



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών  
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«Ιατρική Γενετική: Κλινική και Εργαστηριακή Κατεύθυνση»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μοριακή διερεύνηση του γονιδίου IKZF1 σε παιδιατρικούς  
ασθενείς με οξεία Β λεμφοβλαστική λευχαιμία**

Ευτυχιάνα Α. Παπαστάθη

Επιβλέπουσα: **Τζέτη Μαρία** Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενετικής, Εργαστήριο  
Ιατρικής Γενετικής

ΑΘΗΝΑ  
Ιούνιος 2019

## **ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

Μοριακή διερεύνηση του γονιδίου IKZF1 σε παιδιατρικούς ασθενείς με οξεία Β  
λεμφοβλαστική λευχαιμία

**Ευτυχιάνα Α. Παπαστάθη**

**A.M.: 20160651**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ:** **Τζέτη Μαρία** Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενετικής, Εργαστήριο  
Ιατρικής Γενετικής

Ιούνιος 2019

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ALL) αποτελεί την πιο κοινή κακοήθεια στους παιδιατρικού ασθενείς.

Σε προηγούμενες μελέτες έχει φανεί ότι στην B-ALL δεν παρατηρούνται συχνά μεταλλάξεις στο γονίδιο ίκαρος (*IKZF1*), ωστόσο είναι διαδεδομένες σε υπότυπους με κακή πρόγνωση και ελλείματα σε αυτό αποτελούν μια ισχυρή ένδειξη για υποτροπή της ασθένειας.

Το γονίδιο *IKZF1* αποτελείται από 8 εξώνια από τα οποία μόνο τα 7 (2-8) είναι κωδικά. Το προϊόν του γονιδίου ίκαρος, αποτελεί έναν μεταγραφικό παράγοντα που συμμετέχει μεταξύ άλλων στην ωρίμανση της λεμφοειδούς σειράς. Στον μιν αμινοτελικό άκρο εντοπίζονται 4 δακτύλιοι ψευδαργύρου οι οποίοι κωδικοποιούνται από τα εξώνια 4-6 και συνεισφέρουν στην πρόσδεση του *IKZF1* στο DNA, ενώ στο καρβοξυτελικό άκρο εντοπίζονται 2 δακτύλιοι ψευδαργύρου οι οποίοι κωδικοποιούνται από το εξώνιο 8 και συμμετέχουν στον ομοδιμερισμό και τον ετεροδιμερισμό της πρωτεΐνης.

Μεταλλάξεις στο γονίδιο έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση του εναλλακτικού ματίσματος με αποτέλεσμα την παραγωγή ισομορφών οι οποίες λειτουργούν ως ανταγωνιστικοί παράγοντες.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε το γονίδιο *IKZF1* με τις τεχνικές της αλληλούχισης DNA κατά Sanger και της πολλαπλής ενίσχυσης ανιχνευτών εξαρτώμενη από τη δράση λιγάσης (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification / MLPA) σε δείγματα παιδιατρικών ασθενών που έχουν διαγνωστεί με B-ALL.

## **ABSTRACT**

The acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common cancer disease that someone encounters at the pediatric patients.

In previous research it was shown that it is rare to identify mutations in the ikaros gene (IKZF1) although deletions and point mutations are quite common in certain subtypes with bad prognosis. Those deletions often are a strong indication for relapse.

The ikaros gene has 8 exons of which only 7 (2-8) are coding. The product is a transcriptional factor that is involved in the maturation of the lymphoid lineage. The N-terminal Zn-finger domain is comprised of four Zn-fingers that are encoded by exons 4-6 that support the sequence specific DNA binding. On the other hand the C-terminal domain contains two Zn-fingers encoded by exon 8 and is required for oligomerization with self- and other family members of Ikaros.

A number of ikaros isoforms can be generated by differential splicing of exons. Mutations of ikaros gene can promote an increase to that differential splicing. These isoforms can act as negative dominant factors.

In this study, Sanger sequencing and Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) were used in order to study the IKZF1 in DNA samples of pediatric patients diagnosed with B-ALL.

**KEYWORDS:** leukemia, ALL, IKZF1, Ikaros, Sequencing, MLPA

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου Τζέτη Μαρία για τις παρατηρήσεις της καθώς και για την εμπιστοσύνη και την υπομονή που υπέδειξε απέναντι στο πρόσωπό μου.

Σίγουρα δεν θα μπορούσα να παραλείψω τη Μυρτώ Πούλου, υπότροφο του εργαστηρίου «Χωρέμιο Ερευνητικό Εργαστήριο» στο Νοσοκομείο Παιδών «Αγία Σοφία» για τη πολύτιμη βοήθεια τόσο στο πειραματικό κομμάτι όσο και στις εν γένη συμβουλές της. Χωρίς τη βοήθειά της δεν θα ήταν εφικτή η ολοκλήρωση αυτού του εγχειρήματος.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τη διδάκτορα Νικολέτα Σελέντη, τον υποψήφιο διδάκτορα Αναστάση Μητράκο καθώς και τη διδάκτορα Ειρήνη Φυλακτού για τη στήριξή τους στο πειραματικό κομμάτι.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του εργαστηρίου για τη φιλοξενία τους και τη βοήθειά τους.

## Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ .....	11
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>	<b>12</b>
1.1 Κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος- Αιμοποίηση.....	12
1.2 Οξεία Β λεμφοβλαστική λευχαιμία.....	13
1.2.1 Κλινική εικόνα της ALL.....	15
1.2.2 Εργαστηριακός έλεγχος.....	16
1.2.3 Γενετικό υπόβαθρο.....	18
1.3 Γονίδιο Ίκαρος (IKZF1).....	19
1.3.1 Δομικά στοιχεία του Ίκαρος.....	20
1.3.2 Ρόλος του γονιδίου Ίκαρος.....	22
1.3.3 Μεταλλάξεις του γονιδίου Ίκαρος και συσχέτιση με την ALL.....	26
<b>2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ .....</b>	<b>29</b>
<b>2.1 Μεθοδολογία-Θεωρητική προσέγγιση.....</b>	<b>29</b>
2.1.1 Έλεγχος της ποιότητας και μέτρηση της συγκέντρωσης των νουκλεϊκών οξέων.....	29
2.1.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ( Polymerase Chain Reaction-PCR).....	30
2.1.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	36
2.1.4 Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης.....	39
2.1.5 Αλληλούχιση DNA.....	39
2.1.6 MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification).....	41
<b>2.2 Μεθοδολογία- Πειραματική διαδικασία.....</b>	<b>43</b>
2.2.1 Σχεδιασμός εκκινητών.....	43
2.2.2 Βελτιστοποίηση της αντίδρασης PCR.....	54
2.2.3 Πειραματική διαδικασία στα δείγματα μελέτης.....	55

<b>2.3 Αποτελέσματα.....</b>	<b>61</b>
<b>2.3.1 Αλληλούχιση DNA.....</b>	<b>61</b>
<b>2.3.2 MLPA.....</b>	<b>64</b>
<b>2.4 Συμπεράσματα.....</b>	<b>70</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ.....</b>	<b>77</b>
<b>ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....</b>	<b>78</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.....</b>	<b>79</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ .....</b>	<b>85</b>
<b>ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....</b>	<b>87</b>

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

- Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση της αιμοποίησης (σελ. 13)
- Εικόνα 2: Η μορφολογία των ALL/BLL σε κηλίδες και παραφινομένους ιστούς (σελ.17)
- Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση του χρωμοσώματος 7(σελ. 20)
- Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση του γονίδιου IKZF1 (σελ. 21)
- Εικόνα 5: Α. Δομή του συμπλόκου ίκαρος- NuRD και του Mi-2β. Β. Μοντέλο αρνητικής και θετικής ρύθμισης του συμπλόκου NuRD (σελ. 24)
- Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση φασματοφωτόμετρου υπεριώδους-ορατού (σελ. 30)
- Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση της ενίσχυσης τμήματος DNA κατά την PCR (σελ. 31)
- Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση της ενίσχυσης τμήματος DNA κατά την PCR (σελ. 31)
- Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση της ενίσχυσης τμήματος DNA κατά την PCR (σελ. 32)
- Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση της ενίσχυσης τμήματος DNA κατά την PCR (σελ. 33)
- Εικόνα 11: Σχηματική αναπαράσταση των φάσεων της αντίδρασης PCR (σελ. 34)
- Εικόνα 12: Πίνακας με μερικά μετάγραφα του IKFZ1 (σελ. 43)
- Εικόνα 13: Εξώνιο 2. Το προϊόν που αναμένεται να προκύψει από την αντίδραση PCR (σελ. 47)
- Εικόνα 14: Εξώνιο 3. Το προϊόν που αναμένεται να προκύψει από την αντίδραση PCR (σελ. 47)
- Εικόνα 15: Εξώνιο 4. Το προϊόν που αναμένεται να προκύψει από την αντίδραση PCR (σελ 48)
- Εικόνα 16: Εξώνιο 5. Το προϊόν που αναμένεται να προκύψει από την αντίδραση PCR (σελ. 48)
- Εικόνα 17: Εξώνιο 6. Το προϊόν που αναμένεται να προκύψει από την αντίδραση PCR (σελ. 49)
- Εικόνα 18: Εξώνιο 7. Το προϊόν που αναμένεται να προκύψει από την αντίδραση PCR (σελ.49)
- Εικόνα 19: Εξώνιο 2. In Silico PCR (σελ. 51)
- Εικόνα 20: Εξώνιο 3. In Silico PCR (σελ. 51)
- Εικόνα 21: Εξώνιο 4. In Silico PCR (σελ. 52)
- Εικόνα 22: Εξώνιο 5. In Silico PCR (σελ. 52)
- Εικόνα 23: Εξώνιο 6. In Silico PCR (σελ. 53)



**Εικόνα 24: Εξώνιο 7. In Silico PCR (σελ. 53)**

**Εικόνα 25: Ηλεκτροφόρημα σε πήκτωμα αγαρόζης low melt (σελ.55)**

**Εικόνα 26: Χρωματογράφημα της αλληλουχίας του εξωνίου 2 (δείγμα 6BM) (σελ.61)**

**Εικόνα 27: Χρωματογράφημα της αλληλουχίας του εξωνίου 5 (δείγμα 12BM) (σελ. 62)**

**Εικόνα 28: Χρωματογράφημα της αλληλουχίας του εξωνίου 5 (δείγμα 16BM) (σελ.62)**

**Εικόνα 29: Χρωματογράφημα της αλληλουχίας του εξωνίου 5 (δείγμα 37BM) (σελ. 63)**

**Εικόνα 30: Χρωματογράφημα της αλληλουχίας του εξωνίου 6 (δείγμα 25BM) (σελ. 63)**

**Εικόνα 31: Χρωματογράφημα της αλληλουχίας του εξωνίου 6 (δείγμα 37BM) (σελ. 63)**

**Εικόνα 32: Χρωματογράφημα της αλληλουχίας του εξωνίου 6 (δείγμα 40BM) (σελ.64)**

**Εικόνα 33: Διαγραμματική απεικόνιση όπως εμφανίζεται στο cofalyser ένα άτομο (10BM) που δεν παρουσιάζει ελλείματα ή διπλασιασμούς στα εξεταζόμενα γονίδια (σελ. 65)**

**Εικόνα 34: Διαγραμματική απεικόνιση όπως εμφανίζεται στο cofalyser ένα άτομο (14BM) που δεν παρουσιάζει ελλείματα ή διπλασιασμούς στα εξεταζόμενα γονίδια (σελ. 66)**

**Εικόνα 35: Διαγραμματική απεικόνιση όπως εμφανίζεται στο cofalyser ένα άτομο (12BM) που παρουσιάζει έλλειμα στο γονίδιο IKZF1 στο εξώνιο 4 (σελ.66)**

**Εικόνα 36: Διαγραμματική απεικόνιση όπως εμφανίζεται στο cofalyser ένα άτομο (12BM -επανάληψη) που παρουσιάζει ελλείματα στο γονίδιο IKZF1 στα εξώνια 3, 4 και 7 (σελ. 67)**

**Εικόνα 37: Διαγραμματική απεικόνιση όπως εμφανίζεται στο cofalyser ένα άτομο (15BM) που παρουσιάζει διπλασιασμό στο γονίδιο IKZF1 στο εξώνιο 4 (σελ. 68)**

**Εικόνα 38: Διαγραμματική απεικόνιση όπως εμφανίζεται στο cofalyser ένα άτομο (16BM) που παρουσιάζει έλλειμα στο γονίδιο IKZF1 στο εξώνιο 3 (σελ. 69)**

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Εκθετική αύξηση των μορίων στόχων DNA ανά κύκλο της αντίδρασης PCR (σελ. 33)

Πίνακας 2: Ενδεικτικές τιμές της συγκέντρωσης πηκτώματος αγαρόζης και του εύρους της διακριτικής του ικανότητας (σελ. 37)

Πίνακας 3: Πρόσθιος και οπίσθιος εκκινητής όπως σχεδιάστηκε στο primer3 για το εξώνιο 2 του IKFZ1 (σελ. 44)

Πίνακας 4: Πρόσθιος και οπίσθιος εκκινητής όπως σχεδιάστηκε στο primer3 για το εξώνιο 3 του IKFZ1 (σελ. 44)

Πίνακας 5: Πρόσθιος και οπίσθιος εκκινητής όπως σχεδιάστηκε στο primer3 για το εξώνιο 4 του IKFZ1 (σελ. 45)

Πίνακας 6: Πρόσθιος και οπίσθιος εκκινητής όπως σχεδιάστηκε στο primer3 για το εξώνιο 5 του IKFZ1 (σελ. 45)

Πίνακας 7: Πρόσθιος και οπίσθιος εκκινητής όπως σχεδιάστηκε στο primer3 για το εξώνιο 6 του IKFZ1 (σελ. 46)

Πίνακας 8: Πρόσθιος και οπίσθιος εκκινητής όπως σχεδιάστηκε στο primer3 για το εξώνιο 7 του IKFZ1 (σελ. 46)

Πίνακας 9: Πρόγραμμα αντίδρασης PCR (σελ. 54)

Πίνακας 10: Τα γονίδια στόχοι στο SALSA MLPA p335 ALL-IKFZ1 kit (σελ. 56)

Πίνακας 11: Συγκεντρωτικός πίνακας με τα αποτελέσματα (ελλείματα και διπλασιασμοί) όπως προέκυψαν από την πειραματική διαδικασία του MLPA (σελ. 64-65)

Πίνακας 12: Τιμές DQ όπως υπολογίζονται από το coffalyser (σελ.67)

Πίνακας 13: Τιμές DQ όπως υπολογίζονται από το coffalyser (σελ. 68)

Πίνακας 14: Τιμές DQ όπως υπολογίζονται από το coffalyser (σελ. 69)

Πίνακας 15: Τιμές DQ όπως υπολογίζονται από το coffalyser (σελ. 70)

Πίνακας 16: Αντιστοίχιση της τιμής DQ με τον αριθμό των αντιγράφων στο MLPA (σελ. 71)

Πίνακας 17: Αντιστοίχιση της τιμής DQ με τα εξεταζόμενα δείγματα όπως προέκυψαν από την πειραματική διαδικασία (σελ. 72)

Πίνακας 18: Συγκεντρωτικές πληροφορίες των δειγμάτων που εξετάστηκαν (σελ. 74-75)

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού τίτλου σπουδών ειδίκευσης: «Ιατρική γενετική: Κλινική και Εργαστηριακή κατεύθυνση» της Σχολής Επιστημών Υγείας, στο τμήμα Ιατρικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Όλη η πειραματική διαδικασία διενεργήθηκε στο Εργαστήριο Ιατρική Γενετικής της Ιατρικής Σχολής Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών με έδρα το Χωρέμιο Ερευνητικό Εργαστήριο στο Νοσοκομείο Παίδων «Αγία Σοφία».

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος- Αιμοποίηση

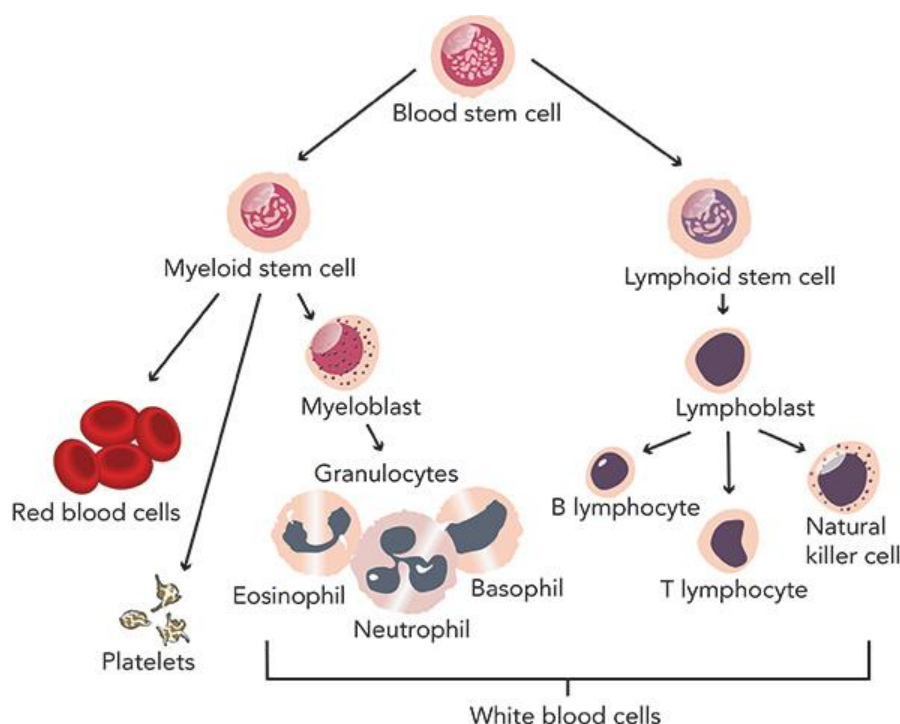
Όλα τα κύτταρα του αίματος προέρχονται από ένα τύπο κυττάρων τα οποία ονομάζονται αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (HSC, Hematopoietic Stem Cell). Τα αρχέγονα αυτά βλαστοκύτταρα έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε άλλους τύπους κυττάρου και να αυτοανανεώνονται διατηρώντας έτσι σταθερό το επίπεδο του πληθυσμού τους μέσω κυτταρικών διαιρέσεων (1).

Στα αρχικά στάδια της αιμοποίησης ένα πολυδύναμο αρχέγονο κύτταρο μπορεί να ακολουθήσει δύο διαφορετικά μονοπάτια διαφοροποίησης, δίνοντας γένεση είτε σε ένα λεμφοειδές προγονικό κύτταρο (lymphoid progenitor cell) ή σε ένα μυελοειδές προγονικό κύτταρο (myeloid progenitor cell). Τα προγονικά/πρόδρομα κύτταρα έχουν χάσει την ικανότητα αυτοανανέωσης και ανήκουν πλέον σε μια συγκεκριμένη κυτταρική σειρά. Τα μεν προγονικά λεμφοειδή κύτταρα δίνουν γένεση στα B, T και NK (φυσικά φονικά κύτταρα-Natural Killers) κύτταρα ενώ τα μυελοειδή αρχέγονα κύτταρα δημιουργούν προγονικά κύτταρα ερυθρών αιμοσφαιρίων, διάφορους τύπους λευκών αιμοσφαιρίων (ουδετερόφιλα, εωσινόφιλα,βασεόφιλα, μονοκύτταρα, μαστοκύτταρα, δενδριτικά) και μεγακαρυοκύτταρα (πρόδρομα κύτταρα των αιμοπεταλίων) (1).

Τα αιμοποιητικά κύτταρα καθώς και τα κύτταρα που προκύπτουν από αυτά, αναπτύσσονται, διαφοροποιούνται και ωριμάζουν στο μυελό των οστών μέσα σε ένα δίκτυο στρωματικών κυττάρων (stromal cells) μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται λιπώδη κύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες και μακροφάγα. Τα στρωματικά κύτταρα παρέχουν τις συνθήκες ενός μικροπεριβάλλοντος που επάγει την αιμοποίηση (HIM- Hematopoietic Inducing Microenvironment) και επηρεάζουν έτσι την διαφοροποίηση και αύξηση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Το μικροπεριβάλλον αυτό αποτελείται από ένα συνονθύλευμα κυττάρων και παραγόντων. Αρκετοί από αυτούς τους αυξητικούς αιμοποιητικούς παράγοντες είναι διαλυτές ουσίες οι οποίες φτάνουν στα κύτταρα στόχους μέσω διάχυσης ενώ άλλοι είναι μεμβρανικά μόρια των στρωματικών κυττάρων και απαιτούν τη δημιουργία διακυτταρικών επαφών μεταξύ των στρωματικών και των αποκρινόμενων κυττάρων (1).

Τα B λεμφοκύτταρα ωριμάζουν στο μυελό των οστών (πρωτογενές λεμφοειδές όργανο) και εν συνεχεία μεταφέρονται από το αίμα στα δευτερογενή λεμφοειδή όργανα. Αντιθέτως τα T λεμφοκύτταρα εγκαταλείπουν το μυελό των οστών όσο είναι ακόμα ανώριμα, κατευθύνονται στο θύμο αδένα

όπου και ωριμάζουν και τελικά κινούνται προς τα δευτερογενή λεμφοειδή όργανα (2).



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση της αιμοποίησης. Φαίνεται πως όλα τα κύτταρα του αίματος προέρχονται από ένα τύπο κυττάρων (αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα-blood stem cell) και πως τα προγονικά λεμφοειδή κύτταρα (lymphoid stem cell) εξελίσσονται σε B, T και NK κύτταρα. (πηγή: NIH, National Cancer Institute, [www.cancer.gov](http://www.cancer.gov))

## 1.2 Οξεία Β λεμφοβλαστική λευχαιμία

Η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (Acute Lymphoblastic Leukemia, ALL) είναι η πιο κοινή κακοήθεια σε παιδιατρικούς ασθενείς και αντιπροσωπεύει το 75-80% των οξείων λευχαιμιών σε αυτή την ηλικιακή ομάδα. Η πλειοψηφία των περιπτώσεων ALL συναντάται σε παιδιά, περίπου 3-4 ανά 100 000 ασθενών με ηλικία μεταξύ μηνών (λιγότερο του ενός έτους) και 14 ετών και περίπου 1 ανά 100 000 σε ασθενείς άνω των 15 ετών στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (3, 4). Επηρεάζει παιδιά όλων των ηλικιών, ωστόσο εμφανίζεται ιδιαίτερη αύξηση των ALLs στις ηλικίες μεταξύ 2 και 5 ετών και με ελαφρά αυξημένη συχνότητα στα αγόρια (3, 4). Στα παιδιά, οι ALLs αποτελούν το 75% όλων των οξείων λευχαιμιών οι οποίες με τη σειρά τους αποτελούν το 34% όλων των κακοηθειών σε αυτή την ηλικιακή ομάδα. (4). Περίπου το 10% όλων των κακοηθειών που επηρεάζουν τα παιδιά κάτω των 15 ετών, διαγιγνώσκονται στο πρώτο έτος της ζωής τους. Η λευχαιμία είναι ο δεύτερος πιο συχνός τύπος κακοήθειας στα παιδιά ηλικίας κάτω του ενός έτους και η

ALL ο πιο συχνά παρατηρούμενος τύπος (5). Αυτά τα ποσοστά μειώνονται όσο αυξάνει η ηλικία και φαίνεται ότι στους ενήλικες οι οξείες μυελογενής λευχαιμίες (AMLs) και οι χρόνιες λεμφοβλαστικές λευχαιμίες είναι πιο κοινές. Τέλος σε όλες τις ηλικιακές ομάδες φαίνεται να επηρεάζεται περισσότερο η λευκή φυλή (4).

Η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία είναι ένα ετερογενές νόσημα και οι υπότυποι διαφοροποιούνται με βάση βιολογικά, κυτταρικά και μοριακά χαρακτηριστικά, την ανταπόκριση στη θεραπεία και τον κίνδυνο υποτροπής και συσχετίζονται με διαφορετική πρόγνωση και εξέλιξη (3).

Το ποσοστό επιβίωσης σε παιδιατρικούς ασθενείς με ALL έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια και έχει φτάσει περίπου το 90% ειδικά σε ομάδες με καλή πρόγνωση. Αυτή η πρόοδος οφείλεται κυρίως στην υιοθέτηση τροποποιημένων θεραπευτικών πρωτοκόλλων τα οποία στηρίζονται σε εξατομίκευση με βάση τη φαρμακοδυναμική (pharmacodynamics) και την φαρμακογενετική (pharmacogenomics) του κάθε ασθενούς (3).

Η κατανομή σε ομάδες κινδύνου βασίζεται σε ένα ευρύ φάσμα κλινικών, βιολογικών και γενετικών χαρακτηριστικών όπως είναι η ηλικία, το φύλο, ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων κατά τη διάγνωση, ο ανοσοφαινότυπος, κυταρογενετικά και μοριακά χαρακτηριστικά καθώς και η απόκριση στη θεραπεία. Μάλιστα η απόκριση στην θεραπεία και κατά πόσο στο τέλος αυτής υπάρχουν ευρήματα ελάχιστης υπολειμματικής νόσου (minimal residual disease - MRD) είναι ένας από τους πιο βασικούς προγνωστικούς δείκτες στους ασθενείς με ALL (3).

Η ALL εμφανίζεται κυρίως ως de novo και σπάνια μόνο λαμβάνει χώρα ως δευτερεύουσα νεοπλασία. Μια πληθώρα γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων έχουν συσχετιστεί με την ALL. Εμφανίζεται με μεγάλη συχνότητα σε ασθενείς με σύνδρομο Down, σύνδρομο Bloom, νευροϊνωμάτωση τύπου I και αταξία-τηλεαγγειεκτασία. Επιπροσθέτως η έκθεση, κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης σε ιονίζουσα ακτινοβολία, εντομοκτόνα και διάφορους διαλύτες φαίνεται να συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο παιδικής λευχαιμίας (4, 5) καθώς και η χρήση αντισταμινικών, μετρονιδαζόλης, διπυρόνης, οιστρογόνων, οινόπνεύματος, μαριχουάνας και παραισθησιογόνων φαρμάκων από την έγκυο (5). Ακόμα ένας παράγοντας που θεωρείται ότι συμβάλει είναι το υψηλό βάρος γέννησης (μεγαλύτερο από 3,5 κιλά) ενώ πολλές φορές έχουν προηγηθεί και αυτόματες αποβολές σε προηγούμενες κυήσεις (5).

### 1.2.1 Κλινική εικόνα της ALL

Η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία περιλαμβάνει μία ομάδα λεμφοειδών νεοπλασιών οι οποίες μορφολογικά και ανοσοφαινοτυπικά φέρουν χαρακτηριστικά των πρόδρομων κυττάρων της Β και Τ σειράς. Αυτές οι νεοπλασίες μπορεί να προϋπάρχουν σε μία λευχαιμική διαδικασία με εκτεταμένη εμπλοκή του μυελού των οστών και του περιφερικού αίματος ή μπορεί να περιορίζονται σε διήθηση των ιστών με απουσία ή ελάχιστη εμπλοκή του μυελού των οστών (λιγότερη από 25%) οπότε και τυπικά χαρακτηρίζονται ως λεμφοβλαστικά λεμφώματα (lymphoblastic lymphomas LBLs). Η ALL και τα LBLs φαίνεται να αποτελούν μία βιολογική συνέχεια αν και μπορεί να εμφανίζουν απόλυτα διακριτά κλινικά χαρακτηριστικά. Η τρέχουσα ταξινόμηση του παγκόσμιου οργανισμού υγείας (World Health Organization Classification) για τις αιμοποιητικές νεοπλασίες ορίζει αυτές τις διαταραχές ως Β- ή Τ- λεμφοβλαστικές λευχαιμίες/λεμφώματα (4).

Η λευχαιμία σε παιδιά κάτω του ενός έτους έχει ευδιάκριτα επιδημιολογικά, κλινικά και βιολογικά χαρακτηριστικά και συσχετίζονται με παράγοντες κακής πρόγνωσης. Πολύ κοινές είναι οι γονιδιακές ανακατατάξεις, όπως η 11q23 μετάθεση, οι οποίες οδηγούν στην συνύπαρξη λεμφοειδών και μυελοειδών φαινοτύπων γνωστή ως μετάθεση λευχαιμιών μικτής γραμμής (mixed lineage leukemia- MLL translocation). Η παρουσία αυτού του τύπου μετάθεσης συσχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση. Όσον αφορά τον ανασοφαινότυπο σε αυτά τα παιδιά, παρατηρούνται πληθώρα νεαρών, πρόδρομων Β κυττάρων (CD34+/CD19+) αρνητικά για το αντιγόνο CD10 (5).

Συνήθως η κλινική εμφάνιση της ALL είναι οξεία αν και σε μικρό ποσοστό μπορεί να εξελιχθεί σε διάστημα πολλών μηνών. Τα συμπτώματα και οι ενδείξεις που παρουσιάζονται συσχετίζονται με το φορτίο των λευχαιμικών κυττάρων και με το βαθμό της αντικατάστασης του μυελού που οδηγούν σε κυτταροπενίες. Έτσι τα πιο συχνά συμπτώματα περιλαμβάνουν πυρετό (ο οποίος είτε προκαλείται από τη λευχαιμία είτε δευτερογενώς από μία δευτεροπαθή λοίμωξη λόγω της ουδετεροπενίας), κόπωση και λήθαργο (ως αποτέλεσμα της αναιμίας), πόνος στα οστά και στις αρθρώσεις και αιμορραγική διάθεση (η οποία συσχετίζεται με τη θρομβοπενία) (4).

Οι ασθενείς με πρόδρομη Τ-λεμφοκυτταρική ALL/LBL συχνά εμφανίζουν μία μεσοθωρακική μάζα με ή χωρίς συσχετιζόμενες υπεζωκοτικές εκροές οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε αναπνευστικές δυσλειτουργίες καθώς και σε άλλα σύμπτωμα στου συνδρόμου της άνω κοίλης φλέβας. Κοινές εξωμυελικές περιοχές που εμπλέκονται είναι οι λεμφαδένες, το ήπαρ, ο

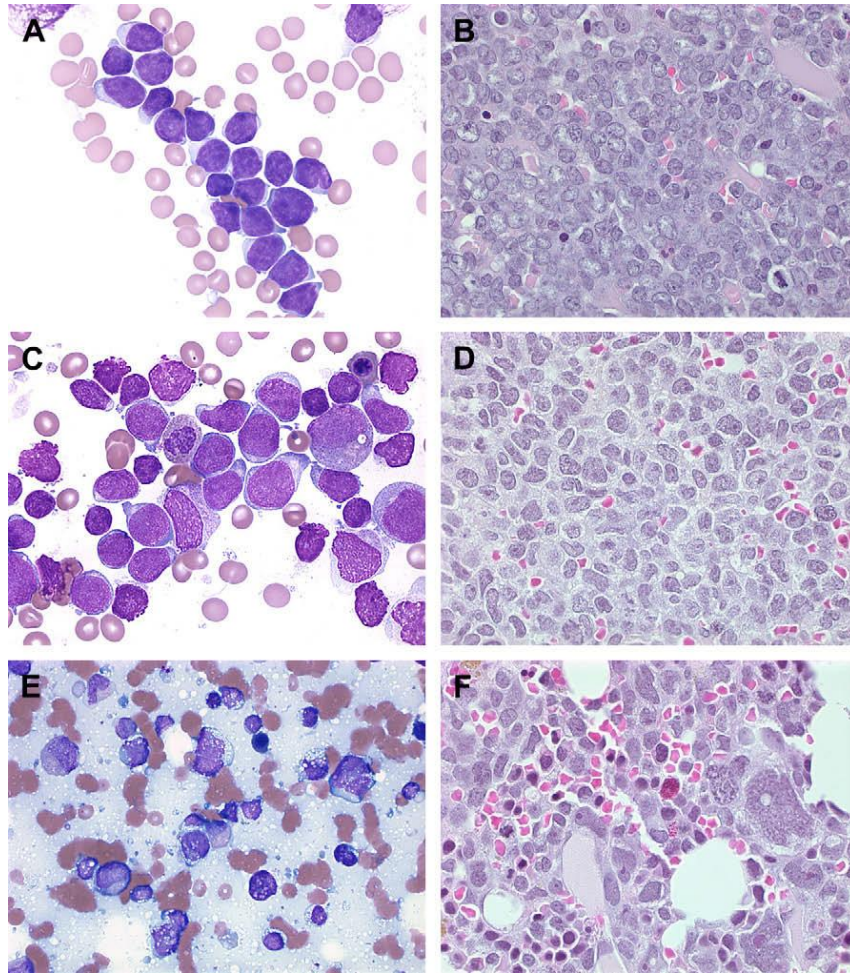
σπλήνας και οι μήνιγγες. Σπάνια ασθενείς με B-LBL, μπορεί να εμφανίσουν δερματικές αλλοιώσεις που συσχετίζονται με λεμφαδενοπάθειες σε περιοχές της κεφαλής και του λαιμού ή διακριτές οστικές αλλοιώσεις (4).

### 1.2.2 Εργαστηριακός έλεγχος

Στις πιο συχνές εργαστηριακές ενδείξεις που εντοπίζονται στην ALL περιλαμβάνονται η αναιμία, η θρομβοπενία, η ουδετεροπενία και η λευκοπένια ή η λευκοκυττάρωση, με υπερλευκοκυττάρωση ( $>100 \cdot 10^9/L$ ) να παρουσιάζεται περίπου στο 15% των παιδιατρικών ασθενών. Επίσης μπορεί να παρουσιάζεται υψηλή συγκέντρωση ουρικού οξέος καθώς και αφυδρογονάσης της λακτόζης στον ορό του αίματος οι οποίες συσχετίζονται με το φορτίο των καρκινικών κυττάρων και το βαθμό λύσης τους (4).

Τα κλασσικά μορφολογικά χαρακτηριστικά της ALL έχουν περιγραφεί πολύ καλά στην βιβλιογραφία και συνοψίζονται καλύτερα στην πρώτη ταξινόμηση της ALL του γαλλο-αμερικανο-βρετανικού συστήματος (FAB) η οποία είναι βασισμένη κυρίως σε μικροσκοπικά ευρήματα των λευχαιμικών κυττάρων όπως αυτά φαίνονται σε επιχρίσματα με Wright-Giemsa βαφή. Η ταξινόμηση FAB χαρακτηρίζεται από τρεις μορφολογικές ομάδες, τις L1, L2 και L3 (εικόνα 2). Συχνότερα οι βλάστες που συναντώνται στην ALL είναι μικρού με μεσαίου μεγέθους με περιορισμένο κυτταρόπλασμα και συμπυκνωμένη πυρηνική χρωματίνη και δυσδιάκριτους ή απόντες πυρηνίσκους (υπότυπος L1 κατά FAB). Λιγότερο συχνά τα κύτταρα της ALL μπορεί να είναι μεγαλύτερα με μέτρια ποσότητα ωχρού βασεοφιλικού κυτταροπλάσματος, έντονα κατακερματισμένη σε μικρά κομμάτια πυρηνική χρωματίνη και εξέχοντες πυρηνίσκους (υπότυπος L2 κατά FAB). Πολύ σπάνια μπορεί να εμφανιστεί ο υπότυπος L3 κατά FAB, στον οποίο οι βλάστες εμφανίζονται ευμεγέθεις με αφθονία σκούρου βασεοφιλικού και περιστασιακά κενοτοπικού χαρακτήρα κυταρόπλασμα και πυρηνική χρωματίνη που σχηματίζει αδρά συσσωματώματα καθώς και ποικιλοτρόπως εξέχοντες πυρηνίσκους (4).





**Εικόνα 2: Η μορφολογία των ALL/BLL σε κηλίδες και παραφινωμένους ιστούς (A,B). ALL L1 (C,D), ALL L2 (E,F). (A,C,E Whright-Giemsa stain/ B,D,F αιματοξυλίνη-ηωσίνη). (πηγή: Onciu M. Acute Lymphoblastic Leukemia, 2009).**

Οι περισσότερες περιπτώσεις με την μορφολογία L3 αφορούν το λέμφωμα Burkitt όπου παρατηρείται ένας υπότυπος μεγάλου μεγέθους ώριμων Β κυττάρων. Ωστόσο ένα μικρό υποσύνολο με πρόδρομα νεοπλασματικά Β κύτταρα μπορεί επίσης να απαντά στη FAB L3 ο οποίος συσχετίζεται με υποδιπλοειδία (4).

Όταν παρατηρούνται βιοψίες μυελού των οστών που έχουν επεξεργαστεί με αιματοξυλίνη και ιωσίνη, οι νεοπλασματικοί λεμφοβλάστες της ALL/LBL μπορεί να εμφανίζουν χαρακτηριστικά τα οποία ανταποκρίνονται στις κατηγορίες FAB (4).

Η κυτταροχημική χρώση χρησιμοποιείται ωστόσο με φθίνουσα συχνότητα ως διαγνωστικό μέσο στην ALL και αντικαθίσταται από τον ανοσοφαινότυπο αναδεικνύοντάς τον σε βασικό συστατικό της διαγνωστικής διαδικασίας της ALL/LBL (4).

Σε αντίθεση με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά, ο ανοσοφαινότυπος διακρίνει την ALL σε δύο κατηγορίες: πρόδρομη Β-κυτταρική ALL (B-ALL) και πρόδρομη Τ-κυτταρική ALL (T-ALL). Η Β-ALL χαρακτηρίζεται από την έκφραση πληθώρας αντιγόνων των Β κυττάρων μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται το PAX-5 (πρωτεΐνη ενεργοποίησης των Β-κυττάρων), CD19, CD20, CD22 (επιφανείας και κυτταροπλασματικό), CD24 και CD79a (κυτταροπλασματικό). Σημειωτέων, στην Β-ALL το αντιγόνο CD20 ενδεικτικό των ώριμων Β-λεμφοκυττάρων, μπορεί να εκφράζεται μόνο μερικώς από τους λευχαιμικούς λεμφοβλάστες ή να είναι απολύτως απών. Μεγάλο μέρος επίσης των Β-ALL εκφράζουν το CD10, κοινό αντιγόνο της οξείας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας το οποίο σταθερά εκφράζεται και από φυσιολογικά πρόδρομα Β-κύτταρα. Τα περισσότερα Β-ALL εμφανίζουν χαμηλή έκφραση του CD45 (πανλευκοκυτταρικό αντιγόνο) και έναν υπότυπο αυτών των λευχαιμιών ο οποίος είναι πολύ κοινός σε παιδικούς ασθενείς, εμφανίζεται τελείως πλήρης απουσία έκφρασης του CD45 (4).

Με βάση το πρότυπο έκφρασης της ανοσοσφαιρίνης Ig, η Β-ALL μπορεί να διακριθεί σε:

- Πρώιμη προ-Β ALL, στην οποία υπάρχει απουσία της έκφρασης της Ig
- Προ-Β ALL όπου εντοπίζεται κυτταροπλασματικά η έκφραση μ αλυσίδων χωρίς την έκφραση Ig ελαφρών αλυσίδων
- Μεταβατική προ-Β-ALL με κυτταροπλασματική και χαμηλή επιφανειακή έκφραση μ αλυσίδων χωρίς την έκφραση Ig ελαφρών αλυσίδων (4).

Υπενθυμίζεται ότι ένα λεμφοκύτταρο μπορεί να συνθέτει είτε κ είτε λ ελαφρές αλυσίδες, ενώ το ίδιο λεμφοκύτταρο μπορεί να συνθέσει διαδοχικά μ και γ αλυσίδες. Οι ανοσοσφαιρίνες του ανθρώπου αποτελούνται είτε από δύο κ είτε από δύο λ ελαφρές αλυσίδες που συνδέονται με δύο μ ή δ ή γ ή α ή ε αλυσίδες για να σχηματίσουν τα τετραμερή μόρια IgM, IgD, IgG, IgA και IgE, αντιστοίχως (6).

Το πρότυπο των ανοσοφαινοτυπικών διαταραχών συσχετίζεται έως κάποιο βαθμό με την υποκείμενη γενετική βλάβη στη Β-ALL (4).

### 1.2.3 Γενετικό υπόβαθρο

Αν και σχετικά ομογενής στα μορφολογικά και ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά οι ALL/LBL εμφανίζουν ιδιαίτερη ετερογένεια σε γενετικό επίπεδο. Οι γενετικές βλάβες καθορίζουν υποομάδες ασθενειών με χαρακτηριστικά κλινικά στοιχεία και απόκριση σε θεραπείες. Οι μελέτες που διερευνούν την έκφραση γονιδίων έχουν δείξει ότι αυτές οι υποομάδες, αν και εκτενώς αλληλεπικαλύπτονται σε μορφολογικό και σε ανοσοφαινοτυπικό

επίπεδο, σε επίπεδο έκφρασης γονιδίων έχουν διακριτά χαρακτηριστικά και διαφορετική *in vitro* απόκριση σε φάρμακα, καθώς παρατηρούνται διαφορετικά πρότυπα έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με ένζυμα μεταβολισμού φαρμάκων. Αναλύσεις με την χρήση μικροσυστοιχειών με ανιχνευτές μονονουκλεοτιδικών πολυμορφικών θέσεων (single nucleotide polymorphism arrays) και DNA αλληλούχισης, αποκάλυψαν ότι αυτές οι υποομάδες περιέχουν επίσης διακριτές αλλαγές σε γονίδια τα οποία κωδικοποιούν βασικούς ρυθμιστικούς παράγοντες οι οποίοι εμπλέκονται στην ωρίμανση και την διαφοροποίηση των Β-λεμφοκυττάρων (4).

Η κλινικοπαθολογία και τα μοριακά στοιχεία αναφέρονται περιληπτικά στον πίνακα του παραρτήματος II.

Πολλές φορές έχουν εντοπιστεί σε νεογνικές κηλίδες (κάρτες Guthrie) συντηγμένα γονίδια (fusion genes) τα οποία συσχετίζονται με τη λευχαιμία καθώς και ανακατατάξεις γονιδίων των ανασοσφαιρινών (Ig) και κλωνικών Ig γονιδίων και τα οποία νεογνά εν συνεχεία εμφάνισαν ALL (4).

Ανακατατάξεις της Ig και /ή των TCR (T-cell receptor- υποδοχέας των T-κυττάρων) γονιδίων είναι παρούσες στις περισσότερες ALL/LBL. Αυτές οι ανακατατάξεις δεν είναι πάντα συνδεδεμένες με την γενεολογία των κυττάρων καθώς στη B-ALL μπορεί να βρεθούν TCR ανακατατάξεις και στην T-ALL Ig ανακατατάξεις πολύ πιθανά λόγω του συνεχούς ανασυνδυασμού των κακοηθών αιμοποιητικών κυττάρων (4).

Έτσι οι περισσότερες B-ALL (97%) περιέχουν ανακατατάξεις στα Ig γονίδια συμπεριλαμβανομένων το γονίδιο της βαριάς αλυσίδας (IgH) (95%), το γονίδιο της κάππα ελαφριάς αλυσίδας (IgK) (30%) ή της λάμδα ελαφριάς αλυσίδας (IgL) (20%). Αυτές οι ανακατατάξεις είναι συνήθως ολιγκλωνικές (πολλαπλές ανακατατάξεις IgH παρούσες σε ποσοστό 30-40%, πολλαπλές IgK ανακατατάξεις σε ποσοστό 5-10%) (4).

Ωστόσο όπως αναφέρθηκε, στις B-ALL μπορούν επίσης να εντοπιστούν και ανακατατάξεις TCR ή/και ελλείψεις που αφορούν τα TCR β,γ ή/και δ γονίδια. Αυτές μπορεί να είναι δικλωνικές ή ολιγκλωνικές οι οποίες φαίνεται να οφείλονται στις συνεχείς αναδιατάξεις και δευτερογενείς αναδιατάξεις (αναδιατάξεις που δεν παρατηρούνται στην αρχική διάγνωση) οι οποίες ενδέχεται να λαμβάνουν χώρα και συχνά εντοπίζονται στις B-ALL σε περιπτώσεις υποτροπής (4).

### **1.3 Γονίδιο Ίκαρος (*IKZF1*)**

Στο 15% περίπου των περιπτώσεων παιδιατρικών B-ALL το γονίδιο *IKZF1* εμφανίζεται με μεταλλάξεις ενώ έχει εξαλλαγές στο 70% και πλέον των περιπτώσεων της Ph<sup>+</sup> θετικής λεμφοειδούς λευχαιμίας (Ph<sup>+</sup> positive lymphoid

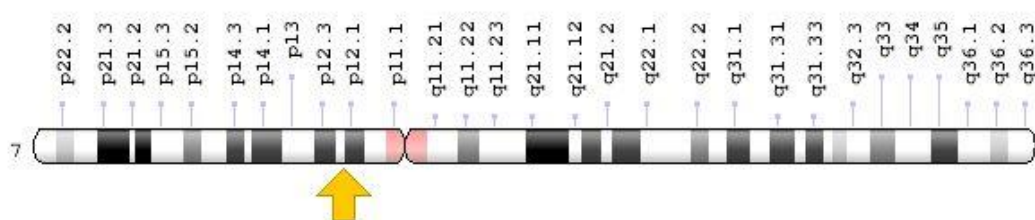
leukemia) καθώς είναι κοινές και στη τύπου Φιλαδέλφεια ALL (Ph-like ALL) (7).

Οι εξαλλαγές (alterations) στο γονίδιο *IKZF1* είναι λιγότερο συχνές στις B-ALL αλλά είναι πολύ διαδεδομένες σε υψηλού ρίσκου υπότυπους (high risk subtypes) με κακή πρόγνωση (poor outcome) (7).

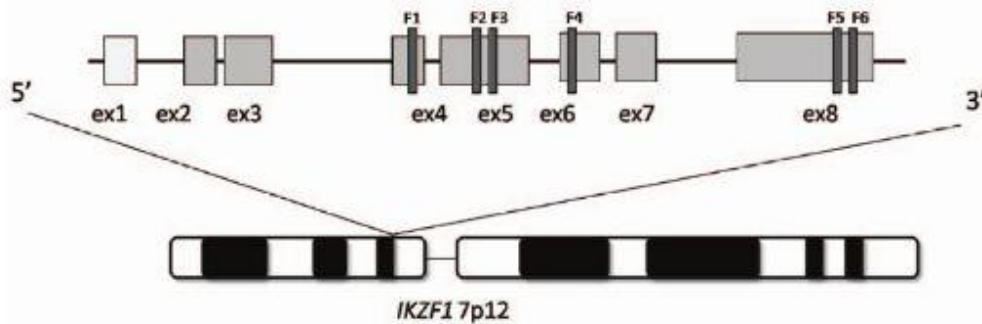
Η υποτροπή εμφανίζεται συχνά στην παιδιατρική ALL και είναι δύσκολα προβλέψιμη. Κατά τη διάρκεια της διάγνωσης ανιχνεύονται πολλαπλές αλλοιώσεις οι οποίες περιλαμβάνουν τα *PAX5*, *CDKN2A* και *EBF1*, οι οποίες συνήθως είναι απύσες κατά την υποτροπή το οποίο υποδεικνύει ότι αποτελούν δευτερογενή επεισόδια τα οποία απουσιάζουν από τα προγονικά κύτταρα τα οποία παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στη θεραπεία και ως εκ τούτου οδηγούν στην υποτροπή. Αντίθετα οι ελλείψεις και οι μη νοηματικές (non sense mutations) μεταλλάξεις στο *IKZF1* ανιχνεύονταν συνεχώς κατά τη διάρκεια της υποτροπής. Ως εκ τούτου η ανίχνευση των ελλείψεων στο *IKZF1* θεωρείται κατά τη διάγνωση ένα από τα πιο ισχυρά προγνωστικά χαρακτηριστικά για υποτροπή (8).

### 1.3.1 Δομικά στοιχεία του Ίκαρος

Το γονίδιο Ίκαρος κωδικοποιεί για ένα μεταγραφικό παράγοντα που περιέχει δακτυλίου ψευδαργύρου (zink finger) και είναι απαραίτητος σε όλες τις λεμφοειδείς σειρές. Έχει 8 εξώνια από τα οποία τα 7 είναι κωδικά (7).



Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση του χρωμοσώματος 7. Με το βέλος υποδεικνύεται η χρωμοσωμική περιοχή 7p12.2 στην οποία εντοπίζεται το γονίδιο *IKZF1* (πηγή: <https://ghr.nlm.nih.gov>)



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση του γονιδίου IKZF1: ex= κωδικά εξώνια (σκούρο γκρι) και το πρώτο μη κωδικό (ανοιχτό γκρι). F1-F4= αμινοτελικές περιοχές των δακτυλίων ψευδαργύρου (περιοχές πρόσδεσης της πρωτεΐνης στο DNA). F5-F6= καρβοξυτελικές περιοχές των δακτυλίων ψευδαργύρου (περιοχές διμερισμού της πρωτεΐνης). (πηγή: Iacobucci I, Iraci N, Messina M, Lonetti A, Chiaretti S, et al. 2012).

Το *IKZF1* και τα μέλη της ίδιας οικογένειας περιέχουν 2 εξαιρετικά συντηρημένες περιοχές δακτυλίων ψευδαργύρου τόσο στο άμινο- όσο και στο κάρβοξυ-τελικό άκρο. Στο αμινοτελικό άκρο εντοπίζονται 4 δακτύλιοι ψευδαργύρου οι οποίοι κωδικοποιούνται από τα εξώνια τέσσερα έως έξι και προσδένονται σε συγκεκριμένα σημεία που αναγνωρίζουν στο DNA. Ο δεύτερος και τρίτος δακτύλιος ψευδαργύρου στο άμινο τελικό άκρο είναι απαραίτητοι ώστε να προσφέρουν μία ειδική αλληλουχία σύνδεσης στο core motif A/GGGAA και άκρως απαραίτητο για την διαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο πρώτος και ο τέταρτος δακτύλιος ψευδαργύρου του Ίκαρος, έχουν ξεκάθαρο ρόλο στην ανάπτυξη των λεμφοειδών κυττάρων και στη λευκογένεση προτείνοντας ότι αυτοί οι δύο δακτύλιοι αλλάζουν στο σύνολο την ειδικότητα της αλληλουχίας και ως εκ τούτου τα γονίδια στόχους. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η εξειδίκευση του Ίκαρος στην σύνδεση με το DNA είναι παρόμοια με αυτή των Ets (E26 transformation-specific/E-twenty-six) παραγόντων. Στα T λεμφοκύτταρα οι πιο συχνοί ενισχυτές που συνεργάζονται με το Ίκαρος είναι οι πρωτεΐνες E-box E2A και Runx1, όπου παρατηρείται μία λειτουργική αλληλεπίδραση μεταξύ τους κατά την διαφοροποίηση των T (9).

Στο καρβοξυτελικό άκρο του Ίκαρος εντοπίζονται 2 δακτύλιοι ψευδαργύρου οι οποίοι κωδικοποιούνται από το εξώνιο 8 και είναι απαραίτητοι για τον όμοδιμερισμό του Ίκαρος καθώς και τον ετεροδιμερισμό με άλλα μέλη της οικογένειας (Αίολος- IKZF3, Ήλιος, Έως). Ο ετερο-όμο-διμερισμός αυξάνει τη σύνδεση του Ίκαρος στο DNA τουλάχιστον *in vitro* (7, 9).

Μία πληθώρα ισομορφών του Ίκαρος μπορούν να προκύψουν από εναλλακτικό μάτισμα στα εξώνια τρία έως και οκτώ. Αυτό εν μέρει οφείλεται στο γεγονός ότι τα εξώνια τέσσερα, έξι και επτά δεν έχουν κανονικούς (non-canonical) δέκτες (acceptor sites) στη περιοχή ματίσματος. Οι βασικές ισομορφές που απαντούν από τα πρώτα έως τα προχωρημένα στάδια της

αιμοποίησης είναι οι Ik-1 και Ik-2 ενώ προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος τα οποία στερούνται το αμινοτελικό άκρο των δακτυλίων ψευδαργύρου και ως εκ τούτου δεν μπορούν να δεσμευτούν στο DNA, φυσιολογικά παράγονται σε πολύ μικρό ποσοστό. Ωστόσο οι γενωμικές εξαλλαγές και ελλείψεις οδηγούν σε μία αυξημένη παραγωγή ισομορφών οι οποίες στερούνται την ικανότητα τους να συνδέονται στο DNA όπως για παράδειγμα η Ik-6. Αυτές οι ισομορφές παρεμβαίνουν στη δράση των λειτουργικών ισομορφών και των άλλων μελών της οικογένειας με το να ανταγωνίζονται την ενσωμάτωση στο NuRD (Nucleosome Remodeling and Deacetylase complex) και ως εκ τούτου αναφέρονται συνήθως ως αρνητικές επικρατητικές ισομορφές του γονιδίου Ίκαρος (Ikaros dominant negative isoforms) (9).

### 1.3.2 Ρόλος του γονιδίου Ίκαρος

Το γονίδιο Ίκαρος έχει πολλαπλούς ρόλους στη μεταγραφική ρύθμιση οι οποίοι πιθανά εξαρτώνται από τον τύπο του κυττάρου και από το στάδιο και μεταξύ των άλλων περιλαμβάνουν τη μεταγραφική ενεργοποίηση ή καταστολή η οποία εν μέρει προκαλείται από την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης (chromatin remodeling) (7).

Η οικογένεια των πρωτεϊνών Ίκαρος οι οποίες συνδέονται στο DNA, παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων. Στα πολυδύναμα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα το Ίκαρος ενισχύει την έναρξη της μεταγραφής γονιδίων τα οποία με τη σειρά τους προάγουν την διαφοροποίηση. Το Ίκαρος στοχεύει στο NuRD σύμπλοκο (Nucleosome Remodeling and Deacetylase-σύμπλοκο αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης) με αποτέλεσμα να αυξάνεται η προσβασιμότητα στη χρωματίνη και ως εκ τούτου η μεταγραφή. Μετά τη διαφοροποίηση της προγονικής σειράς, η έκφραση του Ίκαρος αυξάνεται σε επίπεδα χαρακτηριστικά για τα ενδιάμεσα B και T κύτταρα, το οποίο είναι απαραίτητο για την προαγωγή της ωρίμανσης και την αποτροπή λευχαιμικών επεισοδίων. Ως εκ τούτου είναι σαφές ότι το Ίκαρος παίζει δύο σημαντικούς ρυθμιστικούς ρόλους κατά την διαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων τόσο στα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα όσο και στα πρόδρομα B και T (9).

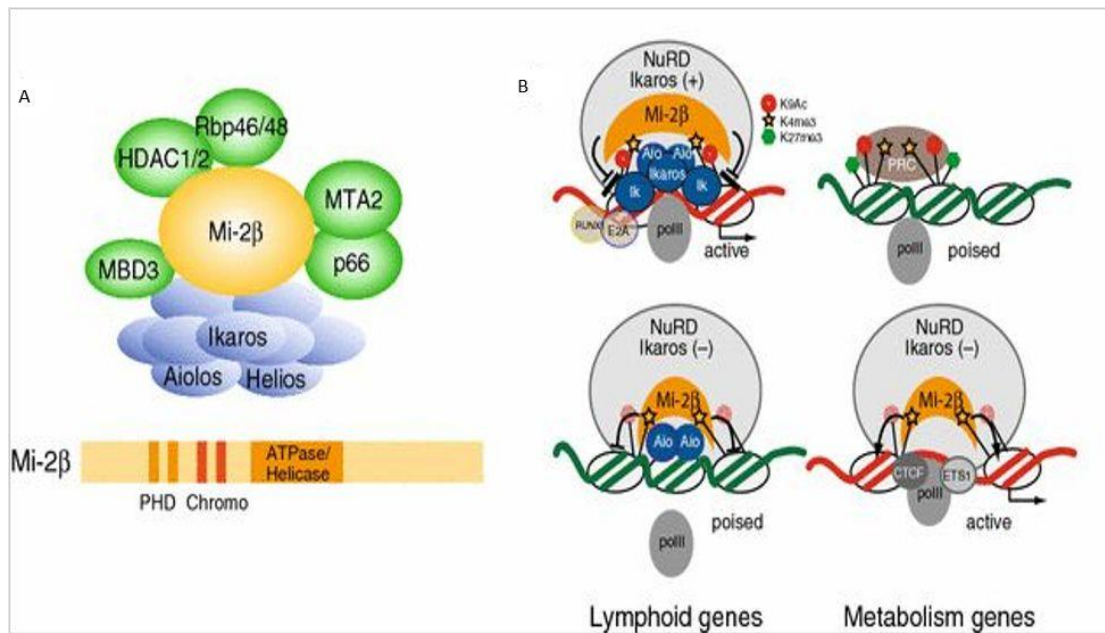
Μελέτες έχουν δείξει μία στενή σχέση του Ίκαρος με το σύμπλοκο NuRD στον πυρήνα τόσο των λεμφοκυττάρων όσο και των αιμοποιητικών (9). Το γονίδιο Ίκαρος με τις αποακετυλάσες των ιστονών καθώς και το Αίολος είναι μέρος του συμπλόκου του NuRD το οποίο διαμεσολαβεί στην αποακετυλίωση των ιστονών. Το Ίκαρος επίσης σχετίζεται με το PRC2 (polycomb repressor complex 2) ανεξάρτητα από το NuRD. Το PRC2 διαμεσολαβεί στην τριμεθυλίωση και την μεταγραφική καταστολή της H3K27 ιστόνης (Histone 3 lysine 27) και η απώλεια του Ίκαρος έχει ως αποτέλεσμα σε θυμοκύτταρα

ποντικού την καταστολή των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων και των γονιδίων στόχων του NOTCH1 (7).

Τα βασικά στοιχεία του NuRD είναι τα HDAC1, HDAC2, MTA1, MTA2, MBD3, Rbp46/48 και Mi-2b. Το Mi-2b είναι ένας ATP εξαρτώμενος τροποποιητής της χρωματίνης μεγέθους 22 kDa ο οποίος διαμορφώνει την χρωματίνη επιδρώντας στα νουκλεοσώματα. Σε αντίθεση με τον Ίκαρο ο οποίος κυρίως εκφράζεται στα αιμοποιητικά κύτταρα, τα συστατικά του NuRD εκφράζονται πρακτικά σε όλους τους τύπους κυττάρων (9).

Σε μοντέλα ποντικών έχει φανεί ότι το σύμπλοκο Ίκαρος-NuRD λειτουργεί τόσο ως καταστολέας όσο και ως ενεργοποιητής της γονιδιακής έκφρασης μέσω της αποκετυλίωση των ιστονών και την αναδιαμόρφωση των νουκλεοσωμάτων (9).

Παρόλο που το Ίκαρος και το Mi-2b απαντούν στο ίδιο σύμπλοκο, έχουν παρατηρηθεί ανταγωνιστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους όπως για παράδειγμα στη ρύθμιση της έκφρασης του *Cd4* καθώς και στην διαφοροποίηση των HSC (Hematopoietic Stem Cell). Τα υπεύθυνα γονίδια της ρύθμισης της αυτοανανέωσης των πολυδύναμων αυτών κυττάρων (όπως για παράδειγμα τα *MPL*, *TEK*, *NDN*, *MDMDC2*, *TGM2*, *EBI3*) καθώς και τα γονίδια που προωθούν την μυελική σειρά (όπως για παράδειγμα τα *CSF1R*, *EGR1*, *IL6RA*, *IL6ST*) σε κύτταρα HSC που εμφανίζουν ανεπάρκεια στον Mi-2b φαίνεται να υπολειτουργούν καθώς υπάρχει συσχέτιση απώλειας της αυτοανανέωσης καθώς και ατελή διαφοροποίηση σε κύτταρα της μυελικής σειράς. Δεδομένου ότι το Ίκαρος καταστέλλει το πρόγραμμα των πολυδύναμων LMPP (Lymphoid-primed multipotent progenitor) και αντιθέτως ενεργοποιεί τα προγράμματα προς την κατεύθυνση της λεμφοειδούς σειράς στα HSC και στα LMPP, πολύ πιθανά το Ίκαρος και το Mi-2b να έχουν αντίθετους ρόλους στη ρύθμιση της αυτοανανέωσης των πολυδύναμων κυττάρων καθώς και στην πορεία τους τελικά προς την λεμφοειδή ή την μυελική σειρά (9).



**Εικόνα 5:** Α. Δομή του συμπλόκου ίκαρος- NuRD και του Mi-2β. Το σύμπλοκο NuRD περιλαμβάνει την ιστονική δεακετυλάση τάξης I (HDAC1/2) και το ATP εξαρτώμενο αναδιομορφωτή της πρωτεΐνης Mi-2β (και α). Β. Μοντέλο αρνητικής και θετικής ρύθμισης του συμπλόκου NuRD. Η ανασταλτική επίδραση του συμπλόκου Mi-2β-NuRD στη χρωματίνη (H3K4me3, H3K9Ac) αντισταθμίζεται στα λεμφοειδή γονίδια από τις πρωτεΐνες της οικογένειας του Ίκαρος. Η υπόθεση των Yoshida και Georgopoulos είναι ότι η εξισορρόπηση επιτυγχάνεται χάρη στο ότι το ίκαρος συνδέεται εκτεταμένα πάνω στο DNA στις θέσεις στόχους. Η μείωση της επίδρασης του ίκαρος είτε μέσω μετα-μεταφραστικής τροποποίησης της πρωτεΐνης είτε μέσω μεταλλάξεων που οδηγούν στην αδρανοποίηση του, αυξάνει την πρόσβαση της χρωματίνης στο σύμπλοκο Mi-2β-NuRD και την απώλεια έκφρασης των λεμφοειδών γονιδίων. Στην περίπτωση απώλειας του Ikaros, το σύμπλεγμα NuRD επαναδιατάσσεται επιπλέον σε νέες θέσεις οι οποίες σχετίζονται με γονίδια που σχετίζονται με μεταγραφικούς παράγοντες που υποστηρίζουν την κυτταρική ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και το μεταβολισμό προκαλώντας την ενεργοποίησή τους εν μέρει εκτοπίζοντας το συμπλόκο PRC2. Ik, Aio Aiolos, polIII RNA πολυμεράση II, πολυκλωνικό κατασταλακτικό σύμπλεγμα PRC (πηγή: Yoshida T, Georgopoulos K. 2014)

Σε άγριου τύπου (wild type) θυμοκύτταρα DP (double positive: TCR+, CD4+, CD8+ (10)) οι περιοχές πρόσδεσης του Mi-2β είναι σαφέστατα περιορισμένες δεδομένου της δέσμευσης του Ίκαρος. Σε αυτά τα κύτταρα το σύμπλοκο NuRD-Ίκαρος προσδένεται σε ενεργά γονίδια τα οποία είναι μέλη μονοπατιών τα οποία υποστηρίζουν την διαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων. Η μείωση στη πρωτεΐνη Ίκαρος αυξάνει την πρόσβαση του NuRD στη χρωματίνη με αποτέλεσμα την αναδιאμόρωση των νουκλεοσωμάτων και της αποκετυλίωση των ιστονών ώστε τελικά να παρατηρείται μείωση στην έκφραση των λεμφοειδών γονιδίων. Επιπροσθέτως το NuRD αναδιανέμεται σε άλλες προσβάσιμες περιοχές της χρωματίνης προκαλώντας την ενεργοποίηση άλλων εν δυνάμει μεταγραφόμενων γονιδίων, συχνά μέσω της παρέμβασής του στο PRC (polycomb repressive complex). Πολλά από αυτά τα γονίδια σχετίζονται με την ανάπτυξη, των πολλαπλασιασμό, την μετανάστευση και το μεταβολισμό των κυττάρων όπως για παράδειγμα το μονοπάτι σηματοδότησης Notch. Πολύ πιθανά αυτή να είναι πρακτικά η αιτία της αναστολής στην ανάπτυξη των κυττάρων και την έναρξη κακοηθειών σε



DP κύτταρα μεταλλαγμένα για το Ίκαρος και προτείνει ένα μηχανισμό στον οποίο το Ίκαρος παίζει το ρόλο του ογκοκατασταλτικού ανταγωνιζόμενο το NuRD τόσο άμεσα σε λεμφοειδικά γονίδια όσο και έμμεσα σε γονίδια που σχετίζονται με την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό (9).

Ο πρώτος περιορισμός που υφίσταται ένα πολυδύναμο HSC στην πορεία του προς λεμφοκύτταρο είναι η μετατροπή του σε LMPP στο μυελό των οστών. Τα LMPP, έχουν τη δυνατότητα να διαφοροποιηθούν τόσο προς την μυελοειδή όσο και προς την λεμφοειδή σειρά. Περαιτέρω περιορισμοί στη πορεία της λεμφοειδούς σειράς δίνουν γένεση στα ELP (early lymphoid precursor), CLP (common lymphoid progenitor) και τα ETP (early thymic precursor). Αυτά εν συνεχεία διαφοροποιούνται σε πρόδρομα-B (pro-B) και σε DN2 (double negative 2) πρόδρομα-T (pro-T) (9).

Μελέτες σε μοντέλα ποντικών αποκάλυψαν ότι το Ίκαρος δεν είναι απαραίτητο για την διαφοροποίηση σε LMPP αλλά είναι απαραίτητο για τη διαφοροποίηση σε λεμφοειδή πρόδρομο όπως τα CLP και ETP, σημείο όπου συνήθως καθορίζεται η περαιτέρω πορεία της λεμφοειδούς σειράς. Σημειωτέων ο μεταγραφικός παράγοντας E2A εμπλέκεται επίσης στην έναρξη της λεμφοειδούς σειράς και επηρεάζει πολλούς στόχους του Ίκαρου συμμετέχοντας συνεργατικά στη δράση του εκ των υστέρων. Ωστόσο ο E2A μπορεί επίσης να δρα συνεργατικά με το Ίκαρος σε προηγούμενα στάδια δεδομένου ότι είναι απαραίτητος για την τη δημιουργία των LMPP από τα HSC (9).

Σε ποντίκια στα οποία υπάρχει πλήρης έλλειψη του Ίκαρος, τα προ-B και τα NK είναι απόλυτα απόντα ενώ τα ETP (DN1) στο θύμο μπορούν ακόμα να ανιχνευθούν αν και σε μικρό ποσοστό. Άλλα μέλη του ίκαρος όπως το ήλιος εκφράζονται στα HSC και στα πρώιμα στάδια των T-κυττάρων αλλά η διαφοροποίηση στα B-κύτταρα δεν είναι ικανή να συνδράμει στη διαφοροποίηση των T. Σε δη για το Ίκαρος ποντίκια (ποντίκια ομόζυγα για τη μετάλλαξη dominant negative του Ίκαρος (11)) εμφανίζονται πιο σοβαρές ακόμα επιπτώσεις όπως για παράδειγμα πλήρης απουσία των πρόδρομων T, γεγονός το οποίο υποδεικνύει την παρεμβολή στη λειτουργία του Ήλιος (9).

Ο βασικός και πρωταρχικός ρόλος του Ίκαρος είναι να οδηγήσει τα πολυδύναμα πρόδρομα προς την λεμφοειδή σειρά, αυξάνοντας την προσβασιμότητα της χρωματίνης μέσω του συμπλόκου NuRD και καταστέλλοντας εναλλακτικές διαδρομές που θα μπορούσαν να πάρουν μέσω της μυελόδους σειράς και της αυτοανανέωσης (9).

Μελέτες σε μοντέλα ποντικών με μεταλλάξεις στο ίκαρος έδειξαν ότι η απώλεια λειτουργίας είχε ως αποτέλεσμα την απώλεια της ωρίμανσης των λεμφοκυττάρων και αλλαγές στο αμινοτελικό άκρο των δακτυλίων ψευδαργύρου οι οποίες διαταράσσουν την πρόσδεση στο DNA και ως εκ τούτου οδηγούν σε μία T γενεολογική λεμφοπολλαπλασιαστική ασθένεια. Η τάση των μεταλλαγμένων ποντικών να εμφανίζουν διαταραχές στην T

γενεολογική σειρά ίσως να σχετίζεται με την απώλεια της φυσιολογικής καταστολής της μεταγραφής των γονιδίων στόχων του NOTCH1 στα T γενεολογικά λεμφοκύτταρα. Ωστόσο αυτά τα μοντέλα δεν ανέπτυξαν B κυτταρικές νεοπλασίες ενώ αντίθετα στους ανθρώπους είναι ασυνήθιστο σε T-ALL να εμφανίζονται εξαλλαγές στο ίκαρος (7).

Ως εκ τούτου οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι το ίκαρος είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής της φυσιολογικής ωρίμανσης των λευκοκυττάρων και ασκεί πολύπλοκους ρόλους στη μεταγραφική ρύθμιση που απαιτεί αναδιαμόρφωση της χρωματίνης τουλάχιστον στα T-λεμφοκύτταρα των ποντικών (7).

### 1.3.3 Μεταλλάξεις του γονιδίου Ίκαρος και συσχέτιση με την ALL

Η ALL είναι η πιο κοινή κακοήθεια στα παιδιά. Παρά την πρόοδο στη θεραπεία αυτής της κακοήθειας τα τελευταία χρόνια ακόμα το 25% των παιδιών υποτροπιάζουν και εμφανίζουν μόλις 30% ποσοστό επιβίωσης και η πρόγνωση τους παραμένει κακή. Η υποτροπή είναι ο κυριότερος λόγος της αποτυχίας της θεραπείας στα παιδιά με ALL και τις περισσότερες φορές είναι δύσκολο να προβλεφθεί κατά τη διάγνωση (8)

Φαίνεται ότι συγκεκριμένες χρωμοσωμικές ανωμαλίες έχουν σημαντική αξία στην πρόγνωση και ως εκ τούτου χρησιμοποιούνται στην πορεία της κλινικής λήψης αποφάσεων. Για παράδειγμα η t(9;22)(q34;q11) που σχετίζεται με τη σύντηξη των γονιδίων *BCR-ABL1* και η 11q23 που σχετίζεται με ανακατάταξη του γονιδίου *MLL* (mixed lineage leukemia) συνδέονται με κακή πρόγνωση με υψηλά ποσοστά υποτροπής. Ωστόσο δεδομένου ότι οι συχνότητες αυτών των βλαβών είναι χαμηλές, έχουν σημασία μόνο για τη μειοψηφία των υποτροπών στην ALL (8).

Στη πλειοψηφία των μελετών σε ALL που περιλαμβάνουν διάφορους υπότυπους καθώς και σε *BCR-ABL1* ALL που περιλαμβάνουν και περιπτώσεις που υπόκεινται σε θεραπεία με παράγοντες τυροσινικής κινάσης (TKI: tyrosine kinase inhibitors), φαίνεται ότι οι εξαλλαγές στο IKZF1 σχετίζονται με κακή πρόγνωση. Μελέτες με τη χρήση ρετροϊκής ή διαγονιδιακής έκφρασης του *BCR-ABL1* στα πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα ποντικών έχουν δείξει ότι αυτή η όγκοπρωτεΐνη που προκύπτει από την σύντηξη των γονιδίων προωθεί την ανάπτυξη μυελώδους νεοπλασίας παρόμοια με CML (Chronic Myeloid Leukemia- χρόνια μυελογενής λευχαιμία) (7)

Αντιθέτως σε υπότυπο της ALL ο οποίος χαρακτηρίζεται από απορρύθμιση του διπλού homeobox γονιδίου *DUX4* και του μεταγραφικού παράγοντα ERG της οικογένειας ETS, οι εξαλλαγές στο *IKZF1* δεν φαίνονται να συσχετίζονται με κακή πρόγνωση (7).

Οι υποτροπές στην ALL θεωρούνται ότι είναι αποτέλεσμα της αύξησης των εναπομεινάντων λευχαιμικών κυττάρων τα οποία παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στη θεραπεία καθώς η πλειοψηφία αυτών αποτελούν κλώνους οι οποίοι ήδη είναι παρόντες κατά τη διάγνωση. Μελέτες στις οποίες γίνεται σύγκριση μεταξύ του γενωμικού προφίλ δειγμάτων κατά τη διάγνωση και κατά την υποτροπή, έδειξαν ότι τα δείγματα κατά την υποτροπή είναι γενωμικά διακριτά σε σχέση με τον προγονικό κλώνο κατά τη διάγνωση καθώς επίσης και ότι τα κύτταρα που οδηγούν στην υποτροπή γενικά φαίνεται να προέρχονται από τα προγονικά. Επιπλέον αυτές οι μελέτες έδειξαν ότι στα δείγματα κατά την διάγνωση υπήρχαν ελλείψεις σε γονίδια όπως στα *CDKN2A*, *ETV6*, *IKFZ1* και *EBF1*, σε ασθενείς με υποτροπές σε σχέση με εκείνους που δεν παρουσίασαν υποτροπές. Ωστόσο μια πιο ολοκληρωμένη μελέτη έδειξε ότι οι ελλείψεις ή οι σημειακές παθολογικές μεταλλάξεις στο *IKFZ1* γονίδιο εμφανίζουν πολύ ισχυρή συσχέτιση με μία κακή πρόγνωση και ότι σχεδόν πάντα είναι παρούσες στις περιπτώσεις με *BCR-ABL1*. Μία επιπλέον σημαντική ομοιότητα μεταξύ του τρόπου έκφρασης σε ALL με *BCR-ABL1* και όχι είναι ότι αλλαγές στο *IKFZ1* ή/και σε άλλα βασικά γονίδια που σχετίζονται με την ωρίμανση, μπορεί να επηρεάζουν τα μετάγραφα και στις δύο αυτές ομάδες (8).

Οι περισσότερες από τις γενωμικές αλλοιώσεις που ανιχνεύονται κατά τη διάγνωση είναι παρούσες και κατά την υποτροπή γεγονός που καταδεικνύει ότι και οι δύο λευχαιμικές κακοήθειες είναι κλωνικές ως προς την προέλευση. Ωστόσο πολλές φορές παρατηρούνται και διαφορές όπως για παράδειγμα αλλοιώσεις στη διάγνωση που εν συνεχεία δεν παρατηρούνται στην υποτροπή καθώς και διαφορετικού τύπου αλλοιώσεις που επηρεάζουν τα ίδια γονίδια μεταξύ των οποίων και τα *CDKN2A* και *PAX5* το οποίο υποδεικνύει ότι αποτελούν δευτερογενή γεγονότα. Αντιθέτως οι αλλοιώσεις στο *IKZF1* φαίνεται ότι πάντα διατηρούνται μεταξύ της διάγνωσης και της υποτροπής και απαντούν πολύ συχνά σε δείγματα υποτροπής. Ως εκ τούτου φαίνεται ότι οι αλλοιώσεις στο *IKZF1* αποτελούν έναν δείκτη υποτροπής ήδη από τα αρχικά στάδια των λευχαιμικών επεισοδίων. Επίσης φαίνεται ότι ελλείψεις στο *IKZF1* δρουν ως ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου και επισκιάζει άλλους παράγοντες επικινδυνότητας όπως το *BCR-ABL1*, την ηλικία και τον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων κατά τη διάγνωση (8).

Οι εξαλλαγές που συναντώνται συνήθως στο γονίδιο Ίκαρος στην ALL είναι κυρίως ελλείψεις. Περίπου στα δύο τρίτα των περιπτώσεων επιφέρουν ως αποτέλεσμα την απώλεια λειτουργίας (loss-of-function) ενώ στο υπόλοιπο ένα τρίτο οι εστιακές-μικρής κλίμακας ελλείψεις (focal deletions) έχουν ως αποτέλεσμα την έκφραση μιας ισομορφής με εσωτερική έλλειψη στην οποία είναι απόντα τα εξώνια 4-7 και ως εκ τούτου όλοι οι δακτύλιοι ψευδαργύρου (zinc fingers) οι οποίοι προσδένονται στο DNA, με αποτέλεσμα τελικά το *IKZF1* να δρα ως αρνητικά επικρατητικό γονίδιο (dominant negative).

Παρόμοια επίδραση έχουν και οι μη συνώνυμες μεταλλάξεις (missense mutations) στην περιοχή σύνδεσης με το DNA (7).

Διάφορες μελέτες έχουν προτείνει ότι οι εξαλλαγές στο Ίκαρος προωθούν την ανθεκτικότητα απέναντι σε φαρμακευτική αγωγή τουλάχιστον έως ένα σημείο μέσω της προώθησης ανώμαλης προσκόλλησης μεταξύ των λευχαιμικών κυττάρων καθώς και μεταξύ των λευχαιμικών κυττάρων και του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών. Στα *BCR-ABL1* ποντίκια τα προ-B λευχαιμικά κύτταρα τυπικά αναπτύσσονται *in vitro* σε εναιώρημα μεμονωμένων κυττάρων αλλά τα κύτταρα με εξαλλαγές στο Ίκαρος όπως για παράδειγμα κύτταρα με έκφραση της IK6 ή απενεργοποίηση του *ikfz1* στο NuRD ή έκφραση αλληλίων του ίκαρος με σημειακές μεταλλάξεις, οδηγεί σε εντυπωσιακά ανώμαλη αύξηση και μεγάλα λευχαιμικά συσσωματώματα (7).

Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι τόσο στα ποντίκια όσο και στον άνθρωπο, στις λευχαιμίες όπου απαντούν μεταλλάξεις του Ίκαρος, η έκφραση των μορίων γεινίασης όπως το THY1 (CD90), ITGA5 (integrin alpha 5, τμήμα του ετεροδιμερούς VLA-5-προσδέτης του THY1-CD28) η L-σελεκτίνη (L-selectin), εμφανίζεται απορυθμισμένη. Η απορρύθμιση αυτή είναι πολύ πιθανό ότι οφείλεται στην απώλεια του κατασταλτικού ρόλου του *IKFZ1* το οποίο προσδένεται σε αυτούς του γονιδιακούς τόπους και την ενεργοποίηση μονοπατιών ιντεγκρίνης (7).

Ο συσχετισμός μεταξύ των εξαλλαγών στο *IKZF1*, τη γεινίαση, την ενεργοποίηση μονοπατιών ιντεγκρίνης, τη μη φυσιολογική θέση των κυττάρων στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών και την ανθεκτικότητα στη θεραπεία πρότεινε ότι ο φαινότυπος της γεινίασης ίσως να αποτελεί μία θεραπευτική προσέγγιση ώστε να ξεπεραστεί το πρόβλημα της ανθεκτικότητας στη φαρμακευτική αγωγή (7).

Η απώλεια του Ίκαρος στα T-λεμφοκύτταρα επιτρέπει στο NuRD να καταστείλει τα λεμφοκυτταρικά γονίδια και αυξάνει τη δράση του σε γονίδια τα οποία ενισχύουν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό οδηγώντας σε μία σειρά γεγονότων τα οποία οδηγούν σε λευχαιμικά επεισόδια (9).

Η απώλεια του ίκαρος στα πρόδρομα B-λεμφοκύτταρα εμποδίζει την διαφοροποίηση τους οδηγεί σε προσκόλληση στα στρωματικά κύτταρα ενισχύοντας την σηματοδότηση της ιντεγκρίνης. Ο συνδυασμός της σηματοδότησης της ιντεγκρίνης και της κυτοκίνης στα πρόδρομα B-κύτταρα που είναι ανεπαρκή στο ίκαρος, ενισχύει την επιβίωσή τους και την αυτοπολλαπλασιασμό τους (9).

## 2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε το γονίδιο ίκαρος με τις τεχνικές της αλληλούχισης κατά Sanger (Sanger sequencing) και MLPA. Εξετάστηκαν 20 δείγματα DNA τα οποία προέρχονταν από δείγμα μυελού των οστών και αφορούσαν παιδιατρικούς ασθενείς που έχουν διαγνωστεί με ALL.

### 2.1 Μεθοδολογία-Θεωρητική προσέγγιση

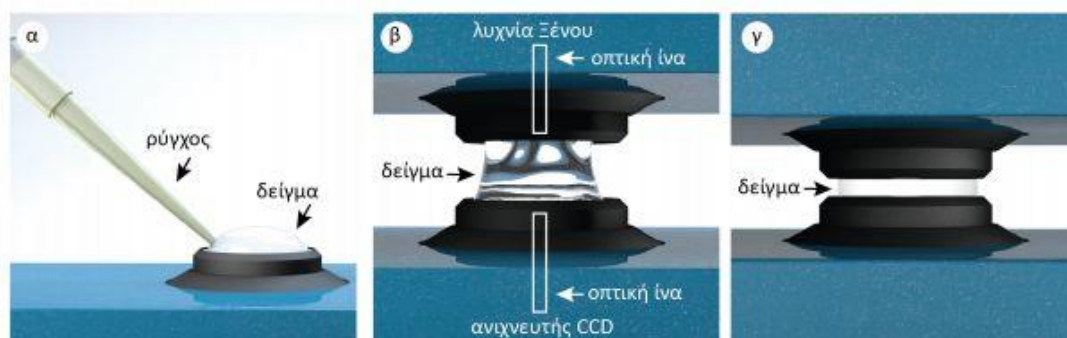
#### 2.1.1 Έλεγχος της ποιότητας και μέτρηση της συγκέντρωσης των νουκλεϊκών οξέων

Η καθαρότητα, η ποιότητα και η συγκέντρωση των διαλυμάτων των νουκλεϊκών οξέων αξιολογούνται με τη βοήθεια μεθόδων όπως η φασματοφωτομετρία υπεριώδους, η φασματοφθορισμομετρία και σε ορισμένες περιπτώσεις η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων (12).

Η μέθοδος της φασματοφωτομετρίας βασίζεται στην ιδιότητα των μορίων να απορροφούν εκλεκτικά μέρος της ακτινοβολίας του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Η φασματοφωτομετρία υπεριώδους - ορατού (Ultraviolet/Visible, UV/Vis) είναι πιθανότατα η περισσότερο χρησιμοποιούμενη αναλυτική μέθοδος στη βιοχημεία. Στο μήκος κύματος της υπεριώδους (200-380 nm) και της ορατής (380-750 nm) ακτινοβολίας, η αλληλεπίδραση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας και ύλης έχει ως αποτέλεσμα τη διέγερση των ηλεκτρονίων των εξωτερικών στιβάδων και την παροδική μετάπτωσης τους σε μοριακά τροχιακά υψηλότερων ενεργειών. Κατά την αποδιέγερσή τους τα μόρια αποδίδουν την απορροφηθείσα ενέργεια είτε με τη μορφή θερμότητας είτε με τη μορφή φωσφορισμού ή φθορισμού. Για κάθε χημική ένωση υπάρχει ένα χαρακτηριστικό μήκος κύματος ( $\lambda_{max}$ ) στο οποίο εμφανίζει τη μέγιστη απορρόφηση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Τα νουκλεϊκά οξέα εμφανίζουν το μέγιστο της απορρόφησής τους στα 260 nm (οι βάσεις πουρίνης λίγο χαμηλότερα από τα 260 nm, ενώ οι βάσεις πυριμιδίνης λίγο υψηλότερα). Στο φάσμα της υπεριώδους ακτινοβολίας οι πρωτεΐνες εμφανίζουν δύο κύριες αιχμές απορρόφησης. Τα αρωματικά αμινοξέα (τυροσίνη, τρυπτοφάνη και φαινυλαλανίνη) εμφανίζουν μέγιστη απορρόφηση στα 280 και τα 260 nm. Τα κατάλοιπα τυροσίνης και τρυπτοφάνης συνεισφέρουν στην απορρόφηση στα 280 nm, ενώ η φαινυλαλανίνη απορροφά στα 260 nm και όχι στα 280 nm. Η δεύτερη αιχμή απορρόφησης είναι μεταξύ των 215 nm και των 230 nm και οφείλεται στους πεπτιδικούς δεσμούς (12).

Ορισμένα εξελιγμένα φασματοφωτόμετρα υπεριώδους-ορατού (UV/Vis) λειτουργούν με βάση ειδικά σύστημα συγκράτησης του δείγματος ανάμεσα σε δύο επιφάνειες βασισμένα στην επιφανειακή τάση, χωρίς τη χρήση κυψελίδων. Η απαιτούμενη ποσότητα δείγματος είναι πολύ μικρή (1-2  $\mu$ l) και το δείγμα χρησιμοποιείται χωρίς καμία προηγούμενη αραίωση. Όπως και στα

άλλα φασματοφωτόμετρα, μετρίεται η απορρόφηση του δείγματος στα 260 nm και στα 280 nm. Τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του δείγματος (λόγος  $A_{260nm}/A_{280nm}$ ) παρουσιάζονται αυτόματα στην οθόνη του υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με το σύστημα. Ως πηγή ακτινοβολίας χρησιμοποιείται λυχνία ξένου. Το σύστημα συγκράτησης του δείγματος αποτελείται από δύο επιφάνειες που φέρουν οπτικές ίνες και καθορίζουν αυτόματα την απόσταση μεταξύ τους (εικόνα 6). Αυτή η διάταξη επιτρέπει την ακριβή μέτρηση διαλυμάτων με μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων, από 2 ng/ml έως 4000 ng/ml (12).



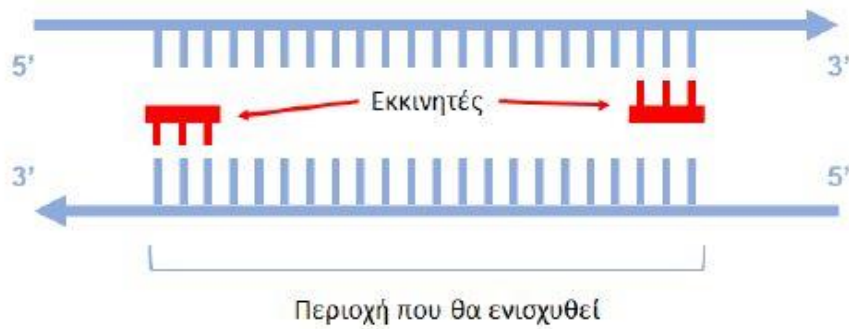
Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση φασματοφωτόμετρου υπεριώδους-ορατού. (α) Τοποθέτηση σταγόνας με τη βοήθεια πιπέττας, (β) θέση της λυχνίας ξένου και του ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας, (γ) η κεφαλή τοποθετείται σε συγκεκριμένη σταθερή απόσταση (πηγή: Παπανικολάου Γ, et al. 2015).

### 2.1.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR) είναι ίσως η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος της μοριακής βιολογίας, με αναρίθμητες εφαρμογές τόσο σε ερευνητικό όσο και σε διαγνωστικό επίπεδο (12).

Η PCR είναι μια ενζυμική μέθοδος ενίσχυσης συγκεκριμένων τμημάτων γενετικού υλικού *in vitro* (12).

Κατά τη διάρκεια μιας τυπικής αντίδρασης PCR το επιθυμητό τμήμα γενετικού υλικού πολλαπλασιάζεται μέχρι και ένα τρισεκατομμύριο φορές, γεγονός που είναι απαραίτητο για μετέπειτα χειρισμούς που θα ακολουθήσουν όπως η ηλεκτροφόρηση, η πέψη με ένζυμα περιορισμού, η ανάγνωση της αλληλουχίας βάσεων κ.ά (12). Αυτό επιτυγχάνεται καθώς η PCR μιμείται τη διαδικασία της αντιγραφής του DNA. Οποιαδήποτε περιοχή οποιουδήποτε τμήματος του DNA μπορεί να επιλεγεί για ενίσχυση αν και εφόσον είναι γνωστή η νουκλεοτιδική αλληλουχία στα δύο άκρα της περιοχής του ενδιαφέροντος ώστε να μπορέσουν να σχεδιαστούν οι απαραίτητοι εκκινητές (13).



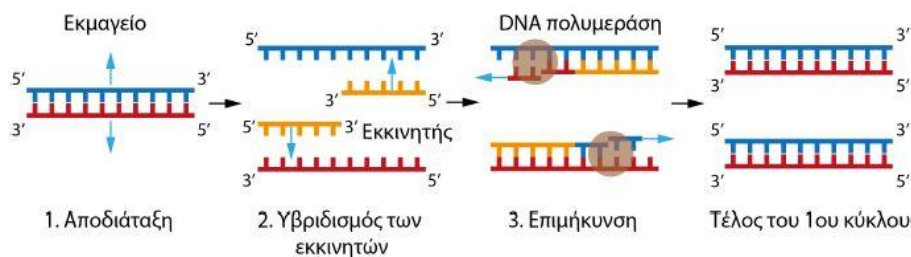
**Εικόνα 7:** Σχηματική απεικόνιση της ενίσχυσης τμήματος DNA κατά την PCR (πηγή: Σπέλλα Μ.).

Η PCR βασίζεται στην ικανότητα της δίκλωνης αλυσίδας του DNA να αποδιατάσσεται και να επανασυντίθεται βάσει της συμπληρωματικότητας των αζωτούχων βάσεων διαδοχικά και ελεγχόμενα (13) και ουσιαστικά η αντίδραση πραγματοποιείται σε τρία στάδια, τα οποία επαναλαμβάνονται διαδοχικά (εικόνα 8):

1. Αποδιάταξη (denaturation): Οι δύο αλυσίδες του DNA διαχωρίζονται (αποδιατάσσονται) με θέρμανση σε θερμοκρασία 94-95° C για περίπου 30 sec έως 1 min.

2. Υβριδισμός εκκινητών (annealing): Με μείωση της θερμοκρασίας στους 55-65° C για περίπου 30 sec έως 1 min, οι εκκινητές υβριδίζονται στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο εκμαγείο DNA (12). Η θερμοκρασία και ο χρόνος της φάσης αυτής εξαρτάται από το μήκος και τη νουκλεοτιδική αλληλουχία των εκκινητών καθώς και από τη συγκέντρωσή τους (13).

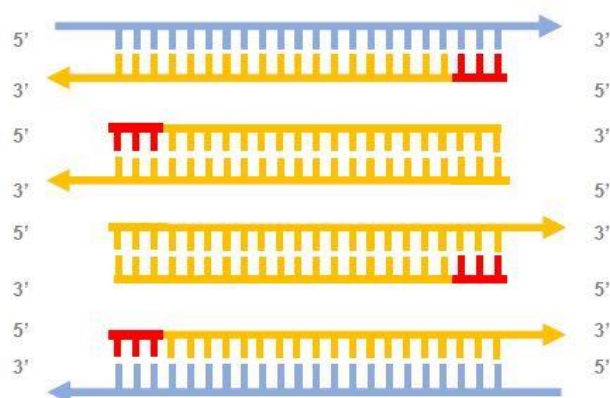
3. Επιμήκυνση (elongation/extension): Για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72° C, τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της Taq πολυμεράσης. Η πολυμεράση προσδένεται στους εκκινητές και τους επιμηκώνει εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (Deoxynucleotide triphosphates, dNTPs) χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο (12,13). Ο χρόνος της φάσης επιμήκυνσης εξαρτάται από το μήκος της αλληλουχίας-στόχου και το είδος της DNA πολυμεράσης που χρησιμοποιείται (13). Ωστόσο η ταχύτητα σύνθεσης της νέας αλυσίδας γενικά είναι της τάξης των 1000 bp ανά λεπτό (12).



**Εικόνα 8:** Σχηματική απεικόνιση της ενίσχυσης τμήματος DNA κατά την PCR (πηγή: Παπανικολάου Γ, et al. 2015).

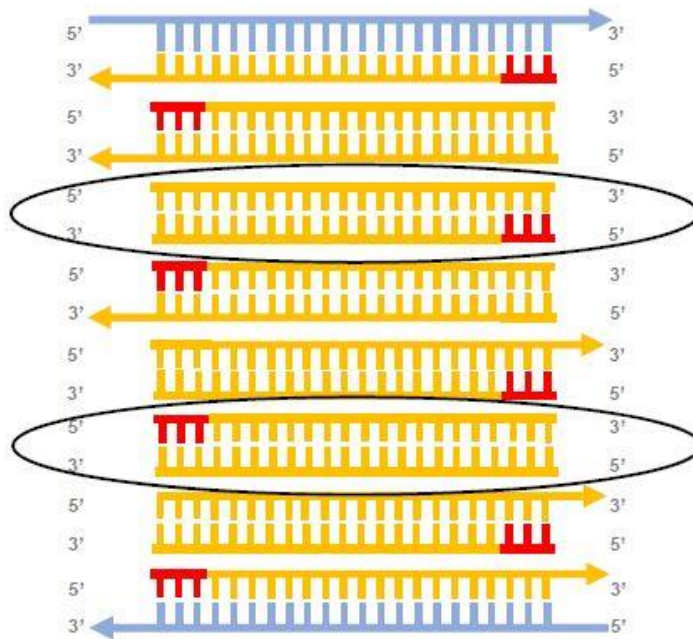
Τα παραπάνω στάδια επαναλαμβάνονται από 25 έως 35 φορές. Η PCR εκτελείται στον θερμικό κυκλοποιητή (Thermal cycler), συσκευή που φέρει θερμαινόμενη πλάκα που μπορεί να εναλλάσσει θερμοκρασίες με ταχύτητα και ακρίβεια. Ο θερμικός κυκλοποιητής είναι μια προγραμματιζόμενη συσκευή, στην οποία μπορούμε να ρυθμίσουμε την επιθυμητή θερμοκρασία και τη διάρκεια κάθε σταδίου αλλά και τη διαδοχή τους (12).

Μετά από το δεύτερο κύκλο της αντίδρασης PCR έχουν παραχθεί τέσσερα μόρια DNA που περιέχουν τόσο την προς ενίσχυση περιοχή όσο και γειτονικές (εικόνα 9). Μετά τον τρίτο κύκλο της PCR επιτυγχάνεται η παραγωγή των δύο πρώτων τμημάτων DNA που περιέχουν αποκλειστικά την προς ενίσχυση περιοχή (εικόνα 10). Στους επόμενους κύκλους η παραγωγή αυτών των τμημάτων DNA αυξάνεται εκθετικά με αποτέλεσμα ύστερα από 1-2 ώρες να υπάρχουν εκατομμύρια αντίγραφα της επιθυμητής αλληλουχίας στόχου (πίνακας 1) (13).



**Εικόνα 9:** Σχηματική απεικόνιση της ενίσχυσης τμήματος DNA κατά την PCR. Εμφανίζονται τα προϊόντα στους 2 πρώτους κύκλους της αντίδρασης PCR. (πηγή: Σπέλλα Μ.).





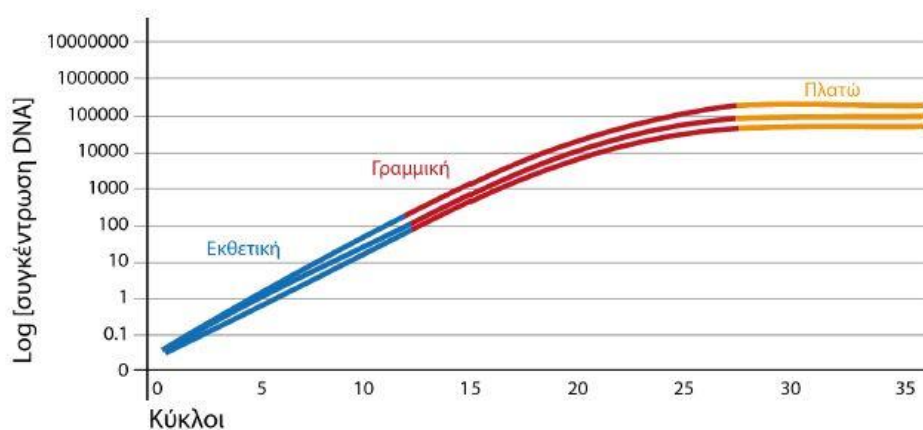
**Εικόνα 10:** Σχηματική απεικόνιση της ενίσχυσης τμήματος DNA κατά την PCR. Κυκλωμένα σημειώνονται τα δύο πρώτα προϊόντα τα οποία περιέχουν αποκλειστικά την επιθυμητή αλληλουχία στόχο. (πηγή: Σπέλλα Μ.).

Αριθμός κύκλου	Αριθμός DNA μορίων-στόχων
1	0
2	0
3	2
5	8
7	32
10	256
12	1,024
15	8,192
17	32,768
20	262,144
21	524,288
22	1,048,576
23	2,097,152
24	4,194,304
25	8,388,608
26	16,777,216
27	33,554,432
29	134,217,728
30	268,435,456

**Πίνακας 1:** Εκθετική αύξηση των μορίων στόχων DNA ανά κύκλο της αντίδρασης PCR (πηγή: Σπέλλα Μ.).

Ωστόσο μόνο στη θεωρία, η αύξηση των προϊόντων της PCR είναι εκθετική σε όλη τη διάρκεια της. Στην πραγματικότητα η PCR χωρίζεται σε τρεις φάσεις (εικόνα 11):

1. Εκθετική φάση: Μόλις έχει αρχίσει ο πολλαπλασιασμός της αλληλουχίας στόχου. Όλα τα αντιδραστήρια βρίσκονται σε επάρκεια και η αντίδραση είναι πολύ αποτελεσματική. Σε κάθε κύκλο διπλασιάζονται τα μόρια της αλληλουχίας στόχου.
2. Γραμμική φάση: Παρατηρείται μειωμένη παραγωγή αντιγράφων της αλληλουχίας στόχου εξαιτίας της μείωσης της ποσότητας των αντιδραστηρίων.
3. Φάση πλατώ: Δεν συντίθενται νέα μόρια DNA εξαιτίας της εξάντλησης ενός ή περισσότερων αντιδραστηρίων (12, 13)



Εικόνα 11: Σχηματική αναπαράσταση των φάσεων της αντίδρασης PCR (πηγή: Παπανικολάου Γ, et al. 2015).

Τα βασικά συστατικά για τη διενέργεια της αντίδρασης PCR είναι:

### 1. DNA πολυμεράση

Η DNA πολυμεράση είναι ένζυμο που υπάρχει σε όλους τους οργανισμούς και συμμετέχει στην αντιγραφή του DNA. Η πολυμεράση που χρησιμοποιείται στην PCR έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus aquaticus* (Taq), το οποίο έχει ως φυσικό περιβάλλον τις θερμές πηγές (12). Ο οργανισμός αυτός ανακαλύφθηκε στις θερμοπηγές του πάρκου Yellowstone και ως εκ τούτου πολλά ένζυμα που περιέχει, συμπεριλαμβανομένου της πολυμεράσης, είναι θερμοανθεκτικά (13). Η Taq πολυμεράση έχει τη βασική ιδιότητα να παραμένει δραστική σε υψηλές θερμοκρασίες. Η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της είναι 72° C (12) καθώς σε αυτή τη θερμοκρασία γίνονται και τα λιγότερα λάθη (13), ενώ δεν καταστρέφεται από τη θέρμανση ακόμη και στους 95° C για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα (12). Η ανθεκτικότητα της συγκεκριμένης πολυμεράσης στις υψηλές θερμοκρασίες που απαιτούνται για την αποδιάταξη του DNA επέτρεψε την αυτοματοποίηση της αντίδρασης PCR καθώς στο παρελθόν χρησιμοποιούνταν μη θερμοανθεκτικές πολυμεράσες οι οποίες απαιτούνταν να ανανεώνονται σε κάθε κύκλο της αντίδρασης (13). Η DNA πολυμεράση δεν μπορεί να συνθέσει ένα νέο μόριο DNA, μπορεί όμως να αντιγράψει ένα υπάρχον που χρησιμοποιείται ως εκμαγείο. Ουσιαστικά συνθέτει μια συμπληρωματική αλυσίδα DNA χρησιμοποιώντας ένα

μονόκλωνο μόριο ως αρχικό εκμαγείο και έναν εκκινητή ως σημείο εκκίνησης. Η κατεύθυνση της σύνθεσης της νέας αλυσίδας είναι 5'-3' (12).

Με την πάροδο των κύκλων της PCR η λειτουργικότητα και η πιστότητα της αντιγραφής φθίνουν και αντίστοιχα αυξάνεται ο αριθμός των λανθασμένων βάσεων που εισάγονται στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα του DNA. Η απλή DNA πολυμεράση κάνει περίπου ένα λάθος στις 100.000 βάσεις. Οι πολυμεράσες υψηλής πιστότητας (Proofreading polymerase), οι οποίες έχουν δραστηριότητα 3'-5' εξωνουκλεάσης, μπορούν να διορθώσουν τα λάθη που δημιουργούνται κατά τη σύνθεση του μορίου DNA. Έτσι επιτυγχάνουν μικρότερα ποσοστά λαθών, της τάξης του  $10^{-6}$  (12).

## **2. Ολιγονουκλεοτιδικό εκκινητές**

Οι εκκινητές (Primers) αποτελούν ολιγονουκλεοτίδια τα οποία οριοθετούν το επιθυμητό προς πολλαπλασιασμό τμήμα του DNA. Ο σωστός σχεδιασμός των εκκινητών επηρεάζει σημαντικά το αποτέλεσμα της PCR (12) καθώς εξασφαλίζουν την ειδικότητα της. Παράγονται συνθετικά ως μικρού μήκους ολιγονουκλεοτίδια. Οριοθετούν το προς πολλαπλασιασμό τμήμα αλλά προσφέρουν και το απαραίτητο 3' προεξέχων άκρο που απαιτείται ώστε η DNA πολυμεράση να προσδεθεί στο DNA και να ξεκινήσει η διαδικασία της αντιγραφής (13).

## **3. Γενετικό υλικό (αλληλουχία στόχος)**

Ως αρχικό υλικό μπορεί να χρησιμοποιηθεί DNA ή RNA το οποίο θα έχει μεταγραφεί στην πιο σταθερή μορφή του, το συμπληρωματικό DNA (Complementary DNA, cDNA). Πολύ μικρές ποσότητες DNA (της τάξης των 25-100 ng ανά αντίδραση τελικού όγκου 50 μl) είναι επαρκείς για τις περισσότερες αντιδράσεις PCR. Μεγάλη ποσότητα DNA μπορεί να αναστείλει την αντίδραση. Για τη βέλτιστη απόδοση της PCR το DNA πρέπει να είναι μακρομοριακό και υψηλής καθαρότητας, απαλλαγμένο από υπολείμματα αιθανόλης ή αλάτων που μπορούν να αναστείλουν την αντίδραση (12).

## **4. Ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης και συγκέντρωση $Mg^{2+}$**

Το διάλυμα της αντίδρασης διατηρεί το pH και τη συγκέντρωση αλάτων στις βέλτιστες συνθήκες διεξαγωγής της αντίδρασης (12). Το pH ρυθμίζεται περίπου ίσο με 8.5 από την παρουσία Tris-HCl στο ρυθμιστικό διάλυμα ενώ η ιοντική ισχύς παρέχεται από ιόντα  $K^+$  ή  $Na^+$  (13). Περιέχει επίσης ιόντα  $Mg^{2+}$ , που είναι απαραίτητος συμπαράγοντας της DNA πολυμεράσης (12, 13). Τα ιόντα  $Mg^{2+}$  σχηματίζουν διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs, το DNA εκμαγείο και τους εκκινητές. Περίσσεια  $Mg^{2+}$  οδηγεί σε μη ειδική σύνδεση των εκκινητών με το DNA, αυξάνοντας τα μη ειδικά προϊόντα στην αντίδραση. Επίσης μειώνει την πιστότητα αντιγραφής της Taq πολυμεράσης (12, 13). Χαμηλές συγκεντρώσεις  $Mg^{2+}$  οδηγούν σε μείωση της ποσότητας του παραγόμενου προϊόντος. Η βέλτιστη συγκέντρωση  $Mg^{2+}$  για κάθε αντίδραση PCR πρέπει να προσδιορίζεται εμπειρικά με δοκιμή διαδοχικών συγκεντρώσεων από 1 έως 4 mM (12).

## **5. Νουκλεοτίδια (dNTPs)**

Τα δομικά μόρια που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας είναι τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (deoxynucleotide triphosphates, dNTPs). Τα dNTPs χρησιμοποιούνται ως ισομοριακό μίγμα των τεσσάρων

νουκλεοτιδίων (ATP, TTP, CTP και GTP) σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται στα 80-800  $\mu\text{M}$  (12). Αυξάνοντας τη συγκέντρωση των dNTPs αυξάνεται η πιθανότητα εισαγωγής λανθασμένου νουκλεοτιδίου (13).

### 2.1.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια ευρέως διαδεδομένη τεχνική για την ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων και των πρωτεϊνών. Βασίζεται στον διαχωρισμό φορτισμένων μορίων (π.χ. DNA) κατά μήκος ενός στερεού πορώδους υποστρώματος στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Τα φορτισμένα μόρια κινούνται μέσα στο υπόστρωμα και διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους. Κατάλληλες τεχνικές επιτρέπουν την οπτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων με ειδικές χρώσεις, με παρατήρηση σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας ή με αυτοραδιογραφία (12).

Η πιο συχνή μορφή ηλεκτροφόρησης είναι η ηλεκτροφόρηση μορίων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης. Η μέθοδος είναι απλή και αποτελεσματική και επιτρέπει τον διαχωρισμό μορίων DNA μεγέθους από 500 bp έως 25 kb (12).

Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης χωρίζεται σε τρία στάδια:

1. Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης, κατάλληλης συγκέντρωσης για το μέγεθος των προς διαχωρισμό μορίων του DNA (12).
2. Τοποθέτηση των δειγμάτων στις θέσεις υποδοχής τους στο πήκτωμα και εφαρμογή της κατάλληλης ηλεκτρικής τάσης στη δεξαμενή ηλεκτροφόρησης για τη βέλτιστη χρονική περίοδο για τον διαχωρισμό των μορίων DNA (12).
3. Χρώση του πηκτώματος (αν αυτή δεν έχει πραγματοποιηθεί κατά το στάδιο παρασκευής του) με κατάλληλες ουσίες που προσδένονται στο DNA και στη συνέχεια άμεση παρατήρηση και φωτογράφησή του σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (12).

Για τη δημιουργία του πηκτώματος αναμιγνύεται αγαρόζη σε σκόνη με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (TAE ή TBE) και το μίγμα θερμαίνεται μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη. Στη συνέχεια, το μίγμα τοποθετείται σε κατάλληλο εκμαγείο. Όταν κρυώσει η αγαρόζη δημιουργεί ένα πήκτωμα, καθώς δεσμοί υδρογόνου συνδέουν τα μόρια της αγαρόζης. Στη συνέχεια τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης (12).

Οι συσκευές ηλεκτροφόρησης για πηκτώματα αγαρόζης είναι οριζόντια δοχεία τα οποία φέρουν στα άκρα τους δύο ηλεκτρόδια από πλατίνα. Το πήκτωμα εμβαπτίζεται στο λουτρό ηλεκτροφόρησης σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (TAE ή TBE) και με τη βοήθεια τροφοδοτικού εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση (12). Το ηλεκτρικό πεδίο που δημιουργείται οδηγεί τα αρνητικά φορτισμένα μόρια του DNA να κινηθούν προς την κάθοδο δηλαδή προς το

θετικά φορτισμένο ηλεκτρόδιο (12, 14). Όταν η κίνηση αυτή γίνεται μέσα σε πορώδες πήκτωμα αγαρόζης, τα νουκλειικά οξέα διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους καθώς τα μικρά μόρια κινούνται μέσα από τους πόρους του πηκτώματος πιο εύκολα από τα μεγαλύτερα μόρια τα οποία καθυστερούνται από δυνάμεις τριβής (14).

Επιλέγεται η κατάλληλη συγκέντρωση του πηκτώματος. Συνήθως τα πηκτώματα αγαρόζης παρασκευάζονται σε συγκεντρώσεις 0,7-2,5%, ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων DNA που θα διαχωριστούν. Στον πίνακα 2 αναφέρονται ενδεικτικά οι συγκεντρώσεις πηκτώματος αγαρόζης που είναι κατάλληλες για τον διαχωρισμό μορίων DNA συγκεκριμένου μεγέθους (12).

%(W/V) πήκτωμα αγαρόζης	Εύρος διακριτικής ικανότητας	Παρατηρήσεις
0.5	1kb έως 30kb	Πήκτωμα χαμηλής συγκέντρωσης- ευνοείται ο διαχωρισμός μεγάλων τμημάτων DNA
0.7	800bp έως 12kb	
1.0	500bp έως 10kb	
1.2	400bp έως 7kb	Πήκτωμα υψηλής συγκέντρωσης- ευνοείται ο διαχωρισμός μικρών τμημάτων DNA
1.5	200bp έως 3kb	
2.0	50bp έως 2kb	

**Πίνακας 2: Ενδεικτικές τιμές της συγκέντρωσης πηκτώματος αγαρόζης και του εύρους της διακριτικής του ικανότητας.**

Τα πηκτώματα χαμηλής συγκέντρωσης και τα πηκτώματα από αγαρόζη χαμηλής θερμοκρασίας τήξης (Low melting temperature agarose) θα πρέπει να τοποθετούνται σε ψύξη 4°C, προκειμένου να γίνονται σκληρότερα και πιο ανθεκτικά κατά τους χειρισμούς (12).

**Διάλυμα φόρτωσης:** Τα διαλύματα φόρτωσης περιέχουν μία ουσία υψηλής πυκνότητας (συνήθως γλυκερόλη) και μία ή δύο χρωστικές που μετακινούνται στο πήκτωμα με ταχύτητα περίπου ίδια με μικρά μόρια DNA (συνήθως μπλε της βρωμοφαινόλης και κυανού του ξυλενίου). Η παρουσία της γλυκερόλης διασφαλίζει ότι τα δείγματα έχουν πυκνότητα μεγαλύτερη του υδατικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης και μπορούν να καθιζάνουν στις θέσεις υποδοχής. Επιπλέον, οι δύο χρωστικές χρωματίζουν τα δείγματα, γεγονός που διευκολύνει τη διαδικασία του φορτώματος στο πήκτωμα αγαρόζης. Κατά τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης οι μπλε ορατές ζώνες προσφέρουν μια αδρή εκτίμηση του ρυθμού μετακίνησης των μορίων DNA στο πήκτωμα (12).

**Ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA στο πήκτωμα αγαρόζης:** Στη συσκευή ηλεκτροφόρησης τα μόρια κινούνται ανάλογα με το φορτίο τους και το μέγεθός τους. Το DNA έχει αρνητικό φορτίο λόγω των φωσφορικών

ομάδων και γι' αυτό τα μόρια DNA που ηλεκτροφορούνται κινούνται προς την κάθοδο. Η κινητικότητα των μορίων DNA σε ένα πήκτωμα αγαρόζης εξαρτάται από το μέγεθος του DNA, τη συγκέντρωση της αγαρόζης και τη διαμόρφωση του DNA, το ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης και την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (12):

**1.Μέγεθος.** Τα μικρότερα μόρια DNA κινούνται ταχύτερα, καθώς συναντούν μικρότερη αντίσταση στους πόρους του πηκτώματος. Αντίθετα, τα μεγαλύτερα μόρια DNA κινούνται βραδύτερα. Συνεπώς τα μικρότερα μόρια εντοπίζονται προς το κάτω μέρος του πηκτώματος, ενώ τα μεγαλύτερα προς το επάνω μέρος του πηκτώματος. Για να μπορούμε να υπολογίσουμε το μέγεθος του τμήματος DNA που ηλεκτροφορείται, τοποθετείται πάντα στο πήκτωμα, εκτός από τα δείγματά και ένας μάρτυρα με κομμάτια DNA γνωστού μοριακού βάρους (12).

**2.Συγκέντρωση της αγαρόζης.** Ανάλογα με το μέγεθος των μορίων DNA που επιθυμούμε να διαχωρίσουμε χρησιμοποιείται και διαφορετική πυκνότητα του πηκτώματος αγαρόζης, όπως ενδεικτικά αναφέρεται στον πίνακα -. Στα πυκνά πηκτώματα μπορούν να κινηθούν εύκολα μόνο τα μικρά μόρια DNA, τα οποία και διαχωρίζονται επιτυχώς. Στο ίδιο πήκτωμα τα μεγαλύτερα μόρια θα κινηθούν όλα ταυτόχρονα και θα δώσουν την εικόνα μιας και μόνο ζώνης (δεν θα διαχωριστούν) (12).

**3. Διαμόρφωση του DNA.** Η στερεοδιαμόρφωση των μορίων DNA (υπερελικωμένα, ανοιχτά κυκλικά ή ευθύγραμμα) καθορίζει και την αντίσταση που δέχονται τα μόρια DNA καθώς κινούνται ανάμεσα στους πόρους του πηκτώματος αγαρόζης. Τα υπερελικωμένα μόρια (συνήθως πλασμιδιακό DNA) κινούνται ταχύτερα και ακολουθούν τα ανοιχτά κυκλικά και τα ευθύγραμμα μόρια DNA. Ένα γραμμικό μόριο DNA κινείται με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του δεκαδικού λογάριθμου του μοριακού του βάρους (12).

**4. Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης.** Το ρυθμιστικό διάλυμα διατηρεί σταθερό το pH και περιέχει τα απαραίτητα ιόντα για την αύξηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας. Απουσία ιόντων, η ηλεκτρική αγωγιμότητα είναι ελάχιστη και το DNA μετακινείται ελάχιστα μέσα στο πήκτωμα. Τα συνήθη διαλύματα ηλεκτροφόρησης είναι το TBE και το TAE και χρησιμοποιούνται σε συγκέντρωση 0,5X. Η ιοντική ισχύς του TAE εξαντλείται ευκολότερα σε παρατεταμένες ηλεκτροφορήσεις με υψηλή διαφορά δυναμικού σε σχέση με το TBE (12).

**5. Ένταση του ηλεκτρικού πεδίου.** Το ηλεκτρικό πεδίο που εφαρμόζεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης υπολογίζεται σε V/cm. Συνήθως εφαρμόζεται τάση ~ 5V /cm με βάση την απόσταση μεταξύ των ηλεκτροδίων της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Σε χαμηλή τάση ευνοείται ο διαχωρισμός των

μεγάλων μορίων (σε τέτοιες περιπτώσεις επιλέγεται τάση 1V/cm), ενώ σε υψηλότερη τάση διαχωρίζονται μόνο τα μικρά μόρια DNA (12).

#### **2.1.4 Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης**

Για να απεικονιστούν οι ζώνες των μορίων DNA στο πήκτωμα αγαρόζης είναι απαραίτητη μια ουσία που να καθιστά ορατά τα μόρια του DNA. Το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) είναι μια χρωστική που έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα γι' αυτόν τον σκοπό. Παρεμβάλλεται στη μεγάλη αύλακα του DNA (ή του RNA) μέσω σχηματισμού δεσμών Van Der Waals και έχει την ιδιότητα να φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία 302-366 nm. Ο φθορισμός του συμπλόκου EtBr-DNA είναι 20-30 φορές ισχυρότερος από αυτόν του ελεύθερου βρωμιούχου αιθιδίου. Η χρωστική προστίθεται στο πήκτωμα είτε κατά την παρασκευή του είτε με εμβάπτισή του σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου 0,5 μg/ml για 15-20 λεπτά μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης. Η χρήση του βρωμιούχου αιθιδίου απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή γιατί η ουσία έχει μεταλλαξιογόνο και τερατογόνο δράση. Για την παρατήρηση του πηκτώματος το πήκτωμα τοποθετείται σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας που βρίσκεται σε σκοτεινό θάλαμο (12).

#### **2.1.5 Αλληλούχιση DNA**

Οι μελέτες του Arthur Kornberg πάνω στα ένζυμα και την αντιγραφή του DNA καθώς και η ικανότητα της DNA Πολυμεράσης να χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα πέρα των τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs) και τα 2',3' –τριφωσφορικά διδεοξυνουκλεοτίδια (ddNTPs), αποτέλεσαν την αρχή για την ενζυμική μέθοδο κατά Sanger ή αλλιώς τη μέθοδο των διδεοξυ αντιδράσεων (15).

Η αλληλούχιση γενετικού υλικού με την τεχνική Sanger αναπτύχθηκε και άρχισε να χρησιμοποιείται στα μέσα της δεκαετίας του 1970. Για να επιτευχθεί η ανάλυση χρειάζονται μονόκλινα μόρια DNA, κατάλληλη DNA πολυμεράση, κατάλληλοι εκκινήτες αντιγραφής του γενετικού υλικού (primers), τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTP) και τριφωσφορικά 2-3' διδεοξυνουκλεοτίδια (ddNTP) (14).

Κατά τη διαδικασία της αντιγραφής δημιουργούνται 3'-5' φωσφοδιεστερικοί δεσμοί μεταξύ των νουκλεοτιδίων και πιο συγκεκριμένα μεταξύ του υδροξυλίου του 3' άνθρακα της δεοξυριβόζης του πρώτου νουκλεοτιδίου και της φωσφορικής ομάδας που είναι συνδεδεμένη στον 5' άνθρακα της δεοξυριβόζης του επόμενου νουκλεοτιδίου (15).

Η μέθοδος Sanger στηρίζεται στην ιδιαίτερη χημεία των διδεοξυνουκλεοτιδίων (ddNTP). Όπως και στην περίπτωση των δεοξυνουκλεοτιδίων, 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 προκαλεί τον τερματισμό στην επιμήκυνση της αλυσίδας (15).

Τα μονόκλωνα μόρια του γενετικού υλικού χρησιμοποιούνται ως μήτρες για την δημιουργία συμπληρωματικών αλύσεων DNA με τα dNTP και τα ddNTP. Τα ddNTP βρίσκονται σε μικρότερες ποσότητες από εκείνες των dNTP (14). Είναι πολύ σημαντικό να ρυθμιστεί σωστά η αναλογία dNTP : ddNTP σε κάθε μια από τις τέσσερις αντιδράσεις ώστε η αντίδραση σύνθεσης του συμπληρωματικού κλάδου να τερματίζεται σε ένα από τα ζητούμενα νουκλεοτίδια της κάθε μίας αντίδρασης, δηλαδή, πρέπει να σχηματιστούν όλα τα δυνατά προϊόντα ανά αντίδραση για να είναι σωστός ο προσδιορισμός της ελεγχόμενης αλληλουχίας (15).

Στην διαδικασία της επιμήκυνσης των συμπληρωματικών αλύσεων προστίθενται στις συμπληρωματικές αλύσεις μόρια dNTP καθώς και μόρια ddNTP (14). Πιο συγκεκριμένα για την αντίδραση του προσδιορισμού της αλληλουχίας του DNA, ένας ολιγονουκλεοτιδικός φορέας- εκκινητής 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 εκκινητή και το 5' άκρο του προστιθέμενου νουκλεοτιδίου που δρα ως δομικός λίθος. Εκτελούνται ταυτόχρονα και οι τέσσερις αντιδράσεις, στις οποίες το ένα είδος από τα τέσσερα χρησιμοποιούμενα dNTPs είναι ραδιοεπισημασμένο (συνήθως με <sup>35</sup>S). 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 (15).

Σε σχέση με την κλασική μέθοδο αναφοράς από το 1977 έχουν γίνει σημαντικές βελτιώσεις . Έτσι σήμερα γίνεται χρήση αυτοματοποιημένων συσκευών (DNA sequencers) για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας των νουκλεϊκών οξέων. Έτσι από τις αρχές της δεκαετίας του '90, η χρήση αυτής της τεχνολογίας αυτοματοποίησε την ηλεκτροφόρηση, την ανίχνευση του σήματος καθώς και την ανάγνωση της αλληλουχίας (15).

Η καινοτομία αυτή οφείλεται στην κατάργηση της ραδιενεργούς σήμανσης και στη χρήση φθορίζουσών ουσιών αντί αυτής. Η μέθοδος αποτελεί τροποποίηση την ενζυμικής μεθόδου του Sanger. Σε αυτή την μέθοδο η επισήμανση γίνεται όπως και πριν, δηλαδή οι φθορίζουσες ουσίες εξακολουθούν να βρίσκονται είτε στους εκκινητές, είτε στα ddNTPs. Ο διαχωρισμός των πολυνουκλεοτιδικών μορίων που παράγονται κατά την ενζυμική σύνθεση, επιτυγχάνεται είτε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, είτε στους πλέον αυτοματοποιημένους sequencers, με



τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (capillary electrophoresis). Τέλος η ανάγνωση της αλληλουχίας γίνεται 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. Το μόνο μειονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι το αυξημένο κόστος ανάλυσης το οποίο όμως αντισταθμίζεται από τον αυξημένο αριθμό αποτελεσμάτων στον ίδιο χρόνο (15).

Η μέθοδος αλληλούχισης κατά Sanger δεν είναι ικανή να εντοπίσει χαμηλό επίπεδο μωσαϊκισμού και συγκεκριμένα φαίνεται το κατώφλι να είναι περίπου στο 10-20% (16).

Η μέθοδος Sanger θεωρείται από πολλούς να είναι το χρυσό πρότυπο για τη μελέτη μεταλλάξεων. Όντως μπορεί να ανιχνεύσει πρακτικά όλες τις υποκαταστάσεις βάσεων, μικρές ενθέσεις καθώς και ελλείψεις. Ωστόσο εμφανίζει περιορισμούς καθώς δεν εμφανίζει σταθερότητα στα αποτελέσματα, μεταβλητότητα που σχετίζεται τόσο με την αλληλουχία καθώς και με τις διαδικασίες που ακολουθεί το κάθε εργαστήριο καθώς η ικανότητα εντοπισμού των μεταλλάξεων κατά την ανάλυση των δεδομένων είναι υποκειμενική και εξαρτάται αρκετά από την εμπειρία του ατόμου που ερμηνεύει τα αποτελέσματα (17).

Δεν αποτελεί μία ποσοτική μέθοδο καθώς το ύψος των κορυφών δεν αποτελεί ένδειξη του ποσοστού των κυττάρων στα οποία είναι παρούσα μία μετάλλαξη (18).

### **2.1.6 MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification)**

Η MLPA είναι μια μέθοδος που βασίζεται στην πολλαπλή αλυσιδωτή αντίδρασης της πολυμεράσης (multiplex PCR), η οποία ανιχνεύει μη φυσιολογικούς αριθμούς αντιγράφων μέχρι και 50 διαφορετικών γονιδιωματικών περιοχών και είναι ικανή να ξεχωρίζει αλληλουχίες που διαφέρουν κατά μόνο ένα νουκλεοτίδιο σε συγκεκριμένες περιπτώσεις. Είναι μία μέθοδος απλή και με σχετικά χαμηλό κόστος. Είναι εύκολη στη χρήση και μπορεί να γίνει σε πολλά εργαστήρια καθώς απαιτεί έναν θερμικό κυκλοποιητή και εξοπλισμό για τριχοειδή ηλεκτροφόρηση. Μέχρι 96 δείγματα μπορούν να αναλυθούν ταυτόχρονα με αποτελέσματα διαθέσιμα σε 24 ώρες. Πλεονεκτεί καθώς οι μέθοδοι που ανιχνεύουν σημειακές μεταλλάξεις, όπως το Sequencing, δεν μπορούν να ανιχνεύσουν αλλαγές στον αριθμό των αντιγράφων. Η ανάλυση Southern blot ανιχνεύει μεν πολλές μεγάλες αναδιατάξεις αλλά δεν θα ανιχνεύσει μικρές απαλοιφές και δεν είναι ιδανική για τεχνική ρουτίνας. Αντίστοιχα η MLPA μπορεί να ανιχνεύσει αλλαγές στον αριθμό μικρών αλληλουχιών στόχων (50-70 νουκλεοτίδια) τα οποία είναι πολύ μικρά για να ανιχνευτούν με τη FISH (15).

Παρόλο που για τις περισσότερες κληρονομικές καταστάσεις οι διαγραφές γονιδίων ή ο διπλασιασμός γονιδίων είναι λιγότερο του 10% όλων των

μεταλλάξεων, για άλλες ανωμαλίες το φαινόμενο αυτό μπορεί να είναι 10 μέχρι 30% ή και ακόμα μεγαλύτερο (15).

Η MLPA δεν βασίζεται στις αλληλουχίες που ενισχύονται, αλλά στους MPLA ανιχνευτές που υβριδίζονται στην αλληλουχία στόχο (δύο ανιχνευτές ανά περιοχή). Οι ανιχνευτές πέραν της ειδικής ακολουθίας με την οποία υβριδίζεται στο στόχο περιέχουν αλληλουχίες κοινών εκκινητών. Σε αντίθεση με μια τυπική πολλαπλή PCR χρησιμοποιείται μόνο ένα σετ κοινών εκκινητών (15). Επομένως, στηρίζεται στην μέθοδο της ημιποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, μέσω της οποίας πραγματοποιείται ταυτόχρονη ενίσχυση πολλαπλών τμημάτων DNA σε μία αντίδραση. Έτσι, χρησιμοποιούμε 1 ζεύγος εκκινητών και 1 μείγμα ιχνηθετών για κάθε εξόνιο των εξεταζόμενων δειγμάτων και των δειγμάτων αναφοράς (19). Το μέγεθος των προϊόντων που ενισχύονται είναι μεταξύ 130 και 480 νουκλεοτιδίων και πρέπει να διαφέρουν μεταξύ τους ώστε να αναλυθούν συγκριτικά με ανάλυση θραυσμάτων με τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (15). Η ανάλυση στηρίζεται στην αντιπαράθεση της έντασης φθορισμού των εξεταζόμενων δειγμάτων και των δειγμάτων αναφοράς. Η έλλειψη ανιχνεύεται όταν η ένταση του φθορισμού μειώνεται, ενώ όταν αυξάνεται υπάρχει διπλασιασμός στο συγκεκριμένο τμήμα του γονιδίου. Για την σύγκριση των τιμών φθορισμού έχουν αναπτυχθεί κατάλληλα υπολογιστικά προγράμματα (19). Έτσι η σύγκριση των κορυφών που προκύπτουν μεταξύ των δειγμάτων οδηγούν στο συμπέρασμα ποια από αυτά δεν έχουν φυσιολογικό αριθμό αντιγράφων (15).

Η πειραματική διαδικασία της μεθόδου αυτής περιλαμβάνει :

1. Απομόνωση DNA του δείγματος προς ανάλυση.
2. Αποδιάξη του δίκλωνου DNA και υβριδοποίηση με την χρήση κατάλληλων ζευγών εκκινητών.
3. Αντίδραση σύνδεσης (ligation).
4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για την ενίσχυση των κατάλληλων αλληλουχιών.
5. Αλληλούχιση εξεταζόμενων δειγμάτων και ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη χρήση ειδικού λογισμικού (19).

Κατά τη διάρκεια του σταδίου της αποδιάταξης, λαμβάνει χώρα πλήρης αποδιάταξη του DNA και επωάζεται για 20 ώρες με το μίγμα των MLPA ανιχνευτών. Οι ανιχνευτές αποτελούνται από δύο διαφορετικά ολιγονουκλεοτίδια που το καθένα περιέχει την κοινή αλληλουχία ενός PCR εκκινητή. Οι δύο ανιχνευτές υβριδίζονται στις αλληλουχίες στόχους. Μόνο όταν οι εκκινητές υβριδιστούν στις αλληλουχίες στόχους μπορούν να ενωθούν κατά την διάρκεια του σταδίου της λιγάσης και μόνο αυτοί οι ανιχνευτές που έχουν ενωθεί θα ενισχυθούν στη συνέχεια κατά την PCR. Ο αριθμός προϊόντων των ανιχνευτών που έχουν ενωθεί είναι το μέτρο του αριθμού των αλληλουχιών στόχων που υπάρχουν στο δείγμα. Τα ενισχυμένα προϊόντα διαχωρίζονται με τριχοειδή ηλεκτροφόρηση. Οι ανιχνευτές που δεν έχουν ενωθεί περιέχουν μόνο τον ένα εκκινητή έτσι δεν ενώνονται και δεν παράγουν σήμα και ως εκ τούτου η απομάκρυνση των ανιχνευτών αυτών δεν είναι απαραίτητη (15).

## 2.2 Μεθοδολογία- Πειραματική διαδικασία

### 2.2.1 Σχεδιασμός εκκινήτων.

Αρχικά σχεδιάστηκαν εκκινήτες για τα εξώνια 2 έως 7 του γονιδίου IKZF1. Το εξώνιο 1 αποτελεί ένα μη κωδικό εξώνιο και ως εκ τούτου δεν κρίθηκε απαραίτητο να μελετηθεί. Για το εξώνιο 8 σχεδιάστηκαν εκκινήτες ωστόσο εν τέλει δεν μελετήθηκε.

Ο σχεδιασμός των εκκινήτων έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος primer3 και ως αλληλουχία αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το IKZF1-221, με ταυτότητα μετάγραφου (transcript ID) ENST00000644005.1 και RefSeq (Reference Sequence) NM\_006060 και NP\_006051 (εικόνα12) από την [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org) (Human GRCh38.p12).

IKZF1-219	<a href="#">ENST00000641948.1</a>	1527	No protein	Retained intron	-	-	-	
IKZF1-220	<a href="#">ENST00000642219.1</a>	509	67aa	Protein coding	-	-	-	
IKZF1-221	<a href="#">ENST00000644005.1</a>	6302	519aa	Protein coding	<a href="#">CCDS75596</a>	-	<a href="#">NM_006060</a> <a href="#">NP_006051</a>	GE
IKZF1-222	<a href="#">ENST00000645066.1</a>	558	170aa	Protein coding	-	-	-	

Εικόνα 12: Πίνακας με μερικά μετάγραφα του IKZF1 όπως εμφανίζεται στη βάση δεδομένων [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από το primer3 απεικονίζονται στους πίνακες που ακολουθούν (πίνακες 3-8).

Εξώνιο 2

	Αλληλουχία	Μήκος εκκινητών	Tm
πρόσθιος εκκινητής (forward primer)	gcataggggttctttatctctctc	24	58.86
ανάστροφος εκκινητής (reversed primer)	ccatgagcataccaagcact	20	58.75
	gc%	Any	3'
πρόσθιος εκκινητής (forward primer)	45.83	3.00	0.00
ανάστροφος εκκινητής (reversed primer)	50.00	4.00	2.00

Μήκος προϊόντος: 225

**Πίνακας 3:** Πρόσθιος και οπίσθιος εκκινητής όπως σχεδιάστηκε στο primer3 για το εξώνιο 2 του IKFZ1. Στον πίνακα σημειώνονται η αλληλουχία των εκκινητών, το μήκος τους (αριθμός νουκλεοτιδίων), η θερμοκρασία αποδιάταξης (Melting temperature Tm), το ποσοστό της περιεκτικότητας σε γουανίνη και κυτοσίνη (gc%) καθώς και η τιμή συμπληρωματικότητας των εκκινητών (any: αυτόσυμπληρωματικότητα δημιουργώντας εσωτερικές δομές / 3': τάση για δημιουργία primer dimers. Όσο μικρότερες οι τιμές και πιο κοντά στο 0 θεωρούνται προτιμότερες). Τέλος σημειώνεται το μήκος του προϊόντος που προκύπτει.

Εξώνιο 3

	Αλληλουχία	Μήκος εκκινητών	Tm
πρόσθιος εκκινητής (forward primer)	accctctcaagccaaaagc	19	59.42
ανάστροφος εκκινητής (reversed primer)	tgacttgcattcccttcatca	20	60.20
	gc%	Any	3'
πρόσθιος εκκινητής (forward primer)	52.63	2.00	2.00
ανάστροφος εκκινητής (reversed primer)	45.00	4.00	2.00

Μήκος προϊόντος: 288

**Πίνακας 4:** Πρόσθιος και οπίσθιος εκκινητής όπως σχεδιάστηκε στο primer3 για το εξώνιο 3 του IKFZ1. Στον πίνακα σημειώνονται η αλληλουχία των εκκινητών, το μήκος τους (αριθμός νουκλεοτιδίων), η θερμοκρασία αποδιάταξης (Melting temperature Tm), το ποσοστό της περιεκτικότητας σε γουανίνη και κυτοσίνη (gc%) καθώς και η τιμή συμπληρωματικότητας των εκκινητών (any: αυτόσυμπληρωματικότητα δημιουργώντας εσωτερικές δομές / 3': τάση για δημιουργία primer dimers. Όσο μικρότερες οι τιμές και πιο κοντά στο 0 θεωρούνται προτιμότερες). Τέλος σημειώνεται το μήκος του προϊόντος που προκύπτει.

Εξώνιο 4

	Αλληλουχία	Μήκος εκκινητών	Tm
πρόσθιος εκκινητής (forward primer)	tgtctttttgctgctgtgttg	21	60.08
ανάστροφος εκκινητής (reversed primer)	cacaaggaagacaggatgctt	21	59.34
	gc%	Any	3'
πρόσθιος εκκινητής (forward primer)	42.86	3.00	0.00
ανάστροφος εκκινητής (reversed primer)	47.62	4.00	3.00

Μήκος προϊόντος: 425

**Πίνακας 5:** Πρόσθιος και οπίσθιος εκκινητής όπως σχεδιάστηκε στο primer3 για το εξώνιο 4 του IKFZ1. Στον πίνακα σημειώνονται η αλληλουχία των εκκινητών, το μήκος τους (αριθμός νουκλεοτιδίων), η θερμοκρασία αποδιάταξης (Melting temperature Tm), το ποσοστό της περιεκτικότητας σε γουανίνη και κυτοσίνη (gc%) καθώς και η τιμή συμπληρωματικότητας των εκκινητών (any: αυτόσυμπληρωματικότητα δημιουργώντας εσωτερικές δομές / 3': τάση για δημιουργία primer dimers. Όσο μικρότερες οι τιμές και πιο κοντά στο 0 θεωρούνται προτιμότερες). Τέλος σημειώνεται το μήκος του προϊόντος που προκύπτει.

Εξώνιο 5

	Αλληλουχία	Μήκος εκκινητών	Tm
πρόσθιος εκκινητής (forward primer)	ttctcgtagcatcgtcctca	20	59.55
ανάστροφος εκκινητής (reversed primer)	gactcagggttagccagcaa	20	60.40
	gc%	Any	3'
πρόσθιος εκκινητής (forward primer)	50.00	2.00	1.00
ανάστροφος εκκινητής (reversed primer)	55.00	4.00	2.00

Μήκος προϊόντος: 341

**Πίνακας 6:** Πρόσθιος και οπίσθιος εκκινητής όπως σχεδιάστηκε στο primer3 για το εξώνιο 5 του IKFZ1. Στον πίνακα σημειώνονται η αλληλουχία των εκκινητών, το μήκος τους (αριθμός νουκλεοτιδίων), η θερμοκρασία αποδιάταξης (Melting temperature Tm), το ποσοστό της περιεκτικότητας σε γουανίνη και κυτοσίνη (gc%) καθώς και η τιμή συμπληρωματικότητας των εκκινητών (any: αυτόσυμπληρωματικότητα δημιουργώντας εσωτερικές δομές / 3': τάση για δημιουργία primer dimers. Όσο μικρότερες οι τιμές και πιο κοντά στο 0 θεωρούνται προτιμότερες). Τέλος σημειώνεται το μήκος του προϊόντος που προκύπτει.

Εξώνιο 6

	Αλληλουχία	Μήκος εκκινητών	Tm
πρόσθιος εκκινητής (forward primer)	tccgtaacagtttagctctcaag	24	59.18
ανάστροφος εκκινητής (reversed primer)	ctctgctcctaaggctgcat	20	59.74
	gc%	Any	3'
πρόσθιος εκκινητής (forward primer)	41.67	5.00	2.00
ανάστροφος εκκινητής (reversed primer)	55.00	5.00	3.00

Μήκος προϊόντος: 352

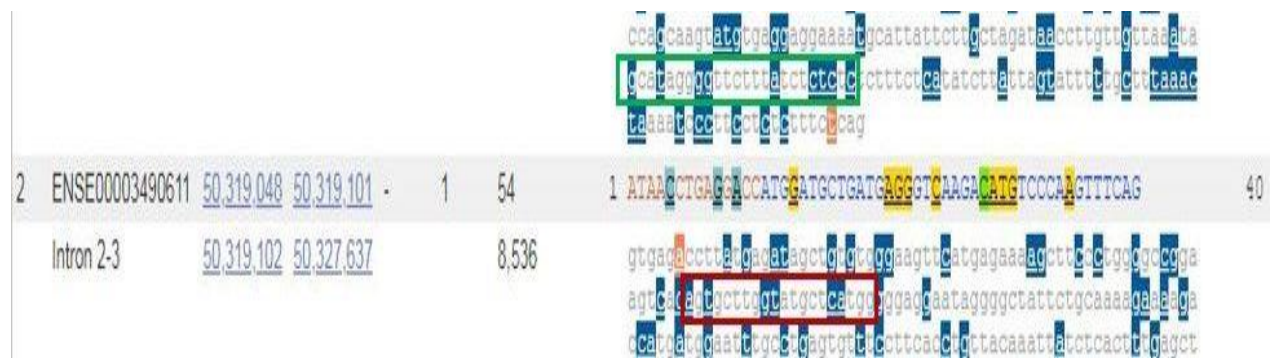
**Πίνακας 7:** Πρόσθιος και οπίσθιος εκκινητής όπως σχεδιάστηκε στο primer3 για το εξώνιο 6 του IKFZ1. Στον πίνακα σημειώνονται η αλληλουχία των εκκινητών, το μήκος τους (αριθμός νουκλεοτιδίων), η θερμοκρασία αποδιάταξης (Melting temperature Tm), το ποσοστό της περιεκτικότητας σε γουανίνη και κυτοσίνη (gc%) καθώς και η τιμή συμπληρωματικότητας των εκκινητών (any: αυτόσυμπληρωματικότητα δημιουργώντας εσωτερικές δομές / 3': τάση για δημιουργία primer dimers. Όσο μικρότερες οι τιμές και πιο κοντά στο 0 θεωρούνται προτιμότερες). Τέλος σημειώνεται το μήκος του προϊόντος που προκύπτει.

Εξώνιο 7

	Αλληλουχία	Μήκος εκκινητών	Tm
πρόσθιος εκκινητής (forward primer)	cctggctctttaggcactt	20	59.50
ανάστροφος εκκινητής (reversed primer)	ccctttctccaccctcaac	20	60.85
	gc%	Any	3'
πρόσθιος εκκινητής (forward primer)	55.00	3.00	0.00
ανάστροφος εκκινητής (reversed primer)	55.00	2.00	0.00

Μήκος προϊόντος: 329

**Πίνακας 8:** Πρόσθιος και οπίσθιος εκκινητής όπως σχεδιάστηκε στο primer3 για το εξώνιο 7 του IKFZ1. Στον πίνακα σημειώνονται η αλληλουχία των εκκινητών, το μήκος τους (αριθμός νουκλεοτιδίων), η θερμοκρασία αποδιάταξης (Melting temperature Tm), το ποσοστό της περιεκτικότητας σε γουανίνη και κυτοσίνη (gc%) καθώς και η τιμή συμπληρωματικότητας των εκκινητών (any: αυτόσυμπληρωματικότητα δημιουργώντας εσωτερικές δομές / 3': τάση για δημιουργία primer dimers. Όσο μικρότερες οι τιμές και πιο κοντά στο 0 θεωρούνται προτιμότερες). Τέλος σημειώνεται το μήκος του προϊόντος που προκύπτει.



Εικόνα 13: Εξώνιο 2. Το προϊόν που αναμένεται να προκύψει από την αντίδραση PCR με βάση τους εκκινήτες που σχεδιάστηκαν με το *prism3*. Το πράσινο πλαίσιο σηματοδοτεί τον πρόσθιο εκκινήτη ενώ το κόκκινο τον ανάστροφο, όπως σχεδιάστηκαν ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)).



Εικόνα 14: Εξώνιο 3. Το προϊόν που αναμένεται να προκύψει από την αντίδραση PCR με βάση τους εκκινήτες που σχεδιάστηκαν με το *prism3*. Το πράσινο πλαίσιο σηματοδοτεί τον πρόσθιο εκκινήτη ενώ το κόκκινο τον ανάστροφο, όπως σχεδιάστηκαν ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)).

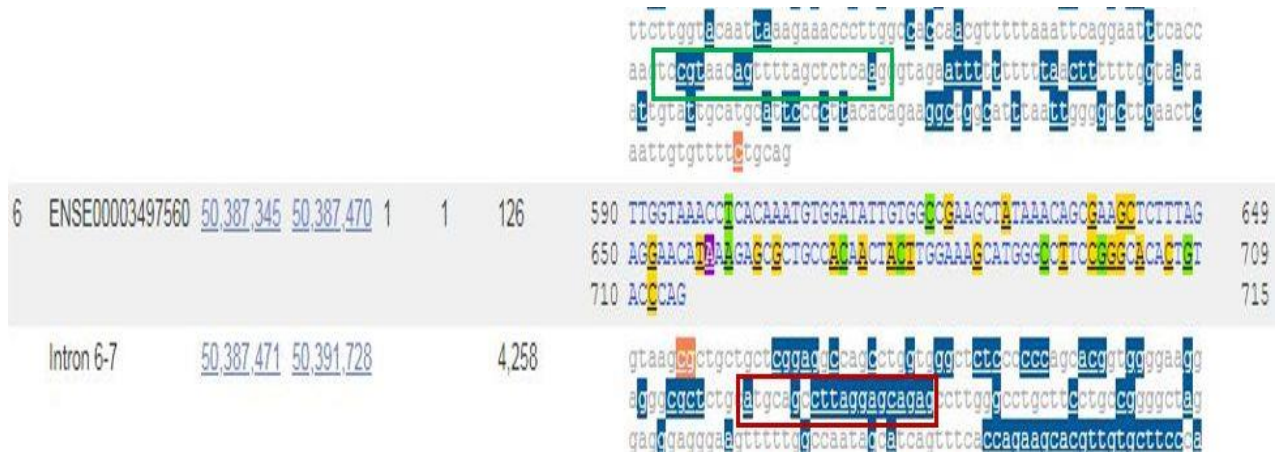


Εικόνα 15: Εξώνιο 4. Το προϊόν που αναμένεται να προκύψει από την αντίδραση PCR με βάση τους εκκινητές που σχεδιάστηκαν με το *primo3*. Το πράσινο πλαίσιο σηματοδοτεί τον πρόσθιο εκκινητή ενώ το κόκκινο τον ανάστροφο, όπως σχεδιάστηκαν ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)).

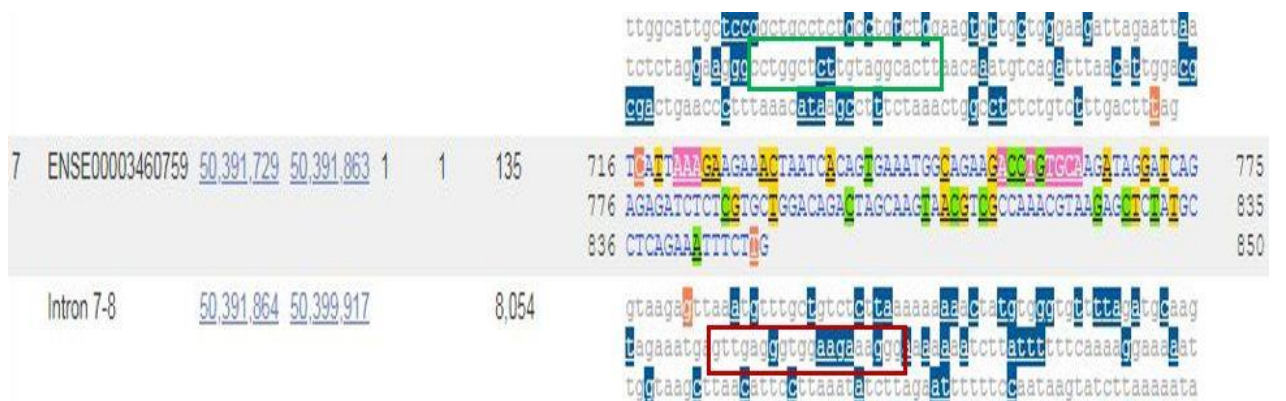


Εικόνα 16: Εξώνιο 5. Το προϊόν που αναμένεται να προκύψει από την αντίδραση PCR με βάση τους εκκινητές που σχεδιάστηκαν με το *primo3*. Το πράσινο πλαίσιο σηματοδοτεί τον πρόσθιο εκκινητή ενώ το κόκκινο τον ανάστροφο, όπως σχεδιάστηκαν ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)).





**Εικόνα 17: Εξώνιο 6.** Το προϊόν που αναμένεται να προκύψει από την αντίδραση PCR με βάση τους εκκινητές που σχεδιάστηκαν με το *primo3*. Το πράσινο πλαίσιο σηματοδοτεί τον πρόσθιο εκκινητή ενώ το κόκκινο τον ανάστροφο, όπως σχεδιάστηκαν ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)).



**Εικόνα 18: Εξώνιο 7.** Το προϊόν που αναμένεται να προκύψει από την αντίδραση PCR με βάση τους εκκινητές που σχεδιάστηκαν με το *primo3*. Το πράσινο πλαίσιο σηματοδοτεί τον πρόσθιο εκκινητή ενώ το κόκκινο τον ανάστροφο, όπως σχεδιάστηκαν ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)).

Κατά το σχεδιασμό των εκκινητών συνήθως λαμβάνονται υπόψη και γίνεται προσπάθεια να ικανοποιηθούν τα παρακάτω κριτήρια:

**Μέγεθος των εκκινητών:** Οι εκκινητές είναι συνήθως ολιγονουλεοτίδια με μήκος 18-30 βάσεις. Μικρότεροι εκκινητές οδηγούν σε μη ειδικό υβριδισμό, ενώ μεγαλύτεροι εκκινητές έχουν μεγαλύτερη ειδικότητα, αλλά αυξάνεται η πιθανότητα δημιουργίας δευτερογενών δομών που μειώνουν την αποτελεσματικότητα του υβριδισμού.

**Αλληλουχία και εξειδίκευση των εκκινητών:** Οι εκκινητές πρέπει να είναι ειδικοί για τις αλληλουχίες που πλαισιώνουν την περιοχή στόχο (13) πρέπει δηλαδή να έχουν απόλυτη συμπληρωματικότητα προς την αλληλουχία στόχο, αλλά ελάχιστη έως καθόλου συμπληρωματικότητα μεταξύ τους (12). Ο υβριδισμός μεταξύ των εκκινητών οδηγεί στο σχηματισμό *διμερών εκκινητών* (Primer dimers) που έχουν μέγεθος 30-50 bp και μειώνουν την αποτελεσματικότητα της PCR. Επίσης, η ύπαρξη περιοχών συμπληρωματικότητας μέσα στον εκκινητή αυξάνει την πιθανότητα δημιουργίας δευτερογενών δομών που μειώνουν την αποτελεσματικότητα του υβριδισμού στην αλληλουχία στόχο (12). Επίσης καλό είναι να αποφεύγονται στα άκρα των εκκινητών πολλές επαναλήψεις G-C καθώς υπάρχει το ενδεχόμενο να υβριδοποιηθούν μη ειδικά σε περιοχές του DNA πλούσιες σε GC (13).

**Η θερμοκρασία αποδιάταξης των εκκινητών:** Η θερμοκρασία αποδιάταξης, Melting temperature ( $T_m$ ), είναι η θερμοκρασία στην οποία το 50% των μορίων DNA βρίσκεται σε μονόκλωνη μορφή. Η  $T_m$  εξαρτάται από το μέγεθος της αλληλουχίας και τη σύσταση των βάσεων της αλληλουχίας. Υψηλό ποσοστό σε βάσεις G και C αυξάνει την  $T_m$ , καθώς οι βάσεις G και C ενώνονται με τις συμπληρωματικές τους στο δίκλωνο DNA με τρεις δεσμούς υδρογόνου, σε αντίθεση με τις βάσεις A και T που ενώνονται με δύο δεσμούς υδρογόνου (12). Ως εκ τούτου ένα ποσοστό περιεκτικότητας % GC (περιεκτικότητα βάσεων G και C) κοντά στο 50%, θεωρείται ικανοποιητικό. Αν κάτι τέτοιο δεν είναι εφικτό τότε είναι επιθυμητό οι εκκινητές να έχουν μεγαλύτερο μήκος ώστε να επιτευχθεί μία υψηλότερη θερμοκρασία αποδιάταξης (13).

Στην αντίδραση PCR η  $T_m$  των εκκινητών κυμαίνεται τυπικά στους 58-68 ° C. Οι δύο εκκινητές δεν πρέπει να έχουν πολύ διαφορετικές  $T_m$  μεταξύ τους, με μια διαφορά <3-5 ° C να θεωρείται αποδεκτή(12). Υπάρχουν πολλοί τύποι για τον υπολογισμό της  $T_m$  των ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών. Ένας από τους ευρύτερα χρησιμοποιούμενους είναι ο ακόλουθος:

$$T_m = 2(A + T) + 4(G + C)$$

Αν και ο παραπάνω τύπος ισχύει με ακρίβεια για ολιγονουκλεοτίδια μέχρι 7 βάσεων, στην πράξη χρησιμοποιείται για τον αδρό υπολογισμό της  $T_m$  εκκινητών μέχρι και 20-22 νουκλεοτιδίων. Η  $T_m$  των εκκινητών επηρεάζει άμεσα τη θερμοκρασία υβριδισμού τους στην αλληλουχία στόχο. Αν και η βέλτιστη θερμοκρασία υβριδισμού πρέπει να προσδιοριστεί πειραματικά, ένα καλό σημείο εκκίνησης είναι 3 ° C λιγότεροι από τη χαμηλότερη  $T_m$  των δύο εκκινητών (12).

Εν συνεχεία τα ζεύγη των εκκινητών ελέγχθηκαν με μια εικονική αντίδραση PCR (in silico PCR) με τη βοήθεια υπολογιστικού λογισμικού (εργαλείο In Silico PCR της UCSC). Τα In silico PCR προγράμματα συγκρίνουν το σύνολο

του ανθρώπινου γονιδιώματος ώστε να εξακριβωθεί εάν οι εκκινητές ενισχύουν μία ή περισσότερες περιοχές στο ανθρώπινο γονιδίωμα, αν δηλαδή η ενίσχυση είναι ειδική ή όχι καθώς το ανθρώπινο γονιδίωμα εμφανίζει περιοχές που επαναλαμβάνονται και περιοχές με τα λεγόμενα ψευδογονίδια (12). Από τον έλεγχο αυτό δεν προέκυψε κάποιο δευτερεύον προϊόν πέρα από το προϊόν στόχος.

```
UCSC In-Silico PCR  
  
>chr7:50358559+50358783 225bp GCATAGGGTTCTTTATCTCTCTC CCATGAGCATACCAAGCACT  
GCATAGGGTTCTTTATCTCTCTCtctttctcatatcttattagtat  
tgctttaaactaaaaatcccttcctctctttctcagataacctgaggacca  
tggatgctgatgagggtcaagacatgtccaagtctcaggtgagacctta  
tgagatagctgtgtgggaagttcatgagaaaagcttccctggggccggaa  
gtcacAGTGCTTGGTATGCTCATGG
```

Εικόνα 19: Εξώνιο 2. In Silico PCR. Εμφανίζεται το μοναδικό προϊόν που προκύπτει από την αντίδραση PCR με τη χρήση των εκκινητών που σχεδιάστηκαν στο primer3 για το εξώνιο 2 (<https://genome.ucsc.edu>).

```
UCSC In-Silico PCR  
  
>chr7:50367152+50367439 288bp ACCCTCTCAAGCCAAAAGC TGAATTGCATCCCTTCATCA  
ACCCTCTCAAGCCAAAAGCcgggggaagcccaggcaccttgaccatgacc  
gcccgagactcacacttcttcttctcatcaggggaaggaaagccccctg  
taagcgatactccagatgagggcagatgagcccatgccgatccccgaggac  
ctctccaccacctcgggaggacagcaaagctccaagagtacagagtcgt  
gggtaagtgggtcaccagcggcctctgtgcctgtgaaacctttatctctt  
tgtatTTTTCCAAGACAGTGATGAAGGGATGCAAGTCA
```

Εικόνα 20: Εξώνιο 3. In Silico PCR. Εμφανίζεται το μοναδικό προϊόν που προκύπτει από την αντίδραση PCR με τη χρήση των εκκινητών που σχεδιάστηκαν στο primer3 για το εξώνιο 3 (<https://genome.ucsc.edu>).

## UCSC In-Silico PCR

```
>chr7:50444151+50444575 425bp TGTCTTTTTGCTGCTGTGTTG CACAAGGAAGACAGGATGCTT
TGTCTTTTTGCTGCTGTGTTGttttgttgagtttttttttgcacatgaca
ctgagtgccctcctgtattgtttctttcagccagtaatgttaaagtagag
actcagagtgatgaagagaatgggcgtgcctgtgaaatgaatggggaaga
atgtgcggaggatttacgaatgcttgatgcctcgggagagaaaatgaatg
gctccacagggaccaaggcagctcggctttgtcgggagttggaggcatt
cgacttcctaacggaaaactaaagtgtgatatctgtgggatcatttgcac
cgggccaatgtgctcatggttcacaaaagaagccacactggtaaggcct
ggctcagtttttcttttagtggcctggagaagggtgcatggggtttgaagg
aggaAAGCATCCTGTCTTCCTTGTG
```

Εικόνα 21: Εξώνιο 4. In Silico PCR. Εμφανίζεται το μοναδικό προϊόν που προκύπτει από την αντίδραση PCR με τη χρήση των εκκινητών που σχεδιάστηκαν στο primer3 για το εξώνιο 4 (<https://genome.ucsc.edu>).

## UCSC In-Silico PCR

```
>chr7:50450168+50450508 341bp TTCTCGTAGCATCGTCCTCA GACTCAGGGTTAGCCAGCAA
TTCTCGTAGCATCGTCCTCAgtccccacgctgagtttagttctcaccag
ctctcctctctccgtcccaggagaacggcccttcagtgcaatcagtgcg
gggcctcattcaccagaagggaacctgctccggcacatcaagctgcat
tccggggagaagcccttcaaatgccacctctgcaactacgcctgccgccg
gagggacgcccctcactggccacctgaggacgcactccggtaggtcccctg
gatgcagtcggggctgtctgggtgtcccgggattcctccactctgcccg
cctgggtcccggattgtgtccTTGCTGGCTAACCCCTGAGTC
```

Εικόνα 22: Εξώνιο 5. In Silico PCR. Εμφανίζεται το μοναδικό προϊόν που προκύπτει από την αντίδραση PCR με τη χρήση των εκκινητών που σχεδιάστηκαν στο primer3 για το εξώνιο 5 (<https://genome.ucsc.edu>).

## UCSC In-Silico PCR

```
>chr7:50454909+50455260 352bp TCCGTAACAGTTTTAGCTCTCAAG CTCTGCTCCTAAGGCTGCAT  
TCCGTAACAGTTTTAGCTCTCAAGggtagaattttttttaactttttt  
ggtaataattgtattgcatgcattcccccttacacagaaggctggcattta  
attggggctctgaactcaattgtgttttctgcagttggtaaacctcaca  
atgtggatattgtggccgaagctataaacagcgaagctcttagaggaa  
ataaagagcgtgccacaactacttggaaagcatgggccttcgggcaca  
ctgtaccaggaagcgtgctgctcggaggccagcctgggggctctcc  
ccccagcacggggggaaggaggcgctctgcATGCAGCCTTAGGAGCAG  
AG
```

Εικόνα 23: Εξώνιο 6. In Silico PCR. Εμφανίζεται το μοναδικό προϊόν που προκύπτει από την αντίδραση PCR με τη χρήση των εκκινητών που σχεδιάστηκαν στο primer3 για το εξώνιο 6 (<https://genome.ucsc.edu>).

## UCSC In-Silico PCR

```
>chr7:50459322+50459650 329bp CCTGGCTCTTGTAGGCACTT CCCTTTCTCCACCCTCAAC  
CCTGGCTCTTGTAGGCACTTaacaaatgtcagatttaacattggacgcga  
ctgaaccctttaaacataagcctttctaaactggcctctctgtctttgac  
ttagtcattaaagaagaactaatcacagtgaatggcagaagacctgt  
gcaagataggatcagagagatctctcgtgctggacagactagcaagtaac  
gtcgccaaacgtaagagctctatgcctcagaaatttcttggtaagagtta  
aatgtttgctgtctcttaaaaaaaaactatgtgggtgttttagatgcaag  
tagaaatgaGTTGAGGGTGAAGAAAGGG
```

Εικόνα 24: Εξώνιο 7. In Silico PCR. Εμφανίζεται το μοναδικό προϊόν που προκύπτει από την αντίδραση PCR με τη χρήση των εκκινητών που σχεδιάστηκαν στο primer3 για το εξώνιο 7 (<https://genome.ucsc.edu>).

Επίσης μέσω της ensemble τα ζεύγη εκκινητών ελέγχθηκαν για τυχών παραλλαγές στις αλληλουχίες τους, όπου προέκυψε ότι δεν υπήρχαν παραλλαγές που να εμφανίζονταν με υψηλές συχνότητες.

Η σύνθεση των εκκινητών έγινε από την εταιρία metabion international AG και στο λυοφιλοποιημένο προϊόν που παραλήφθηκε προστέθηκε η απαραίτητη ποσότητα H<sub>2</sub>O που αναφερόταν στην ειδική συνοδευτική φόρμα ώστε να προκύψει διάλυμα συγκέντρωσης 100μM. Εν συνεχεία έγιναν οι απαραίτητες αραιώσεις ώστε να προκύψουν σωληνάρια που περιείχαν συγκεντρώσεις των 10μM και 5 μM (υπολογισμός με βάση τον τύπο αραιώσης:  $C_{αρχ} * V_{αρχ} = C_{τελ} * V_{τελ}$  όπου  $C_{αρχ}=100$ ,  $C_{τελ}=10$  και 5 αντίστοιχα και  $V_{τελ}=100μl$ ). Επομένως προέκυψε ότι για τη συγκέντρωση των 10μM απαιτούνταν 10μl του αρχικού διαλύματος του εκκινητή στα οποία προστέθηκαν 90μl H<sub>2</sub>O, και για τη συγκέντρωση των 5μM απαιτούνταν 5 μl του αρχικού διαλύματος του εκκινητή στα οποία προστέθηκαν 95μl H<sub>2</sub>O).

Μετά το σχεδιασμό των εκκινητών, ακολούθησε πείραμα βελτιστοποίησης της PCR σε τυχαία δείγματα.

### 2.2.2 Βελτιστοποίηση της αντίδρασης PCR

Τα βασικά χαρακτηριστικά μιας αντίδρασης PCR είναι η ειδικότητα (Specificity) και η απόδοση (Efficiency). Για να επιτευχθεί η βέλτιστη ειδικότητα (δηλαδή να προκύπτει ένα μοναδικό προϊόν) και η μέγιστη απόδοση (παραγωγή πολλών μορίων των PCR προϊόντων) μπορούν να τροποποιηθούν πολλοί παράγοντες, όπως η συγκέντρωση των ιόντων  $Mg^{2+}$ , των εκκινητών, των dNTPs, της πολυμεράσης και η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών. Οι παράγοντες που τροποποιούνται συχνότερα είναι η συγκέντρωση των ιόντων  $Mg^{2+}$  και η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών (12).

Η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών είναι καθοριστικής σημασίας για την ειδικότητα της αντίδρασης. Χαμηλή θερμοκρασία μειώνει την ειδικότητα του υβριδισμού, δηλαδή οι εκκινητές μπορούν να προσδεθούν σε αλληλουχίες DNA που δεν είναι απόλυτα συμπληρωματικές προς τη δική τους. Σε αυτή την περίπτωση παράγονται μη επιθυμητά παραπροϊόντα στην αντίδραση PCR. Σε υψηλές θερμοκρασίες λιγότερα μόρια εκκινητών υβριδίζονται στο DNA, με αποτέλεσμα τη μείωση της απόδοσης της αντίδρασης (12).

Η βέλτιστη θερμοκρασία υβριδισμού συνήθως προσδιορίζεται πειραματικά. Ως σημείο εκκίνησης όπως ήδη αναφέρθηκε, χρησιμοποιείται μια θερμοκρασία περίπου  $3^{\circ} C$  κάτω από τη χαμηλότερη  $T_m$  των δύο εκκινητών γι'αυτό άλλωστε είναι επιθυμητό οι  $T_m$  των δύο εκκινητών να μη διαφέρουν πάνω από  $3-5^{\circ} C$  (12).

Με βάση την παραπάνω θεωρία και το γεγονός ότι η ταχύτητα σύνθεσης της νέας αλυσίδας γενικά είναι της τάξης των 1000 bp ανά λεπτό (12), σχεδιάστηκε το εξής πρόγραμμα το οποίο εφαρμόστηκε για όλα τα ζεύγη των εκκινητών: (πίνακας 9)

Στάδια της PCR	Θερμοκρασία	Χρόνος	
1. Αρχική αποδιάταξη/ ενεργοποίηση πολυμεράσης	95 °C	15 min	
2. Αποδιάταξη	95°C	30sec	Επανάληψη για 35 κύκλους
3. Υβριδισμός εκκινητών	57°C	30sec	
4. Επιμήκυνση	72°C	30sec	
5. Τελική επιμήκυνση	72°C	8min	

**Πίνακας 9: Πρόγραμμα αντίδρασης PCR όπως σχεδιάστηκε με βάση την  $T_m$  των εκκινητών και το μήκος των προϊόντων για κάθε εξώνιο.**

Για την αντίδραση της PCR χρησιμοποιήθηκε Hot StarTaq™ Master Mix της εταιρίας Qiagen με LOT Number: 142348407. Σύμφωνα με το εγχειρίδιο της QIAGEN (HotStarTaq® PCR Handbook) η HotStarTaq DNA πολυμεράση απαιτεί ενεργοποίηση για 15 λεπτά στους 95 °C (στάδιο 1. του πίνακα 9).

Οι τιμές T<sub>m</sub> των εκκινήτων που σχεδιάστηκαν για τα διάφορα εξώνια κυμαίνονται μεταξύ 58.75 και 60.85. Ως εκ τούτου επιλέχθηκε ως θερμοκρασία για το στάδιο του υβριδισμού των εκκινήτων οι 57°C (στάδιο 3 του πίνακα 9).

Το μήκος των προϊόντων που προκύπτουν κυμαίνονται μεταξύ 225 και 425 bp ως εκ τούτου ως χρόνος επιμήκυνσης επιλέχθηκαν τα 30 δευτερόλεπτα (στάδιο 4 του πίνακα 9).

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αгарόζης low melt 2% της BIORAD στα 100mVolt για 20 λεπτά περίπου (τα ακριβή πρωτόκολλα αναγράφονται στο παράρτημα I).



**Εικόνα 25:** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης low melt. Εφαρμόστηκε το πρόγραμμα της αντίδρασης που σημειώνεται στον πίνακα 9 σε τυχαία δείγματα DNA. Απεικονίζονται τα προϊόντα της PCR σε τυχαία δείγματα (3 δείγματα) για τα εξώνια (ex) 1 έως και 7. Στη θέση 1 κάθε πηκτώματος έχει χρησιμοποιηθεί μάρτυρας μεγέθους ΦΧ174 DNA-Hae III Digest ενώ με b1 ή με παύλα (-) έχει σημειωθεί ο μάρτυρας επιμόλυνσης (τυφλό).

### 2.2.3 Πειραματική διαδικασία στα δείγματα μελέτης

Εν συνεχεία ακολούθησε η εφαρμογή της PCR σε 20 δείγματα.

Τα 20 δείγματα DNA αφορούσαν παιδιατρικούς ασθενείς που έχουν διαγνωστεί με ALL. Το DNA έχει απομονωθεί από δείγμα μυελού των οστών και έχει φωτομετρηθεί στη διάταξη (φασματοφωτόμετρο) NanoDrop 1000. Έγιναν οι απαραίτητες αραιώσεις όπου χρειαζόταν ώστε τα δείγματα να έχουν συγκέντρωση περίπου ίση με 50 ng/μl, συγκέντρωση που εξυπηρετεί και το πείραμα με τη μέθοδο του MLPA. Τα αραιωμένα δείγματα εκ νέου φωτομετρήθηκαν προς επιβεβαίωση.

Τελικά μετά την αντίδραση της PCR και την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης low melt 2%, στα 20 δείγματα ακολουθήθηκε η μέθοδος της αλληλούχισης του DNA. Τα 20 δείγματα επίσης αναλύθηκαν και με τη μέθοδο του MLPA (τα ακριβή πρωτόκολλα αναγράφονται στο παράρτημα Ι).

Για την αντίδραση MLPA έγινε χρήση του kit SALSA MLPA p335 ALL-IKZF1 (LOT C1-1217). Το probemix περιέχει 57 MLPA probes. Σε αυτούς περιλαμβάνονται ένας Probe (ινχηθέτης) για κάθε ένα από τα 8 εξώνια του γονιδίου IKZF1 (NM\_006060.5) (20).

Τα γονίδια που περιέχονται στο SALSA MLPA p335 ALL-IKZF1 είναι τα εξής (Πίνακας 10) (20):

Γονίδιο	Χρωμόσωμα	Εξώνια
IKZF1	7p12.2	1,2,3,4,5,6,7,8
PAX5	9p13.2	1,2,5,6,7,8,10
ETV6	12p13.2	1,2,3,5,8
RB1	13q14.2	6,14,19,24,26
BTG1,BTG1 downstream region	12q21.33	1,2
EBF1	5q33.3	1,10,14,16
CDKN2A και CDKN2B	9p21.3	4,2 και2
PAR1 region, SHOX area, CRLF2, CSF2RA, IL3RA και P2RY8	Xp22.33 region	
ZFY	Yp11.31	
JAK2	9p24.1	23

**Πίνακας 10: Τα γονίδια στόχοι στο SALSA MLPA p335 ALL-IKZF1 kit ([www.mlpa.com](http://www.mlpa.com)).**

Ο EBF1 (Early B cell factor 1) είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος είναι ιδιαίτερα σημαντικός τόσο για την B λεμφοποίηση όσο και για τη λειτουργία των B κυττάρων. Αποτελεί μέλος της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων EBF. Ο EBF1 είναι απαραίτητο συστατικό του μεταγραφικού δικτύου των B λεμφοκυττάρων και είναι ουσιώδης για τη διαφοροποίηση των B κυττάρων. Τόσο η έκφραση των υποδοχέων των προ-B κυττάρων (pre-BCR) καθώς και τα μονοπάτια σηματοδότησης PI3K/Akt/mTOR, ελέγχονται από το EBF1. Ο EBF1 προσδένεται στο DNA συνεργατικά με το Runx1 μεταγραφικό παράγοντα και αλληλεπιδρά συνεργατικά με τις E2A πρωτεΐνες (21).



Το EBF1 ενεργοποιεί τη μεταγραφή των ειδικών για τα B κύτταρα γονιδίων, μεταξύ των οποίων το PAX5 το οποίο κωδικοποιεί ένα παράγοντα που «δεσμεύει» τα κύτταρα να ακολουθήσουν την B γενεολογία. Επίσης το EBF1 ενισχύει αυτή τη «δέσμευση» με την καταστολή έκφρασης άλλων μονοπατιών που θα οδηγούσαν σε εναλλακτική γενεολογία. Φαίνεται ότι ο EBF1 εκκινεί επιγενετικές αλλαγές σε γονίδια στόχους κατά τη διάρκεια των αρχικών σταδίων της διαφοροποίησης των B κυττάρων (21).

Μελέτες σε ετερόζυγα ποντίκια, δείχνουν ότι υπάρχουν δοσοεξαρτώμενα αποτελέσματα τα οποία οδηγούν σε μειωμένους αριθμούς στο μισό τόσο σε προγονικά B λεμφοκύτταρα όσο και σε ώριμα B κύτταρα (21).

Η JAK2 κινάση ανήκει στην οικογένεια των JAK κινασών που επιπλέον περιλαμβάνει και τις JAK1, JAK3 και TYK2 κινάσες. Το μόριο αυτό έχει μεγάλη λειτουργική σημασία στη μετάδοση του σήματος των κυτταροκινών και των αυξητικών παραγόντων. Στη δομή του υπάρχουν δύο ομόλογες περιοχές, μία με δράση κινάσης και μία άλλη περιοχή ψευδοκινάσης. Η σημασία της JAK 2 κινάσης φαίνεται από το γεγονός ότι σε ποντίκια με πλήρη έλλειψή της αυτά δεν μπορούν να παράγουν καθόλου ερυθροκύτταρα και δεν επιβιώνουν πέρα της 13ης με 15ης ημέρας (22).

Το JAK2 αποτελεί βασικό ρυθμιστή της κυτταρικής ανάπτυξης μέσω της κυτταρικής οδού μεταγωγής σήματος JAK-STAT. Οι αιμοποιητικοί υποδοχείς κυτοκινών τύπου I (EPO, TPO, G-CSF, GM-SCF, IL-3, IL-5, IL-6, IL-10) χρησιμοποιούν, όπως και οι υποδοχείς ιντερφερόνης, ένα σύστημα κινασών αγωγής σήματος που ονομάστηκε JAK-STAT (signal transducers and activators of transcription). Κληρονομικές ελλείψεις στην οδό JAK-STAT σχετίζονται με καταστάσεις ανοσοεπάρκειας ενώ σωματικές μεταλλάξεις και αναδιατάξεις εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία αιματολογικών νεοπλασιών (23).

Οι γονιδιακοί τόποι CDKN2A (INK4a/ARF) και CDKN2B (INK4b) που εδράζονται στη χρωμοσωμική περιοχή 9p21, αποτελούν την πιο συχνά τροποποιημένη γενωμική περιοχή στον καρκίνο. Ο τόπος CDKN2A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, αναστολέας της κυκλίνης 2A εξαρτώμενος από κινάση), αποτελεί την δεύτερη πιο συχνά τροποποιημένη περιοχή μετά το p53 και κωδικοποιεί δύο ογκοκατασταλτικά γονίδια, τα p16INK4a και p14ARF, όπου και τα δύο συμμετέχουν στην αρνητική ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (24).

Τα βιοχημικά δεδομένα που δείχνουν ότι το p16INK4A φαίνεται να είναι ένας σημαντικός αρνητικός ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου, υποστηρίζουν και την πιθανότητα να είναι ένα σημαντικό ογκοκατασταλτικό γονίδιο. κύκλου, με αποτέλεσμα την πρόοδο στη φάση S. Το p16INK4a είναι αναστολέας των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών CDK4 και CDK6 της G1 φάσης, και διατηρεί το

ογκοκατασταλικό γονίδιο Rb ενεργοποιημένο (μη-φωσφορυλιωμένο). Η απενεργοποίηση του p16INK4a έχει σαν αποτέλεσμα την άρση της καταστολής των CDKs και την υπερφωσφορυλίωση του Rb από αυτές. Ως αποτέλεσμα, απελευθερώνεται ο μεταγραφικός παράγοντας E2F, και ο κυτταρικός κύκλος μεταβαίνει στην φάση S (24).

Η πρωτεΐνη p14ARF σταθεροποιεί την p53 αναστέλλοντας τον κατακερματισμό της μέσω του συστήματος HDM-2 και σταματά τον κυτταρικό κύκλο στις φάσεις G1 και G2. Συνεπώς, η πρωτεΐνη p53 μπορεί να οδηγήσει το κύτταρο σε προσωρινή και μόνιμη διακοπή της ανάπτυξης του, σε επιδιόρθωση του DNA, οριστική διαφοροποίηση ή απόπτωση ως αποτέλεσμα ογκογονικών ερεθισμάτων και βλάβης του DNA (24).

Ο τύπος CDKN2B (cyclin-dependent kinase inhibitor 2B, αναστολέας της κυκλίνης 2B εξαρτώμενος από κινάση ή INK4b) κωδικοποιεί το ογκοκατασταλικό γονίδιο p15INK4b, και φαίνεται επίσης να συμμετέχει στην αρνητική ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Το γονίδιο p15INK4b (γνωστό και ως MTS-2, major tumor suppressor 2) βρίσκεται δίπλα στο p16INK4a, 25 kb προς το κεντρομερίδιο του χρωμοσώματος 9, και έχει δομική και λειτουργική ομολογία με αυτό (αναστέλλει τις κινάσες CDK4 και CDK6), ιδιαίτερα στο εξώνιο 2, όπου εμφανίζουν 91% ομολογία αλληλουχίας και ενεργοποιείται μεταγραφικά από τον αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού β [transforming growth factor-β (TGF-β)]. Η πρωτεΐνη p15INK4b συνδέεται με το σύμπλοκο Cdk4-cyclin D, εκτοπίζοντας την πρωτεΐνη p27 και απελευθερώνοντας την ώστε να προσδεθεί και να αναστέλλει το σύμπλοκο Cdk2-cyclin D, το οποίο είναι απαραίτητο για την έναρξη της φάσης S του κυτταρικού κύκλου. Επομένως, η έκφραση της πρωτεΐνης p15INK4b ή p16INK4a εμποδίζει την φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών της οικογένειας Rb, τα οποία λειτουργούν σαν φρένο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, με αναστολή στη G1 φάση του κυτταρικού κύκλου, μέσω του μεταγραφικού παράγοντα E2F, με τον οποίο είναι συνδεδεμένη. Η απώλεια του τύπου CDKN2B (cyclin-dependent inhibitor locus 2) στους ανθρώπινους όγκους είναι συχνή, και ίσως να εξηγείται από την παρακείμενη θέση της στον τόπο CDKN2A, με αποτέλεσμα την συχνή απαλοϊφή και των δύο (24).

Ο μεταγραφικός παράγοντας PAX5 είναι γνωστός και ως BSAP (B-cell specific activator protein) παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην αιμοποίηση κυρίως στα προγονικά B κύτταρα για τη διαφοροποίησή τους και την ωρίμανσή τους ενώ αναστέλλει και τη διαφοροποίηση προς άλλες γενεολογικές γραμμές. Εμπλέκεται σε διάφορες πτυχές της διαφοροποίησης των B-κυττάρων όπως στην αναδιάταξη του γονιδίου της ανοσοσφαιρίνης, στη μεταγωγή σήματος BCR και στην επιβίωση των B κυττάρων. Έτσι στην περίπτωση ελλειμμάτων ή μεταλλάξεων που το απενεργοποιούν, το PAX5 προκαλεί την παραμονή των B κυττάρων σε πρόδρομο στάδιο. Σημειακές μεταλλάξεις, ελλείμματα και διάφορες ανακατατάξεις στο γονίδιο PAX5 έχουν αναφερθεί σε διάφορους

τύπους καρκίνου. Ωστόσο δεν έχει υπάρξει σαφής σχέση μεταξύ αυτών των αποκλίσεων και της πρόγνωσης. Η διαφορική έκφραση του *PAX5* στα Β κύτταρα μπορούν να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης τόσο για τη διάγνωση και κατηγοριοποίηση κινδύνου των λευχαιμιών και λεμφωμάτων που εμπλέκουν τα Β κύτταρα όσο και για την ύφεση ή την υποτροπή (25).

Το γονίδιο *ETV6* κωδικοποιεί τον μεταγραφικό αναστολέα Ets τύπου 6. Στην *ETV6* πρωτεΐνη εντοπίζεται μία υψηλής συντήρησης περιοχή που σχετίζεται με την πρόσδεση στο DNA η οποία απαντά σε όλα τα μέλη της οικογένειας ETS. Σε μοντέλα ποντικών το *ETV6* είναι απαραίτητο για την διατήρηση των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων, αλλά σε περίπτωση ετεροζυγωτικής απώλειας του ενός αλληλίου, η αιμοποίηση δεν εμποδίζεται (26). Στις λευχαιμίες αναφέρεται συχνά ότι η περιοχή υπόκειται σε ανακατατάξεις (27).

Το *BTG1* (B cell Translocation Gene 1) πρώτη φορά αναγνωρίστηκε στις περιπτώσεις της Β χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας (CLL-chronic lymphocytic leukemia). Σταθερά εκφράζεται σε κύτταρα που βρίσκονται σε ηρεμία (φάσεις  $G_0$ - $G_1$ ) ενώ η έκφραση του αναστέλλεται όταν τα κύτταρα εισέρχονται σε φάση ανάπτυξης (28) ανταποκρινόμενα στις ιδανικές ποσότητες μιτωτικών παραγόντων (29). Πειράματα στα οποία υπήρχε εξαναγκασμός της έκφρασής του, έδειξαν ότι το *BTG1* ρυθμίζει αρνητικά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Αυτή η δράση του έχει παρατηρηθεί σε πολλούς τύπους κυττάρου όπως στα μονοκύτταρα κύτταρα του περιφερικού αίματος (PBMC- Peripheral blood mononuclear cell) και στα μακροφάγα (28).

Το *RB1* (retinoblastoma) έχει κυρίως μελετηθεί για το ρόλο του στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου ως βασικός ρυθμιστής πολλών βιολογικών διαδικασιών. Μεταξύ αυτών το *RB1* εμπλέκεται στη ρύθμιση της απόπτωση με αποτέλεσμα εξαλλαγές σε αυτό να οδηγούν στην ανάπτυξη καρκίνου καθώς και σε ανθεκτικότητα στη θεραπεία. Ωστόσο ο ρόλος του στην απόπτωση είναι ακόμα αμφισβητούμενος καθώς μπορεί να δράσει είτε αναστέλλοντας είτε προωθώντας την απόπτωση. Η απενεργοποίηση του *RB1* είτε άμεσα μέσω μεταλλάξεων είτε έμμεσα μέσω αλλαγών στην έκφραση των ρυθμιστών του, είναι κάτι το οποίο συναντάται πολύ συχνά στους καρκίνους. Ένα από τα μοντέλα για τη δράση του προτείνουν ότι αναστέλλει τη μετάβαση  $G1$ - $S$  μέσω της καταστολής των γονιδίων στόχων *E2F* που εμπλέκονται στη σύνθεση του DNA και την πορεία του κυτταρικού κύκλου (30).

Το *SHOX* εντοπίζεται στην τελομερική περιοχή των φυλετικών χρωμοσωμάτων και ξεφεύγει της απενεργοποίησης του X. Συγκεκριμένα απαντά στο άκρο των βραχέων βραχιόνων και των δύο φυλετικών χρωμοσωμάτων στη ψευδοαυτοσωματική περιοχή 1 (PAR1-pseudoautosomal region 1). Είναι μία πυρηνική πρωτεΐνη η οποία προσδένεται στο DNA και δρα ως μεταγραφικός ενεργοποιητής. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης και της ανάπτυξης ρυθμίζοντας το πρότυπο της

ανάπτυξης τόσο στο χώρο όσο και στο χρόνο. Είναι δόσοεξαρτώμενο και η απώλεια του ενός αλληλομόρφου προκαλεί αποτυχία στην ανάπτυξη και ως εκ τούτου χαμηλό ανάστημα (31).

Το *CRLF2* βρίσκεται υπό τον έλεγχο των γονιδιακών ρυθμιστικών στοιχείων του *P2RY8*. Η αποκλίνουσα έκφραση του συσχετίζεται πολύ συχνά με μεταλλάξεις που ενεργοποιούν την JAK2 και αυτές οι δύο εξαλλαγές συνεργάζονται ανεξάρτητα ώστε να ξεκινήσει μία αλυσιδωτή αντίδραση ενεργοποίησης μεταγραφικών μονοπατιών γεγονός το οποίο προτείνει ότι το *CRLF2* ίσως δρα ως ικρίωμα απαραίτητο για την ενεργοποίηση του ογκογόνου σήματος JAK-STAT στη B-ALL. Ωστόσο πλέον δεν θεωρείται σημαντικός δείκτης κακής πρόγνωσης στην ALL τουλάχιστον από μόνος του ειδικά στις περιπτώσεις όπου δεν υπάγονται στην Ph-like ALL (32).

Το *CSF2RA* (Colony stimulating factor 2 Receptor A) γονίδιο εντοπίζεται στην ψευδοαυτοσωμική περιοχή (PAR) των X και Y φυλετικών χρωμοσωμάτων. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο είναι μία άλφα υπομονάδα του ετεροδιμερούς υποδοχέα CSF2 (Colony stimulating factor 2) ο οποίος αποτελεί μέλος την οικογένειας των κυτοκινικών υποδοχέων οι οποίοι ελέγχουν την παραγωγή, διαφοροποίηση και λειτουργία των κοκκιοκυττάρων και μακροφάγων (33).

Η ιντερλευκίνη 3 (IL3) και ο παράγοντας διέγερσης αποικίας κοκκιοκυττάρων/μακροφάγων (CSF2) διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση διάφορων αιμοποιητικών κυττάρων και οι υποδοχείς τους αποτελούνται από διαφορετικές υπομονάδες α αλλά μοιράζονται από κοινού την υπομονάδα β (CSF2RB). Η αλληλουχία για τον υποδοχέα α της IL3 (IL3RA) απαντά στην ψευδοαυτοσωμική περιοχή των φυλετικών χρωμοσωμάτων X και Y (PAR) και μάλιστα κοντά στην περιοχή που εντοπίζεται ο CSF2RA (34).

Το *P2RY8* κωδικοποιεί έναν πουρινεργικό υποδοχέα (Purinergic receptor). Ουσιαστικά είναι μέλος μίας οικογένειας πουρινεργικών υποδοχέων οι οποίοι εκφράζονται στα αιμοποιητικά κύτταρα συμπεριλαμβανομένου και στις λευχαιμικές βλάστες (35).

Επίσης έχουν συμπεριληφθεί 13 ιχνηθέτες αναφοράς (reference probes) οι οποίοι στοχεύουν χρωμοσωμικές περιοχές οι οποίες θεωρούνται ότι εμφανίζουν σταθερό αριθμό αντιγράφων στην ALL. Τέλος περιλαμβάνονται εννέα τμήματα αναφοράς ποιότητας (quality control fragments): 4 τμήματα για την ποσότητα του DNA (DNA Quantity Fragments /Q-fragments- ορατό μόνο όταν τα δείγματα DNA είναι σε ποσότητα μικρότερη των 100ng), δύο τμήματα για την αποδιάταξη του DNA (DNA Denaturation Fragments /D-fragments- χαμηλό σήμα υποδεικνύει ελλιπή αποδιάταξη), ένα τμήμα σημείο αναφοράς

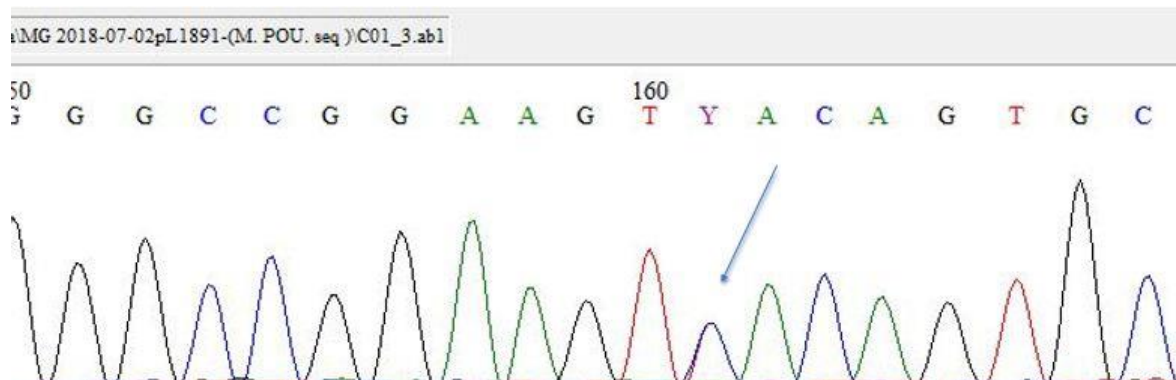
(benchmark fragment) και από ένα τμήμα για το χρωμόσωμα X και χρωμόσωμα Y (20).

## 2.3 Αποτελέσματα

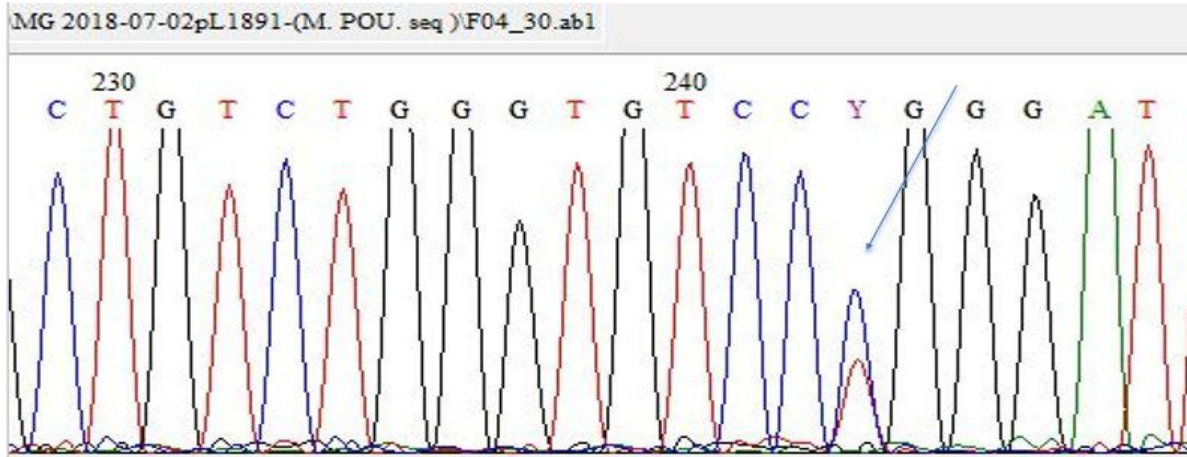
### 2.3.1 Αλληλούχιση DNA

Τα χρωματογράφημα αναλύθηκαν με το πρόγραμμα BioEdit και η αλληλουχίες συγκρίθηκαν με την αλληλουχία αναφοράς του IKZF1-221, με ταυτότητα μετάγραφου (transcript ID) ENST00000644005.1 και RefSeq (Reference Sequence) NM\_006060 και NP\_006051 (εικόνα 12) από την [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org) (Human GRCh38.p12). Στα είκοσι δείγματα βρέθηκαν τρεις πολυμορφισμοί σε ιντρονικές περιοχές:

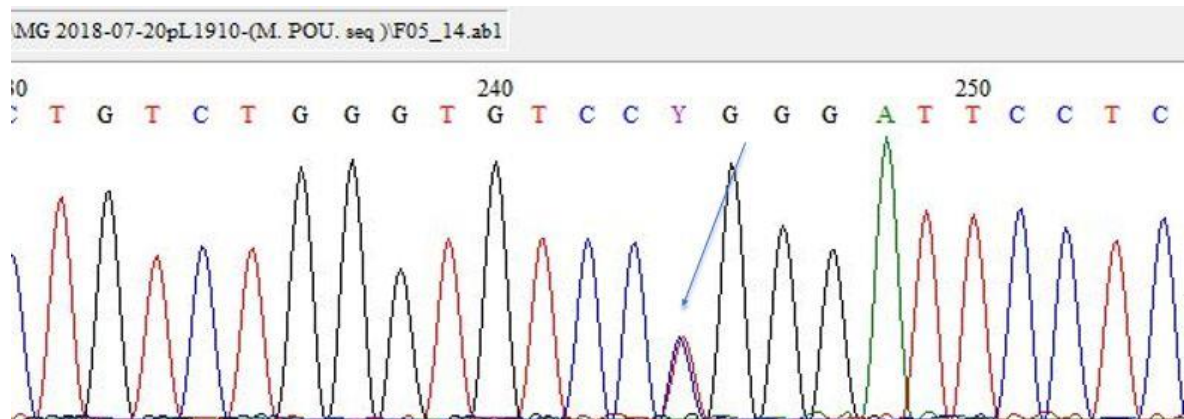
1. Εξώνιο 2: c.40+64 C>T (rs 756200899)(δείγμα 6BM)
2. Εξώνιο 5: c.589+41 C>T (rs113962761)(δείγματα, 12BM, 16BM και 37BM)
3. Εξώνιο 6: c.590-63A>T (rs56278999) (δείγματα 25BM, 37BM και 40BM)



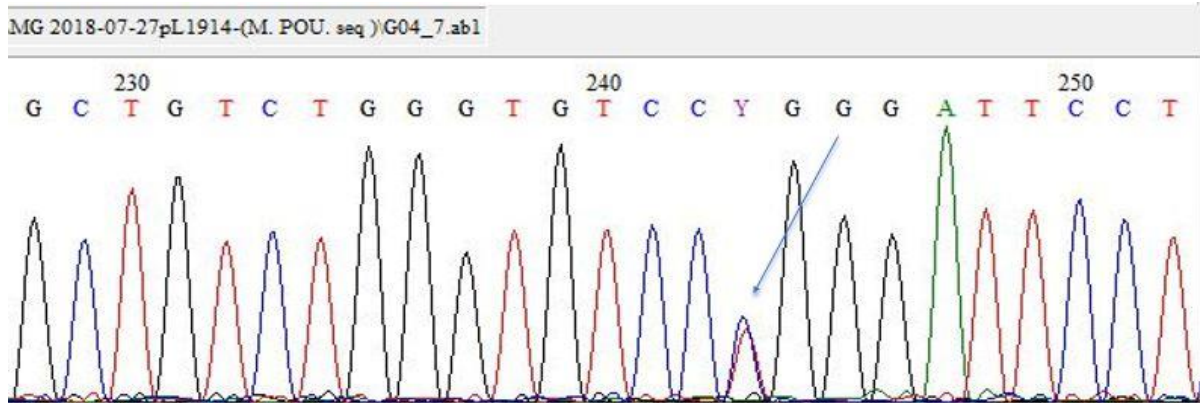
Εικόνα 26: Χρωματογράφημα της αλληλουχίας του εξωνίου 2 (δείγμα 6BM). Με το βέλος σημειώνεται η αλλαγή c.40+64 C>T (rs 756200899) όπως εμφανίζεται στο χρωματογράφημα. Με κόκκινο σημειώνεται η κορυφή που αντιστοιχεί στην βάση T (θυμίνη) και με μπλε η κορυφή που αντιστοιχεί στη βάση C (κυτοσίνη).



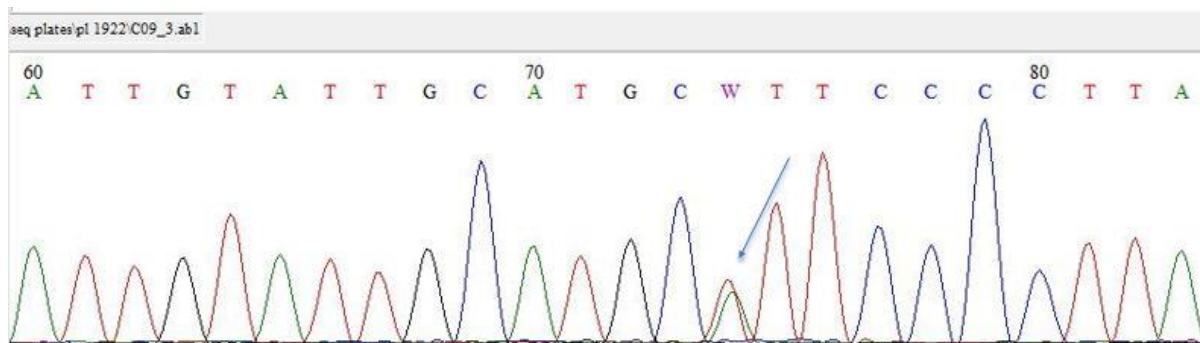
Εικόνα 27: Χρωματογράφημα της αλληλουχίας του εξωνίου 5 (δείγμα 12BM). Με το βέλος σημειώνεται η αλλαγή c.589+41 C>T (rs113962761) όπως εμφανίζεται στο χρωματογράφημα. Με κόκκινο σημειώνεται η κορυφή που αντιστοιχεί στην βάση T (θυμίνη) και με μπλε η κορυφή που αντιστοιχεί στη βάση C (κυτοσίνη).



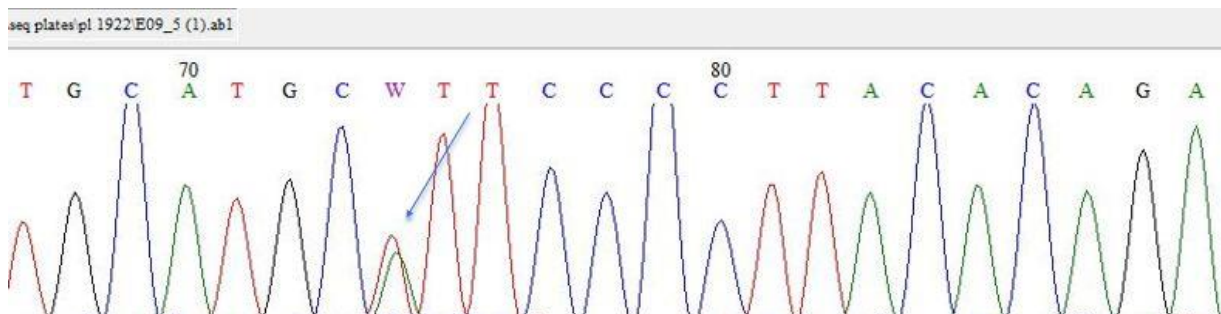
Εικόνα 28: Χρωματογράφημα της αλληλουχίας του εξωνίου 5 (δείγμα 16BM). Με το βέλος σημειώνεται η αλλαγή c.589+41 C>T (rs113962761) όπως εμφανίζεται στο χρωματογράφημα. Με κόκκινο σημειώνεται η κορυφή που αντιστοιχεί στην βάση T (θυμίνη) και με μπλε η κορυφή που αντιστοιχεί στη βάση C (κυτοσίνη).



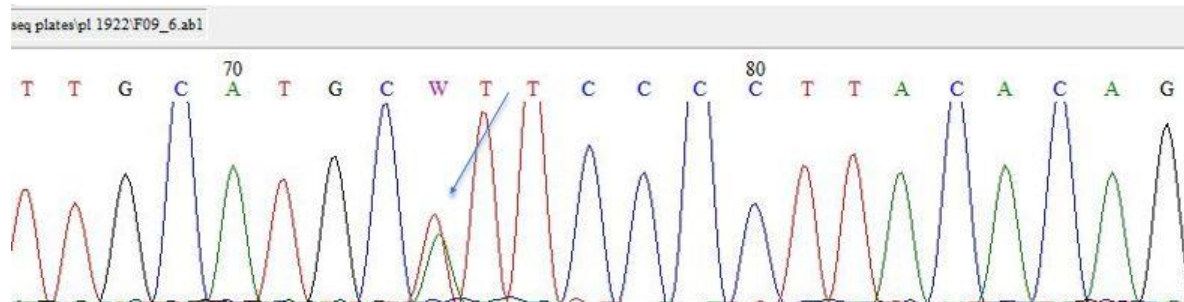
Εικόνα 29: Χρωματογράφημα της αλληλουχίας του εξωνίου 5 (δείγμα 37BM). Με το βέλος σημειώνεται η αλλαγή c.589+41 C>T (rs113962761) όπως εμφανίζεται στο χρωματογράφημα. Με κόκκινο σημειώνεται η κορυφή που αντιστοιχεί στην βάση T (θυμίνη) και με μπλε η κορυφή που αντιστοιχεί στη βάση C (κυτοσίνη).



Εικόνα 30: Χρωματογράφημα της αλληλουχίας του εξωνίου 6 (δείγμα 25BM). Με το βέλος σημειώνεται η αλλαγή c.590-63A>T (rs56278999) όπως εμφανίζεται στο χρωματογράφημα. Με κόκκινο σημειώνεται η κορυφή που αντιστοιχεί στην βάση T (θυμίνη) και με πράσινο η κορυφή που αντιστοιχεί στη βάση C (κυτοσίνη).



Εικόνα 31: Χρωματογράφημα της αλληλουχίας του εξωνίου 6 (δείγμα 37BM). Με το βέλος σημειώνεται η αλλαγή c.590-63A>T (rs56278999) όπως εμφανίζεται στο χρωματογράφημα. Με κόκκινό σημειώνεται η κορυφή που αντιστοιχεί στην βάση T (θυμίνη) και με πράσινο η κορυφή που αντιστοιχεί στη βάση C (κυτοσίνη).



Εικόνα 32: Χρωματογράφημα της αλληλουχίας του εξωνίου 6 (δείγμα 40BM). Με το βέλος σημειώνεται η αλλαγή c.590-63A>T (rs56278999) όπως εμφανίζεται στο χρωματογράφημα. Με κόκκινο σημειώνεται η κορυφή που αντιστοιχεί στην βάση T (θυμίνη) και με πράσινο η κορυφή που αντιστοιχεί στη βάση C (κυτοσίνη).

### 2.3.2 MLPA

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το Coffalyser.Net software.

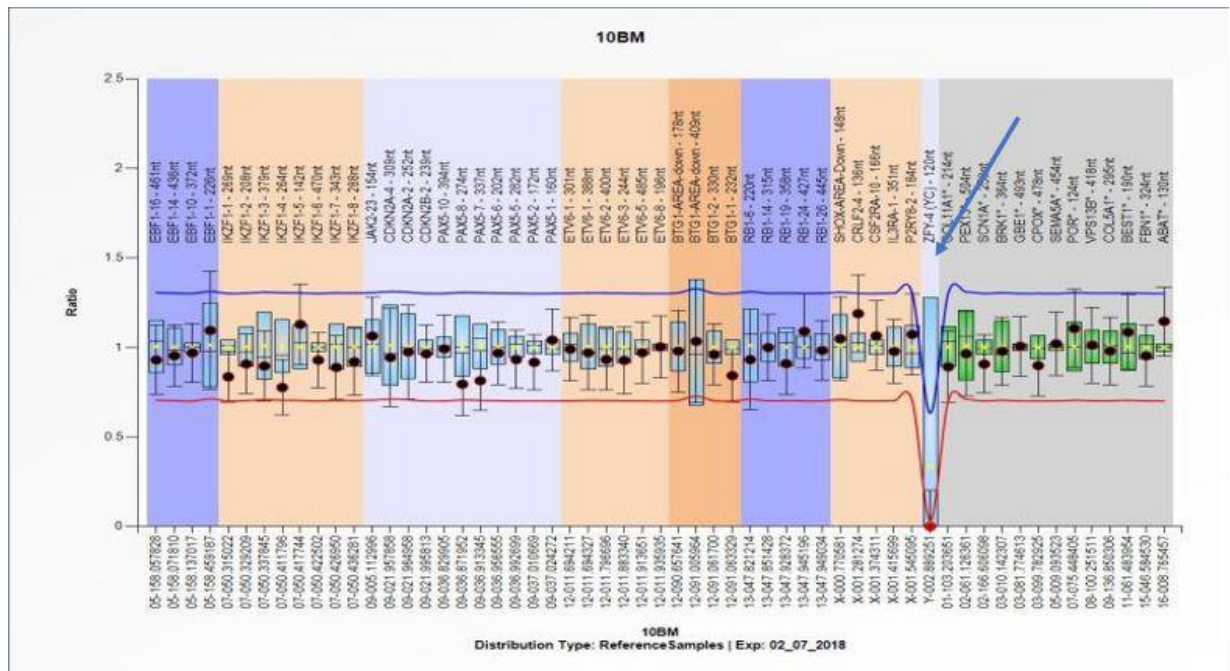
Από τα 20 δείγματα στα 8 δεν βρέθηκε κανένας διπλασιασμός ή έλλειμμα στα γονίδια που εξετάστηκαν. Σε 3 δείγματα βρέθηκαν διπλασιασμοί (1 δείγμα) και ελλείμματα (2 δείγματα) στο γονίδιο Ίκαρος, ενώ στα υπόλοιπα 9 βρέθηκαν ελλείμματα ή διπλασιασμοί σε άλλα γονίδια που εξετάστηκαν, κυρίως στο ETV6 και στο CDKN2 (Πίνακας 11).

Δείγματα	Γονίδια (εξώνια) ελλείμματα	Γονίδια (εξώνια) διπλασιασμοί
1BM	-	-
2BM	CDKN2A(2,4)/CDKN2B(2)/ETV6 (2,3,5,8)	-
6BM	CDKN2A(2,4)/CDKN2B(2)/ETV6 (1<301>,1<388>,2,3,5,8,)/SHOX/CRLF2(4)/CSF2RA(10)/IL3RA(1)/ P2RY8(2)	-
10BM	-	-
11BM	-	-
12BM	IKZF1(1,2,3,4,7, 8)	RB1(6)
13BM	ETV6(1<301>,1<388>,2,3,5,8)	-
14BM	-	-
15BM	RB1(6) / P2RY8(2)	IKZF1 (4)/BTG1
16BM	IKZF1(3)/JAK2(23)/RB1(26)	ETV6(1<388>)/ BTG1(1)/P2RY8(2)
18BM	ETV6 (2)	JAK2(23)/CDKN2A(2,4)/PAX5(1,2,5,6,7,8,10)/SHOX/CRLF2(4)/CSF2RA(10)/IL3RA(1)/P2RY8(2)
19BM	-	SHOX/CRLF2(4)/CSF2RA(10)/IL3RA(1)/P2RY8(2) /ZFY (4)
20BM	-	ETV6(2)
21BM	-	-

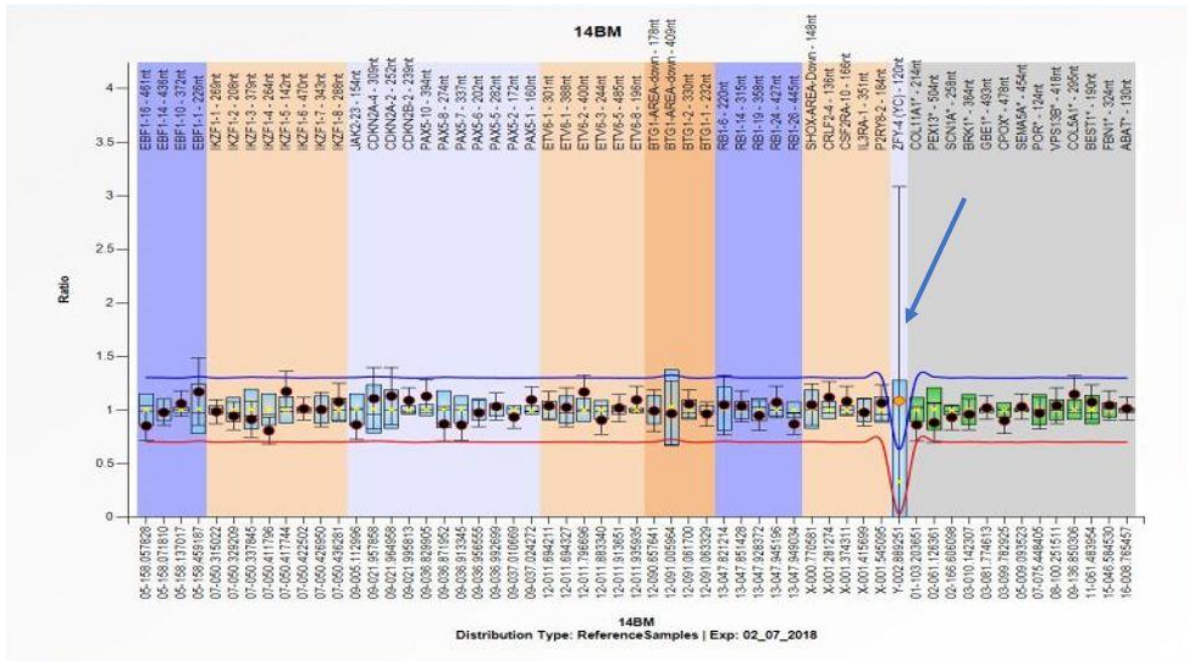


22BM	PAX5(2)	-
L23	CDKN2A(2,4)	-
25BM	JAK2(23)/CDKN2B/PAX5(6,7,8)/RB1(26)	-
31BM	-	-
37BM	-	-
40BM	-	-

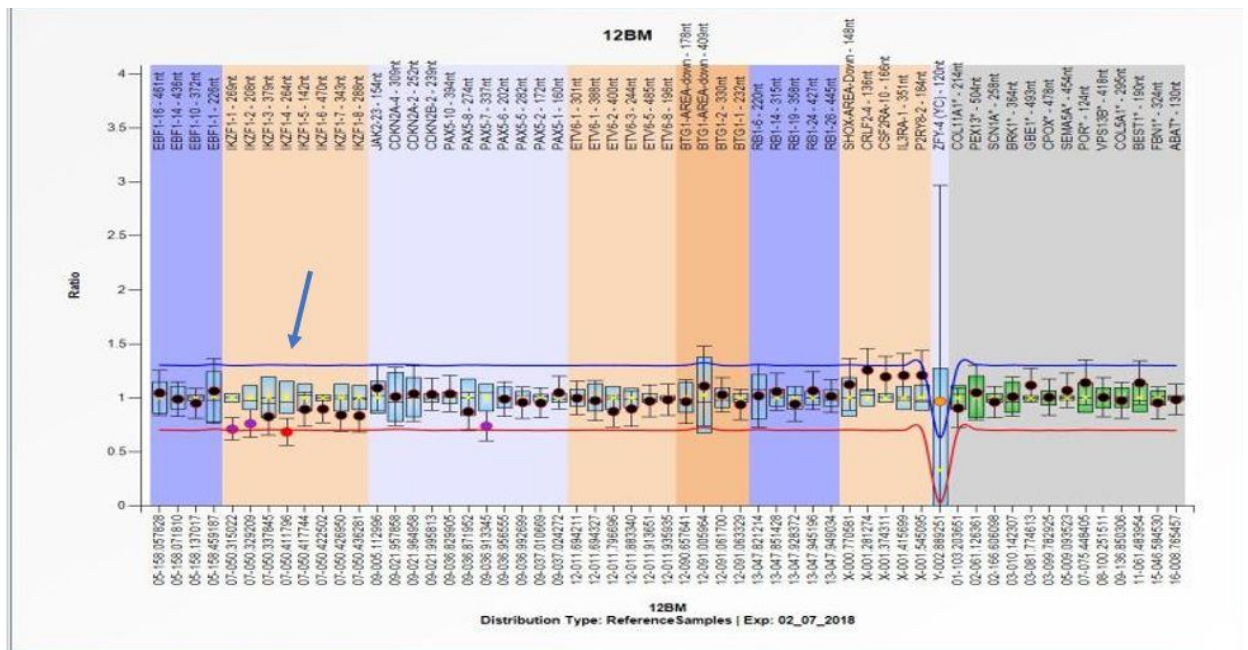
Πίνακας 11: Συγκεντρωτικός πίνακας με τα αποτελέσματα (ελλείματα και διπλασιασμοί) όπως προέκυψαν από την πειραματική διαδικασία του MLPA. Στη πρώτη στήλη εμφανίζεται ο κωδικός των δειγμάτων. Στη δεύτερη στήλη εμφανίζονται τα γονίδια στα οποία εμφανίζονται ελλείματα και στη τρίτη στήλη τα γονίδια όπου εμφανίζονται διπλασιασμοί. Μέσα στην παρένθεση, δίπλα από τα γονίδια αναγράφονται τα εξώνια των γονιδίων στα οποία εμφανίζονται διπλασιασμοί ή ελλείματα. Η παύλα (-) υποδηλώνει ότι δεν εμφανίστηκαν ελλείματα ή διπλασιασμοί στα γονίδια που εξετάστηκαν.



Εικόνα 33: Διαγραμματική απεικόνιση όπως εμφανίζεται στο coffalyser ένα άτομο (10BM) που δεν παρουσιάζει ελλείματα ή διπλασιασμούς στα εξεταζόμενα γονίδια. Το έλλειμα που εμφανίζεται στο ZFY.4 (σημειώνεται με βέλος) υποδεικνύει ότι το άτομο είναι θηλυκό.



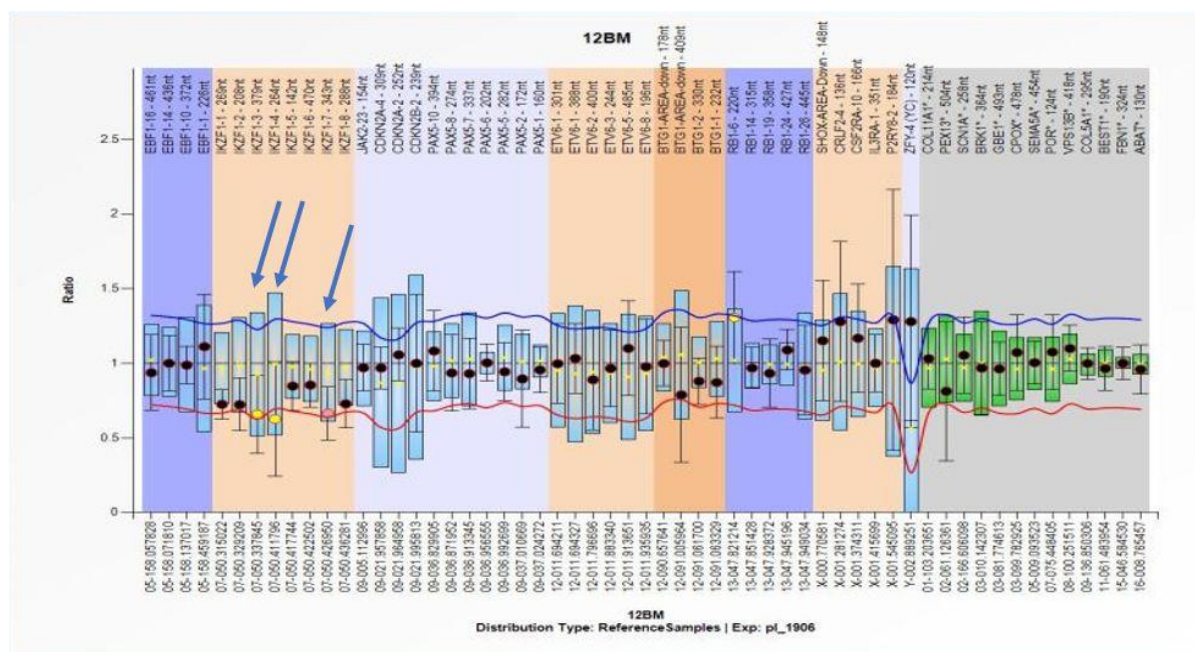
Εικόνα 34: Διαγραμματική απεικόνιση όπως εμφανίζεται στο coffalyser ένα άτομο (14BM) που δεν παρουσιάζει ελλείματα ή διπλασιασμούς στα εξεταζόμενα γονίδια. Στο ZFY.4 δεν παρουσιάζεται έλλειμα (σημειώνεται με βέλος) γεγονός το οποίο υποδεικνύει ότι το άτομο είναι αρσενικό.



Εικόνα 35: Διαγραμματική απεικόνιση όπως εμφανίζεται στο coffalyser ένα άτομο (12BM) που παρουσιάζει έλλειμα στο γονίδιο IKZF1 στο εξώνιο 4 (σημειώνεται με βέλος).

D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio <sup>H</sup>	Stdev
461	EBF1-16	05q33.3	05-158.057828	2310	15435	1.05	0.1
436	EBF1-14	05q33.3	05-158.071810	3968	26055	0.99	0.08
372	EBF1-10	05q33.3	05-158.137017	4353	25875	0.95	0.07
226	EBF1-1	05q33.3	05-158.459187	6346	29784	1.06	<b>0.15</b>
269	IKZF1-1	07p12.2	07-050.315022	3252	15816	0.71	0.05
208	IKZF1-2	07p12.2	07-050.329209	4295	19270	0.76	0.06
379	IKZF1-3	07p12.2	07-050.337845	2928	17289	0.83	0.09
264	IKZF1-4	07p12.2	07-050.411796	2693	12950	<b>0.69</b>	0.06
142	IKZF1-5	07p12.2	07-050.417744	5140	25235	0.9	0.08
470	IKZF1-6	07p12.2	07-050.422502	3034	20978	0.9	0.06
343	IKZF1-7	07p12.2	07-050.426950	4070	21955	0.84	0.08
288	IKZF1-8	07p12.2	07-050.436281	4854	23672	0.84	0.07

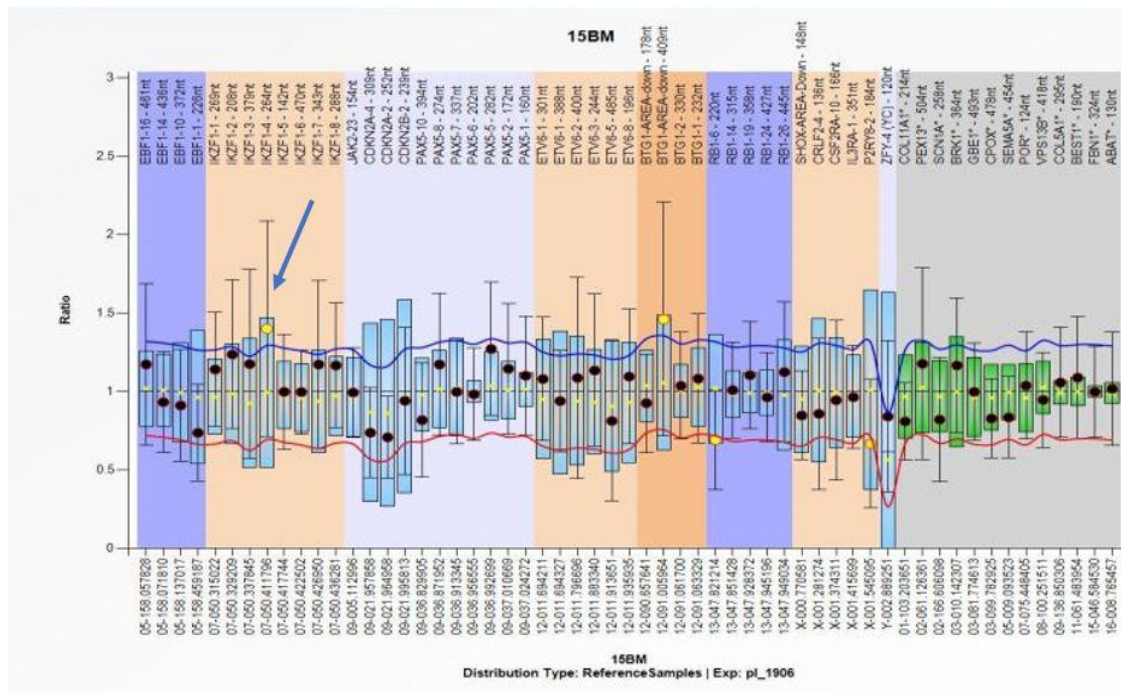
Πίνακας 12: Τιμές DQ όπως υπολογίζονται από το coffalyser. Εμφανίζονται οι τιμές του DQ για τα γονίδια EBF και IKZF1 (Ratio<sup>H</sup>) του δείγματος 12BM (πείραμα 1). Οι τιμές που αναμένονται για το ετερόζυγο έλλειμμα είναι  $0.40 < DQ < 0.65$ . Η τιμή που σημειώνεται με βέλος στο εξώνιο 4 του γονιδίου IKZF1 είναι οριακή (αμφίβολου αριθμός αντιγράφων). Για τα εξώνια 3, 5, 6, 7 και 8 η τιμή που εμφανίζεται υποδηλώνει φυσιολογικό αριθμό αντιγράφων (φυσιολογικές τιμές  $0,80 < DQ < 1,20$ ). Οι τιμές της τυπικής απόκλισης (standard deviation- Stdev) είναι μικρότερη από 0,10.



Εικόνα 36: Διαγραμματική απεικόνιση όπως εμφανίζεται στο coffalyser ένα άτομο (12BM -επανάληψη) που παρουσιάζει ελλείματα στο γονίδιο IKZF1 στα εξώνια 3, 4 και 7 (σημειώνονται με βέλος).

D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio <sup>H</sup>	Stdev
461	EBF1-16	05q33.3	05-158.057828	2917	18334	0.94	<b>0.13</b>
436	EBF1-14	05q33.3	05-158.071810	5649	34256	1	0.09
372	EBF1-10	05q33.3	05-158.137017	6057	33879	0.99	0.06
226	EBF1-1	05q33.3	05-158.459187	8208	39589	1.11	<b>0.18</b>
269	IKZF1-1	07p12.2	07-050.315022	4710	22614	0.72	0.05
208	IKZF1-2	07p12.2	07-050.329209	5537	25885	0.72	0.09
379	IKZF1-3	07p12.2	07-050.337845	3798	21550	<b>0.66</b>	<b>0.13</b>
264	IKZF1-4	07p12.2	07-050.411796	3406	17085	<b>0.63</b>	<b>0.19</b>
142	IKZF1-5	07p12.2	07-050.417744	7482	34245	0.85	0.08
470	IKZF1-6	07p12.2	07-050.422502	4156	26826	0.85	0.07
343	IKZF1-7	07p12.2	07-050.426950	5279	28154	<b>0.66</b>	0.09
288	IKZF1-8	07p12.2	07-050.436281	6115	30614	0.73	0.08

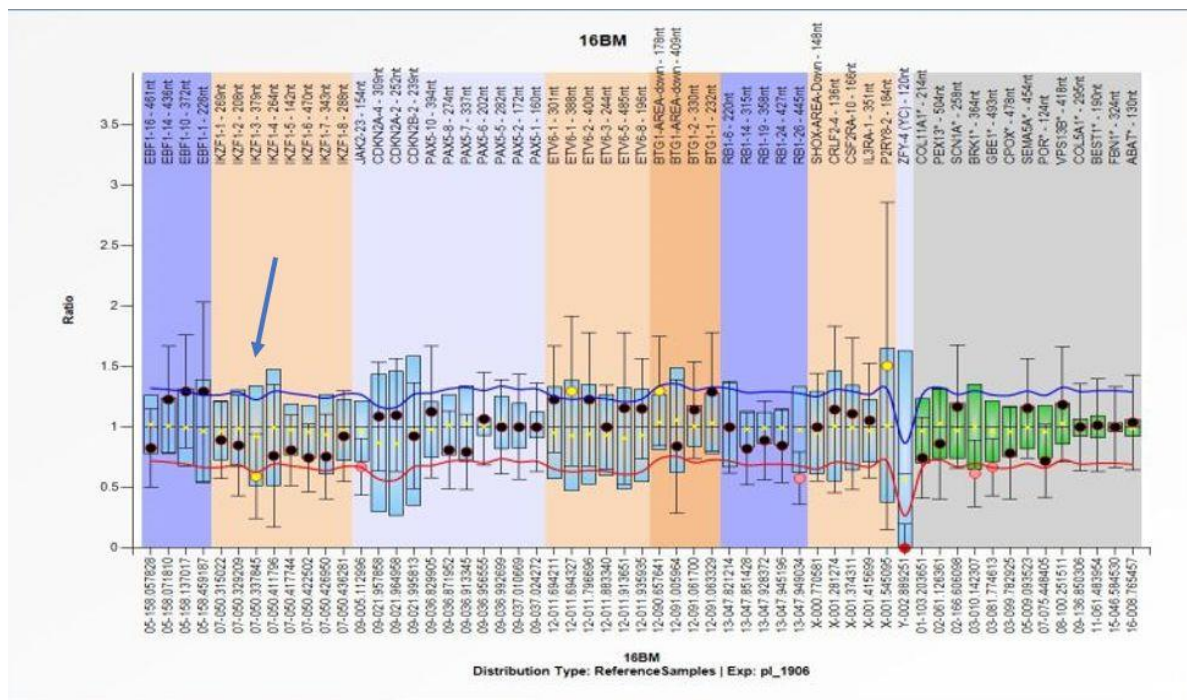
Πίνακας 13: Τιμές DQ όπως υπολογίζονται από το coffalyser. Εμφανίζονται οι τιμές του DQ για τα γονίδια EBF και IKZF1 (Ratio<sup>H</sup>) του δείγματος 12 BM (πείραμα 2). Οι τιμές που αναμένονται για το ετερόζυγο έλλειμμα είναι  $0.40 < DQ < 0.65$ . Η τιμή που σημειώνεται με βέλος (μπλε χρώματος) στο εξώνιο 4 του γονιδίου IKZF1 υποδηλώνει έλλειμμα (ωστόσο το Stdev > 0,10). Για τα εξώνια 3 και 7 η τιμή που εμφανίζεται (σημειώνεται με βέλος κόκκινου χρώματος) είναι οριακή (αμφίβολος αριθμός αντιγράφων).



Εικόνα 37: Διαγραμματική απεικόνιση όπως εμφανίζεται στο coffalyser ένα άτομο (15BM) που παρουσιάζει διπλασιασμό στο γονίδιο IKZF1 στο εξώνιο 4 (σημειώνεται με βέλος).

D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio <sup>H</sup>	Stdev
461	EBF1-16	05q33.3	05-158.057828	2516	16010	1.17	0.26
436	EBF1-14	05q33.3	05-158.071810	3701	22085	0.93	0.16
372	EBF1-10	05q33.3	05-158.137017	4051	22566	0.91	0.18
226	EBF1-1	05q33.3	05-158.459187	4388	21626	0.74	0.15
269	IKZF1-1	07p12.2	07-050.315022	5806	28616	1.14	0.18
208	IKZF1-2	07p12.2	07-050.329209	7523	34820	1.24	0.24
379	IKZF1-3	07p12.2	07-050.337845	5237	29331	1.18	0.3
264	IKZF1-4	07p12.2	07-050.411796	6396	31081	1.4	0.34
142	IKZF1-5	07p12.2	07-050.417744	7563	35324	1	0.18
470	IKZF1-6	07p12.2	07-050.422502	3319	21672	1	0.13
343	IKZF1-7	07p12.2	07-050.426950	7181	38339	1.17	0.27
288	IKZF1-8	07p12.2	07-050.436281	7583	38225	1.17	0.2

Πίνακας 14: Τιμές DQ όπως υπολογίζονται από το *coffalyser*. Εμφανίζονται οι τιμές του DQ για τα γονίδια EBF και IKZF1 (Ratio<sup>H</sup>) του δείγματος 16 BM. Οι τιμές που αναμένονται για το ετερόζυγο διπλασιασμό είναι  $1.30 < DQ < 1.65$ . Η τιμή που σημειώνεται με βέλος (μπλε χρώματος) στο εξώνιο 4 του γονιδίου IKZF1 υποδηλώνει διπλασιασμό. Οι τιμές της τυπικής απόκλισης (standard deviation- Stdev) είναι μικρότερη από 0,10.



Εικόνα 38: Διαγραμματική απεικόνιση όπως εμφανίζεται στο *coffalyser* ένα άτομο (16BM) που παρουσιάζει έλλειμα στο γονίδιο IKZF1 στο εξώνιο 3 (σημειώνεται με βέλος).

D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio <sup>H</sup>	Stdev
461	EBF1-16	05q33.3	05-158.057828	890	5409	0.83	0.16
436	EBF1-14	05q33.3	05-158.071810	2608	15286	1.23	0.22
372	EBF1-10	05q33.3	05-158.137017	3471	19069	1.29	0.23
226	EBF1-1	05q33.3	05-158.459187	6122	27792	1.29	0.37
269	IKZF1-1	07p12.2	07-050.315022	3325	15436	0.89	0.16
208	IKZF1-2	07p12.2	07-050.329209	4260	18618	0.85	0.21
379	IKZF1-3	07p12.2	07-050.337845	1443	8438	0.59	0.18
264	IKZF1-4	07p12.2	07-050.411796	2391	11454	0.76	0.3
142	IKZF1-5	07p12.2	07-050.417744	5811	25598	0.81	0.15
470	IKZF1-6	07p12.2	07-050.422502	1223	7686	0.75	0.14
343	IKZF1-7	07p12.2	07-050.426950	2783	14163	0.76	0.17
288	IKZF1-8	07p12.2	07-050.436281	4181	20748	0.92	0.19

Πίνακας 15: Τιμές DQ όπως υπολογίζονται από το *coffalyser*. Εμφανίζονται οι τιμές του DQ για τα γονίδια EBF και IKZF1 (Ratio<sup>H</sup>) του δείγματος 15 BM. Οι τιμές που αναμένονται για το ετερόζυγο έλλειμμα είναι  $0,40 < DQ < 0,65$ . Η τιμή που σημειώνεται με βέλος (μπλε χρώματος) στο εξώνιο 3 του γονιδίου IKZF1 υποδηλώνει έλλειμμα. Οι τιμές της τυπικής απόκλισης (standard deviation- Stdev) είναι ωστόσο μεγαλύτερη από 0,10. Για τα εξώνια 4, 6 και 7 ο αριθμός των αντιγράφων εμφανίζεται αμφίβολος με τιμές της τυπικής απόκλισης (standard deviation- Stdev) μεγαλύτερη από 0,10.

## 2.4 Συμπεράσματα

Με τη μέθοδο της αλληλούχισης στα 20 δείγματα δεν βρέθηκε κάποια μετάλλαξη που να αφορά σε περιοχή των εξωνίων ή σε περιοχή ματίσματος. Ωστόσο σύμφωνα με μία μελέτη σε ποντίκια η οποία δημοσιεύτηκε το 2018, ο πολυμορφισμός που βρέθηκε, rs113962761 (Εξώνιο 5: c.589+41 C>T), φαίνεται ότι ειδικά σε συνδυασμό με τους πολυμορφισμούς rs4589708 και rs1050171, μπορεί να οδηγεί σε ανθεκτικότητα έναντι της φαρμακευτικής αγωγής με ADR (adriamycin-αδριαμυκίνη) (36). Ωστόσο στα δείγματα μας δεν ανιχνεύθηκε η συνύπαρξη των πολυμορφισμών καθώς δεν εξετάστηκαν (ο πολυμορφισμός rs4589708 αφορά το χρωμόσωμα 2- 2:29275294-29275394 γονίδιο *ALK* και ο πολυμορφισμός rs1050171 αφορά το χρωμόσωμα 7 - 7:55181320-55181420 γονίδιο *EGFR-AS1*).

Τα ελλείματα στο *IKZF1* μπορούν να ανιχνευθούν στο 70% περίπου των παιδιατρικών ασθενών με *BCR-ABL1* (χρωμόσωμα Φιλαδέλφεια Ph+) ALL, στο 10-15% των αρνητικών για το χρωμόσωμα Φιλαδέλφεια (Ph-) ALL και στο 40-75% των ενήλικων BCP-ALL (B-cell Precursor Acute lymphoblastic

Leukemia) περιπτώσεων. Τα ελλείμματα στο *IKZF1* αφορούν είτε ολόκληρο το γονίδιο (25-50% όλων των ελλείψεων) ή μικρά ελλείμματα (intragenic deletions) με πιο συχνά ελλείμματα στα εξώνια 4-7 το οποίο αποτελεί και το 30-55% των ελλείψεων (20).

Η ευαισθησία και ειδικότητα για την ανίχνευση των ελλείψεων ή των διπλασιασμών στο *IKZF1* γονίδιο είναι πολύ υψηλή και θεωρείται >99%. Η απόδοση μπορεί να μειωθεί λόγω: SNPs (single nucleotide polymorphisms) ή άλλων πολυμορφισμών (για παράδειγμα ενθέσεις) στην αλληλουχία του DNA, μη ικανοποιητική καθαρότητα του δείγματος DNA, όχι επαρκής αποδιάταξη του DNA, η υπερβολική ή ανεπαρκής ποσότητα του DNA, η χρήση ανεπαρκούς ή ακατάλληλων δειγμάτων αναφοράς, προβλήματα με την ηλεκτροφόρηση μέσω των τριχοειδών (capillary electrophoresis) ή ανεπαρκή δεδομένα κατά τη διαδικασία της κανονικοποίησης και άλλα τεχνικά προβλήματα (20).

Η τυπική απόκλιση (standard deviation) για όλους τους ιχνηθέτες στα δείγματα αναφοράς θα πρέπει να είναι <0.10. Όταν αυτό το κριτήριο ισχύει τότε το κατώφλι για τις τιμές (cut-off values) DQ (dosage quotient-δοσολογικό πηλίκο) των ιχνηθετών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων του MLPA για τα αυτοσωμικά και ψεύδο-αυτοσωμικά (pseudo-autosomal) χρωμοσώματα (πίνακας 16) (20).

Κατάσταση αριθμού αντιγράφων	Dosage quotient
Φυσιολογικό	0.80<DQ<1.20
Ομόζυγο έλλειμμα	DQ=0
Ετερόζυγο έλλειμμα	0.40<DQ<0.65
Ετερόζυγος διπλασιασμός	1.30<DQ<1.65
Ετερόζυγος τριπλασιασμός/ ομόζυγος διπλασιασμός	1.75<DQ<2.15
Αμφίβολος αριθμός αντιγράφων	λουπές τιμές

**Πίνακας 16: Αντιστοίχιση της τιμής DQ με τον αριθμό των αντιγράφων στο MLPA ([www.mlpa.com](http://www.mlpa.com)).**

Είναι απόλυτα απαραίτητο να σημειωθεί ότι η τιμή DQ μπορεί να επηρεαστεί τόσο από το ποσοστό των καρκινικών κυττάρων και την πιθανή υποκλωνικότητα. Στην περίπτωση της υποκλωνικότητας σε ετερόζυγες ελλείψεις καθώς και σε χαμηλό ποσοστό καρκινικών κυττάρων, η τιμή DQ δεν θα φτάσει το 0.5. Για παράδειγμα στην περίπτωση που υπάρχουν 50% καρκινικά κύτταρα ή που το 50% των καρκινικών κυττάρων περιέχουν μία μεταλλαγή στον αριθμό των αντιγράφων (υποκλωνικότητα) η τιμή DQ θα είναι 0.75. Ωστόσο η ίδια τιμή DQ (0.75) θα βρεθεί και στην περίπτωση που το δείγμα περιέχει 25% κυτταρικών κυττάρων ή ένας κλώνος που αποτελεί το 25% όλων των καρκινικών κυττάρων και φιλοξενεί μία ομόζυγη έλλειψη. Η τεχνική του MLPA λοιπόν δεν μπορεί να διακρίνει μεταξύ αυτών των δύο περιπτώσεων (20).

Οι τιμές DQ που προέκυψαν για το γονίδιο του *IKZF1* από τα πειράματα ήταν (Πίνακας 17 οι δύο τιμές στο δείγμα 12 BM αντιπροσωπεύουν τα δύο πειράματα):

Δείγμα	Εξώνιο IKZF1	Τιμή DQ
12BM	1	0.71/0.72
	2	0.76/0.72
	3	0.83/0.66
	4	0.69/0.63
	7	0.84/0.66
15BM	4	1.4
16BM	3	0.59

**Πίνακας 17: Αντιστοίχιση της τιμής DQ με τα εξεταζόμενα δείγματα όπως προέκυψαν από την πειραματική διαδικασία.**

Σύμφωνα με τα παραπάνω φαίνεται ότι τα αποτελέσματα που αφορούν τα δείγματα 15BM και 16BM δεν αποτελούν οριακές τιμές (δείγμα 15BM:  $DQ=1.4$  όταν οι τιμές που αναμένονται για τον ετερόζυγο διπλασιασμό είναι  $1.30 < DQ < 1.65$  και για το δείγμα 16BM:  $DQ=0.59$  όταν οι τιμές που αναμένονται για το ετερόζυγο έλλειμμα είναι  $0.40 < DQ < 0.65$ ) και οπότε μάλλον όντως υφίσταται ένας διπλασιασμός και ένα έλλειμμα αντίστοιχα σε αυτά τα δείγματα.

Για το δείγμα 12BM, είναι θετική η ένδειξη ότι παρουσιάζονται ελλείμματα σε περισσότερα από ένα εξώνια, ωστόσο οι τιμές είναι οριακές (με εξαίρεση τη τιμή  $DQ=0.63$  στο εξώνιο 4 της επανάληψης) και τα αποτελέσματα δεν συμφωνούν απόλυτα μεταξύ της πρώτης φοράς και του επαναληπτικού πειράματος. Έτσι για τα εξώνια 3 και 7 εμφανίζεται την πρώτη φορά ως φυσιολογικά (0.83 και 0.84 αντίστοιχα με εύρος τιμής DQ για τα φυσιολογικά δείγματα να θεωρείται το  $0.80 < DQ < 1.20$ ) και στο επαναληπτικό πείραμα ως οριακά με ετερόζυγο έλλειμμα (τιμή 0.66 όταν εύρος για το ετερόζυγο έλλειμμα είναι  $0.40 < DQ < 0.65$ ). Ως εκ τούτου μάλλον θα πρέπει να θεωρηθεί ως αμφίβολος αριθμός αντιγράφων και να διερευνηθεί περισσότερο ίσως και με συμπληρωματική μεθοδολογία.

Στους περιορισμούς της μεθόδους συμπεριλαμβάνονται ότι δεν μπορούν να εντοπιστούν οι μικρές σημειακές μεταλλάξεις, οι οποίες αν και πιο σπάνιες από τα ελλείμματα υφίστανται. Επίσης στη μέθοδο MLPA δεν μπορούν να ανιχνευθούν εξαλλαγές οι οποίες βρίσκονται έξω από την αλληλουχία στόχο των ιχνηθετών καθώς επίσης δεν θα ανιχνευθούν μετατοπίσεις ή αναστροφές. Ακόμα και αν η μέθοδος MLPA δεν ανιχνεύσει κάποια ανωμαλία, η πιθανότητα να υφίστανται εξαλλαγές στο γονίδιο ή στο χρωμόσωμα παραμένει, οι οποίες παραμένουν μη ανιχνεύσιμες. Αλλαγές στην αλληλουχία στόχο (για παράδειγμα SNPs, σημειακές μεταλλάξεις, μικρές ενθέσεις) που αναγνωρίζεται από τους ιχνηθέτες μπορεί να προκαλέσει ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Μεταλλάξεις και SNPs, ακόμα και όταν βρίσκονται σε



απόσταση 20 νουκλεοτιδίων από την περιοχή σύνδεσης με λιγάση του ανιχνευτή (probe ligation site) μπορεί να επιφέρει μείωση στο σήμα του, καθώς μπορεί να αποτρέψει την σύνδεση των ολιγονουκλεοτιδίων των ιχνηθετών ή αποσταθεροποιώντας την πρόσδεση των ολιγονουκλεοτιδίων των ιχνηθετών στο δείγμα του DNA (20).

Η μέθοδος MLPA σε καρκινικά δείγματα παρέχει πληροφορίες για το μέσο όρο των κυττάρων από τα οποία προήλθε το DNA. Κέρδη ή απώλειες γενωμικών περιοχών ή γονιδίων μπορεί και να μην ανιχνευθούν αν το ποσοστό των καρκινικών κυττάρων είναι πολύ χαμηλό. Επιπροσθέτως η υποκλωνικότητα επηρεάζει την τελική αναλογία των ανταποκρινόμενων ιχνηθετών. Επιπλέον, υπάρχει πάντα η πιθανότητα ότι ένας ή περισσότεροι ιχνηθέτες αναφοράς δείχνουν μία εξαλλαγή στον αριθμό των αντιγράφων στο δείγμα (20).

Ως εκ τούτου για την επικύρωση των αποτελεσμάτων στον αριθμό των αντιγράφων που ανιχνεύονται από έναν και μόνο ιχνηθέτη, πάντα θα πρέπει να υπάρχει επιβεβαίωση από μία άλλη μέθοδο. Ένα έλλειμμα που έχει ανιχνευθεί από ένα και μόνο ιχνηθέτη μπορεί να είναι εσφαλμένο και να οφείλεται για παράδειγμα σε μία μετάλλαξη ή πολυμορφισμό ο οποίος εμποδίζει την σύνδεση με λιγάση ή αποσταθεροποιεί την πρόσδεση των ιχνηθετών στο DNA. Η ανάλυση με αλληλούχιση μπορεί να επιβεβαιώσει κατά πόσο υπάρχουν μεταλλάξεις ή πολυμορφισμοί στη περιοχή της αλληλουχίας στόχου. Το εύρημα μία ετερόζυγης μετάλλαξης ή πολυμορφισμού υποδεικνύει ότι δύο διαφορετικά αλληλία της αλληλουχίας υφίστανται στο δείγμα το οποίο οδήγησε σε ένα ψευδώς θετικό αποτέλεσμα με τη μέθοδο της MLPA (20).

Οι αλλαγές στον αριθμό των αντιγράφων που ανιχνεύονται με ένα ή περισσότερους διαδοχικούς ιχνηθέτες μπορούν να επιβεβαιωθούν από άλλη ανεξάρτητη τεχνική όπως για παράδειγμα με long-range PCR, qPCR, array-CGH ή Southern blotting (20).

Ελλείμματα και διπλασιασμοί που είναι μεγαλύτερα των 50kb μπορούν συχνά να επιβεβαιωθούν με τη μέθοδο FISH (20).

Όσον αφορά το γονίδιο *IKZF1* οι αλλαγές στον αριθμό αντιγράφων μπορεί επίσης να επιβεβαιωθεί με τη χρήση του SALSA MLPA Probemix P202 IKZF1 (IKAROS) το οποίο περιέχει επιπρόσθετους ιχνηθέτες για κάθε εξώνιο του γονιδίου *IKZF1* (20).

Από τα 20 δείγματα στα 8 δεν βρέθηκε κάποια αλλαγή στον αριθμό των αντιγράφων στα γονίδια που εξετάστηκαν. Σε 3 δείγματα βρέθηκαν διπλασιασμοί (1 δείγμα) και ελλείμματα (2 δείγματα) στο γονίδιο Ίκαρος (και ταυτόχρονα και σε άλλα γονίδια), ενώ στα υπόλοιπα 9 βρέθηκαν ελλείμματα ή διπλασιασμοί στα υπόλοιπα γονίδια που εξετάστηκαν και όχι στο γονίδιο Ίκαρος.

Σύμφωνα με τους Stanulla et. al., στην περίπτωση που τα ελλείμματα στο *IKZF1* συνυπάρχουν με ελλείμματα στο *CDKN2A*, *CDKN2B*, *PAX5* ή *PAR1* (*CRLF2*, *CSF2RA*, *IL3RA*) και απουσία ελλειμμάτων στο *ERG*, υπάρχει η χειρότερη πρόγνωση και αναφέρεται ως *IKZF1<sup>plus</sup>*. Η *IKZF1<sup>plus</sup>* περιγράφει μια νέα MRD (Minimal Residual Disease)- εξαρτώμενη με πολύ κακή πρόγνωση στην BCP ALL (B cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia) (37). Ωστόσο αυτός ο συνδυασμός δεν προέκυψε από τη παρούσα μελέτη των 20 δειγμάτων όπου τα ελλείμματα στο *IKZF1* συνοδεύονταν από διπλασιασμό στο RB1 (δείγμα 12BM) ή έλλειμμα στο JAK2 και RB1 (δείγμα 16BM) και αντίστοιχα όταν υπήρχαν ελλείμματα στα γονίδια *CDKN2A*, *CDKN2B* και στη περιοχή PAR1 (δείγμα 6BM) δεν ανιχνεύθηκε έλλειμμα στο *IKZF1*.

ΔΕΙ-ΓΜΑ	ΦΥ-ΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ	ΕΚΒΑΣΗ	ΕΛΛΕΙΜΑΤΑ IKZF	ΔΙΠΛΑΣΙΑΣΜΟΙ IKZF	ΕΛΛΕΙΜΑΤΑ ΣΕ ΑΛΛΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΕΞΕΤΑΣΤΗΚΑΝ	ΔΙΠΛΑΣΙΑΣΜΟΙ ΣΕ ΑΛΛΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΕΞΕΤΑΣΤΗΚΑΝ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ
1BM	M	2	Ύφεση					
2BM	M	7	Ύφεση			CDKN2A(2,4)/ CDKN2B(2)/ ETV6 (2,3,5,8)		
6BM	F	12	Ύφεση			CDKN2A(2,4)/ CDKN2B(2)/ ETV6(1<301>, 1<388>,2,3,5,8)/ SHOX/CRLF2(4)/ CSF2RA(10)/ IL3RA(1)/ P2RY8(2)		c.40+6 C>T
10BM	F	5	Ύφεση					
11BM	M	1	Ύφεση					
12BM	M	5	Ύφεση	IKZF1(1, 2,3,4,7, 8)			RB1(6)	c.589+41C>T
13BM	F	3	Ύφεση			ETV6(1<301>, 1<388>,2,3,5,8)		
14BM	M	7	Ύφεση					
15BM	M	NA	Απεβίωσε		IKZF1 (4)	RB1(6) / P2RY8(2)	BTG1	
16BM	F	10	Ύφεση	IKZF1(3)		JAK2(23)/	ETV6(1<388>)/	c.589+41C>T

						RB1(26)	BTG1(1)/ P2RY8(2)	
18BM	M	4	Ύφεση			ETV6 (2)	JAK2(23)/ CDKN2A(2,4)/ PAX5(1,2,5,6, 7,8,10)/ SHOX/ CRLF2(4)/ CSF2RA(10)/ IL3RA(1)/ P2RY8(2)	
19BM	M	4	Ύφεση				SHOX/ CRLF2(4)/ CSF2RA(10)/ IL3RA(1)/ P2RY8(2) /ZFY (4)	
20BM	F	3	Ύφεση				ETV6(2)	
21BM	M	14	Ύφεση					
22BM	F	5	Ύφεση			PAX5(2)		
23BM	F	5	Ύφεση			CDKN2A(2,4)		
25BM	M	5	Υποτροπή			JAK2(23)/ CDKN2B/ PAX5(6,7,8)/ RB1(26)		c.590-63A>T
31BM	M	8	Ύφεση					
37BM	F	11	Ύφεση					c.589+41C>T και c.590-63A>T
40BM	F	12	Απεβίωσε					c.590-63A>T

**Πίνακας 18:** Συγκεντρωτικές πληροφορίες των δειγμάτων που εξετάστηκαν. Σημειώνεται ο κωδικός του δείγματος, το φύλο του, η ηλικία που διαγνώστηκε με B-ALL, η εξέλιξη της νόσου καθώς και τα πειραματικά αποτελέσματα του MLPA και της αλληλούχισης (στις στήλες με τους διπλασιασμούς και τα ελλείματα σημειώνονται τα γονίδια και μέσα στην παρένθεση, δίπλα από τα γονίδια αναγράφονται τα εξώνια των γονιδίων στα οποία εμφανίζονται διπλασιασμοί ή ελλείματα).

Ο αριθμός των δειγμάτων που εξετάστηκαν είναι πολύ μικρός ώστε να αποτελέσουν αντικείμενο στατιστικής επεξεργασίας ωστόσο μπορούν να γίνουν κάποιες πρόχειρες συγκρίσεις με τις βιβλιογραφικές αναφορές.

Φαίνεται ότι όντως τα αγόρια είναι ελαφρώς περισσότερα από τα κορίτσια χωρίς ωστόσο να είναι τόσο μεγάλη η διαφορά μεταξύ τους (9 κορίτσια έναντι 11 αγοριών) και ο μέσος όρος ηλικίας διάγνωσης της νόσου είναι τα 6,5 έτη (min:1 έτος και max:14 έτη).

Σε δύο περιπτώσεις η έκβαση της νόσου δεν ήταν θετική (θάνατος). Στη μία εξ αυτών συνυπήρχε μετάλλαξη στο γονίδιο ίκαρος (διπλασιασμός του εξωνίου 4 στο δείγμα 15BM) και στη δεύτερη συνυπήρχε σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο ίκαρος (πολυμορφισμός c.590-63A>T rs56278999 στο δείγμα 40BM). Επιπλέον σε μία περίπτωση σημειώθηκε υποτροπή και ανευρέθηκε πολυμορφισμός στο γονίδιο (δείγμα 25BM/ πολυμορφισμός c.590-63A>T rs56278999). Ωστόσο ο πολυμορφισμός c.590-63A>T rs56278999 παρόλο που απαντά σε δύο περιπτώσεις με κακή πρόγνωση, απαντάει και σε περίπτωση ύφεσης (δείγμα 37BM) και απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση.

Σαφέστατα από τα αποτελέσματα διαφαίνεται η ανάγκη χρήσης περισσότερων των δύο μεθόδων καθώς κάθε μέθοδος εστιάζει σε διαφορετικά σημεία καθώς και η περαιτέρω διερεύνηση με περισσότερα δείγματα καθώς και χρήση περισσότερων μεθόδων και έλεγχος περισσότερων γονιδίων για τον έλεγχο πιθανής αλληλεπίδρασης και συνέργιας μεταξύ μεταλλάξεων άλλων γονιδίων με μεταλλάξεις στο γονίδιο ίκαρος.

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
Hematopoietic Stem Cell	αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα
lymphoid progenitor cell	λεμφοειδές προγονικό κύτταρο
myeloid progenitor cell	μυελοειδές προγονικό κύτταρο
Natural Killers	φυσικά φονικά κύτταρα
stromal cells	στρωματικά κύτταρα
Acute Lymphoblastic Leukemia	οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία
Acute Myeloid leukemia	οξείες μυελογενής λευχαιμία
Pharmacodynamics	Φαρμακοδυναμική
Pharmacogenomics	Φαρμακογενομική
minimal residual disease	ελάχιστη υπολειματική νόσος
lymphoblastic lymphomas	λεμφοβλαστικά λεμφώματα
mixed lineage leukemia translocation	μετάθεση λευχαιμιών μικτής γραμμής
single nucleotide polymorphism arrays	χρήση μικροσυστοιχειών με ανιχνευτές πολυμορφικών θέσεων
fusion genes	συντηγμένα γονίδια
T-cell receptor	υποδοχέας των T-κυττάρων
Ph <sup>+</sup> positive lymphoid leukemia	Ph <sup>+</sup> θετική λεμφοειδής λευχαιμία
Ph-like ALL	τύπου Φιλαδέλφεια ALL
Alterations	Εξαλλαγές
high risk subtypes	Υπότυποι υψηλού ρίσκου
poor outcome	κακή πρόγνωση
nosence mutations	μη νοηματικές μεταλλάξεις
zink finger	δακτύλιος ψευδαργύρου
acceptor sites	δέκτες στη περιοχή ματίσματος
Ikaros dominant negative	αρνητική επικρατής του Ίκαρος
chromatin remodeling	αναδιαμόρφωση της χρωματίνης
Nucleosome Remodeling and Deacetylase	σύμπλοκο αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης
wild type	άγριου τύπου
tyrosine kinase inhibitors	αναστολείς τυροσινικής κινάσης
Chronic Myeloid Leukemia	χρόνια μυελογενής λευχαιμία
loss-of-fuction	απώλεια λειτουργίας
focal deletions	εστιακές-μικρής κλίμακας ελλείψεις
missense mutations	μη συνώνυμες μεταλλάξεις

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

HSC	Hematopoietic Stem Cell
NK	Natural Killers
HIM	Hematopoietic Inducing Microenvironment
ALL	Acute Lymphoblastic Leukemia
AML	Acute Myeloid leukemia
MRD	minimal residual disease
LBL	lymphoblastic lymphoma
MLL	mixed lineage leukemia
FAB	French-American-British
TCR	T-Cell Receptor
Ets / E26	transformation-specific / E-twenty-six
NuRD	Nucleosome Remodeling and Deacetylase
PRC2	polycomb repressor complex 2
H3K27	Histone 3 lysine 27
LMPP	Lymphoid-primed multipotent progenitor
DP	double positive
ELP	early lymphoid precursor
CLP	common lymphoid progenitor
ETP	early thymic precursor
pro-B	προδρομα-B
DN2	double negative 2
pro-T	πρόδρομα-T
MLL	mixed lineage leukemia
TKI	tyrosine kinase inhibitors
CML	Chronic Myeloid Leukemia

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

### Πρωτόκολλα πειραματικής διαδικασίας

#### Αντίδραση PCR

Για το διάλυμα της αντίδρασης PCR (PCR mix) υπολογίζονται οι ποσότητες:

Hot StarTaq™ Master Mix:	6 µL	*αριθμό δειγμάτων + 1
H <sub>2</sub> O:	6 µL	*αριθμό δειγμάτων + 1
Forward primer:	0.5 µL	*αριθμό δειγμάτων + 1
Reverse primer:	0.5 µL	*αριθμό δειγμάτων + 1
<b>13µL</b>		

Σε σωλήνα τύπου erpendorf των 0.5 ml που φέρει τη σήμανση που το καθιστά ως τυφλό, προστίθενται οι ποσότητες που υπολογίστηκαν με βάση τον παραπάνω πίνακα (το επιπλέον δείγμα που υπολογίζεται αφορά το τυφλό). Εν συνεχεία σε σωλήνες τύπου erpendorf των 0.5 ml που έχουν σημειωθεί ώστε ο καθένας να αντιστοιχεί σε ένα δείγμα, διαμοιράζονται 13 µL από το PCR mix. Τέλος σε καθένα από αυτούς προστίθεται 1.5µL του αντίστοιχου δείγματος DNA. Προφανώς στο τυφλό δεν προστίθεται DNA καθώς αντιστοιχεί στο δείγμα που θα παρέχει την πληροφορία κατά πόσο έχει υπάρξει κάποια επιμόλυνση στο PCR mix.

#### Πήκτωμα αγαρόζης low melt 2%

Σε πυρίμαχο δοχείο τοποθετούνται 100ml TBE και 2g low melt αγαρόζης που έχουν ζυγιστεί σε ζυγό ακριβείας. Το διάλυμα ανακινείται σε μαγνητικό αναδευτήρα για 30 λεπτά. Εν συνεχεία θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων στα 360w για περίπου 8 λεπτά με ενδιάμεσες ανακινήσεις έως ότου είναι πλήρως διαυγές.

Το διάλυμα αναδεύεται εκ νέου στον μαγνητικό αναδευτήρα έως ότου φτάσει σε ανεκτή για την αφή θερμοκρασία και με ανοικτό τον απαγωγό προστίθενται περίπου τρεις σταγόνες βρωμιούχου αιθιδίου.

Τέλος το διάλυμα μεταφέρεται σε ειδικό καλούπι ώστε να πήξει τελείως (απαιτούνται περίπου 30 λεπτά) και να δημιουργηθούν τα απαραίτητα πηγάδια φόρτωσης των δειγμάτων.

## Φόρτωση δειγμάτων στο πήκτωμα αγαρόζης

Σε καθαρό τμήμα parafilm μεταφέρονται 2μL χρωστικής (loading dye: ficoll και bromophenol blue). Σε κάθε σταγόνα χρωστικής μεταφέρονται 2μL προϊόντος PCR και αναδεύονται. Εν συνεχεία το μίγμα μεταφέρεται σε ένα καθαρό πηγάδι φόρτωσης του πηκτώματος αγαρόζης το οποίο βρίσκεται εμβαπτισμένο σε TBE μέσα στη διάταξη ηλεκτροφόρησης.

Τέλος σε καθαρό πηγάδι φόρτωσης του πηκτώματος μεταφέρονται 2 μL έτοιμου διαλύματος μάρτυρα μεγέθους ΦΧ174 DNA-Hae III Digest.

## Αντίδραση αλληλούχισης

### Ενζυμικός καθαρισμός των PCR προϊόντων με ExoI και rSAP

Για το διάλυμα της αντίδρασης καθαρισμού (enzyme mix) υπολογίζονται οι ποσότητες (η αντίδραση είναι μειωμένη στο μισό σε σχέση με την προτεινόμενη που ορίζει η εταιρεία στο συνοδευτικό φυλλάδιο):

ExoI:	0.25 μL	*αριθμό δειγμάτων
rSAP:	0.5 μL	*αριθμό δειγμάτων
0,75μL		

Η προετοιμασία απαιτεί πάγο. Σε σωλήνα τύπου erpendorf των 0.5 ml προστίθενται οι ποσότητες που υπολογίστηκαν με βάση τον παραπάνω πίνακα. Εν συνεχεία σε σωλήνες τύπου erpendorf των 0.5 ml που έχουν σημανθεί ώστε ο καθένας να αντιστοιχεί σε ένα δείγμα, διαμοιράζονται 0.75 μL από το enzyme mix. Τέλος σε καθένα από αυτούς προστίθεται 2.5μL του αντίστοιχου δείγματος προϊόντος PCR.

Το πρόγραμμα που ακολουθεί σε θερμικό κυκλοποιητή (Thermal cycler) είναι:

37 °C	15 min
80°C	15 min
10°C	soak

### Κύριως αντίδραση αλληλούχισης (sequencing reaction)

Χρησιμοποιήθηκε το kit Big Dye Terminator v3.1. Για το διάλυμα της αντίδρασης αλληλούχισης (sequencing reaction mix) υπολογίζονται οι ποσότητες:



Big Dye Term buffer:	1.75 $\mu$ L	*αριθμό δειγμάτων
Big Dye Term enzyme:	0.25 $\mu$ L	*αριθμό δειγμάτων
H <sub>2</sub> O:	6.68 $\mu$ L	*αριθμό δειγμάτων
Primer (5 $\mu$ M):	0.32 $\mu$ L	*αριθμό δειγμάτων
9 $\mu$ L		

Απαιτούνται 2 ξεχωριστά sequencing reaction mixes, ένα για το forward primer και ένα για το reverse primer. Η προετοιμασία απαιτεί πάγο. Σε σωλήνες τύπου erpendorf σημασμένοι ένας για την forward αντίδραση και ένας για τη reverse, προστίθενται οι ποσότητες που υπολογίστηκαν με βάση τον παραπάνω πίνακα. Σε plate 96 θέσεων διαμοιράζονται 9  $\mu$ L του αντίστοιχου sequence reaction mix στις αντίστοιχες θέσεις και αντίστοιχα προστίθενται 1 $\mu$ L του καθαρισμένου προϊόντος PCR.

Το plate καλύπτεται με σιλικονούχο κάλυμμα και ακολουθεί η διαδικασία της αντίδρασης σε θερμικό κυκλοποιητή. Το πρόγραμμα που ακολουθεί στο θερμικό κυκλοποιητή είναι:

96°C	1min	
96°C	10sec	25 cycles
55°C	5sec	
60°C	4min	
4°C	soak	

### Καθαρισμός με αιθανόλη (ethanol precipitation)

Για το διάλυμα καθαρισμού υπολογίζονται οι ποσότητες:

EtOH (100%):	55 $\mu$ L	*αριθμό δειγμάτων
NH <sub>4</sub> OH (7.5M):	2 $\mu$ L	*αριθμό δειγμάτων

Το NH<sub>4</sub>OH προστίθεται αργά στο τοιχώματα του δοχείου και εν συνεχεία ακολουθεί καλή ανακίνηση. Σε κάθε θέση του plate 96 θέσεων διαμοιράζονται 29  $\mu$ L. Αν απαιτείται αντίβαρο, τότε στο plate που θα αναλάβει το ρόλο του αντίβαρου, προστίθενται 39 $\mu$ L στις αντίστοιχες θέσεις.

Το plate καλύπτεται με σιλικονούχο κάλυμμα και επωάζεται για 30 min σε θερμοκρασία 4 °C (ψύξη).

Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε ψυχόμενη (4 °C) φυγόκεντρο στα 2210g για 30min.

Εν συνεχεία αφαιρείται το σιλικονούχο κάλυμμα, το Plate καλύπτεται με χειροπετσέτες και αναποδογυρίζεται και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 200g για 3min.

Σε κάθε θέση του Plate προστίθενται 50μL EtOH 70%. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στη ψυχόμενη φυγόκεντρο στα 2210g για 3min και το Plate καλύπτεται με χειροπετσέτες και αναποδογυρίζεται και ακολουθεί εκ νέου φυγοκέντρηση στα 200g για 3min.

Το plate παραμένει για 10 min περίπου στο σκοτάδι ώστε να εξατμιστούν τυχών υπολείμματα της αιθανόλης που δεν απομακρυνθήκαν με τη φυγοκέντρηση και προστίθενται 10μL HiDi (φορμαμίδιο) σε κάθε θέση του plate το οποίο αναδεύεται καλά (περίπου 20 φορές). Το plate καλύπτεται με καθαρό σιλικονούχο κάλυμμα ειδικό για τον αυτόματο αναλυτή ABI3500, ακολουθεί μια σύντομη φυγοκέντρηση (spin down) και αποθηκεύεται στη ψύξη έως ότου να ακολουθήσει η capillary electrophoresis στον αυτόματο αναλυτή.

## **MLPA**

Για την αντίδραση απαιτείται ποσότητα DNA 50ng οπότε πρώτα διεξάγεται η φωτομέτρηση των δειγμάτων στο Nanodrop, και ο υπολογισμός για να γίνουν οι ανάλογες αραιώσεις όπου απαιτείται.

Απαιτείται τελικός όγκος 5μL, οπότε σε σωλήνες τύπου erpendorf των 0.5 ml μεταφέρονται η απαραίτητη ποσότητα από το δείγμα DNA ώστε να υπάρχουν περίπου 50ng DNA και συμπληρώνεται ποσότητα H<sub>2</sub>O μέχρι τελικού όγκου 5μL.

Οι σωλήνες τύπου erpendorf των 0.5ml τοποθετούνται σε θερμικό κυκλοποιητή σε πρόγραμμα:

98°C	10min
25°C	hold

Για την αντίδραση MLPA έγινε χρήση του kit SALSA MLPA p335 ALL-IKFZ1 (LOT C1-1217).

Για το διάλυμα υβριδισμού (probe mix) υπολογίζονται οι ποσότητες (η αντίδραση είναι μειωμένη στο μισό σε σχέση με την προτεινόμενη που ορίζει η εταιρεία στο συνοδευτικό φυλλάδιο):

MLPA buffer (yellow cap):	0.75 µL	*αριθμό δειγμάτων
MLPA probe mix (black cap):	0.75 µL	*αριθμό δειγμάτων
	1.5 µL	

Σε σωλήνα τύπου errendorf των 0.5 ml προστίθενται οι ποσότητες που υπολογίστηκαν με βάση τον παραπάνω πίνακα. Μετά το τέλος του προγράμματος του θερμικού κυκλοποιητή, διαμοιράζεται σε κάθε σωλήνα τύπου errendorf των 0.5ml 1.5µL από το διάλυμα υβριδισμού και συνεχίζει το πρόγραμμα:

95°C	1min
60°C	16-20 hours

Για το διάλυμα σύνδεσης των υβριδοποιημένων ανιχνευτών με το ένζυμο της λιγάσης (ligation mix) υπολογίζονται οι ποσότητες (η αντίδραση είναι μειωμένη στο μισό σε σχέση με την προτεινόμενη που ορίζει η εταιρεία στο συνοδευτικό φυλλάδιο):

Buffer A:	1.5 µL	*αριθμό δειγμάτων
Buffer B:	1.5 µL	*αριθμό δειγμάτων
H <sub>2</sub> O:	12.5 µL	*αριθμό δειγμάτων
Ligase 65 (green cap):	0.5 µL	*αριθμό δειγμάτων
	16 µL	

Η προετοιμασία απαιτεί πάγο. Σε σωλήνα τύπου errendorf των 0.5 ml προστίθενται οι ποσότητες που υπολογίστηκαν με βάση τον παραπάνω πίνακα. Μετά το τέλος του προγράμματος του θερμικού κυκλοποιητή, διαμοιράζεται σε κάθε σωλήνα τύπου errendorf των 0.5ml 16µL από το ligation mix στους 54°C και συνεχίζει το πρόγραμμα:

54°C	15min
98°C	5min
20°C	Hold

Για το διάλυμα αντίδρασης της PCR (PCR mix) υπολογίζονται οι ποσότητες (η αντίδραση είναι μειωμένη στο μισό σε σχέση με την προτεινόμενη που ορίζει η εταιρεία στο συνοδευτικό φυλλάδιο):

H <sub>2</sub> O:	3.75 µL	*αριθμό δειγμάτων
SALSA PCR primers (brown):	1 µL	*αριθμό δειγμάτων
SALSA polymerase(orange cap):	0.25 µL	*αριθμό δειγμάτων
	5 µL	

Η προετοιμασία απαιτεί πάγο. Σε σωλήνα τύπου errendorf των 0.5 ml προστίθενται οι ποσότητες που υπολογίστηκαν με βάση τον παραπάνω πίνακα. Μετά το τέλος του προγράμματος του θερμικού κυκλοποιητή, διαμοιράζεται σε κάθε σωλήνα τύπου errendorf των 0.5ml 5µL από το ligation mix και ακολουθεί το πρόγραμμα:

95°C	30sec	35 cycles
60°C	30sec	
72°C	1min	
72°C	20min	
15°C	soak	

Για το διάλυμα αποδιάταξης των προϊόντων της PCR υπολογίζονται οι ποσότητες

HiDi:	9.1 µL	*αριθμό δειγμάτων
LIZ:	0.2 µL	*αριθμό δειγμάτων
	9.3 µL	

Σε σωλήνα τύπου errendorf των 0.5 ml προστίθενται οι ποσότητες που υπολογίστηκαν με βάση τον παραπάνω πίνακα. Σε plate 96 θέσεων διαμοιράζονται 9.3 µL στις αντίστοιχες θέσεις και προστίθεται 0.7µL του προϊόντος της PCR. Το plate καλύπτεται με καθαρό σιλικονούχο κάλυμμα ειδικό για τον αυτόματο αναλυτή ABI3500, ακολουθεί μια σύντομη φυγοκέντρηση (spin down) και αποθηκεύεται στη ψύξη έως ότου να ακολουθήσει η capillary electrophoresis στον αυτόματο αναλυτή.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

Κυτταρογενετικοί υπότυποι πρόδρομης B-ALL και τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά τους (Πίνακας -, - και-).

Κυττ/γενετική υποομάδα	Συχνότητα %	Κυττ/γενετική ανωμαλία	Συντηγμένα γονίδια	Μοναδικά μορφολογικά χαρακτηριστικά
Υπερδιπλοειδική ή ALL	27-29(Π) 6-8 (Ε)	51-65 χρωμοσώματα (+4, +14, +21, +X)	-	-
ALL με t(12;21)	22-25 (Π) 1-2 (Ε)	t(12;21) (p13;q22)	TEL/AML1 (ETVX/RUNX1)	-
ALL με t(1;19)	3-6(Π) 5-7(Ε)	t(1;19) (q23;p13)	E2A (TCF3)/PBX1	-
Philadelphia <sup>+</sup> ALL	2-3(Π) 20-30(Ε)	t(9;22) (q43;q11.2)	BCR/ABL (P190/P210)	ALL L1, μερικές φορές κοκκιώδης βλάστες
ALL με t(v;11q23); MLL ανακατάταξη	2-3(Π) 5-7(Ε)	t(4;11) (q21;q23) t(19;11) (p13;q23)	AF4/MLL ENL/MLL	-
Υποδιπλοειδής ALL	5-6(Π) -(Ε)	<46 χρωμοσώματα	-	-
ALL με εωσινοφιλία	<1	t(5;14 q31;q32)	IL3/IGH	Αυξημένα δυσπλαστικά εωσινόφιλα

Κυττ/γενετική υποομάδα	Μοναδικά ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά	Επιπλέον μοριακές ανωμαλίες
Υπερδιπλοειδική ALL	-	Ασυνήθιστες BCDG μεταλλάξεις (13%), FLT3 μεταλλάξεις (21-25%)
ALL με t(12;21)	Πρώιμα προ-B-ALL, My+	Μονοαλληλικές ελλείψεις PAX5 (28%)
ALL με t(1;19)	Προ-B-ALL, CD34-/dim+, CD20-, CD9++	-
Philadelphia <sup>+</sup> ALL	-	IKZF1 ελλείψεις, BCDG μεταλλάξεις στο 66%
ALL με t(v;11q23); MLL ανακατάταξη	Πρώιμα προ-B, CD10-, CD15+, sCD22-, CD65+, NG2+	FLT3 μεταλλάξεις (18%) αυξημένη έκφραση των HOX γονιδίων
Υποδιπλοειδής ALL	-	BCDG μεταλλάξεις 100%
ALL με εωσινοφιλία	-	-

<b>Κυττ/γενετική υποομάδα</b>	<b>Φαρμακολογικά χαρακτηριστικά</b>	<b>Πρόγνωση/κίνδυνος</b>
Υπερδιπλοειδική ALL	Μεγαλύτερη ευαισθησία στο MTX, MP	Καλή πρόγνωση (Π) Κακή πρόγνωση(Ε)
ALL με t(12;21)	Μεγαλύτερη ευαισθησία στην ασπαραγινάση	Καλή πρόγνωση/χαμηλός κίνδυνος (Π)
ALL με t(1;19)	-	Συνήθης κίνδυνος
Philadelphia <sup>+</sup> ALL	-	Κακή πρόγνωση/υψηλός κίνδυνος (Π, Ε)
ALL με t(v;11q23); MLL ανακατάταξη	Μεγαλύτερη ευαισθησία στη cytarabine	Κακή πρόγνωση/υψηλός κίνδυνος(Π,Ε)
Υποδιπλοειδής ALL	-	Κακή πρόγνωση/υψηλός κίνδυνος
ALL με εωσινοφιλία	-	-

## ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. T.J. Kindt, Goldsby RA, Osborne BA. Kuby Immunology. Broken Hill Publishers LTD2013. p. 27-41.
2. A. Vander, J. Sherman, Luciano D. Human Physiology. The Mechanisms of Body Function. Mc Graw Hill2001. p. 916-9.
3. Lustosa de Sousa DW, de Almeida Ferreira FV, Cavalcante Felix FH, de Oliveira Lopes MV. Acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: prognostic factors and analysis of survival. Revista brasileira de hematologia e hemoterapia. 2015;37(4):223-9.
4. Onciu M. Acute lymphoblastic leukemia. Hematology/Oncology Clinics of North America. Aug 2009;23(4):pp. 655-74
5. Ibagy A, Silva DB, Seiben J, Winneshoffer AP, Costa TE, Dacoregio JS, et al. Acute lymphoblastic leukemia in infants: 20 years of experience. Jornal de pediatria. 2013;89(1):64-9.
6. Λουκόπουλος Δ, Μαριάννα, Π. Μαθήματα αιματολογίας. Εκδόσεις Κάλλιπος: Αθήνα:Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών 2015. p. 142.
7. Churchman ML, Mullighan CG. Ikaros: Exploiting and targeting the hematopoietic stem cell niche in B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. Experimental hematology. 2017;46:1-8.
8. Kuiper RP, Waanders E, van der Velden VH, van Reijmersdal SV, Venkatachalam R, Scheijen B, et al. IKZF1 deletions predict relapse in uniformly treated pediatric precursor B-ALL. Leukemia. 2010;24(7):1258-64.
9. Yoshida T, Georgopoulos K. Ikaros fingers on lymphocyte differentiation. International journal of hematology. 2014;100(3):220-9.
10. Sawicka M, Stritesky GL, Reynolds J, Abourashchi N, Lythe G, Molina-Paris C, et al. From pre-DP, post-DP, SP4, and SP8 Thymocyte Cell Counts to a Dynamical Model of Cortical and Medullary Selection. Frontiers in immunology. 2014;5:19.
11. Nichogiannopoulou A, Trevisan M, Neben S, Friedrich C, Georgopoulos K. Defects in hemopoietic stem cell activity in Ikaros mutant mice. The Journal of experimental medicine. 1999;190(9):1201-14.
12. Παπανικολάου Γ, et al. Εργαστηριακές ασκήσεις γενετικής ανθρώπου στον υπολογιστή και στον πάγκο. Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών 2015.
13. Σπέλλα Μ. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction,PCR). Σχολή Θετικών Επιστημών και Τεχνολογίας, Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο.
14. Ρ.Φ.Σολδάτος. Μοριακή μελέτη των μηνιγγιωμάτων,Διδακτορική διατριβή: Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών; 2014.
15. Πουμπουρίδου Ν. Μελέτη και κλινική αξιολόγηση νέων μοριακών δεικτών καρκίνου του μαστού, Διδακτορική διατριβή: Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών; 2015.
16. Rohlin A, Wernersson J, Engwall Y, Wiklund L, Bjork J, Nordling M. Parallel sequencing used in detection of mosaic mutations: comparison with four diagnostic DNA screening techniques. Human mutation. 2009;30(6):1012-20.
17. Tsiatis AC, Norris-Kirby A, Rich RG, Hafez MJ, Gocke CD, Eshleman JR, et al. Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of KRAS mutations: diagnostic and clinical implications. The Journal of molecular diagnostics : JMD. 2010;12(4):425-32.

18. A. Gomes, Korf B. Genetic Testing Techniques Pediatric Cancer Genetics. 2018:pp. 47-64.
19. Τσιτλαΐδου Μ. Γενετική Ανάλυση στον Κληρονομικό Καρκίνο του Μαστού, Διδακτορική διατριβή, : Πανεπιστήμιο Πατρών; 2014.
20. Product Description SALSA®MLPA® Probemix P335-C1 ALL-IKZF1. MRC-Holland MLPA. [www.mlpa.com](http://www.mlpa.com) Issued 21 March 2018
21. Hagman J, Ramirez J, Lukin K. B lymphocyte lineage specification, commitment and epigenetic control of transcription by early B cell factor 1. *Current topics in microbiology and immunology*. 2012;356:17-38.
22. Μπουραντάς ΛΜ. Μοριακή Ανάλυση των μεταλλαξεων των γονιδίων υποδοχέα της ερυθροποιητίνης και της JAK2 κινάσης σε ασθενείς με οικογενή πολυερυθραιμία και μυελοϋπερπλαστικά σύνδρομα  
2008.
23. Βαδικολια ΧΜ. Μελέτη συσχέτισης ειδικών βιοχημικών και μοριακών δεικτών στα χρόνια μυελοϋπερπλαστικά νεοπλάσματα 2011.
24. Κανέλλου Π. Μελέτη του ρόλου των μεταλλαγών στα γονίδια p14ARF, p15INK4b και p16INK4a και της γενωμικής αστάθειας στην αντνική υπερκεράτωση 2008.
25. Shahjahani M, Norozi F, Ahmadzadeh A, Shahrabi S, Tavakoli F, Asnafi AA, et al. The role of Pax5 in leukemia: diagnosis and prognosis significance. *Medical oncology*. 2015;32(1):360.
26. Zhang MY, Churpek JE, Keel SB, Walsh T, Lee MK, Loeb KR, et al. Germline ETV6 mutations in familial thrombocytopenia and hematologic malignancy. *Nature genetics*. 2015;47(2):180-5.
27. H. Hock, E. Meade, S. Medeiros, J.W. Schindler, P.J.M Valk, Y. Fujiwara, et al. Tel/Etv6 is an essential and selective regulator of adult hematopoietic stem cell survival. *GENES & DEVELOPMENT* 18:2336–2341. 2004.
28. Lee H, Cha S, Lee MS, Cho GJ, Choi WS, Suk K. Role of antiproliferative B cell translocation gene-1 as an apoptotic sensitizer in activation-induced cell death of brain microglia. *Journal of immunology*. 2003;171(11):5802-11.
29. Pimentel E. *Handbook of Growth Factors*, CRC Press. 1994.
30. Indovina P, Pentimalli F, Casini N, Vocca I, Giordano A. RB1 dual role in proliferation and apoptosis: cell fate control and implications for cancer therapy. *Oncotarget*. 2015;6(20):17873-90.
31. Binder G. Short stature due to SHOX deficiency: genotype, phenotype, and therapy. *Hormone research in paediatrics*. 2011;75(2):81-9.
32. M. Burns AG. *Hematology: Basic Principles and Practice*. Elsevier Inc. 2018.
33. Hildebrandt J, Yalcin E, Bresser HG, Cinel G, Gappa M, Haghghi A, et al. Characterization of CSF2RA mutation related juvenile pulmonary alveolar proteinosis. *Orphanet journal of rare diseases*. 2014;9:171.
34. Milatovich A, Kitamura T, Miyajima A, Francke U. Gene for the alpha-subunit of the human interleukin-3 receptor (IL3RA) localized to the X-Y pseudoautosomal region. *American journal of human genetics*. 1993;53(5):1146-53.
35. Collins-Underwood JR, Mullighan CG. Genomic profiling of high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2010;24(10):1676-85.
36. Udagawa C, Sasaki Y, Suemizu H, Ohnishi Y, Ohnishi H, Tokino T, et al. Targeted sequencing reveals genetic variants associated with sensitivity of 79 human cancer xenografts to anticancer drugs. *Experimental and therapeutic medicine*. 2018;15(2):1339-59.
37. Stanulla M, Dagdan E, Zaliova M, Moricke A, Palmi C, Cazzaniga G, et al. IKZF1(plus) Defines a New Minimal Residual Disease-Dependent Very-Poor Prognostic Profile in Pediatric B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2018;36(12):1240-9.



38. Iacobucci I, Iraci N, Messina M, Lonetti A, Chiaretti S, et al. IKAROS Deletions Dictate a Unique Gene Expression Signature in Patients with Adult BCell Acute Lymphoblastic Leukemia. PLoS ONE. 2012;7(7): e40934.