.3%, M4 15.3%, M5 13.9%, M1 7.2%, M0 5.8%, M6 2.9%, και M7 σε ποσοστό 0.7%. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9. Ταξινόμηση κατά FAB, κυτταρογενετικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΟΜΛ και ομάδες πρόγνωσης βάσει καρυότυπου.

	ΟΜΛ ασθενείς (%)			p-value
	Συνολικά n = 360	Πρωτοπαθής n = 278	Δευτεροπαθής n = 82	
Ταξινόμηση κατά FAB^α				
M0		8 (5.8)		
M1		10 (7.2)		
M2		38 (27.7)		
M3		36 (23.3)		ns
M4		21 (15.3)		
M5		19 (13.9)		
M6		4 (2.9)		
M7		1 (0.7)		
Καρυότυπος^β				
Φυσιολογικός	104 (29.5)	91 (33.6)	13 (16)	
Παθολογικός	248 (70.5)	180 (66.4)	68 (83.9)	
-7/del(7q)	58 (16.5)	36 (13.3)	22 (27.2)	ns
-5/del(5q)	42 (11.9)	22 (8.1)	20 (24.6)	
+8 ^γ	30 (8.5)	21 (7.7)	9 (11.1)	
Abn(11q23)	36 (10.2)	27 (9.9)	9 (11.1)	

inv(16)	10 (2.8)	10 (3.6)		
t(15;17)	21 (5.9)	21 (7.7)		
t(8;21)	15 (4.2)	15 (5.5)		
+21	10 (2.8)	4 (1.4)	6 (7.4)	
-Y	5 (1.4)	5 (1.8)		
t(9;22)	9 (2.5)	5(1.8)	4 (4.9)	
t(3;3)/inv(3)	7(1.9)	4(1.4)	3(3.7)	
Άλλη αλλοίωση	64 (18.2)	47 (17.3)	17 (20.9)	
Σύνθετοι καρυότυποι	53 (15.1)	38 (14)	15 (18.5)	
Μονοσωμικοί καρυότυποι	60 (17)	40 (14.7)	20 (24.6)	
Ομάδες πρόγνωσης (βάσει καρυοτύπου)				
Καλή	46 (12.7)	46 (16.5)		
Ενδιάμεση	181 (50.3)	165 (59.4)	16 (19.5)	ns
Κακή	133(36.9)	67 (24.1)	66 (80.5)	

ns: μη στατιστικά σημαντικό

^αΟι υπολογισμοί των συχνοτήτων έγιναν βάσει του συνόλου των ασθενών με πρωτοπαθή ΟΜΛ με γνωστή ταξινόμηση κατά FAB (137/278).

^βΟι υπολογισμοί των συχνοτήτων έγιναν με βάση το σύνολο των ασθενών με επιτυχή καρυοτυπική ανάλυση (352/360 στους ασθενείς με ΟΜΛ, 271 /278 στους ασθενείς με *de novo* ΟΜΛ και 81/82 στους ασθενείς με s-ΟΜΛ).

^γΤρισωμία 8 ως μεμονωμένη χρωμοσωμική αλλοίωση

Οι συχνότερες καρυοτυπικές αλλοιώσεις που ανιχνεύθηκαν κατά την κυτταρογενετική ανάλυση ήταν η μονοσωμία ή έλλειψη στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 7 [-7/del(7q)] (16.5%), η μονοσωμία ή έλλειψη στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 5 [-5/del(5q)] (11.9%) και η τρισωμία του χρωμοσώματος 8 (+8) ως μεμονωμένη αλλοίωση (8.5%). Ακολουθούν οι αλλοιώσεις της περιοχής 11q23 [abn(11q23)] (10.2%), οι αμοιβαίες μεταθέσεις t(15;17) και t(8;21) σε ποσοστό 5.9% και 4.2% αντίστοιχα και η αναστροφή του χρωμοσώματος 16 [inv(16)] και η τρισωμία 21 (+21) σε ποσοστό 2.8%. Άλλες κυτταρογενετικές ανωμαλίες με μικρότερη συχνότητα ήταν η αμοιβαία μετάθεση t(9;22) (2.5%), η αμοιβαία μετάθεση των χρωμοσωμάτων 3 ή η

αναστροφή του χρωμοσώματος 3[t(3;3)/inv(3)] (1.9%) και η απώλεια του χρωμοσώματος Y (-Y) (1.4%). Αναλυτικότερα, στην ομάδα των ασθενών με πρωτοπαθή ΟΜΛ οι πιο συχνές κυτταρογενετικές αλλοιώσεις που ανιχνεύθηκαν ήταν: -7/del(7q) (13.3%), -5/del(5q) (8.1%), abn(11q23) (9.9%), +8 ως μεμονωμένη αλλοίωση (7.7%), t(15;17) (7.7%), t(8;21) (5.5%), inv(16) (3.6%), -Y και t(9;22) (1.8%? έκαστη), +21 και t(3;3)/inv(3) (1.4%). Ως μεμονωμένη αλλοίωση, η απώλεια του χρωμοσώματος Y θεωρείται κλωνική ανωμαλία που σχετίζεται με τη νόσο, μόνο όταν βρίσκεται σε ποσοστό άνω των 75% των αναλυθέντων κυττάρων (Swerdlow S. et al. 2008).

Οι πιο συχνές ανωμαλίες που παρουσίασαν οι ασθενείς με δευτεροπαθή ΟΜΛ ήταν: -7/del(7q) σε ποσοστό 27.2%, -5/del(5q) σε ποσοστό 24.6%, +8 και αλλοιώσεις του 11q σε ποσοστό 11.1%, +21 σε ποσοστό 7.4%, t(9;22) σε ποσοστό 4.9% και t(3;3)/inv(3) σε ποσοστό 3.7%. Βάσει καρυοτύπου, οι ασθενείς ταξινομήθηκαν σε τρεις προγνωστικές ομάδες, καλής (12.7%), ενδιάμεσης (50.3%) και κακής πρόγνωσης (36.9%) (Πίνακας 11). Η ταξινόμηση αυτή έγινε και στις δυο υποκατηγορίες ασθενών, με τους ασθενείς με δευτεροπαθή ΟΜΛ να έχουν υψηλό ποσοστό καρυοτύπων κακής πρόγνωσης (80.5%) σε σχέση με τους ασθενείς με πρωτοπαθή ΟΜΛ (24.1%).

Γ2. Μεταλλάξεις του γονιδίου ASXL1

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, πραγματοποιήθηκε μοριακή μελέτη ασθενών με ΟΜΛ, στο εξόνιο 12 του γονιδίου ASXL1. Η ανίχνευση των μεταλλάξεων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο αλληλούχισης κατά Sanger.

G2.1 Συχνότητες και τύποι μεταλλάξεων στο γονίδιο

Από την ομάδα των 360 ΟΜΛ ασθενών, η μοριακή ανάλυση του γονιδίου *ASXL1* ήταν επιτυχής σε όλους τους ασθενείς. Από το σύνολο των ασθενών, οι 52 ασθενείς (52/360, 14.4%) εμφάνισαν μετάλλαξη στο γονίδιο. Η πιο συχνή μετάλλαξη ήταν η c.1934dupG στο 84.6% των ασθενών (44/52), ακολουθεί η μετάλλαξη c.2060G>A στο 7.7% (4/52), η c.1900dupA στο 3.84% (2/52), η c.1779A>G στο 1.92% (1/52) και η c.1900_1922del στο 1.92% (1/52). Κανένας σπό τους υγιείς δότες δεν παρουσίασε μετάλλαξη στο γονίδιο *ASXL1* (Πίνακας 10).

Πίνακας 10. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *ASXL1* και αντίστοιχες πρωτεΐνες

DNA Μετάλλαξη στο γονίδιο <i>ASXL1</i>	Αντίστοιχη Πρωτεΐνη
c.1934dupG	p.Gly646TrpfsX12
c.1900_1922del	p.Glu635ArgfsX24
c.1900dupA	p.Arg634LysfsX24
c.2060G>A	p. Cys688Tyr
c.1779A>G	p. Ile593Val

Όλες οι μεταλλάξεις που ανευρέθησαν ήταν σε ετεροζυγωτία. Από τις μεταλλάξεις η c.1934dupG, η c.1900dupA και η c.1900_1922del είναι μεταλλάξεις αλλαγής πλαισίου ανάγνωσης (frame shift) ενώ η c.2060G>A και η c.1779A>G είναι μεταλλάξεις χωρίς νόημα (nonsense mutations). Από τους 52 ασθενείς με μετάλλαξη, οι 33 (33/52, 63.5%) ήταν ασθενείς με πρωτοπαθή ΟΜΛ και οι 19 (19/52, 36.5%) ήταν ασθενείς με δευτεροπαθή ΟΜΛ (Πίνακας 11).

Πίνακας 11. Χαρακτηριστικά ασθενών που συμμετείχαν στη μελέτη.

Age	63 years	IQR 16-88 years	
Gender	Female 44.2%	Male 55.8%	
Year of Diagnosis	2010	range 2000-2014	
AML	Secondary 22.8%	De novo 77.2%	
	MDS N=63		
	CMML N=4		
	PV/ET N=9		
	MF N=2		
	CML N=4		
ASXL1 mutations	14.4%		
	1934dupG 44/52		
	c.2060G>A 4/52		
	c.1900dupA 2/52		
	c.1900 1922del 1/52		
	c.1779A>G 1/52		
Karyotype	Abnormal 70%	Normal 27.8%	Failed 2.2%
	CBF N=28		
	Complex N=66		
	Monosomal N=55		
	MDS-related N=105		

Γ2.1.2 Συσχέτιση των μεταλλάξεων του γονιδίου ASXL1 με τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών

Η ομάδα των ασθενών κατηγοριοποιήθηκε με βάση το φύλο σε δύο ομάδες, (άρρεν και θήλυ) και με βάση την ηλικία σε δύο ηλικιακές ομάδες [μικρότερης ή ίσης των 60 ετών (≤ 60) και άνω ή ίσης των 61 ετών (≥ 61)]. Στη συνέχεια υπολογίστηκαν οι αντίστοιχες συχνότητες των μεταλλάξεων και συγκρίθηκαν μεταξύ των ατόμων της ίδιας ομάδας. Για τη σύγκριση χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό μη-παραμετρικό χ^2 τεστ με διόρθωση κατά Yates (Yate's chi-square test).

Η συχνότητα μεταλλάξεων του *ASXL1* ήταν παρόμοια σε άνδρες και γυναίκες ασθενείς (15.4% έναντι 13.2%, $p = 0.55$), ενώ οι μεταλλάξεις *ASXL1* ήταν σημαντικά συχνότερες σε ασθενείς με δευτεροπαθή ΟΜΛ (33/82, 40.2%)

σε σχέση με τους ασθενείς με πρωτοπαθή ΟΜΛ (9/278, 6.8%, $p < 10^{-3}$). Οι ασθενείς με μεταλλάξεις στο *ASXL1* ήταν σημαντικά μεγαλύτεροι με μέση ηλικία τα 72 έτη έναντι των 61.5 ετών στην ομάδα των μη μεταλλαγμένων ($p = 0,0001$). Στην πραγματικότητα, οι μεταλλάξεις *ASXL1* ήταν πολύ λιγότερο συχνές σε νεαρότερες ηλικιακές ομάδες [3 από 61 ασθενείς (4.9%) ηλικίας ≤ 40 , 10/97 ηλικίας 41-60 (10.3%)] σε σύγκριση με μεγαλύτερες ηλικιακές ομάδες [(39/198 ηλικίας > 60 (19.7%)]. Ο αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων κατά τη διάγνωση ήταν διαθέσιμος για 111 ασθενείς (92 μη μεταλλαγμένους και 19 μεταλλαγμένους) με μέσες τιμές $11.57 \times 10^9/L$ στους ασθενείς με μετάλλαξη και $29 \times 10^9/L$ σε ασθενείς χωρίς μετάλλαξη. Στον πίνακα 12 συνοψίζονται τα χαρακτηριστικά των ασθενών που παρουσίασαν μετάλλαξη στο γονίδιο *ASXL1*.

Η πλειοψηφία των μεταλλάξεων *ASXL1* που ανιχνεύθηκαν ήταν μεταλλάξεις μετατόπισης πλαισίου ανάγνωσης (47/52, 90.4%, 44 περιστατικά με 1934dupG, 2 περιστατικά με 1900dupA και 1 περιστατικό με 1900_1922del), ενώ μόνο 5 ήταν παρανοημένες μεταλλάξεις (missense) (4 περιστατικά με c.2060G> A και 1 με c.1779A <G). Και τα 5 περιστατικά με missense μεταλλάξεις είχαν παθολογικούς καρυότυπους αλλά με διαφορετικές αλλοιώσεις. Πιο συγκεκριμένα, ένας ασθενής είχε t(8;21), ένας t(15;17), ένας τρισωμία 8, ένας τρισωμία 13 και ένας μονοσωμικό καρυότυπο με μονοσωμία 7. Τρία από τα πέντε περιστατικά με missense μεταλλάξεις είχαν δευτεροπαθή ΟΜΛ. Καμία συσχέτιση δεν ανιχνεύθηκε μεταξύ missense αλλοιώσεων με σύνθετους καρυότυπους, μονοσωμικούς καρυότυπους, και με αλλοιώσεις που σχετίζονται με ΜΔΣ.

Μεταξύ των ασθενών με μετάλλαξη στο *ASXL1*, υπάρχουν δύο ασθενείς που παρουσίασαν μετάλλαξη στο γονίδιο *NPM1*. Πιο συγκεκριμένα, ο πρώτος ασθενής ήταν γυναίκα που παρουσιάστηκε με ΜΔΣ (RCMD) τον Νοέμβριο του 2009 σε ηλικία 50 ετών. Ο αρχικός καρυότυπος ήταν φυσιολογικός. Στη συνέχεια υποτροπίασε σε δευτεροπαθή ΟΜΛ, 10 μήνες αργότερα. Η επαναληπτική κυτταρογενετική ανάλυση έδειξε μονοσωμία 7 και η μοριακή ανάλυση έδειξε ότι έφερε μετάλλαξη στο γονίδιο *NPM1*. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *FLT3* (ITD ή TKD) δεν ανιχνεύθηκαν. Η ασθενής βρέθηκε θετική για την μετάλλαξη c.1934dupG στο γονίδιο *ASXL1*. Έλαβε τυπική επαγωγική χημειοθεραπεία στην οποία είχε πλήρη ανταπόκριση και τελικά υποβλήθηκε σε αλλογενή μεταμόσχευση. Ήταν ακόμα ζωντανή και σε ύφεση δύο χρόνια μετά την διάγνωση. Ο δεύτερος ασθενής ήταν μια γυναίκα 58 ετών που διαγνώστηκε με πρωτοπαθή ΟΜΛ το Δεκέμβριο του 2008, όταν ήταν 58 ετών. Η καρυοτυπική ανάλυση έδειξε τρισωμία 8 και η μοριακή ανάλυση έδειξε μετάλλαξη στα γονίδια *NPM1* και *FLT3* (*FLT3*-ITD μετάλλαξη), ενώ η ασθενής παρουσίασε και την μετάλλαξη c.1934dupG στο γονίδιο *ASXL1*. Ήταν ανθεκτική στην πρώτη θεραπεία (idarubicin, cytarabine, "3 + 7") αλλά παρουσίασε πλήρη ύφεση μετά από την δεύτερη επαγωγική θεραπεία με FLAG-IDA. Στη συνέχεια μετακόμισε στο εξωτερικό και δεν ήταν δυνατή η παρακολούθησή της.

Πίνακας 12. Χαρακτηριστικά ασθενών που παρουσίασαν μετάλλαξη στο γονίδιο *ASXL1*.

UP	Age/Sex	AML	Karyotype	<i>ASXL1</i> mutation	a.a. change
				n.t. change	

Κεφάλαιο Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1	75/F	sec ond ary	46,XX,t(3;3)(q21;q26),t(9;22)(q34;q11.2)[20]	c.1900dupA	p.Ser63 4Lys7
2	77/F	sec ond ary	48,XX,+8,+14,del(13)(q12q14) [20]	c.1934dupG	p.Gly64 6Trp
3	75/F	sec ond ary	47,XX,+8[20]	c.1934dupG	p.Gly64 6Trp
4	67/ M	sec ond ary	47,XY,+11[3] 47,XY,der(1),+11[2] / 46,XY,+11,-16, der(21)t(16;21)(p11;p11.2)[10] N	c.1934dupG	p.Gly64 6Trp
5	87/ M	sec ond ary	47,XY,+11[20]	c.1934dupG	p.Gly64 6Trp
6	86/ M	sec ond ary	46,XY[4] / 45,XY,- 16,der(17)t(16;17)(p11.1;p11.2) [14] / 46,XY,+8,-16, der(17)t(16;17)(p11.1;p11.2)[2]	c.1934dupG	p.Gly64 6Trp
7	72/ A	sec ond ary	46,XY[14]/47,XY,+8[6]	c.1934dupG	p.Gly64 6Trp
8	52/F	sec ond ary	45,X,-X,t(9;22)(q34;q11.2)[26] / 45,X,- X,del(6)(q23~25),t(9;22)(q34;q11.2)[2]	c.1934dupG	p.Gly64 6Trp
9	78/F	sec ond ary	46,XX[4]/47,XX,+8[13]	c.1934dupG	p.Gly64 6Trp
10	59/F	sec ond ary	46,XX[17]/44,XX,-6,del(10q),- 11,add(12p),-21,+mar1[3]	c.1934dupG	p.Gly64 6Trp
11	67/ M	sec ond ary	46,XY,del(2)(q31)[7]	c.1934dupG	p.Gly64 6Trp
12	78/ M	sec ond ary	46,XY[4] / 47,XY,+8[15] / 47,XY,+8,del(20)(q11)[1]	c.1934dupG	p.Gly64 6Trp
13	72/ M	sec ond ary	46~47,XY,-4,-5,-6,add(9)(q34),-10 -11,-16,- 17, +22,+mar1,+mar2, +mar3,+mar4, +mar5,+mar6,inc[11]	c.1934dupG	p.Gly64 6Trp
14	83/ M	sec ond ary	46,XY[7] / 47,XY,+8[13]	c.1934dupG	p.Gly64 6Trp
15	73/ M	sec ond ary	46,XY[17]	c.1934dupG	p.Gly64 6Trp
16	72/ M	sec ond ary	46,XY[20]	c.1934dupG	p.Gly64 6Trp

Κεφάλαιο Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

17	58/ M	sec ond ary	45,XY,add(3)(q26),del(5q),add(7)(p11.1),- 6,-11,+mar	c.1934dupG	p.Gly64 6Trp
18	79/F	sec ond ary	47,XX,+8[20]	c.1934dupG	p.Gly64 6Trp
19	74/ M	sec ond ary	46,XY[18] / 47,XY,+8[2]	c.2060G>A	p. Cys688 Tyr
20	63/F	sec ond ary	46,XX[5] / 46,XX,del(7)(q22)[1]	c.2060G>A	p. Cys688 Tyr
21	?/M	De nov o	46,XY[9] / 46,XY,del(11)(q23)[1] / 45,X,- Y,del(11)(q23)[10]	c.1934dupG	p.Gly64 6Trp
22	72/ M	De nov o	46,XY[3]	c.1934dupG	p.Gly64 6Trp
23	73/ M	De nov o	46,XY[1]/47,XY,+8[6]	c.1934dupG	p.Gly64 6Trp
24	61/ M	De nov o	46,XY[24]	c.1934dupG	p.Gly64 6Trp
25	60/F	De nov o	46,XX[20]	c.1934dupG	p.Gly64 6Trp
26	75/ M	De nov o	46,XY,t(8;21)(q22;q22)[7] / 45,X,- Y,t(8;21)(q22;q22)[15]	c.1934dupG	p.Gly64 6Trp
27	58/F	De nov o	46,XX[20]	c.1934dupG	p.Gly64 6Trp
28	76/ M	De nov o	46,XY[8] / 45,XY,der(17)t(17;19)(p11;?p11),-19[23]	c.1934dupG	p.Gly64 6Trp
29	40/ M	De nov o	46,XY[20]	c.1934dupG	p.Gly64 6Trp
30	19/ M	De nov o	46,XY[5] / 46,XY,t(16;21)(p11;q22)[14] / 47,XY,+8,t(16;21)(p11;q22)[1]	c.1934dupG	p.Gly64 6Trp
31	86/ M	De nov o	45,X,-Y.t(11;19)(q23;p13.1)[22]	c.1934dupG	p.Gly64 6Trp
32	79/F	De nov o	46,XX[20]	c.1934dupG	p.Gly64 6TrpfsX 12
33	58/F	De	54,XX,+X,+5,+8,+10,+11,+21,	c.1934dupG	p.Gly64

Κεφάλαιο Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

		nov o	+22		6Trp
34	71/ M	De nov o	47,XY,+11[20]	c.1934dupG	p.Gly64 6Trp
35	69/F	De nov o	46,XY[10] / 44~46,XY,-1,del(2q),del(4q),- 6,-7,-8,add(9q),- 17,+mar1,+mar2,+mar3,inc[8]	c.1934dupG	p.Gly64 6Trp
36	76/ M	De nov o	54,XY,+8,+9,+12,+13,+14x2,+21,+22	c.1934dupG	p.Gly64 6Trp
37	52/ M	De nov o	46,XY,t(15;17)(q22;q21)[20]	c.2060G>A	p. Cys688 Tyr
38	74/ M	De nov o	46,XY[12] / 47,XY,+13[8]	c.2060G>A	p.Gly68 7Glu
39	46/ M	De nov o	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22)[25]	C.1779A<G	p. Ile593V al
40	56/ M	De nov o	46, XY [21]/ 47,XY,+8[4]	c.1900_1922 del	p.Glu63 5Arg
41	11/F	De nov o	45,XX,-7[20]/46,XX,-7,+?22[2]	c.1934dupG	p.Gly64 6Trp
42	79/ M	De nov o	46,XY[15]/46,XY,der(18)t(18;21)(p11;q11. 2)[5]	c.1934dupG	p.Gly64 6Trp
43	62/ M	De nov o	46,XY[6]	c.1934dupG	p.Gly64 6Trp
44	65/F	De nov o	46,XX[20]	c.1934dupG	p.Gly64 6Trp
45	76/ M	De nov o	46,XY[22]	c.1934dupG	p.Gly64 6Trp
46	80/F	De nov o	46,XX[25]	c.1934dupG	p.Gly64 6Trp
47	76/F	De nov o	46,XX[30]	c.1934dupG	p.Gly64 6Trp
48	74/F	sec ond ary	47,XX,+8[24]	c.1934dupG	p.Gly64 6Trp
49	73/ M	sec ond	46,XY[23]	c.1934dupG	p.Gly64 6Trp

50	74/F	secondary	46,XX,del(7)(q22)[25]	c.1934dupG	p.Gly646Trp
51	79/M	secondary	47,XY,+8[20]	c.1934dupG	p.Gly646Trp
52	70/M	De novo	46,XX[1] / 46,XX,del(5q)[2] / 43~44,XX,add(3p),del(5q),add(7)(p11),der(11)t(11;11)(p15;q13),-13,dic(13;?)(p11;?),add(14)(p11),-16,-17,-22,+3mar,inc[17]	c.1934dupG	p.Gly646Trp
53	72/F	De novo	46,XX[20]	C.1900dupA	p.Ser634Lysfs
54	73/F	De novo	46,XX[20]	c.1934dupG	p.Gly646Trpfs
55	63/F	secondary	46,XX[5] / 46,XX,del(7)(q22)[1]	c.2060G>A	p.Cys688Tyr

Γ2.1.3 Συσχέτιση των μεταλλάξεων του γονιδίου ASXL1 με τα καρυοτυπικά ευρήματα των ασθενών

Η καρυοτυπική ανάλυση ήταν επιτυχής σε 352 ασθενείς με ΟΜΛ (352/360, 97.7%) και καρυοτυπικές αλλοιώσεις παρατηρήθηκαν στο 71.6% (252/352) των ασθενών. Η συχνότητα των μεταλλάξεων ASXL1 ήταν παρόμοια σε ασθενείς με παθολογικούς καρυότυπους (15.5%) και σε ασθενείς με φυσιολογικούς καρυότυπους (13%) ($p = 0.55$). Δεν βρέθηκε συσχέτιση των μεταλλάξεων ASXL1 με σύνθετους (16.7% έναντι 14.3%, $p = 0.63$) ή μονοσωμικούς καρυότυπους (16.4% έναντι 14.5%, $p = 0.72$). Μεταξύ των ασθενών με μετάλλαξη στο ASXL1 με πληροφοριακό καρυότυπο, το 75% (39/52) είχε παθολογικούς καρυότυπους και το 25% φυσιολογικούς καρυότυπους (13/52). Η πιο συνηθισμένη χρωμοσωμική ανωμαλία σε ασθενείς με μετάλλαξη στο ASXL1 ήταν η τρισωμία 8 στο 23.1% (12/52) ακολουθούμενη από αλλοιώσεις στο χρωμόσωμα 11 στο 15.4% (8/52), -7/del(7q) στο 9.6%

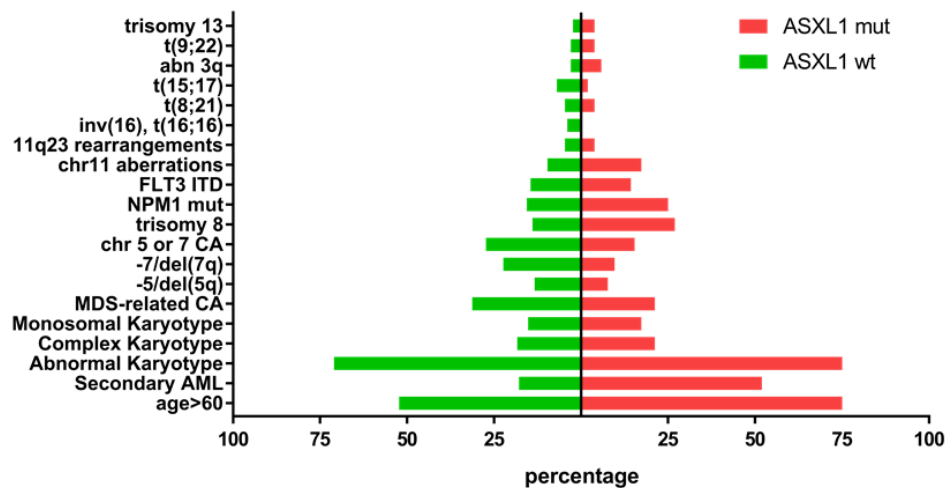
(5/52) , -5/del (5q) στο 7.7% (4/52), αλλοιώσεις στο 3q στο 5.8% (3/52), t (8;21) στο 3.8% (2/52), τρισωμία 13 στο 3.8% (2/52) και t (15;17) στο 1.9% (1/52).. Επιπλέον, οι μεταλλάξεις *ASXL1* ήταν λιγότερο συχνές σε ασθενείς με καθορισμένες από τον ΠΟΥ κυτταρογενετικές ανωμαλίες που σχετίζονται με ΜΔΣ (10.5% έναντι 16.6%, $p = 0.14$) (Πίνακας 13).

Πίνακας 13. Χρωμοσωμικές αλλοιώσεις σε ασθενείς με αλλοιώσεις στο γονίδιο *ASXL1*.

Χρωμοσωμικές αλλοιώσεις	Ασθενείς με <i>ASXL1</i> μεταλλάξεις % (no)
trisomy 8	23.1%(12/52)
11 abnormalities	15.4% (8/52)
-7/del7q	9.6% (5/52)
-5/del5q	7.7% (4/52)
3q	5.8% (3/52)
t(8;21)	3.8% (2/52)
t(9;22)	3.8% (2/52)
trisomy 13	3.8% (2/52)
t(15;17)	1.9% (1/52)
-Y	1.9% (1/52)

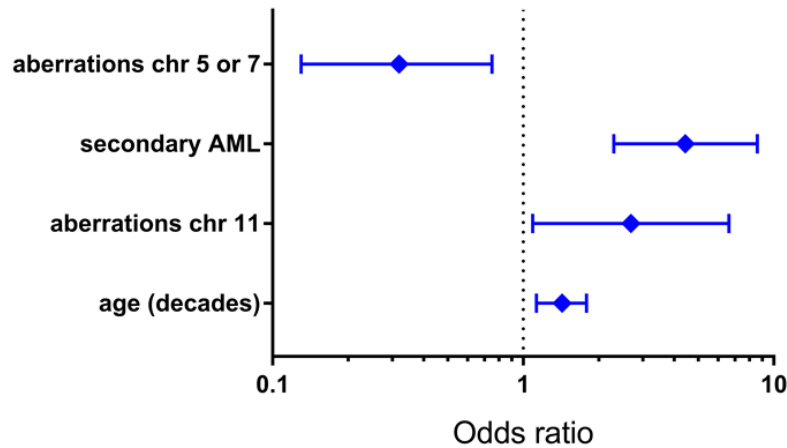
Επίσης στην παρούσα διατριβή, παρατηρήθηκε αντίστροφη σχέση μεταξύ των μεταλλάξεων *ASXL1* με τις αλλοιώσεις -7/del (7q) και -5/del (5q) ως ομάδα (8.9% έναντι 16.8%, $p = 0.07$). Παρόλα αυτά, οι μεταλλάξεις *ASXL1* ήταν σημαντικά συχνότερες μεταξύ των ασθενών με τρισωμία 8 (25% έναντι 12.8%, $p = 0.02$) και σε ασθενείς με αλλοιώσεις του χρωμοσώματος 11 (23.7% έναντι 13.7%, $p = 0.1$). Κανένας από τους 12 ασθενείς με inv(16)/t(16; 16) δεν παρουσίασε μετάλλαξη ενώ το 12.5% (2/16) των ασθενών με t(8;21) είχαν μεταλλάξεις στο *ASXL1*. Επιπλέον, μεταλλάξεις *ASXL1* ανιχνεύθηκαν στο 25%

(3/12) των ασθενών με αλλοιώσεις στο 3q, στο 22% (2/9) με τρισωμία 13, στο 18% (2/11) με t (9; 22) και μόνο στο 4.5% (1/22) των ασθενών με t(15;17) (Διάγραμμα 1). Τα συνολικά αποτελέσματα των ασθενών με μεταλλαξη στο γονίδιο *ASXL1* και των ασθενών χωρίς μεταλλαξη στο γονίδιο παρουσιάζονται στο πίνακα 14.



Διάγραμμα 1. Συχνότητα των χρωμοσωμικών αλλοιώσεων σε ασθενείς με *ASXL1*mut και *ASXL1*wt

Η πολυμεταβλητή λογιστική ανάλυση έδειξε ότι ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες της παρουσίας μεταλλάξεων *ASXL1* ήταν η μεγαλύτερη ηλικία (OR 1.43 ανά δεκαετία, 95% CI 1.13-1.79), οι αλλοιώσεις του χρωμοσώματος 11 (OR 2.69, 95% CI 1.09-6.63) και η δευτεροπαθής ΟΜΛ (OR 4.44, 95% CI 2.3-8.57), ενώ οι αλλοιώσεις -7/del (7q) ή -5/del(5q) συνδέονται με χαμηλή συχνότητα μεταλλάξεων (OR 0.32, 95% CI 0.13-0.75) (Διάγραμμα 2).



Διάγραμμα 2. Λογιστική σχέση (Odds ratio) μετά από στατιστική πολυπαραγοντική λογιστική ανάλυση.

Πίνακας 14. Χαρακτηριστικά των ασθενών με μετάλλαξη και χωρίς μετάλλαξη στο εξώνιο 12 του γονιδίου *ASXL1*

Χαρακτηριστικά	<i>ASXL1</i> wt	<i>ASXL1</i> mut	Σύγκριση
Ηλικία	μέση 61.5, IQR 47-72 έτη, N=304	median 72, IQR 60-76 έτη, N=52	Mann-Whitney p=0.0001
Φύλο	Θήλυ 44.8%, Άρρεν 55.2%, N=308	Θήλυ 40.4%, Άρρεν 59.6%, N=52	chi-square p=0.55
Λευκοκύτταρα στη διάγνωση	median 11.6, IQR 2.6-33.1 x10E9/L, N=92	median 29, IQR 3-40 x10E9/L, N=19	Mann-Whitney p=0.17
s-ΟΜΛ	17.9%, N=55/308	51.9%, N=27/52	chi-square p<0.001
ΜΔΣ	13.6 %, N=42/308	40.4 %, N=21/52	
ΜΔΣ/ΜΥΝ (ΧΜΜΛ)	N=3/308	N=1/52	
ΜΥΝ (ΙΘ., ΜΙ, ΡV)	N=10/308	N=3/52	
ΧΜΛ	N=2/308	N=2/52	
FLT3	14.5%, N=9/62	14.3%, N=1/7	Fisher's exact p=0.7
NPM1 mut	15.6%, N=10/64	16.7%, N=2/8	Fisher's exact p=0.6
Παθολογικός καρυότυπος	71%, N=213/300	75%, N=39/52	chi-square p=0.55

CBF	8.7%, N=26/300	3.85%, N=2/52	Fisher's exact p=0.4
t(8;21)	4.7%, N=14/300	3.85%, N=2/52	Fisher's exact p=0.6
inv(16)	4%, N=12/300	0%, N=0/52	Fisher's exact p=0.23
Σύνθετος	18.3%, N=55/300	21.2%, N=11/52	chi-square p=0.63
Μονοσωμικός	15.3%, N=46/300	17.3%, N=9/52	Fisher's exact p=0.68
ΜΔΣ-related	31.3%, N=94/300	21.15%, N=11/52	chi-square test p=0.14
chr 5 or 7 μονοσωμίες/ελλείψεις	27.3%, N=82/300	15.3%, N=8/52	Fisher's exact p=0.084
"-5, del(5q)"	13.3%, N=40/300	7.7%, N=4/52	Fisher's exact p=0.36
"-7, del(7q)"	22.3%, N=67/300	9.6%, N=5/52	Fisher's exact p=0.04
chr 11 αλλοιώσεις	9.7%, N=29/300	17.3%, N=9/52	Fisher's exact p=0.14
αναδιατάξεις 11q23	4.7%, N=14/300	3.85%, N=2/52	Fisher's exact p=1.0
trisomy 8	14%, N=42/300	26.9%, N=14/52	chi-square p=0.02
trisomy 13	2.3%, N=7/300	3.85%, N=2/52	Fisher's exact p=0.63

Γ3. Μελέτη μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου *RAD21*

Γ3.1 Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών με ΟΜΛ και συσχέτιση με τη μεθυλίωση του γονιδίου *RAD21*

Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής, πραγματοποιήθηκε μελέτη της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου *RAD21* σε ασθενείς με πρωτοπαθή και δευτεροπαθή ΟΜΛ. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν 60 δείγματα μυελού των οστών ενήλικων ασθενών με ΟΜΛ, εκ των οποίων 42 είχαν πρωτοπαθή ΟΜΛ και 18 δευτεροπαθή ΟΜΛ. Παράλληλα, ο ίδιος έλεγχος έγινε και σε 10 δείγματα περιφερικού αίματος υγιών δοτών, εκ των οποίων στους τρεις υπήρχε και μυελός των οστών.

Ο έλεγχος μεθυλίωσης ήταν επιτυχής σε όλους τους υγιείς δότες και στους 60 ασθενείς. Όλοι οι υγιείς δότες έφεραν μη μεθυλιωμένους υποκινητές για το γονίδιο *RAD21*. Αντίθετα, μεταξύ των ασθενών που μελετήθηκαν, το 15% (9/60) παρουσίασε μεθυλιωμένο υποκινητή του γονιδίου *RAD21*. Ως εκ τούτου, η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι η μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου απαντάται αποκλειστικά στους ασθενείς με ΟΜΛ ($p=0.225$, $\chi^2=1.47$, $df=1$). Ο βαθμός μεθυλίωσης στους ασθενείς βρέθηκε να ποικίλει. Αναλυτικότερα, το 5% των ασθενών (3/60) παρουσίασε μεθυλίωση στο 11-50% των αναλυθέντων κυττάρων, το 6.6% των ασθενών (4/60) στο 50%-89% των κυττάρων και το 3.3% των ασθενών (2/60) είχε >90% ποσοστό μεθυλιωμένων κυττάρων.

Η υπό μελέτη ομάδα ασθενών με επιτυχή αποτελέσματα για τον έλεγχο της μεθυλίωσης του *RAD21*, περιλαμβάνει 33 άντρες (33/60, 55%) και 27 γυναίκες (27/60, 45%), με αναλογία αντρών/γυναικών 1.2/1. Η ομάδα των μαρτύρων αποτελείται από 6 άντρες (6/10, 60%) και 4 γυναίκες (4/10, 40%), με αναλογία αντρών/γυναικών 1.5/1. Η μέση ηλικία ήταν 58.5 έτη (εύρος 20-88 έτη) για τους ασθενείς και 64.8 έτη (εύρος 18-93 έτη) για την ομάδα των υγιών δοτών. Από την ομάδα των ασθενών 42 ασθενείς (42/60, 70%) έπασχαν από πρωτοπαθή ΟΜΛ και 18 ασθενείς (18/60, 30%) από δευτεροπαθή ΟΜΛ από τους οποίους 13 ασθενείς είχαν προηγουμένως διαγνωσθεί με Μυελοδυσπλαστικό Σύνδρομο (ΜΔΣ), 1 ασθενής με Χρόνια Μυεομονοκυτταρική Λευχαιμία (ΧΜΜΛ) και 2 ασθενείς με Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία (ΧΜΛ).

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μετά από σύγκριση των συχνοτήτων μεθυλίωσης του υπό μελέτη υποκινητή μεταξύ ασθενών με

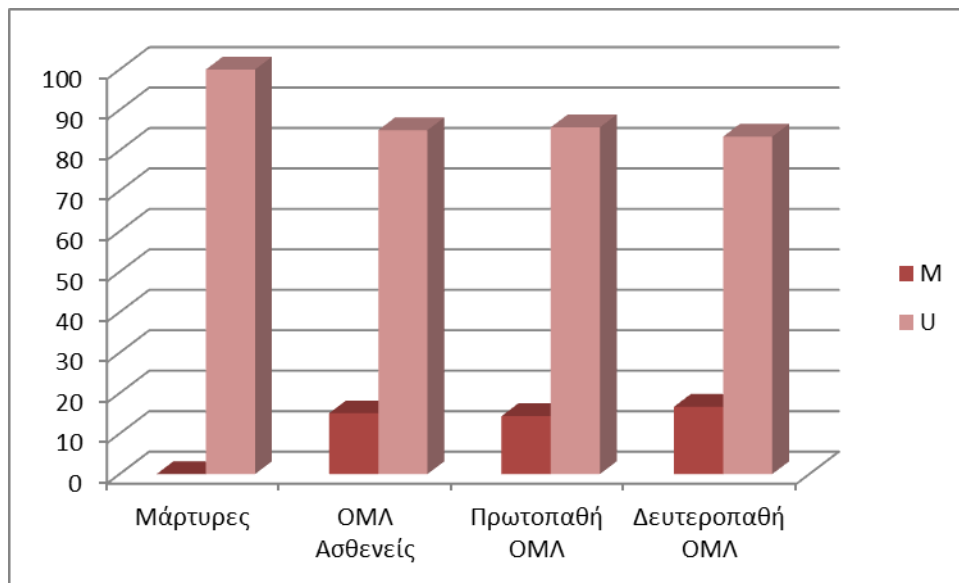
πρωτοπαθή και δευτεροπαθή ΟΜΛ ($p= 0.839$, $\chi^2=4.11$, $df=1$). Εμφανίστηκε όμως ένα ελαφρώς αυξημένο ποσοστό μεθυλιωμένου υποκινητή στους ασθενείς με δευτεροπαθή ΟΜΛ (3/18, 16.6%), έναντι του μικρότερου ποσοστού που παρατηρήθηκε στους ασθενείς με πρωτοπαθή ΟΜΛ (6/42, 14.3%). Επιπλέον, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μετά από σύγκριση των ασθενών με s-ΟΜΛ με την ομάδα ελέγχου ($p= 0.209$, $\chi^2=1.58$, $df=1$) και μετά από σύγκριση των ασθενών με *de novo* ΟΜΛ με τους μάρτυρες ($p=0.238$, $\chi^2=1.39$, $df=1$). Η συχνότητα της παρουσίας ή απουσίας μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου *RAD21* στο σύνολο των ασθενών, όσο και στις επιμέρους οντότητες των *de novo* και s- ΟΜΛ και των μαρτύρων παρουσιάζονται στον Πίνακα 15 και στο Διάγραμμα 3..

Πίνακας 15. Συχνότητα μεθυλιωμένου (M) και μη-μεθυλιωμένου (U) υποκινητή του γονιδίου *RAD21* σε ΟΜΛ ασθενείς και μάρτυρες.

Ομάδα	No	M (%)	U (%)	<i>p</i> -value	<i>p</i> *-value
Μάρτυρες	10	0 (0.0)	10 (100.0)		<i>ns</i>
ΟΜΛ Ασθενείς	60	9 (15)	54 (85)		
Πρωτοπαθή ΟΜΛ	42	6 (14.3)	36 (85.7)	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Δευτεροπαθή ΟΜΛ	18	3 (16.6)	15 (83.4)		<i>ns</i>

*p**-value: σύγκριση κάθε ομάδας ασθενών με την ομάδα των μαρτύρων.

Διάγραμμα 3. Συχνότητα εμφάνισης μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου *RAD21* στους ασθενείς με ΟΜΛ και στους μάρτυρες.



Γ3.2. Συσχέτιση μεθυλίωσης του γονιδίου *RAD21* με τα καρυοτυπικά ευρήματα των ασθενών.

Η συσχέτιση της παρουσίας ή όχι μεθυλιωμένου υποκινητή του γονιδίου *RAD21* σε συνάρτηση με τα κυτταρογενετικά ευρήματα των ασθενών αποτυπώνονται στον Πίνακα 16. Η υψηλότερη συχνότητα μεθυλιωμένου υποκινητή στους ασθενείς με παθολογικό καρυότυπο (9/51, 17.6%) έναντι αυτών με φυσιολογικό καρυότυπο (0/9, 0%) δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0.215$). Παρόλα αυτά η περαιτέρω κατηγοριοποίηση των ασθενών με παθολογικό καρυότυπο έδειξε ότι υπάρχει σημαντική συσχέτιση της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου *RAD21* και της παρουσίας ειδικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών.

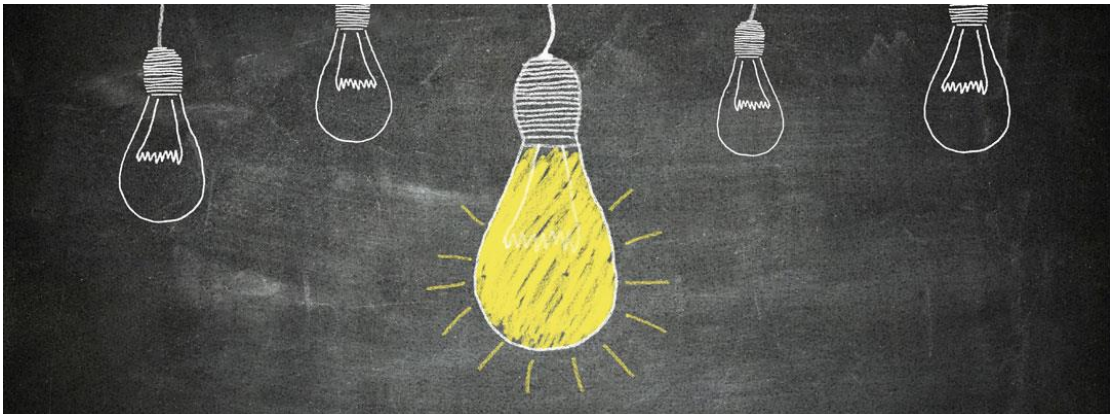
Πίνακας **16.**

Καρυότυπος	No	M (%)	U (%)
Φυσιολογικός	9	0 (0)	9 (100)
Παθολογικός	51	9 (17.6)	42 (82.4)
+8	11	3 (27.3)	8 (72.7)
inv(16)	2	1 (50)	1 (50)
abn. 11q23	3	1 (33.3)	2 (66.7)
-Y	2	1 (50)	1 (50)
t(15;17)	4	1 (25)	3 (75)
t(9;22)	6	2 (33.3)	4 (66.7)
Σύνθετος καρυότυπος	10	0 (0)	10 (100)

Συχνότητες μεθυλιωμένου (M) και μη-μεθυλιωμένου (U) υποκινητή του γονιδίου *RAD21* ανά κυτταρογενετική κατηγορία ασθενών.

Η κατηγοριοποίηση των ασθενών βάσει κυτταρογενετικών αλλοιώσεων έδειξε μεθυλιωμένους υποκινητές του γονιδίου *RAD21* στο 27.3% των ασθενών (3/11) με +8, στο 50% των ασθενών (1/2) με inv(16), στο 50% των ασθενών (1/2) με -Y, στο 25% των ασθενών (1/4) με t(15;17) στο 33.3% των ασθενών (2/6) με t(9;22) και στο 33.3% των ασθενών (1/3) με αλλοιώσεις στο 11q. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι κανένας από τους ασθενείς με φυσιολογικό καρυότυπο δεν παρουσίασε μεθυλίωση στο υποκινητή του γονιδίου *RAD21*.

Δ.ΣΥΖΗΤΗΣΗ



Δ1. Κυτταρογενετική ανάλυση ασθενών με ΟΜΛ

Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής αναλύθηκαν καρυοτυπικά 360 ενήλικες ασθενείς με ΟΜΛ (278 με *de novo* ΟΜΛ και 82 με s-ΟΜΛ), προκειμένου να ελεγχθούν για την ύπαρξη κλωνικών δομικών και/ή αριθμητικών χρωμοσωμικών αλλοιώσεων. Η αναλογία φύλου άρρεν/θήλυ ήταν 1.2/1 δείχνοντας ελαφρά επικρατέστερο το ανδρικό φύλο. Οι ηλικίες των ασθενών κυμαίνονταν από τα 18 έως τα 95 έτη με μέση ηλικία τα 64.2 έτη. Τόσο η αναλογία φύλου όσο και ο μέσος όρος ηλικίας είναι σύμφωνος με τις βιβλιογραφικές αναφορές (Cheng Y. et al. 2009; Deschler B. et Lubbert M. 2006; O'Donnell MR. et al. 2008).

Όσον αφορά τους υπότυπους κατά FAB, η κατηγοριοποίηση των ασθενών της παρούσας μελέτης είναι συγκρίσιμη με προηγούμενες αναφορές που περιλαμβάνουν μεγάλες σειρές ασθενών με *de novo* ΟΜΛ. Πιο συγκεκριμένα, ο πιο συχνός υπότυπος κατά FAB στην εργασία αυτή ήταν ο M2 ακολουθούμενος από τους M3, M4, M5, M1, M0, M6 και M7. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι υπότυποι M0, M6 και ιδιαίτερα ο υπότυπος M7 είναι σπάνιοι, ενώ οι συχνότητες των πιο κοινών υποτύπων παρουσιάζουν μεταβλητότητα: M2 (εύρος 27%-34%), M4 (εύρος 13%-27%), M5 (εύρος 12%-26%) και M1 (εύρος 16%-27%) (Walter RB. et al. 2013). Στην ομάδα των ασθενών μας η συχνότητα του υποτύπου M1 είναι μικρότερη από αυτή της βιβλιογραφίας. Αυτή η διαφορά μπορεί να είναι τυχαία ή μπορεί να οφείλεται στην έκθεση των ασθενών σε διαφορετικούς γονοτοξικούς παράγοντες ή στην γενετική ετερογένεια των πληθυσμών.

Οι συχνότητες των κυτταρογενετικών αλλοιώσεων που ανιχνεύθηκαν στο σύνολο των ασθενών με επιτυχή καρυοτυπική ανάλυση (97.8%) ήταν συγκρίσιμες με τις αντίστοιχες συχνότητες που αναφέρονται στην τελευταία έκδοση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας για την ΟΜΛ καθώς και με διεθνείς μελέτες που περιλαμβάνουν

μεγάλο αριθμό ασθενών με OML (Mrozek K. et al. 2004; Grimwade D. et al. 2010, Grimwade D. et al. 2011; Marchesi F. et al. 2011; Döhner H. et al. 2017).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας οι πιο συχνές χρωμοσωμικές ανωμαλίες στο σύνολο των ασθενών ήταν οι $-7/\text{del}(7q)$ (16.5%) και $-5/\text{del}(5q)$ (11.9%), εύρημα που είναι σύμφωνο με τα διεθνή βιβλιογραφικά δεδομένα (Dohner H. et al. 2012). Πιο συγκεκριμένα, οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες $-5/\text{del}(5q)$ και $-7/\text{del}(7q)$ αντιπροσωπεύουν το 8.1-13.3% των ασθενών με *de novo* OML, ενώ βρίσκονται στο 24.6-27.2% των ασθενών με *s*-OML. Γενικότερα, παρατηρήθηκε αυξημένο ποσοστό παθολογικών καρυοτύπων σε ασθενείς με *s*-OML (83.9%) σε σχέση με τους *de novo* (66.4%). Το αυξημένο αυτό ποσοστό κυτταρογενετικών αλλοιώσεων στους ασθενείς με δευτεροπαθή OML πιθανά να οφείλεται στη χημιοθεραπεία ή/και στις ακτινοβολίες που χρησιμοποιήθηκαν για τη θεραπεία του προηγούμενου νοσήματος τους.

Μετά από κατηγοριοποίηση των ασθενών μας με *de novo* OML σε τρεις προγνωστικές ομάδες (καλής, ενδιάμεσης και κακής πρόγνωσης) βάση των κυτταρογενετικών τους ευρημάτων, πραγματοποιήθηκε σύγκριση τους με αυτά μιας μεγάλης σειράς ασθενών (1550 ασθενείς) με *de novo* OML (Mrozek K. et al. 2012). η οποία έδειξε ετερογένεια στα ποσοστά των προγνωστικών ομάδων μεταξύ των ασθενών μας και των ασθενών της παραπάνω μελέτης. Η ετερογένεια αυτή πιθανά να οφείλεται σε παράγοντες, όπως η διαφορετική περιβαλλοντική έκθεση, η διαφορετική γεωγραφική κατανομή καθώς και η ηλικία των ασθενών. Επίσης, στην παρούσα διατριβή, οι ασθενείς με *s*-OML παρουσίασαν αυξημένο ποσοστό αλλοιώσεων κακής πρόγνωσης (80.5%), εύρημα σύμφωνο με τη διεθνή βιβλιογραφία (Arber DA. et al. 2003; Yanada M. et al. 2005; Preiss BS. et al. 2010; Boddu et al. 2017).

Δ2. Μελέτη μεταλλάξεων του γονιδίου *ASXL1* σε ασθενείς με OML

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, πραγματοποιήθηκε μελέτη των μεταλλάξεων του γονιδίου *ASXL1* σε ασθενείς με ΟΜΛ για τη διερεύνηση του πιθανού ρόλου των μεταλλάξεων του γονιδίου *ASXL1*, στην εμφάνιση της ΟΜΛ.

Στη παρούσα διατριβή, πραγματοποιήθηκε η ανίχνευση μεταλλάξεων του γονιδίου *ASXL1* σε ασθενείς με ΟΜΛ και η συσχέτισή τους με τα κυττρογενετικά, δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *ASXL1* ανευρέθησαν μόνο στην ομάδα των ασθενών και όχι στην ομάδα των υγιών μαρτύρων. Πιο συγκεκριμένα, οι συχνότητες των μεταλλάξεων *ASXL1* που παρατηρήθηκαν σε ασθενείς με ΟΜΛ (14.4%, 32.9% σε s-ΟΜΛ, 9% σε de novo ΟΜΛ) σε αυτή τη μελέτη είναι παρόμοιες με αυτές που αναφέρονται σε προηγούμενες μελέτες (19.3-58% σε s-ΟΜΛ, 4.5-10.8 % σε de novo ΟΜΛ) (Paschka P et al. 2015; Chou WC et al. 2010; Gelsi-Boyer V et al. 2012; Pratorcorona M et al. 2012). Το εύρημα αυτό υποδεικνύει τον πιθανό ρόλο του γονιδίου *ASXL1* στην παθογένεση της ΟΜΛ.

Σε συμφωνία με άλλες μελέτες διαπιστώσαμε ότι η συχνότητα των μεταλλάξεων *ASXL1* αυξάνεται με την ηλικία. Πιο συγκεκριμένα, η συχνότητα των μεταλλάξεων *ASXL1* ήταν 19.7% σε ασθενείς ηλικίας > 60 ετών έναντι 4.9% σε ασθενείς ηλικίας ≤40. Οι Metzeler et al παρατήρησαν ότι οι μεταλλάξεις *ASXL1* ήταν 5 φορές πιο συχνές σε ασθενείς ηλικίας 60 ετών και άνω (16.2%) από ότι σε νεότερους ασθενείς (3.2%), ενώ οι Chou et al ανίχνευσαν μεταλλάξεις *ASXL1* στο 5.4% των νεότερων ασθενών με ΟΜΛ και στο 18% των ηλικιωμένων ασθενών (Metzeler KH et al. 2011; Chou WC et al. 2010). Είναι γνωστό ότι όσο αυξάνεται η ηλικία, αυξάνεται και η αθροιστική δράση των περιβαλλοντικών εκθέσεων, η οποία εμπλέκεται στους μηχανισμούς παθογένεσης της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας. Σύμφωνα λοιπόν με τα παραπάνω, μπορούμε να υποθέσουμε ότι άτομα μεγαλύτερης ηλικίας λόγω περιβαλλοντικής ή επαγγελματικής έκθεσης γονοτοξικών ουσιών και ανάλογα με το τρόπο ζωής τους (π.χ. κάπνισμα, κατανάλωση αλκοόλ, κ.ά.) είναι πιο πιθανό να αποκτήσουν κάποια μετάλλαξη στο

γονίδιο *ASXL1* και λόγω της συσσώρευσης και άλλων γενετικών ή επιγενετικών αλλαγών να είναι πιο ευάλωτα να αναπτύξουν ΟΜΛ.

Οι ασθενείς με *ASXL1* μεταλλάξεις είχαν χαμηλότερο αριθμό λευκοκυττάρων στη διάγνωση σε σύγκριση με τους ασθενείς χωρίς *ASXL1* μεταλλάξεις (μέση τιμή 29 έναντι $11.5 \times 10^9/L$). Το παραπάνω εύρημα έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Paschka et al (Paschka et al. 2015). Εκτός από τις κυτταρογενετικές και μοριακές ανωμαλίες, ο υψηλός αριθμός λευκοκυττάρων κατά την διάγνωση, θεωρείται ένας ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για την κακή έκβαση της νόσου τόσο στους ενήλικες όσο και στα παιδιά με ΟΜΛ (Koh et al., 2010). Ωστόσο, ο ρόλος του αριθμού λευκοκυττάρων κατά την διάγνωση σε συνδιασμό με την ύπαρξη μεταλλάξεων *ASXL1* στην πρόγνωση των ασθενών είναι ακόμα υπό διερεύνηση.

Αντίθετα δεν παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ μεταλλάξεων *ASXL1* και του αριθμού των αιμοπεταλίων ή της αιμοσφαιρίνης εύρημα που επιβεβαιώνεται και από άλλες μελέτες (Schnittger et al. 2013; Chou et al. 2010).

Η ανίχνευση μεταλλάξεων *ASXL1* σε ασθενείς με χρόνιες μυελογενείς διαταραχές (πχ. ΜΔΣ, ΙΘ, ΧΜΜΛ) πριν από την εξέλιξη της νόσου σε ΟΜΛ, καθώς και η υψηλή συχνότητα των μεταλλάξεων *ASXL1* σε ασθενείς με δευτεροπαθή ΟΜΛ υποστηρίζουν την άποψη ότι αυτές οι μεταλλάξεις αντιπροσωπεύουν ένα σχετικά πρώιμο γεγονός στη λευχαιμογένεση (Paschka P et al. 2015). Δυστυχώς η διεξαγωγή περαιτέρω ανάλυσης δεν κατέστη δυνατή, λόγω της μη διαθεσιμότητας δειγμάτων των ασθενών μας πριν διαγνωστούν με ΟΜΛ. Ωστόσο, οι Schnittger et al έχουν αναφέρει ότι μεταλλάξεις *ASXL1* ήταν ήδη παρούσες σε ασθενείς στο στάδιο ΜΔΣ, ενώ και άλλες μελέτες παρέχουν επιπλέον στοιχεία αναφέροντας ότι οι μεταλλάξεις *ASXL1* ευνοούν την ανάπτυξη της ΟΜΛ από ΜΔΣ ή ΧΜΜΛ (Vainchenker W et al., 2011; Gelsi-Boyer V et al. 2012; Pratorcorona M et al. 2012; Papaemmanuil E et al. 2013; Thol F et al. 2011). Η υψηλή συχνότητα των μεταλλάξεων *ASXL1* σε ασθενείς με δευτεροπαθή ΟΜΛ πιθανά

να οφείλεται στην συσσωρευτική γονοτοξική έκθεση των ασθενών αυτών λόγω της προηγηθείσας χημειο/ακτινοθεραπείας ή λόγω των προϋπάρχοντων μεταλλάξεων *ASXL1* στο προηγούμενο νόσημα (Jaiswal S et al. 2014; Xie M et al. 2014; Genovese G et al. 2014; McKerrell T et al. 2015)

Οι μεταλλάξεις που ανιχνεύτηκαν στο γονίδιο *ASXL1* ήταν όλες ετερόζυγες. Σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, η μετάλλαξη c.1934dupG (p.G646WfsX12) ήταν η πιο συχνή ανάμεσα στους ασθενείς με μετάλλαξη *ASXL1* σε ποσοστό 84.6% (Schnittger et al. 2013; Carbuccia et al. 2009; Gelsi-Boyer et al. 2012; Herold et al. 2014; Devillier et al. 2012). Οι μεταλλάξεις p.G646WfsX12 (n=44), p.R634KfsX24 (n=2) και p.E635RfsX15 (n=1), είναι μεταλλάξεις αλλαγής πλαισίου (frameshift), ενώ οι μεταλλάξεις p.Ile593Val (c.1779A>G, n=1) και p.Cys688Tyr (c.2060G>A, n=4) είναι μεταλλάξεις χωρίς νόημα (missense). Οι τελευταίες δύο μεταλλάξεις (p.Ile593Val και p.Cys688Tyr) δεν έχουν αναφερθεί ξανά είτε σαν SNPs στο γονίδιο *ASXL1* είτε σαν παραλλαγές μιας βάσης του γονιδίου (Herold et al. 2014; Devillier et al. 2012).

Υπάρχουν μόνο λίγες μελέτες στην ΟΜΛ που αξιολογούν την συσχέτιση των μεταλλάξεων *ASXL1* με τα κυτταρογενετικά ευρήματα. Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε παρόμοια συχνότητα μεταλλάξεων μεταξύ ασθενών με φυσιολογικούς και παθολογικούς καρυοτύπους. Το παραπάνω εύρημα έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (Chou et al. 2010; Zong et al. 2017).

Η συσχέτιση των μεταλλάξεων *ASXL1* με τις κυτταρογενετικές αλλοιώσεις των ασθενών, έδειξε ότι η τρισωμία 8 ήταν η συχνότερη χρωμοσωμική ανωμαλία ανάμεσα σε ασθενείς με μετάλλαξη (12/52, 23.1%). Το εύρημα αυτό επιβεβαιώνεται από προηγούμενες μελέτες (Paschka et al., 2015; Chou et al., 2010; Zong et al., 2017). Ωστόσο, μετά από πολυμεταβλητή λογιστική στατιστική ανάλυση (Multivariate logistic regression) παρατηρήθηκε ότι η τρισωμία 8 δεν είχε ανεξάρτητη προγνωστική αξία για την παρουσία μεταλλάξεων *ASXL1*. Οι ανωμαλίες του χρωμοσώματος 11 [del (11q), t

(11), add (11p)] εμφανίστηκαν ως οι δεύτερες πιο συχνές αλλοιώσεις μεταξύ των ασθενών με μετάλλαξη *ASXL1* (8/52, 15.4%). Οι Pratscorona et al διαπίστωσαν επίσης ότι οι μεταλλάξεις *ASXL1* ήταν συχνές σε ασθενείς με αλλοιώσεις στο 11q23. Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες -5/del(5q) και -7/del(7q) ήταν οι λιγότερες συχνές στους ασθενείς με μετάλλαξη *ASXL1* (7.7% και 9.6% αντίστοιχα) σε σύγκριση με τους ασθενείς με φυσιολογικό *ASXL1*. Αυτή η αντίστροφη συσχέτιση διατήρησε τη σπουδαιότητά της και κατά την στατιστική ανάλυση με τεχνική λογιστικής παλινδρόμησης.

Άλλες λιγότερο συχνές χρωμοσωμικές ανωμαλίες που παρατηρήθηκαν στους ασθενείς με μετάλλαξη ήταν οι μεταθέσεις t(8;21) (3.8%), t(9;22) (3.8%) και η τρισωμία 13 (3.8%). Τα αποτελέσματά μας επιβεβαιώνουν την ύπαρξη μεταλλάξεων *ASXL1* σε ασθενείς με t(8;21) αλλά σε χαμηλότερη συχνότητα (3.8%) σε σύγκριση με προηγούμενες μελέτες (8-9,9%) (Chou et al., 2010; Xie et al 2014; Zong et al. 2017). Η συσχέτιση των μεταλλάξεων *ASXL1* με την τρισωμία 13 έχει επίσης αναφερθεί από τους Herold et al. 2014. Η τρισωμία 13 ως μεμονωμένη αλλοίωση αποτελεί μια ομογενή κατηγορία OML με υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων σε γονίδια spliceosome και κακή πρόγνωση (Herold et al., 2014). Στο σύνολο των ασθενών μας με τρισωμία 13, το 22.2% παρουσίασε μεταλλάξεις *ASXL1*, επιβεβαιώνοντας τη συνύπαρξη των μεταλλάξεων *ASXL1* με την τρισωμία 13. Οι μεταλλάξεις *ASXL1* απουσίαζαν εξ' ολοκλήρου από τους ασθενείς που έφεραν inv(16), επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα μιας προηγούμενης μελέτης. Πιο συγκεκριμένα, οι Peter Paschka et al διαπίστωσαν ότι κανένας από τους 106 ασθενείς με OML και inv(16) δεν έφερε μεταλλάξεις *ASXL1* (Paschka et al., 2014). Οι Chou et al 2010 εξέτασαν τις μεταλλάξεις στο εξόνιο 12 του γονιδίου *ASXL1* σε 501 ενήλικες ασθενείς με de novo OML και διαπίστωσαν ότι οι μεταλλάξεις ήταν σε πολύ χαμηλή συχνότητα σε ασθενείς με t(15;17) και με σύνθετο καρυότυπο. Οι Devillier et al 2015 μελέτησαν 149 ασθενείς και παρατήρησαν χαμηλή συχνότητα μεταλλάξεων *ASXL1* σε ασθενείς με σύνθετους καρυότυπους (Devillier et al.

2014). Επιβεβαιώνοντας τις προηγούμενες μελέτες διαπιστώσαμε ότι οι μεταλλάξεις *ASXL1* παρατηρήθηκαν σε χαμηλή συχνότητα σε ασθενείς με σύνθετους καρυότυπους ή με t(15;17).

Από όσο γνωρίζουμε, αυτή είναι η πρώτη μελέτη που δείχνει την συνύπαρξη μεταλλάξεων *ASXL1* με t(9;22), αλλοιώσεις στο 3q [inv(3), t(3;3), abn(3q)] και απώλεια του φυλετικού χρωμοσώματος Y σε ασθενείς με OML.

Αρχικά οι μεταλλάξεις *ASXL1* και *NPM1* είχαν χαρακτηριστεί ως αμοιβαία αποκλειόμενες, δηλαδή ότι δεν μπορούν να συνυπάρχουν στους ίδιους ασθενείς. Κανένα από τα 28 περιστατικά με μεταλλάξεις στο γονίδιο *NPM1* δεν είχε μετάλλαξη στο *ASXL1* (Carbuccia et al. 2010) και κανένας από τους 46 OML-ασθενείς με μεταλλάξεις στο *ASXL1* δεν βρέθηκε να φέρει *NPM1* μεταλλάξεις στη μελέτη των Pratcorona et al. (Pratcorona et al., 2012). Οι Patel et al επίσης παρατήρησαν τα ίδια αποτελέσματα (Patel et al. 2012). Ωστόσο, η μελέτη μιας πολύ μεγαλύτερης ομάδας ασθενών με OML από την γερμανο-αυστριακή ομάδα AMLSG (Paschka et al., 2015), ανίχνευσε περιπτώσεις ασθενών με ταυτόχρονη εμφάνιση μεταλλάξεων *ASXL1* και *NPM1* στο 5.9% των ασθενών. Σπάνιες περιπτώσεις με συνυπάρχουσες μεταλλάξεις *NPM1* και *ASXL1* έχουν περιγραφεί και σε άλλες μελέτες. Πιο συγκεκριμένα, στη μελέτη των Chou et al 2010, 2 από τους 54 ασθενείς που έφεραν *ASXL1* μεταλλάξεις ήταν επίσης θετικοί για τις μεταλλάξεις *NPM1*. Ο Metzeler et al παρατήρησαν ότι 2 από τους 38 ασθενείς έφεραν μετάλλαξη τόσο στο γονίδιο *ASXL1* όσο και στο γονίδιο *NPM1*. Στη μελέτη των Schnittger et al 2013 το 63% των ασθενών με φυσιολογικό καρυότυπο και με μεταλλαγμένο *ASXL1* παρουσίασαν μεταλλάξεις και στο γονίδιο *NPM1* (Metzeler et al., 2011; Paschka et al., 2015; Schnittger et al., 2013).

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματά μας υποστηρίζουν τη συσχέτιση των μεταλλάξεων *ASXL1* με την ανάπτυξη OML και ιδιαίτερα με την ανάπτυξη δευτεροπαθούς OML καθώς και με την προχωρημένη ηλικία των ασθενών.

Παρατηρήσαμε μια συσχέτιση με την τρισωμία 8 αλλά το εύρημα αυτό δεν διατήρησε τη σημασία του μετά τη πολυπαραγοντική στατιστική ανάλυση. Οι ανωμαλίες του χρωμοσώματος 11 προέκυψαν ως ένας ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για την ανάπτυξη των μεταλλάξεων *ASXL1*. Παρά την ισχυρή σύνδεση των μεταλλάξεων *ASXL1* με την s-OMΛ (η πλειοψηφία των περιπτώσεων ήταν ΜΔΣ πριν την εξέλιξη της νόσου), τα δεδομένα μας δείχνουν μια αντίστροφη σχέση με τις χρωμοσωμικές αλλοιώσεις $-7 / del(7q)$ ή $-5 / del(5q)$. Επίσης δεν βρέθηκε συσχέτιση των μεταλλάξεων *ASXL1* με σύνθετους ή μονοσωμικούς καρυότυπους. Μετά από λεπτομερή έλεγχο της βιβλιογραφίας, αυτή είναι η πρώτη μελέτη που δείχνει ταυτόχρονη εμφάνιση μεταλλάξεων *ASXL1* με $t(9;22)$ και αλλοιώσεις στο 3q ενώ παρουσιάζονται για πρώτη φορά δύο μεταλλάξεις *ASXL1* που δεν είχαν αναφερθεί προηγουμένως, οι p.Ile593Val και p.Cys688Tyr. Αν και οι μεταλλάξεις *ASXL1* φαίνεται να συνδέονται με συγκεκριμένα κλινικά και κυτταρογενετικά προφίλ, ωστόσο ανιχνεύονται σε όλο το φάσμα των υποτύπων ΟΜΛ με λίγες εξαιρέσεις. Ως αποτέλεσμα, δεδομένης της δυσμενούς προγνωστικής τους σημασίας, όλοι οι νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με ΟΜΛ θα πρέπει να εξετάζονται για την παρουσία των μεταλλάξεων στο γονίδιο *ASXL1* όπως έχει προταθεί πρόσφατα και από τις κατευθυντήριες οδηγίες του LeukemiaNet για την ΟΜΛ (ELN recommendations for AML, 2017, Döhner et al., 2016).

Δ3. Μελέτη μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου *RAD21*

Το γονίδιο *RAD21*, ένα συστατικό του συμπλέγματος cohesion ρυθμίζει τη συνοχή και τον διαχωρισμό χρωμοσωμάτων κατά τη μίτωση, τον έλεγχο του σημείου ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, καθώς και την επιδιόρθωση δίκλωνων ρηγμάτων στον κλώνο του DNA (DNA Double – Strand Break repair – DSB). Επομένως, εικάζεται ότι οι μεταλλάξεις ή η αλλοιωμένο προφίλ μεθυλίωσης στο γονίδιο *RAD21* μπορεί να συμβάλλουν στην αστάθεια του γονιδιώματος και συνεπώς στην ανάπτυξη της ΟΜΛ.

Σύμφωνα με μια πρόσφατη μελέτη [Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia (The Cancer Genome Atlas research network 2013)], το σύμπλοκο cohesin παρουσιάζει ένα σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της ΟΜΛ. Οι μεταλλάξεις του συμπλέγματος Cohesin συνυπάρχουν με άλλες μεταλλάξεις που είναι γνωστό ότι αποτελούν οδηγούς της κλωνικής εξέλιξης. Το *RAD21* είναι ένα βασικό κεντρικό συστατικό του συμπλέγματος cohesin (Xu et al, 2011), η κύρια λειτουργία του οποίου είναι να εξασφαλίσει τον ισορροπημένο διαχωρισμό χρωμοσωμάτων κατά τη μετάπτωση ανάφαση-μετάφαση στη μίτωση (Michaelis et al., 1997; Guacci et al., 2007). Η απώλεια του *RAD21* έχει συσχετιστεί με την κλωνική αναγέννηση των βλαστοκυττάρων του μυελού των οστών, ενώ η ομόζυγη εξάλειψή του έχει ως αποτέλεσμα τον πρώιμο εμβρυϊκό θάνατο (Xu et al., 2011). Επιπλέον, η υπερέκφραση του *RAD21* στον καρκίνο του μαστού σχετίζεται με κακή πρόγνωση και αντοχή στη χημειοθεραπεία (Xu et al., 2011). Όσον αφορά την ΟΜΛ και το *RAD21*, έχουν δημοσιευτεί μόνο λίγες πρόσφατες μελέτες οι οποίες έχουν εντοπίσει μεταλλάξεις του *RAD21* στο 3-6% των ασθενών με πρωτοπαθή ΟΜΛ και στο 22% των ασθενών με οξεία μεγακαρυοβλαστική λευχαιμία (The Cancer Genome Atlas research network; Kon A et al., 2013; Yoshida K et al., 2013). Αυτές οι μεταλλάξεις ταυτοποιήθηκαν σε ολόκληρο το γονίδιο και δεν συσσωρεύτηκαν σε κάποιο συγκεκριμένο εξόνιο, και περιλάμβαναν μεταλλάξεις χωρίς νόημα (nonsense mutations), μετατόπισης πλαισίου (frameshift), συνώνυμες (silent), μικρές παρεμβολές (insertions) ή σημειακές μεταλλάξεις (SNPs, Single nucleotide mutations) (Thota et al. 2014; Solomon et al, 2014; Thol et al. 2014; Dolnik et a. 2012). Επιπλέον, σε μια πρόσφατη μελέτη, οι μεταλλάξεις *RAD21* συσχετίστηκαν με μεταλλάξεις του *NPM1* και αλλοιώσεις του χρωμοσώματος 8 (Anna Dolnik 2012, Felicitas Thol, 2014). Το *RAD21* αναγνωρίστηκε πρόσφατα ως λειτουργικός επιγενετικός παράγοντας σίγασης μαζί με άλλα γονίδια

όπως το *DNMT3A* και το *TRIM24*, τα οποία εμφανίζονται μεταλλαγμένα σε ασθενείς με ΟΜΛ (Anna Dolnik, 2012).

Στα πλαίσια της επιγενετικής διερεύνησης της ΟΜΛ, μελετήθηκε η κατάσταση μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου *RAD21*. Στην παρούσα μελέτη, ο υποκινητής του γονιδίου *RAD21* βρέθηκε μεθυλιωμένος σε ποσοστό 15% του συνόλου των ασθενών με ΟΜΛ. Ένα ελαφρώς αυξημένο ποσοστό μεθυλιωμένου υποκινητή παρατηρήθηκε στους ασθενείς με δευτεροπαθή ΟΜΛ (3/18, 16.6%), έναντι των ασθενών με πρωτοπαθή ΟΜΛ (6/42, 14.3%). Σε κανένα δείγμα υγιούς μάρτυρα (περιφερικό αίμα ή μυελός) δεν βρέθηκε μεθυλιωμένος ο υπό μελέτη υποκινητής. Αξίζει να σημειωθεί ότι η μελέτη αυτή αποτελεί την πρώτη διερεύνηση της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου *RAD21* σε ασθενείς με ΟΜΛ δείχνοντας για πρώτη φορά μια θετική συσχέτιση. Σύμφωνα λοιπόν με τα αποτελέσματα μας, θα μπορούσε να υποστηριχθεί ότι η μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου *RAD21* πιθανόν να εμπλέκεται στην εμφάνιση της ΟΜΛ και/ ιδιαίτερα της s-ΟΜΛ. Πράγματι, πολλές μελέτες υποστηρίζουν ότι παρόλο που το *RAD21* δεν λειτουργεί ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο, η απώλεια της γονιδιακής του έκφρασης λόγω μεθυλίωσης του υποκινητή ίσως αποτελεί ένα πρώιμο συμβάν στη λευχαιμογένεση λόγω της γονιδιακής αστάθειας που προκαλείται. Το *RAD21* ανήκει στην κατηγορία των γονιδίων που εξασφαλίζουν τη σταθερότητα του γονιδιώματος (caretaker gene) και η γονιδιακή αποσιώπηση του μπορεί να προάγει την προδιάθεση σε άλλες γενωμικές αλλαγές που προκαλούνται από καρκινογόνους παράγοντες. Με αυτόν τον τρόπο, παρέχει στα καρκινικά κύτταρα ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα ανάπτυξης (Lin et al, 2001; Kinzler et al, 1997). Συνεπώς, η μη-μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου *RAD21* δεν λειτουργεί μόνο προστατευτικά κατά τον διαχωρισμό χρωμοσωμάτων στη μίτωση, τον έλεγχο του σημείου ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, καθώς και την επιδιόρθωση δίκλωνων ρηγμάτων στον κλώνο του DNA αλλά και για την προστασία εξαλλαγής του κυττάρου σε καρκινικό. Βάσει των

παραπάνω, η επιγενετική αδρανοποίηση του *RAD21* στους ασθενείς με ΟΜΛ μπορεί να ευνοεί τη συσσώρευση γενετικών βλαβών οι οποίες συμβάλλουν στη λευχαιμογένεση.

Τέλος ελέγχθηκε η συσχέτιση της μεθυλίωσης του *RAD21* με την παρουσία συγκεκριμένων χρωμοσωμικών αλλοιώσεων. Η μεγαλύτερη συχνότητα ασθενών με μεθυλίωση του *RAD21* βρέθηκε στην ομάδα των ασθενών με παθολογικό καρυότυπο (17.6%) και πιο συγκεκριμένα σε ασθενείς που έφεραν τρισωμία 8, inv(16), -Y, t(15;17), t(9;22) και αλλοιώσεις του 11q. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι κανένας από τους ασθενείς με φυσιολογικό καρυότυπο δεν παρουσίασε μεθυλίωση στο υποκινητή του γονιδίου, γεγονός που υποδικνύει την πιθανή συμμετοχή της μεθυλίωσης του *RAD21* στη δημιουργία των χρωμοσωμικών αλλοιώσεων της ΟΜΛ

Δ4. Γενικά συμπεράσματα – Μελλοντικές προοπτικές

Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από την παρούσα διδακτορική διατριβή είναι τα ακόλουθα:

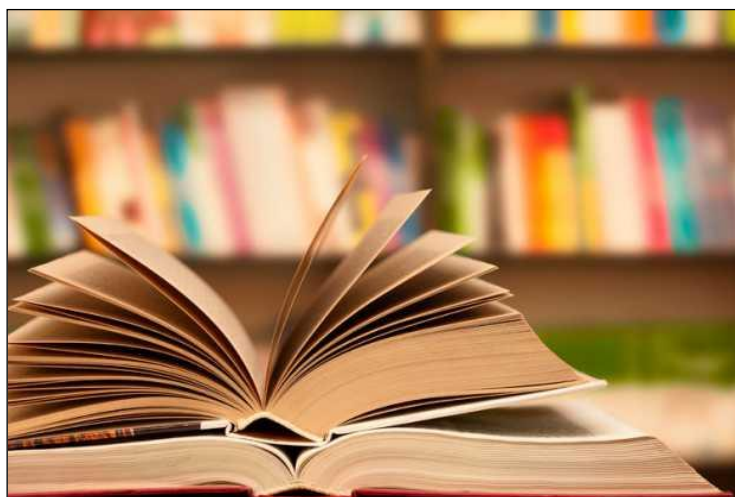
- ✓ Το ποσοστό των αλλοιωμένων καρυοτύπων στο σύνολο των ασθενών με ΟΜΛ ανέρχεται στο 70.5%.
- ✓ Το ποσοστό παθολογικών καρυοτύπων σε ασθενείς με s-ΟΜΛ είναι αυξημένο σε σχέση με τους *de novo* (s-ΟΜΛ 83.9 % vs *de novo* 66.4 %).
- ✓ Οι ασθενείς με s-ΟΜΛ παρουσιάζουν αυξημένο ποσοστό αλλοιώσεων κακής πρόγνωσης.
- ✓ Μεταλλάξεις στο γονίδιο *ASXL1* ανευρέθησαν στο 14.4% των ασθενών με ΟΜΛ (s-ΟΜΛ 32.9% vs *de novo* 9%).
- ✓ Η συχνότητα των μεταλλάξεων *ASXL1* αυξάνεται με την ηλικία, πιθανόν λόγω της συσσώρευσης γονοτοξικών ουσιών από

περιβαλλοντική ή επαγγελματική έκθεση ή προηγούμενο ιστορικό χημειο/ακτινοθεραπείας.

- ✓ Ταυτοποίηση δύο νέων μεταλλάξεων *ASXL1*, οι οποίες δεν έχουν αναφερθεί ξανά στη βιβλιογραφία (p.Ile593Val και p.Cys688Tyr).
- ✓ Θετική συσχέτιση των μεταλλάξεων *ASXL1* με συγκεκριμένες κυτταρογενετικές αλλοιώσεις.
- ✓ Η παρούσα διατριβή που αποτελεί την πρώτη μελέτη της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου *RAD21* σε ασθενείς με ΟΜΛ υποδεικνύει ότι η μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου *RAD21* πιθανόν να εμπλέκεται στην εμφάνιση της ΟΜΛ και ιδιαίτερα της s-ΟΜΛ καθώς και στη δημιουργία συγκεκριμένων κυτταρογενετικών αλλοιώσεων.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής αναδεικνύουν τη συμβολή των γονιδίων *ASXL1* και *RAD21* στην παθογένεση της ΟΜΛ και στην εμφάνιση συγκεκριμένων χρωμοσωμικών αλλοιώσεών της. Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, αναμένεται να συμβάλλουν στην κατανόηση των μηχανισμών λευχαιμογένεσης στην ΟΜΛ καθώς και στη σχεδίαση κατάλληλων εξατομικευμένων θεραπευτικών πρωτοκόλλων ανάλογα με τις επίκτητες γενετικές και επιγενετικές αλλοιώσεις των ασθενών. Η περαιτέρω γενετική και επιγενετική μελέτη των εν λόγω γονιδίων καθώς και η μελέτη επιπλέον γονιδίων σημαντικών για τη λειτουργία της αιμοποίησης και η συσχέτιση τους με τη κλινική πορεία και την έκβαση των ασθενών αποτελούν μελλοντικούς στόχους που θα συμβάλλουν στην περαιτέρω κατανόηση των μηχανισμών παθογένεσης της ΟΜΛ καθώς και στην εξατομικευμένη θεραπεία των ασθενών.

Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ



Abilev SK., Salnikova LE., Rubanovich AV. (2011) Candidate gene association study of the radiosensitivity of human chromosomes with candidate gene polymorphisms upon exposure to gamma-irradiation in vitro and in vitro. *Gig. Sanit.* (5):14-8

Adler V., Yin Z., Fuchs S.Y., Benezra M., Rosario L. et al. (1999) Regulation of JNK signaling by GSTp. *EMBO J.* 18:1321–34

Affatato AA., Wolfe KJ., Lopez MS., Hallberg C., Ammenheuser MM. and Abdel-Rahman SZ. (2004) Effect of XPD/ERCC2 polymorphisms on chromosome aberration frequencies in smokers and on sensitivity to the mutagenic tobacco-specific nitrosamine NNK. *Environ. Mol. Mutagen.* 44(1):65-73

Albin M., Björk J., Welinder H., Tinnerberg H., Mauritzson N., Johansson B., Billström R., Strömberg U., Mikoczy Z., Ahlgren T., Nilsson PG., Mitelman F. and Hagmar L (2000) Acute myeloid leukemia and clonal chromosome aberrations in relation to past exposure to organic solvents. *Scand. J. Work Environ. Health* 26:482-91

Ali-Osman F., Akande O., Antoun G., Mao J.X. and Buolamwini J. (1997) Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. *J. Biol. Chem.* 272(15):10004-12

Allan JM., Smith AG., Wheatley K., Hills RK., Travis LB., Hill DA., Swirsky DM., Morgan GJ. and Wild CP. (2004) Genetic variation in XPD predicts treatment outcome and risk of acute myeloid leukemia following chemotherapy. *Blood* 104(13):3872-7

Allan JM., Wild CP., Rollinson S., Willett EV., Moorman AV. et al. (2001) Polymorphism in glutathione S-transferase P1 is associated with susceptibility to chemotherapy induced leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98(20):11592-7

Amin HM., Yang Y., Shen Y., Estey EH., Giles FJ., Pierce SA., Kantarjian HM.,

O'Brien SM. Et al. (2005) Having a higher blast percentage in circulation than bone marrow: Clinical implications in myelodysplastic syndrome and acute lymphoid and myeloid leukemias. *Leukemia* 19(9):1567–1572

Aoki K., Kurihara M. and Haykawa N. (1992) Death rates for malignant neoplasms for selected sites by sex and five-year age group in 33 countries 1953-1957 to 1983-1987. *International Union Against Cancer*

Arber DA, Brunning RD, Orazi A et al. Acute myeloid leukaemia with myelodysplasia-related changes. In: Swerdlow SH Campo E Harris NL et al., eds. *World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 4th ed. Lyon, France: IARC; 2008:124–126.

Arber DA, Orazi A, Hasserjian R et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016; 127(20):2391-405.

Arber DA., Stein AS., Carter NH., Ikle D., Forman SJ. et al. (2003) Prognostic impact of acute myeloid leukemia classification. Importance of detection of recurring cytogenetic abnormalities and multilineage dysplasia on survival. *Am. J. Clin. Pathol.* 119:672–80

Aref S., Al Khodary T., Zeed TA., El Sadiék A., El Menshawy N. and Al Ashery R. (2015) The Prognostic Relevance of BAALC and ERG Expression Levels in Cytogenetically Normal Pediatric Acute Myeloid Leukemia. *Indian J. Hematol. Blood Transfus.* 31(1):21-8

Bacher U., Haferlach T., Kern W., Haferlach C. and Schnittger S. (2007) A comparative study of molecular mutations in 381 patients with myelodysplastic syndrome and in 4130 patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica* 92:744–752 9

Baldus CD., Mrózek K., Marcucci G., Bloomfield CD. (2007) Clinical outcome of de novo acute myeloid leukaemia patients with normal cytogenetics is affected by molecular genetic alterations: a concise review. *Br. J. Haematol.* 137 (5): 387–400

Baldus CD., Tanner SM., Ruppert AS. et al. (2003) BAALC expression predicts clinical outcome of de novo acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: a Cancer and Leukemia Group B Study. *Blood* 102:1613–1618

Baxter EJ., Scott LM., Campbell J., East C. and Fourouclas N. (2005) Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet.* 365:1054–1061

Bennett J., Catovsky D., Daniel M., Flandrin G., Galton D., Gralnick H., Sultan C. (1976) Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 33(4):451-8

Bigoni R., Cuneo A., Milani R., Cavazzini F., Bardi A. and Roberti M. (2001) Multilineage involvement in the 5q- syndrome: a fluorescent in situ hybridization study on bone marrow smears. *Haematologica* 86(4):375-81

Bird A. (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Develop.* 16:6-21

Bizzozzero O., Johnson K. and Ciocco A. (1966) Radiation-related leukemia in Hiroshima and Nagasaki, 1946–1964. I. Distribution, incidence and appearance time. *N. Engl. J. Med.* 274(20):1095–101

Boultonwood J, Perry J, Pellagatti A et al. Frequent mutation of the polycomb-associated gene ASXL1 in the myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2010; 24: 1062–1065.

Boddu P, Hagop M, Kantarjian et al (2017). Treated secondary acute myeloid leukemia: a distinct high-risk subset of AML with adverse prognosis. *Blood*; 1(17): 1312–1323.

Bradstock K., Matthews J., Benson E., Page F. and Bishop J. (1994) Prognostic value of immunophenotyping in acute myeloid leukemia. Australian Leukaemia Study Group. *Blood* 84(4):1220-5

Bullinger L., Ehrich M., Dohner K., Schlenk RF., Dohner H. et al. (2010) Quantitative DNA methylation predicts survival in adult acute myeloid leukemia. *Blood* 115:636–642

Brunning RD, Matutes E, Flandrin G, et al (2001). Acute myeloid leukaemias and myelodysplastic syndromes, therapy related. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al., editors. World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press; pp. 89–91.

Cancer Genome Atlas Research Network (2013) Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 368:2059–74

Ley TJ, Miller C, Ding L, et al (2013). Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2013;368(22):2059-74.

Carbuccia N, Murati A, Trouplin V et al. Mutations of ASXL1 gene in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2009; 23: 2183–2186.

Carbuccia N, Trouplin V, Gelsi-Boyer V et al. Mutual exclusion of ASXL1 and NPM1 mutations in a series of acute myeloid leukemias. *Leukemia*. 2010; 24, 469–473.

Chauhan PS., Ihsan R., Yadav DS., Mishra AK., Bhushan B., Soni A., Kaushal M., Devi TR., Saluja S., Gupta DK., Mittal V., Saxena S. and Kapur S. (2011) Association of glutathione S-transferase, *EPHX*, and *p53* codon 72 gene polymorphisms with adult acute myeloid leukemia. *DNA Cell Biol.* 230(1):39-46

Cheng Y., Wang Y., Wang H., Chen Z., Lou J., Xu H., Wang H., Qian W., Meng H., Lin M. and Jin J. (2009) Cytogenetic profile of de novo acute myeloid leukemia: a study based on 1432 patients in a single institution of China. *Leukemia* 23:1801-1806

Chou WC., Tang JL., Wu SJ., Tsay W., Yao M., Huang SY., Huang KC., Chen CY., Huang CF., Tien HF. (2007) Clinical implications of minimal residual disease monitoring by quantitative polymerase chain reaction in acute myeloid

leukemia patients bearing nucleophosmin (*NPM1*) mutations. *Leukemia* 21(5):998-1004

Chung HW. and Kim SY. (2002) Detection of chromosome-specific aneusomy and translocation by benzene metabolites in human lymphocytes using fluorescence in situ hybridization with DNA probes for chromosomes 5, 7, 8, and 21. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 65:365–72

Copelan EA., Hamilton BK., Avalos B., Ahn KW., Bolwell BJ. et al (2013) Better leukemia-free and overall survival in AML in first remission following cyclophosphamide in combination with busulfan compared to TBI. *Blood* 122:3863–70

Costa D., Valera S., Carrió A., Arias A., Muñoz C., et al. (2010) Do we need to do fluorescence in situ hybridization analysis in myelodysplastic syndromes as often as we do? *Leuk. Res.* 34(11):1437–1441

Dastugue N., Lafage-Pochitaloff M., Pagès MP., Radford I., Bastard C., Talmant P., Mozziconacci MJ., Léonard C., Bilhou-Nabéra C., Cabrol C., Capodano AM., Cornillet-Lefebvre P., Lessard M., Mugneret F., Pérot C., Taviaux S., Fenneteaux O.,

Duchayne E., Berger R.; Groupe Français d'Hématologie Cellulaire (2002) Cytogenetic profile of childhood and adult megakaryoblastic leukemia (M7) a study of the Groupe Français de Cytogenétique Hematologique (GFCH). *Blood* 15;100(2):618-26

David A. Solomon, Jung-Sik Kim et al. Cohesin gene mutations in tumorigenesis: from discovery to clinical significance. *BMB Rep.* 2014; 47(6):299-310.

De Botton S., Chevret S., Sanz M., Dombret H., Thomas X., Guerci A., Fey M., Rayon C., Huguet F., Sotto JJ., Gardin C., Cony Makhoul P., Travade P., Solary E., Fegueux N., Bordessoule D., San Miguel J., Link H., Desablens B., Stamatoullas A., Deconinck E., Geiser K., Hess U., Maloisel F., Castaigne S., Preudhomme C., Chomienne C., Degos L., Fenaux P., European APL Group. (2000) Additional chromosomal abnormalities in patients with acute promyelocytic leukaemia (APL) do not confer poor prognosis: results of APL 93 trial. *Br J Haematol.* 111(3):801-6

Desch CE, McNiff KK, Schneider EC et al. American Society of Clinical Oncology/National Comprehensive Cancer Network Quality Measures. *J Clin Oncol.* 2008; 20;26(21):363-7.

Deschler B. et Lubbert M. (2006) Acute Myeloid Leukemia: Epidemiology and Etiology. *Cancer* 1;107(9):2099-107. Review

Devillier R, Mansat-De Mas V, Gelsi-Boyer V, et al. Role of ASXL1 and TP53 mutations in the molecular classification and prognosis of

acute myeloid leukemias with myelodysplasia-related changes. *Oncotarget*. 2015;6(10):8388-8396.

Di Stasi A., Jimenez AM., Minagawa K., Al-Obaidi M. and Rezvani K. (2015) Review of the Results of WT1 Peptide Vaccination Strategies for Myelodysplastic Syndromes and Acute Myeloid Leukemia from Nine Different Studies. *Front Immunol*. 4;6:36

Ding DP., Ma WL, He XF. and Zhang Y. (2012) *XPD* Lys751Gln polymorphism and esophageal cancer susceptibility: a meta-analysis of case-control studies. *Mol. Biol. Rep.* 39(3):2533–2540

Döhner H, Estey E, Grimwade D et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2016;129(4): 424–447.

Dolnik A1, Engelmann JC et al. Commonly altered genomic regions in acute myeloid leukemia are enriched for somatic mutations involved in chromatin remodeling and splicing. *Blood*. 2012 Nov 1;120(18).

Dunna NR., Vuree S., Kagita S., Surekha D., Digumarti R., Rajappa S. and Satti V. (2012) Association of *GSTP1* gene (I105V) polymorphism with acute leukaemia. *J. Genet.* 17;91(1):e60-3

Duvoix A., Schmitz M., Schnekenburger M., Dicato M., Morceau F., Galteau MM. and Diederich M. (2003) Transcriptional regulation of glutathione S-transferase P1-1 in human leukemia. *Biofactors* 17(1-4):131-8. Review

Dvorakova D., Lengerova M., Pospisilova J., Palasek I., Mayer J. (2009) A novel quantitative assessment of minimal residual disease in patients with acute myeloid leukemia carrying *NPM1* (nucleophosmin) exon 12 mutations. *Leukemia* 23(4):793-6

Economopoulou P., Pappa V. and Kontsioti F. Expression analysis of proteins involved in the non homologous end joining DNA repair mechanism in the bone marrow of adult de novo myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol*. 89:233–239

Ekmekci CG., Gutierrez IM., Siraj KA., Ozbek U. and Bhatia K. (2004) Aberrant Methylation of Multiple tumor suppressor Genes in Acute Myeloid Leukemia. *American Journal of Hematology* 77:233-240

El-Sharkawi D, Ali A, Evans CM, Hills RK et al. ASXL1 mutations are infrequent in young patients with primary acute myeloid leukemia and their detection has a limited role in therapeutic risk stratification. *Leuk Lymphoma*. 2014; 55(6):1326-31.

Estey E. and Dohner H. (2006) Acute myeloid leukemia. *Lancet* 368:1894-1907

Evans D. and Steward J. (1972) Down's syndrome and leukaemia. *Lancet* 2(7790):1322

Fabiani E., D'Alò F., Scardocci A., Greco M., Di Ruscio A. et al. (2009) Polymorphisms of detoxification and DNA repair enzymes in myelodysplastic syndrome. *Leuk. Res.* 33:1068–1071

Falini B., Mecucci C., Tiacci E. et al. (2005) Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med.* 352:254–266

Fenaux P., Mufti GJ., Hellstrom-Lindberg E., Santini V., Finelli C. et al. (2009) Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol.* 10:223–232

Fenrick R. and Hiebert SW. (1998) Role of histone deacetylases in acute leukemia. *J. Cell Biochem. Suppl.* 30–31:194–202

Fernandez-Mercado M, Yip BH, Pellagatti A et al. Mutation patterns of 16 genes in primary and secondary acute myeloid leukemia (AML) with normal cytogenetics. *PLoSOne.* 2012; 7(8): e42334.44.

Figuroa ME., Lugthart S., Li Y., Erpelinck-Verschueren C., Deng X. et al. (2010) DNA Methylation Signatures Identify Biologically Distinct Subtypes in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell* 19;17(1):13-27

Fisher Joseph B., Peterson Jonathan et al. The cohesin subunit Rad21 is a negative regulator of hematopoietic self-renewal through epigenetic repression of HoxA7 and HoxA9. *Leukemia.* 2017 March ; 31(3): 712–719.

Flandrin G. (2002) Classification of acute myeloid leukemias. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*

Garcia-Closas M., Egan KM., Newcomb PA., Brinton LA., Titus-Ernstoff L., Chanock S., Welch R., Lissowska J., Peplonska B., Szeszenia-Dabrowska N., Zatonski W., Bardin-Mikolajczak A. and Struewing JP. (2006) Polymorphisms in DNA double-strand break repair genes and risk of breast cancer: two population-based studies in USA and Poland, and metaanalyses. *Human Genetic* 119:376–388

Garcia-Manero G., Kantarjian HM., Sanchez-Gonzalez B., Yang H., Rosner G. et al. (2006) Phase 1/2 study of the combination of 5-aza-2'-deoxycytidine with valproic acid in patients with leukemia. *Blood.* 108:3271–3279

Gelsi-Boyer V, Brecqueville M, Raynier D et al. Mutations in ASXL1 are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid diseases. *Br J Haematology.* 2012; 5:12.

Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adélaïde J et al. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2009; 145(6):788-800.

Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med.* 2014; 371(26):2477-2487.

Ghezraoui H., Piganeau M., Renouf B., Renaud JB., Sallmyr A., Ruis B., Oh S., Tomkinson AE., Hendrickson EA., Giovannangeli C., Jasin M. and Brunet E. (2014) Chromosomal translocations in human cells are generated by canonical nonhomologous end-joining. *Mol. Cell* 18;55(6):829-42

Gilliland DG. and Griffin JD. (2002) The roles of *FLT3* in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 1;100(5):1532-42. Review

Grimwade D, Walker H, Oliver F et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The

Grimwade D. and Mrózek K. (2011) Diagnostic and prognostic value of cytogenetics in acute myeloid leukemia. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 25:1135–61

Grimwade D., Hills RK., Moorman AV., Walker H., Chatters S. et al. (2010) Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* 22;116(3):354–65

Grimwade D., Walker H., Oliver F., Wheatley K., Harrison C., Harrison G., Rees J., Hann I., Stevens R., Burnett A., Goldstone A. (1998) The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 1;92(7):2322-33

Guacci V, Koshland D, Strunnikov A. A direct link between sister chromatid cohesion and chromosome condensation revealed through the analysis of MCD1 in *S. cerevisiae*. *Cell.* 1997;91:47–57. *Haematologica*, 2015; 100(3): 324-330

Halasova E., Matakova T., Musak L., Polakova V., Letkova L., Dobrota D. and Vodicka P. (2012) Evaluating chromosomal damage in workers exposed to hexavalent chromium and the modulating role of polymorphisms of DNA repair genes. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 85(5):473-81

Hasle H., Alonzo TA., Auvrignon A., Behar C. et al (2007) Monosomy 7 and deletion 7q in children and adolescents with acute myeloid leukemia: an international retrospective study. *Blood* 1;109(11):4641-7

Hayes JD. and Mc Lellan LI. (1999) Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res.* 31(4):273-300

Head DR. (2004) Classification and differentiation of the acute leukemias. *Wintrobe's clinical hematology*, Volume II, 11th edition

Hederson SH., Williams WJ., Beutler E., Erslav HA., Lichtman MA., McGraw Hill (1990) Acute leukemia: general considerations. *Hematology* 4th ed. 236-251

Heim S. and Mitelman F. (2001) Cancer cytogenetics. *Copyright John wiley & Sons* 3rd edition

Hengstler JG., Arand M., Herrero ME. and Oesch F. (1998) Polymorphism of N-acetyltransferases, glutathione S-transferases, microsomal epoxide hydrolase and sulfotransferases: influence on cancer susceptibility. Recent Results. *Cancer Res.* 154:47–85

Herman JG. and Baylin SB. (2003) Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N. Engl. J. Med.* 349:2042–2054

Herman JG., Graff JR., Myohanen S., Nelkin BD. and Baylin SB. (1996) Methylation-specific PCR: a novel assay for methylation status of CpG islands. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:9821-9826

Herold T, Metzeler KH, Vosberg S et al. Isolated trisomy 13 defines a homogeneous AML subgroup with high frequency of mutations in spliceosome genes and poor prognosis. *Blood.* 2014; 124(8):1304-11.

Hou HA., Huang TC., Lin LI., Liu CY., Chen CY., Chou WC., Tang JL., Tseng MH., Huang CF., Chiang YC., Lee FY., Liu MC., Yao M., Huang SY., Ko BS., Hsu SC., Wu SJ., Tsay W., Chen YC., Tien HF. (2010) *WT1* mutation in 470 adult patients with acute myeloid leukemia: stability during disease evolution and implication of its incorporation into a survival scoring system. *Blood* 24;115(25):5222-31

Hu X., Herzog C., Zimniak P. and Singh SV. (1999) Differential protection against benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide-induced DNA damage in HepG2 cells stably transfected with allelic variants of pi class human glutathione S-transferase. *Cancer Res.* 59(10):2358-62

Huiling Xu¹, Max Yan , Jennifer Patra.. Enhanced RAD21 cohesin expression confers poor prognosis and resistance to chemotherapy in high grade luminal, basal and HER2 breast cancers. . *Breast Cancer Research* 2011, 13:R9

J B Fisher , J Peterson , M Reimer et al. The cohesin subunit Rad21 is a negative regulator of hematopoietic self-renewal through epigenetic repression of Hoxa7 and Hoxa9. *Leukemia.* 2017. Vol 31, pages 712–719.

Jaffe CA., Turgeon DK., Lown K., Demott-Friberg R. and Watkins PB. (2002) Growth hormone secretion pattern is an independent regulator of growth hormone actions in humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283:1008–15

Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J et al. Age related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med.* 2014; 371(26):2488-2498.

Jameson JN., Dennis L. Kasper, Harrison Tinsley Randolph, Braunwald Eugene, Fauci Anthony S., Hauser Stephen L, Longo Dan L. (2005) *Harrison's principles of internal medicine*, 16th Edition

Jemal A., Thomas A., Murray T., Thun M. (2002) Cancer statistics. *CA Cancer J clin* 52(1):23-47

Kayser S., Zucknick M., Döhner K., Krauter J., Köhne CH., et al. (2012) Monosomal karyotype in adult acute myeloid leukemia: prognostic impact and outcome after different treatment strategies. *Blood* 119: 551–8

Kim SY., Choi JK., Cho YH., Chung EJ., Paek D. et al. (2004) Chromosomal aberrations in workers exposed to low levels of benzene: association with genetic polymorphisms. *Pharmacogenetics* 14:453–63

Kinzler KW. and Vogelstein B. (1997) Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 386:761–763

Kiyohara C. and Yoshimasu K. (2007) Genetic polymorphisms in the nucleotide excision repair pathway and lung cancer risk: a meta-analysis. *Int. J. Med. Sci.* 4(2):59–71

Knudson AG. (1996) Hereditary cancer: two hits revisited. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 122:135–140

Kon A1, Shih LY, Minamino M, Sanada M. Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms. *Nat Genet.* 2013 Oct;45(10):1232-7.

Kroeger H., Jelinek J., Estecio MR., He R., Kondo K. et al (2008) Aberrant CpG island methylation in acute myeloid leukemia is accentuated at relapse. *Blood* 112:1366–1373

Kumar C. Genetic Abnormalities and Challenges in the Treatment of Acute Myeloid Leukemia. *Genes Cancer.* 2011; 2(2): 95–107

Küry S., Buecher B., Robiou-du-Pont S., Scoul C., Colman H. et al. (2008) Low-penetrance alleles predisposing to sporadic colorectal cancers: a French case-controlled genetic association study. *BMC Cancer* 8:326

Laborde E. (2010) Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death *Cell Death and Differentiation.* 17:1373–1380

Larson RA., Le Beau MM., Vardiman JW., Testa JR., Golomb HM., Rowley JD. (1983) The predictive value of initial cytogenetic studies in 148 adults with acute nonlymphocytic leukemia: a 12-year study (1970-1982). *Cancer Genet Cytogenet.* 10(3):219-36

Lindsley R, Mar B, Mazzola E, et al. Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations. *Blood.* 2010;26:125(9):1367-76.)

Linnet MS. (1985) The leukemias: Epidemiologic aspects. Monographs in epidemiology and biostatistics. *Lilienfield AM eds*, New York, Oxford University Press

Liu TX., Becker MW., Jelinek J., Wu WS., Deng M., Mikhalkevich N., Hsu K., Bloomfield CD., Stone RM., DeAngelo DJ., Galinsky IA., Issa JP., Clarke MF., Look AT. (2007) Chromosome 5q deletion and epigenetic suppression of the gene encoding alpha-catenin (*CTNNA1*) in myeloid cell transformation. *Nat Med.* 13(1):78-83

Mahasirimongkol S., Kitpoka P., Thithapandha A. and Hongeng S. (2007) Genetic polymorphisms and haplotypes of DNA repair genes in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr. Blood Cancer* 48(1):16-20

Mandegary A., Rostami S., Alimoghaddam K., Ghavamzadeh A. and Ghahremani MH. (2011) Gluthatione-S-transferase T1-null genotype predisposes adults to acute promyelocytic leukemia; a case-control study. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 12(5):1279-82

Manola KN. (2009) Cytogenetics of pediatric acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol.* 83(5):391-405

Manola KN., Panitsas F., Polychronopoulou S., Daraki A. Karakosta M., Stavropoulou C., Avgerinou G., Hatzipantelis E., Pantelias G., Sambani C., Pagoni M. (2013) Cytogenetic abnormalities and monosomal karyotypes in children and adolescents with acute myeloid leukemia: correlations with clinical characteristics and outcome. *Cancer Genet.* 206(3):63-72.

Marchesi F., Annibali O., Cerchiara E., Tirindelli MC. and Avvisati G. (2011) Cytogenetic abnormalities in adult non-promyelocytic acute myeloid leukemia: a concise review. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 80:331–46

Marcucci G., Mrózek K., Ruppert AS., Maharry K., Kolitz JE., Moore JO., Mayer RJ., Pettenati MJ., Powell BL., Edwards CG., Sterling LJ., Vardiman JW., Schiffer CA., Carroll AJ., Larson RA., Bloomfield CD. (2005) Prognostic factors and outcome of core binding factor acute myeloid leukemia patients with t(8;21) differ from those of patients with inv(16): a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol.* 20;23(24):5705-17

Martens JH. and Stunnenberg HG. (2010) The molecular signature of oncofusion proteins in acute myeloid leukemia. *FEBS Lett.* 18;584(12):2662-9. Review.

Martinez C., Martin F., Fernandez JM., García-Martín E., Sastre J. et al. (2006) Glutathione S-transferases mu 1, theta 1, pi 1, alpha 1 and mu 3 genetic polymorphisms and the risk of colorectal and gastric cancers in humans. *Pharmacogenomics* 7:711–718

Matutes E., Morilla R., Frabat N. (1997) Definition of acute biphenotypic leukemia. *Haematologica* 82:64-66

Mauritzson N., Albin M., Rylander L., Billström R., Ahlgren T., Mikoczy Z., Björk J., Strömberg U., Nilsson PG., Mitelman F., Hagmar L., Johansson B. (2002) Pooled analysis of clinical and cytogenetic features in treatment-related and de novo adult acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes based on a consecutive series of 761 patients analyzed 1976-1993 and on 5098 unselected cases reported in the literature 1974-2001. *Leukemia* 16(12):2366-78

McKerrell T, Park N, Moreno T, et al; Understanding Society Scientific Group. Leukemia-associated somatic mutations drive distinct patterns of age-related clonal hemopoiesis. *Cell Reports.* 2015; 10(8):1239-1245.

Mehdipour P, Santoro F, Minucci S. Epigenetic alterations in acute myeloid leukemias. *FEBS J.* 2014; 282(9):1786-800.

Mehta PA., Alonzo TA., Gerbing RB., Elliott JS., Wilke TA., Kennedy RJ., Ross JA., Perentesis JP., Lange BJ., Davies SM. and Children's Oncology Group (2006) *XPD* Lys751Gln polymorphism in the etiology and outcome of childhood acute myeloid leukemia: a Children's Oncology Group report. *Blood* 1;107(1):39-45

Melki RJ., Vincent PC. and Clark SJ. (1999) Concurrent DNA hypermethylation of multiple genes in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Research* 59:3730-3740

Metzeler KH, Becker H, Maharry K et al. ASXL1 mutations identify a high-risk subgroup of older patients with primary cytogenetically normal AML within the ELN favorable genetic category. *Blood.* 2011; 118: 6920–6929.

Michaelis C, et al. Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell.* 1997;91(1):35-45

Miksys S., Lerman C., Shields PG., Mash DC. and Tyndale RF. (2003) Smoking, alcoholism and genetic polymorphisms alter *CYP2B6* levels in human brain. *Neuropharmacology* 45:122–32

Mocellin S., Verdi D. and Nitti D. (2009) DNA repair gene polymorphisms and risk of cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Carcinogenesis* 30(10):1735–1743

Mohr F., Döhner K., Buske C., Rawat VP. (2011) TET genes: new players in DNA demethylation and important determinants for stemness. *Exp Hematol.* 39(3):272-81

Morgan GJ. and Smith MT. (2002) Metabolic enzyme polymorphisms and susceptibility to acute leukemia in adults. *Am. J. Pharmacogenomics* 2(2):79-92

Mrózek K. and Bloomfield CD. (2006) Chromosome aberrations, gene mutations and expression changes, and prognosis in adult acute myeloid leukemia. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 2006:169–77

Mrózek K. Cytogenetic, molecular genetic, and clinical characteristics of acute myeloid leukemia with a complex karyotype. *Semin Oncol.* 2008;35(4):365-377.

Mrozek K., Heerema NA. and Bloomfield CD. (2004) Cytogenetics in acute leukemia. *Blood* 18:115–36]

Mrózek K., Marcucci G., Nicolet D., Maharry KS., Becker H. et al. (2012) Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* 30:4515–23

Musak L., Soucek P., Vodickova L., Naccarati A., Halasova E., Polakova V., Slysikova J., Susova S., Buchancova J., Smerhovsky Z., Sedikova J., Klimentova G., Osina O., Hemminki K. and Vodicka P. (2008) Chromosomal aberrations in tire plant workers and interaction with polymorphisms of biotransformation and DNA repair genes. *Mutat. Res.* 10;641(1-2):36-42

Naegeli O. (1900) Uber rothes Knochenmark und Myeloblasten. *Deutsch Med Wochenschr* 26:287

O'Connor HE., Butler TA., Clark R., Swanton S., Harrison C., Secker-Walker LM. and Foroni L. (1998) Abnormalities of the *ETV6* gene occur in the majority of patients with aberrations of the short arm of chromosome 12: a combined PCR and Southern blotting analysis. *Leukemia* 12 :1099–1106

O'Donnell MR., Appelbaum FR., Coutre SE., Damon LE., Erba HP., Foran J., Lancet J., Maness LJ., Marcucci G., Maslak PG., Millenson M., Moore JO., Ravandi F., Schuening F., Shami P., Smith BD., Stone RM., Tallman MS., Wang E. and White FL. (2008) Acute myeloid leukemia. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* 6(10):962-93

Orozco JJ. and Appelbaum FR. (2012) Unfavorable, Complex, and Monosomal Karyotypes: The Most Challenging Forms of Acute Myeloid Leukemia. *Oncology (Williston Park)* 26(8):706-12

Pabalan N., Francisco-Pabalan O., Sung L., Jarjanazi H. and Ozcelik H. (2010) Meta-analysis of two *ERCC2 (XPD)* polymorphisms, Asp312Asn and Lys751Gln, in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 124(2):531-41

Pabst T., Mueller BU., Zhang P. et al. (2001) Dominant-negative mutations of *CEBPA*, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (*CEBPalpha*), in acute myeloid leukemia. *Nat. Genet.* 27:263–270

Padua R.A. and West R.R. (2000) Oncogene mutation and prognosis in the myelodysplastic syndromes. *Br. J. Haematol.* 111:873–874

Pakakasama S., Sirirat T., Kanchanachumpol S., Udomsubpayakul U., Mahasirimongkol S., Kitpoka P., Thithapandha A. and Hongeng S. (2007) Genetic polymorphisms and haplotypes of DNA repair genes in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr. Blood Cancer* 48(1):16-20

Pangiotou JP. and Polychronopoulou-Androulakali S. (2000) Leukemogenesis in childhood. Etiology factors and pathogenetic mechanisms. *Hellenic Med.* 17(6):576-583

Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 2016;374(23): 2209-2221.

Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2013;122(22):3616–3627.

Paschka P, Döhner K. Core-binding factor acute myeloid leukemia: can we improve on HiDAC consolidation. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2013; 209-19.

Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik V et al. *ASXL1* mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia: a study by the German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group. *Hematologica* 2015; 100(3): 324–330.

Patel JP, Mithat Gönen M, Figueroa ME et al. Prognostic Relevance of Integrated Genetic Profiling in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2012; 366:1079-1089.

Pedersen-Bjergaard J., Christiansen DH., Andersen MK. and Skovby F. (2002) Causality of myelodysplasia and acute myeloid leukemia and their genetic abnormalities. *Leukemia* 16:2177–84

Pedersen-Bjergaard J., Pedersen M., Roulston D. and Philip P. (1995) Different genetic pathways in leukemogenesis for patients presenting with therapy-related myelodysplasia and therapy-related acute myeloid leukemia. *Blood* 86:3542-52

Perera F. (1996) Molecular epidemiology: insights into cancer susceptibility, risk assessment, and prevention. *J. Natl. Cancer Inst.* 88:496
Perez B, Kosmider O, Cassinat B et al. Genetic typing of CBL, ASXL1, RUNX1, TET2 and JAK2 in juvenile myelomonocytic leukaemia reveals a genetic profile distinct from chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2010; 151:460–468.

Pratcorona M, Abbas S, Sanders MA, et al. Acquired mutations in ASXL1 in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. *Haematologica.* 2012; 97(3):388–392.

Preiss BS, Bergmann OJ, Friis LS et al. Cytogenetic findings in adult secondary acute myeloid leukemia (AML): frequency of favorable and adverse chromosomal aberrations do not differ from adult de novo AML. *Cancer Genet Cytogenet.* 2010;202(2):108-22.

Preiss BS., Bergmann OJ., Friis LS., Sørensen AG., Frederiksen M. et al. (2010) Cytogenetic findings in adult secondary acute myeloid leukemia (AML): frequency of favourable and adverse chromosomal aberrations do not differ from adult de novo AML. *Cancer Genet. Cytogenet.* 202:108–22

Rossi D., Capello D., Gloghini A., Franceschetti S., Paulli M. et al (2004) Aberrant promoter methylation of multiple genes throughout the clinico-pathologic spectrum of B-cell neoplasia. *Haematologica* 89(2):154-164

Sachse C., Smith G., Wilkie MJ., Barrett JH., Waxman R. et al. (2002) A pharmacogenetic study to investigate the role of dietary carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Carcinogenesis* 23:1839–1849

Salagovič J., Klimčáková L., Ilenčíková D. and Kafková A. (2012) Association of follicular lymphoma risk with *BRCA2* N372H polymorphism in Slovak population. *Med. Oncol.* 29(2):1173-8

Salnikova L., Chumachenko A., Belopolskaya O. and Rubanovich A. (2012) Correlations between DNA polymorphism and frequencies of gamma-radiation induced and spontaneous cytogenetic damage. *Health Phys.* 103(1):37-41

Saxena A., Dhillon VS., Shahid M., Khalil HS., Rani M. et al. (2012) *GSTP1* methylation and polymorphism increase the risk of breast cancer and the effects of diet and lifestyle in breast cancer patients. *Exp. Ther. Med.* 4(6):1097-1103

Schnittger S, Eder C, Jeromin S et al. ASXL1 exon 12 mutations are frequent in AML with intermediate risk karyotype and are independently associated with an adverse outcome. *Leukemia*. 2013; 27(1):82-91.

Schoofs T., Berdel WE. and Muller-Tidow C. (2014) Origins of aberrant DNA methylation in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 28;1–14

Seedhouse C., Faulkner R., Ashraf N., Das-Gupta E. and Russell N. (2004) Polymorphisms in genes involved in homologous recombination repair interact to increase the risk of developing acute myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res.* 15;10(8):2675-80

Sekeres MA, Peterson B, Dodge RK, Mayer RJ, Moore JO, Lee EJ, Kolitz J, Baer MR, Schiffer CA, Carroll AJ, Vardiman JW, Davey FR, Bloomfield CD, Larson RA, Stone RM; Cancer and Leukemia Group B (2004) Differences in prognostic factors and outcomes in African Americans and whites with acute myeloid leukemia. *Blood* 1;103(11):4036-42

Shang Z., Wang D., Xiao M., Wang J., Li TJ., Zhao YC., Li CR., Zhou JF. (2013) Mutation of isocitrate dehydrogenase 2 (*IDH2*) gene in Chinese AML patients and its clinical significance. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 21(3):607-12

Sharpless NE., Ferguson DO., O'Hagan RC., Castrillon DH., Lee C., Farazi PA., Alson S., Fleming J., Morton CC., Frank K., Chin L., Alt FW. and DePinho RA. (2001) Impaired nonhomologous end-joining provokes soft tissue sarcomas harboring chromosomal translocations, amplifications, and deletions. *Mol. Cell* 8(6):1187-96

Shea TC., Kelley SL. and Henner WD. (1988) Identification of an anionic form of glutathione transferase present in many human tumors and human tumor cell lines. *Cancer Res.* 48:527–533

Shen L., Kantarjian H., Guo Y., Lin E., Shan J. et al. (2010) DNA methylation predicts survival and response to therapy in patients with myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 28:605–613

Shimada T. (2006) Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic hydrocarbons. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 21:257–76

Shimada A., Taki T., Tabuchi K., Tawa A., Horibe K., Tsuchida M., Hanada R., Tsukimoto I., Hayashi Y. (2006) *KIT* mutations, and not *FLT3* internal tandem duplication, are strongly associated with a poor prognosis in pediatric acute myeloid leukemia with t(8;21): a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Blood* 1;107(5):1806-9

Shipley JL. and Butera JN. (2009) Acute myelogenous leukemia. *Exp. Hematol.* 37(6):649-58

Silverman LR., Demakos EP., Peterson BL., Kornblith AB., Holland JC. et al. (2002) Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group. *B J. Clin. Oncol.* 20:2429–2440

Smith M., Barnett M., Bassan R., Gatta G., Tondini C., Kern W. (2004) Adult acute myeloid leukemia. *Crit Rev Oncol/Hematol* 50:197-222

Smith MT. and Rothman N. (2000) Biomarkers in the molecular epidemiology of benzene-exposed workers. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 61:439–45

Smith MT., Zhang L., Wang Y., Hayes RB., Li G. et al. (1998) Increased translocations and aneusomy in chromosomes 8 and 21 among workers exposed to benzene. *Cancer Res.* 58:2176–81

Smith LL., Pearce D., Smith ML., Jenner M., Lister TA., Bonnet D., Goff L., Fitzgibbon J. (2006) Development of a quantitative real-time polymerase chain reaction method for monitoring *CEBPA* mutations in normal karyotype acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* 133(1):103-5

Soupir CP., Vergilio JA., Dal Cin P., Muzikansky A., Kantarjian H., Jones D., Hasserjian RP. (2007) Philadelphia chromosome-positive acute myeloid leukemia: a rare aggressive leukemia with clinicopathologic features distinct from chronic myeloid leukemia in myeloid blast crisis. *Am J Clin Pathol.* 127(4):642-50.

Spry M., Scott T., Pierce H. and D'Orazio JA. (2007) DNA repair pathways and hereditary cancer susceptibility syndromes. *Front Biosci* 12:4191

Stirewalt DL., Meshinchi S. and Radich JP. (2003) Molecular targets in acute myelogenous leukemia. *Blood* 17:15-23

Swerdlow S., Campo E., Harris NL. (2008) WHO Classification of Tumours of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Geneva, Switzerland, *WHO Press*, 4th edition

Swerdlow SH., Campo E., Harris NL., Jaffe ES., Pileri SA., Stein H., Thiele J., Vardiman JW. (2008) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. *IARC WHO Classification of Tumours Volume 2*, 4th Edition

Tada M., Yokosuka O., Fukai K., Chiba T., Imazeki F. et al. (2005) Hypermethylation of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (*NQO1*) gene in human hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 42(4):511-519

Taskesen E., Bullinger L., Corbacioglu A., Sanders MA., Erpelinck CA., Wouters BJ., van der Poel-van de Luytgaarde SC., Damm F., Krauter J., Ganser A., Schlenk RF., Löwenberg B., Delwel R., Döhner H., Valk PJ., Döhner K. (2011) Prognostic impact, concurrent genetic mutations, and gene

expression features of AML with *CEBPA* mutations in a cohort of 1182 cytogenetically normal AML patients: further evidence for *CEBPA* double mutant AML as a distinctive disease entity. *Blood* 24;117(8):2469-75I.

Tew D. and Townsend D.M. (2011) Regulatory functions of glutathione S-transferase P1-1 unrelated to detoxification. *Drug Metab. Rev.* 43(2):179-93

The Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia. (N Engl J Med. 2013, 368 (22): 2059-2074.

Thiede C., Steudel C., Mohr B. et al. (2002) Analysis of *FLT3*-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* 99:4326–4335

Thirman MJ and Larson RA. (1996) Therapy-related myeloid leukemia. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 10(2):293-320

Thol F, Friesen I, Damm F, et al. Prognostic significance of *ASXL1* mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol.*2011; 29(18):2499–2506

Thol F, Bollin R, Gehlhaar M et al. Mutations in the cohesin complex in acute myeloid leukemia: clinical and prognostic implications. *Blood.* 2014 Feb 6;123(6):914-20.

Thota S, Viny AD, Makishima H et al. Genetic alterations of the cohesin complex genes in myeloid malignancies. *Blood.* 2014 Sep 11;124(11):1790-8

Tian X., Xu Y., Yin J., Tian H., Chen S., Wu D. and Sun A. (2014) *TET2* gene mutation is unfavorable prognostic factor in cytogenetically normal acute myeloid leukemia patients with *NPM1+* and *FLT3-ITD* - mutations. *Int. J Hematol.* 100(1):96-104

Toyota M., Kopecky KJ., Toyota MO., Jair KW., Willman CL. et al. (2001) Methylation profiling in acute myeloid leukemia. *Blood* 97:2823–2829

Vainchenker W, Delhommeau F, Constantinescu SN et al. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2011; 118: 1723–1735.

Vardiman JW., Thiele J., Arber AD., Brunning DR., Borowitz JM., Porwit A., Harris LN., Le Beau MM., Hellström-Lindberg E., Tefferi A. and Clara D. Bloomfield CD. (2009) The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 114(5):937-51

Vardiman JW. (2010) The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: an overview with emphasis on the myeloid neoplasms. *Chem Biol Interact.* 19; 184(1-2):16-20.

Walter RB., Othus M., Burnett AK., Löwenberg B., Kantarjian HM. et al. (2013) Significance of FAB subclassification of "acute myeloid leukemia, NOS" in the 2008 WHO classification: analysis of 5848 newly diagnosed patients. *Blood* 121:2424–31

Walter RB1, Othus M, Burnett AK et al. Significance of FAB subclassification of "acute myeloid leukemia, NOS" in the 2008 WHO classification: analysis of 5848 newly diagnosed patients. *Blood*. 2013. Mar 28;121(13):2424-31. doi: 10.1182/blood-2012-10-462440. Epub 2013 Jan 16.

Wang Zhen-yi and (2003) Ham-Wasserman lecture: treatment of Acute Leukemia by inducing differentiation and apoptosis. *Hematology* 2003:1

Wolman SR., Gundacker H., Appelbaum FR., Slovak ML., Southwest Oncology Group. (2002) Impact of trisomy 8 (+8) on clinical presentation, treatment response, and survival in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood* 1;100(1):29-35

Xie M, Lu C, Wang J, et al. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat Med*. 2014; 20(12):1472-1478.

Zong X, Yao H, Wen L et al. ASXL1 mutations are frequent in de novo AML with trisomy 8 and confer an unfavorable prognosis. *Leuk Lymphoma*. 2017; 58:204-206.

Αθανασίου Α., (2008) Νέα ταξινόμηση της οξείας μυελοβλαστικής λευχαιμίας κατά WHO. *Haema Nov*: 325-330

Κοντοπίδου Φ. (2004) τυποποίηση της οξείας μυελοβλαστικής λευχαιμίας. *Νοσοκομειακά Χρόνια* Τόμος 66, Τεύχη 3-4:189-194

Λαζαρίδου Α. (2009) Ο ρόλος της κλασσικής κυτταρογενετικής και FISH στην διάγνωση, ταξινόμηση και πρόγνωση της ΟΜΛ. *Ελληνική Αιματολογική Εταιρία*

Σταυρογιάννη Ν. (2007) Μοριακή παθογένεια οξείας μυελογενούς λευχαιμίας. *Haema Nov*: 381-386

Deschler B and Lübbert M (2006). Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology *Cancer*. Nov ;107(9):2099-107.

Forman D, Stockton D, Moller H (2003). Cancer prevalence in the UK: results from the EUROPREVAL study. *Ann Oncol.*,

Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M (2002). *CA Cancer J Clin*. 52 (1): 23–47

Cordoba I, González-Porras JR, Nomdedeu B, Luño E et al (2012). Better prognosis for patients with del(7q) than for patients with monosomy 7 in myelodysplastic syndrome. *Cancer*. Jan 1;118(1):127-33.

Zhu HH, Zhang XH, Qin YZ, et al (2013). MRD-directed risk stratification treatment may improve outcomes of t(8;21) AML in the first complete remission: results from the AML05 multicenter trial. *Blood.*;121(20):4056-4062.

Schoch C, Kern W, Schnittger S, Hiddemann W, Haferlach T (2004). Karyotype is an independent prognostic parameter in therapy-related acute myeloid leukemia (t-AML): an analysis of 93 patients with t-AML in comparison to 1091 patients with de novo AML. *Leukemia*, ,vol.18(pg.120-5).

Koh Y, Kim I, Bae J et al (2010). Prognosis of Secondary Acute Myeloid Leukemia is affected by the Type of the Preceding Hematologic Disorders and the Presence of Trisomy 8. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, Volume 40, Issue 11, 1 November 2010, Pages 1037–1045.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΚΑΚΟΣΑΙΟΥ ΚΑΤΕΡΙΝΑ

Προσωπικά στοιχεία

Όνοματεπώνυμο:	Κακοσαίου Κατερίνα
Πατρώνυμο:	Αντώνιος
Τόπος και ημερομηνία γεννήσεως:	Χολαργός Αττικής, 13/04/1985
Οικογενειακή κατάσταση:	Άγαμη
Διεύθυνση Οικίας:	Καλύμνου 2, Νέα Σμύρνη,
T.K.:17122	
Τηλέφωνα επικοινωνίας:	6972746199, 213-0342021
e-mail:	katerinakak@hotmail.com

Εκπαίδευση

- 2014-σήμερα Υποψήφια διδάκτωρ της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ).
Τίτλος διατριβής: «Κυτταρογενετική, μοριακή και επιγενετική διερεύνηση της Οξείας Μυελογενούς Λευχαιμίας».
- 2011-2013 Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης με τίτλο: «Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική» της Σχολής Θετικών Επιστημών του Τμήματος Βιολογίας και της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών(Χαρακτηρισμός πτυχίου: "Λίαν Καλώς").
Τίτλος μεταπτυχιακής εργασίας: «Γονίδια αποτοξικοποίησης στη διερεύνηση της προδιάθεσης της Οξείας Μυελογενούς Λευχαιμίας».
- 2010 Πτυχίο Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (Χαρακτηρισμός πτυχίου:"Λίαν Καλώς").
- 2003 Απολυτήριο 1ου Ενιαίου Λυκείου Λιβαδειάς.

Γενική επιμόρφωση

- Ξένες γλώσσες
- ♦ Αγγλικά: Άριστα (Proficiency in English, University of Michigan, 2011)
 - ♦ Γερμανικά: Καλά (Zertificat , Goethe Institut, 1999)

Συμμετοχή σε ερευνητικά προγράμματα

1/5/2014-1/7/2015 Σύμβαση μίσθωσης έργου με σκοπό «τη μελέτη των κυτταρογενετικών αλλοιώσεων και μεταλλάξεων γονιδίων αποτοξικοποίησης σε στόχο τον προσδιορισμό βιοδεικτών γονιδιωματικής αστάθειας και προδιάθεσης στην λευχαιμογένεση», στο πλαίσιο υποστήριξης του ερευνητικού προγράμματος «ΟΣΠΕΕ-Ολοκληρωμένος Σχεδιασμός για Περιβαλλοντικές και Ενεργειακές Εφαρμογές», που υλοποιείται μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανταγωνιστικότητα και Επιχειρηματικότητα».

Δημοσιεύσεις σε Διεθνή Περιοδικά

- 2018 *ASXL1* mutations in AML are associated with specific clinical and cytogenetic characteristics. **K Kakosaίου**, F Panitsas, A Daraki, M Pagoni, P Apostolou, A Ioannidou, I Vlachadami, T Marinakis, C Giatra, D Vasilatou, C Sambani, V Pappa, KN. Manola, *Leukemia & Lymphoma*. Impact factor:2.755
- 2017 Polymorphisms and haplotypes of the CYP2B6 detoxification gene in the predisposition of Acute Myeloid Leukemia (AML) and induction of its cytogenetic abnormalities A. Daraki, **K. Kakosaίου**, S. Zachaki, C. Sambani, V. Aleporou-Marinou, P. Kollia, K. Manola, *Cancer Genetics*, 2016 Nov;209(11):525-533. Impact factor: 2.981
- 2016 A novel variant translocation t(8;16;21)(q22;q24;q22) in Acute Myeloid Leukemia expressing both myeloid and lymphoid markers. **K. Kakosaίου**, A. Daraki, A. Zomas, KN. Manola, *Hospital Chronicles*, 10(3):165-167.

Ακαδημαϊκά Επιτεύγματα (Βραβεύσεις)

- 2016 Βραβείο καλύτερης αναρτημένης ανακοίνωσης, 27^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη 3-5 Νοεμβρίου.

Συμμετοχή σε συνολικά 25 διεθνή και εθνικά συνέδρια με κριτές. (Αναφέρονται επιλεκτικά)

1. **Κ. Κακοσαίου**, Α. Δαράκη, Α. Καρυτιανού, Μ. Μπάκα, Δ. Δογάνης, Α. Πουρτσίδης Μ. Σερβιτζόγλου, Κ. Καπετανίου, Μ. Νικήτα, Θ. Αναστασίου, Α. Διβανέ. Αλλοιώσεις του der(12)t(12;21) με θετικό ETV6/RUNX1 σε παιδιά με B-

- προέλευσης Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία. 28^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Αθήνα, 2-4 Νοεμβρίου, 2017.
2. **Κ. Κακοσαίου**, Α. Καρυτιανού, Ε. Βασιλάτου-Κοσμίδη, Μ. Μοσχόβη, Μ. Μπάκα, Α. Πουρτσίδης, Α. Καπάμης, Δ. Δογάνης, Μ. Σερβιτζόγλου, Μ. Βαρβουτσή, Δ. Μπουχούτσου, Ε. Δανά, Ν. Τουρκαντώνη, Α. Διβανέ. Κυτταρογενετικές αλλοιώσεις σε παιδιά με οξεία Μυελογενή λευχαιμία στον Ελλαδικό χώρο. 27^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο Θεσσαλονίκη, 3-5 Νοεμβρίου, 2016.
 3. **Kakosaïou Katerina**, Daraki Aggeliki, Apostolou Paraskevi, Zachaki Sophia, Pagoni Maria, Sambani Constantina, Dimitriadis Georgios, Pappa Vasiliki, Manola Kalliopi. Analysis of ASXL1 mutations and correlation with chromosomal alterations in Acute Myeloid Leukemia. 20th Congress of the European Hematology Association, June 11-15, Vienna, Austria, 2015.
 4. **Kakosaïou Katerina**, Daraki Aggeliki, Apostolou Paraskevi, Zachaki Sophia, Pagoni Maria, Pagoni Maria, Sambani Constantina, Dimitriadis Georgios, Pappa Vasiliki, Manola Kalliopi. ASXL1 mutations associated with cytogenetic findings in de novo and secondary Acute Myeloid Leukemia. XV International Symposium on Acute Leukemias, abstr 20, February 22– 25, Munich, Germany, 2015.
 5. **Κακοσαίου Κατερίνα**, Δαράκη Αγγελική, Αποστόλου Παρασκευή, Ζαχάκη Σοφία, Παγώνη Μαρία, Σαμπάνη Κωνσταντίνα, Παππά Βασιλική, Μανωλά Καλλιόπη. Μεταλλάξεις του γονιδίου ASXL1 σε ασθενείς με Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία και συσχέτιση με τα κυτταρογενετικά ευρήματα. 25ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Ελληνική Αιματολογική 4 Εταιρία, Βελλίδειο Συνεδριακό Κέντρο, Θεσσαλονίκη, Νοεμβρίου 22-24, 2014. Ηαεμα 2014, Τόμος 5, Suppl 1, abstr. 33, σελ 39. Προφορική ανακοίνωση.