



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-
ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ
ΝΕΩΝ ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΤΗΣ RNase κ ΣΤΗΝ
ΘΞΕΙΑ ΛΕΜΦΟΒΛΑΣΤΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ ΣΕ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΟΥΣ
ΑΣΘΕΝΕΙΣ**

ΛΕΡΟΥΝΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ
ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

ΑΘΗΝΑ, 2019



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-
ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ
ΝΕΩΝ ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΤΗΣ RNase κ ΣΤΗΝ
ΟΞΕΙΑ ΛΕΜΦΟΒΛΑΣΤΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ ΣΕ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΟΥΣ
ΑΣΘΕΝΕΙΣ**

ΛΕΡΟΥΝΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ
ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

ΑΘΗΝΑ, 2019



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-
ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗ ΚΑΘΗΓΗΤΗ
κ. ΔΙΑΜΑΝΤΗ ΣΙΔΕΡΗ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ
ΝΕΩΝ ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΤΗΣ RNase κ ΣΤΗΝ
ΘΞΕΙΑ ΛΕΜΦΟΒΛΑΣΤΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ ΣΕ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΟΥΣ
ΑΣΘΕΝΕΙΣ**

ΛΕΡΟΥΝΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ
ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

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

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

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

ΑΘΗΝΑ, 2019

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Δ.Π.Μ.Σ. «Κλινική Βιοχημεία- Μοριακή Διαγνωστική» υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Σίδηρη Διαμάντη. Οι πειραματικές διαδικασίες έλαβαν χώρα στον Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ, στην ερευνητική μονάδα του κ. Σίδηρη και στο Εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας & Μοριακής Διαγνωστικής της Ιατρικής Σχολής Αθηνών. Ευχαριστώ θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου για την ευκαιρία να εργαστώ στο εργαστήριό του και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας.

Οφείλω να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Γουργιώτη Δημήτριο για τη φιλοξενία στο εργαστήριό του, όπως και την υποψήφια διδάκτορα Μαριέττα Ξαγοράρη του Εργαστηρίου Κλινικής Βιοχημείας - Μοριακής Διαγνωστικής, της Β΄ Παιδιατρικής Κλινικής του Νοσοκομείου Παιδών "Π&Α Κυριακού" (Ιατρικής Σχολή, ΕΚΠΑ) για τη συνεργασία στη διεξαγωγή των παρακάτω πειραμάτων και την πολύτιμη βοήθειά της. Τους ευχαριστώ για τη συλλογή των δειγμάτων των ασθενών με ΟΛΛ, την καταγραφή των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών και τη διάθεση του χώρου τους για την εκπόνηση μέρους των πειραμάτων.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Σκορίλα και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Κοντό, του Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Ε.Κ.Π.Α, για την επιμέλεια και αξιολόγηση της παρούσας εργασίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στη συνάδελφο Αγγελική Μεϊντάνη, της οποίας το θέμα συνέχισα και εξέλιξα, για τη πολύτιμη βοήθεια στην αρχή της ανάληψης του θέματος. Ευχαριστώ επίσης το Δρ. Αυγέρη Μαργαρίτη του Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Ε.Κ.Π.Α, για την πολύτιμη συνεργασία και καθοδήγησή του στην στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της ερευνητικής ομάδας του κ. Σίδηρη, την Δρ Κραββαρίτη Ελευθερία για τη συνολική της βοήθεια στο χώρο του εργαστηρίου, το φίλο και συνάδελφο Μιχαήλ Αριστεΐδη και τις προπτυχιακές φοιτήτριες Αναγνώστου Ευαγγελία, Στυλιανουδάκη Ιωάννα και Τατούλη Μαρία για το άριστο κλίμα και τις εξαιρετικές συνθήκες συνεργασίας καθώς και την εν γένει βοήθειά τους. Τέλος, οφείλω να

ευχαριστήσω πολύ τον υποψήφιο διδάκτορα και γραμματέα του Δ.Π.Μ.Σ. Διαμαντόπουλο Μάριο για την πολύτιμη υποστήριξη και καθοδήγησή του καθώς και τα υπόλοιπα τα μέλη του Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος για τη συνεργασία τους σε όλη τη διάρκεια διεξαγωγής των παρακάτω πειραμάτων.

Πίνακας περιεχομένων

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 ΛΕΥΧΑΙΜΙΕΣ	1
1.2 ΟΞΕΙΑ ΛΕΜΦΟΒΛΑΣΤΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ	7
1.2.1 Μοριακή παθογένεια.....	9
1.2.2 Ταξινόμηση	10
1.2.3 Οξεία Β-λεμφοβλαστική λευχαιμία της παιδικής ηλικίας.....	11
1.2.4 Οξεία Τ-λεμφοβλαστική λευχαιμία της παιδικής ηλικίας.....	16
1.2.5 Διάγνωση	19
1.2.5.1 Κλινικά Ευρήματα	19
1.2.5.2 Εργαστηριακά Ευρήματα.....	20
1.2.6 Προγνωστική ταξινόμηση	22
1.2.7 Θεραπεία οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας.....	29
1.2.7.1 Η εξέλιξη της θεραπείας	29
1.2.7.2 Τρέχουσες θεραπείες.....	31
1.2.7.3 Υποτροπιάζουσα οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία.....	36
1.2.7.4 Μελλοντικές θεραπείες	37
1.3 ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ	42
1.3.1 Η βιολογική λειτουργία των ριβονουκλεασών.....	42
1.3.2 Κατηγορίες ριβονουκλεασών	49
1.3.3 Η οικογένεια της ριβονουκλεάσης κ.....	51
1.3.3.1 Η ανθρώπινη ριβονουκλεάση κ: Δομή και Δράση.....	52
1.4 ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΟ ΜΑΤΙΣΜΑ	54
1.5 ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ	59
1.6 ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ	63
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	64
2.1 ΥΛΙΚΑ	64
2.1.1 Χημικά αντιδραστήρια	64
2.1.2 Χημικά διαλύματα	64
2.1.3 Κυτταρικές σειρές.....	64

2.1.4 Ένζυμα	66
2.1.5 Εκκινητές.....	66
2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ	67
2.2.1 Απομόνωση ολικού RNA	67
2.2.1.1 Απομόνωση RNA κυττάρων.....	67
2.2.1.2 Απομόνωση RNA μυελού (ολικό αίμα).....	68
2.2.2 Ποσοτικός προσδιορισμός RNA.....	69
2.2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	70
2.2.3.1 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής.....	72
2.2.3.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου.....	74
2.2.4 Στατιστική ανάλυση	79
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	80
3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA –ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ	80
3.2 ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ CLASSICAL, 4 & 14 ΣΕ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΟΛΛ.....	81
3.2.1 Μελέτη έκφρασης του κλασικού μεταγράφου του γονιδίου της ριβονουκλεάσης κ ως προς τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών	85
3.2.2 Μελέτη έκφρασης των μεταγράφων 4 & 14 του γονιδίου της ριβονουκλεάσης κ ως προς τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών	90
3.3 ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΥ 19 ΣΕ ΛΕΥΧΑΙΜΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ	95
3.4 ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΥ 19 ΣΕ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΟΛΛ	97
3.4.1 Μελέτη έκφρασης του μεταγράφου 19 του γονιδίου της ριβονουκλεάσης κ ως προς τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών	99
3.5 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΛΑΣΙΚΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΥ, ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΥ 4, , ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΥ 14 ΚΑΙ ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΥ 19 ΣΤΗ ΠΑΙΔΙΚΗ ΟΛΛ	100
3.6 ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΥ 9 ΣΕ ΛΕΥΧΑΙΜΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ	101
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	105
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	119

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΛΕΥΧΑΙΜΙΕΣ

Η λευχαιμία είναι ένας τύπος καρκίνου που εντοπίζεται στο αίμα και το μυελό των οστών και προκαλείται από την ταχεία παραγωγή ανώμαλων λευκών αιμοσφαιρίων. Αυτά τα ανώμαλα λευκά αιμοσφαίρια δεν είναι σε θέση να παρέχουν την κατάλληλη άμυνα έναντι των λοιμώξεων και μειώνουν την ικανότητα του μυελού των οστών να παράγει ερυθρά αιμοσφαίρια και αιμοπετάλια [1].

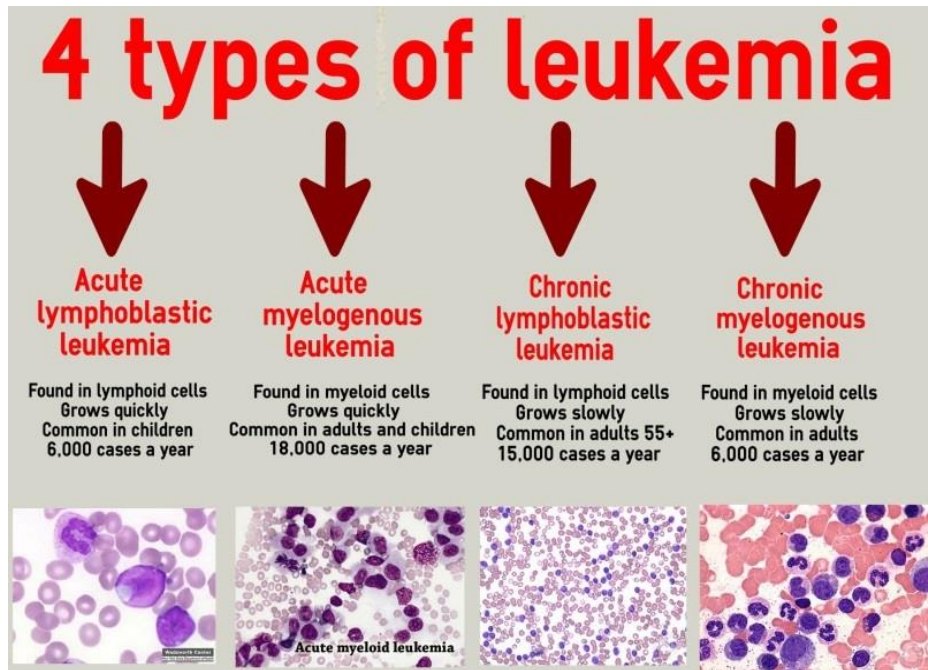
Η λευχαιμία είναι ο γενικός όρος για μερικούς διαφορετικούς τύπους αιματολογικών κακοηθειών. Υπάρχουν τέσσερις κύριοι τύποι λευχαιμίας, όπως απεικονίζονται και στην Εικόνα 1.1.:

- i. Οξεία λεμφοβλαστική (λεμφοκυτταρική) λευχαιμία (ΟΛΛ)/Acute lymphoblastic leukemia (ALL)
- ii. Οξεία μυελοειδής (μυελογενής) λευχαιμία(ΟΜΛ)/ Acute myeloid leukemia (AML)
- iii. Χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ)/ Chronic lymphoblastic leukemia (CLL)
- iv. Χρόνια μυελοειδής (μυελογενής) λευχαιμία (ΧΜΛ)/ Chronic myeloid leukemia (CML) [2].

Η χρόνια λευχαιμία εξελίσσεται πιο αργά από την οξεία, η οποία απαιτεί άμεση θεραπεία. Η λευχαιμία ταξινομείται επίσης ως λεμφοκυτταρική ή μυελογενής. Ο όρος λεμφοκυτταρική λευχαιμία αναφέρεται σε μη φυσιολογική ανάπτυξη των κυττάρων του μυελού που ωριμάζουν σε λεμφοκύτταρα, τύπος λευκών αιμοσφαιρίων του ανοσοποιητικού συστήματος . Ενώ η κατάσταση της μυελογενούς λευχαιμίας, περιγράφει τη μη φυσιολογική ανάπτυξη των κυττάρων μυελού που ωριμάζουν σε ερυθρά και λευκά αιμοσφαίρια και αιμοπετάλια [1].

Για κάθε τύπο λευχαιμίας, οι ασθενείς πλήττονται και αντιμετωπίζονται διαφορετικά. Στις ΟΛΛ και ΟΜΛ (οξεία λευχαιμία) συσσωρεύονται νεαρά κύτταρα, γνωστά ως λεμφοβλάστες ή μυελοβλάστες. Οι οξείες λευχαιμίες προχωρούν γρήγορα χωρίς θεραπεία. Η ΧΛΛ και η ΧΜΛ έχουν λίγες ή καθόλου βλάστες και συχνά προχωρούν αργά σε σύγκριση με την οξεία λευχαιμία, ακόμη και χωρίς άμεση θεραπεία. Αυτοί οι τέσσερις τύποι λευχαιμίας έχουν ένα πράγμα κοινό - αρχίζουν σε ένα κύτταρο του μυελού των

οστών. Το κύτταρο υφίσταται αλλαγές και μετατρέπεται σε ένα τύπο λευχαιμικού κυττάρου [2].



Εικόνα 1.1. 4 Κόριοι Τύποι Λευχαιμίας (Πηγή: <http://straightfromthedoc.com/types-of-leukemia/>)

Η λευχαιμία εμφανίζεται τόσο σε ενήλικες όσο και σε παιδιά. Η ΟΛΛ είναι η πιο συνηθισμένη μορφή λευχαιμίας στα παιδιά, και η ΟΜΛ έρχεται δεύτερη σε συχνότητα. Έρευνες δεκαετιών έχουν οδηγήσει σε εξαιρετικά βελτιωμένα αποτελέσματα για τους ασθενείς παιδικής ΟΛΛ. Οι δύο πιο συχνές λευχαιμίες ενηλίκων είναι η ΟΜΛ και η ΧΛΛ. Κάθε τρία λεπτά, κάποιος διαγιγνώσκεται με αιματολογικό καρκίνο - περισσότερες από 201.870 νέες περιπτώσεις αναμένονται φέτος στις Ηνωμένες Πολιτείες. Σύμφωνα με εκτιμήσεις, 68.000 θάνατοι θα προκληθούν από αιματολογικές κακοήθειες φέτος. Οι ενήλικες διαγιγνώσκονται με λευχαιμία 10 φορές πιο συχνά από τα παιδιά. Η λευχαιμία πλήττει άνδρες και γυναίκες όλων των ηλικιών και όλων των φυλών. Η λευχαιμία είναι ο πιο κοινός παιδικός & εφηβικός καρκίνος στους ισπανόφωνους. Το ποσοστό πενταετούς σχετικής επιβίωσης είναι 3-4% χαμηλότερο για τους ισπανόφωνους από εκείνο των μη ισπανόφωνων λευκών [1]. Εκτιμώμενος αριθμός πρόσφατα διαγνωσμένων ατόμων στις Ηνωμένες Πολιτείες κάθε χρόνο:

- ΟΜΛ περίπου 12.950
- ΧΛΛ περίπου 14.570
- ΧΜΛ περίπου 5.150

- ΟΛΛ περίπου 5.730

Περίπου 274.930 άνθρωποι στις Ηνωμένες Πολιτείες, ζουν με λευχαιμία [2].

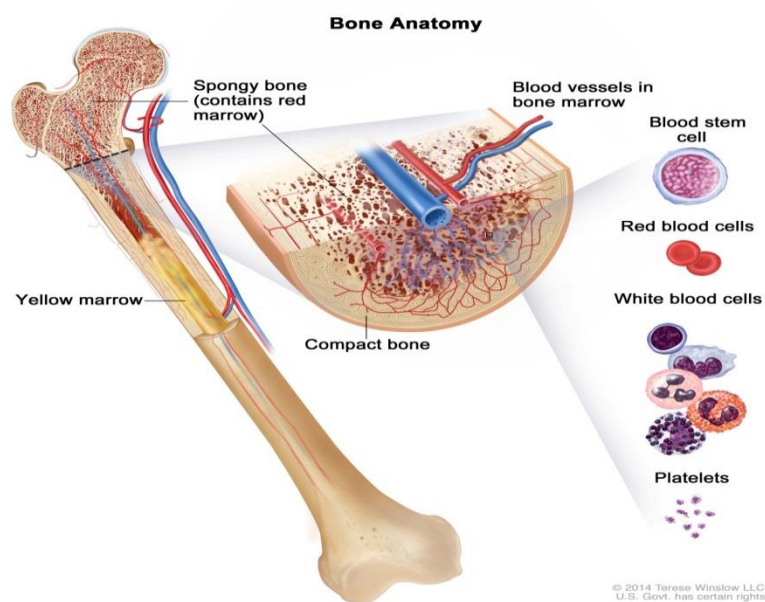
Τα κύτταρα του αίματος σχηματίζονται στον μυελό των οστών, στο σπογγώδη ιστό, που βρίσκεται μέσα στα οστά (βλ. Εικόνα 1.2.). Τα αιμοποιητικά κύτταρα διαιρούνται για να παράγουν είτε περισσότερα βλαστοκύτταρα είτε ανώριμα κύτταρα που καθίστανται ώριμα με την πάροδο του χρόνου. Ένα βλαστοκύτταρο μπορεί να γίνει μυελοειδές βλαστικό ή λεμφοειδές βλαστικό κύτταρο.

Ένα μυελοειδές βλαστικό κύτταρο γίνεται ένας από τους τρεις τύπους ώριμων κυττάρων του αίματος:

- Ερυθρά αιμοσφαίρια που μεταφέρουν οξυγόνο σε όλους τους ιστούς του σώματος. Αιμοπετάλια που είναι υπεύθυνα για την αιμόσταση.
- Κοκκιοκύτταρα (λευκά αιμοσφαίρια) που καταπολεμούν τη μόλυνση και τις ασθένειες.

Ένα λεμφοειδές βλαστικό κύτταρο γίνεται λεμφοβλαστικό κύτταρο και στη συνέχεια διαφοροποιείται σε τρεις τύπους λεμφοκυττάρων (λευκά αιμοσφαίρια):

- Β λεμφοκύτταρα που παράγουν αντισώματα για την καταπολέμηση λοιμώξεων.
- Τ λεμφοκύτταρα που βοηθούν τα λεμφοκύτταρα Β να κάνουν τα αντισώματα που βοηθούν στην καταπολέμηση της λοίμωξης.
- Φυσικά κύτταρα φονείς που προσβάλλουν καρκινικά κύτταρα και ιούς [3].

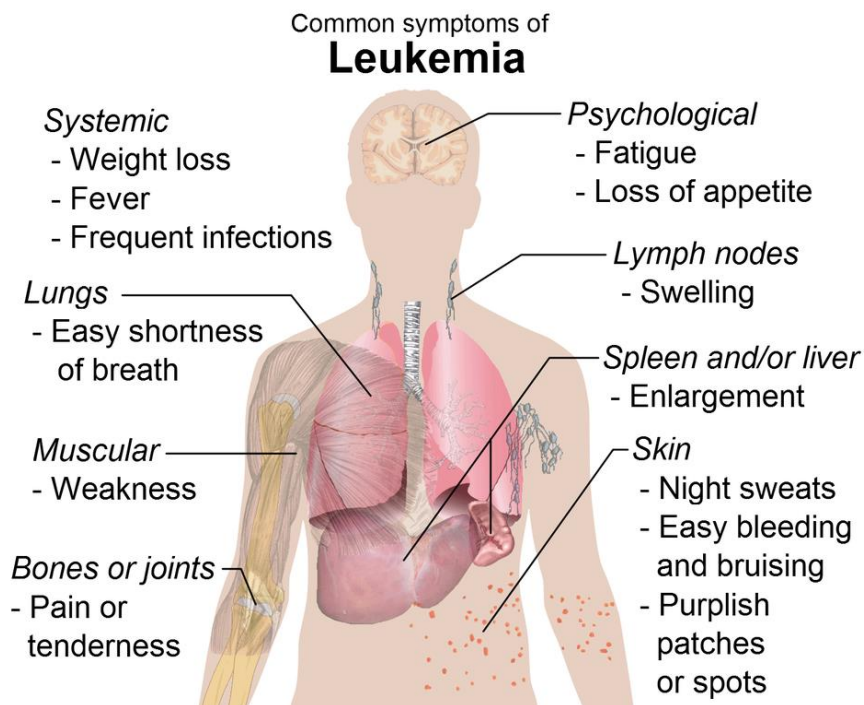


Εικόνα 1.2. Ανατομία Μυελού των Οστών (Πηγή: <https://www.mhealth.org/patient-education/cdr0000258006>)

Ο μυελός των οστών είναι κυτταροβριθής, χαλαρός συνδετικός ιστός με πυκνή αγγείωση, που βρίσκεται στις μυελικές κοιλότητες (κυψέλες) των οστών. Παρά το γεγονός ότι ο μυελός είναι διασκορπισμένος στις μυελικές κυψέλες, λειτουργεί ως ένα ενιαίο όργανο. Ο φυσιολογικός μυελός των οστών στον ενήλικα παράγει καθημερινά $2,5 \times 10^9$ ερυθρά αιμοσφαίρια, περίπου $2,5 \times 10^9$ αιμοπετάλια και $1,0 \times 10^9$ λευκά αιμοσφαίρια ανά kg βάρους σώματος. Ενώ ο ρυθμός παραγωγής εμφανίζει διακυμάνσεις σύμφωνα με τις καθημερινές ανάγκες [4].

Τα σημάδια και τα συμπτώματα που παραπέμπουν σε λευχαιμία (και γενικά αιματολογικούς καρκίνους είναι ασαφή και μη ειδικά). Δεν υπάρχει συγκεκριμένη κλινική εικόνα οποιουδήποτε τύπου λευχαιμίας που θα επέτρεπε στο γιατρό να προχωρήσει σε ασφαλή διάγνωση χωρίς εργαστηριακές εξετάσεις.

Σε όλους τους τύπους λευχαιμίας, τα συμπτώματα που προκαλούνται (βλ. Εικόνα 1.3.) , συχνά οφείλονται στην έλλειψη φυσιολογικών κυττάρων αίματος παρά στην παρουσία ανώμαλων λευκοκυττάρων. Καθώς ο μυελός των οστών γεμίζει από κακοήθη κύτταρα, δεν είναι σε θέση να παράγει τον απαιτούμενο αριθμό φυσιολογικών κυττάρων που χρειάζεται το σώμα [3].



Εικόνα 1.3. Συμπτώματα Λευχαιμίας (Πηγή:

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Symptoms_of_leukemia.png)

Αυτό οδηγεί σε:

- Έλλειψη ερυθρών αιμοσφαιρίων (ερυθροπενία) που μεταφέρουν οξυγόνο σε όλους τους ιστούς του σώματος, έτσι εμφανίζεται αδυναμία, κόπωση, δύσπνοια, αϋπνία και αίσθημα παλμών.
- Έλλειψη φυσιολογικών λευκών αιμοσφαιρίων, κάτι που οδηγεί σε λοιμώξεις πιο συχνές και πιο σοβαρές που διαρκούν περισσότερο.
- Πυρετό και αίσθημα κακουχίας (γενικό αίσθημα ασθένειας)
- Αιμορραγία και μώλωπες (εξαντλητικές έμμηνες ρήσεις) , ρινορραγίες, αιμορραγία των ούλων) λόγω της έλλειψης αιμοπεταλίων.

Υπάρχουν ορισμένα συμπτώματα που παρατηρούνται μόνο σε ορισμένους ασθενείς ή σε συγκεκριμένες μορφές λευχαιμίας. Για παράδειγμα, τα μικρά παιδιά με ΟΛΛ μπορεί να διαμαρτυρηθούν για πόνο στα οστά ή τους αρθρώσεις και, σε κάποιους τύπους ΟΜΛ, τα ούλα μπορεί να διογκωθούν από την έντονη παρουσία λευχαιμικών κυττάρων. Σε λεμφοειδείς κακοήθειες, οι λεμφαδένες μπορεί να είναι πρησμένοι. Σε ορισμένες μορφές της λευχαιμίας, παρατηρείται ηπατομεγαλία και σπληνομεγαλία εξαιτίας της μεγάλης συσσώρευσης βλαστών [3].

Τα άτομα με χρόνια λευχαιμία μπορεί να μην έχουν καν συμπτώματα. Μερικοί ασθενείς μαθαίνουν ότι πάσχουν μετά από τις τακτικές εξετάσεις αίματος. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η γενική αίματος μπορεί να δείξει αύξηση του αριθμού των λεμφοκυττάρων. Ωστόσο κάθε τύπος λευχαιμίας μπορεί να έχει διαφορετικά συμπτώματα, που προτρέπουν ένα άτομο να απευθυνθεί στο γιατρό [2].

Ο γιατρός μπορεί μόνο να υποψιάζεται ότι ένας ασθενής έχει λευχαιμία βάσει συμπτωμάτων, για αυτό το λόγο επιβάλλεται να πραγματοποιηθούν και εργαστηριακές εξετάσεις για τη τελική διάγνωση. Τα αποτελέσματα μια απλής γενικής αίματος καταδεικνύουν συνήθως λευχαιμία με υψηλά ή χαμηλά επίπεδα λευκών αιμοσφαιρίων αιμοπεταλίων και των ερυθρών αιμοσφαιρίων (πανκυτταροπενία), παρουσία βλαστών στη κυκλοφορία του αίματος. Αν και σπάνια μπορεί να είναι φυσιολογικά τα παραπάνω ευρήματα, οι περισσότεροι ασθενείς θα υποβληθούν και στη διαδικασία λήψης δείγματος μυελού των οστών (αναρρόφηση και βιοψία) ώστε να επιβεβαιωθεί η διάγνωση, να εντοπιστούν χρωμοσωμικές ανωμαλίες και να προσδιοριστεί ο ακριβής τύπος λευχαιμίας.

Κάθε κύριος τύπος λευχαιμίας έχει επίσης διαφορετικούς υποτύπους. Αυτό σημαίνει ότι οι ασθενείς με τον ίδιο κύριο τύπο λευχαιμίας μπορεί να πάσχουν από διαφορετικές μορφές

της νόσου. Η ηλικία του ασθενούς, η γενική υγεία του και ο υπότυπος της νόσου μπορεί να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στον καθορισμό του καλύτερου σχήματος θεραπείας.

Συνήθως, μια ακτινογραφία θώρακος θα ληφθεί ώστε να σαρώσει, και να εντοπίσει πρησμένους λεμφαδένες, ή άλλες περιοχές που έχουν πληγεί. Δείγματα αίματος θα ληφθούν για να ελεγχθούν τυχόν προβλήματα με το ήπαρ, τους νεφρούς ή άλλα όργανα. Σε ορισμένους, αλλά όχι σε όλους, τύπους λευχαιμίας λαμβάνεται δείγμα εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ορισμένα είδη λευχαιμικών κυττάρων μπορούν να εισέλθουν στο νευρικό σύστημα, και να προστατευτούν από τα περισσότερα είδη θεραπείας. Εξετάσεις αίματος θα επαναληφθούν για να ελεγχθεί η ανταπόκριση στη θεραπεία και τυχόν επιπλοκές [2,3].

Οι λεπτομέρειες της θεραπείας θα ποικίλουν ανάλογα με το τύπο της λευχαιμίας και τη γενική κατάσταση του ασθενούς. Οι παρενέργειες της θεραπείας διαφέρουν μεταξύ των τύπων θεραπείας και ασθενών.

Οι κύριοι τρόποι αντιμετώπισης της νόσου είναι:

- Χημειοθεραπεία: φάρμακα που έχουν κυτταροτοξική δράση.
- Ακτινοθεραπεία: συνήθως μόνο για μεταμόσχευση μυελού των οστών ή τοπική ασθένεια π.χ. στο σπλήνα
- Στοχευμένη θεραπεία: φάρμακα τα οποία αναγνωρίζουν ειδικά και σκοτώνουν κακοήθη, λευχαιμικά κύτταρα
- Ανοσοθεραπεία: σχήματα θεραπείας που χρησιμοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα για την καταστροφή των λευχαιμικών κυττάρων, συχνά με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων.
- Μεταμόσχευση αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων (*Hematopoietic stem cell transplantation, HSCT*): Οι νεότεροι ασθενείς που υπόκεινται σε θεραπεία μπορούν να λάβουν μεταμόσχευση βλαστικών κυττάρων (μεταμόσχευση μυελού των οστών). Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας τα υγιή βλαστικά κύτταρα του ίδιου του ασθενούς ή βλαστοκύτταρα από έναν δότη. Αυτό γίνεται συνήθως για οξεία λευχαιμία εάν η χημειοθεραπεία δεν είναι αποτελεσματική.

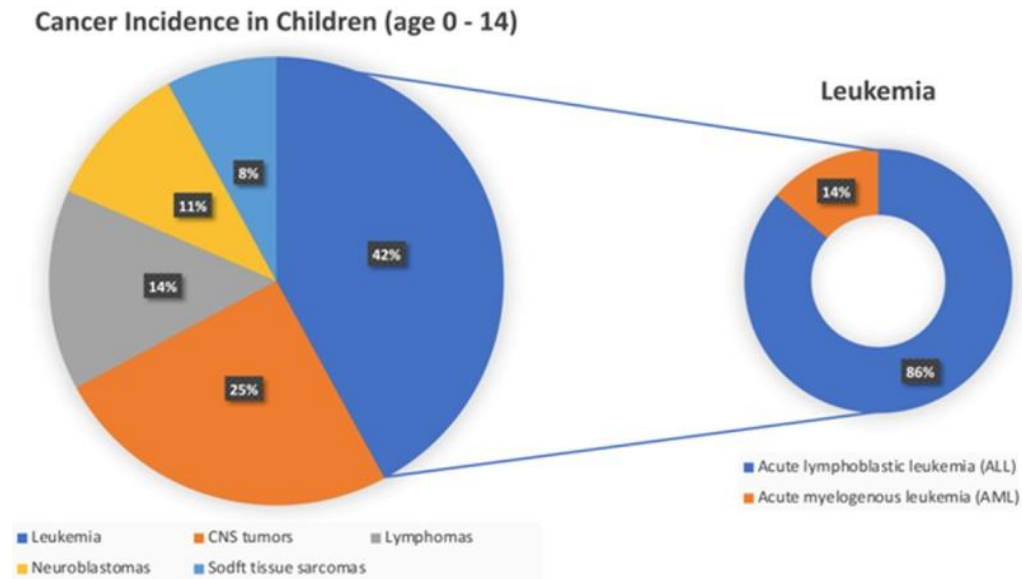
Η χημειοθεραπεία είναι η χρήση φαρμάκων που προκαλούν κυτταρικό θάνατο. Με άλλα λόγια, σκοτώνουν τα καρκινικά κύτταρα και εμποδίζουν τη διαίρεση τους. Η χημειοθεραπεία συνήθως χορηγείται σε «κύκλους» θεραπείας, ένας κύκλος θεραπείας θα

αποτελείται από μια σειρά δόσεων χημειοθεραπείας ακολουθούμενη από μία διακοπή για την ανάκτηση των υγιών κυττάρων.

Μερικοί ασθενείς δεν ξεκινούν θεραπεία αμέσως. Εάν αυτοί δεν λαμβάνουν θεραπεία, υπόκεινται σε τακτικούς ελέγχους, διαδικασία γνωστή και ως "ενεργός έλεγχος". Αυτό αφορά κυρίως τους ασθενείς με ΧΛΛ. Από την άλλη, σχεδόν όλοι οι ασθενείς με ΧΜΛ ή με οξεία λευχαιμία θα ξεκινήσουν τη θεραπεία αμέσως μετά τη διάγνωση. Μερικοί ασθενείς με ΧΛΛ δεν θα χρειαστεί ποτέ να λάβουν θεραπεία. Η οξεία λευχαιμία συχνά θεραπεύεται με τις συνήθεις θεραπείες. Η χρόνια λευχαιμία συνήθως δεν είναι θεραπεύσιμη, αλλά διαχειρίσιμη. Αν και οι περισσότεροι ασθενείς με χρόνια λευχαιμία έχουν καλή αρχική ανταπόκριση στη θεραπεία, η κατάσταση επανέρχεται μερικές φορές, κάτι που είναι γνωστό ως υποτροπή και συνήθως αντιμετωπίζεται χρησιμοποιώντας παρόμοιες θεραπείες με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν τη πρώτη φορά [3].

1.2. ΟΞΕΙΑ ΛΕΜΦΟΒΛΑΣΤΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ (ΟΛΛ)

Τα νεοπλάσματα από πρόδρομα Β- & Τ- λεμφικά κύτταρα (λεμφοβλάστες), συνήθως εκδηλώνονται ως οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ΟΛΛ). Η παραπάνω κατηγορία λευχαιμίας εκδηλώνεται με χαρακτηριστικά μυελικής ανεπάρκειας ενώ πολλοί ασθενείς παρουσιάζουν εξωμυελική ιστική νόσο [4]. Η ΟΛΛ είναι η πιο συνηθισμένη παιδική κακοήθεια, αντιπροσωπεύοντας ένα μεγάλο ποσοστό όλων των καρκίνων παιδικής ηλικίας. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, περίπου 3.000 παιδιά ηλικίας 1-19 ετών διαγιγνώσκονται με ΟΛΛ ετησίως. Ενώ είναι η δεύτερη πιο συχνή οξεία λευχαιμία σε ενήλικες με συχνότητα εμφάνισης που εκτιμάται σε 1,6 ανά 100.000 πληθυσμό. Μόνο το 2016 διαγνώστηκαν 6590 νέες περιπτώσεις, με περισσότερους από 1400 θανάτους εξαιτίας της ΟΛΛ [5-7].



Εικόνα 1.4. Συχνότητα ΟΛΛ σε σύγκριση με άλλους παιδικούς καρκίνους (Πηγή: Larry E, Teresa J. *Childhood cancer incidence and mortality in Canada. Stat Canada Heal a Glance. 2015*)

Το χαρακτηριστικό γνώρισμα της ΟΛΛ είναι χρωμοσωμικές ανωμαλίες και Γενετικές μεταβολές που εμπλέκονται στη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των λεμφικών προδρόμων κυττάρων. Στους ενήλικες, το 75% των περιπτώσεων αναπτύσσεται από πρόδρομες μορφές της γραμμής των Β-κυττάρων, ενώ οι υπόλοιπες περιπτώσεις της γραμμής των κυττάρων Τ. Παραδοσιακά, ο καθορισμός των επιπέδων κινδύνου βασίστηκε σε κλινικούς παράγοντες όπως η ηλικία, ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων και η ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία. Ωστόσο, ο εντοπισμός των επαναλαμβανόμενων γενετικών αλλαγών συνέβαλε στη βελτίωση της ατομικής πρόγνωσης και της διαχείρισης της νόσου [8].

Έχουν σημειωθεί εξαιρετικά σημαντικά βήματα στη διαχείριση της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας της παιδικής ηλικίας κατά τα τελευταία 50 χρόνια, γεγονός που οδήγησε στη βελτίωση των ποσοστών θεραπείας από 10% περίπου στο 90% [9,10].

Η ορθολογική χρήση συστηματικής πολυπαραγοντικής χημειοθεραπείας με παρατεταμένη διάρκεια (2-3 χρόνια) και κατάλληλη θεραπεία με στόχο την προστασία του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ-Central Nervous System, CNS) καθώς και υποστηρικτική δράση από μεριάς των αντιβιοτικών και των προϊόντων αίματος τις δεκαετίες '60 και '70 ήταν σταθμοί για την βελτίωση και τη παράταση του προσδόκιμου ζωής των ασθενών. Ωστόσο, τα νέα δεδομένα για την ετερογενή παθοφυσιολογία της ΟΛΛ και η

παρακολούθηση της ελάχιστης υπολειμματικής νόσου (Minimal residual disease, MRD) έχουν βοηθήσει στην βελτίωση της θεραπείας με βάση τον κίνδυνο υποτροπής ώστε μεγιστοποιηθούν τα ποσοστά ίασης και να ελαχιστοποιηθούν οι τοξικότητες. Για παράδειγμα, η ταυτοποίηση του χρωμοσώματος Philadelphia σε ένα υποσύνολο ασθενών με ΟΛΛ έχει καταστήσει δυνατή την ενσωμάτωση αναστολέων κινάσης τυροσίνης ABL σε θεραπευτικά σχήματα χημειοθεραπείας. Αυτή η προσέγγιση στοχευμένης θεραπείας έχει βελτιώσει τον ρυθμό θεραπείας των ασθενών με ΟΛΛ που είναι θετικοί στο χρωμόσωμα Philadelphia από 35% έως περίπου 70% τα τελευταία 10 χρόνια, ακόμη και χωρίς τη μεταμόσχευση βλαστικών κυττάρων [11].

Παρόλη όμως την πρόοδο στη διαχείριση της νόσου, η κύρια μορφή θεραπείας παραμένει η πολλαπλή χημειοθεραπεία με βινκριστίνη, κορτικοστεροειδή και ανθρακυκλίνη με μεταμόσχευση αλλογενών βλαστικών κυττάρων για τους επιλέξιμους υποψήφιους. Παρά το υψηλό ποσοστό ανταπόκρισης στην επαγωγική χημειοθεραπεία, μόνο το 30-40% των ενήλικων ασθενών με ΟΛΛ θα επιτύχει μακροχρόνια ύφεση, ενώ οι ηλικιωμένοι ασθενείς συχνά αδυνατούν να ανεχθούν τέτοιες θεραπευτικές αγωγές και φέρουν ιδιαίτερα κακή πρόγνωση [8,12].

1.2.1. Μοριακή παθογένεια

Η παθοφυσιολογία της ΟΛΛ περιλαμβάνει τον ανώμαλο πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση ενός κλωνικού πληθυσμού λεμφοειδών κυττάρων. Μελέτες στον παιδικό πληθυσμό έχουν εντοπίσει γενετικά σύνδρομα που προδιαθέτουν για μια μειοψηφία περιπτώσεων ΟΛΛ, όπως το σύνδρομο Down, η αναιμία Fanconi, το σύνδρομο Bloom [4,13-16]. Άλλοι παράγοντες προδιάθεσης περιλαμβάνουν την έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία, τα παρασιτοκτόνα, ορισμένους διαλύτες ή ιούς όπως ο ιός Epstein-Barr και ο ιός της ανθρώπινης ανοσολογικής ανεπάρκειας HIV [17-19].

Κύριο ρόλο στην παθογένεια της ΟΛΛ έχει η τροποποίηση της έκφρασης και της δράσης μεταγραφικών παραγόντων, που έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή του σωστής διαφοροποίησης και το πολλαπλασιασμό νεοπλασματικών κυττάρων. Χρωμοσωμικές μεταθέσεις, που συμβαίνουν σε γονίδια μεταγραφικών παραγόντων προκαλούν τροποποίηση της δράσης τους με δύο μηχανισμούς: α)δημιουργούν χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, δηλαδή υβριδικές πρωτεΐνες με διαφορετική δραστηριότητα, β)

απορρυθμίζουν την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων χωρίς να προκαλούνται όμως μεταβολές στα γονίδια τους αλλά λόγω της γειννίασης τους με γονίδια του T-κυτταρικού υποδοχέα και των ανοσοσφαιρινών, στην πλειονότητα των περιπτώσεων, εμφανίζεται ως *de novo* κακοήθεια σε υγιή άτομα.

Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες είναι το χαρακτηριστικό γνώρισμα της ΟΛΛ, αλλά δεν επαρκούν για την εκδήλωση λευχαιμίας. Χαρακτηριστικές μεταθέσεις περιλαμβάνουν t(12;21) [ETV6-RUNX1], t(9;22) [BCR-ABL1] και αναδιάταξη του MLL [20]. Παρουσιάστηκε παρόμοιο προφίλ γονιδιακής έκφρασης με χρωμόσωμα Philadelphia (Ph-θετική ΟΛΛ, Ph+) αλλά χωρίς την αναδιάταξη BCR-ABL1. Στην ΟΛΛ συχνά παρατηρείται διαταραχή της πλοειδίας, που ανιχνεύεται είτε με κυτταρομετρία ροής είτε με ανάλυση καρυοτύπου. Επιπλέον, πρόσφατα περιγράφηκε η γενετική βάση μιας άλλης υποομάδας με κακή πρόγνωση, η υποδιπλοειδική ΟΛΛ. Σε σχεδόν απλοειδείς περιπτώσεις ΟΛΛ (24-31 χρωμοσώματα), παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις στη σηματοδότηση της τυροσινικής κινάσης ή του μονοπατιού Ras σε 71% των περιπτώσεων. Αντίθετα, σε υποδιπλοειδείς περιπτώσεις ΟΛΛ (32-39 χρωμοσώματα), οι μεταβολές στο p53 (91%) ήταν οι πιο κοινές και ανευρίσκονται συνήθως σε υποτροπές της νόσου. Τόσο τα απλοειδή όσο και τα υποδιπλοειδή περιστατικά εμφάνισαν ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών RAS & PI3K, υποδηλώνοντας ότι αυτές οι οδοί μπορεί να είναι ένας στόχος για θεραπεία σε επιθετικής υποδιπλοειδικής ΟΛΛ [21]. Η υπερπλοειδία φαίνεται να συνδέεται με καλύτερη πρόγνωση σε σχέση με την υποπλοειδία ενώ είναι συχνότερη στα παιδιά.

1.2.2. Ταξινόμηση

Η ΟΛΛ ταξινομείται αρχικά σε B- και T- υπότυπο με βάση τον ανοσοφαινότυπο. Η B- και η T- λευχαιμία χωρίζεται σε περαιτέρω υποτύπους με βάση και πάλι εργαστηριακά ευρήματα (HLA-DR⁺, CD10⁺, CD19⁺ για B φαινότυπο/ cCD3⁺, Tdt⁺ για T φαινότυπο). Παραδοσιακά και μέχρι το 2008, βάσει της ταξινόμησης κατά FAB (French American British), οι λεμφοβλάστες κατατάσσονταν μορφολογικά σε 3 κατηγορίες, οι οποίες αναφέρονταν ως L1 (βλάστες ομοιόμορφοι, μικροί, με ελάχιστο κυτταρόπλασμα, στρογγυλό πυρήνα), L2 (βλάστες μεγάλου μεγέθους με μορφολογική ετερογένεια, ακανόνιστο σχήμα, ανώμαλο πυρήνα με αναδιπλώσεις και αρκετό κυτταρόπλασμα), L3 (βλάστες μεγάλου μεγέθους, ομοιόμορφοι με στρογγυλό πυρήνα και αρκετό βασεόφιλο

κυτταρόπλασμα). Η μορφολογία τύπου L1 είναι πιο συχνή στα παιδιά, ενώ η L2 εμφανίζεται στους ενήλικες [4]. Από την άλλη, η μορφολογία τύπου L3 χαρακτηρίζει την λευχαιμία Burkitt, πλέον όμως δεν υφίσταται σαν υποκατηγορία της ΟΛΛ, καθώς αποδείχθηκε ότι δεν αποτελεί ξεχωριστή οντότητα από το λέμφωμα Burkitt. Έτσι, η Β-λεμφοβλαστική λευχαιμία διαιρείται σε 2 υπότυπους: Β-ΟΛΛ με επαναλαμβανόμενες γενετικές ανωμαλίες, που περιγράφεται περαιτέρω με βάση συγκεκριμένη χρωμοσωμική αναδιάταξη και Β-ΟΛΛ που δεν χαρακτηρίζεται διαφορετικά [4, 22]. Το 2016, δύο νέες υποκατηγορίες προστέθηκαν στον κατάλογο των επαναλαμβανόμενων γενετικών ανωμαλιών και η υποδιπλοειδία επαναπροσδιορίστηκε ως χαμηλή υποδιπλοειδία ή ως υποδιπλοειδία με μεταλλάξεις TP53, όπως αναφέρθηκε παραπάνω [23]. Επιλεκτικά, μερικοί από τους κυριότερους υπότυπους Β- & Τ-ΟΛΛ θα αναλυθούν παρακάτω (Πίνακες 1.1. & 1.2.).

1.2.3. Οξεία Β-λεμφοβλαστική λευχαιμία της παιδικής ηλικίας

Η οξεία Β λεμφοκυτταρική λευχαιμία αποτελεί το 85% των ΟΛΛ της παιδικής ηλικίας, αντίστοιχο ποσοστό με αυτό των ενήλικων ασθενών. Ως επί το πλείστον, προσβάλλονται παιδιά μεταξύ των ηλικιών 2 έως 5 ετών, χωρίς να είναι γνωστά τα αίτια της νόσου και οι εκδηλώσεις της νόσου είναι αντίστοιχες με όλες τις λευχαιμίες. Ως προδιαθεσικοί παράγοντες κατηγορούνται οι ακτίνες Χ, οι χημειοθεραπείες για άλλους όγκους, ενώ έχει αποδειχτεί πως πολλά σύνδρομα, όπως το σύνδρομο Down και το σύνδρομο Li-Fraumeni, με μεταλλάξεις στο γονίδιο TP53, αυξάνουν πάνω από 20 φορές την πιθανότητα εμφάνισης της παιδικής ΟΛΛ. Υπάρχουν πολλοί άλλοι παράγοντες κινδύνου όπως το γονικό κάπνισμα, τα χημικά οικιακής χρήσης και χημικές βαφές, τα παρασιτοκτόνα, η μητρική διατροφή, το καυσαέριο και τα ηλεκτρικά πεδία, αλλά μέχρι στιγμής κανένας δεν έχει αποδειχθεί ότι συμβάλει με βεβαιότητα στην εμφάνιση της παιδικής ΟΛΛ [24].

Περίπου το 75% των περιπτώσεων της παιδικής Β-ΟΛΛ εμφανίζουν ανευπλοειδία ή πολλαπλές χρωμοσωμικές αναδιατατάξεις. Η υπερδιπλοειδία με επιπλέον τουλάχιστον 5 χρωμοσώματα, της οποίας η βιολογική βάση είναι ακόμα άγνωστη, αποτελεί μία από τις συχνότερες μεταβολές και συνδέεται με ευνοϊκή πρόγνωση. Αντίθετα, η υποδιπλοειδία, με λιγότερα από 44 χρωμοσώματα, σχετίζεται με δυσμενή πρόγνωση.

Οι πιο κοινές μετατοπίσεις, σε γονίδια υπεύθυνα για Β-ΟΛΛ σε παιδιατρικούς ασθενείς, περιλαμβάνουν την $t(12;21)$ [*ETV6-RUNX1*] (25%), την $t(1;19)$ [*TCF3-PBX1*], την $t(9;11)$ [*BCR-ABL1*] (3%) και μετατοπίσεις στο γονίδιο *MLL* (5%). Η υπερδιπλοειδία (>50 χρωμοσώματα) συναντάται στο 25% της παιδικής ΟΛΛ, ενώ η υποδιπλοειδία (<44 χρωμοσώματα) αντιπροσωπεύει περίπου το 1% των περιπτώσεων (βλ. Πίνακα 1.1.). Πολλές από αυτές τις γενετικές αλλαγές έχουν προγνωστική και θεραπευτική αξία, καθώς καθορίζουν το επίπεδο κινδύνου της κάθε μορφής Β-ΟΛΛ. Για παράδειγμα, η συνολική επιβίωση των ασθενών με τη μετατόπιση *ETV6-RUNX1* ή υπερδιπλοειδία, είναι μεγαλύτερη του 93%, ενώ οι μετατοπίσεις *TCF3-PBX1* και *BCR-ABL1*, παρά το γεγονός ότι ανήκουν σε υποτύπους υψηλού κινδύνου, έχουν σχετικά καλύτερη πρόγνωση σε σχέση με παλαιότερα. Ταυτόχρονα, η υποδιπλοειδία συνεχίζει να αποτελεί κατηγορία υψηλού κινδύνου, καθιστώντας απαραίτητη την περαιτέρω κατανόηση των ογκογόνων μηχανισμών και την ορθολογική χρήση στοχευμένης θεραπείας (π.χ. αναστολή της οδού RAS). Από την άλλη, η συχνότητα της αναδιάταξης *MLL* και η πρόγνωση, που αυτή φέρει, ποικίλλει ανάλογα με την ηλικία [25,26].

Πίνακας 1.1. Οι κυριότεροι υπότυποι της Β-ΟΛΛ [30,31]

ΥΠΟΤΥΠΟΣ	ΗΛΙΚΙΑ	ΕΜΦΑΝΙΣΗ (%)	ΠΡΟΓΝΩΣΗ	ΣΧΟΛΙΑ
Υπερδιπλοειδία	Παιδιά	20-30	Εξαιρετική πρόγνωση	με >50 χρωμοσώματα
$t(12;21)(p13;q22)$ μετατόπιση κωδικοποίησης <i>ETV6-RUNX1</i>	Παιδιά	15-25	Εξαιρετική πρόγνωση	
$t(1;19)(q23;p13)$ μετατόπιση κωδικοποίησης <i>TCF3-PBX1</i>	Παιδιά & Ενήλικες	2-6	Γενικά εξαιρετική πρόγνωση	Αυξημένη συχνότητα εμφάνισης στους Αφρο-Αμερικανούς. Συσχέτιση με υποτροπή του ΚΝΣ
$t(8;14)(q24;q32)$, $t(2;8)(q12;q24)$, $t(2;8)(q12;q24)$ Αναδιάταξη του MYC		2	Ευνοϊκή πρόγνωση	Βραχυπρόθεσμη χημειοθεραπεία υψηλής δόσης
Διαγραφές κεντρικά του γονιδίου ERG	Παιδιά & Ενήλικες	~7	Ευνοϊκή πρόγνωση	Απορρύθμιση γονιδίου ERG Τροποποιήσεις IKZF1
Υποδιπλοειδία	Παιδιά & Ενήλικες	2-3	Κακή πρόγνωση	με <44 χρωμοσώματα, Υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων στο μονοπάτι Ras & την οικογένεια γονιδίων Ikaros
$t(9;22)(q34;q11.2)$ μετατόπιση κωδικοποίησης <i>BCR-ABL1</i>	Ενήλικες	2-4	Γενικά κακή πρόγνωση	Βελτιωμένη πρόγνωση με την προσθήκη του imatinib και / ή του dasatinib σε σχήμα εντατικής χημειοθεραπείας
$t(4;11)(q21;q23)$ μετατόπιση, οδηγεί σε σύντηξη <i>MLL-AF4</i>	Νεογνά	1-2	Κακή πρόγνωση	Συχνή σε βρέφη <6 μηνών
Αναδιάταξη <i>CRLF2</i>	Παιδιά & Ενήλικες	5-7	Κακή πρόγνωση σε περιπτώσεις μη παρουσίας σ. Down	Συχνή σε περιπτώσεις συνδρόμου Down και Ph-like ΟΛΛ (~ 50% των περιπτώσεων). Συσχέτιση με τη διαγραφή και / ή μετάλλαξη IKZF1 και τη μετάλλαξη JAK1 / 2
Ph-like ΟΛΛ	Ενήλικες	10-15	Κακή πρόγνωση	Βλάβες στην ενεργοποίηση κινάσης. Μεγαλύτερες ηλικίες. Αυξημένος αριθμός λευκών. Τροποποίηση του IKZF1. Ενδεχόμενη θεραπεία με TKI

i. Οξεία λευχαιμία BCR-ABL1+ ή Χρωμοσώματος Φιλαδέλφεια (Ph + ALL)

Η μετατόπιση t(9;22) (q34;q11), που σχετίζεται με το χρωμόσωμα Philadelphia (Ph+), είναι η πιο συνηθισμένη κυτταρογενετική ανωμαλία στους ενήλικες ασθενείς με ΟΛΛ. Η συχνότητα αυξάνεται με την ηλικία, και εμφανίζεται στο 2-5% των παιδιατρικών ασθενών με ΟΛΛ, στο 20% των περιπτώσεων των νεαρών ενηλίκων και στο 30-40% των ηλικιωμένων ενηλίκων ασθενών [29,30]. Το χρωμόσωμα Ph κωδικοποιεί την ογκογόνα πρωτεΐνη μετά από σύντηξη των BCR-ABL1 με συνεχή ενεργή δραστικότητα κινάσης τυροσίνης. Το κύριο σημείο διακοπής, το οποίο δημιουργεί μια πρωτεΐνη 210 kDa, ανιχνεύεται σε 24-50% των ενηλίκων Ph + ALL [31,32], αλλά είναι σπάνιο στην Ph+ ΟΛΛ παιδικής ηλικίας [33]. Το μικρό σημείο διακοπής, το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 190 kDa, είναι πιο διαδεδομένο και μπορεί να ταυτοποιηθεί σε 50-77% των ενηλίκων Ph+ ασθενών [29,32] και περισσότερο από το 90% των παιδιατρικών περιπτώσεων [34].

Η υπερέκφραση του ανασυνδυασμένου γονιδίου BCR-ABL1 οδηγεί στην ενεργοποίηση πολλαπλών μονοπατιών σηματοδότησης όπως MAPK, Ras, NF-kB, c-Myc, PI-3 κινάση και JAK-STAT. Προωθεί επίσης τον πολλαπλασιασμό των λεμφοβλαστών με τη μεταβολή των προ- και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών [35]. Μία από τις κύριες γενετικές μεταβολές σε ασθενείς με BCR-ABL1 είναι οι μεταλλάξεις και οι διαγραφές στο γονίδιο IKZF1, που κωδικοποιούν τον μεταγραφικό παράγοντα Ikaros που σχετίζεται με κακή πρόγνωση και δυσμενή έκβαση και στην Ph+ και Ph- ΟΛΛ [36-38]. Η BCR-ABL θετική ΟΛΛ έχει συσχετιστεί με δυσμενή πρόγνωση και είναι σχεδόν ανίατη μόνο με τη χημειοθεραπεία. Η εμφάνιση των αναστολέων της κινάσης τυροσίνης (TKI) έχει βελτιώσει σημαντικά τα ποσοστά απόκρισης στη θεραπεία και τα συνολικά ποσοστά επιβίωσης, ιδιαίτερα όταν χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία, αν και η υποτροπή παραμένει το κύριο πρόβλημα [39,40].

ii. Οξεία λευχαιμία τύπου BCR-ABL1 ή τύπου χρωμοσώματος Φιλαδέλφεια (Ph-like ALL)

Αυτός ο υποτύπος ΟΛΛ υψηλού κινδύνου εντοπίστηκε για πρώτη φορά από την ομάδα του Mullighan και από Ολλανδούς ερευνητές το 2009, σε δύο ανεξάρτητες έρευνες. Ορίζεται ως ένα μοτίβο γονιδιακής έκφρασης παρόμοιο με εκείνο της BCR-ABL1 θετικής

ΟΛΛ [36,41,42], αλλά χωρίς έκφραση της πρωτεΐνης BCR-ABL1. Η λεγόμενη οξεία λευχαιμία τύπου BCR-ABL1 ή τύπου χρωμοσώματος Φιλαδέλφεια (Ph-like ALL) είναι πιο διαδεδομένη σε εφήβους και νεαρούς ενήλικες με Β-ΟΛΛ, που περιλαμβάνει περίπου 15% παιδιατρικών ασθενών ηλικίας 12-18 ετών και 20-25% νεαρών ενήλικων ασθενών [43, 44-47]. Συσχετίζεται με ανεπιθύμητη ανταπόκριση στην επαγωγική χημειοθεραπεία, υψηλότερη συχνότητα μόνιμης ελάχιστης υπολειμματικής νόσου (MRD) και κακή επιβίωση [37,44,48]. Πρόκειται για τον πλέον συχνότερο υπότυπο των παιδιατρικών ασθενών και νεαρών ενηλίκων, που συνδέεται με δυσμενή πρόγνωση, και εμφανίζει περίπου 60% πενταετή επιβίωση χωρίς ασθένεια [41,44]. Η αναθεώρηση της ταξινόμησης των μυελοειδών νεοπλασμάτων και της οξείας λευχαιμίας από τον ΠΟΥ το 2016 αναγνώρισε την Ph-like ΟΛΛ ως νέα οντότητα λευχαιμίας κλινικής σημασίας και αυτό λόγω της συσχέτισης της με μια δυσμενή πρόγνωση αλλά και με την ανταπόκριση στις TKI [23].

Η γονιδιακή της έκφραση ενεργοποιείται από ένα πολύ ευρύ φάσμα διαφορετικών γενετικών παρεκκλίσεων, που έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση υποδοχέα κυτταροκίνης και/ή σηματοδότησης κινάσης τυροσίνης [37,43,44,49, 50]. Πιο συγκεκριμένα, οι μεταλλάξεις επηρεάζουν γονίδια που κωδικοποιούν κινάσες (AK1, JAK2, JAK3, ABL1, ABL2, και TYK2), υποδοχείς κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων (CRLF2, PDGFRB, EPOR) και μεσολαβητές και ρυθμιστές σηματοδότησης (KRAS, NRAS, BRAF, PTPN11, NF1). Αυτές οι παρεκκλίσεις μπορούν να είναι διαφόρων τύπων, μικρής κλίμακας (διαγραφές, παρεμβολές, υποκαταστάσεις και σύνθετες μεταλλάξεις) και μεταλλάξεις μεγάλης κλίμακας (χρωμοσωμικές μεταθέσεις και εξαλείψεις) οι οποίες μπορούν να δημιουργήσουν γονίδια σύντηξης.

Οι διαγραφές IKZF1 εντοπίζονται επίσης, όπως και οι αναδιατάξεις CRLF 2 που είναι συνηθέστερες και σχετίζεται με το σύνδρομο Down και εξαρτώνται από την ηλικία, με τη P2RY8-CRLF2 να εμφανίζεται σε νεαρές ηλικίες [20,51]. Το CRLF2 υπερεκφράζεται στην κυτταρική επιφάνεια των λευχαιμικών λεμφοβλαστών και ανιχνεύεται με κυτταρομετρία ροής. Η πλειονότητα των αναδιατάξεων CRLF2 έχουν επιπρόσθετες αλλαγές που οδηγούν σε JAK-STAT ή Ras σηματοδότηση [36,41,52]. Στις περισσότερες μελέτες, οι ανακατατάξεις CRLF2 σχετίζονται με κακή πρόγνωση, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις συνύπαρξης IKZF1 τροποποιήσεων [53,54].

Παρόλο που η θεραπεία που βασίζεται σε ομάδες κινδύνου περιλαμβάνει εντατική χημειοθεραπεία με ή χωρίς μεταμόσχευση με βάση το επίπεδο MRD κατά τη διάρκεια της ύφεσης, μπορεί να βελτιώσει τη κακή πρόγνωση αυτής της ομάδας ασθενών, είναι σημαντικό να αναζητηθούν γενετικές βλάβες που ανταποκρίνονται στον αναστολέα της ABL κινάσης τυροσίνης, έτσι ώστε μερικοί ασθενείς να μπορούν να απαλλαγούν από τη μεταμόσχευση [55].

iii. Υποδιπλοειδική Β-ΟΛΛ

Αυτός ο λευχαιμικός υπότυπος, ο οποίος χαρακτηρίζεται από την παρουσία λιγότερων από 44 χρωμοσωμάτων, περιλαμβάνει το 2-3% των ασθενών με ΟΛΛ και συνδέεται με κακή πρόγνωση [56]. Χωρίζεται σε διαφορετικές κατηγορίες με ξεχωριστές γενετικές τροποποιήσεις: α) Η ΟΛΛ με χαμηλή υποδιπλοειδία (32 έως 39 χρωμοσώματα), σχετίζεται με αρκετές ανωμαλίες, συμπεριλαμβανομένων των μεταλλάξεων TP53 (στο 91% των ασθενών), του RB1 (στο 41% των περιπτώσεων) και των αλλαγών του IKZF2 (στο 53% των περιπτώσεων). Οι μεταλλάξεις TP53 στις μισές περιπτώσεις ΟΛΛ παιδικής ηλικίας, προκαλούν την εκδήλωση συνδρόμου Li-Fraumeni και για τη κλινική διάγνωση απαιτείται ανίχνευση της μετάλλαξης TP53. β) Η ΟΛΛ με σχεδόν απλοειδία (24 έως 31 χρωμοσώματα), που συνδέεται με τροποποιήσεις όπως αλλοιώσεις IKZF3 (στο 13% των ασθενών) και μεταλλάξεις που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση της οδού σηματοδότησης Ras (στο 71% των περιπτώσεων). γ) Οι περιπτώσεις παιδιατρικών υποδιπλοειδών ΟΛΛ, οι ανωμαλίες που ανιχνεύονται με την αλληλουχία επόμενης γενιάς (NGS), περιλαμβάνουν σηματοδότηση RAS (NRAS, KRAS, FLT3 και NF1), υποδοχείς κινασών τυροσίνης (70% σχεδόν απλοειδείς περιπτώσεις), μετάλλαξη IKZF2 και TP53 (σε χαμηλά ποσοστά) [21,38]. Καθώς οι δίαυλοι σηματοδότησης Ras και PI3K ενεργοποιούνται και στις δύο περιπτώσεις (απλοειδία και χαμηλή υποδιπλοειδία), μπορούν να θεωρηθούν ως δυνητικοί στόχοι στη θεραπεία της υποδιπλοειδικής ΟΛΛ [21,23,56].

iv. iAMP21

Ο υπότυπος ΟΛΛ με ενδοχρωμοσωμική ενίσχυση του χρωμοσώματος 21 (iAMP21), που ορίζεται ως η ύπαρξη τουλάχιστον 3 αντιγράφων της περιοχής του χρωμοσώματος 21, που περιέχει το γονίδιο RUNX1, ανακαλύφθηκε αρχικά με την παρατήρηση πολλαπλών αντιγράφων του γονιδίου RUNX1 κατά τη διάρκεια του συστηματικού ελέγχου για το

ETV6-RUNX1 με φθορίζων *in situ* υβριδισμό (Fluorescence *in situ* hybridization, FISH). Το iAMP21 χαρακτηρίζεται από την αστάθεια του χρωμοσώματος, με πολύπλοκες δομικές αλλοιώσεις με μεγάλες περιοχές ενίσχυσης [57,58]. Η επίπτωση του iAMP21 είναι περίπου 2% και η μέση ηλικία των ασθενών με Β-ΟΛΛ είναι 9-11 έτη, ενώ σχετίζεται και με μεγαλύτερες ηλικίες και κακή πρόγνωση [59]. Η εντατικοποίηση της χημειοθεραπείας έχει θέσει το τέλος της μέχρι πρότινος κακής πρόγνωσης που συσχετιζόταν με αυτόν τον υπότυπο ΟΛΛ [59].

v. Υπερδιπλοειδία

Η υπερδιπλοειδία εμφανίζεται στο 25% περίπου της παιδικής ΟΛΛ και έχει ευνοϊκή πρόγνωση. Αυτές οι περιπτώσεις έχουν συσχετισθεί με περίπου δεκαπλάσια υπερέκφραση του γονιδίου SH3BP5, το οποίο κωδικοποιεί SH3 πρωτεΐνη δέσμησης 5 που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 3p24. Αυτή η πρωτεΐνη μπορεί να εμπλέκεται στη μεταφορά σημάτων από τον υποδοχέα της κινάσης της τυροσίνης του Bruton (BTK), υποδεικνύοντας ότι αυτός ο υποδοχέας ή οι καθοδικές οδοί σηματοδότησης μπορεί να αποτελούν δυνητικούς θεραπευτικούς στόχους [36,60]. Διαταραχές στο γονίδιο CREBBP έχουν επίσης εντοπιστεί σε υποτροπιάζουσες υπερδιπλοειδίες [61].

1.2.4. Οξεία T-λεμφοβλαστική λευχαιμία της παιδικής ηλικίας

Η T-ΟΛΛ είναι λιγότερο συχνή από τη Β-ΟΛΛ, με συχνότητα 10-15%. Η μέση ηλικία εκδήλωσης της νόσου είναι τα 9 έτη με τα αγόρια να έχουν τριπλάσια πιθανότητα εκδήλωσης της νόσου σε σχέση με τα κορίτσια. Η διαφορά αυτή ανάμεσα στα δύο φύλα δεν είναι απολύτως κατανοητή, παρόλα αυτά πιστεύεται ότι οφείλεται σε μεταλλάξεις ή διαγραφές ογκοκατασταλτικών γονιδίων του χρωμοσώματος X. Η μόνη επιβεβαιωμένη εξωγενής αιτία της ΟΛΛ είναι η ιονίζουσα ακτινοβολία [62].

Κατά την ανάλυση του καρυότυπου του ασθενή, η μελέτη των ζωνών των χρωμοσωμάτων αποκαλύπτει κλωνικές ανωμαλίες σε ποσοστό 55-75% της παιδικής T-ΟΛΛ. Αυτό το ποσοστό αυξάνεται, αν χρησιμοποιηθούν πιο ειδικές τεχνικές, όπως FISH ή μελέτη πολυμορφισμών (SNPs). Περίπου το 70% των καρυοτυπικά μη φυσιολογικών παιδιατρικών περιπτώσεων T-ΟΛΛ εμφανίζουν ψευδοδιπλοειδία έχοντας 46 χρωμοσώματα. Στις υπόλοιπες περιπτώσεις, ο αριθμός των χρωμοσωμάτων ποικίλλει, από 45 μέχρι και 47- 49. Οι δομικές μεταβολές των χρωμοσωμάτων είναι πολύ συχνότερες από

τις τρισωμίες/μονοσωμίες: Το 65% των περιπτώσεων φέρει μόνο δομικές ανωμαλίες, το 25% τόσο δομικές όσο και αριθμητικές και το 10% άλλες ανωμαλίες.

Περίπου στο 30% των περιπτώσεων T-ΟΛΛ, κύριο πρόβλημα αποτελούν οι μετατοπίσεις ή αναστροφές στην περιοχή των γονιδίων του T-κυτταρικού υποδοχέα (T-cell receptor, TCR). Επιπλέον, διαγραφές στον 6q βραχίονα (~20%), απώλεια του 9p βραχίονα μέσω διαγραφών ή μη ισορροπημένων μετατοπίσεων (~15%) τρισωμίες 8, διαγραφές του 11q βραχίονα και απώλεια του 12p βραχίονα (5-10%) αποτελούν μερικές από τις δομικές ανωμαλίες της παιδικής T-ΟΛΛ (βλ. Πίνακα 1.2.) [24,63].

Σχετικά με την επιβίωση, όταν τη δεκαετία του 1960 μόνο το 5-10% των ασθενών παιδικής ΟΛΛ θεραπεύονταν, πλέον τα ποσοστά της έχουν βελτιωθεί σημαντικά. Η γενική επιβίωση χωρίς νόσο για παιδιά, εφήβους και νεότερους ενήλικες με T-ΟΛΛ κυμαίνεται πλέον μεταξύ 70% και 80%, την ώρα όμως που οι υποτροπιάζουσες μορφές T-ΟΛΛ έχουν συνολική επιβίωση μόλις 20%. Τα τελευταία χρόνια, με τις οι θεραπείες να στοχεύουν ειδικές εξειδικευμένες για τη λευχαιμία μεταλλάξεις, οι οποίες πλέον αναγνωρίζονται ευκολότερα μέσω του NGS, η πρόγνωση της νόσου θα βελτιωθεί [24].

Πίνακας 1.2. Οι κυριότεροι υπότυποι της T-ΟΛΛ [30]

ΥΠΟΤΥΠΟΣ	ΗΛΙΚΙΑ	ΕΜΦΑΝΙΣΗ (%)	ΠΡΟΓΝΩΣΗ	ΣΧΟΛΙΑ
t(1:7)(p32;q35) t(1:14)(p32;q11) μεταθέσεις διάμεση διαγραφή 1p32	Ενήλικες	15-18	Γενικά ευνοϊκή πρόγνωση	Δυσλειτουργία του TAL1
t(11:14)(p15;q11) μετάθεση διαγραφή του 5' LMO2	Παιδιά	10	Γενικά ευνοϊκή πρόγνωση	Δυσλειτουργία του LMO2
t(10:14)(q24;q11) και t(7:10)(q35;q24) μεταθέσεις	Ενήλικες	7	Καλή πρόγνωση	Δυσλειτουργία του TLX1 [HOX11]
t(5:14)(q35;q32) μετάθεση	Παιδιά & Ενήλικες	20	Κακή	Δυσλειτουργία του TLX3
<i>MLL-MLLT1 [MLL-ENL]</i>	Παιδιά	2-3		Καλύτερη πρόγνωση σε σχέση με άλλους τύπους λευχαιμίας με τροποποιημένο MLL
Ενίσχυση του 9q34 που κωδικοποιεί το NUP214-ABL1	Παιδιά	6		Ενδεχόμενη θεραπεία με TKI, που επίσης χρησιμοποιούνται σε B-ΟΛΛ υψηλού κινδύνου. Άλλες συγχωνεύσεις που ταυτοποιούνται σε T-ΟΛΛ περιλαμβάνουν τις EML1-ABL1, ETV6-JAK2 και ETV6-ABL1
Πρώμη T-ΟΛΛ	Παιδιά & Ενήλικες	10-15	Κακή πρόγνωση	Ανώριμος ανοσοφαινότυπος, έκφραση των δεικτών μυελοειδών και / ή βλαστικών κυττάρων γενετικά ετερογενής με μεταλλάξεις σε αιματοποιητικούς παράγοντες, κυτταροκίνες και στο σηματοδοτικό μονοπάτι Ras ευνοϊκότερη πρόγνωση σε πρόσφατες μελέτες.

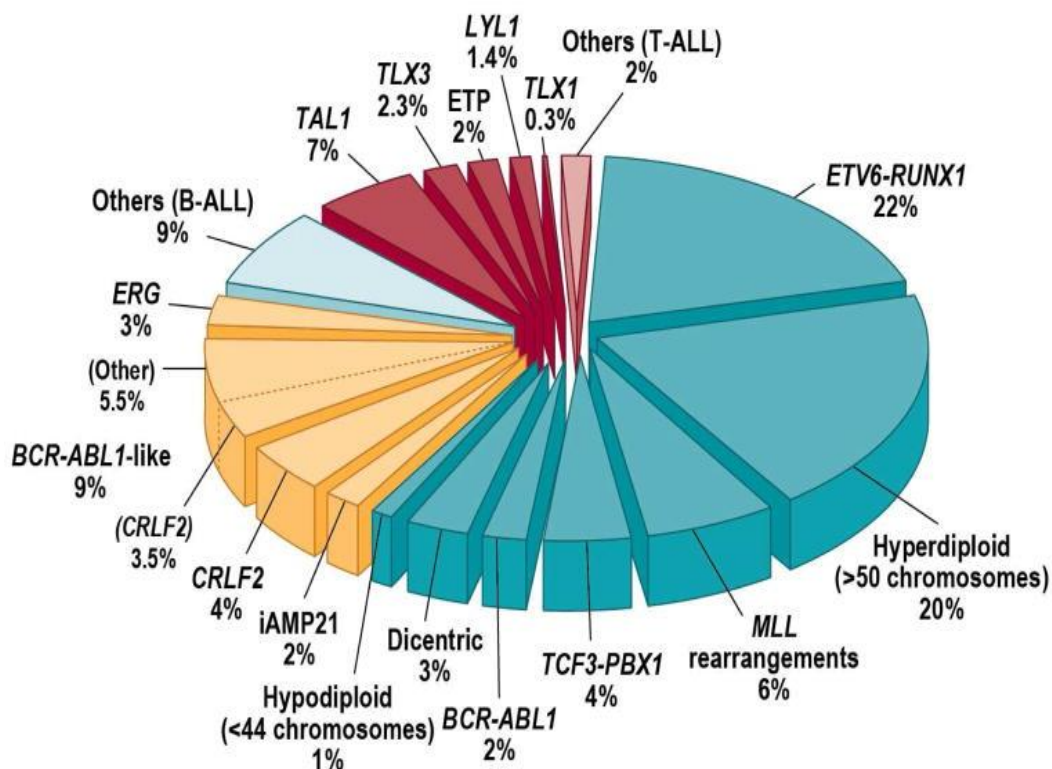
i. Ενεργοποίηση του μονοπατιού NOTCH

Η ενεργοποίηση της NOTCH σηματοδότησης μέσω σωματικών κυρίως μεταλλάξεων, παρατηρείται σε περισσότερο από το 50% των ασθενών με T-ΟΛΛ [64]. Γενικά, η παρουσία των NOTCH1 μεταλλάξεων δείχνει ευνοϊκή πρόγνωση. Το NOTCH1 είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας σγματικός για την ανάπτυξη T-κυττάρων. Η ενεργοποίηση του NOTCH1 με την παρουσία συνεργικών βλαβών, όπως η διαγραφή του ογκοκατασταλτικού CDKN2A βρίσκεται στο 70% των ασθενών με T-ΟΛΛ. Επιπλέον, οι μεταλλάξεις στο FBXW7, που κωδικοποιούν μια λιγάση της πρωτεΐνης ουμπικουΐτινης, που απαντάται στο 8% -10% των ασθενών με T-ΟΛΛ, μπλοκάρουν την αποικοδόμηση του ενεργοποιημένου NOTCH1, ενισχύοντας περαιτέρω τη συνεχή σηματοδότηση [65]. Έτσι, η ανατολή του NOTCH1, είτε με μοριακούς αναστολείς γάμμα-σεκρετάσης, που καταστέλλουν την ενεργοποίηση του NOTCH1, είτε με αντι-NOTCH1 αντισώματα, ακολουθείται ως θεραπευτική στρατηγική για την T-ΟΛΛ [66,67].

ii. Πρώιμη T-ΟΛΛ

Τα πρώιμα κύτταρα T T (Early T-cell precursors, ETPs) είναι ένα υποσύνολο ανώριμων θυμοκυττάρων που διατηρούν τα χαρακτηριστικά βλαστοκυττάρων και μπορούν να διαφοροποιηθούν σε πολλαπλές σειρές, συμπεριλαμβανομένης της λεμφοειδούς και μυελοειδούς σειράς. Συμπληρωματικές μελέτες της γονιδιακής έκφρασης και του αριθμού αντιγράφων DNA, με κυτταρομετρίας ροής, έδειξαν ότι το γενετικό προφίλ περίπου 12% των ασθενών με T-ΟΛΛ είναι παρόμοιο με εκείνο αυτών των ανώριμων θυμοκυττάρων [68]. Στην πρώιμη T-ΟΛΛ εντοπίζονται συχνά μεταλλάξεις γονιδίων που εμπλέκονται στην αιμοποίηση, την σηματοδότηση υποδοχέα κυτταροκίνης και RAS και την τροποποίηση χρωματίνης [69]. Η συχνότητα εμφάνισης των μεταλλάξεων του ενεργοποιημένου μονοπατιού NOTCH1 είναι χαμηλή στην πρώιμη T-ΟΛΛ, η οποία επίσης δεν εμφανίζει κάποια συγκεκριμένη χρωμοσωμική ανωμαλία.

Γενικά, η πρόγνωση για τους ασθενείς με πρώιμη T-ΟΛΛ είναι κακή, αλλά οι επιγενετικές θεραπείες μπορεί να είναι επωφελείς για αυτούς [69]. Μια πρόσφατη μικρή μελέτη έδειξε ότι αυτοί οι ασθενείς εμφανίζουν ένα ίσως ενθαρρυντικό αποτέλεσμα όταν υποβάλλονται σε θεραπεία με εντατική χημειοθεραπεία που περιλαμβάνει ασπαραγινάση και δεξαμεθαζόνη (5ετή επιβίωση χωρίς συμβάντα 76,7%), μια διαπίστωση ωστόσο, που απαιτεί επιβεβαίωση [69].



Εικόνα 1.5. Κυτταρογενετικές και μοριακές γενετικές ανωμαλίες στην ΟΛΛ παιδικής ηλικίας (Πηγή: Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. *Acute lymphoblastic leukaemia. Lancet.* 2013;381(9881):1943–1955. doi:10.1016/S0140-6736(12)62187-4)

1.2.5. Διάγνωση

1.2.5.1. Κλινικά ευρήματα

Όπως έχει ήδη αναφερθεί για τη συμπτωματολογία των αιματολογικών κακοηθειών, τα σημάδια και τα συμπτώματα που παραπέμπουν σε λευχαιμία είναι ασαφή και μη ειδικά. Δεν υπάρχει συγκεκριμένη κλινική εικόνα οποιουδήποτε τύπου λευχαιμίας που θα επέτρεπε στο γιατρό να προχωρήσει σε ασφαλή διάγνωση χωρίς εργαστηριακές εξετάσεις. Οι ασθενείς με ΟΛΛ συνήθως εμφανίζουν πυρετό με ή χωρίς την ύπαρξη λοίμωξης, συμπτώματα αναιμίας και αιμορραγικές εκδηλώσεις απόρροια της γενικότερης πανκυτταροπενίας. Σε κάποιες περιπτώσεις T-ΟΛΛ, οι ασθενείς μπορεί να παρουσιάσουν συμπτώματα ογκώδους μάζας μεσοθωρακίου με εικόνα πλευρίτιδας ή περικαρδίτιδας. Στα παιδιά παρατηρούνται συχνά οστικά άλγη, δύσπνοια και κόπωση. Ένα μικρό ποσοστό ασθενών εμφανίζει συμπτώματα που προκύπτουν από τη προσβολή του ΚΝΣ, όπου και

απαιτούνται επιπλέον εργαστηριακές εξετάσεις. Παράλληλα, λεμφαδενοπάθεια, σπληνομεγαλία και ηπατομεγαλία εμφανίζει η πλειοψηφία των ασθενών [4].

1.2.5.2. Εργαστηριακά ευρήματα

i. Γενική εξέταση αίματος και επίχρισμα αίματος

Στη γενική αίματος συνήθως παρατηρείται μείωση στα ερυθρά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια και αύξηση του αριθμού των λευκών (λευκοκυττάρωση). Το εύρημα αυτό οφείλεται στη παρουσία λεμφοβλαστών. Με το επίχρισμα αίματος διαπιστώνεται η παρουσία λεμφοβλαστών και επιβεβαιώνεται η λευκοκυττάρωση. Συχνή είναι η εμφάνιση σοβαρής ουδετεροπενίας, θρομβοπενίας και αναιμίας με την αιμοσφαιρίνη να είναι <10g/dl [4,70]. Η πρώτη προσπάθεια ταξινόμησης της ΟΛΛ κατά τη διάγνωση, γίνεται κατά FAB, όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω. Η συγκεκριμένη ταξινόμηση αφορά τις 2 πλέον μορφολογικές κατηγορίες λεμφοβλαστών L1 (βλάστες ομοιόμορφοι, μικροί, με ελάχιστο κυτταρόπλασμα, στρογγυλό πυρήνα), L2 (βλάστες μεγάλου μεγέθους με μορφολογική ετερογένεια [4].

ii. Μυελός των οστών

Η διήθηση του μυελού από βλάστες ξεπερνά το ποσοστό του 50%. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η αναρρόφηση μυελού είναι σχεδόν αδύνατη με αποτέλεσμα τη λήψη ελάχιστου ή και καθόλου δείγματος. Από την άλλη, η οστεομυελική βιοψία περιλαμβάνεται και αυτή στον διαγνωστικό έλεγχο, προσφέροντας πληροφορίες για τη φυσιολογική αιματοποίηση και για την πιθανότητα νέκρωσης του ιστού [4, 70].

iii. Οσφυονωτιαία παρακέντηση

Η συγκεκριμένη εξέταση ενδείκνυται σε όλους τους ασθενείς κατά τον διαγνωστικό έλεγχο. Διήθηση του ΚΝΣ εμφανίζεται στο 5-10% των ασθενών με ΟΛΛ και συνήθως είναι ασυμπτωματική. Στην περίπτωση διήθησης του ΚΝΣ, στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) εντοπίζονται λεμφοβλάστες όπου γίνονται εύκολα εμφανείς σε φυγοκεντρημένα δείγματα με χρώση MG-G, ενώ μπορούν να μελετηθούν και ανοσοφαινοτυπικά και με κυτταρομετρία ροής. Επίσης παρατηρείται αύξηση λευκόματος και μείωση σακχάρου [4].

iv. Ανοσοφαινότυπος

Πραγματοποιούνται διάφορες κυτταροχημικές μελέτες με κυτταρομετρία ροής εξετάζοντας ένα λεπτομερές πάνελ επιφανειακών και κυτταροπλασματικών δεικτών. Η

ανοσοφαινοτυπική ανάλυση είναι σημαντική ώστε να καθοριστεί μορφολογικά ο τύπος της ΟΛΛ, ιδιαίτερα στη διαφορική διάγνωση και περαιτέρω υποκατηγοριοποίηση της νόσου σε Β- και Τ- λευχαιμίες. Πράγμα που είναι εφικτό λόγω της πληθώρας δεικτών που έχουν αποδειχθεί και χρησιμοποιούνται στη διάγνωση. Σχεδόν το 85% των οξείων λεμφοβλαστικών λευχαιμιών προέρχονται από τη Β- κυτταρική σειρά, με πολλές υποκατηγορίες ανάλογα με την ωρίμανση των Β λεμφοκυττάρων. Αντίστοιχα, στο 15-20% περίπου των περιπτώσεων ΟΛΛ, η Τ- κυτταρική σειρά παρουσιάζει συχνότητα, με επίσης δικές της υποκατηγορίες ανάλογα με τη κυτταρική ωρίμανση (βλ. υποενότητες 1.2.3. & 1.2.4.) [70].

Η ΟΛΛ ταξινομείται αρχικά σε Β- και Τ- υπότυπο με βάση τον ανοσοφαινότυπο. Η Β- και η Τ- λευχαιμία χωρίζεται σε περαιτέρω υποτύπους με βάση και πάλι εργαστηριακά ευρήματα (HLA-DR⁺, CD10⁺, CD19⁺ για Β φαινότυπο/ CD3⁺, Tdt⁺ για Τ φαινότυπο). Για παράδειγμα, στο 20% των ασθενών με Β-ΟΛΛ, παρατηρείται έκφραση των μυελικών δεικτών CD13 & CD33 και μάλιστα σε μεγαλύτερη συχνότητα στις περιπτώσεις χρωμοσώματος Philadelphia. Επίσης ο δείκτης CD34 των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων είναι θετικός. Για τη διάγνωση της Τ-ΟΛΛ απαιτείται η έκφραση της Tdt (τελική δεοξυνουκλεοτιδική τρανσφεράση) καθώς και του αντιγόνου CD3. Παράλληλα η έκφραση του CD7 είναι σχεδόν καθολική στις περιπτώσεις Τ-ΟΛΛ χωρίς όμως να αποτελεί ειδικό δείκτη καθώς εμφανίζεται και στην οξεία μυελογενή λευχαιμία. Και στην Τ-ΟΛΛ παρατηρείται έκφραση των CD13, CD33 και CD34 [4].

ν. Κυτταρογενετικά και μοριακά ευρήματα

Τέλος, συμπληρωματικά στις παραπάνω αναλύσεις που γίνονται, βοηθούν και οι κυτταρογενετικές και μοριακές μελέτες. Οι ανακατατάξεις, μεταθέσεις, αναστροφές, κλπ που πραγματοποιούνται στα χρωμοσώματα και στα γονίδια μπορούν να ανιχνευτούν αρκετά εύκολα με την εφαρμογή τεχνικών όπως η FISH και η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR) [70]. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ανίχνευση του χρωμοσώματος Philadelphia, του οποίου η αξία αναλύθηκε πρωτύτερα, μπορεί να γίνει σε μοριακό επίπεδο ταχύτερα από ότι στο καρυότυπο, με RT-PCR για την υβριδική πρωτεΐνη bcr-abl [4].

1.2.6. Προγνωστική ταξινόμηση

Η ακριβής αξιολόγηση της πρόγνωσης είναι κρίσιμη στη διαχείριση της ΟΛΛ. Ο καθορισμός των επιπέδων κινδύνου επιτρέπει στο γιατρό να επιλέξει το καταλληλότερο αρχικό θεραπευτικό σχήμα καθώς επίσης και να εξετάσει το ενδεχόμενο μεταμόσχευσης αλλογενών βλαστικών κυττάρων (Allo-SCT).

Οι προβλεπτικοί δείκτες εντοπίζουν τους ασθενείς με διαφορετική ανταπόκριση στη θεραπεία (π.χ. εκείνοι που ανταποκρίνονται ή εκείνοι που ενδέχεται να εμφανίσουν ανεπιθύμητες παρενέργειες) και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να καθορίσουν τις επιλογές θεραπείας [71,72]. Στην ογκολογία, οι μελέτες σχετικά με προβλεπτικούς δείκτες εξετάζουν την επίδραση της θεραπείας στον καρκίνο [73] και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επιλογή των ασθενών ή για την παροχή πληροφοριών σχετικά με την έγκαιρη ανταπόκριση στη θεραπεία [74].

Αντίθετα, οι προγνωστικοί παράγοντες περιγράφουν τις διαφορές μεταξύ των ομάδων ασθενών που αντιμετωπίζουν κίνδυνο, με δεδομένο ένα πρότυπο ή όχι (δηλαδή η θεραπεία διατηρείται σταθερή) [73,74]. Ένας προγνωστικός παράγοντας στην ογκολογία είναι ένα κλινικό ή βιολογικό μέτρο που προβλέπει κλινική πορεία ή έκβαση (π.χ. την υποτροπή) [71]. Πιο συγκεκριμένα και απλούστερα, ένας προγνωστικός παράγοντας είναι ένα χαρακτηριστικό του ασθενούς ή της νόσου που επηρεάζει την πορεία της κατάστασης της υγείας του ασθενούς [73,74]. Η δυναμική ενός προγνωστικού παράγοντα στην ΟΛΛ είναι ότι παρέχει πληροφορίες σχετικά με τον κίνδυνο υποτροπής έτσι ώστε η θεραπεία να μπορεί να τροποποιηθεί ώστε να ελαχιστοποιηθεί η χημειοθεραπευτική τοξικότητα χωρίς να διακυβεύεται η επιβίωση [74]. Αν και δεν χρειάζεται ένας προγνωστικός παράγοντας να είναι και προβλεπτικός δείκτης για να έχει αξία, μπορεί να είναι εάν υπάρχει αιτιακή συσχέτιση ή επηρεάζει κάποιο βιολογικό μηχανισμό [75].

i. Ηλικία

Ιστορικά, η ηλικία και ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων κατά τη στιγμή της διάγνωσης έχουν χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό των ασθενών σε ομάδες κινδύνου. Η προχωρημένη ηλικία αποτελεί μια κακή πρόγνωση. Οι ασθενείς ηλικίας άνω των 60 ετών έχουν ιδιαίτερα κακές εκβάσεις, με μόνο μακροχρόνια επιβίωση 10-15%. Η ηλικία είναι τουλάχιστον ένα υποκατάστατο για άλλους προγνωστικούς παράγοντες, καθώς οι ηλικιωμένοι τείνουν να παρουσιάζουν δυσμενέστερη βιολογία νόσου (π.χ. Χρωμόσωμα

Φιλαδέλφεια, υποδιπλοειδία και σύνθετος καρυότυπος) και αδυναμία να ανεχθούν τυπικά σχήματα χημειοθεραπείας. Σε δοκιμή για τον προσδιορισμό της βέλτιστης θεραπείας, βρέθηκε σημαντική διαφορά στην επιβίωση χωρίς νόσο (Disease Free Survival, DFS) και στη συνολική επιβίωση (Overall Survival, OS) με βάση ένα όριο των 35 ετών σε Ph(-) αρνητική νόσο.[76]. Όσον αφορά την παιδική λευχαιμία, η βρεφική ηλικία και η ηλικία 10 ετών και άνω σχετίζονται με κακή πρόγνωση [77, 78-80].

ii. Αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων

Ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων (White Blood Cells, WBC) κατά τη διάγνωση είναι ένας άλλος σημαντικός προγνωστικός παράγοντας που έχει σημαντική αναφορά σε κάθε σχετική μελέτη. Σε κλινικές μελέτες έχει συχνά χρησιμοποιηθεί ένα αυθαίρετο όριο αριθμού WBCs $30 \times 10^9 / l$ για τη Β-ΟΛΛ και $100 \times 10^9 / l$ για την Τ-ΟΛΛ. Είναι πολύ πιθανό ο αριθμός των WBCs να θεωρηθεί, τουλάχιστον εν μέρει, υποκατάστατο άλλων προγνωστικών παραγόντων, όπως η μετατόπιση t(4;11)(q21;q23) ή έκφραση BAALC (Brain And Acute Leukemia Cytoplasmic Protein), που σχετίζονται έτσι κι αλλιώς με υψηλό αριθμό WBC ($\geq 50 \times 10^9 / L$). Ένα άλλο παράδειγμα δυσάρεστης πρόγνωσης, που συσχετίζει 3 στην ουσία χαρακτηριστικά, είναι τα βρέφη ηλικίας <6 μηνών με αναδιάταξη MLL και πολύ υψηλό αριθμό WBCs ($>300 \times 10^9 / L$) [81,82]. Αντίθετα, η μετατόπιση t(12;21)(p13;q22), που οδηγεί στη σύντηξη των γονιδίων ETV6-RUNX1, είναι γνωστό ότι προσδίδει καλύτερη πρόγνωση στην ΟΛΛ παιδικής ηλικίας και σχετίζεται γενικά με χαμηλά επίπεδα λευκών αιμοσφαιρίων [83]. Σε άλλη μελέτη σχετικά με τη Ph(-) αρνητική ΟΛΛ βρέθηκε αυξημένος αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων κατά τη διάγνωση, ο οποίος και αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για το DFS και το OS και ορίζεται ως $>30 \times 10^9$ για το Β-ΟΛΛ ή $>100 \times 10^9$ για τον Τ-ΟΛΛ. Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων και σε συνδυασμό με την ηλικία των ασθενών, η Ph(-) αρνητική ΟΛΛ θα μπορούσε να κατηγοριοποιηθεί ως χαμηλού κινδύνου (χωρίς παράγοντες κινδύνου σχετικά με την ηλικία ή τον αριθμό των λευκοκυττάρων), ενδιάμεσου κινδύνου (ηλικία > 35 ετών ή αυξημένος αριθμός WBC) και υψηλού κινδύνου (ηλικία >35 ετών και αυξημένος αριθμός WBC). Τα ποσοστά συνολικής επιβίωσης 5 ετών, που βασίζονται σε αυτές τις κατηγορίες κινδύνου ήταν 55, 34 και 5% αντίστοιχα [76].

Risk Group	Age, Years	White Blood Cell Count at Diagnosis	Other Influential Factors
Standard ^a risk	1 to <10	< 50 000/ μ L	<ul style="list-style-type: none"> • T-cell or B-cell origin (immunophenotype) • Chromosomal changes in lymphocyte genes (cytogenetics)
High risk	\geq 10	\geq 50 000/ μ L	<ul style="list-style-type: none"> • Rapidity and magnitude of drop in leukemic cell count after induction therapy • Presence of leukemic cells in cerebrospinal fluid

Εικόνα 1.6. Παράγοντες διαστρωμάτωσης κινδύνου για παιδιατρικούς ασθενείς με *De Novo* Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (Πηγή: National Cancer Institute)

iii. Φύλο

Ιστορικά, το φύλο έχει αναφερθεί ότι αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα, με τους άνδρες ασθενείς να έχουν δυσμενέστερη εξέλιξη από ότι οι γυναίκες, στοιχείο που επιβεβαιώνεται από δεδομένα που προέρχονται κυρίως από ΟΛΛ παιδικής ηλικίας, πιθανώς λόγω υποτροπής και προσβολής των όρχεων. Ωστόσο, το παραπάνω στοιχείο για την ενήλικη ΟΛΛ δεν επιβεβαιώνεται [83].

iv. Κυτταρογενετική

Αν και οι κλινικοί παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της θεραπείας, οι κυτταρογενετικές αλλαγές έχουν σημαντικό ρόλο στον προσδιορισμό του κινδύνου. Ενώ πρόσφατα έχουν αναφερθεί πολλές επαναλαμβανόμενες κυτταρογενετικές ανωμαλίες, η ανεξάρτητη προγνωστική τους σημασία δεν ήταν δυνατόν να προσδιοριστεί λόγω του σχετικά μικρού αριθμού αναφορών. Η κυτταρογενετική εκτροπή με τη μεγαλύτερη επίδραση στην πρόγνωση και τη θεραπεία είναι η παρουσία του χρωμοσώματος Φιλαδέλφεια, t (9;22). Ο επιπολασμός του t (9;22) στην ενήλικη ΟΛΛ μπορεί να κυμαίνεται από 15-50% και αυξάνει με την ηλικία [84].

Ο συγκεκριμένος υπότυπος έχει επιπτώσεις τόσο στην πρόγνωση όσο και τη θεραπεία. Ιστορικά, η Ph-θετικό ΟΛΛ παρουσιάζει επιβίωση 1 έτους σε ποσοστό περίπου 10%. Ωστόσο, με την ανάπτυξη των TKI, η επιβίωση έχει βελτιωθεί και συνεπώς πρέπει να

καθοριστεί η κυτταρογενετική κατάσταση όλων των ασθενών σχετικά με το χρωμόσωμα Ph πριν από την έναρξη της θεραπείας. [55]

Σε μια αναφορά ορόσημο με 1.522 ασθενείς, που έλαβαν θεραπεία, επιχειρήθηκε κυτταρογενετική ανάλυση πριν από τη θεραπεία σε 90% των περιπτώσεων. Η ανάλυση θεωρήθηκε επιτυχής, μετά από ανασκόπηση, στα σχεδόν τρία τέταρτα αυτών των ασθενών και μεταξύ εκείνων που είχαν επιτυχή κυτταρογενετική ανάλυση ανιχνεύθηκε ένας μη φυσιολογικός κλώνος στο 79% των περιπτώσεων. Όπως αναμενόταν, η συχνότερη ανωμαλία ήταν το χρωμόσωμα Philadelphia t(9;22)(q34;q11) / BCR-ABL1, το οποίο ανιχνεύθηκε στο 19% των ασθενών χρησιμοποιώντας είτε συμβατικά κυτταρογενετικά, είτε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time -PCR) ή με συνδυασμό αυτών των μεθόδων. Εκτός από το παραπάνω εύρημα κακής πρόγνωσης, οι κυτταρογενετικές ανωμαλίες που ανιχνεύθηκαν περιλαμβάνουν μετατοπίσεις t(4;11)(q21;p13·3), t(8; 14)(q24·1;q;32) ή πολύπλοκο καρυότυπο (>5 χρωμοσωμικές ανωμαλίες), καθώς και χαμηλή υποδιπλοϊδία/σχεδόν τριπλοειδία. Αντίθετα, οι ασθενείς με υψηλή υπερδιπλοειδία και del(9p) είχαν σημαντικά καλύτερη πρόγνωση, κάτι που όμως δεν ισχύει για την ΟΛΛ παιδικής ηλικίας, όπου οι ανωμαλίες 9p θεωρούνται συχνά από τους πιο δυσμενείς προγνωστικούς παράγοντες, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις B-ΟΛΛ [83].

Σε μια μεταγενέστερη μελέτη, μεταξύ των 200 ασθενών που μελετήθηκαν, βρέθηκε ότι το κυτταρογενετικό προφίλ αποτελεί πιο σημαντικό προγνωστικό παράγοντα από ότι η ηλικία ή ο αριθμός WBCs [85].

v. Μοριακές αστάθειες

Οι μοριακοί δείκτες έχουν αναγνωριστεί ως βασικοί παράγοντες στην παθογένεια της νόσου, προσφέροντας τη δυνατότητα για στοχοποιημένη θεραπευτική προσέγγιση. Είναι πιθανόν ότι τα επόμενα χρόνια, αυτό θα συμπληρώσει τουλάχιστον την κυτταρογενετική ως τον σημαντικότερο προγνωστικό παράγοντα πριν τη θεραπεία. Το γονίδιο BAALC, ένας δείκτης πρώιμων αιματοποιητικών προγονικών κυττάρων, έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται με κακή εξέλιξη σε ενήλικες με T-ΟΛΛ.

Πρόσφατα, μια γερμανική μελέτη ανέφερε ότι το BAALC αποτελεί έναν νέο δείκτη για την ταυτοποίηση ενός πληθυσμού ασθενών με B-ΟΛΛ των οποίων τα κύτταρα εκφράζουν έναν ανώριμο λευχαιμικό φαινότυπο. Ο παρών βιοδείκτης φαίνεται να σχετίζεται με κακή ή καθόλου ανταπόκριση στην τυποποιημένη θεραπεία. Το σημαντικό εδώ είναι ότι

αναγνωρίζεται μια ακόμα ομάδα υψηλού κινδύνου Β-ΟΛΛ που είναι ανεξάρτητη από τις BCR-ABL1 ή MLL-AFF1. Οι επιγενετικές αλλοιώσεις φαίνεται να έχουν όλο και πιο αυξανόμενη σημασία σε πολλούς τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένης της οξείας λευχαιμίας. Αυτές οι αλλοιώσεις περιλαμβάνουν υπερμεθυλίωση ογκοκατασταλτικών γονιδίων ή γονιδίων micro-RNA και υπομεθυλίωση ογκογονιδίων. Η σημασία της μεθυλίωσης του DNA ως θεραπευτικός στόχος σε όλους τους καρκίνους έχει καθιερωθεί και η υπερμεθυλίωση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων ή η υπομεθυλίωση των ογκογονιδίων έχουν επίσης περιγραφεί στην ΟΛΛ, προσφέροντας ένα δυναμικό θεραπευτικών στόχων, για παράδειγμα, αναστολείς αποακετυλάσης ιστονών.

Η συσχέτιση μεταξύ των μοτίβων έκφρασης γονιδίων με επαναλαμβανόμενες χρωμοσωμικές μετατοπίσεις στην ΟΛΛ πραγματοποιείται την τελευταία δεκαετία. Οι αναλύσεις μικροσυστοιχιών αναπτύχθηκαν για να καθορίσουν αυτά τα προφίλ έκφρασης γονιδίων, ώστε να κατηγοριοποιηθούν αυτοί οι ασθενείς. Μια ενδιαφέρουσα αναφορά περιέγραψε μια ομάδα υψηλού κινδύνου ασθενών με Β-ΟΛΛ, που χαρακτηρίζεται από διαγραφές ή μεταλλάξεις του γονιδίου IKZF1 της οικογένειας IKAROS. Αυτές οι αλλοιώσεις του IKZF1 έχουν επίσης συσχετιστεί με κακή πρόγνωση σε ασθενείς με Β-ΟΛΛ, BCR-ABL1-αρνητικούς, παρόλο που μέχρι σήμερα τα δεδομένα περιορίστηκαν σε παιδική ΟΛΛ [84].

vi. Διαθεσιμότητα συμβατού κατά HLA δότη

Η πιο ισχυρή θεραπευτική προσέγγιση για ΟΛΛ στην πρώτη φάση πλήρους ύφεσης (complete remission-CR1) είναι η επίδραση μοσχεύματος-έναντι-λευχαιμίας (graft-versus-leukemia-GvL). Ασθενείς με ΟΛΛ, αρνητικοί για το χρωμόσωμα Philadelphia και ένα συγγενή (αδερφό) συμβατό δότη, έχουν πολύ σημαντική μείωση του ποσοστού υποτροπής, ανεξάρτητα εάν ανήκουν στην ομάδα υψηλού ή ενδιάμεσου κινδύνου. Είναι επίσης γνωστό ότι οι ασθενείς με ΟΛΛ, θετικοί για το χρωμόσωμα Philadelphia, έχουν καλύτερα αποτελέσματα όταν υποβάλλονται σε θεραπεία με αλλογενή μεταμόσχευση στη φάση CR1 σε σύγκριση με τη τυπική χημειοθεραπεία. Η γαλλική μελέτη LALA-94 ανέφερε επίσης σημαντικά οφέλη για τους ασθενείς υψηλού κινδύνου συμπεριλαμβανομένων και των θετικών ασθενών για το χρωμόσωμα Philadelphia που έχουν συμβατό δότη.

Το 2009, σε μία από τις μεγαλύτερες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σχετικά με την ΟΛΛ επιβεβαιώθηκε η υπεροχή της αλλογενούς μεταμόσχευσης έναντι της χημειοθεραπείας (πριν την περίοδο χρήσης του imatinib) σε 267 ενήλικες ασθενείς. Σε έκθεση του Κέντρου Διεθνούς έρευνας μεταμοσχεύσεων αίματος και μυελού (CIBMTR) φάνηκε μια εντυπωσιακή συνολική επιβίωση και σχετικά χαμηλή επίπτωση υποτροπής για τους 169 ασθενείς με ΟΛΛ υψηλού κινδύνου, που συμμετείχαν. Βρίσκονταν στη φάση CR1 και έλαβαν μόσχευμα από συγγενή δότη. Σε ευρωπαϊκές και αμερικανικές μελέτες έχουν περιγραφεί αποτελέσματα ασθενών με ΟΛΛ υψηλού κινδύνου (n=95), που υποβλήθηκαν σε μεταμόσχευση και εμφάνισαν συνολική επιβίωση 2-3 ετών σε ποσοστά περίπου 34%.

Τα παραπάνω δεδομένα είναι ενθαρρυντικά και μέσω αυτών τονίζεται η σημασία της διαθεσιμότητας ενός συμβατού HLA δότη, κάτι που αποτελεί και προγνωστικό παράγοντα για τη νόσο. Το αν μια τέτοια επιλογή πρέπει να προσφέρεται και να επιλέγεται για κάθε ασθενή εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ θεραπευτικής αποτελεσματικότητας και της επικινδυνότητας της διαδικασίας, καθώς το όφελος από το ισχυρό αποτέλεσμα της GvL δεν εκδηλώνεται σε ορισμένους ασθενείς λόγω της μεγάλης θνησιμότητας χωρίς καν υποτροπή [84].

vii. Ελάχιστη υπολειμματική νόσος

Εκτός από τα χαρακτηριστικά της νόσου στη διάγνωση, έχει αναγνωριστεί ότι και η απάντηση στην αρχική θεραπεία έχει προβλεπτική αξία για την έκβαση. Η ελάχιστη υπολειμματική νόσος (MRD) είναι ένας από τους ισχυρότερους προγνωστικούς δείκτες της ελεύθερης νόσου επιβίωσης και της συνολικής επιβίωσης (OR) για ασθενείς με ΟΛΛ και πλέον ακολουθείται η πρακτική να αξιολογείται η MRD με τη χρήση μοριακών τεχνικών όπως η κυτταρομετρία ροής και η PCR [86]. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει τη σημασία της MRD στον καθορισμό κινδύνου [87-91].

Η απάντηση στην πρώιμη θεραπεία έχει προγνωστική αξία για το κίνδυνο υποτροπής και χρησιμοποιείται για την κατάταξη των ασθενών σε επακόλουθη προσαρμοσμένη θεραπεία [27]. Η MRD είναι σήμερα ο ισχυρότερος προγνωστικός δείκτης για την παιδική λευχαιμία ακόμη και για ασθενείς χαμηλού κινδύνου [81,92-96]. Έχουν προταθεί κατά καιρούς τόσο η αναρρόφηση μυελού των οστών όσο και το περιφερικό αίμα ως πηγές κυττάρων προς ανάλυση και υπολογισμό της MRD. Ωστόσο, μετά από μία σειρά μελετών,

όπου τα αποτελέσματα δεν συμφωνούσαν μεταξύ B & T-ΟΛΛ και μυελού και περιφερικού, αποφασίστηκε πως η δειγματοληψία μυελού είναι αντιπροσωπευτικότερη μέθοδος για την εκτίμηση της MRD τόσο σε Β-ΟΛΛ όσο και σε Τ-ΟΛΛ.

Οι μέθοδοι με τις οποίες γίνεται ο εντοπισμός των υπολειμματικών λευχαιμικών κυττάρων είναι η κυτταρομετρία ροής (ανίχνευση ανώμαλων ανοσοφαινότυπων) και η ενίσχυση με PCR (ανίχνευση ειδικής για τη λευχαιμία ανοσοσφαιρίνης, γονιδίων Τ-κυτταρικών υποδοχέων ή μεταγάρφων σύντηξης) επιτρέπουν την αναγνώριση όλων των κυττάρων που υπάρχουν σε επίπεδα πολύ χαμηλότερα από εκείνα που είναι ανιχνεύσιμα με μικροσκόπηση και μορφολογική εξέταση [97]. Η PCR είναι τυπικά πιο ευαίσθητη από τη κυτταρομετρία ροής για τη μέτρηση της MRD (~ 0.001% έναντι ~ 0.01%) ενώ τα ανιχνεύσιμα χαμηλά επίπεδα MRD με PCR (0.001 έως <0.01%), μετά τη θεραπεία ύφεσης, έδειξαν προγνωστική σημασία στην ΟΛΛ παιδικής ηλικίας [98]. Ωστόσο, η κυτταρομετρία ροής είναι ταχύτερη, γενικά λιγότερο δαπανηρή και εφαρμόζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών [91] επιτρέποντας την ταχύτερη προσαρμογή της θεραπείας [95]. Η ευαισθησία της κυτταρομετρίας ροής μπορεί να αυξηθεί με τη χρήση πολυχρωματικών δεικτών [99].

Τα τελευταία χρόνια το πρότυπο κινδύνου επαναδιαμρφώθηκε με ποσοστά υποτροπής, δηλαδή ομάδες χαμηλού, ενδιάμεσου και υψηλού κινδύνου 0%, 47% και 94%, αντίστοιχα, με βάση τα επίμονα αυξημένα επίπεδα MRD, που ορίζονται ως $>10^{-4}$. Με βάση τα γνωστά στοιχεία για τους προγνωστικούς παράγοντες στις περιπτώσεις ενήλικων ασθενών με ΟΛΛ, έχουν αναπτυχθεί συστάσεις για την προσέγγιση της διαστρωμάτωσης κινδύνου [100]. Έτσι, ορίζεται ότι οι έφηβοι και οι νέοι ενήλικες (adolescent and young adults-AYA) θεωρούνται όσοι είναι 15-39 ετών, επίσης μπορεί να ωφελούνται από τη θεραπεία με παιδιατρικά σχήματα και επομένως αντιμετωπίζονται ξεχωριστά από τους ενήλικες > 40 ετών [101,102].

Και οι δύο ομάδες ηλικίας διαχωρίζονται σε Ph(+) υποομάδες υψηλού κινδύνου και Ph(-) ενδιάμεσου κινδύνου. Η Ph(-) ΟΛΛ μπορεί περαιτέρω να κατηγοριοποιηθεί σε υψηλού κινδύνου με βάση τα ποσοστά MRD, τον αυξημένο αριθμό WBCs ή τα δυσμενή αποτελέσματα κυτταρογενετικής ανάλυσης.

Σε μελέτη του 2010, όπου συμμετείχαν πάνω από 3.000 ασθενείς τα επίπεδα MRD για τη ανταπόκριση στην ίδια χημειοθεραπεία ύφεσης διέφεραν μεταξύ Β- & Τ-ΟΛΛ. Η

αρνητική MRD την 33η ημέρα (μετά τη χορήγηση 4) ήταν ο ισχυρότερος προγνωστικός παράγοντας για την Β-ΟΛΛ [93], ενώ η αρνητική MRD την 78η ημέρα (μετά τη χορήγηση 7 φαρμάκων) ήταν επίσης προγνωστική για την Τ-ΟΛΛ ανεξάρτητα από τη θετική MRD την 33η ημέρα [94].

Οι ασθενείς με επίπεδα MRD $>10^{-4}$ ή $> 5 \times 10^{-4}$ εμφανίζουν κακή ανταπόκριση και έχουν ιδιαίτερα κακή πρόγνωση [90, 103-107]. Τρεις μη τυχαιοποιημένες μελέτες (GMALL, NILG, GRAALL) έδειξαν βελτιωμένα αποτελέσματα με μεταμόσχευση αλλογενών αιμοποιητικών κυττάρων (allo-HSCT). Πιο συγκεκριμένα, η μελέτη NILG αξιολόγησε το ρόλο των επιπέδων MRD και το ρόλο της allo-HSCT. Η μελέτη έδειξε ότι οι ασθενείς με MRD από 10^{-4} έως $<10^{-3}$ εμφάνισαν βελτιωμένη επιβίωση χωρίς νόσο (DFS) κατά 60% μετά από allo-HSCT, ενώ οι ασθενείς με υψηλότερα επίπεδα MRD $>10^{-3}$ είχαν δυσμενέστερη έκβαση παρά τη μεταμόσχευση [108].

1.2.7. Θεραπεία οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας

1.2.7.1. Η εξέλιξη της θεραπείας

Με τη βέλτιστη χρήση αντιλευχαιμικών παραγόντων σε συνδυαστικά πρωτόκολλα, τη στοχευμένη θεραπεία σχετικά με το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ), τις βελτιώσεις στην υποστηρικτική περίθαλψη και την αναγνώριση βιολογικών, κλινικών και θεραπευτικών χαρακτηριστικών που μπορούν να κατατάξουν τους ασθενείς σε ομάδες υψηλότερου ή χαμηλότερου κινδύνου και να προβλέπουν τα ποσοστά επιτυχίας της θεραπείας, αυξήθηκαν τα ποσοστά επιβίωσης χωρίς συχνές εκδηλώσεις (EFS) σε ποσοστό άνω του 85% και τα ποσοστά συνολικής επιβίωσης 5 ετών σε ποσοστό άνω του 90% [81], όταν λίγα παιδιά είχαν την ευκαιρία να επιβιώσουν πριν από 50 χρόνια [10].

Οι συνδυασμοί των πρώτων φαρμάκων που χρησιμοποιούνταν πετύχαιναν απλά μια προσωρινή ύφεση κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του '40 και της δεκαετίας του '50 [109,110]. Το 1962 όμως, ο Pinkel και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν ένα πρωτόκολλο θεραπείας πολλαπλών φάσεων [111], όπου συμπεριλάμβανε την επαγωγή της ύφεσης, την στοχευμένη θεραπεία για την προστασία του ΚΝΣ και την εντατικοποίηση της θεραπείας με χρήση του συνδυασμού των φαρμάκων που χρησιμοποιούνταν αρχικά (6-μερκαπτοπουρίνη και μεθοτρεξάτη). Αυτή η επιτυχία ενέπνευσε την ανάπτυξη παρόμοιων

κλινικών δοκιμών σε όλο τον κόσμο, συμπεριλαμβανομένων δύο ιδιαίτερα σημαντικών μελετών στη δεκαετία του '70 [112,113].

Πρώτον, άρχισε η χρήση της θεραπείας του "Πρωτοκόλλου II", προσδιορίζοντας μια φάση επαναπροσδιορισμού (δηλαδή την επανάληψη της θεραπείας επαγωγής αρχικής ύφεσης, η οποία τώρα αναφέρεται ως καθυστερημένη εντατικοποίηση). Δεύτερον, σε άλλες δοκιμές προστέθηκε υψηλή δόση ασπαργινάσης εβδομαδιαία, στο πρωτόκολλο πολλαπλών φαρμάκων. Ταυτόχρονα, η χρήση προφυλακτικής κρανιοσφαιρικής ακτινοβολίας ήταν το επόμενο σημαντικό βήμα στην εξέλιξη της θεραπείας της ΟΛΛ [114]. Ενώ μόνο το 2% των παιδιών με ΟΛΛ έχουν εμφανή λευχαιμία στο ΕΝΥ κατά τη διάγνωση, περίπου το ήμισυ θα παρουσιάσει υποτροπή του ΚΝΣ εάν δοθεί μόνο συστηματική θεραπεία. Η κρανιοσφαιρική ακτινοβολία οδήγησε σε αρκετές επιζήμιες επιδράσεις, όπως διακοπής της ανάπτυξης στους περισσότερους ασθενείς [115,116]. Για τη μείωση αυτών των ανεπιθύμητων αποτελεσμάτων εξαλείφθηκε η ακτινοβολία της σπονδυλικής στήλης, ακολουθούμενη από μειώσεις της δόσης κρανιακής ακτινοβολίας. Έτσι, τη δεκαετία του '80, η κρανιακή ακτινοθεραπεία (CRT) έγινε ένα τυποποιημένο συστατικό της επιτυχούς θεραπείας πολυτροπικότητας για τη θεραπεία και την πρόληψη της λευχαιμίας του ΚΝΣ [117]. Ωστόσο, πολλά παιδιά παρέμεναν ακόμα με νευρογνωστικές διαταραχές. Τελικά, μια σειρά τυχαιοποιημένων μελετών έδειξε ότι η χημειοπροφύλαξη με μεθοτρεξάτη ή και άλλους συνδυασμούς φαρμάκων θα μπορούσε να αντικαταστήσει τη CRT χωρίς μακροπρόθεσμο αντίκτυπο στην έκβαση για τους περισσότερους ασθενείς [118]. Πλέον μόνο οι ασθενείς με εμφανή νόσο του ΚΝΣ κατά τη στιγμή της διάγνωσης και μερικοί ιδιαίτεροι υπότυποι ΟΛΛ (T-ΟΛΛ με υπερλευκοκυττάρωση) με υψηλό κίνδυνο για προσβολή του ΚΝΣ, αντιμετωπίζονται σήμερα με CRT.

Η μεταμόσχευση αιματοποιητικών στελεχιαίων κυττάρων (HSCT) εφαρμόστηκε για θεραπευτικούς σκοπούς σε περιπτώσεις υποτροπιάζουσας ή υψηλού κινδύνου ΟΛΛ στα τέλη της δεκαετίας του '70. Οι ασθενείς-λήπτες εκτίθενται σε χημειοθεραπεία ή / και ακτινοβολία πριν από τη μεταμόσχευση (για τη διαχείριση του πρωτοπαθούς καρκίνου), αλλά και μετά (για την αποτροπή της ασθένειας μοσχεύματος κατά ξενιστή ή / και υποτροπή του πρωτοπαθούς καρκίνου). Σοβαρή ή απειλητική για τη ζωή νοσηρότητα αναφέρθηκε στο 40% των περιπτώσεων μεταμόσχευσης, που σχετίζονται με πρόωρη θνησιμότητα [119].

Οι πρόσφατα τρέχουσες προσεγγίσεις στοχοθετημένης θεραπείας περιλαμβάνουν αντιμετώπιση της νόσου με μονοκλωνικά αντισώματα όπως τα blinatumomab και με τον υποδοχέα χμιαρικού αντιγόνου των T-κυττάρων (CAR T-cells). Αυτό το πεδίο έρευνας μπορεί τελικά να κατευθύνει την ανάπτυξη θεραπειών με υψηλή αποτελεσματικότητα και χαμηλότερα ποσοστά βλάβης στους φυσιολογικούς ιστούς. Επί του παρόντος, ωστόσο, τα μακροπρόθεσμα αποτελέσματα σε παιδιατρικούς ασθενείς, που υποβάλλονται σε τέτοιου είδους θεραπείες, είναι άγνωστα λόγω του περιορισμένου χρόνου παρακολούθησης.

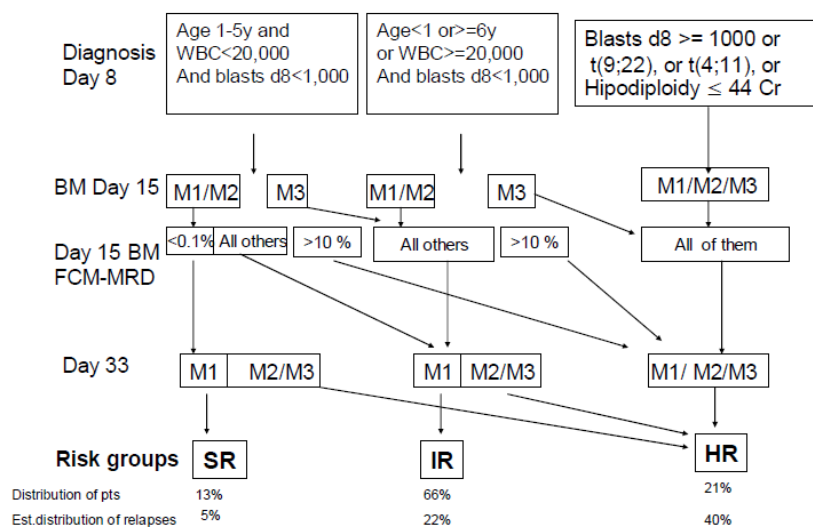
1.2.7.2. Τρέχουσες θεραπείες

Η θεραπευτική αγωγή των ασθενών με ΟΛΛ διαρκεί συνήθως 2-2,5 χρόνια, που περιλαμβάνει 3 φάσεις: επαγωγή ύφεσης, εντατικοποίηση και συντήρηση [77]. Τα περισσότερα από τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται αναπτύχθηκαν πριν ακόμα από το 1970, όπως έχει ήδη αναφερθεί. Ωστόσο, η δοσολογία και το χρονοδιάγραμμα χορήγησής τους σε συνδυαστική χημειοθεραπεία έχουν βελτιστοποιηθεί με βάση τα βιολογικά χαρακτηριστικά των λευχαιμικών κυττάρων, την ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία (MRD) και τα φαρμακοδυναμικά και φαρμακογενετικά ευρήματα κάθε ασθενούς, με αποτέλεσμα το σημερινό υψηλό ποσοστό επιβίωσης.

Για τη επιτυχή θεραπεία των ασθενών με ΟΛΛ, χρειάζεται η κατηγοριοποίηση των ασθενών σε ομάδες κινδύνου, ώστε να χορηγηθεί κατάλληλη θεραπεία σε κάθε ασθενή, όσο πιο εξατομικευμένη γίνεται. Η κατάταξη γίνεται με βάση διάφορα χαρακτηριστικά, που αναλύθηκαν και παραπάνω (κυτταρολογικά και γενετικά χαρακτηριστικά). Το σύστημα κατάταξης των ασθενών καθιερώθηκε από την ομάδα BFM (Berlin- Frankfurt- Münster), μια ομάδα ερευνητών, οι οποίοι ξεκίνησαν τη θεραπεία ασθενών με ΟΛΛ με μια ποικιλία χημειοθεραπευτικών φαρμάκων.

Για την κατηγοριοποίηση των ασθενών, χρησιμοποιείται το σύστημα ALLIC-BFM 2009, το οποίο βασίζεται σε κριτήρια, όπως είναι η κατάσταση του μυελού των οστών την ημέρα της διάγνωσης, τη 15^η και τη 33^η μέρα, τα επίπεδα των λευκών αιμοσφαιρίων, οι βλάστες, η ελάχιστη υπολειπόμενη νόσος (MRD), η ύπαρξη ή όχι συγκεκριμένων κυτταρογενετικών ανωμαλιών.

ALL IC-BFM 2009 CLASSIFICATION



Εικόνα 1.7. Κατάταξη ασθενών με ΟΑΛ αναλόγως κυτταρολογικών και γενετικών κριτηρίων

Από το γράφημα προκύπτουν τρεις κατηγορίες κινδύνου, υψηλού, ενδιάμεσου και χαμηλού. Βάσει αυτής της κατάταξης θα καθοριστεί και η θεραπεία του εκάστοτε ασθενούς. Οι κατηγορίες M1, M2 και M3 αναφέρονται στο % ποσοστό των βλαστών στο μυελό των οστών με ποσοστά βλαστών <5%, 5% - 25% και >25% αντίστοιχα. Αξίζει να αναφερθεί ότι όλοι οι ασθενείς υποβάλλονται σε ένα αρχικό πρωτόκολλο θεραπείας με χημειοθεραπευτικά φάρμακα, όπως η prednisone, η μεθοτρεξάνη, η αλλοπουρινόλη, έτσι ώστε να μπορεί να συνεχιστεί η κατηγοριοποίησή τους, ανάλογα με την ανταπόκρισή τους σε αυτά τα φάρμακα (θεραπεία εφόδου, μέχρι την 33^η ημέρα) [120]. Επιπλέον, χορηγείται θεραπεία για την πρόληψη υποτροπής και προσβολής του ΚΝΣ, που προκαλείται από κύτταρα λευχαιμίας που μπορεί να έχουν συσσωρευτεί στη θέση του ιερού οστού. Η μεταμόσχευση αλλογενών αιμοποιητικών στελεχειαίων κυττάρων εξετάζεται σε ασθενείς με πολύ υψηλό κίνδυνο.

i. Θεραπεία επαγωγής απόκρισης

Τέσσερις έως έξι εβδομάδες θεραπείας με επαγωγή ύφεσης εξαλείφουν το αρχικό φορτίο των λευχαιμικών κυττάρων και αποκαθιστούν την κανονική αιμοποίηση σε ποσοστά της τάξης του 96-99% στα παιδιά και 78-92% στους ενήλικες. [77-80]. Η φάση αυτή διαρκεί συνήθως 29 ημέρες [120].

Οι παράγοντες χημειοθεραπείας τυπικά περιλαμβάνουν ένα γλυκοκορτικοειδές (πρεδνιζολόνη ή δεξαμεθαζόνη) βινκριστίνη και ασπαραγινάση, με ή χωρίς ανθρακυκλίνη. Αυτή η αγωγή φαίνεται να είναι επαρκής σε ασθενείς ενδιαμέσου κινδύνου όταν χορηγείται εντατικά. Οι ασθενείς με υψηλό ή πολύ υψηλό κίνδυνο λαμβάνουν τέσσερα ή περισσότερα φάρμακα.

Η πρεδνιζολόνη χρησιμοποιείται παραδοσιακά στη θεραπεία ΟΛΛ, αλλά η χρήση δεξαμεθαζόνης εξετάζεται όλο και περισσότερο [121]. Ωστόσο, οι βέλτιστες δόσεις αυτών των φαρμάκων είναι ασαφείς. Σε τυχαιοποιημένες μελέτες, η δεξαμεθαζόνη παρείχε καλύτερο έλεγχο της λευχαιμίας του ΚΝΣ και σε συνδυασμό με δεξαμεθαζόνη απέδωσε καλύτερη επιβίωση σε παιδιά με Τ-ΟΛΛ και παιδιά κάτω των 10 ετών με Β-ΟΛΛ χωρίς κλινικές εκδηλώσεις [122,123]. Από την άλλη, η θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή σε συνδυασμό με δεξαμεθαζόνη σχετίζεται με ανεπιθύμητες ενέργειες, συμπεριλαμβανομένων των μολύνσεων, ψυχώσεων, της οστεονέκρωσης και της μυοπάθειας, ενώ η υψηλή δόση δεξαμεθαζόνης δεν συνιστάται σε έφηβους με Β-ΟΛΛ [124].

Ασθενείς με BCR-ABL1-θετική ΟΛΛ θεωρείται ότι παρουσιάζουν φτωχή πρόγνωση αλλά επωφελούνται από την έγκαιρη χορήγηση ενός αναστολέα κινάσης τυροσίνης (π.χ., imatinib, dasatinib). Όταν ο παράγοντας αυτός προστίθεται σε χημειοθεραπεία πολλαπλών παραγόντων, τα πλήρη ποσοστά υποχώρησης είναι > 90% και η επιβίωση χωρίς κλινικές εκδηλώσεις είναι καλύτερη [125,126]. Σε αντίθεση με το imatinib, το dasatinib στοχεύει τόσο τις κινάσες ABL1 όσο και τις Src, έχει επίσης ισχυρότερη δραστηριότητα έναντι του BCR-ABL1, και είναι δραστική ακόμα και έναντι της ανθεκτικής στο imatinib BCR-ABL1. Ενώ παρουσιάζει καλύτερη διεισδυτικότητα στο ΚΝΣ [126-128].

ii. Θεραπεία εντατικοποίησης

Η θεραπεία εντατικοποίησης χορηγείται μετά από την επίτευξη ύφεσης της νόσου για την εξάλειψη υπολειμμάτων λευχαιμικών κυττάρων [79,81]. Αυτή η φάση συνήθως χρησιμοποιεί μεθοτρεξάτη υψηλής δόσης, συχνές δόσεις γλυκοκορτικοειδών και ασπαραγινάση για 20-30 εβδομάδες. Στη συνέχεια ακολουθεί η θεραπεία επαναπρόσληψης με παράγοντες παρόμοιους με εκείνους που χρησιμοποιήθηκαν κατά την επαγωγή της ύφεσης.

Το συγκεκριμένο στάδιο θεραπείας έχει αποδειχθεί ότι είναι κρίσιμο για τα Πρωτόκολλα θεραπείας της ΟΛΛ. Θεραπεία εντατικοποίησης με βινκριστίνη και ασπαραγινάση βελτίωσε την έκβαση των ασθενών υψηλού κινδύνου [129]. Ωστόσο, ένας πανομοιότυπος δεύτερος κύκλος δεν βελτίωσε την έκβαση των ασθενών υποδηλώνοντας ότι οι εναπομείναντες λευχαιμικοί κλώνοι μετά από μια ακολουθία εντατικοποίησης μπορεί να αναπτύσσουν εγγενή αντοχή στα φάρμακα [129,130]. Δεν είναι σαφές εάν αυτός ο δεύτερος κύκλος προσφέρει όφελος σε ασθενείς υψηλού κινδύνου και βραδεία έγκαιρη απόκριση, στο πλαίσιο της σύγχρονης θεραπείας. Η οστεονέκρωση είναι μία από τις ανεπιθύμητες ενέργειες, που συμβαίνει συχνά κατά το στάδιο αυτό, ειδικά σε παιδιά ηλικίας 10 ετών και άνω. Εναλλακτικά, η χορήγηση, ανά διαστήματα, δεξαμεθαζόνης μείωσε σημαντικά την οστεονέκρωση, παρά την υψηλότερη σωρευτική δόση [131].

iii. Μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων και κυτταρική θεραπεία

Μετά την επίτευξη πλήρους απόκρισης, οι επιλογές θεραπείας περιλαμβάνουν χημειοθεραπεία συντήρησης ή Allo-SCT για τους κατάλληλους ασθενείς. Για τους ασθενείς υψηλού κινδύνου και τους ασθενείς με υποτροπιάζουσα / ανθεκτική νόσο, η Allo-SCT έχει από καιρό θεωρηθεί ως το πρότυπο της περίθαλψης με τις καλύτερες πιθανότητες για μια λύση διαρκείας. Παρόλο που τα κριτήρια διαφέρουν μεταξύ των μελετών, γενικά τα υψηλού κινδύνου χαρακτηριστικά που ορίζονται είναι η Ph(+) ΟΛΛ, ο αυξημένος αριθμός WBC, η προσβολή του ΚΝΣ, οι αναδιατάξεις γονιδίων υψηλού κινδύνου ή η υποδιπλοΐδα. Μελέτες του Πανεπιστημίου Stanford έδειξαν πλεονέκτημα της Allo-SCT έναντι της τυποποιημένης χημειοθεραπείας σε αυτούς τους ασθενείς υψηλού κινδύνου [132-134]. Η μεταμόσχευση αλλογενών αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (HSCT) αποτελεί επιλογή για παιδιατρικούς ασθενείς υψηλού κινδύνου ή/και νόσο που δεν υποχωρεί [135]. Τα σύγχρονα πρωτόκολλα HSCT με HLA τυποποίηση υψηλής ανάλυσης, οι κλινικές δοκιμές βασισόμενες συγκεκριμένα στην περίπτωση και η βελτιωμένη υποστηρικτική φροντίδα έχουν μειώσει τη θνησιμότητα που σχετίζεται με την υποτροπή, την σχετική με τη θεραπεία τοξικότητα και τις λοιμώξεις. [136,137] Συνιστάται επομένως ότι όλοι οι νεαροί ενήλικες υψηλού κινδύνου με διαθέσιμο δότη να υποβάλλονται σε Allo-SCT κατά την πρώτη φάση CR (CR1).

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι και οι ασθενείς με Ph-like ΟΛΛ πρέπει να αντιμετωπίζονται ως υψηλού κινδύνου και να τους προσφέρεται Allo-SCT κατά τη

διάρκεια της CR1 [103,134]. Ο ρόλος του Allo-SCT σε ενήλικες με τυπικό κίνδυνο είναι λιγότερο σαφής. Γενικά, η MRD ως ένας προγνωστικός δείκτης μπορεί να περιορίσει τους ασθενείς υψηλού κινδύνου, βοηθώντας να επιλεγούν οι κατάλληλοι υποψήφιοι για μεταμόσχευση. Η αλλογενής μεταμόσχευση πρέπει επίσης να λαμβάνεται υπόψη στους ασθενείς που υποτροπιάζουν, ιδανικά μετά την επίτευξη ενός δεύτερου CR (CR2). Στη μελέτη MRC / ECOG 2993, η 5ετής επιβίωση ήταν υψηλότερη στην ομάδα που υποβλήθηκε σε μεταμόσχευση με συγγενή δότη σε σχέση με περιπτώσεις μη συγγενούς δότη ή αποκλειστικά με χημειοθεραπεία (23%, 16% και 4% αντίστοιχα) [138-140].

Λόγω της συνεχιζόμενης ανάπτυξης των μεθόδων ανίχνευσης της νόσου και θεραπειών πρώτης γραμμής, οι ενδείξεις για αλλογενή HSCT πρέπει να επαναξιολογούνται συνεχώς. Ασθενείς με BCR-ABL1-ΟΛΛ που λαμβάνουν θεραπεία ύφεσης μετά από χημειοθεραπεία πολλαπλών παραγόντων με αναστολείς κινάσης ABL1 και μικρά παιδιά (ηλικίας <6 ετών) με Β-ΟΛΛ στην καθυστερημένη ύφεση μετά από αποτυχία επαγωγής μπορούν να αντιμετωπιστούν και χωρίς HSCT [141-143]. Ένα επίπεδο MRD $\geq 10^{-4}$ πριν από την HSCT συνδέεται στενά με την υποτροπή και απαιτούνται νέες στρατηγικές για τη μείωση του φορτίου της νόσου πριν και / ή μετά από HSCT [144,145]. Το όφελος του HSCT για βρέφη με ΟΛΛ είναι αμφιλεγόμενο, ο ρόλος του HSCT, εάν υπάρχει, περιορίζεται σε μια μικρή ομάδα υψηλού κινδύνου [144,145]. Παρόλο που πολλά κέντρα ενηλίκων θεωρούν ότι το HSCT κατά τη διάρκεια της πρώτης πλήρους ύφεσης αποτελεί βασικό στοιχείο της θεραπείας, η θεραπεία με παιδιατρικά θεραπευτικά σχήματα θα μειώσει τη χρήση του [110,146].

iv. Θεραπεία παγιοποίησης - συντήρησης

Η θεραπεία συντήρησης συνήθως διαρκεί 2 χρόνια ή περισσότερο και περιλαμβάνει κυρίως ημερήσια δόση μερκαπτοπουρίνης και εβδομαδιαία δόση μεθοτρεξάτης σε συνδυασμό ή και όχι βινκριστίνης και δεξαμεθαζόνης. Πιο συγκεκριμένα, σε αυτό το στάδιο, οι ασθενείς με Β-ΟΛΛ ενδιάμεσου ή χαμηλού κινδύνου ακολουθούν το πρωτόκολλο mM (6-mercaptopurine, methotrexate) ενώ οι ασθενείς με Τ-ΟΛΛ ενδιάμεσου ή χαμηλού κινδύνου το πρωτόκολλο Μ (όμοια φάρμακα, διαφορετικές δόσεις).

Σε περιπτώσεις ΟΛΛ υψηλού κινδύνου, συνήθως πραγματοποιείται και Μεταμόσχευση [120]. Μετά από αυτό το στάδιο θεραπείας, ακολουθεί η θεραπεία συντήρησης, η οποία

συνήθως κρατάει κάποια χρόνια, ώστε να επιτευχθεί η πλήρης εξάλειψη της νόσου και να αποφευχθεί η υποτροπή. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα παραπάνω πρωτόκολλα τροποποιούνται ανάλογα με τα όργανα τα οποία έχουν προσβληθεί (π.χ. ΚΝΣ) ή με το κίνδυνο υποτροπής.

1.2.7.3. Υποτροπιάζουσα οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία

Χάρης τις εξελίξεις σχετικά με τη ταξινόμηση των ασθενών και τα στάδια της νόσου, αλλά και στην ύπαρξη συγκεκριμένης θεραπευτικής προσέγγισης, το ποσοστό επιβίωσης των ασθενών εντός 5ετίας, χωρίς νόσο, αυξάνεται ραγδαία. Παράλληλα, η επιτυχία στην πλήρη ίαση της νόσου έχει αυξηθεί και προβλέπεται ότι μέσα στα επόμενα χρόνια θα βελτιωθεί περισσότερο. Παρά το γεγονός της επιτυχημένης θεραπευτικής προσέγγισης των τελευταίων χρόνων όμως, ο κίνδυνος υποτροπής είναι πάντα ορατός σχεδόν σε όλα τα στάδια της θεραπείας.

Σημαντικό ζήτημα στις περιπτώσεις καρκινογένεσης, είναι η πιθανότητα υποτροπής και η έγκαιρη αποφυγή και αντιμετώπισή της. Στις περιπτώσεις οξείας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας παιδικής ηλικίας, ορισμένοι ασθενείς υποτροπιάζουν, το γεγονός αυτό φαίνεται να σχετίζεται με κυτταρογενετικές ανωμαλίες. Συγκεκριμένοι υποτύποι, όπως η Ph(+) ΟΛΛ ή η υποδιπλοειδία και η Ph-like ΟΛΛ, σχετίζονταν πριν τη χρήση των TKIs με αξιοσημείωτο κίνδυνο υποτροπής. Η μεγαλύτερη αντοχή στη χημειοθεραπεία αποτελεί χαρακτηριστικό της υποτροπιάζουσας νόσου, είτε λόγω ενός προϋπάρχοντος ανθεκτικού κλώνου, είτε λόγω νέας μετάλλαξης κατά τη διάρκεια της χημειοθεραπευτικής έκθεσης, η οποία δημιουργεί αντοχή έναντι του φαρμάκου. Σχεδόν όλες οι υποτροπιάζουσες ΟΛΛ παρουσιάζουν και νέες γενετικές αλλοιώσεις ενώ διατηρούν τα βασικά γενετικά χαρακτηριστικά από τη διάγνωση, ιδίως τις μετατοπίσεις των χρωμοσωμάτων, που διατηρούνται πάντοτε [147,148]. Ενδιαφέρον εύρημα αποτελεί το γεγονός ότι ο λευχαιμικός κλώνος κυττάρων εξαλείφεται, ενώ οι πιο σπάνιοι υποκλώνοι παραμένουν και αποκτούν νέες μεταλλάξεις, με αποτέλεσμα να γίνονται οι κύριοι προβληματικοί κλώνοι στην υποτροπή [148]. Μελέτες σε επίπεδο γονιδιώματος έχουν εντοπίσει ειδικούς πολυμορφισμούς νουκλεοτιδίων που εμφανίζονται πιο συχνά σε ασθενείς με υποτροπιάζουσα ΟΛΛ.

Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *CREBBP* έχουν αναφερθεί σε περίπου 20% των ασθενών με υποτροπιάζουσα ΟΛΛ [149,150]. Η πρωτεΐνη *CREBBP* (*CBP*) εμπλέκεται στη διαμεσολαβούμενη από κορτικοειδή μετάφραση και στην αποακετυλίωση ιστονών. Προκλινικές μελέτες επιδεικνύουν αναστολή της δράσης αποακετυλάσης των ιστονών στη θεραπεία με αναστολείς μικρού μοριακού βάρους. Η συνύπαρξη των μεταλλάξεων *CREBBP* και *KRAS* έχει αναφερθεί σε μεγάλο ποσοστό των υποτροπιάζουσών ΟΛΛ, για αυτό είναι απαραίτητη η μελέτη νέων ανασταλτικών μορίων μικρού μεγέθους. Επιπλέον, έχουν εντοπιστεί μεταλλάξεις στο γονίδιο *NT5C2*, που επάγουν την έκφρασή του, σε σχεδόν 20% των υποτροπών, τόσο σε Β- όσο και σε Τ-ΟΛΛ [151,152]. Άλλες επαναλαμβανόμενες σωματικές μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν σε τέτοιες περιπτώσεις περιλαμβάνουν παραλείψεις στο γονίδιο επιδιόρθωσης *MSH6* και στον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών *NR3C1* καθώς και στον επιγενετικό ρυθμιστή *MLL2* [148, 153-155]. Έχουν εντοπιστεί επίσης σωματικές μεταλλάξεις σε γονίδια που σχετίζονται με το σηματοδοτικό μονοπάτι του Ras (π.χ. *KRAS*, *NRAS*, *FLT3* και *PTPN11*) σχεδόν στο 50% των ασθενών με υποτροπιάζουσα ΟΛΛ [25, 156].

1.2.7.4. Μελλοντικές θεραπείες

Λόγω της μεγάλης πιθανότητας υποτροπής που παρουσιάζουν αρκετοί ασθενείς αλλά και των ανεπιθύμητων ενεργειών πολλών φαρμάκων, η έρευνα έχει στραφεί στο πολλά υποσχόμενο πεδίο της ανοσοθεραπείας, προς αναζήτηση αποτελεσματικότερων θεραπειών. Μερικά παραδείγματα νέων θεραπειών εμφανίζονται στις Εικόνες 1.8. & 1.9..

i. Μονοκλωνικά αντισώματα

CD22: Το CD22 είναι ένα αντιγόνο διαφοροποίησης της Β-σειράς που εκφράζεται στη Β-ΟΛΛ στο 50-100% των ενηλίκων και 90% των παιδιών [157-159]. Κατά τη σύνδεση ενός αντισώματος, το CD22 εσωτερικεύεται ταχέως, καθιστώντας το έτσι έναν ελκυστικό στόχο παρέχοντας ανοσοτοξικότητα σε λευχαιμικά κύτταρα [160]. Το Epratuzumab είναι ένα μη συζευγμένο μονοκλωνικό αντίσωμα που στοχεύει το CD22 και έχει μελετηθεί σε περιπτώσεις τόσο παιδιατρικών όσο και ενηλίκων ασθενών με υποτροπιάζουσα/ανθεκτική ΟΛΛ. Το Epratuzumab αξιολογήθηκε σε 15 παιδιατρικούς ασθενείς ως μέρος θεραπείας διάσωσης. Το αντίσωμα χορηγήθηκε ως ένας απλός παράγοντας σε συνδυασμό με πρότυπη χημειοθεραπεία ενταντικοποίησης. Μια μελέτη φάσης 2 σε ενήλικες με

υποτροπιάζουσα / ανθεκτική νόσο εξέτασε την προσθήκη του συγκεκριμένου αντισώματος στη χορήγηση κλοφαριμπίνης / κυταραβίνης. Η μελέτη κατέδειξε υψηλότερο ποσοστό ανταπόκρισης σε σύγκριση με τα ιστορικά δεδομένα της χορήγησης αποκλειστικά κλοφαριμπίνης / κυταραβίνης [161]. Πρόσφατα, το Epratuzumab συζευγμένο με τον αναστολέα τοποϊσομεράσης I, SN-38, έχει δείχθει ότι έχει δραστηριότητα έναντι των Β-κυττάρων λευχαιμίας σε *in vitro* και *in vivo* προκλινικές μελέτες [162]. Άλλα μονοκλωνικά αντισώματα, που στοχεύουν το CD22 είναι: Inotuzumab ozogamicin (InO), Moxetumomab pasudotox κ.α. [8].

CD20: Το CD20 είναι ένα ειδικό αντιγόνο Β-σειράς που εκφράζεται σε σχεδόν όλα τα στάδια διαφοροποίησης στην επιφάνεια των φυσιολογικών και των κακοηθών Β-κυττάρων. Η σηματοδότηση μέσω CD20 παίζει ένα ρόλο στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, τις οδούς διαφοροποίησης και τη ρύθμιση της απόπτωσης. Το CD20 εκφράζεται στο 40-50% των προδρόμων λεμφοβλαστών και προδιαθέτει για χειρότερη πρόγνωση [142]. Επιπλέον, η CD20(+) λευχαιμία αποκρίνεται ελάχιστα στην εντατικοποίηση της θεραπείας, υπογραμμίζοντας την ανάγκη για στοχοθετημένη θεραπεία. Η προσθήκη του Rituximab, ενός μονοκλωνικού αντισώματος αντι-CD20 πρώτης γενιάς, έχει βελτιωμένα αποτελέσματα σε αυτούς τους ασθενείς, αλλά η αντίσταση, που αναπτύσσεται, αποτελεί περιορισμό στη χρήση του. Άλλα μονοκλωνικά αντισώματα, που στοχεύουν το CD20 είναι: Ofatumumab (δεύτερης γενιάς μονοκλωνικό αντίσωμα), Obinutuzumab κ.α. [8].

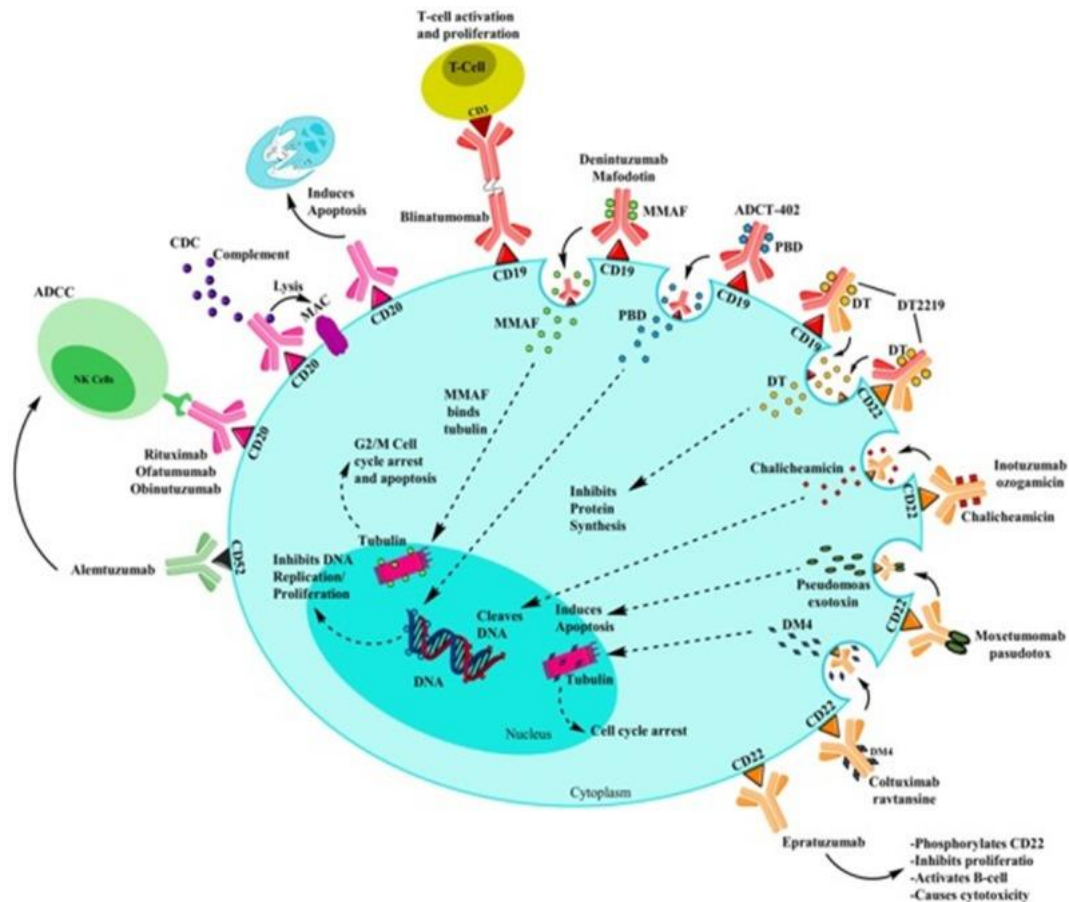
CD19: Το CD19 είναι το πιο ευρέως εκφραζόμενο ειδικό αντιγόνο για την Β-σειρά, που εκφράζεται σε όλα τα στάδια διαφοροποίησης, αλλά χάνεται κατά την ωρίμανση στα κύτταρα πλάσματος. Το CD19 χρησιμεύει ως συν-υποδοχέας για την ανοσοσφαιρίνη επιφάνειας Β-λεμφοκυττάρων και η ενεργοποίησή του πυροδοτεί έναν καταρράκτη φωσφορυλίωσης που περιλαμβάνει κινάσες της οικογένειας Src και PI3K καθώς επίσης και την ενεργοποίηση του c-Myc, οδηγώντας σε πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση [163, 164]. Το CD19 εκφράζεται σε σχεδόν όλες τις Β-λευχαιμίες και ενσωματώνεται ταχέως με τη δέσμευση ενός αντισώματος, καθιστώντας το ιδανικό υποψήφιο για τη θεραπεία μονοκλωνικών αντισωμάτων [165]. Εκπρόσωποι αντισωμάτων που στοχεύουν το CD19 αποτελούν το Coltuximab ravtansine (SAR3419), το Denintuzumab mafodotin (SGN-CD19A) κ.α. [8].

ii. Αναστολέας πρωτεασώματος (Bortezomib)

Το Bortezomib, ένας αναστολέας πρωτεασώματος, εγκρίθηκε για πρώτη φορά για τη θεραπεία του πολλαπλού μυελώματος. Οι προκλινικές μελέτες πρότειναν ένα συνεργικό ρόλο με δεξαμεθαζόνη και επιπρόσθετες επιδράσεις με χημειοθεραπευτικούς παράγοντες σε οξείες λευχαιμίες [166]. Η αποκλειστική χορήγηση του Bortezomib δεν προκάλεσε σημαντικές αποκρίσεις σε ασθενείς με υποτροπιάζουσα / ανθεκτική ΟΛΛ, παρά την αποδεδειγμένη πρωτεασοματική αναστολή [167]. Ωστόσο, σε μια μελέτη φάσης 2, ο αναστολέας πρωτεασώματος σε συνδυασμό με βινκριστίνη, δεξαμεθαζόνη, πεγκυλιωμένη ασπαραγινάση και δοξορουβικίνη παρήγαγε ποσοστό ανταπόκρισης 80% σε παιδιά με υποτροπιάζουσα / ανθεκτική προ-B-ΟΛΛ [168]. Λόγω της ικανότητάς του να αναστέλλει τις οδούς σηματοδότησης NF-κB και NOTCH1, μελετάται ως θεραπεία πρώτης γραμμής για την T-ΟΛΛ.

iii. Ο αναστολέας JAK (Ruxolitinib)

Η οδός σηματοδότησης JAK / STAT έχει αναγνωριστεί ως ένας σημαντικός μηχανισμός με τον οποίο τα λευχαιμικά κύτταρα παρακάμπτουν τους φυσιολογικούς ρυθμούς ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού. Συγκεκριμένα, η Ph-like ΟΛΛ φαίνεται να εξαρτάται από τη JAK σηματοδότηση. Οι πιο συνηθισμένες αναδιατάξεις στην Ph-like ΟΛΛ περιλαμβάνουν τον διαμεμβρανικό υποδοχέα CRLF2, ο οποίος σηματοδοτεί μέσω JAK κινασών. Πολλοί υποδοχείς κυτταροκίνης, συμπεριλαμβανομένου του IL-7R, δρουν επίσης μέσω JAK κινασών. Επιπλέον, οι μεταλλάξεις JAK1 και JAK2 βρίσκονται περίπου στο ήμισυ των CRLF2-αναδιατάξεων στην Ph-like ΟΛΛ [37,44]. Οι προκλινικές μελέτες έχουν δείξει το όφελος του Ruxolitinib για τη θεραπεία της ΟΛΛ με CRLF2-αναδιατάξεις [169-171]. Μια δοκιμή φάσης 2 του Ruxolitinib με πρότυπη χημειοθεραπεία πολλαπλών παραγόντων είναι επί του παρόντος ανοικτή για πρόσληψη νεοδιαγνωσθέντων παιδιών, εφήβων και ενηλίκων με υψηλού κινδύνου B-ΟΛΛ με CRLF2 αναδιατάξεις (NCT02723994).



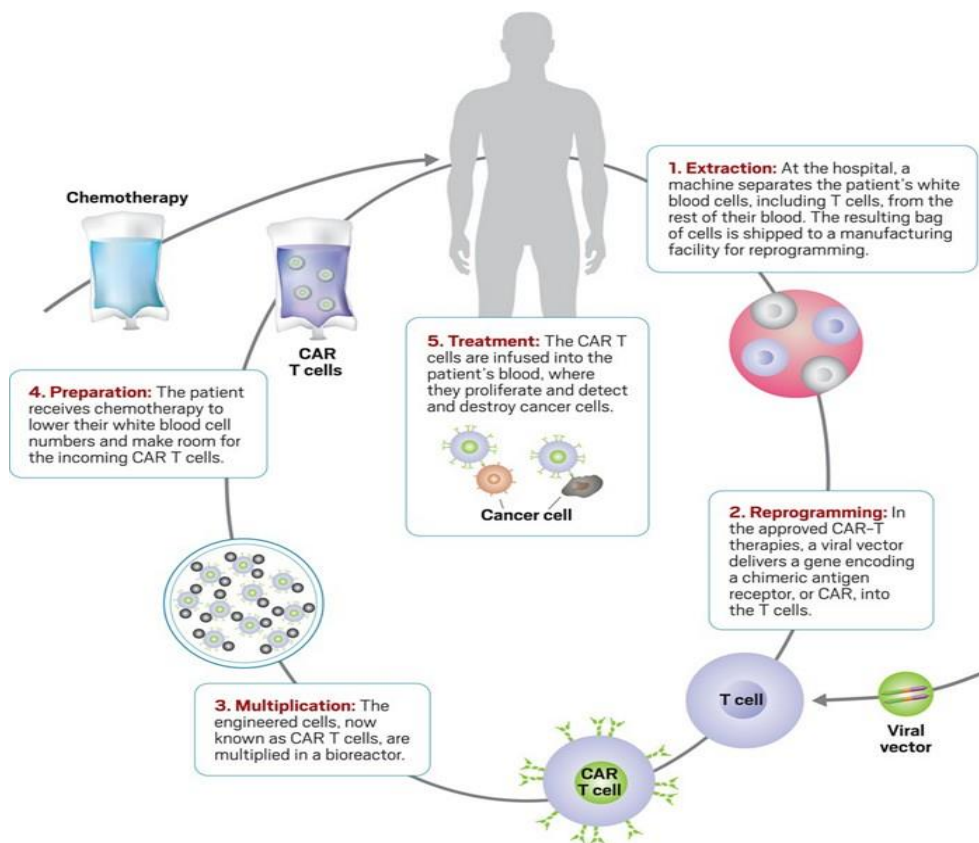
Εικόνα 1.8. Μηχανισμοί στοχευμένης θεραπείας με βάση τα μονοκλωνικά αντισώματα (Πηγή: Mohseni, Mahsa, Hasan Uludag, and Joseph M. Brandwein. "Advances in biology of acute lymphoblastic leukemia (ALL) and therapeutic implications." *American journal of blood research* 8.4 (2018): 29.)

iv. Χιμαιρικός υποδοχέας αντιγόνου T-κυττάρων (CAR T-cells)

Τα CAR T-cells είναι γενετικά τροποποιημένα κύτταρα της T-σειράς, που εκφράζουν την περιοχή πρόσδεσης μιας ανοσοσφαιρίνης που συνδέεται μέσω διαμεμβρανικών περιοχών με τα σηματοδοτικά τμήματα του ενδοκυτταρικού υποδοχέα T-κυττάρου [172]. Αυτό επιτρέπει στα T κύτταρα να αναγνωρίζουν μη επεξεργασμένα αντιγόνα και με αποτέλεσμα την ανεξάρτητη ενεργοποίηση του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (Major histocompatibility complex, MHC).

Η διαδικασία της θεραπείας με CAR-T-cells περιλαμβάνει τη συλλογή T λεμφοκυττάρων, την τροποποίηση του υποδοχέα και, στη συνέχεια, μια αυτόλογη μεταμόσχευση των τροποποιημένων T-κυττάρων πίσω στον ασθενή. Επιλογές για μεθόδους χορήγησης γονιδίων περιλαμβάνουν ικούς φορείς και μεθόδους που βασίζονται στο RNA [173]. Η

χρήση ενός ιικού φορέα έχει το πλεονέκτημα ότι επάγει μόνιμη έκφραση του γονιδίου και έτσι προσφέρει αντικαρκινική δραστηριότητα για όσο διάστημα διατηρούνται τα τροποποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα. Οι ενδεχόμενοι κίνδυνοι αυτής της μεθόδου περιλαμβάνουν τον κακοήγη μετασχηματισμό των τροποποιημένων Τ-κυττάρων εάν η τροποποίηση γίνει με τέτοιο τρόπο ώστε να απορυθμιστεί η έκφραση ενός ογκογονιδίου [174]. Μια άλλη μέθοδος χορήγησης γονιδίων περιλαμβάνει την άμεση μεταφορά ενός τμήματος mRNA [175]. Καθώς δεν εισάγεται DNA στο γονιδίωμα του Τ-κυττάρου, αυτό εξαλείφει τον κίνδυνο κακοήθους μετασχηματισμού. Λόγω του υψηλού αντιγραφικού δυναμικού αυτών των Τ-κυττάρων, αυτές οι μέθοδοι προσφέρουν επίσης το πλεονέκτημα μιας βαθιάς αντικαρκινικής απόκρισης [176]. Ωστόσο, η επίδραση της άμεσης εισαγωγής mRNA είναι παροδική και η αντικαρκινική δραστηριότητα σπάνια παραμένει πέραν των 7 ημερών. Έτσι, όλες οι τρέχουσες κλινικές δοκιμές χρησιμοποιούν έναν ικό φορέα για την τροποποίηση [176].



Εικόνα 1.9.
*Η διαδικασία
 θεραπείας με
 CAR-T-cells*

1.3. ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ

1.3.1. Η βιολογική λειτουργία των ριβονουκλεασών

Το RNA, μαζί με τις πρωτεΐνες και το DNA, είναι πλέον γνωστό πως αποτελεί ένα από τα τρία απαραίτητα και σημαντικότερα βιομόρια της ζωής και της εξέλιξης των ειδών. Το RNA υπήρχε σε προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς οργανισμούς από την αρχή της εξέλιξης των ειδών ίσως και πριν τον κόσμο του DNA και των πρωτεϊνών, ενώ είναι πλέον γνωστό ότι διαθέτει καταλυτικές ιδιότητες και έχει την ικανότητα να αντιγράφει τον εαυτό του [177].

Σήμερα γνωρίζουμε έναν σύγχρονο κόσμο RNA που περιλαμβάνει τα γνωστά μόρια (mRNA, tRNA, rRNA, miRNA, ncRNA, κλπ.), που συναντάμε στα σημερινά βιολογικά συστήματα και συμμετέχουν σε ένα μεγάλο αριθμό κυτταρικών διεργασιών από την πρωτεινوسύνθεση και την γονιδιακή ρύθμιση, την κατάλυση βιοχημικών αντιδράσεων (σύνθεση ριβοσωμάτων, εμπλοκή σε μεταβολικά μονοπάτια) αλλά συμμετέχοντας ακόμα και στην προστασία των οργανισμών από μολυσματικούς παράγοντες [178].

Η επιστημονική κοινότητα πλέον ανακαλύπτει συνεχώς καινούργια είδη RNA μορίων, τα οποία λαμβάνουν μέρος σε ποικίλες κυτταρικές διαδικασίες και για αυτό το λόγο η σωστή δράση, κατανομή και έκφρασή τους κρίνεται απαραίτητη για τη φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου. Έτσι, η ρύθμιση της έκφρασης και αποικοδόμησής τους είναι εξίσου σημαντική και απασχολούν τους ερευνητές.

Λόγω του καθοριστικού ρόλου που κατέχει το RNA και τα μόρια, που περιλαμβάνει, είναι απαραίτητη η διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ της σύνθεσης και της αποικοδόμησης των RNA μορίων μέσα στο κύτταρο. Ο μεταγραφικός έλεγχος αποτελεί ένα τρόπο ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, όμως η μετα-μεταφραστική ρύθμιση, μέσω της αποικοδόμησης των μορίων RNA που δεν είναι λειτουργικά για το κύτταρο, είναι εξίσου σημαντική. Η αποικοδόμηση περιλαμβάνει σύνθετα μονοπάτια που αλληλοσυνδέονται και όλα καταλήγουν στην επιστράτευση των ριβονουκλεασών.

Οι ριβονουκλεάσες ή αλλιώς RNases αποτελούν ένζυμα τα οποία αποικοδομούν τα μόρια RNA σε μικρότερα τμήματα. Η αποικοδόμηση επιτελείται διασπώντας τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς μεταξύ των βάσεων των RNA μορίων, μέσω της διαδικασίας της υδρόλυσης. Ανήκουν στην κατηγορία των νουκλεασών και υπολογίζεται ότι ένα μόνο

κύτταρο εκφράζει 20 διαφορετικές ριβονουκλεάσες. Συμμετέχουν σε βιολογικές διεργασίες, δρώντας τόσο σε ενδοκυτταρικό όσο και εξωκυτταρικό επίπεδο [179].

Πέρα από την αποικοδόμηση των μορίων RNA που πλέον δεν είναι χρήσιμα ή λειτουργικά, οι RNases παίζουν σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση όλων των μορίων RNA, όπως τα αγγελιαφόρα RNA (mRNA) και τα μη κωδικά RNA (ncRNA), τα οποία συμμετέχουν σε ποικίλες κυτταρικές διεργασίες. Παράλληλα μπορούν να δράσουν ως μια πρώτη γραμμή προστασίας εναντίον των RNA ιών και συμμετέχουν σε βιολογικές διεργασίες, όπως το RNAi.

Το γονιδίωμα των περισσότερων οργανισμών κωδικοποιεί ένα μεγάλο αριθμό ριβονουκλεασών, των οποίων οι δράσεις συχνά αλληλεπικαλύπτονται. Διάφορες μεταλλάξεις, που εμφανίζονται σε αυτές δε φαίνεται να επηρεάζουν ή να εμποδίζουν την αποικοδόμηση των RNA μορίων, και αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι διαφορετικές ριβονουκλεάσες αναγνωρίζουν ίδια υποστρώματα. Η ύπαρξη λοιπόν πολλών διαφορετικών RNases υποδεικνύει την σημαντικότητα των καλά συντηρημένων μονοπατιών αποικοδόμησης των RNAs [180]. Αλλαγές στην έκφραση των ριβονουκλεασών, και τελικά στην αποικοδόμηση των μορίων RNA, φαίνεται να προκαλούν τέτοια τροποποίηση της κυτταρικής λειτουργίας, που συχνά οδηγεί σε καρκινογένεση.

Η πιο καλά χαρακτηρισμένη και μελετημένη ριβονουκλεάση είναι η βόεια παγκρεατική RNase A. Η πολυπεπτιδική της αλυσίδα αποτελείται από 124 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 12.600 Da. Είναι το πρώτο ένζυμο το οποίο συντέθηκε τεχνητά, στο εργαστήριο, και η τρίτη πρωτεΐνη που αλληλουχήθηκε. Η RNase A καταλύει τον πολυμερισμό μονόκλωνων mRNA, σπάζοντας τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς μέσω υδρόλυσης μεταξύ ριβονουκλεοτιδίων συνδεδεμένων κυρίως με πυριμιδίνες (C και U) [181,182].

Η βιολογική λειτουργία των ριβονουκλεασών δεν αφορά μόνο στην αποικοδόμηση μορίων RNA αλλά πιο συγκεκριμένα στο μεταβολισμό τους. Ειδικότερα, η συμμετοχή των ενζύμων αυτών καθίσταται στις παρακάτω περιπτώσεις [183]:

i. Επεξεργασία RNA

Παρότι η μεταγραφή είναι από τα πιο ελεγχόμενα βήματα στην γονιδιακή έκφραση, για την πλειοψηφία των νεοσυντιθέμενων μορίων RNA απαιτείται τροποποίηση με διάφορους τρόπους ώστε να φτάσουν στο επίπεδο της λειτουργικής τους μορφής [184]. Αυτή η

τροποποίηση για την παραγωγή ενός λειτουργικού RNA αφορά σε μια σειρά των γεγονότων που απαιτούνται και θα αναλυθούν παρακάτω:

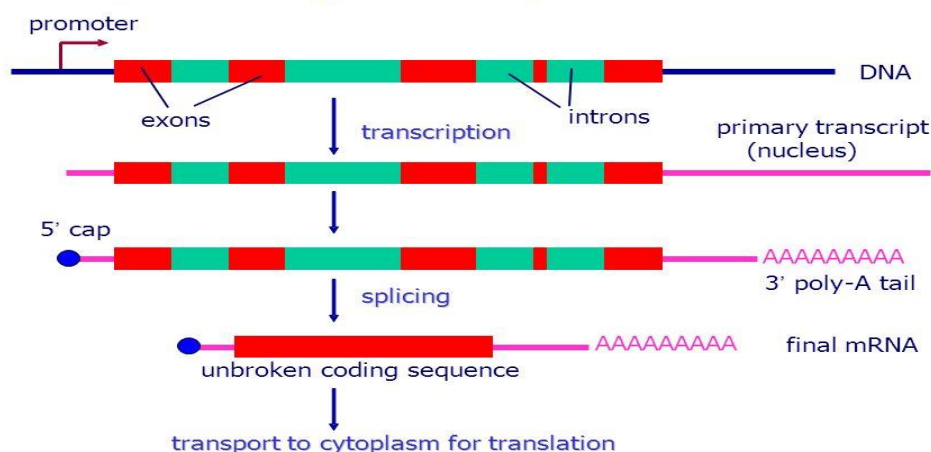
Επεξεργασία rRNA και tRNA: Λαμβάνοντας υπόψη τους βασικούς ρόλους των μορίων RNA στην πρωτεϊνοσύνθεση, αναμένεται η βασική επεξεργασία των ριβοσωμικών και των μεταφορικών RNA να είναι κοινή τόσο σε προκαρυωτικά όσο και σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Η επεξεργασία στην οποία υποβάλλονται προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά pre-rRNAs πραγματοποιείται σε διάφορα στάδια. Οι αρχικές διασπάσεις του βακτηριακού pre-rRNA οδηγούν σε διαφορετικούς προδρόμους για τα τρία μεμονωμένα rRNAs, τα οποία στη συνέχεια υποβάλλονται σε επιπλέον επεξεργασία με περαιτέρω διασπάσεις, δημιουργώντας τα τελικά προϊόντα. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, το pre-rRNA διασπάται πρώτα σε μια θέση γειτονική με το 5.8S rRNA στην πλευρά του 5' άκρου του, δίνοντας δύο διαφορετικές πρόδρομες ενώσεις που περιέχουν αντίστοιχα τα 18S και 28S + 5.8S rRNA. Στη συνέχεια περισσότερες διασπάσεις οδηγούν στα τελικά προϊόντα, όπως και στους προκαρυώτες. Όπως και τα rRNAs, έτσι και τα tRNA σε βακτηριακά και ευκαρυωτικά αρχικά συντίθενται ως μεγαλύτερα πρόδρομα μόρια (pre-tRNAs). Η επεξεργασία του 5' άκρου των pre-tRNA πραγματοποιείται με διάσπαση από ένα ένζυμο που ονομάζεται RNase P, ενώ το 3' άκρο παράγεται από τη δράση μίας συμβατικής ριβονουκλεάσης [179,184].

- Επεξεργασία mRNA: Αντίθετα με τις τροποποιήσεις των rRNAs και tRNAs, η επεξεργασία των αγγελιαφόρων RNAs πραγματοποιείται διαφορετικά μεταξύ των προκαρυωτικών και των ευκαρυωτικών κυττάρων. Στα βακτήρια, όσο η μεταγραφή βρίσκεται ακόμα σε εξέλιξη τα ριβοσώματα έχουν την ικανότητα της άμεσης πρόσβασης στο mRNA με τη μετάφραση να ξεκινά από την νεοσυντιθέμενη αλυσίδα mRNA. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, το mRNA συντίθεται στον πυρήνα και απαιτείται πρώτα η μεταφορά του στο κυτταρόπλασμα πριν αποτελέσει πρότυπο για τη πρωτεϊνοσύνθεση. Τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα το mRNA υποβάλλεται σε αρκετές τροποποιήσεις. Το 5' άκρο των προ-mRNAs υφίσταται τροποποίηση άμεσα μετά την σύνθεσή του με την προσθήκη μιας δομής που ονομάζεται καλύπτρα 7-μεθυλογουανωσίνης. Η κάλυψη αρχίζει με την προσθήκη ενός μορίου GTP σε αντίστροφο προσανατολισμό στο τελικό νουκλεοτίδιο του 5' άκρου του pre-mRNA. Το 3' άκρο των περισσότερων ευκαρυωτικών mRNAs δεν καθορίζεται από το πέρας της μεταγραφής, αλλά από

μια διαδικασία επεξεργασίας που καλείται πολυαδενυλίωση, με τη διάσπαση δηλαδή του αρχικού μεταγράφου και την προσθήκη μιας πολυ-A ουράς. Ωστόσο, η αφαίρεση των ιντρονίων κατά την επεξεργασία των pre-mRNAs αποτελεί ίσως την πιο εντυπωσιακή διαδικασία. Στις κωδικές αλληλουχίες των περισσότερων ευκαρυωτικών γονιδίων παρεμβάλλονται μη κωδικές αλληλουχίες (εσώνια) που τελικά αποκόπτονται με ακρίβεια από το ώριμο mRNA, μέσω της διαδικασίας του ματίσματος/συρραφής.

- Επεξεργασία miRNA και siRNA: Τα συγκεκριμένα μόρια RNA μεγέθους 21-25 νουκλεοτιδίων έχουν βασικό ρόλο στο τερματισμό της μετάφρασης και στην αποικοδόμηση του mRNA. Η μεταγραφή των miRNA πραγματοποιείται από ενδογενή γονίδια ως pri-miRNA (μεγέθους περίπου 85 νουκλεοτιδίων με δομή φουρκέτας). Στη συνέχεια το ένζυμο Drosha θα διασπάσει τα πρώιμα μόρια. Τα pre-miRNA πλέον μετατρέπονται σε λειτουργικά από τη Dicer στο κυτταρόπλασμα. Τα siRNA, που προέρχονται από δίκλιωνα μόρια RNA, υφίστανται επίσης επεξεργασία με το ένζυμο Dicer. Και οι δύο αυτές μορφές RNA συμπλέκονται με πρωτεΐνες (π.χ. AGO2) δημιουργώντας το σύμπλοκο RISC, το οποίο εμφανίζει δράση εξωνουκλεάσης ή ενδονουκλεάσης. Με αυτό το τρόπο, καθίσταται δυνατή η αποικοδόμηση, συμπληρωματικών με αυτά, μορίων mRNA.
- Επεξεργασία άλλων μορφών RNAs (π.χ. ncRNAs)
- Εναλλακτικό μάτισμα

RNA processing in eukaryotes



Εικόνα 1.10. Η επεξεργασία του RNA στους ευκαρυώτες

ii. Αποικοδόμηση RNA

Από τις κυριότερες λειτουργίες των ριβονουκλεασών είναι η αποικοδόμηση των RNAs. Οι αντιδράσεις αποικοδόμησης εξαλείφουν μόρια RNA που πλέον δεν χρησιμεύουν ή είναι μη λειτουργικά για το κύτταρο. Αρκετές μορφές RNA μορίων υφίστανται αποικοδόμηση, με προεξέχουσα αυτή του mRNA καθώς και των εσωνίων, που προκύπτουν από την τροποποίηση του. Η αποικοδόμηση είναι μια αρκετά πολύπλοκη διαδικασία, στην οποία συμμετέχει μία πληθώρα ριβονουκλεασών, τόσο σε σύμπλοκα με άλλες πρωτεΐνες όσο και αυτοτελώς.

Δυσλειτουργικά μόρια mRNA που περιλαμβάνουν ανερμηνεύσιμα κωδικόνια υποβάλλονται στα μονοπάτια αποικοδόμησης NMD (Nonsense mediated mRNA decay). Η παρουσία μιας ανερμηνεύσιμης μετάλλαξης οδηγεί σε εκτεταμένη αποικοδόμηση του mRNA [185,186]. Το γεγονός ότι η αποικοδόμηση εξαρτάται από ένα κωδικόνιο λήξης δείχνει ότι αποικοδόμηση λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα. Ο συγκεκριμένος μηχανισμός επιλεκτικής αποικοδόμησης των μορίων RNA με ανερμηνεύσιμα κωδικόνια είναι πιθανό να αποτελεί ένα σύστημα ποιοτικού ελέγχου ή επιτήρησης που εξαλείφει τα μη λειτουργικά mRNA. Αντίστοιχα στη διαδικασία που αναφέρεται ως NSD (Non-stop decay), τα mRNA τα οποία δεν φέρουν κωδικόνιο τερματισμού αναγνωρίζονται και αποικοδομούνται με κατεύθυνση 3'-5' από το κυτταροπλασματικό εξώσωμα.

Το 90% του συνολικού RNA, τόσο στα προκαρυωτικά όσο και στα ευκαρυωτικά κύτταρα αντιπροσωπεύεται από τα πολύ σταθερά μόρια των rRNAs και tRNAs. Αντίθετα, τα mRNAs απαιτείται να διασπαστούν με ταχύτερους ρυθμούς ώστε να υπάρχει ισορροπία μεταξύ των μορίων που μεταγράφονται και εκείνων που τελικά θα αποικοδομηθούν. Όσον αφορά τα βακτηριακά mRNA, αποικοδομούνται πολύ γρήγορα, συνήθως ο χρόνος ημίσειας ζωής τους είναι μόνο 2-3 λεπτά. Με αυτό το τρόπο, το κύτταρο έχει την ικανότητα να ανταποκρίνεται εγκαίρως σε αλλαγές στο περιβάλλον του, όπως αλλαγές στη διαθεσιμότητα των θρεπτικών ουσιών που απαιτούνται για την ανάπτυξη του. Ωστόσο, στα ευκαρυωτικά κύτταρα, τα mRNAs αποικοδομούνται με διαφορετικούς ρυθμούς, αναλόγως τις ανάγκες του κυττάρου. Η αποικοδόμηση της πλειοψηφίας των ευκαρυωτικών mRNA αρχίζει με διάσπαση των πολυ-A ουρών τους, την αποαδενυλίωση δηλαδή του 3' άκρου [187]. Το ένζυμο που καταλύει τη συγκεκριμένη διεργασία στα Σπονδυλωτά είναι η εξωνουκλεάση PARN. Η δράση του ενζύμου είναι συνεχής από την

αρχή της αποικοδόμησης ενός συγκεκριμένου υποστρώματος mRNA και συνεχίζει να το τεμαχίζει βάση-βάση έως το τέλος. Η αποαδενυλίωση της 3' ουράς πυροδοτεί την αφαίρεση της καλύπτρας από το 5' άκρο του mRNA από ένα ειδικό ένζυμο την PABR που δρα και από τα δύο άκρα (5' → 3' και αντίστροφα). Η διαδικασία αφαίρεσης της καλύπτρας συμβαίνει με αποκοπή 1-2 βάσεων από το 5' άκρο [188]. Για να αφαιρεθεί η καλύπτρα, που εμποδίζει την αποικοδόμηση του mRNA είναι απαραίτητη η διάσπαση της πολύ-A ουράς. Ο χρόνος ημίσειας ζωής των mRNA στα κύτταρα των θηλαστικών κυμαίνεται από 30 λεπτά έως περίπου 20 ώρες [184].

Η δράση των ριβονουκλεασών δεν είναι ανεξέλεγκτη, αλλά υπάρχουν μηχανισμοί για την αναγνώριση του υποστρώματος δράσης τους. Δηλαδή ο τρόπος, με τον οποίο τα ένζυμα αυτά αναγνωρίζουν και ξεχωρίζουν τα μόρια RNA που πρέπει να αποικοδομηθούν και αυτά που είναι απαραίτητα για την επιβίωση του κυττάρου. Τα ίδια τα κύτταρα έχουν αναπτύξει προστατευτικούς μηχανισμούς των σημαντικών RNA μορίων τους από την ανεξέλεγκτη δράση των RNAses, έτσι ώστε να υπάρχει σαφής διαχωρισμός στα υποστρώματα δράσης τους [188]. Πρώτα από όλα, πολλά μόρια RNA έχουν τη μορφή ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων μέσα στο κύτταρο, όπως το ριβόσωμα, αυτές οι πρωτεΐνες λοιπόν, που περιβάλλουν το rRNA προσφέρουν και μια προστασία έναντι των νουκλεολυτικών ενζύμων. Επιπλέον, η συμπαγής τριτοταγής δομή που έχουν τα tRNA προσδίδει ανθεκτικότητα έναντι μη εξειδικευμένων ριβονουκλεασών, αποτελεί όμως και στοιχείο αναγνώρισης για τα «processing» ένζυμα. Παράλληλα είναι γνωστό ότι με την ομοιοπολική τροποποίηση, που υφίστανται τα άκρα των μορίων των mRNA, με την προσθήκη της καλύπτρας στο 5' άκρο και της πολύ(A) ουράς στο 3' άκρο διασφαλίζεται και μια σταθερότητα έναντι των εξωνουκλεασών. Ωστόσο, ένα τυχαίο mRNA δεν κινδυνεύει να αποικοδομηθεί από αυτά τα ένζυμα, καθώς οι εξειδικευμένες ριβονουκλεάσες αναγνωρίζουν μόνο τα συγκεκριμένα υποστρώματα δράσης τους.

Η ακεραιότητα των μορίων RNA εξασφαλίζεται και με άλλους τρόπους, όπως η παρουσία και η δράση πρωτεϊνικών αναστολέων ριβονουκλεασών στο κυτταρόπλασμα ευκαρυωτικών κυττάρων. Τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η πρωτεΐνη αναστολέας ριβονουκλεασών (ribonuclease inhibitor, RI), η οποία εμφανίζει τη μέγιστη χημική συγγένεια με ορισμένες ριβονουκλεάσες, στις οποίες και προσδένεται, εμποδίζοντας τη δράση τους. Μέχρι τώρα, πρωτεΐνες αναστολές τέτοιου τύπου έχουν απομονωθεί από

ανθρώπινο πλακούντα, από εγκέφαλο χοίρου και από άλλες πηγές κυρίως θηλαστικών [189].

Συν της άλλης, ένα ανεπιθύμητο αποτέλεσμα από την μη ορθή δράση των ριβονουκλεασών μπορεί να περιοριστεί από μηχανισμούς επιδιόρθωσης, δημιουργείται έτσι ένα εξαιρετικά ευαίσθητο κύκλωμα όπου οι ριβονουκλεάσες αναγνωρίζουν εξειδικευμένα υποστρώματα και δρουν σε αυτά χωρίς να βλάπτουν τα λειτουργικά RNA μόρια. Επομένως, οι ριβονουκλεάσες αποτελούν ένα κύριο ρυθμιστικό παράγοντα του μεταβολισμού των μορίων RNA στον οργανισμό, για την σωστή γονιδιακή ρύθμιση και έκφραση. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερες μελέτες έχουν αποκαλύψει την σημαντικότητα και του μετα-μεταγραφικού μηχανισμού στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης ειδικά στη διαδικασία αποικοδόμησης του mRNA. Οι αποκαλύψεις αυτές έχουν οδηγήσει στο συμπέρασμα έντονης συσχέτισης μεταξύ καρκινογένεσης και δυσλειτουργίας μεταβολισμού του mRNA, με τις ριβονουκλεάσες να παίζουν σημαντικό ρόλο σε αυτό.

Οι ριβονουκλεάσες εμπλέκονται στην καρκινογένεση και έχουν σημαντική επίδραση στον μετα-μεταγραφικό έλεγχο, καθώς έχουν την ικανότητα να δράσουν ως ογκοπρωτείνες ή ογκοκαταστολείς δίνοντας μια άλλη διάσταση στη ρύθμιση του mRNA και τους ρυθμούς της μετάφρασης [190,191]. Όπως αναφέρθηκε, οι ριβονουκλεάσες εμπλέκονται στον μηχανισμό αποαδενυλίωσης του mRNA. Απουσία λοιπόν ρυθμιστικών μηχανισμών οι ριβονουκλεάσες έχουν σημαντική επίδραση στην γονιδιακή έκφραση αφού μόνο μία ενδονουκλεολυτική κοπή είναι αρκετή για να οδηγήσει στην αδρανοποίηση του mRNA. Ωστόσο, τα κύτταρα διαθέτουν μηχανισμούς για την αποτροπή ανώμαλων αποικοδομήσεων των mRNA, που ρυθμίζουν τις ριβονουκλεάσες. Τέτοιοι μηχανισμοί αποτελούν ορισμένα κυτταρικά σήματα που ελέγχουν την διασφάλιση των επιπέδων της γονιδιακής έκφρασης σε επίπεδο mRNA.

Η μειωμένη αποικοδόμηση ογκογόνων mRNA μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη καρκίνου, λόγω της μειωμένης δραστηριότητας των ριβονουκλεασών και των miRNAs που αναστέλλουν την μετάφραση ογκογόνων mRNAs. Αντίστοιχες επιδράσεις έχουν η αυξημένη δραστηριότητα των σταθεροποιητικών ή η μειωμένη δραστηριότητα των αποσταθεροποιητικών πρωτεϊνών που συνδέονται με το mRNA. Από την άλλη, η αυξημένη αποικοδόμηση των ογκοκατασταλτικών mRNAs επίσης οδηγεί σε ανάπτυξη καρκίνων στις περιπτώσεις αυξημένης δραστηριότητας ριβονουκλεασών ή miRNAs που

αναστέλλουν την μετάφρασή τους. Σημαντικό ρόλο κατέχουν οι πρωτεΐνες που συνδέονται με το mRNA.

Συμπερασματικά λοιπόν, η δράση των RNases στην κυκλοφορία και αποικοδόμηση των mRNAs εμπλέκεται έντονα σε περιπτώσεις καρκινογένεσης είτε με αποικοδόμηση ογκοκατασταλτικών mRNAs λόγω έντονης δράσης τους είτε με μη αποικοδόμηση ογκογόνων mRNAs λόγω μειωμένης δράσης [192].

1.3.2. Κατηγορίες ριβονουκλεασών

Έχει ήδη αναφερθεί, οι ριβονουκλεάσες (RNases) παίζουν κεντρικό ρόλο σε πολλές πτυχές του μεταβολισμού του RNA. Οι αντιδράσεις που καταλύονται από αυτήν την ομάδα ενζύμων περιλαμβάνουν την επεξεργασία και μετατροπή των πρόδρομων RNA σε ώριμα, λειτουργικά μόρια, την τροποποίηση τους σε διαφορετικές μορφές και την αποικοδόμηση των μη λειτουργικών RNAs. Πιο συγκεκριμένα, αυτή η ομάδα ενζύμων διακρίνεται, σύμφωνα με τον τρόπο και τόπο δράσης, σε δύο μεγάλες κατηγορίες:

i. Εξωριβονουκλεάσες

Οι εξωριβονουκλεάσες συμμετέχουν σε πολλές σημαντικές λειτουργίες που σχετίζονται με τον καταβολισμό του RNA: RNA τροποποίηση, αποικοδόμηση, παρεμβολής, μεταγραφή και διαμόρφωση της κυτταρικής έκφρασης καθώς και άμυνας εναντίον των ιών [193]. Έχουν την ικανότητα να δρουν διασπώντας RNA μόρια από το 3' ή και το 5' άκρο, απελευθερώνοντας υπολείμματα νουκλεοτιδίων, και για αυτό το λόγο κατηγοριοποιούνται με βάση της κατεύθυνσης δράσης τους σε 5'- εξωριβονουκλεάσες, και σε 3'- εξωριβονουκλεάσες.

Στα περισσότερα βακτήρια, οι εξωριβονουκλεάσες δρουν στο 3' άκρο του RNA, καθώς τα βακτηριακά mRNA δεν φέρουν καλύπτρα και θα ήταν ιδιαίτερα ευπαθή σε ριβονουκλεάσες 5'→3'. Παρότι μέχρι σήμερα έχει ταυτοποιηθεί ένας μεγάλος αριθμός 3'-5' εξωριβονουκλεασών, με μόνο στο βακτήριο *Escherichia coli* να εντοπίζονται οκτώ από αυτές, λίγες 5'-3' έχουν βρεθεί, με προεξέχουσα την Xm1/Xm2 οικογένεια [194]. Οι εξωριβονουκλεάσες κατατάσσονται σε έξι υπεριοικογένειες, την RNP (περιέχει μη ειδικές ριβονουκλεάσες, χρειάζεται μεταλλοκατιόντα για τη δράση της και υπάρχει τόσο σε βακτήρια όσο και σε ευκαρυώτες), την DEDD (περιέχει τις RNaseD, RNaseT, oligoribonuclease και άλλες και εμφανίζει πιο υψηλή ειδικότητα ως προς το υπόστρωμα,

έχει τουλάχιστον 10 αντιπροσώπους στα ευκαρυωτικά κύτταρα), την RBN (δεν παρουσιάζει ομολογία στους ευκαρυώτες και η δράση της δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένη), την PDX (αφήνει ελεύθερα φωσφορικά δινουκλεοτίδια και περιέχει τις PNPase και RNase PH, εμφανίζεται σε όλα τα πρωκαρυώτες και ευκαρυώτες), την RRP4 που φέρουν 3'-5' υδρολυτική ικανότητα και την 5PX (περιέχει τις Xrn1p και Rat1p) με 5'-3' υδρολυτική ικανότητα [193,195].

ii. Ενδοριβονουκλεάσες

Οι ενδοριβονουκλεάσες είναι ένζυμα τα οποία διασπούν τα μόρια RNA εσωτερικά, απελευθερώνοντας θραύσματα RNA διαφόρων μεγεθών. Παρουσιάζουν τεράστια ποικιλομορφία τόσο στην υποστρωματική τους εξειδίκευση όσο και στη δομή των υποστρωμάτων τους [196]. Η δράση τους μπορεί να είναι ιδιαίτερα εξειδικευμένη, να διασπούν δηλαδή ένα ή λίγα σημεία ανά μόριο RNA, ή μη ειδική, δρώντας σε όλη την αλυσίδα του RNA, οδηγώντας το σε πλήρη αποικοδόμηση. Ανάλογα με τον μηχανισμό αντίδρασης της κάθε RNase, η διάσπαση μπορεί να γίνει και στις δύο πλευρές του φωσφοδιεστερικού δεσμού.

Οι ενδοριβονουκλεάσες διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: α) σε αυτές που αντιδρούν υδρολυτικά αναγεννώντας προϊόντα με φωσφορικές ομάδες στο 3' άκρο και έχουν σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενδιάμεσων κυκλικών 2'-3' προϊόντων, χωρίς η δράση τους να απαιτεί τη παρουσία δισθενών κατιόντων, και β) σε αυτές που παρουσιάζουν μεγάλη υποστρωματική εξειδίκευση και παίρνουν μέρος σε τροποποιητικές διαδικασίες καθώς και στην ωρίμανση του RNA. Αυτή η κατηγορία συνήθως δημιουργεί θραύσματα με 3' υδροξυλιωμένα άκρα και φωσφορικά 5' άκρα [197]. Ενώ η παρουσία δισθενών ιόντων είναι απαραίτητη για την καταλυτική διαδικασία [198].

Οι ενδοριβονουκλεάσες, με τις τελευταίες ανακαλύψεις, απέδειξαν τον σημαντικό τους ρόλο στον μεταβολισμό του και την αποικοδόμησή του mRNA. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν πολλές ριβονουκλεάσες, με καλύτερα παραδείγματα να αποτελούν αυτές της *E. Coli*. Χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι είναι οι RNaseI, III, P, E, G, HI, HII, Z, ο οποίος συμμετέχουν στη διεργασία αποικοδόμησης του RNA, στην ωρίμανσή του και στην επιδιόρθωση του DNA του βακτηρίου [199,201]. Γνωστές ριβονουκλεάσες είναι και η PMR1, που ανήκει στην οικογένεια των υπεροξειδασών ενώ δρα σε σύμπλοκο με άλλες πρωτεΐνες και αποικοδομεί το mRNA, η IRE1, που ενεργοποιεί το γονίδιο XBP1 με

μάτισμα και επάγει την έκφραση διαφόρων γονιδίων, η RNase L, η οποία διασπά δίκλωνο ιικό RNA, μέσω του μονοπατιού 2-5A και η Dicer, που ανήκει στην οικογένεια ριβονουκλεασών III και παίρνει μέρος στη βιογένεση των miRNA και siRNA για γονιδιακή αποσιώπηση μετά τη μεταγραφή. Σε αυτές προστίθενται και οι εξίσου σημαντικές AGO2, που ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών αργοναυτών και συμμετέχει στο RNAi μέσω του συμπλόκου RISC, η Αλδολάση C, που δρα σε mRNA του εγκεφάλου και νευρικού ιστού και η Αγγειογενίνη, που ανήκει στην οικογένεια των RNase A και διασπά μικρά μόρια RNA από tRNA, που εκφράζονται λόγω στρες. Τέλος, άλλες εκπρόσωποι των ενδοριβονουκλεασών είναι οι: ARD-1, G3BP, SMG6, Rrp44, PP11 και APE1 [199,202].

1.3.3. Η οικογένεια της Ριβονουκλεάσης κ

Η οικογένεια της ριβονουκλεάσης κ ή αλλιώς RNase κ ανήκει στην κατηγορία των ενδοριβονουκλεασών, της οποίας ιδρυτικό μέλος αποτελεί η Cc ριβονουκλεάση. Η Cc RNase εντοπίστηκε πρώτη φορά και απομονώθηκε το 1987 στο εργαστήριο μας από νεαρές προνύμφες 6 ημερών του εντόμου *Ceratitis capitata*. Το ένζυμο αντιπροσωπεύεται από ένα μοναδικό ορθόλογο γονίδιο σε μιας μεγάλης κλίμακας ταξινόμησης των ζωικών ομάδων και στο έντομο *Ceratitis capitata* δίνει δύο μετάγραφα, ένα 0,9 και ένα 1,5 kb. Τα ορθόλογα γονίδια παρουσιάζουν ένα αυστηρό πρότυπο γονιδιακής οργάνωσης έχοντας αρκετά συντηρημένες τις θέσεις τους, αποτελούμενα από τρία εξώνια και δύο εσώνια [203].

Αποτελείται από μια πολυλεπτιδική αλυσίδα 95 αμινοξέων και αποικοδομεί επιλεκτικά poly(U) και poly(C) υποστρώματα [204] χωρίς όμως να παρουσιάζει την αντίστοιχη δραστηριότητα σε άλλα ομοπολυριβονουκλεοτιδικά υποστρώματα. Η σχετική μοριακή μάζα της είναι 25.000D (95 αμινοξέα) και το βέλτιστο pH για τη δράση της κυμαίνεται μεταξύ 7-9 [204] δεν παρουσιάζει ομοιότητες με άλλες ριβονουκλεάσες. Το cDNA που κωδικοποιεί την σύνθεση του ενζύμου απομονώθηκε από δύο αλληλοεπικαλυπτόμενους κλώνους, αρχικά με την χρήση ανοσάρωσης του ενός κλώνου και ύστερα με την χρήση 5'-RACE PCR στο cDNA του άλλου κλώνου. Έπειτα αναλύθηκε η βάση δεδομένων με EST αλληλουχίες (Expressed Sequence Tags), όπου και βρέθηκαν πολλές αλληλουχίες που προέρχονταν από 19 διαφορετικά είδη ζώων (θηλαστικά, αμφίβια, ψάρια, πουλιά, έντομα, νηματώδεις) και εμφάνιζαν υψηλό ποσοστό ομολογίας με την Cc RNase [205]. Το

γεγονός αυτό φανερώνει την ισχυρή επικράτηση του ενζύμου κατά την εξέλιξη, κάτι που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι επιτελεί βασικές λειτουργίες. Μια πληθώρα ανθρώπινων ESTs, προερχόμενα από ανθρώπινους φυσιολογικούς και μη, τόσο ενήλικους όσο και εμβρυικούς ιστούς, κωδικοποιούν για τον αντίστοιχο εκπρόσωπο της οικογένειας αυτής. Αυτή η καθολική έκφραση της συγκεκριμένης ριβονουκλεάσης την καθιστά γονίδιο αναφοράς (housekeeping gene) [206].

1.3.3.1. Η ανθρώπινη ριβονουκλεάση κ: Δομή και Δράση

Το 2007 η μελέτη της ανθρώπινης RNase κ ξεκίνησε στο εργαστήριό μας από τους Economidou, Sideris, Fragoulis. Η μελέτη αφορούσε την μοριακή κλωνοποίηση και το χαρακτηρισμό του γονιδίου. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι πρόκειται για ένα ορθόλογο γονίδιο, που εδράζεται στο χρωμόσωμα 17. Ειδικότερα, η ακριβής του θέση είναι η 17p13.1, η οποία αντιστοιχεί στο γενετικό τόπο LOC440400. Μετά από σύγκριση των αλληλουχιών του γενωμικού DNA και του cDNA, αποκαλύφθηκε ότι το γονίδιο της ριβονουκλεάσης κ αποτελείται από 3 εξόνια και 2 εσόνια, όπως δηλαδή και τα περισσότερα ορθόλογα γονίδια.

Τα δύο εσόνια αποτελούνται από 904 ζεύγη βάσεων (ζ.β.) και 402 ζ.β. αντίστοιχα. Το πρώτο εξόνιο, έχει μήκος 118 ζ.β., από τα οποία τα 40 ζ.β. αποτελούν την 5' αμετάφραστη περιοχή και τα υπόλοιπα κωδικοποιούν για τα πρώτα 26 αμινοξέα. Το δεύτερο εξόνιο μήκους 77 ζ.β., κωδικοποιεί για τα επόμενα 26 αμινοξέα της ανθρώπινης πρωτεΐνης και τέλος, το τρίτο εξόνιο έχει μήκος 387 ζ.β., με τα 245 ζ.β. να ανήκουν στην 3' αμετάφραστη περιοχή και τα υπόλοιπα 139 ζ.β. να κωδικοποιούν τα τελευταία 46 αμινοξέα. Συγκρίνοντας, λοιπόν, την ανθρώπινη RNase κ με την προηγουμένως χαρακτηρισμένη CcRNase της ίδιας οικογένειας, εμφανίζεται μια σειρά από σημαντικές ομοιότητες. Η ανθρώπινη πρωτεΐνη αποτελείται από 98 αμινοξέα είναι δηλαδή κατά τρία αμινοξέα μεγαλύτερη και εμφανίζει 40% ομοιότητα σε επίπεδο αμινοξέων με την CcRNase [207]. Και τα δύο ένζυμα δρουν υδρολύοντας το RNA στο στις ίδιες τιμές pH, παρουσιάζουν θερμοευαισθησία και η δράση τους αναστέλλεται από ιόντα Zn. Σχετικά με την νουκλεοτιδική τους ειδικότητα, και τα δύο υδρολύουν δεσμούς UpU, με την διαφορά ότι η Cc RNase κόβει δεσμούς CpC πιο αποτελεσματικά σε σύγκριση με την RNase κ.

Ανάλυση κατά Northern έδειξε την ύπαρξη ενός κύριου μεταγράφου της ανθρώπινης RNase κ αποτελούμενο από 700 νουκλεοτίδια στους ιστούς που εξετάστηκαν (εγκέφαλος,

καρδιά, πνεύμονας, ήπαρ, νεφροί, πάγκρεας, πλακούντας, σκελετικός μυς). Παράλληλα, η ανάλυση είχε σαν αποτέλεσμα και την ανίχνευση δύο επιπλέον mRNA μεταγράφων, μήκους 3,1 και 5 kb, που ταυτοποιήθηκαν μόνο σε εγκέφαλο, πλακούντα και πάγκρεας, ενώ και ένα τρίτο μετάγραφο μήκους 1,6 kb εντοπίστηκε στα Β κύτταρα [205, 207].

Η RNase κ εμφανίζει δραστηριότητα ενδοριβονουκλεάσης κόβοντας ενζυμικά φωσφοδιεστερικούς δεσμούς σε μονόκλωνες αλυσίδες στις θέσεις με ApU και ApG, ενώ υδρολύει UpU δεσμούς σε χαμηλότερο ρυθμό. Η παρουσία μερικών πολύ καλά συντηρημένων κατάλοιπων κυστεϊνών σε πολλούς οργανισμούς, φαίνεται να είναι σημαντική για την καταλυτική ενεργότητα της οικογένειας RNase κ. Τα κατάλοιπα Cys6, Cys14 και Cys69 εμφανίζονται απόλυτα συντηρημένα, σε όλα τα είδη, ενώ τα Cys7 και Cys85 είναι συντηρημένα μεταξύ σπονδυλωτών, αμφιβίων, πτηνών και θηλαστικών [208]. Όσον αφορά την δομή του ενζύμου, τα δεδομένα σχετικά με την απόλυτη συντηρητικότητα υποδεικνύουν την εξαιρετικά μεγάλη σημασία των καταλοίπων κυστεϊνης καθώς ανάμεσα στα Cys6 και Cys69 σχηματίζεται ενδομοριακός δισουλφιδικός δεσμός, απαραίτητος για την σωστή αναδίπλωση του μορίου και τη λειτουργική του μορφή. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι ο αυτός ο δεσμός πιθανότατα να είναι συντηρημένος σε όλους τους εκπροσώπους της οικογένειας, καθώς παίζει ρόλο στην ενεργότητα του ενζύμου [208].

Το μετάγραφο, που ήταν γνωστο μέχρι πρότινος, είχε μελετηθεί με τη μορφή cDNA. Αυτό έχει μήκος 466 ζ.β. και κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη 98 αμινοξέων (RNaseκ01) έχοντας ενδοριβονουκλεοτιδική δράση Σε πρόσφατη μελέτη (2014), που έγινε στο εργαστήριό μας, από τους Karousis και Sideris, βρέθηκε μια ισομορφή της ριβονουκλεάσης κ, η οποία αποτελεί αποτέλεσμα ενός καινούργιου μεταγράφου mRNA, που προκύπτει μετά από εναλλακτικό μάτισμα στο σημείο σύνδεσης του εξονίου 1 και 2. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να απουσιάζει μια αλληλουχία GTTG. Κωδικοποιεί για τη σύνθεση μιας πρωτεΐνης (RNaseκ02) 134 αμινοξέων, που εκφράζεται σε όλες τις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν, με μοριακό βάρος 14.900 Da και κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης διαφορετικό από το αντίστοιχο της κ01. Οι αμινοξικές αλληλουχίες των κ01 και κ02 δεν εμφανίζουν καμία ομοιότητα στο αμινοτελικό τους άκρο, όμως η περιοχή των αμινοξέων 63-134 της κ02 είναι εντελώς ταυτόσημη με τη μεγαλύτερη περιοχή της κ01 (27-98 αα).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί και οι δύο τελικά ισομορφές εκφράζονται σε όλες τις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν, σε διαφορετικές όμως αναλογίες, με την ισομορφή κ02 να είναι αρκετά πιο υδρόφοβη. Με το γεγονός αυτό συνδυαστικά με τον εντοπισμό της στο κυτταρόπλασμα, συμπεραίνεται ότι πιθανώς παίζει ρόλο στο σχηματισμό μακρομοριακών συμπλόκων *in vivo* ή εντοπίζεται σε μεμβρανικές δομές, όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο [209].

Τέλος, τα δεδομένα δείχνουν ότι η ριβονουκλεάση κ εμπλέκεται και σε άλλες διαδικασίες, χωρίς τη δράση ριβονουκλεάσης. Πιο συγκεκριμένα, φαίνεται να συμβάλλει στην, μεσολαβούμενη από κλαθρίνη, ενδοκύττωση πολλών ιών, όπως ο ιός του Δυτικού Νείλου, ο ιός της γρίπης, ο αδενοϊός, ο RVFW (Rift Valley Fever) και ο ιός του Δάγκειου πυρετού, στο κύτταρο-ξενιστή. Ωστόσο δε φαίνεται να συμμετέχει στην προσκόλληση των ιών στο κύτταρο, παρά μόνο στα αρχικά στάδια της ενσωμάτωσής τους, ενώ η απώλεια της ριβονουκλάσης κ φαίνεται να αποτρέπει τα πρώιμα στάδια ενδοκύττωσης και πολλαπλασιασμού πολλών ιών. Υποστηρίζεται ακόμα ότι συνδέεται άμεσα με την αντλία πρωτονίων V-ATPase, έχοντας σημαντικό στη ρόλο στη διατήρηση της σωστής λειτουργίας της [210,211].

1.4. ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΟ ΜΑΤΙΣΜΑ

Ασυνεχή γονίδια [212] απαντώνται σε όλα σχεδόν τα ανώτερα ευκαρυωτικά γονιδιώματα, είναι δεδομένο λοιπόν ότι στα γονίδια αυτά ανάμεσα στα εξόνια παρεμβάλλονται τα εσόνια. Για να σχηματιστεί το πλήρως λειτουργικό mRNA (ώριμο mRNA) από το πρωτογενές μετάγραφο ενός γονιδίου (πρόδρομο mRNA), που να κωδικοποιεί τη σωστή πρωτεΐνη, πρέπει να απομακρυνθούν τα εσόνια και τα εξόνια να συνδεθούν μεταξύ τους. Το λεγόμενο μάτισμα ή συρραφή αποτελεί αυτή τη διαδικασία. Το μάτισμα είναι μια ιδιαίτερα πολύπλοκη και ευαίσθητη διεργασία, κι αυτό γιατί στη περίπτωση λάθους στα σημεία συρραφής, το πλαίσιο ανάγνωσης αλλάζει με αποτέλεσμα μια εντελώς διαφορετική αμινοξική αλληλουχία.

Σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς υπάρχουν συγκεκριμένα σημεία συρραφής, ώστε να αποφεύγονται τα λάθη κατά το σχηματισμό του ώριμου mRNA. Αυτές οι θέσεις ορίζονται από τις αλληλουχίες που βρίσκονται μεταξύ των ορίων του κάθε εσονίου και εξονίου και αποτελούν τις θέσεις αποκοπής και επανένωσης. Οι θέσεις συρραφής φέρουν διαφορετική αλληλουχία μεταξύ τους προσδιορίζοντας έτσι την φορά του ιντρονίου

[213]. Την αρχή των εσονίων αποτελούν οι βάσεις (5') GU (αριστερή θέση ή θέση δότη) και το τέλος του οι AG (3') (δεξιά θέση ή θέση δέκτη) [214]. Η αναγνώριση των θέσεων ματίσματος εξαρτάται από δύο κυρίως παράγοντες: 1) την ισχύ της συναινετικής (*consensus*) αλληλουχίας που αντιστοιχεί στην περιοχή γύρω από την υποψήφια θέση ματίσματος (ισχύς ματίσματος) και 2) τις αλληλεπιδράσεις συγκεκριμένων αλληλουχιών του πρώιμου RNA με πληθώρα ρυθμιστικών παραγόντων όπως οι SR (serine arginine) πρωτεΐνες, οι ετερογενείς οικογένειες πυρηνικών ριβονουκλεοπρωτεϊνών (hnRNP) και οι παράγοντες snRNA που ρυθμίζουν την επιλογή των εξονίων [215].

Το μάτισμα επιτυγχάνει την αφαίρεση των ιντρονίων και την συρραφή εξονίων, ακολουθώντας συνήθως συγκεκριμένα μονοπάτια, ώστε να δημιουργηθεί ένα λειτουργικό mRNA. Απαραίτητες για τη διαδικασία του ματίσματος φαίνεται να είναι συγκεκριμένες συντηρημένες αλληλουχίες χωρίς όμως το υπόλοιπο ιντρόνιο να είναι σημαντικό [216]. Αυτές οι αλληλουχίες, οι οποίες περιγράφηκαν παραπάνω αφορούν στον κανόνα GU-AG, στα άκρα δηλαδή του ιντρονίου. Με την αντίδραση στη 5' θέση ματίσματος σχηματίζεται μια θηλιά, όπου το άκρο GU σχηματίζει έναν 5'-2' φωσφοδιεστερικό δεσμό με το ιντρόνιο στο κατάλοιπο αδερίνης στην 6' θέση της διακλάδωσης. Έπειτα, το 3'-OH άκρο του 5' εξονίου προσβάλλει την 3' θέση του ματίσματος, με αυτό το τρόπο συνδέονται τα εξόνια και αποδεσμεύεται το ιντρόνιο με την μορφή θηλιάς. Και στις δύο αντιδράσεις ο αριθμός των δεσμών διατηρείται σταθερός.

Για την αποκοπή και επανένωση των τμημάτων μεταξύ τους, απαιτείται η δημιουργία ενός μεγάλου συμπλόκου που καλείται σωματίο ματίσματος ή το συρραπτόσωμα ή σωματίο συρραφής (spliceosome) [217]. Το σωματίο ματίσματος συναρμολογεί τις συντηρημένες πρότυπες αλληλουχίες σε μια δομή η οποία διευκολύνει την πραγματοποίηση της αντίδρασης. Δημιουργείται συνήθως με την αναγνώριση της 5' θέσης ματίσματος, τη διαδικασία δηλαδή καθορισμού ιντρονίου. Το σωματίο ματίσματος περιέχει μικρά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωματία με πρωτεϊνικά στοιχεία (snRNP) και μικρού μεγέθους RNA (snRNA), εκ των οποίων τα βασικά είναι τα U1, U2, U4/U6 και U5 [218].

Τα U1, U2 και U5 snRNP περιέχουν το καθένα ένα μόριο snRNP και αρκετές πρωτεΐνες. Το U4/U6 περιέχει 2 snRNP και αρκετές πρωτεΐνες και αυτό. Κάποιες πρωτεΐνες είναι κοινές σε όλα τα σωματία snRNP. Τα snRNP αναγνωρίζουν συντηρημένες αλληλουχίες. Το U1 σχηματίζει ζεύγη βάσεων με την 5' θέση ματίσματος και η πρόσδεση του αποτελεί

το πρώτο βήμα για το μάτισμα, το U2 σχηματίζει ζεύγη βάσεων με την αλληλουχία διακλάδωσης, ενώ το U5 snRNP δρα στη 5' θέση ματίσματος. Όταν το U4 αποδεσμεύει το U6, το U6 σχηματίζει ζεύγη βάσεων με το U2, δημιουργώντας ενδεχομένως το καταλυτικό κέντρο του ματίσματος [218, 219].

Η σταθερότητα της αλληλεπίδρασης μεταξύ του U1 snRNA και της θέσης ματίσματος διασφαλίζεται από εξωγενείς παράγοντες που περιλαμβάνουν:

- Μέλη της οικογένειας των SR πρωτεϊνών και πιο συγκεκριμένα με την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης ASF/SF2 (γενικός παράγοντας ματίσματος της οικογένειας των πρωτεϊνών SR) με το U1 snRNP.
- Μια ομάδα από συντηρημένες πρωτεΐνες δέσμευσης του RNA που χαρακτηρίζεται από ένα τουλάχιστον μοτίβο αναγνώρισης RNA μορίων (RNA recognition motif, RRM) και μια περιοχή RS πλούσια σε σερίνη και αργινίνη που συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών.

Αρκετά στάδια της αντίδρασης χρειάζονται υδρόλυση του ATP, ώστε να προωθηθούν οι αλλαγές στη διαμόρφωση του RNA και / ή των πρωτεϊνικών συστατικών. Συγκεκριμένες RNA ελικάσες ενεργοποιούνται, από την ενέργεια που παράγεται, ώστε να ξετυλίξουν τις δίκλωνες δομές RNA, που σχηματίζονται, έτσι απομακρύνονται τα εκάστοτε snRNP μόρια από το mRNA [219].

Ο κεντρικός ρόλος του ματίσματος στην επεξεργασία του pre-mRNA προσφέρει τη δυνατότητα ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης και σε αυτόν οφείλεται η ποικιλομορφία των γονιδιακών προϊόντων. Είναι η απάντηση στο ερώτημα σχετικά με τον μικρό αριθμό ανθρώπινων γονιδίων και τα πολλαπλά προϊόντα τους, κι αυτό γιατί είναι ένας έξυπνος τρόπος να δημιουργείται ποικιλία πρωτεϊνών μέσα από τροποποιήσεις ενός βασικού μοτίβου σύμφωνα με τη φάση ανάπτυξης κάθε κυττάρου, χωρίς να είναι απαραίτητα νέα γονίδια για κάθε πρωτεΐνη [220]. Τα περισσότερα pre-mRNAs περιέχουν πολλαπλά εσόνια, συνεπώς πολλά διαφορετικά mRNAs μπορούν να παραχθούν από το ίδιο γονίδιο με διαφορετικούς συνδυασμούς των θέσεων συρραφής 5' και 3', εκδηλώνεται δηλαδή το πρότυπο του λεγόμενου εναλλακτικού ματίσματος (alternative splicing), όπου ένα γονίδιο παράγει περισσότερες από μία αλληλουχίες mRNA. Η δυνατότητα σύνδεσης εξονίων σε ποικίλους συνδυασμούς παρέχει ένα νέο μέσο για τον έλεγχο της έκφρασης των γονιδίων, δημιουργώντας πολλαπλά mRNAs (και κατ' επέκταση πολλαπλές πρωτεΐνες), από το ίδιο προ-mRNA. Αυτή η διαδικασία, που ονομάζεται εναλλακτική συρραφή και εμφανίζεται

συχνά στα γονίδια των σύνθετων ευκαρυωτικών οργανισμών, παρέχει έναν σημαντικό μηχανισμό για εξειδικευμένη και ισορροπημένη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων [184].

Το εναλλακτικό μάτισμα παρουσιάζει ιδιαίτερη χρησιμότητα στην παραγωγή διαφορετικών πρωτεϊνών αναλόγως τον ιστό, το αναπτυξιακό στάδιο ή ακόμα και τα διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Το γονίδιο, που κωδικοποιεί την καλσιτονίνη, αλλά και το σχετιζόμενο πεπτίδιο με το γονίδιο της καλσιτονίνης (CGRP- calcitonin gene related peptide), αποτελούν χαρακτηριστικό παράδειγμα. η καλσιτονίνη, μια πεπτιδική ορμόνη που ρυθμίζει το μεταβολισμό του ασβεστίου και του φωσφόρου, παράγεται μέσω συρραφής και συμπερίληψης των εξωνίων 1-4 στο θυρεοειδή αδένα. Σε νευρικά κύτταρα όμως, ακολουθώντας μια διαφορετική πορεία συρραφής, αποκλείοντας το εξώνιο 4 και συρράβοντας τα 1-3 και 5 μεταξύ τους, παράγεται μια πεπτιδική ορμόνη που δρα ως αγγειοδιασταλτικός παράγοντας, το CGPR.

Ένα άλλο χαρακτηριστικό παράδειγμα παραγωγής πολλαπλών προϊόντων αποτελεί το γονίδιο της πρωτεΐνης Dscam στα νευρικά κύτταρα της *Drosophila melanogaster*. Μέσω του εναλλακτικού ματίσματος, από αυτό το γονίδιο, δίνονται 38.016 διαφορετικοί συνδυασμοί εξωνίων, συνεπώς διαφορετικά mRNA , δηλαδή τρεις φορές ο αριθμός των γονιδίων που φέρει το συγκεκριμένο είδος, στην πραγματικότητα όμως παράγεται μόνο ένα κλάσμα αυτών των δυνατών μορίων mRNA [214].

Η ρύθμιση του εναλλακτικού ματίσματος είναι μια πολύπλοκη διαδικασία στην οποία λειτουργούν πολυάριθμα αλληλεπιδρώντα συστατικά, συμπεριλαμβανομένων *cis*- και *trans*- δρώντων στοιχείων. Πρόσθετα μοριακά χαρακτηριστικά, όπως η δομή της χρωματίνης, η δομή του RNA και η εναλλακτική έναρξη της μεταγραφής ή ο εναλλακτικός τερματισμός της μεταγραφής, συνεργάζονται με αυτά τα βασικά συστατικά για να παραγάγουν μια μεγάλη ποικιλία πρωτεϊνών. Όλοι αυτοί οι παράγοντες που συμβάλλουν σε αυτή τη θεμελιώδη βιολογική διαδικασία συνθέτουν έναν μηχανισμό, κρίσιμο για την καλή λειτουργία των κυττάρων. Οποιαδήποτε τροποποίηση της διαδικασίας μπορεί να οδηγήσει σε διακοπή της φυσιολογικής κυτταρικής λειτουργίας και στην πιθανότητα εμφάνισης ασθένειας. Ο καρκίνος είναι μια από αυτές τις ασθένειες, όπου η εναλλακτική συρραφή μπορεί να αποτελέσει τη βάση για τον εντοπισμό νέων διαγνωστικών και προγνωστικών βιοδεικτών, καθώς και για νέες στρατηγικές θεραπείας. Συστηματικές αναλύσεις των ESTs περιοχών και των δεδομένων μικροσυστοιχιών, έχουν

μέχρι στιγμής αποκαλύψει επτά κύριους τύπους εναλλακτικών ματίσματος. Το πιο διαδεδομένο μοτίβο (~ 30%) είναι το τύπου κασέτας εναλλακτικό εξόνιο (skipping exon) σε σπονδυλωτά και ασπόνδυλα, ενώ σε πολλά μετόζωα είναι η κατακράτηση εσωνίου [221].

Εναλλακτικό μάτισμα μπορεί να προκύψει με διαφορετικά πρότυπα επεξεργασίας [222]. Σε ορισμένες περιπτώσεις, το τελικό πρότυπο έκφρασης καθορίζεται από το πρωτογενές μετάγραφο, επειδή η χρήση διαφορετικών σημείων έναρξης της μεταγραφής ή η δημιουργία εναλλακτικών 3' άκρων αλλάζει το πρότυπο του ματίσματος. Σε άλλες περιπτώσεις, ένα πρωτογενές μετάγραφο υπόκειται σε μάτισμα με τρόπους όπου τα εσωτερικά εξόνια υποκαθίστανται, προστίθενται ή αποκόπτονται. Το αποτέλεσμα, σε όλες τις περιπτώσεις, είναι η δημιουργία, από ένα και μόνο αρχικό μετάγραφο, πολλαπλών μεταγράφων και κατ' επέκταση διαφορετικών ισομορφών πρωτεϊνών. Τα πολλαπλά προϊόντα μπορούν να παράγονται στο ίδιο κύτταρο ή η διαδικασία να ρυθμίζεται έτσι ώστε συγκεκριμένα πρότυπα ματίσματος να λαμβάνουν χώρα σε διαφορετικούς κυτταρικούς ιστούς ή κάτω από συγκεκριμένες κυτταρικές συνθήκες.

Ο τρόπος ελέγχου του εναλλακτικού ματίσματος επιτυγχάνεται με τον παράγοντα ASF (Alternative Splicing Factor- παράγοντας εναλλακτικού ματίσματος). Ο παράγοντας αυτός αποτελεί μια πρωτεΐνη που προσδένεται στο RNA. Όταν ένα πρόδρομο mRNA διαθέτει περισσότερες από μία 5' θέσεις ματίσματος, οι οποίες προηγούνται μιας μοναδικής θέσης 3' θέσης ματίσματος, η υψηλή συγκέντρωση του ASF προωθεί την χρήση της 5' θέσης που είναι πιο κοντά στην 3' θέση, σε βάρος των υπολοίπων θέσεων [223]. Οι μοριακοί μηχανισμοί των παραγόντων που εμπλέκονται στην επιλογή των εναλλακτικών θέσεων ματίσματος δεν είναι ακόμα γνωστοί με ακρίβεια. Ωστόσο μπορεί να επηρεαστεί από πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην συναρμολόγηση του συμπλόκου του σώματος συρραφής, καθώς επίσης και από την καταστολή της χρήσης μιας θέσης.

Ανάλογα με την δομική τους σύσταση τα εναλλακτικά γεγονότα ματίσματος ταξινομούνται στις εξής τέσσερις κύριες κατηγορίες :

- I. **Παράλειψη εξονίων (cassette exon):** Αναφέρονται σε γεγονότα όπου ένα εξόνιο που περιέχεται σε μία ισομορφή απουσιάζει εξολοκλήρου από μια άλλη
- II. **Διατήρηση ιντρονίου:** Τα γεγονότα αυτά παρατηρούνται όταν μεταξύ ενός ζεύγους ισομορφών ένα ιντρόνιο της μιας ισομορφής περιέχεται εξολοκλήρου στο ένα εξόνιο της άλλης ισομορφής.

- III. **Εναλλακτικά 5' σημεία ματίσματος:** Στις εναλλακτικές ισομορφές, τα όρια των εξονίων στην 5' περιοχή διαφοροποιούνται σε σχέση με το ιδιοσύστατο.
- IV. **Εναλλακτικά 3' σημεία ματίσματος:** Στις εναλλακτικές ισομορφές, διαφοροποιούνται τα όρια των εξονίων στην 3' περιοχή σε σχέση με το ιδιοσύστατο.

Πέρα από αυτές τις βασικές κατηγορίες, το εναλλακτικό μάτισμα διαθέτει και άλλους μηχανισμούς από τους οποίους προκύπτουν εναλλακτικές ισομορφές μεταγράφων [223], όπως τα αμοιβαία αποκλειόμενα εξόνια, όπου η εναλλακτική ισομορφή περιέχει ένα αποκλειόμενο εξόνιο που συνοδεύεται από ένα κρυφό εξόνιο καθώς και εναλλακτικές περιοχές προαγωγέων/πολυαδενυλίωσης, οδηγώντας σε εναλλακτικά αρχικά και τερματικά εξόνια αντίστοιχα. Τέλος, τα γεγονότα εναλλακτικού ματίσματος διακρίνονται σε απλά και σύνθετα, ανάλογα αν οι εναλλακτικές ισομορφές περιέχουν έναν ή περισσότερους τύπους εναλλακτικού ματίσματος.

1.5. ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Η έκφραση της ριβονουκλεάσης κ τόσο σε φυσιολογικές όσο και παθολογικές καταστάσεις άνοιξε ένα πεδίο ερευνών για την συσχέτιση της με διάφορες ασθένειες. Η εμπλοκή γενικά των ριβονουκλεασών σε διάφορους τύπους καρκίνων και οι μηχανισμοί που μπορεί να προάγουν την εμπλοκή τους αναφέρθηκαν παραπάνω. Ειδικότερα όμως, η υπερέκφραση της ή υποέκφραση της RNase κ σε διάφορους τύπους καρκίνου στον άνθρωπο, από δεδομένα που προέκυψαν με την χρήση μικροσυστοιχιών, όντως αποδεικνύουν την εμπλοκή της σε διάφορους τύπους καρκίνων. Μετά από μελέτη της έκφρασης της RNase κ σε καρκίνο των ωοθηκών και καρκίνο του μαστού ύστερα από την επίδραση του αντικαρκινικού φαρμάκου πακλιταξέλη (paclitaxel), όντως εντοπίστηκε αύξηση των επιπέδων έκφρασής της. Με βάση τον τρόπο δράστης του συγκεκριμένου φαρμάκου-εκδηλώνει κυτταροτοξική δράση μέσω απόπτωσης- πολύ πιθανή είναι η εμπλοκή της σε μονοπάτια που σχετίζονται με την απόπτωση [224]. Αντίστοιχη μελέτη που υποστηρίζει αυτή την υπόθεση είναι ο υπολογισμός της έκφρασης της αναλογίας των δύο ισομορφών της RNase (RNase κ01/RNase κ02) σε καρκίνο του μαστού και ωοθηκών, ύστερα από επίδραση αντικαρκινικών φαρμάκων σε διαφορετικούς χρόνους. Τα δεδομένα έδειξαν και εκεί μια γενική αύξηση των επιπέδων έκφρασης των δύο ισομορφών [225].

Η αλληλεπίδραση μεταξύ διαφόρων ριβονουκλεασών (RNases) επηρεάζει την κυκλοφορία και έκφραση των mRNAs σε πολλούς οργανισμούς. Ελλείψει ρυθμιστικών μηχανισμών, οι ενδοριβονουκλεάσες έχουν σοβαρή επίδραση στην έκφραση γονιδίων, δεδομένου ότι μια μόνο ενδονουκλεολυτική διάσπαση σε ένα μόριο mRNA έχει ως αποτέλεσμα την απενεργοποίηση του. Τα κύτταρα έχουν μηχανισμούς για την αποφυγή τέτοιας ασυνήθιστης αποικοδόμησης των mRNAs, έτσι ώστε οι ριβονουκλεάσες να δρουν μόνο όποτε είναι απαραίτητο για το κύτταρο [226].

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

PARN: Η δραστικότητα της ριβονουκλάσης αυτής, σε συνδυασμό τις δράσεις των RBPs, θεωρείται ογκοκατασταλτική, προκαλώντας αποικοδόμηση mRNAs που κωδικοποιούν αυξητικούς παράγοντες όπως IL-8 και VEGF [227]. Επίσης, η PARN, σε σύμπλεγμα με άλλες πρωτεΐνες, προκαλεί την αποσταθεροποίηση διαφόρων mRNAs, συμπεριλαμβανομένων των c-jun και uPA, των οποίων οι αυξήσεις εμπλέκονται σε περιπτώσεις καρκινογένεσης [226].

XRN1: Το XRN1 είναι ένα παράδειγμα ενζύμου που εμπλέκεται στον καρκίνο ως απορυθμισμένο ογκοκατασταλτικό γονίδιο. Σε δείγματα οστεογόνου σαρκώματος και σε κυτταρικές σειρές που προέρχονται από αυτό, υπήρξε εμφανής μείωση των επιπέδων του mRNA του [228].

RNaseL: Το γονίδιο της RNase L χαρτογραφείται σε μια περιοχή που συνδέεται με την προδιάθεση του κληρονομικού καρκίνου του προστάτη (HPC). Πολλές μεταλλάξεις και πολυμορφισμοί στο γονίδιο της φαίνονται να είναι υπεύθυνοι για επιθετικές μεταστάσεις. Συμμετέχει σε σηματοδοτικά μονοπάτια της ιντερφερόνης και θεωρείται ότι επάγει την αύξηση της έκφρασης ογκοκατασταλτικών γονιδίων.

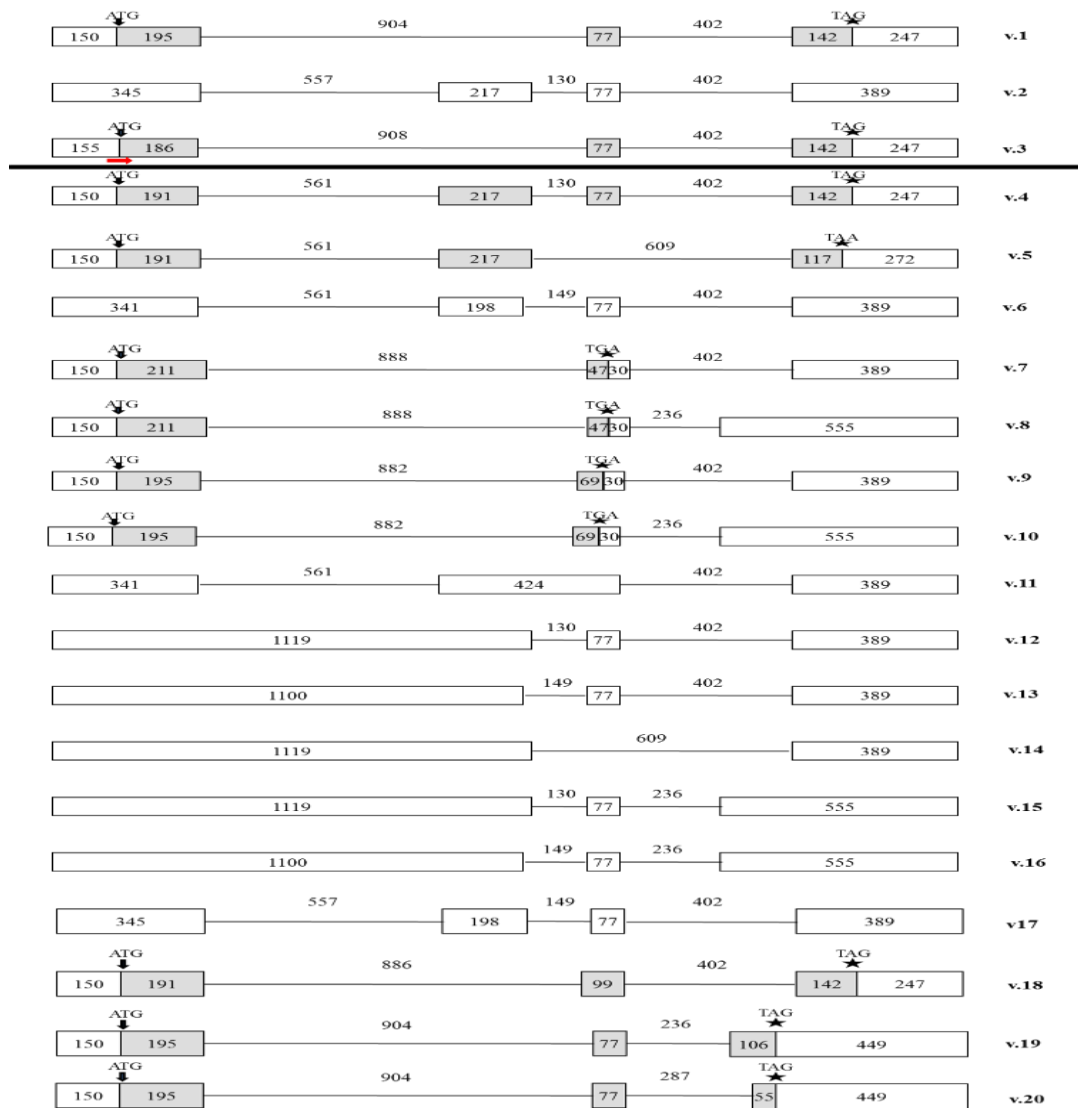
PMR1: Το μονοπάτι της PMR1 φαίνεται να χρησιμοποιείται από το πρωτο-ογκογονίδιο c- Src, το οποίο είναι ενεργοποιημένο σε πολλούς καρκίνους, για την καταστροφή ογκοκατασταλτικών mRNAs.

Dicer: Η Dicer θεωρείται ότι μπορεί να δράσει ως πρωτογονογονίδιο ή ογκοκατασταλτικό γονίδιο, λαμβάνοντας υπόψη την ικανότητά της να επεξεργάζεται όλα τα δίκλινα RNAs, χωρίς προτίμηση συγκεκριμένης αλληλουχίας. Σε γενικές γραμμές, η υπερέκφραση της έχει συνδεθεί κυρίως με ογκογένεση, αλλά υπάρχουν επίσης στοιχεία που υποστηρίζουν το ρόλο της Dicer ως καταστολέας όγκων.

AGO2: Πρόσφατες αναφορές υπογραμμίζουν τροποποιημένα επίπεδα της AGO2 απορρυθμίζουν τις λειτουργίες των miRNAs στον καρκίνο. Μια μελέτη παρουσίασε αυξημένα τα επίπεδα της σε επιθετικούς όγκους καρκίνου του μαστού.

Αγγειογενίνη: Η μείωση της δραστηριότητάς της εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Σε κυτταρικές σειρές μελανώματος, ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών δεν μπορούσε να επάγει τον πολλαπλασιασμό απουσία αγγειογενίνης, ενώ σε μελέτες καταστολής του γονιδίου της, σε κύτταρα HeLa, εμφανίστηκε αξιοσημείωτη αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων [226]. Οι παραπάνω ριβονουκλεάσες είναι μόνο μερικά παραδείγματα από τον συνολικό αριθμό ενζύμων που εμπλέκονται στην καρκινογένεση. Όπως είναι εμφανές, η απορρύθμιση στην έκφρασή τους μπορεί να συμβάλει θετικά ή αρνητικά στην επαγωγή ης καρκινογένεσης.

Διάφορες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί και στο εργαστήριό μας, για το ρόλο της ριβονουκλεάσης κ στην καρκινογένεση. Πρόσφατα δεδομένα από ανάλυση έκφρασης με μικροσυστοιχίες αποκαλύπτουν ότι το γονίδιο της RNase κ βρίσκεται είτε υπερεκφρασμένο είτε υποκεφρασμένο σε έναν αριθμό ανθρώπινων καρκίνων, υποδεικνύοντας μία πιθανή διαγνωστική ή προγνωστική χρησιμότητα. Σε μελέτες των AdamopoulosP.G., KontosC.K., SkorilasA. και SiderisD.C., μέσω αλληλούχισης νέας γενιάς (NGS) το 2014, εντοπίστηκαν 17 νέα μετάγραφα σε 19 διαφορετικές κυτταρικές σειρές (βλ. Εικόνα 1.12.). Στη συνέχεια αυτά τα νέα μετάγραφα επιβεβαιώθηκαν από την Πετροπούλου Χριστίνα, με PCR και nestedPCR ανάλυση. Πιο συγκεκριμένα, αυτά τα μετάγραφα φαίνεται να έχουν τροποποιημένη έκφραση μεταξύ των διάφορων κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν, υποδεικνύοντας ότι το κάθε παραγόμενο mRNA ευνοείται σε συγκεκριμένες περιπτώσεις, π.χ. σε καρκίνο μαστού ή λευχαιμία. Τα νέα μετάγραφα, τα οποία επιβεβαιώθηκαν παρουσιάζονται παρακάτω:



Εικόνα 1.11. Σχηματική απεικόνιση των καταχωρημένων μεταγράφων της RNase κ, 1,2 και 3 και των υπόλοιπων 17 νέων μεταγράφων που εντοπίστηκαν με NGS και επιβεβαιώθηκαν με PCR.

Ορισμένα από τα παραπάνω μετάγραφα παρουσίασαν διαφορετικά μοτίβα έκφρασης, βάσει της ημιποσοτικής ανάλυσης (PCR), στην κυτταρική σειρά οξείας Τ-λευχαιμίας (Jurkatt). Συγκεκριμένα, το μετάγραφο 14 παρουσιάζει έντονη έκφραση την ώρα που το μετάγραφο 4 του γονιδίου της RNaseκ απουσιάζει εντελώς, παρουσιάζοντας όμως μια καθολική έκφραση σε πολλές άλλες κυτταρικές σειρές [229]. Επιπλέον η έκφραση των μεταγράφων 1, 4 και 14 μελετήθηκε και σε παιδιατρικούς ασθενείς με ΟΛΛ. Πολλά δεδομένα έδειξαν μια τάση συχέτισης με προγνωστικούς δείκτες ενώ παρατηρήθηκε υπερέκφραση των παραπάνω μεταγράφων στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς [230]. Σε κυτταρικές σειρές καρκίνου μαστού και ωθηκών παρουσιάστηκε μία αύξηση στα επίπεδα έκφρασης του mRNA της, μετά τη θεραπεία με τον αντινεοπλασματικό παράγοντα πακλιταξέλη. Αντίθετα, η θεραπεία με τα υπόλοιπα αντικαρκινικά φάρμακα

δεν άλλαξε δραστικά τα επίπεδα του mRNA της RNase κ. Με βάση το γεγονός ότι η πακλιταξέλη ασκεί την κυτταροτοξική δράση της προκαλώντας απόπτωση, τα αποτελέσματα θα μπορούσαν να είναι ενδεικτικά μιας πιθανής εμπλοκής της ριβονουκλεάσης κ σε αποπτωτικές οδούς [224].

Έχοντας ως δεδομένα τα παραπάνω, φαίνεται πως πολλές ριβονουκλεάσες είναι χρήσιμες στη θεραπεία ενάντια στον καρκίνο. Πολλές κλινικές μελέτες έχουν γίνει και ορισμένες RNases έχουν φανεί να έχουν ιδιαίτερα αποτελέσματα εναντίον των καρκινικών κυττάρων, όπως η ογκονάση και η RNaseP [219].

1.6. ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ

Τα νέα επιβεβαιωμένα μετάγραφα του γονιδίου της RNase κ εμφανίζουν μια ενδιαφέρουσα εναλλαγή στα μοτίβα έκφρασης σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η έντονη έκφραση του μεταγράφου 14 στην κυτταρική σειρά Jurkatt, αλλά και η απουσία του μεταγράφου 4 από αυτήν, σε PCR ανάλυση. Με αυτά τα δεδομένα, το προηγούμενο ακαδημαϊκό έτος η συνάδελφος Αγγελική Μειντάνη ανέλαβε την αξιολόγηση της ποσοτικής έκφρασης των παραπάνω μεταγράφων σε ασθενείς με ΟΛΛ. Από τα αποτελέσματα, που προέκυψαν θεωρήθηκε σκόπιμο να συνεχιστεί η αξιολόγηση της ποσοτικής έκφρασης των παραπάνω μεταγράφων για εξαγωγή ασφαλέστερων αποτελεσμάτων. Ταυτόχρονα, προστέθηκε ένα ακόμα προς μελέτη μετάγραφο, το 19, του οποίου τη προγνωστική αξία η παρούσα εργασία θα αξιολογήσει.

Συνοπτικά, λοιπόν, στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι:

- Η αύξηση του συνολικού αριθμού των δειγμάτων για τη συνέχιση της μελέτης των μεταγράφων 1, 4 & 14.
- Η ανάλυση και η ποσοτική μελέτη της έκφρασης του κλασικού μεταγράφου, του 4, του 14 και του 19 της ριβονουκλεάσης κ σε δείγματα παιδιατρικών ασθενών με οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία,
- Η μελέτη της κλινικής τους σημασίας συναρτήσει των διάφορων κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών
- Η μελέτη της επιβίωσης των ασθενών (ολικής και χωρίς υποτροπή) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης των μελετούμενων μεταγράφων.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΥΛΙΚΑ

2.1.1. Χημικά αντιδραστήρια

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω χημικές ουσίες:

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

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΕΤΑΙΡΙΑ
Αγαρόζη	NIPPON Genetics
Αιθανόλη	Sigma Aldrich
Βορικό οξύ	Applichem
Βρωμιούχο αιθίδιο	MP Biomedicals, LLC
Τρισ-υδροξυμεθυλο αμινο-μεθάνιο (Tris)	Duchefa Biochemie
TRI REAGENT-BD	MRC
Χλωροφόρμιο	PENTA

2.1.2. Χημικά διαλύματα

10x TBE: 54 g TrisBase, 27,5 g Βορικό οξύ, 20 mL 0,5 MEDTA (pH=8) σε τελικό όγκο 1000 mL

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

2.1.3. Κυτταρικές σειρές

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

HEK293: Τα HEK293, όπως αναφέρει και το όνομά τους (Human Embryonic Kidney cells) είναι εμβρυονικά κύτταρα νεφρού, που αναπτύσσονται σε καλλιέργειες ιστών. Χρησιμοποιούνται στην κυτταρική βιολογία πολλά χρόνια, λόγω του αυξημένου ρυθμού πολλαπλασιασμού τους, καθώς επίσης χρησιμοποιούνται και στη διαδικασία της διαμόλυνσης (ως host για γονιδιακή έκφραση). Προέκυψαν από το μετασχηματισμό και

την καλλιέργεια απλών HEK κυττάρων με DNA από τον αδenoϊό 5, καθώς ενσωματώθηκε στο χρωμόσωμα 19 των HEK, ικό γενετικό υλικό περίπου 4,5 kb.

K562: Τα κύτταρα K562 ήταν η πρώτη ανθρώπινη αθανατοποιημένη κυτταρική σειρά μυελογενούς λευχαιμίας που καθιερώθηκε. Τα κύτταρα K562 είναι τύπου ερυθρολευκαιμίας και προέρχονται από γυναίκα ασθενή 53 ετών που έπασχε από χρόνια μυελογενή λευχαιμία, απομονώθηκαν κατά τη διάρκεια κρίσης έξαρσης βλαστών. Χαρακτηριστικό τους είναι το στρογγυλό τους σχήμα και το γεγονός ότι δεν προσκολλόνται στη καλλιέργεια, είναι θετικά για το γονίδιο σύντηξης bcr: abl και φέρουν πρωτεμικές ομοιότητες τόσο με τα αδιαφοροποίητα κοκκιοκύτταρα όσο και με τα ερυθροκύτταρα. Εκτός από το χρωμόσωμα της Φιλαδέλφειας παρουσιάζουν επίσης και μια δεύτερη αμοιβαία μετατόπιση μεταξύ του μακριού βραχίονα του χρωμοσώματος 15 με το χρωμόσωμα 17.

U937: Τα κύτταρα U937 είναι ένα μοντέλο κυτταρικής σειράς που χρησιμοποιείται στη βιοϊατρική έρευνα. Απομονώθηκαν από το ιστολυτικό λέμφωμα ενός άνδρα ασθενή 37 ετών και χρησιμοποιούνται για να μελετήσουν τη συμπεριφορά και τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων. Ωριμάζουν και διαφοροποιούνται ως απόκριση σε έναν αριθμό ερεθισμάτων, υιοθετώντας τη μορφολογία και τα χαρακτηριστικά των ώριμων μακροφάγων. Τα κύτταρα U937 είναι της μυελοειδούς σειράς και εκκρίνουν έναν μεγάλο αριθμό κυτταροκινών και χημειοκινών (π.χ. IL-1 και GM-CSF). Ο TNFα και το ανασυνδυασμένο GM-CSF προάγουν ανεξάρτητα την παραγωγή IL-10 στα κύτταρα U937.

HL60: Τα κύτταρα HL-60 είναι μια κυτταρική σειρά ανθρώπινης λευχαιμίας που έχει χρησιμοποιηθεί για εργαστηριακή έρευνα σχετικά με το σχηματισμό και τη φυσιολογία των κυττάρων του αίματος. Η HL-60 πολλαπλασιάζεται συνεχώς σε καλλιέργεια εναιωρήματος σε θρεπτικά υλικά με αντιβιοτικά. Ο χρόνος διπλασιασμού είναι περίπου 36-48 ώρες. Η κυτταρική σειρά προήλθε από μια γυναίκα ηλικίας 36 ετών, η οποία είχε αρχικά αναφερθεί ότι υπέστη οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία στο Anderson Cancer Center. Τα κύτταρα HL-60 εμφανίζουν κυρίως ουδετερόφιλη προμυελοκυτταρική μορφολογία. Η μεταγενέστερη αξιολόγηση, συμπεριλαμβανομένου του καρυότυπου έδειξε την απουσία της μετατόπισης t (15;17) χαρακτηριστικό της οξείας προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας, γεγονός που οδήγησε στο συμπέρασμα ότι τα κύτταρα HL-60 προέρχονται

από μια περίπτωση AML FAB-M2, που τώρα αναφέρεται ως ώριμη AML σύμφωνα με το WHO.

2.1.4. Ένζυμα

Για τις ανάγκες της διπλωματικής εργασίας, χρησιμοποιήθηκαν συγκεκριμένα kit με τα αντίστοιχα ένζυμα. Όσον αφορά τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR), χρησιμοποιήθηκε το kit InvitrogenDNA της ThermoFisher Scientific, το οποίο περιείχε ένζυμο αναστολέα των ριβονουκλεασών (RNaseOUT) και την αντίστροφη μεταγραφάση M-MLV. Αντιστοίχως, για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RealTimePCR-qPCR-), χρησιμοποιήθηκε το kit KAPA SYBR FAST Universal της KAPABIOSYSTEMS, με την αντίστοιχη πολυμεράση.

2.1.5. Εκκινητές

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις πολυμερισμού είναι τα παρακάτω:

Πίνακας 2.2. Αλληλουχίες και μήκος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις PCR και Real-TimePCR

ΟΝΟΜΑ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ	ΜΗΚΟΣ
F69 (classical variant)	GATCATGTTGATAATGCTCGGAAT	24
192R(classical variant)	TTGCTCGTAAAGGTTGTATATGTTCTG	27
Ex1(2)/2F (qPCR variant 4)	GAGTGATCATTAATCCACCCACC	23
Ex2/3R (qPCR variant 4)	GAGCATTATTGGATTCCGACTCA	23
Ex2F (qPCR variant 14)	GAAGTGCCGGTTCTCCCTC	19
Ex2/4R (qPCR variant 14)	GCCATTCTGGATTCCGACTCAG	22
2F (qPCR HPRT-1)	TGGAAAGGGTGTATTTCCTCAT	23
3R (qPCR HPRT-1)	ATGTAATCCAGCAGGTCAGCAA	22
1/ext3F (variant 9)	CATGTTGTCTACCCATTCCCCT	22
V19F (variant 19)	AAGATTTTGATCCACCTCTGCAAA	24
4R (variant 9,19)	AGTTGTAGCTGACTTGCTCGT	21

2.2.ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1. Απομόνωση ολικού RNA

2.2.1.1. Απομόνωση RNA Κυττάρων

Η πειραματική διαδικασία της απομόνωσης ολικού RNA βασίστηκε στη μέθοδο Chomczynski, κατά την οποία γίνεται χρήση του αντιδραστηρίου TRIReagent, το οποίο αποτελείται από ισοθειοκυανική γουανιδίνη(30%v/v) και φαινόλη(50%v/v) σε μονοφασικό διάλυμα. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται συχνά για την απομόνωση ολικού RNA, DNA και πρωτεϊνών. Κατά τη μέθοδο απομόνωσης RNA, το όξινο διάλυμα ισοθειοκυανικής γουανιδίνης, φαινόλης και χλωροφορμίου έχει κυτταρολυτική δράση, ενώ έχει την δυνατότητα αποδιάταξης των ανώτερων πρωτεϊνικών δομών. Έτσι, η απομόνωση του ολικού RNA πραγματοποιείται εύκολα καθώς προκαλείται αδρανοποίηση των ριβονουκλεασών που προέρχονται από τα ίδια τα κύτταρα και από το περιβάλλον της εκχύλισης. Ωστόσο, η διαδικασία της απομόνωσης RNA απαιτεί προσοχή, επειδή το RNA είναι λιγότερο σταθερό, ως μονόκλωνο μόριο, σε σύγκριση με τα μόρια DNA, ενώ ταυτοχρονα υπόκειται σε αλκαλική υδρόλυση, μία διαδικασία που ευνοείται εξ αιτίας της ύπαρξης της ελεύθερης υδροξυλομάδας της ριβόζης [231].

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

1. Ακολουθούνται τα βήματα ανακαλλιέργειας των κυττάρων μέχρι και το σημείο της φυγοκέντρωσης.
2. Στο υπάρχον ίζημα των κυττάρων, και αφού απορριφθεί το υπερκείμενο, προστίθεται 1 mL του αντιδραστηρίου TRIReagent και το ίζημα διαλυτοποιείται.
3. Το διάλυμα των κυττάρων μεταφέρεται σε eppendorf των 2 mL, όπου γίνεται προσθήκη 200 µL χλωροφορμίου. Ακολουθεί ήπια ανάδευση για μερικά sec και το διάλυμα αφήνεται στον πάγο για 12 min. Το χλωροφόρμιο βοηθάει στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών και στη διαλυτοποίησή τους στην οργανική φάση, ενώ το RNA θα βρίσκεται διαλυτό στην υδατική φάση.
4. Στη συνέχεια, γίνεται φυγοκέντρωση για 15 min στις 13.300 rpm, στους 4°C.

5. Όλη η υδατική φάση, η οποία περιέχει κατά κύριο λόγο RNA, μεταφέρεται σε αποστειρωμένο eppendorf των 2 mL και προστίθενται 500 μ L ισοπροπανόλης. Ακολουθεί ήπια ανάδευση για μερικά sec και αναμονή στον πάγο για 10 min.
6. Επαναλαμβάνεται η διαδικασία της φυγοκέντρησης για 15 min στις 13.300 rpm, στους 4°C.
7. Το διαυγές υπερκείμενο αφαιρείται και το RNA παραμένει ως λευκό ίζημα.
8. Στη συνέχεια, προστίθεται 1 mL αιθανόλης 75%, ελαφριά ανακίνηση του eppendorf και φυγοκέντρηση για 20 min στις 13.300 rpm, στους 4°C.
9. Με χρήση κατάλληλης σύριγγας, αφαιρείται ΠΡΟΣΕΚΤΙΚΑ η αιθανόλη, το eppendorf σκουπίζεται ελαφρώς σε διηθητικό χαρτί για απομάκρυνση υπολειμμάτων αιθανόλης και αφήνεται ανοιχτό για 3 min. Το στάδιο αυτό χρήζει ιδιαίτερης προσοχής, καθώς το ίζημα δε πρέπει να στεγνώσει πλήρως (από λευκό, διαυγές), διότι η μετέπειτα διαλυτοποίησή του θα είναι δύσκολη.
10. Το ίζημα του RNA διαλυτοποιείται σε περίπου 15 μ LRSS (RNAStorageSolution) και φυλάσσεται στους -80°C.

2.2.1.2. Απομόνωση RNA Μυελού

Για την απομόνωση ολικού RNA από δείγματα μυελού, χρησιμοποιήθηκε επίσης το TRIReagentBD της εταιρίας MRC, αλλά ελαφρώς με τροποποιημένο πρωτόκολλο, όπως παρουσιάζεται παρακάτω: χρησιμοποιούμε eppendorfs των 2ml

1. 330 μ L δείγματος
2. 990 μ L TRI
3. Vortexing για 1min
4. Επώαση στους 15-30°C (RT) για 5min (σε θερμοκρασία δωματίου, το βγάζουμε από τον πάγο και το αφήνουμε στον πάγο)
5. 264 μ L χλωροφορμίου (για 1ml TRI)
6. Έντονη ανάδευση με το χέρι-για 15sec
7. Επώαση στους 15-30°C (RT) για 12min
8. Φυγοκέντρηση στα 12000xg για 15min στους 4°C
9. Μεταφορά ανώτερης υδατικής φάσης σε νέο eppendorf των 1.5ml

ΣΗΜ: Φύλαξη της υπόλοιπης ποσότητας σε κουτί στους -70 °C (μελλοντική απομόνωση των DNA κ των πρωτεϊνών)

10. Προσθήκη ίσης με ανώτερη υδατική φάση ποσότητας ισοπροπανόλης (500λ)
11. Ανάμιξη (ήπια ανάδευση με το χέρι, περίπου 20 φορές)
12. Επώαση στους 15-30°C (RT) για 10min
13. Φυγοκέντρηση στα 12000 g για 9min στους 4°C
14. Απόρριψη υπερκλειμένου-ιδιαίτερη προσοχή για ΠΛΗΡΗ απομάκρυνση της ισοπροπανόλης
15. Προσθήκη 1320μL EtOH 75% για 990μL TRIzol
16. Ανακίνηση των erpendorfs με το χέρι μέχρι να ξεκολλήσει το pellet
17. Φυγοκέντρηση στα 7500 g για 5min στους 4°C
18. Απόρριψη υπερκλειμένου
19. Προσθήκη 1320μL EtOH 75% για 990μL TRIzol
20. Ανακίνηση των erpendorfs με το χέρι μέχρι να ξεκολλήσει το pellet
21. Φυγοκέντρηση στα 7500 g για 5min στους 4°C
22. Τοποθέτηση RSS στο υδατόλουτρο (55°C)
23. Απόρριψη υπερκλειμένου (στέγνωμα του στομίου του erpendorf με καθαρό χαρτί)
24. Air-dry του ιζήματος για 5min

ΠΡΟΣΟΧΗ να μην στεγνώσει τελείως (κάτι τέτοιο θα μειώσει τη διαλυτότητά του)

25. Επαναδιάλυση του pellet σε RSS: 5-8μL (ήπιο πιπετάρισμα)

26. Επώαση στους 55°C για 15min

Τα δείγματα, αφού φωτομετρηθούν για τον υπολογισμό της ποσότητάς τους, φυλλάσσονται στους -80°C

2.2.2. Ποσοτικός προσδιορισμός RNA

Πριν το RNA χρησιμοποιηθεί, π.χ. για RT-PCR, πρέπει να είναι γνωστή η συγκέντρωσή του. Η μέτρηση αυτής πραγματοποιείται με ειδικό φωτόμετρο, το BioSpec- nano, το οποίο είναι κατάλληλο για μικρούς όγκους (απαιτείται μόλις 1 μL για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του RNA) και τα όρια ανίχνευσης είναι ιδιαίτερος χαμηλά. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην απορρόφηση των πουρινών και πυριμιδινών στο υπεριώδες, με μέγιστο τα 260 nm. Μία μονάδα οπτικής απορρόφησης αντιστοιχεί σε 40 μg/mL RNA.

Μαζί με την ποσότητα του RNA, δίνεται και ο λόγος απορρόφησης A_{260}/A_{280} , δηλαδή για τα 260 nm ως προς τα 280 nm. Ο λόγος αυτός αντιπροσωπεύει την καθαρότητα του RNA και είναι επιθυμητό να βρίσκεται μεταξύ των τιμών 1,8-2. Εάν ο λόγος βρεθεί μικρότερος του 1,8 τότε πιθανότατα υπάρχουν προσμίξεις με πρωτεΐνες, ενώ αν ξεπερνάει το 2, τότε υπάρχει πρόσμιξη από γενωμικό DNA. Για τον εύκολο χειρισμό του RNA, αφού πραγματοποιηθεί ο ποσοτικός προσδιορισμός του, φτιάχνονται aliquots με συγκέντρωση 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

2.2.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια πλέον συνηθισμένη εργαστηριακή τεχνική που χρησιμοποιείται για την παραγωγή πολλών αντιγράφων μιας συγκεκριμένης περιοχής του DNA (εκατομμυρίων ή δισεκατομμυρίων). Δίνει τη δυνατότητα της εύκολης μελέτης οποιουδήποτε τμήματος γενετικού υλικού, που επιθυμείται κάθε φορά. Στόχος της PCR είναι η ενίσχυση τμημάτων DNA (*in vitro* αντιγραφή) για περαιτέρω μελέτη τους είτε με άλλες τεχνικές είτε για τη ποσοτικοποίηση τους. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η γνώση της αλληλουχίας που θα ενισχυθεί ή μέρος αυτής, έτσι ώστε να σχεδιαστούν οι κατάλληλοι εκκινητές (primers), από όπου θα ξεκινήσει η αντιγραφή. Ειδικότερα, τα αντιδραστήρια που απαιτούνται για την εφαρμογή της είναι τα εξής:

- DNA που θα ενισχυθεί (μήτρα).
- Taq πολυμεράση: Όπως και στην *in vivo* αντιγραφή ενός γενετικού υλικού, απαραίτητο θεωρείται ένα ένζυμο, το οποίο θα συνθέσει νέους κλώνους έχοντας ως μήτρα το DNA στόχο. Το ένζυμο, που χρησιμοποιείται, είναι η Taq πολυμεράση, η οποία βρέθηκε στο θερμοανθεκτικό βακτήριο *Thermusaquaticus* και απομονώθηκε από αυτό. Η ανθεκτικότητά του σε υψηλές θερμοκρασίες το καθιστά κατάλληλο για την PCR αντίδραση, καθώς υπάρχουν αρκετές εναλλαγές θερμοκρασίες, που φτάνουν μέχρι και τους 95 °C.
- Ολιγονουκλεοτίδια- εκκινητές: Είναι ολιγονουκλεοτίδια που οριοθετούν το τμήμα DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί και είναι απαραίτητοι για να ξεκινήσει τη διαδικασία της αντιγραφής. Ο σωστός σχεδιασμός των εκκινητών επηρεάζει σημαντικά το αποτέλεσμα της PCR. Αυτές οι αλληλουχίες είναι μικρές, 20-25 νουκλεοτίδια, οι οποίες είναι συμπληρωματικές με την περιοχή του γενετικού υλικού που θα ενισχυθεί. Χρησιμοποιούνται δύο ζεύγη εκκινητών, τα οποία είναι

συμπληρωματικά με τις δύο αλυσίδες, έτσι ώστε συντεθούν δίκλιωνα μόρια DNA στο τέλος του κάθε κύκλου αντίδρασης.

- Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs): Προστίθενται βάσει του κανόνα συμπληρωματικότητας, από την πολυμεράση, καθώς αναπτύσσονται οι κλώνοι.
- Ρυθμιστικό διάλυμα: Χρειάζεται για να διατηρεί το pH και τη συγκέντρωση αλάτων στις βέλτιστες συνθήκες. Περιέχει επίσης ιόντα Mg^{2+} , που είναι απαραίτητος συμπράγοντας της DNA πολυμεράσης.
- dH_2O .

Αφού προστεθούν τα παραπάνω αντιδραστήρια στις σωστές αναλογίες, ακολουθεί μια διαδικασία που βασίζεται σε εναλλαγές της θερμοκρασίας. Οι εναλλαγές επιτυγχάνονται με τη χρήση ενός μηχανήματος, που ονομάζεται θερμοκυκλοποιητής. Κάθε κύκλος αντίδρασης αποτελείται από 3 βήματα [Αποδιάταξη (denaturation), Υβριδοποίηση (annealing) και Επιμήκυνση (extension)], στο τέλος κάθε κύκλου έχει παραχθεί ο διπλάσιος αριθμός των συγκεκριμένων τμημάτων DNA.

- I. **Αποδιάταξη (denaturation):** Για να σπάσουν οι δεσμοί υδρογόνου που συγκρατούν τις δύο αλυσίδες του δίκλιωνου DNA απαιτούνται υψηλές θερμοκρασίες. Έτσι, σε αυτό το βήμα, η θερμοκρασία φτάνει τους 95 °C, ώστε να προκύψουν τα μονόκλιωνα τμήματα που αποτελούν και το καλούπι της αντίδρασης. Η αποδιάταξη πραγματοποιείται για μερικά δευτερόλεπτα.
- II. **Υβριδοποίηση (annealing):** Η θερμοκρασία σε αυτό το βήμα ποικίλει, από 55-65 °C συνήθως, και εξαρτάται άμεσα από το T_m των εκκινητών, ώστε να έχουν τη δυνατότητα να προσδεθούν στα μονόκλιωνα τμήματα του DNA και να αρχίσει η διαδικασία της επιμήκυνσης στη συνέχεια. Η σωστή επιλογή της θερμοκρασίας υβριδοποίησης είναι αναγκαία, ώστε οι εκκινητές να προσκολληθούν εκλεκτικά στη συμπληρωματική τους αλυσίδα, χωρίς πιθανά λάθη. Αντίστοιχα, η διαδικασία αυτή διαρκεί μερικά δευτερόλεπτα.
- III. **Επιμήκυνση (extension):** Δεδομένου ότι η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της Taq πολυμεράσης είναι 72 °C, η επιμήκυνση λαμβάνει χώρα σε αυτές

τις συνθήκες. Τα dNTPs προστίθενται συμπληρωματικά με προσανατολισμό 5' προς 3', και έτσι το γενετικό υλικό πολλαπλασιάζεται.

Ο αριθμός των κύκλων σε κάθε αντίδραση PCR συνήθως δε ξεπερνάει τους 40, κι αυτό γιατί η πολυμεράση παύει να δουλεύει με σωστούς ρυθμούς λόγω της περίσσειας αντιγράφων DNA και τα αντιδραστήρια έχουν πια αρχίσει να εξαντλούνται (φάση πλατώ). Αξίζει να σημειωθεί ότι πριν αρχίσουν οι κύκλοι της αντίδρασης, απαιτείται η θερμική ενεργοποίηση του ενζύμου, για αυτό εκτίθεται σε θερμοκρασία 94-98 °C, για μερικά λεπτά. Όταν τελειώσουν όλοι οι κύκλοι της αντίδρασης, τα προϊόντα της PCR διατηρούνται στους 4 °C. Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας εφαρμόστηκαν RT-PCR και Real-Time PCR.

2.2.3.1. Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής

Αντίστροφη μεταγραφή, Reverse Transcription (RT), ονομάζεται η σύνθεση μιας συμπληρωματικής (complementary) αλυσίδας DNA (cDNA) έχοντας ως εκμαγείο ένα μόριο RNA. Η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση, το οποίο στη φύση βρίσκεται στους ρετροϊούς. Οι ρετροϊοί έχουν τη δυνατότητα να μετατρέπουν το μονόκλωνο γενετικό τους υλικό σε δίκλωνο DNA, ώστε αυτό να μπορεί να ενσωματωθεί στο DNA του ξενιστή. Η παραπάνω διαδικασία, πραγματοποιείται και *in vitro*, με τη χρήση του κατάλληλου ενζύμου και έτσι με βήματα παρόμοια με της PCR, RNA τμήματα μετατρέπονται σε cDNA. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται είναι τα εξής:

- RNA που επιθυμείται να μελετηθεί, ως εκμαγείο.
- Αντίστροφη μεταγραφάση: Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο M-MLV, από το kit InvitrogenDNA της ThermoFisher Scientific. Η M-MLV είναι αντίστροφη μεταγραφάση, που ανήκει στον ιό Moloney της λευχαιμίας των ποντικών. Χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο το RNA μόριο συντίθεται αρχικά ένα υβριδικό μόριο RNA-cDNA και στη συνέχεια το τελικό cDNA.
- Ολιγονουκλεοτίδια - εκκινητές: Υπάρχουν πολλά είδη εκκινητών (τυχαία εξαμερή, ειδικά ολιγονουκλεοτίδια στόχοι για συγκεκριμένο γονίδιο, oligo-dTs, κ.ά.). Σε αυτή τη διπλωματική εργασία χρησιμοποιούνται ως εκκινητές, oligo-dTs. Τα τελευταία αποτελούν ολιγονουκλεοτίδια θυμίνης που υβριδίζονται

στην πολυ-A ουρά των mRNAs. Συνεπώς, κατά την αντίστροφη μεταγραφή, το σύνολο του mRNA θα μετατραπεί σε cDNA.

- dNTPs: η χρήση τους είναι όμοια με την απλή PCR.
- dH₂O.

Η RT-PCR που πραγματοποιήθηκε ήταν δύο βημάτων, δηλαδή σε πρώτο στάδιο έγινε η σύνθεση του πρωταρχικού μορίου cDNA και στη συνέχεια η περαιτέρω ενίσχυσή του. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ως ενζύμο χρησιμοποιήθηκε η M-MLV και ως εκκινητής, oligo-dTs. Επιπλέον, προστίθεται στην αντίδραση ο αναστολέας ριβονουκλεασών RNase Inhibitor, το αρχικό RNA προστατεύεται από αποικοδόμηση και μπορεί στη συνέχεια να ενισχυθεί, και ρυθμιστικό διάλυμα διθειοθριτόλης (DTT), το οποίο αποτρέπει την οξείδωση των θειολομάδων. Τα αντιδραστήρια και οι συνθήκες ήταν οι εξής, όπως φαίνονται στον Πίνακα 2.3.:

Πίνακας 2.3. Αναλογίες αντιδραστηρίων για την RT-PCR

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΟΓΚΟΣ (μl)
RNase free dH ₂ O	*Υπολογισμός ποσότητας RNA και ποσότητας RNase free dH ₂ O που χρειάζονται για κάθε δείγμα. Το RNA πρέπει να αντιστοιχεί σε συγκέντρωση του 1μg/μl
oligodTs (5μM)	1
dNTPs mixture (0,5mM)	1
5xFSbuffer	4
DTT (0,1 M)	2
RNase inhibitor (40u/μL)	0,25
M-MLV (50u/μL)	0,25

1. Προσθήκη σε tube των 0,2 mL, 1 μ Loligo-dTs και τις αντίστοιχες ποσότητες RNA
2. Επώαση δειγμάτων στο θερμοκυκλοποιητή:
 - 70° C για 5min
 - 4° C για μερικά δευτερόλεπτα
3. Στο ίδιο tube προστίθενται:
 - 4 μ L 5xbuffer
 - 2 μ L DTT (0,1 M)
 - 0,25 μ L RNaseinhibitor
 - 0,25 μ L M-MLV
4. Τα δείγματα επωάζονται στο θερμοκυκλοποιητή:
 - 37 °C για 52 min (βέλτιστη θερμοκρασία δράσης ενζύμου)
 - 70 °C για 15 min (μη αντιστρεπτή αποδιάταξη ενζύμου).
 - 4° C περαιτέρω

Τελικός όγκος αντίδρασης: 20 μ l.

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

2.2.3.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου

Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές σε κυτταρικές σειρές για την αξιολόγηση έκφρασης των μεταγράφων 9 & 19, αφού επιβεβαιώθηκε η έκφραση τους, προστέθηκαν και αυτό στα προς ανάλυση μετάγραφα. Πραγματοποιήθηκε ποσοτική μελέτη των συνολικά πέντε μεταγράφων με τη βοήθεια της Real-TimePCR. Το cDNA που παράχθηκε από δείγματα μυελού ασθενών με οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία, χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη τεχνική.

Η Real-TimePCR η αλλιώς ποσοτική PCR (qPCR), έχει σαν χαρακτηριστικό τη δυνατότητα παρακολούθησης της εξέλιξής της. Εκτελείται σε εξειδικευμένα μηχανήματα (θερμικοί κυκλοποιητές πραγματικού χρόνου), που φέρουν ένα πολύπλοκο σύστημα εξοπλισμού (κάτοπτρα & φίλτρα) που «διαβάζει» τον φθορισμό που εκπέμπεται από διάφορες φθορίζουσες χρωστικές, καθώς αυτές ενσωματώνονται στα προϊόντα της PCR και μέσω του φθορισμού που εκπέμπεται γίνεται η ποσοτικοποίηση. Τα φθορίζοντα αυτά μόρια μπορεί να είναι μη ειδικά, τα οποία προσκολλώνται σε δίκλιωνα μόρια DNA ή ειδικά ολιγονουκλεοτίδια- ιχνηθέτες που υβριδίζονται με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες. Όπως και στην απλή PCR, ο αριθμός των αρχικών μορίων του νουκλεϊκού οξέος διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο, με αποτέλεσμα την εκθετική αύξηση του προϊόντος. Η βασική διαφορά ανάμεσα στην ποσοτική και την κλασική PCR είναι η φάση της αντίδρασης, στην οποία συλλέγονται τα δεδομένα και εξάγονται τα αποτελέσματα. Βασική προϋπόθεση για τη ποσοτική PCR είναι η σταθερή και επαναλήψιμη σχέση μεταξύ του αναλυτικού σήματος που λαμβάνεται από το προϊόν της αντίδρασης και της αρχικής ποσότητας του DNA στο δείγμα. Ο φθορισμός που μετρείται στο τέλος κάθε κύκλου αντίδρασης, δίνει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot) η οποία αποτελείται από 3 φάσεις, την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση plateau. Στην εκθετική φάση, όλα τα αντιδραστήρια βρίσκονται σε περίσσεια, με αποτέλεσμα την απόλυτη απόδοση στο διπλασιασμό του προϊόντος. Στη συνέχεια, μερικά συστατικά της αντίδρασης αρχίζουν να εξαντλούνται οπότε και η απόδοση της αντίδρασης υποχωρεί, μέχρι να επέλθει και η φάση του κορεσμού (plateau), όπου η απόδοση είναι μηδενική.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιείται το kit KAPA SYBR FAST Universal της KAPABIOSYSTEMS, το οποίο βασίζεται στη SYBR-GREEN. Η SYBR-GREEN είναι μια μη ειδική χρωστική, που διαθέτει δύο φορτία στις συνθήκες της αντίδρασης, που συμβάλλουν στην υψηλή συγγένεια δέσμευσής της στο δίκλινο DNA. Το σύμπλοκο που προκύπτει απορροφά το μπλε φως στα 497 nm και εκπέμπει πράσινο φως στα 520 nm.

Πιο συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της PCR, τα μικρά μόρια της χρωστικής αλληλεπιδρούν με τη μικρή αύλακα του δίκλωνου DNA, το οποίο παράγεται χάρις την ύπαρξη ειδικών εκκινήτων, και προσδένονται επάνω του. Αρχικά, η χρωστική προσδένεται σε όλα τα δίκλιωνα μόρια και εκπέμπεται ένα χαμηλό σήμα φθορισμού (σήμα υποβάθρου, πρώτοι 10-15 κύκλοι). Στη συνέχεια ακολουθεί υβριδισμός των εκκινήτων και παραγωγή των μορίων DNA-στόχων. Όσο συνεχίζεται η διαδικασία, τόσο παραπάνω δίκλινο προϊόν

σχηματίζεται, με αποτέλεσμα παραπάνω ποσότητα του μορίου της SYBR να προσδένεται σε αυτό. Έτσι, λοιπόν, προκαλείται μια αύξηση στη φωταύγεια η οποία αντιστοιχεί στο ποσό του γενετικού υλικού που έχει ενισχυθεί.

Σημαντικό πλεονέκτημα της χρήσης αυτής της χρωστικής στη μέθοδο αυτή είναι όταν βρίσκεται ελεύθερη στο διάλυμα απουσία δηλαδή δίκλωνου DNA δεν εκπέμπεται φθορισμός. Επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για οποιοδήποτε ζεύγος εκκινητών, άρα θεωρητικά μπορεί να ενισχυθεί οποιαδήποτε περιοχή του DNA επιθυμείται κάθε φορά, ενώ και το χαμηλό κόστος σχετικά με άλλους φθορίζοντες ανιχνευτές είναι επίσης πλεονέκτημα. Από την άλλη, περιορισμό αποτελεί το γεγονός ότι προσδένεται μη ειδικά και παράλληλα με την ενίσχυση του επιθυμητού προϊόντος, μπορεί να ενισχυθούν και παραπροϊόντα ή να εμφανιστούν διμερή εκκινητών, για αυτό είναι απαραίτητος ο προσεκτικός σχεδιασμός ειδικών εκκινητών για κάθε αλληλουχία αλλά και η μελέτη των καμπυλών τήξης (melt curve), μετά το πέρας της αντίδρασης, οι οποίες διαφέρουν για τα διμερή των εκκινητών και για το επιθυμητό προϊόν. Σε κάθε περίπτωση, απαιτείται προσεκτική εφαρμογή κατάλληλων συνθηκών, έτσι ώστε να μειώνεται ο «θόρυβος».

Σχετικά με τις θερμοκρασιακές εναλλαγές, είναι οι παρακάτω:

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

Στο τέλος της αντίδρασης τα προϊόντα δε χρειάζεται να διατηρηθούν όπως στην απλή PCR, στους 4 °C, αλλά μπορούν να απορριφθούν καθώς έχει γίνει η ποσοτικοποίηση.

Οι ποσότητες αντιδραστηρίων για κάθε μετάγραφο που μελετήθηκε φαίνονται αναλυτικά στους Πίνακες 2.3. & 2.4.

Πίνακας 2.3. Ποσότητες αντιδραστηρίων για την ποσοτική ενίσχυση της *HPRT-1, var.4, var.14, var.9, var. 19* και κλασικού μεταγράφου με *Real-TimePCR*.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες για <i>HPRT-1, variant 4, variant 14, variant 9, variant 19</i> (μL)	Ποσότητες duplicate (x2,2) (μL)
SYBR-GREEN	5,0	11,0
dH₂O	2,6	5,72
Forward Primer, 1 mM	1,0	2,2
Reverse Primer, 1 mM (1,0	2,2
cDNA	0,4	0,88

Πίνακας 2.4. Ποσότητες αντιδραστηρίων για την ποσοτική ενίσχυση του κλασικού μεταγράφου με *Real-TimePCR*.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες για κλασικό μετάγραφο (μL)	Ποσότητες duplicate (x2,2) (μL)
SYBR-GREEN	5,0	11,0
dH₂O	2,8	6,16
Forward Primer, 0,5 mM	1,0	2,2
Reverse Primer, 0,5 mM	1,0	2,2
cDNA	0,2	0,44

Αρχικά ο όγκος της αντίδρασης για κάθε δείγμα είναι 10 μL. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης όμως είναι 20 μL για κάθε δείγμα (10 μL/well-duplicate) ώστε να επιτυγχάνεται ο διπλός έλεγχος κάθε δείγματος. Οι αλληλουχίες και οι ονομασίες των εκκινητών παρουσιάστηκαν στον Πίνακα 2.2.

Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιείται στην εκθετική φάση της καμπύλης ενίσχυσης. Βασίζεται στο Ct value, αριθμό που αντιστοιχεί στο συνολικό αριθμό κύκλων αντίδρασης που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι να ξεπεραστεί ένα συγκεκριμένο όριο φθορισμού (threshold). Όσο πιο μικρό είναι το Ct value τόσο περισσότερο αρχικό υπόστρωμα υπήρχε. Επιπλέον, η χρήση ενός γονιδίου αναφοράς και ενός θετικού μάρτυρα είναι απαραίτητα για την ποσοτικοποίηση και την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Επειδή πολλά λάθη μπορούν να προκύψουν στην απομόνωση RNA ή την RT-PCR ή ακόμα και την qPCR, τα οποία θα φανούν τελικά στη ποσοτικοποίηση, τα γονίδια αναφοράς χρησιμεύουν ως εσωτερικός έλεγχος της αντίδρασης. Απαραίτητη προϋπόθεση για τα γονίδια αναφοράς είναι η σχετικά σταθερή τους έκφραση μεταξύ διαφόρων ιστών του οργανισμού όπως επίσης και η ανεξαρτησία από τους διάφορους παράγοντες της πειραματικής διαδικασίας. Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς (housekeeping gene) το γονίδιο της *HPRT-1* που κωδικοποιεί το ένζυμο φωσφοριβοζυλο-τρανσφεράση της υποξανθίνης. Ως θετικός μάρτυρας, ένα δείγμα δηλαδή που εκφράζει όλα τα μετάγραφα που μελετώνται, χρησιμοποιήθηκε cDNA της κυτταρικής σειράς HEK293. Έτσι, γίνεται δυνατή η σχετική ποσοτικοποίηση με τη μέθοδο $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Σε αυτή τη μέθοδο, αρχικά πραγματοποιείται η κανονικοποίηση των τιμών Ct για τα ελεγχόμενα γονίδια και τα γονίδια αναφοράς, και για τα ελεγχόμενα δείγματα, αλλά και για τον θετικό μάρτυρα, βάσει των παρακάτω εξισώσεων:

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

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

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

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

Τέλος υπολογίζεται η ποσότητα $2^{-\Delta\Delta Ct}$, η οποία αντιστοιχεί στον αριθμό των φορών που μεταβλήθηκε η έκφραση του ελεγχόμενου γονιδίου στα διάφορα ελεγχόμενα δείγματα, σε σύγκριση με το πρότυπο δείγμα, το οποίο κανονικοποιείται και ως προς το γονίδιο αναφοράς.

2.2.4. Στατιστική ανάλυση

Για την αξιολόγηση των 4 μεταγράφων της ριβονουκλεάσης κ ως προς την έκφραση τους σε δείγματα παιδιατρικών ασθενών ΟΛΛ, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των επιπέδων έκφρασης τους με τη βοήθεια του λογισμικού SPSS (Statistical Package for the Social Sciences).

Η έκφρασή των 4 μεταγράφων μελετήθηκε μεταξύ υγιών και ασθενών, αλλά και μεταξύ ασθενών την ημέρα διάγνωσης και την 33^η μέρα τις θεραπείας τους με τη βοήθεια των μη παραμετρικών διαδικασιών Mann-Whitney Utest και Wilcoxon Rank test. Επιπλέον, τα 4 μετάγραφα μελετήθηκαν ως προς την έκφρασή τους μεταξύ ασθενών με βάση τα διάφορα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά τους. Η μη παραμετρική διαδικασία Kruskal-Wallistest, χρησιμοποιήθηκε, για τη μελέτη συσχέτισης των επιπέδων έκφρασης των 4 μεταγράφων με την ηλικία των ασθενών, με το είδος της ΟΛΛ (B-ΟΛΛ/T-ΟΛΛ), με τον καρυότυπο του κάθε ασθενούς (μετατόπιση t(12,21) και υπερδιπλοειδία), με τον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων την ημέρα διάγνωσης, με την κατάσταση ανταπόκρισης την 8^η μέρα, με την κατάσταση μυελού την 15^η μέρα και με το Danger Score των ασθενών.

Για την ανάλυση επιβίωσης των ασθενών με παιδική ΟΛΛ, σχεδιάστηκαν καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier και πραγματοποιήθηκε ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox (Cox Regression Analysis). Πιο συγκεκριμένα, δημιουργήθηκαν καμπύλες επιβίωσης χωρίς υποτροπή (DFS) και ολικής επιβίωσης (OS) για το κλασικό μετάγραφο, όπου παριστάνεται το ποσοστό επιβίωσης των ασθενών για ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, για τους ασθενείς που το υπερκεφράζουν και το υπόκεφράζουν ενώ μελετήθηκαν και τα υπόλοιπα μετάγραφα ως προς την επιβίωση, δεν υπήρχαν όμως αρκετά συμβάντα για να οδηγήσουν σε συμπέρασμα. Επιπρόσθετα, η ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox δίνει έναν συντελεστή σχετικού κινδύνου (HazardRatio, HR) για την εκδήλωση συγκεκριμένου γεγονότος (θανάτου ή υποτροπής), μεταξύ δύο ομάδων ασθενών, στο ίδιο χρονικό διάστημα.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε συσχέτιση της έκφρασης των 4 μεταγράφων του γονιδίου της ριβονουκλεάσης κ, κατά Spearman, όπου δίνεται ο συντελεστής Spearman (Rs), χαρακτηριστικός για τη συσχέτιση δύο συνεχών μεταβλητών.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA - ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ & ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ

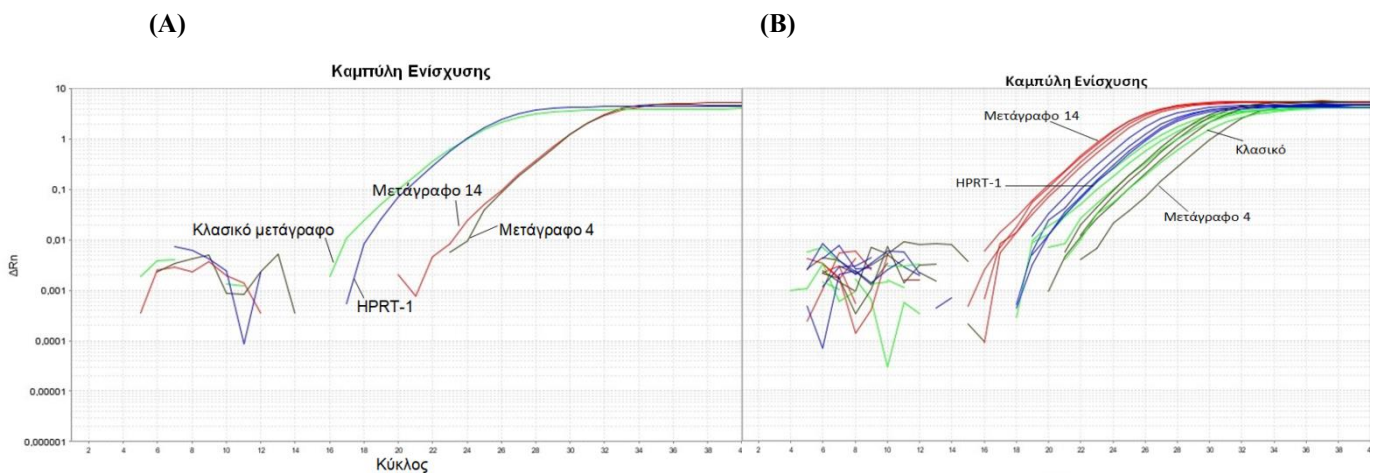
Η απομόνωση του RNA τόσο από τις κυτταρικές σειρές, που χρησιμοποιήθηκαν, όσο και από τα δείγματα ολικού αίματος, πραγματοποιήθηκε βάσει των οδηγιών των υποενοτήτων 2.2.1.1. και 2.2.1.2., αντίστοιχα. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του RNA έγινε με τη χρήση του Biospec-nano, όπως περιεγράφηκε στο υποκεφάλαιο 2.2.2.. Υπενθυμίζεται ότι για να θεωρηθεί καθαρό ένα δείγμα RNA πρέπει ο λόγος της απορρόφησης A_{260}/A_{280} να είναι μεταξύ 1,8-2,0, αλλιώς υπάρχει πιθανότητα πρόσμιξής του με πρωτεΐνες ή γενωμικό DNA. Το RNA από τις κυτταρικές σειρές, επειδή ήταν αρκετά μεγάλη η συγκέντρωσή του, μοιράστηκε σε aliquots των 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, έτσι ώστε να είναι εύκολη και άμεση η χρήση του. Αντιθέτως, το RNA από δείγματα ολικού αίματος, λόγω χαμηλής συγκέντρωσης, δε μοιράστηκε και κάθε φορά γινόταν λήψη της κατάλληλης ποσότητάς του, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση που θα χρησιμοποιηθεί για την RT-PCR να είναι επίσης 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Στον Πίνακα 3.1. παρουσιάζονται ενδεικτικά μερικά αποτελέσματα φασματοφωτομετρικού προσδιορισμού ολικού RNA από τις κυτταρικές σειρές HEK293, U937, K562 και HL60.

Πίνακας 3.1. Ενδεικτικός πίνακας αποτελεσμάτων φασματοφωτομετρικών μετρήσεων με το Biospec-nano, σε δείγματα των κυτταρικών σειρών HEK293, U937, HL60, K562

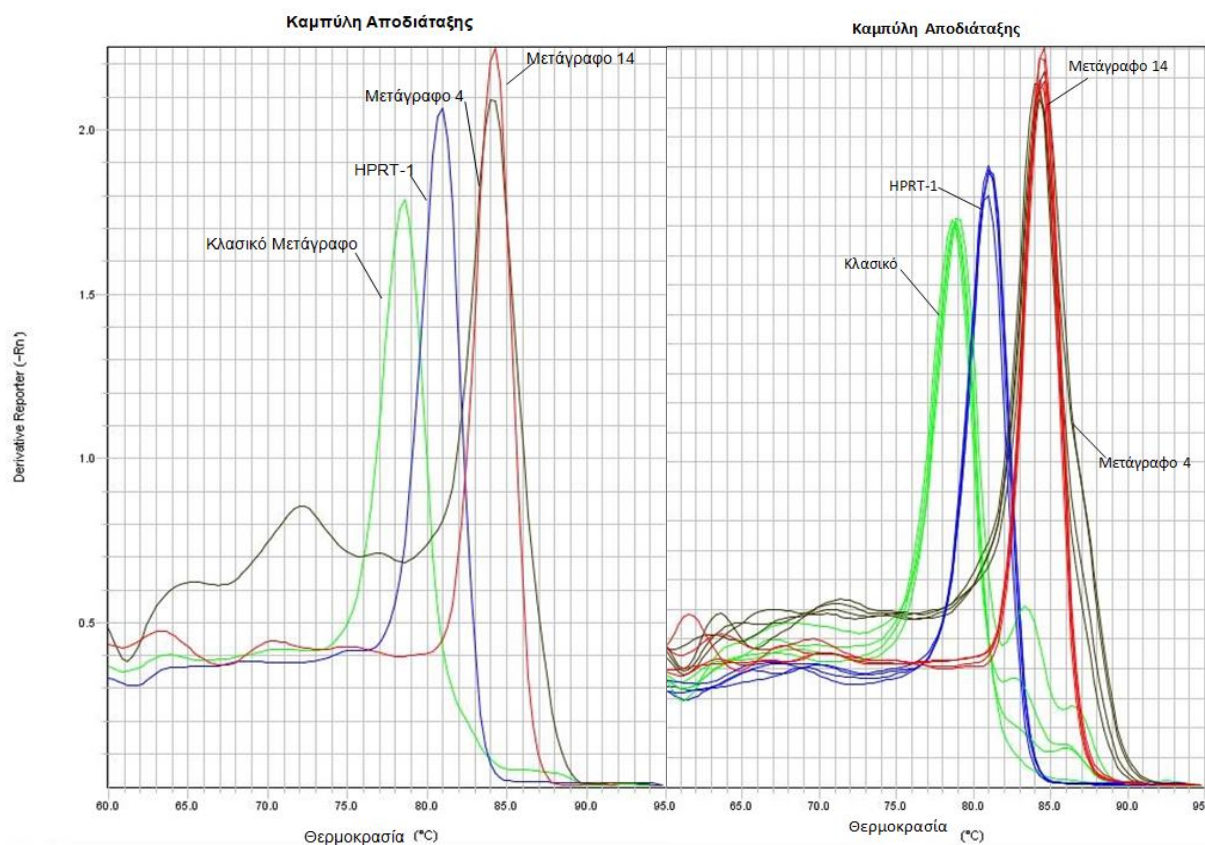
Δείγμα	Συγκέντρωση (ng/ μL)	OD260/280	OD260/230
HEK293(1)	3326,11	1,88	1,96
HEK293(2)	3335,72	1,91	1,86
U937	1153,02	2,15	2,14
HL60	1820,23	2,14	1,81
K562	1185,64	2,14	1,78

3.2. ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ: Κλασικό, 4 & 14 ΣΕ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΟΛΛ

Για την ποσοτική μελέτη των μεταγράφων: κλασικό, 4 & 14 πραγματοποιήθηκε Real Time PCR σε cDNA από δείγματα μυελού των οστών. Στα πλαίσια του παρόντος project, που άρχισε το προηγούμενο χρόνο από τη κ. Μείντάνη Αγγελική, συνολικά μελετήθηκαν 79 (19 νέοι) ασθενείς με παιδική οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία από τους οποίους αξιολογήσιμοι ήταν οι 67 ασθενείς. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η *HPRT-1* και ως θετικός μάρτυρας η κυτταρική σειρά HEK293. Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε η qPCR ήταν οι βέλτιστες, έτσι ώστε για κάθε μελετούμενο μετάγραφο να υπάρχει μοναδικό προϊόν και να υπάρχουν όσο το δυνατόν λιγότερα διμερή των εκκινητών. Στην Εικόνα 3.1., που παρουσιάζεται παρακάτω, φαίνονται ενδεικτικά οι καμπύλες ενίσχυσης για την *HPRT-1*, το κλασικό μετάγραφο, τα μέταγραφα 4 και 14, στην κυτταρική σειρά HEK293 και σε δείγματα ασθενών. Για τον έλεγχο της ποιότητας των προϊόντων της αντίδρασης Real Time PCR απεικονίζονται και οι καμπύλες αποδιάταξης (βλ. Εικόνα 3.2.), όπου φαίνεται η μοναδικότητα των προϊόντων και τα αντίστοιχα Tm.



Εικόνα 3.1. Καμπύλες ενίσχυσης Real-Time PCR για το γονίδιο *HPRT-1*, το κλασικό μετάγραφο, το μετάγραφο 4, το μετάγραφο 14 σε cDNA από την κυτταρική σειρά HEK293 (A) και σε δείγματα ασθενών (B)



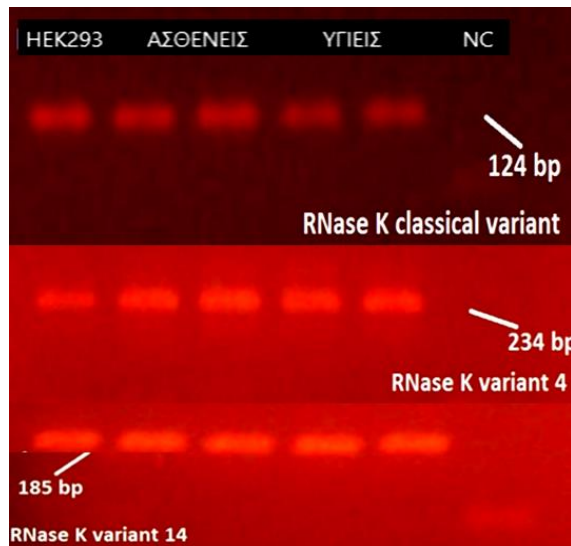
(A)

(B)

Εικόνα 3.2. Καμπύλες αποδιάταξης *Real-TimePCR* για το γονίδιο *HPRT-1* με $T_m=80,97$, το κλασικό μετάγραφο με $T_m=78,52$, το μετάγραφο 4 με $T_m=84,05$ το μετάγραφο 14 με $T_m=84,27$ στη κυτταρική σειρά *HEK293* (A) και σε δείγματα ασθενών (B)

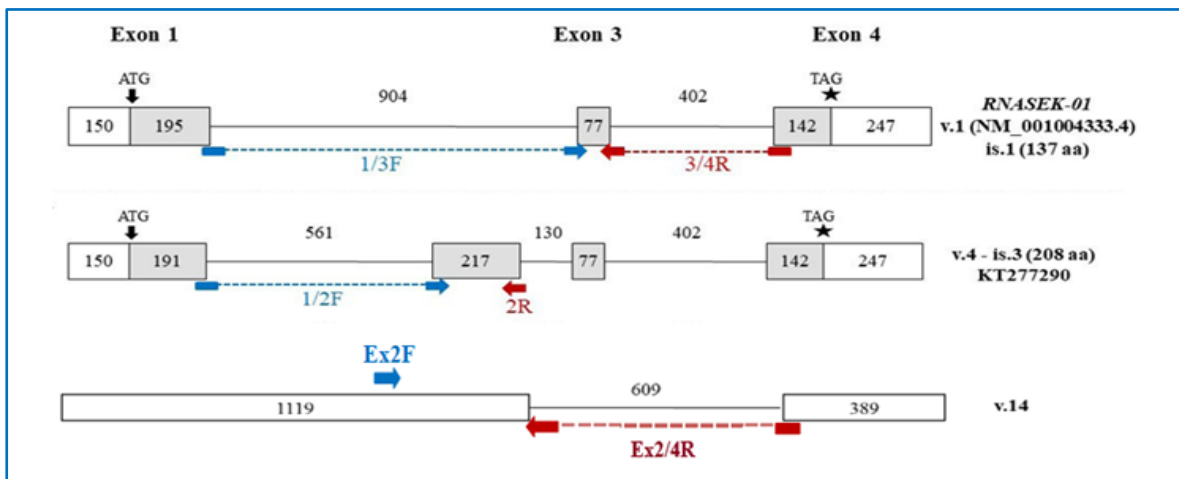
Για την περαιτέρω επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων, τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, έτσι ώστε να ελεγχθεί το προϊόν ως προς το μέγεθός και τη μοναδικότητά του. Παράλληλα με τον έλεγχο λοιπόν για την έκφραση των μεταγράφων της ριβονουκλεάσης κ με qPCR, όλα τα δείγματα ελέγχθηκαν και για την έκφραση του γονιδίου αναφοράς της *HPRT-1*, η έκφραση της οποίας είναι ενδεικτική για την καλή απομόνωση του RNA αλλά για τη σωστή αντίδραση RT-PCR. Δείγματα τα οποία δεν εξέφραζαν το γονίδιο αναφοράς ή είχαν πολύ αργή έκφρασή του, απορρίφθηκαν από τη μελέτη, τα υπόλοιπα, που είχαν φυσιολογική έκφραση του γονιδίου αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση της έκφρασης των παραπάνω μεταγράφων.

Το προϊόν της αντίδρασης ήταν μεγέθους 124bp για το κλασικό μετάγραφο, 250 bp για το μετάγραφο 4 και 185bp για το μετάγραφο 14. Ενδεικτικά δείγματα ασθενών και υγείων, τα οποία ηλεκτροφορήθηκαν μετά την qPCR παρουσιάζονται παρακάτω στην Εικόνα 3.3.



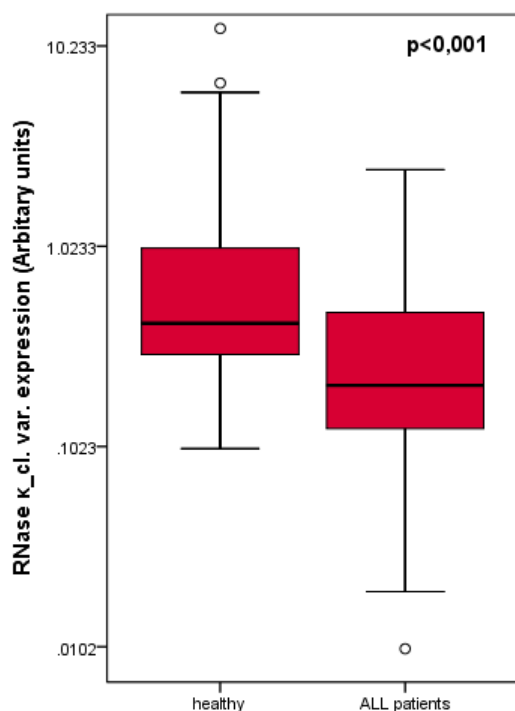
Εικόνα 3.3. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων qPCR για το κλασικό μετάγραφο, το μετάγραφο 4 και το μετάγραφο 14 του γονιδίου της RNase κ σε gel αγαρόζης 2% w/v, σε cDNA από μυελό ολικού αίματος. Το δείγμα από τα HEK293 είναι ο θετικός μάρτυρας, ενώ το NC ο αρνητικός μάρτυρας.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ο F69 με τον 192R για το κλασικό μετάγραφο, ο 1(2)/2F με τον Ex2/3R για το 4 και ο Ex2F με τον Ex2/4R για το 14, οι αλληλουχίες των οποίων παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.2.. Στην Εικόνα 3.4. απεικονίζονται τα μετάγραφα: κλασικό, 4 και 14 καθώς και τα σημεία στα οποία υβριδοποιούνται οι εκκινητές τους.



Εικόνα 3.4. Απεικόνιση των μεταγράφων: κλασικό, 4 και 14 της RNase κ και των σημείων που υβριδοποιούνται οι εκκινητές τους.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, στην προηγούμενη διπλωματική εργασία της κ. Μειντάνη Αγγελικής είχε συλλεχθεί ένας αριθμός δειγμάτων ασθενών και υγίων με βάση τα οποία έγιναν οι στατιστικές αναλύσεις. Ένας από τους στόχους της παρούσας εργασίας είναι η



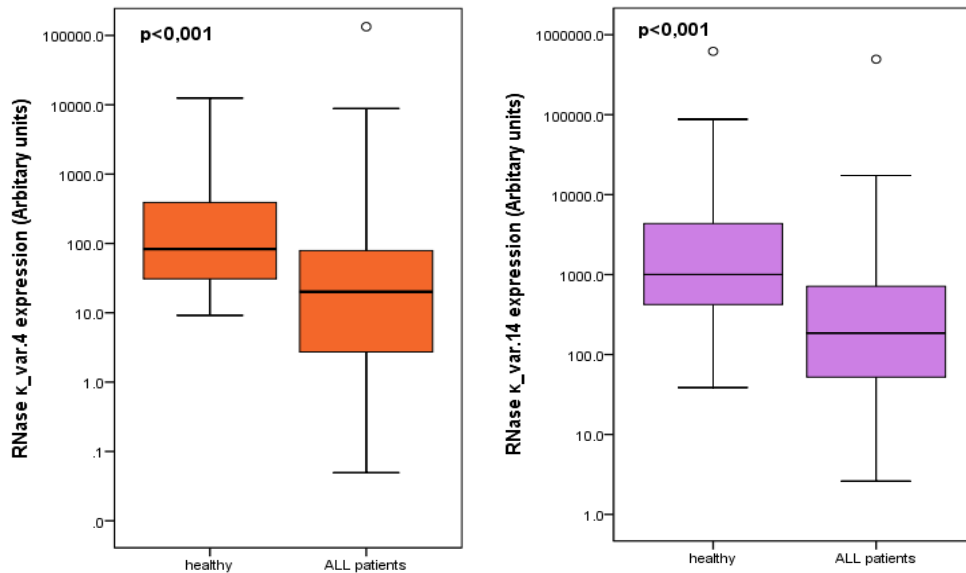
αύξηση του αριθμού των δειγμάτων με σκοπό την εξαγωγή ασφαλέστερων αποτελεσμάτων. Κατά την ανάλυση λοιπόν των 67 ασθενών με παιδική ΟΛΛ και των 36 υγίων, προκύπτει ότι το κλασικό μετάγραφο παρουσιάζει στατιστικώς μειωμένα επίπεδα στους ασθενείς την ημέρα της διάγνωσης, σε σχέση με τους υγιείς ($p < 0,001$). Στην Εικόνα 3.5. παρουσιάζεται και το διάγραμμα σύγκρισης μεταξύ υγίων και ασθενών. Τα αποτελέσματα βρίσκονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του προηγούμενου project.

Εικόνα 3.5. Διάγραμμα έκφρασης του κλασικού μεταγράφου μεταξύ υγίων και ασθενών με παιδική ΟΛΛ. Το p υπολογίστηκε με τη μη-παραμετρική διαδικασία “Mann-WhitneyUtest”

Επιπλέον, εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης των ίδιων ασθενών κατά την ημέρα της διάγνωσης και το τέλος της θεραπείας εφόδου (33^η ημέρα). Συγκεκριμένα, από τους 67 ασθενείς, υπήρξε υλικό μελέτης για τους 21 και αναλύθηκε η έκφραση του κλασικού μεταγράφου (variant 1), από τους οποίους οι 11 είχαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης τη μέρα διάγνωσης σε σχέση με την 33^η μέρα και οι 10, το αντίστροφο.

Σε επόμενη σειρά πειραμάτων προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων 4 και 14 σε δείγματα ασθενών και υγίων. Κατά την ανάλυση λοιπόν των 67 ασθενών με παιδική ΟΛΛ και των 36 υγίων, προκύπτει ότι τα μετάγραφα 4 και 14 παρουσιάζουν στατιστικώς μειωμένα επίπεδα στους ασθενείς την ημέρα της διάγνωσης, σε σχέση με τους υγιείς ($p < 0,001$), (βλ. Εικόνα 3.6.). Σε ό,τι αφορά τη σύγκριση των επιπέδων των μεταγράφων 4 και 14 μεταξύ ημέρας διάγνωσης και 33^{ης} μέρας, υπήρξε υλικό για 23 και 22 ασθενείς αντίστοιχα. Από την ανάλυση έκφρασης του 4 προέκυψε ότι 10 ασθενείς είχαν

υψηλότερα επίπεδα έκφρασης τη μέρα διάγνωσης σε σχέση με την 33^η μέρα και οι 13, το αντίστροφο ($p=0,627$ μη στατιστικώς σημαντικό). Αντίστοιχα για το 14 προέκυψε ότι 11 ασθενείς είχαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης τη μέρα διάγνωσης σε σχέση με την 33^η μέρα και οι υπόλοιποι 11, το αντίστροφο ($p=0,548$, μη στατιστικά σημαντικό).

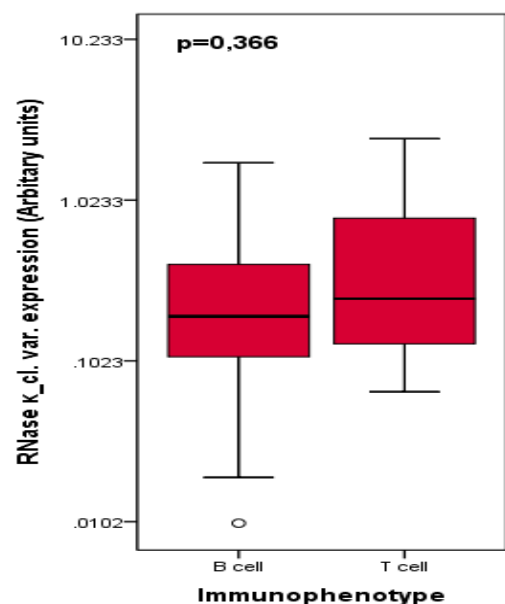


Εικόνα 3.6. Διάγραμμα έκφρασης των μεταγράφων 4 & 14 μεταξύ υγιών και ασθενών με παιδική ΟΛΛ. Το p υπολογίστηκε με τη μη-παραμετρική διαδικασία “Mann-WhitneyUtest”.

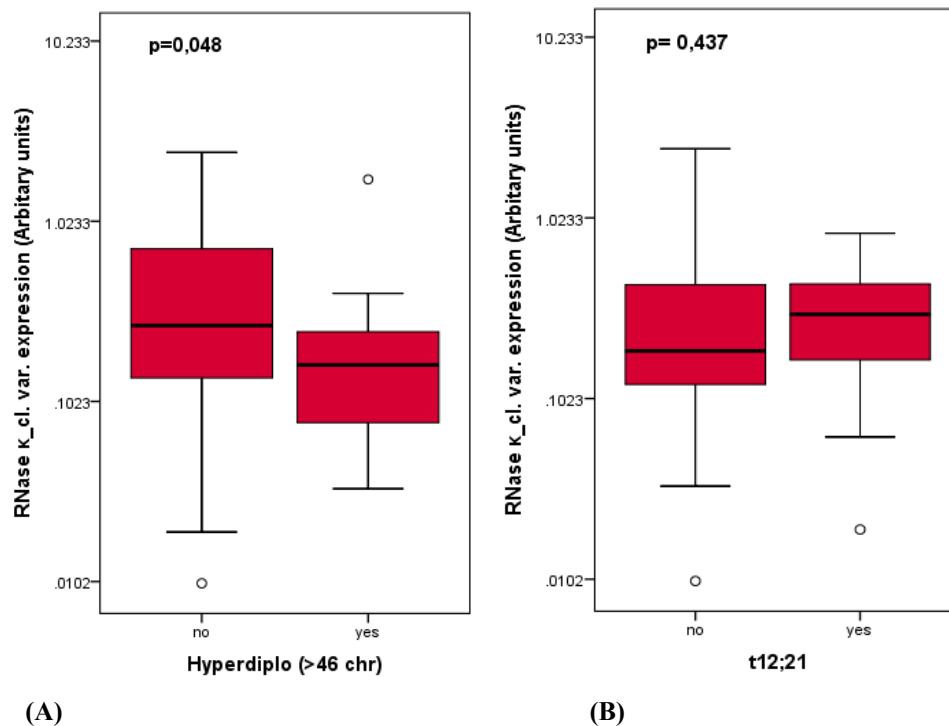
3.2.1. Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης του κλασικού μεταγράφου του γονιδίου της ριβονουκλεάσης κ με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών

Από τους 67 ασθενείς που αξιολογήθηκαν για το κλασικό μετάγραφο της ριβονουκλεάσης κ, οι 54 έπασχαν από Β-ΟΛΛ και οι 13 από Τ-ΟΛΛ. Στην Εικόνα 3.7. προκύπτει ότι η έκφραση του κλασικού μεταγράφου, στους ασθενείς με Τ-ΟΛΛ φαίνεται να είναι αυξημένη, χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντική η διαφορά, $p=0,366$.

Εικόνα 3.7. Διάγραμμα έκφρασης του κλασικού μεταγράφου μεταξύ Β-ΟΛΛ/CALLA(+) και Τ-ΟΛΛ ασθενών. Το p υπολογίστηκε με τη μη-παραμετρική διαδικασία “Mann-WhitneyUtest”

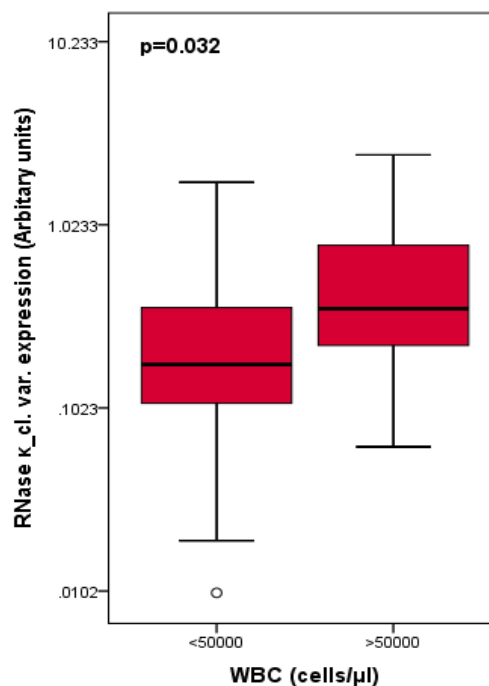


Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μελέτη συσχέτισης των επιπέδων έκφρασης του κλασικού μεταγράφου στους ασθενείς με υπερδιπλοειδία (>46 χρωμοσώματα) και σε αυτούς που έφεραν τη μετατόπιση t(12;21). Η μελέτη έδειξε ότι οι ασθενείς με υπερδιπλοειδία εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα έκφρασης με $p=0,048$ (στατιστικά σημαντικό), ενώ οι ασθενείς με τη μετατόπιση t(12;21) δεν εμφάνισαν κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p=0,437$). Οι παραπάνω παρατηρήσεις απεικονίζονται στα διαγράμματα, που ακολουθούν, στην Εικόνα 3.8.



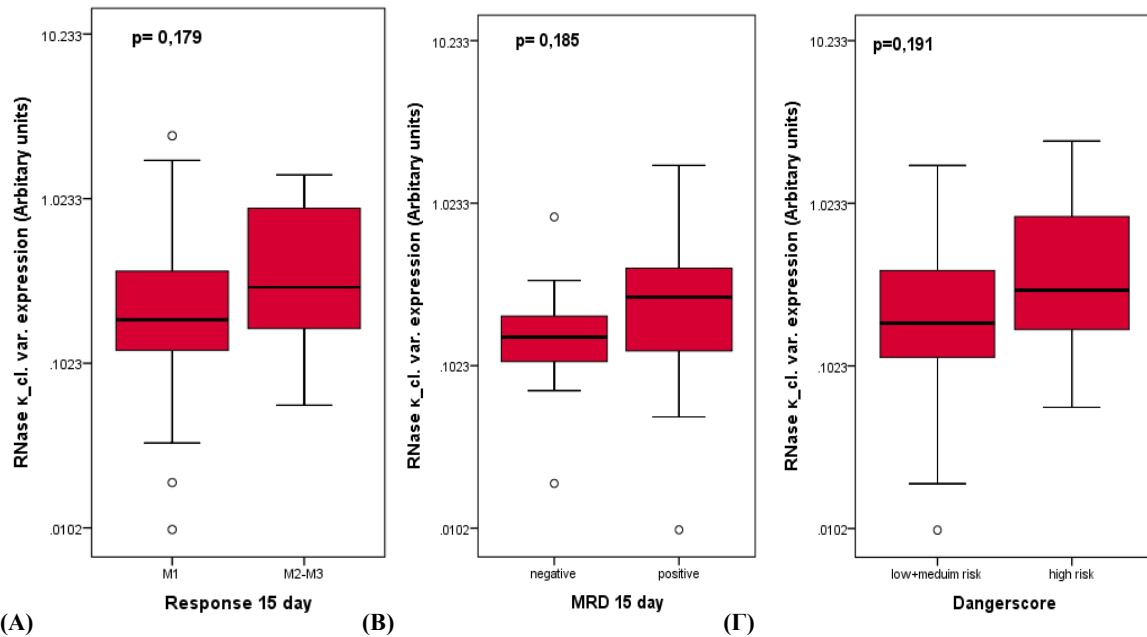
Εικόνα 3.8. Διάγραμμα έκφρασης του κλασικού μεταγράφου μεταξύ ασθενών με υπεδιπλοειδία και ασθενών χωρίς. Το p υπολογίστηκε με τη μη-παραμετρική διαδικασία “Kruskal-Wallis test” (A). Διάγραμμα έκφρασης του κλασικού μεταγράφου μεταξύ ασθενών που φέρουν μετατόπιση t12;21 και ασθενών που δεν τη φέρουν. Το p υπολογίστηκε με τη μη-παραμετρική διαδικασία “Mann-WhitneyUtest” (B).

Επιπλέον, σε ότι αφορά τον αριθμό λευκών κυττάρων (WBC) την ημέρα διάγνωσης σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του κλασικού μεταγράφου, φαίνεται ότι οι ασθενείς, που είχαν πάνω από 50000 αριθμό WBC, εμφάνισαν και αυξημένα επίπεδα του κλασικού μεταγράφου. Η παρατήρηση είναι στατιστικώς σημαντική με $p=0,032$ και το διάγραμμα απεικονίζεται στην Εικόνα 3.9.



Εικόνα 3.9. Διάγραμμα έκφρασης του κλασικού μεταγράφου μεταξύ ασθενών με παιδική ΟΑΛ με WBC την ημέρα διάγνωσης >50000 κτ./μL και <50000 κτ./μL. Το p υπολογίστηκε με τη μη-παραμετρική διαδικασία “Mann-WhitneyUtest ”

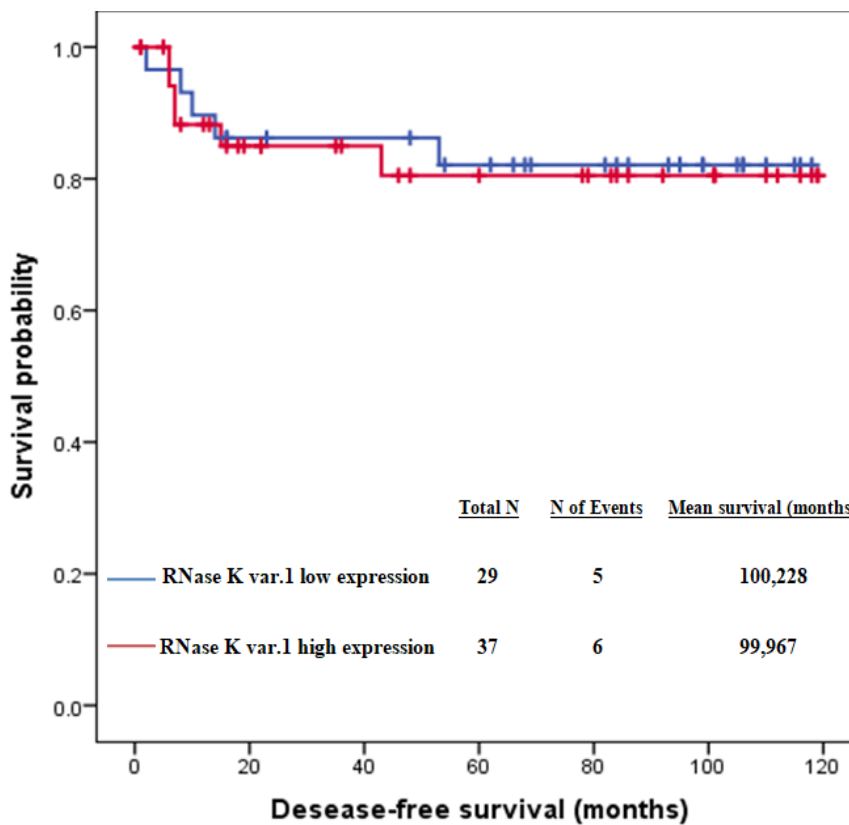
Σε ότι αφορά τον αριθμό των βλαστών την 8^η μέρα, οι ασθενείς με >1000 βλάστες/μL δεν εμφάνισαν κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα έκφρασης του κλασικού μεταγράφου. Αντίθετα, για τη 15^η μέρα, όπου η κατάσταση του μυελού που χωρίζεται σε M1 και M2-M3, τα επίπεδα έκφρασης του κλασικού μεταγράφου ήταν αυξημένα στους ασθενείς M2-M3, $p=0,179$. Επίσης, οι ασθενείς με θετική MRD την 15^η μέρα είχαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του κλασικού μεταγράφου, $p=0,185$. Βάσει του Danger Score, το κλασικό μετάγραφο της RNase κ φαίνεται να έχει αυξημένη έκφραση, μη στατιστικώς σημαντική ($p=0,191$), για τους ασθενείς υψηλού κινδύνου (βλ. Εικόνα 3.10.)



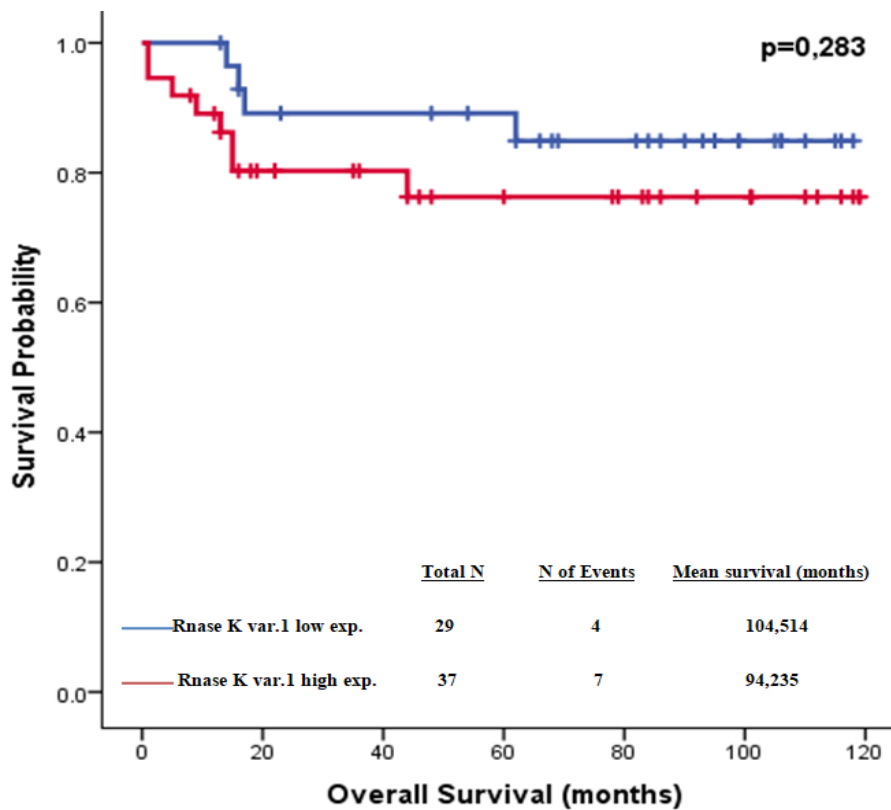
Εικόνα 3.10. Διάγραμμα έκφρασης του κλασικού μεταγράφου μεταξύ ασθενών με παιδική ΟΛΛ για PR την 15^η ημέρα M1/M2-M3. Το p υπολογίστηκε με τη μη-παραμετρική διαδικασία “Kruskal-Wallis test” (A). Διάγραμμα έκφρασης του κλασικού μεταγράφου μεταξύ ασθενών με θετική/αρνητική MRD 15^{ης} μέρας. Το p υπολογίστηκε με τη μη-παραμετρική διαδικασία “Kruskal-Wallis test” (B). Διάγραμμα έκφρασης του κλασικού μεταγράφου μεταξύ ασθενών με παιδική ΟΛΛ χαμηλού/ενδιάμεσου ρίσκου και υψηλού ρίσκου. Το p υπολογίστηκε με τη μη-παραμετρική διαδικασία “Mann-WhitneyUtest” (Γ).

Σχετικά με την επιβίωση των ασθενών χωρίς υποτροπή, δεν φαίνεται κάποια διαφορά ανάμεσα σε αυτούς που υπερεκφράζουν το κλασικό μετάγραφο σε σχέση με αυτούς που το υπόεκφράζουν. Πιο συγκεκριμένα, από τους 66 ασθενείς, οι 29 υποεκφράζουν το κλασικό μετάγραφο, με 5 γεγονότα υποτροπής, ενώ οι 37 το υπέρεκφράζουν με 6 γεγονότα υποτροπής. Η μέση επιβίωση των ασθενών χωρίς υποτροπή, που έχουν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του κλασικού μεταγράφου είναι 100 μήνες, ενώ όσοι έχουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης, επιβιώνουν χωρίς υποτροπή για 98 μήνες. Η παραπάνω παρατήρηση δεν είναι στατιστικώς σημαντική ($p=0,841$), καθώς υπάρχει μικρό ποσοστό υποτροπών, το οποίο είναι και ισομοιρασμένο ανάμεσα στις δύο κατηγορίες των ασθενών. Όσον αφορά την ολική επιβίωση των ασθενών με παιδική ΟΛΛ, όσοι υπερεκφράζουν το κλασικό μετάγραφο φαίνεται να έχουν χειρότερη επιβίωση και μεγαλύτερο κίνδυνο θανάτου, με $p=0,283$. Συγκεκριμένα, από τους 66 ασθενείς, οι 29 που υποεκφράζουν το κλασικό

μετάγραφο παρουσίασαν 4 θανάτους, ενώ οι 37 που το υπερεκφράζουν παρουσίασαν 8 γεγονότα θανάτου. Η μέση ολική επιβίωση των ασθενών με χαμηλότερα επίπεδα του κλασικού μεταγράφου ανέρχεται στους 105 μήνες, ενώ των ασθενών με υψηλότερα επίπεδα έκφρασης, στους 94 μήνες. Οι καμπύλες Kaplan-Meier για την επιβίωση χωρίς υποτροπή και την ολική επιβίωση παρουσιάζονται στις Εικόνες 3.11. & 3.12. αντίστοιχα.



Εικόνα 3.11. Καμπύλη Kaplan-Meier για την επιβίωση χωρίς υποτροπή των παιδιατρικών ασθενών ΟΛΛ, ως προς την έκφραση του κλασικού μεταγράφου του γονιδίου της ριβονουκλεάσης κ. Το p υπολογίσθηκε με το “log-ranktest”.



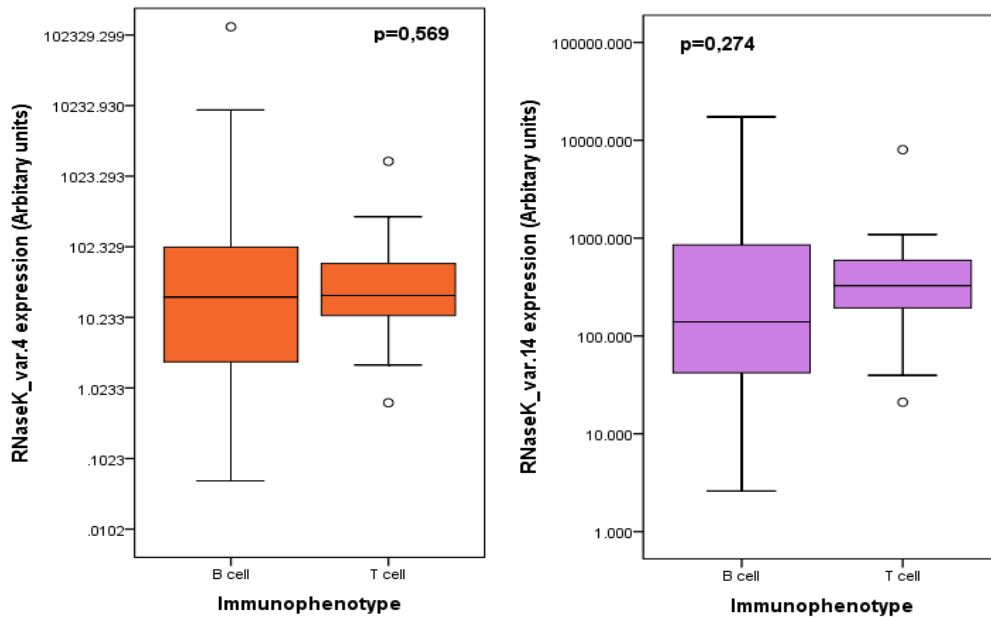
Εικόνα 3.12. Καμπύλη Kaplan-Meier για την ολική επιβίωση (OS) των παιδιατρικών ασθενών ΟΑΛ, ως προς την έκφραση του κλασικού μεταγράφου του γονιδίου της ριβονουκλεάσης κ. Το p υπολογίσθηκε με το “log-ranktest”.

Επιπλέον, από την ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox (Cox regression analysis) προκύπτει, πως στο ίδιο χρονικό διάστημα, οι ασθενείς που υπέρεκφράζουν το κλασικό μετάγραφο παρουσιάζουν 1,129 φορές πιο αυξημένο κίνδυνο υποτροπής, σε σχέση με όσους το υπόεκφράζουν, για το ίδιο χρονικό διάστημα (HR=1,129 με $p=0,842$ και διάστημα εμπιστοσύνης 95%: 0,343-3,709). Αντίστοιχα, όσον αφορά την ολική επιβίωση, οι ασθενείς που υπέρεκφράζουν το μετάγραφο 1 παρουσιάζουν 1,908 φορές πιο αυξημένο κίνδυνο θανάτου σε σχέση με τους ασθενείς που το υπόεκφράζουν (HR=1,908 με $p=0,293$ και διάστημα εμπιστοσύνης 95%: 0,573-6,357).

3.2.2. Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης των μεταγράφων 4 & 14 του γονιδίου της ριβονουκλεάσης κ με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών

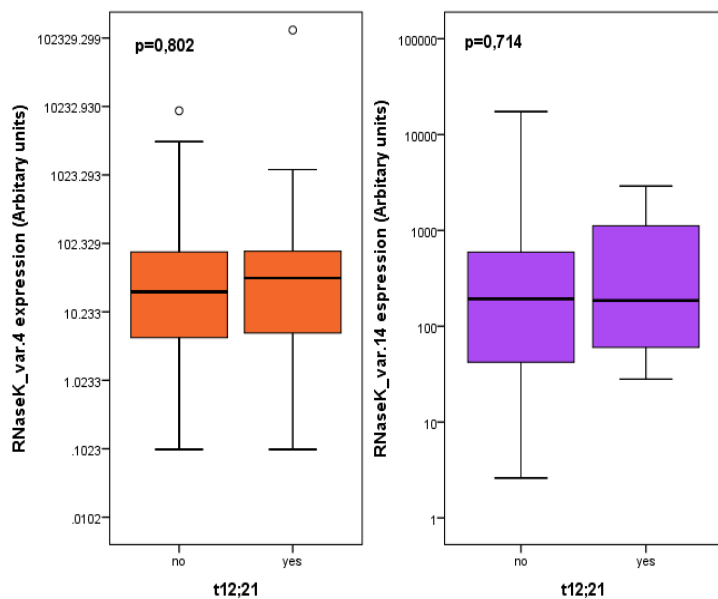
Για τα μετάγραφα 4 & 14 της ριβονουκλεάσης κ, μελετήθηκαν και αξιολογήθηκαν 67 ασθενείς, από τους οποίους οι 54 έπασχαν από Β-ΟΑΛ και οι 13 από Τ-ΟΑΛ. Όσον αφορά λοιπόν την μελέτη έκφρασής τους σε σχέση με τον ανοσοφαινότυπο, δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά, όπως φαίνεται και στην Εικόνα

3.13., Για το μετάγραφο 4 η στατιστική δοκιμασία έδωσε $p=0,569$ και για το 14 έδωσε $p=0,274$, (μη στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα).

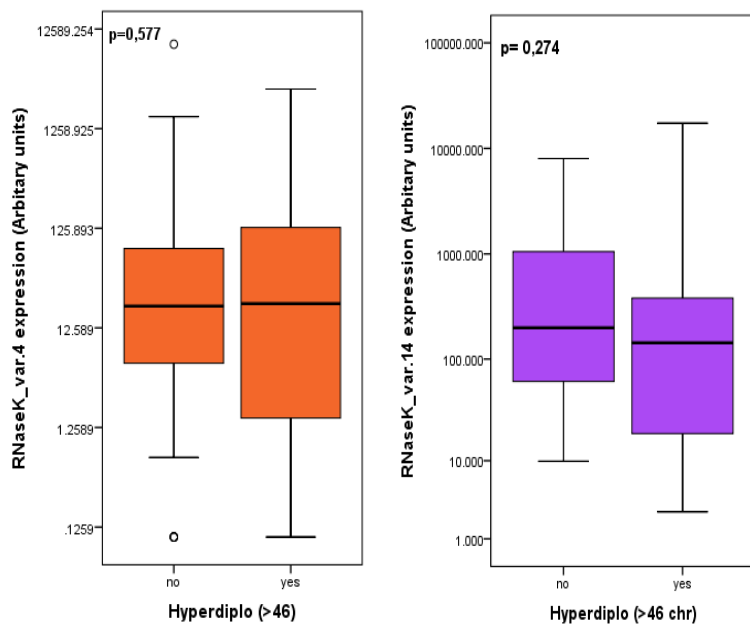


Εικόνα 3.13. Διάγραμμα έκφρασης των μεταγράφων 4 & 14 μεταξύ B-ΟΛΛ/CALLA(+) και T-ΟΛΛ ασθενών. Το p υπολογίστηκε με τη μη-παραμετρική διαδικασία “Mann-WhitneyUtest”

Σε ότι αφορά τη συσχέτιση των μεταγράφων με τη μετατόπιση $t(12;21)$, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.14., για το var.4 η ανάλυση έδωσε $p=0,802$ και για το var.14 έδωσε $p=0,714$ (μη στατιστικώς σημαντικά). Στην περίπτωση της υπερδιπλοειδίας (βλ. Εικόνα 3.15.), η ανάλυση για τους ασθενείς με υπερδιπλοειδία για το var.4 έδωσε $p=0,577$ και για το var.14, $p=0,274$ (μη στατιστικώς σημαντικά).

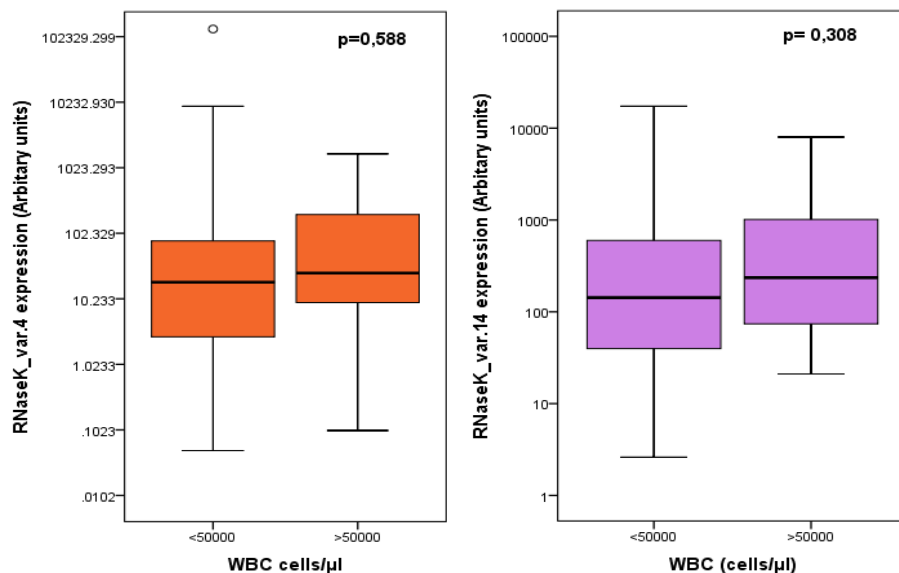


Εικόνα 3.14. Διάγραμμα έκφρασης των μεταγράφων 4 & 14 μεταξύ ασθενών που φέρουν μετατόπιση $t12;21$ και ασθενών που δεν τη φέρουν. Το p υπολογίστηκε με τη μη-παραμετρική διαδικασία “Mann-WhitneyUtest”.



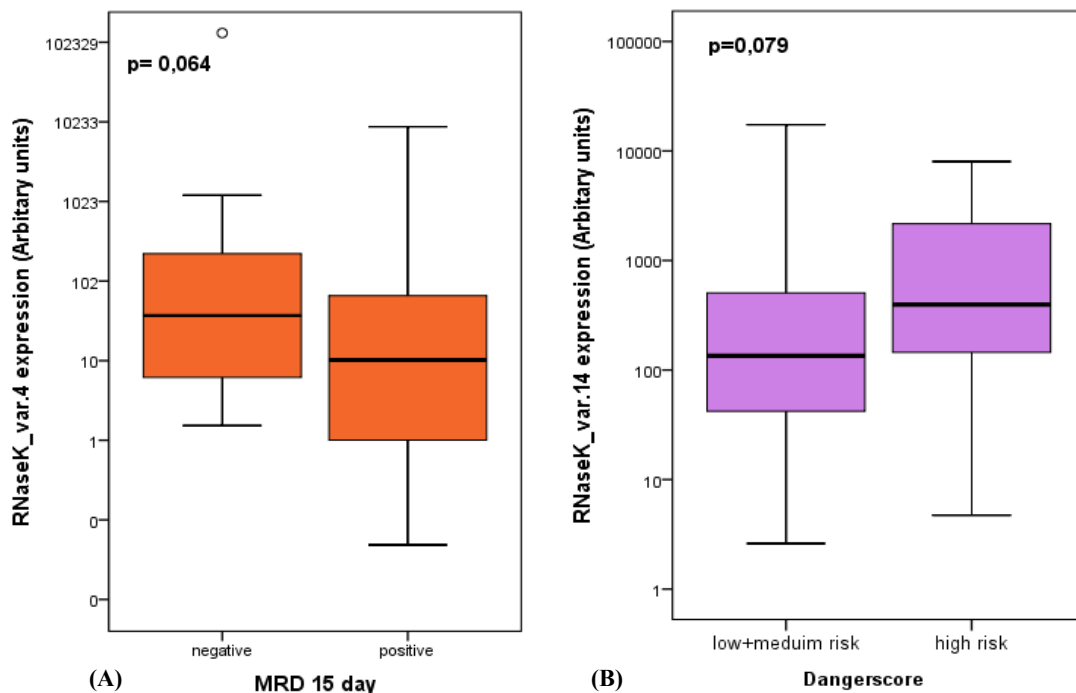
Εικόνα 3.15. Διάγραμμα έκφρασης των μεταγράφων 4 & 14 μεταξύ ασθενών με υπεδιπλοειδία και ασθενών χωρίς. Το p υπολογίστηκε με τη μη-παραμετρική διαδικασία “Mann-WhitneyUtest”.

Επιπλέον, σχετικά με τον αριθμό λευκών κυττάρων (WBC) την ημέρα τα διάγνωσης, δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.16., ανάμεσα στους ασθενείς με αριθμό λευκών >50000 και τους ασθενείς με <50000. Η ανάλυση για το 4 & το 14 έδωσε $p=0,588$ & $p=0,308$ αντίστοιχα, (μη στατιστικά σημαντικό).



Εικόνα 3.16. Διάγραμμα έκφρασης των μεταγράφων 4 & 14 μεταξύ ασθενών με WBC την ημέρα διάγνωσης >50000 κντ./μL και <50000 κντ./μL. Το p υπολογίστηκε με τη μη-παραμετρική διαδικασία “Mann-WhitneyUtest”

Σε ότι αφορά τον αριθμό των βλαστών την 8^η μέρα θεραπείας, οι ασθενείς με >1000 βλάστες/μL δεν παρουσίασαν κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση ούτε με το μετάγραφο 4 ($p=0,634$) ούτε και με το 14 ($p=0,623$). Ανάλογα αποτελέσματα λήφθηκαν και για τη 15^η μέρα, όπου η κατάσταση του μυελού που χωρίζεται σε M1 και M2-M3, τα επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων 4 & 14 δεν παρουσίασαν κάποια αξιόλογη μεταβολή ανάμεσα στους ασθενείς, οι αναλύσεις έδωσαν $p=0,978$ και $p=0,462$ αντίστοιχα. Παρότι τα δύο αυτά μετάγραφα δεν έχουν παρουσιάσει κάποια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με τους παραπάνω δείκτες, αξίζει να σημειωθεί το γεγονός ότι οι ασθενείς με θετική MRD την 15^η μέρα είχαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης του var. 4, $p=0,064$, αποτέλεσμα με μεγάλη τάση σημαντικότητας. Ωστόσο οι ίδιοι ασθενείς δεν είχαν μειωμένα επίπεδα και του var.14 ($p=0,852$). Βάσει του Danger Score, το variant 14 της RNase κ φαίνεται να έχει αυξημένη έκφραση, με αυξημένη τάση σημαντικότητας ($p=0,079$), για τους ασθενείς υψηλού κινδύνου (high risk), κάτι που δεν παρατηρήθηκε όμως και για το 4 ($p=0,807$). Οι παραπάνω παρατηρήσεις απεικονίζονται στα διαγράμματα της Εικόνας 3.17., που ακολουθεί.



Εικόνα 3.17. Διάγραμμα έκφρασης του μεταγράφου 4 μεταξύ ασθενών με θετική/αρνητική MRD 15ης μέρας. Το p υπολογίστηκε με τη μη-παραμετρική διαδικασία “Mann-WhitneyUtest” (A) . Διάγραμμα έκφρασης του μεταγράφου 14 μεταξύ ασθενών με παιδική ΟΑΛ χαμηλού/ενδιάμεσου ρίσκου και υψηλού ρίσκου. Το p υπολογίστηκε με τη μη-παραμετρική διαδικασία “Mann-WhitneyUtest”. (B)

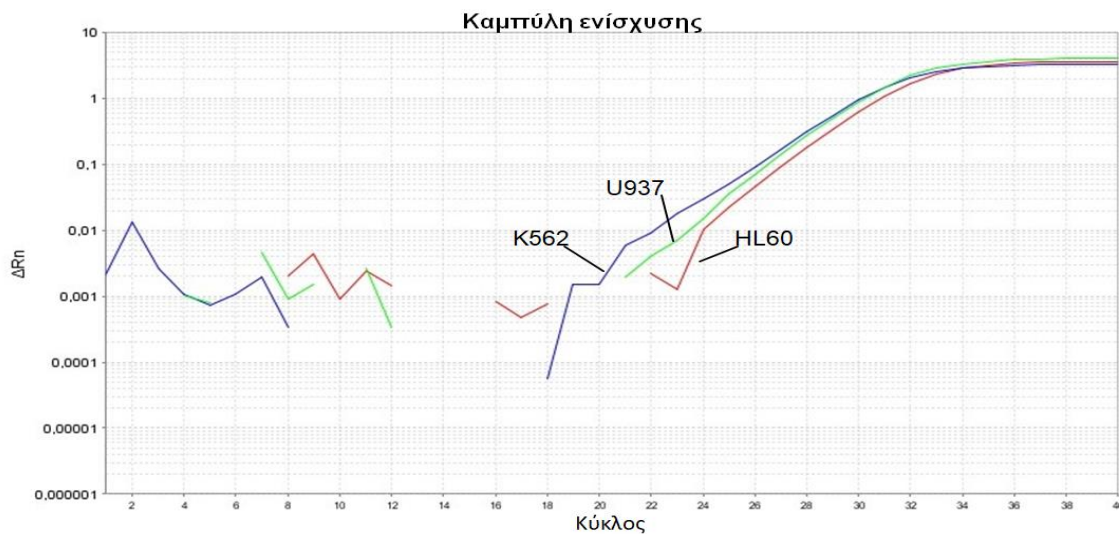
Σχετικά με την επιβίωση των ασθενών χωρίς υποτροπή, και για τα δύο μετάγραφα δεν προκύπτει κάποια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση καθώς τα γεγονότα υποτροπής είναι ίσα μοιρασμένα στους 67 ασθενείς που τα υποεκφράζουν και τα υπερεκφράζουν. Η μέση επιβίωση των ασθενών χωρίς υποτροπή, που έχουν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων 4 & 14 είναι 101 και 105 μήνες αντίστοιχα, ενώ όσοι έχουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης αυτών, επιβιώνουν χωρίς υποτροπή για 98 και 97 μήνες. Οι παραπάνω παρατηρήσεις δεν είναι στατιστικώς σημαντικές ($p=0,902$ & $p=0,533$), το ποσοστό των υποτροπών άλλωστε είναι μικρό, όπως θα ήταν αναμενόμενο, σε ένα μικρό δείγμα ασθενών.

Σε ότι αφορά την ολική επιβίωση των ασθενών με παιδική ΟΛΛ και για τα δύο μετάγραφα δεν προκύπτει κάποια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση καθώς τα γεγονότα θανάτου είναι ίσα μοιρασμένα στους 67 ασθενείς που τα υποεκφράζουν και τα υπερεκφράζουν. Η μέση ολική επιβίωση των ασθενών, που έχουν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων 4 & 14 είναι 95 και 98 μήνες αντίστοιχα, ενώ όσοι έχουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης αυτών, η ολική τους επιβίωση είναι 100 και 96 μήνες. Οι παραπάνω παρατηρήσεις δεν είναι στατιστικώς σημαντικές ($p=0,620$ & $p=0,821$), το ποσοστό των συμβάντων θανάτου άλλωστε είναι μικρό, όπως θα ήταν αναμενόμενο, σε ένα μικρό δείγμα ασθενών.

Επιπλέον, από την ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox (Cox regression analysis), πως στο ίδιο χρονικό διάστημα, οι ασθενείς που υπόεκφράζουν το μετάγραφο 4 δεν παρουσιάζουν στην ουσία πιο αυξημένο κίνδυνο υποτροπής, σε σχέση με όσους το υπερεκφράζουν, για το ίδιο χρονικό διάστημα (HR=0,928 με $p=0,922$ και διάστημα εμπιστοσύνης 95%: 0,283-3,046). Αντίστοιχα, όσον αφορά την ολική επιβίωση, οι ασθενείς που υπόεκφράζουν το μετάγραφο 4 παρουσιάζουν 1,316 φορές πιο αυξημένο κίνδυνο θανάτου σε σχέση με τους ασθενείς που το υπερεκφράζουν (HR=1,316 με $p=0,622$ και διάστημα εμπιστοσύνης 95%: 0,441-3,921). Όσον αφορά το μετάγραφο 14, οι ασθενείς που το υπερεκφράζουν παρουσιάζουν 1,490 φορές πιο αυξημένο κίνδυνο υποτροπής, σε σχέση με όσους το υπόεκφράζουν, για το ίδιο χρονικό διάστημα (HR=1,490 με $p=0,537$ και διάστημα εμπιστοσύνης 95%: 0,420-5,287). Αντίστοιχα, σχετικά με την ολική επιβίωση, οι ασθενείς που υπερεκφράζουν το μετάγραφο 14 παρουσιάζουν 1,136 φορές πιο αυξημένο κίνδυνο θανάτου σε σχέση με τους ασθενείς που το υπόεκφράζουν (HR=1,136 με $p=0,821$ και διάστημα εμπιστοσύνης 95%: 0,371-3,377).

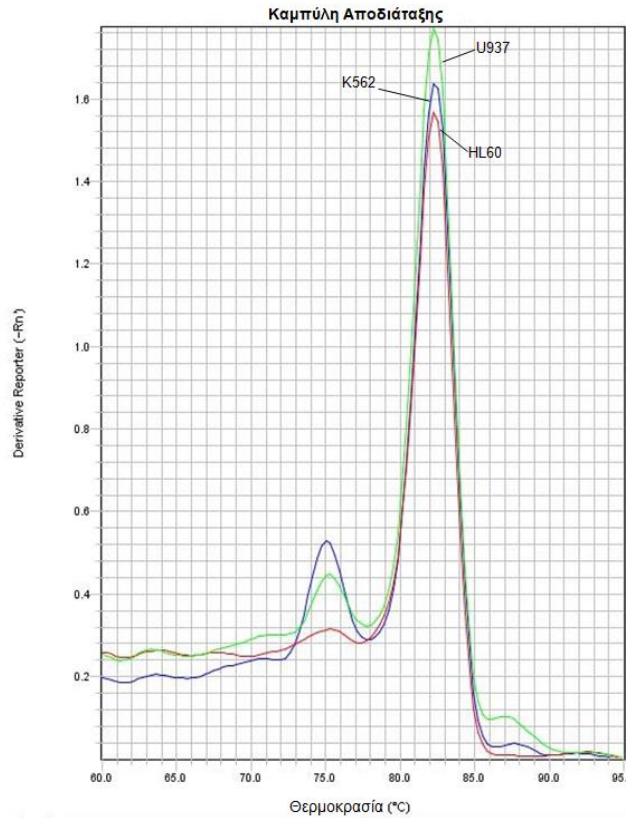
3.3. ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΥ 19 ΣΕ ΛΕΥΧΑΙΜΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ

Για την επιβεβαίωση έκφρασης του μεταγράφου 19, πραγματοποιήθηκε πρώτα αντίδραση Real-Time PCR σε δείγματα cDNA από λευχαιμικές κυτταρικές σειρές (U937, K562, HL60). Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η *HPRT-1* όπως έχει ήδη αναφερθεί στο υποκεφάλαιο 2.2.3.2. Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε η qPCR ήταν οι βέλτιστες, έτσι ώστε για το μελετούμενο μετάγραφο να υπάρχει μοναδικό προϊόν και να υπάρχουν όσο το δυνατόν λιγότερα διμερή των εκκινητών. Στην Εικόνα 3.18. παρουσιάζονται ενδεικτικά οι καμπύλες ενίσχυσης για το 19, όπως αυτό εκφράστηκε στις παραπάνω κυτταρικές σειρές, που τελικά οδήγησαν στο να συμπεριληφθεί στην μελέτη και να αξιολογηθεί σε δείγματα ασθενών. Για τον έλεγχο της ποιότητας των προϊόντων της αντίδρασης απεικονίζονται και οι καμπύλες αποδιάταξης (βλ. Εικόνα 3.19.), όπου φαίνεται η μοναδικότητα των προϊόντων και τα αντίστοιχα Tm.

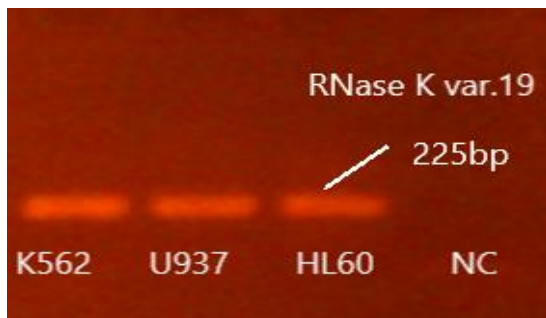


Εικόνα 3.18. Καμπύλες ενίσχυσης Real-TimePCR για το μετάγραφο 19 σε cDNA από τις κυτταρικές σειρές U937(A), K562(B), HL60(Γ)

Εικόνα 3.19. Καμπύλες αποδιάταξης Real-TimePCR για το μετάγραφο 19 σε cDNA από τις κυτταρικές σειρές U937 με $T_m=81,78$, K562 με $T_m=82,08$, HL60 με $T_m=82,23$

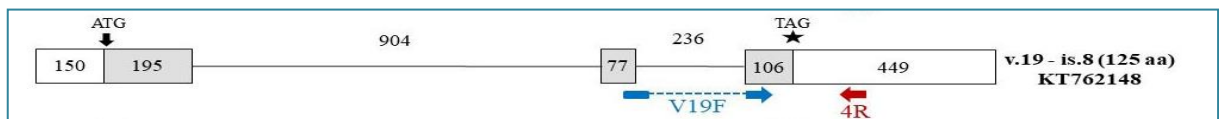


Στις παραπάνω καμπύλες αποδιάταξης παρατηρούνται και κάποιες άλλες εμφανώς μικρότερες. Για την περαιτέρω επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της Real Time PCR, τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, έτσι ώστε να ελεγχθεί το προϊόν ως προς το μέγεθος και τη μοναδικότητά του. Το μέγεθος του μεταγράφου 19 είναι 225bp και πράγματι ήταν μοναδικό. Η ηλεκτροφόρηση του οποίου μετά την qPCR παρουσιάζεται παρακάτω στην Εικόνα 3.20.



Εικόνα 3.20. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων qPCR για το μετάγραφο 19 του γονιδίου της RNase κ σε gel αγαρόζης 2% w/v, σε cDNA λευχαιμικών κυτταρικών σειρών.

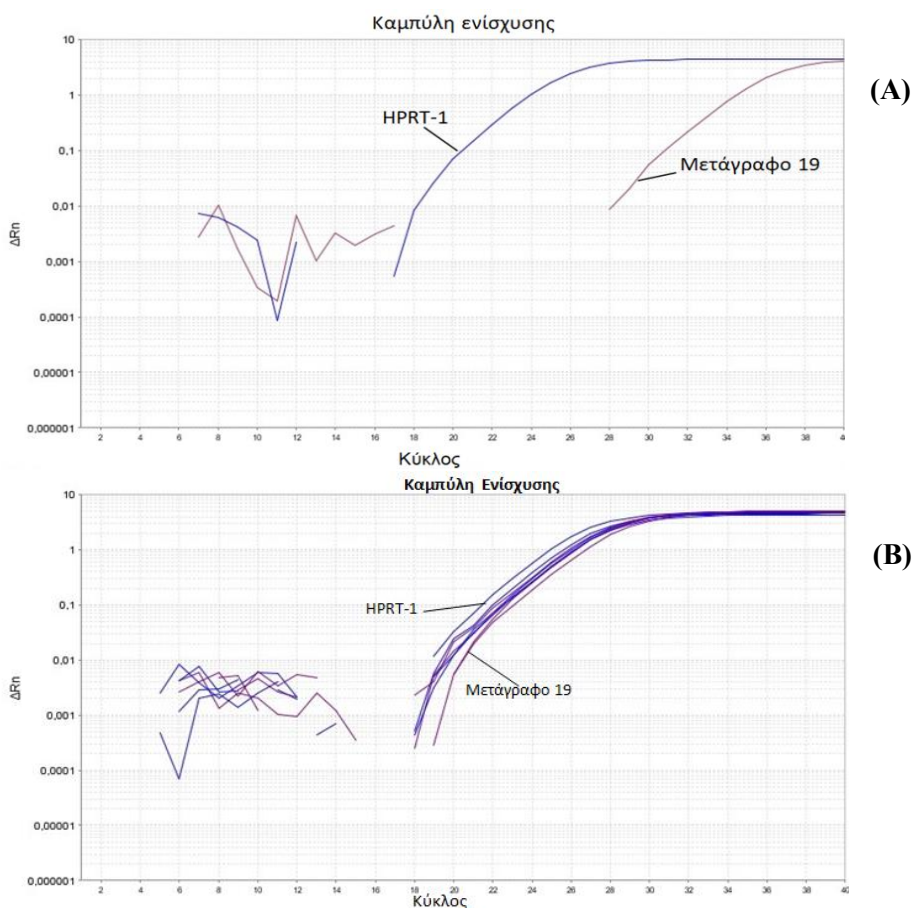
Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για το μετάγραφο 19 ήταν ο 19F με τον 4R, οι αλληλουχίες των οποίων παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.2.. Στην Εικόνα 3.21. επεικονίζεται το μετάγραφο 19 καθώς και τα σημεία στα οποία υβριδοποιούνται οι εκκινητές του.



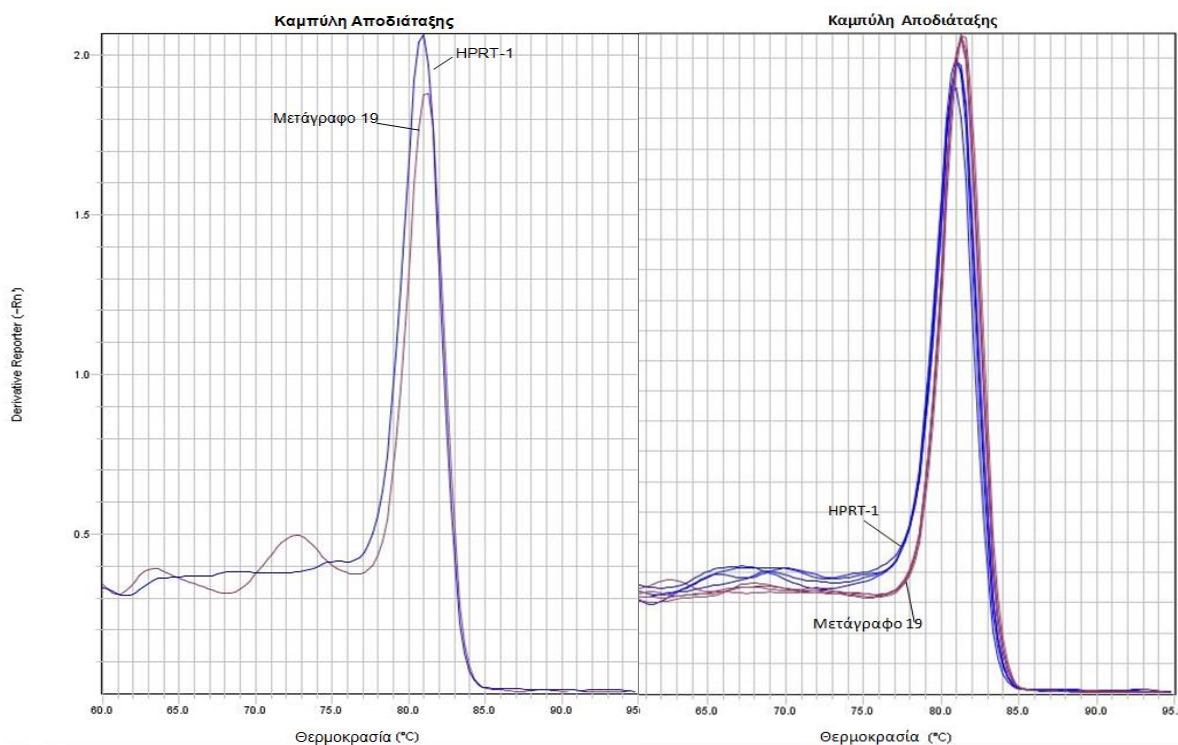
Εικόνα 3.21. Απεικόνιση του μεταγράφου 19 της RNase κ και τα σημεία υβριδοποίησης των εκκινητών το

3.4. ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΥ 19 ΣΕ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΟΛΛ

Για την ποσοτική εκτίμηση και την επιβεβαίωση έκφρασης του μεταγράφου 19, πραγματοποιήθηκε Real-Time PCR σε δείγματα cDNA 31 παιδιατρικών ασθενών με ΟΛΛ. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η *HPRT-1* όπως έχει ήδη αναφερθεί προηγουμένως. Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε η qPCR ήταν οι βέλτιστες, έτσι ώστε για το μελετούμενο μετάγραφο 19 να υπάρχει μοναδικό προϊόν και να υπάρχουν όσο το δυνατόν λιγότερα διμερή των εκκινητών. Στις Εικόνες 3.22. & 3.23. παρουσιάζονται ενδεικτικά οι καμπύλες ενίσχυσης και αποδιάταξης για το 19.



Εικόνα 3.22. Καμπύλες ενίσχυσης Real-TimePCR για το γονίδιο *HPRT-1* και το μετάγραφο 19 σε cDNA από την κυτταρική σειρά HEK293(A) και από δείγματα ασθενών (B)

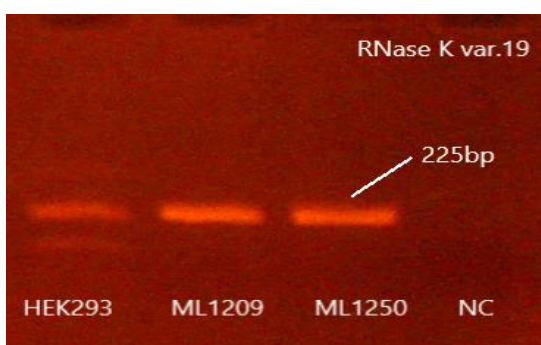


(A)

(B)

Εικόνα 3.23. Καμπύλες αποδιάταξης *Real-TimePCR* για το γονίδιο *HPRT-1* με $T_m=80,97$ και το μετάγραφο 19 με $T_m=81,12$ στη κυτταρική σειρά *HEK293* (A) και σε δείγματα ασθενών (B)

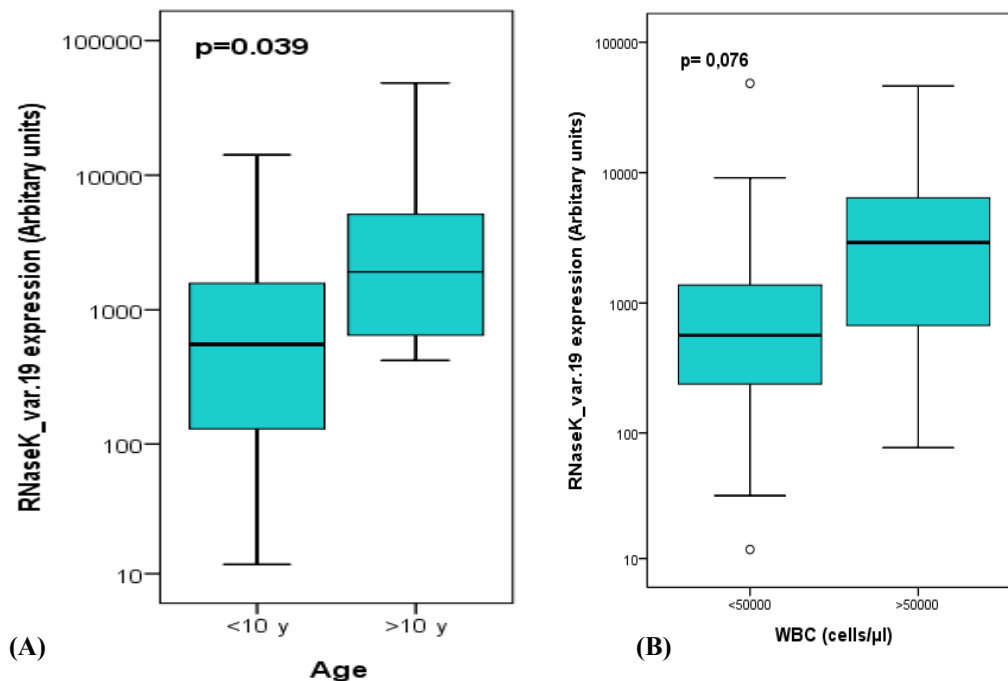
Για την επιβεβαίωση του μεγέθους και της μοναδικότητας των προϊόντων στα δείγματα των ασθενών, ακολούθησε και πάλι ηλεκτοφόρηση σε gel αγαρόζης 2%, η οποία και παρουσιάζεται στη Εικόνα 3.24.



Εικόνα 3.24. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων *qPCR* σε gel αγαρόζης 2% w/v σε *cDNA* δειγμάτων ασθενών. Τα *HEK293* αποτελούν το θετικό μάρτυρα και το *NC* το ατηνητικό.

3.4.1 Μελέτη έκφρασης του μεταγράφου 19 του γονιδίου της ριβονουκλεάσης κ ως προς τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών

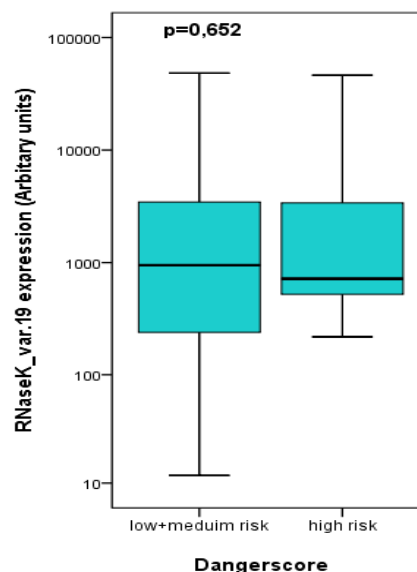
Σχετικά με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, η έκφραση του μεταγράφου 19 εξετάστηκε ως προς την ηλικία των ασθενών και ως προς τον αριθμό των λευκοκυττάρων την ημέρα της διάγνωσης. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.25., οι ασθενείς ηλικίας άνω των 10 ετών εμφάνισαν αυξημένη έκφραση του μεταγράφου 19, αποτέλεσμα στατιστικά σημαντικό ($p=0,039$), ενώ όσοι ασθενείς παρουσίασαν την ημέρα διάγνωσής τους πάνω από 50000 λευκά αιμοσφαίρια, εμφάνισαν επίσης αυξημένα επίπεδα του μεταγράφου 19, αποτέλεσμα με μεγάλη τάση σημαντικότητας ($p=0,076$).



Εικόνα 3.25. Διάγραμμα έκφρασης του μεταγράφου 19 μεταξύ ασθενών με παιδική ΟΛΛ ηλικίας <10 ετών/ >10 ετών. Το p υπολογίστηκε με τη μη-παραμετρική διαδικασία “Mann-WhitneyUtest. (A). Διάγραμμα έκφρασης του μεταγράφου 19 μεταξύ ασθενών με παιδική ΟΛΛ με WBC την ημέρα διάγνωσης >50000 κτ./μL και <50000 κτ./μL. Το p υπολογίστηκε με τη μη-παραμετρική διαδικασία “Mann-WhitneyUtest. (B)

Βάσει του Danger Score, το μετάγραφο 19 φαίνεται να έχει αυξημένη έκφραση (βλ. Εικόνα 3.26.), ωστόσο μη στατιστικώς σημαντική ($p=0,652$), για τους ασθενείς υψηλού κινδύνου (high risk).

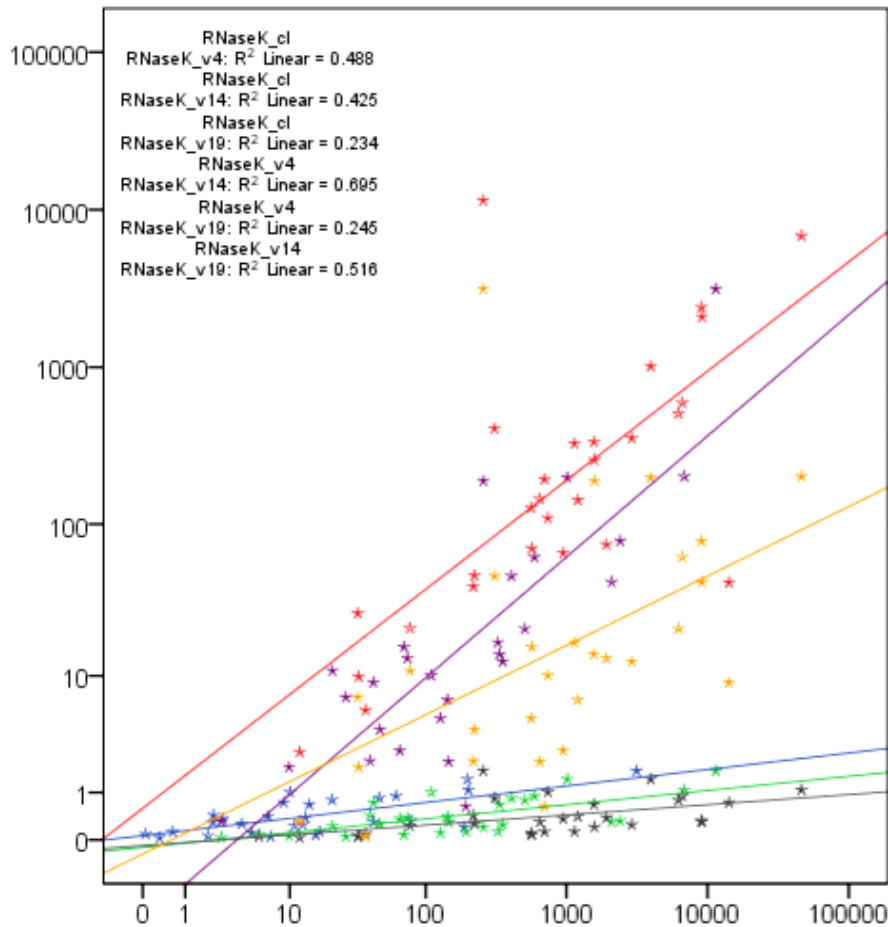
Εικόνα 3.26. Διάγραμμα έκφρασης του μεταγράφου 19 μεταξύ ασθενών με παιδική ΟΛΛ χαμηλού/ενδιάμεσου ρίσκου και υψηλού ρίσκου. Το p υπολογίστηκε με τη μη-παραμετρική διαδικασία “Mann-WhitneyUtest”.



Όσον αφορά την ολική επιβίωση και την επιβίωση χωρίς υποτροπή των 31 ασθενών, που μελετήθηκαν, δεν προέκυψαν στατιστικώς σημαντικές παρατηρήσεις. Δεν κατασκευάστηκαν καμπύλες Kaplan-Meier καθώς το ποσοστό των συμβάντων υποτροπής και θανάτου ήταν πολύ μικρό (4 γεγονότα υποτροπής και 4 γεγονότα θανάτου), όπως θα ήταν αναμενόμενο, σε ένα μικρό δείγμα ασθενών.

3.5 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΛΑΣΙΚΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΥ, ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΥ 4, ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΥ 14 ΚΑΙ ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΥ 19 ΣΤΗ ΠΑΙΔΙΚΗ ΟΛΛ

Αφού έγινε ανάλυση συσχέτισης της ποσοτικής έκφρασης κάθε μεταγράφου ξεχωριστά με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών, αξίζει να σημειωθεί η μελέτη συσχέτισής τους σε επίπεδο έκφρασης, για το σύνολο των ασθενών. Η συσχέτιση της έκφρασης των 4 μεταγράφων, σε ασθενείς με παιδική ΟΛΛ, έγινε με ανάλυση κατά Spearman. Η ανάλυση αυτή (βλ. Εικόνα 3.27), για συνεχείς μεταβλητές, δείχνει μια θετική συσχέτιση των μεταγράφων, όπου καλύτερη συσχέτιση παρουσιάζει το μετάγραφο 19 με τα μετάγραφα 4 και 14 με συντελεστή συσχέτισης $RS=0,245$ με $p<0,001$ και $RS=0,516$ με $p<0,001$ αντίστοιχα. Ενώ και τα δύο τελευταία μεταξύ τους παρουσιάζουν καλή συσχέτιση με συντελεστή συσχέτισης $RS=0,695$ με $p<0,001$.

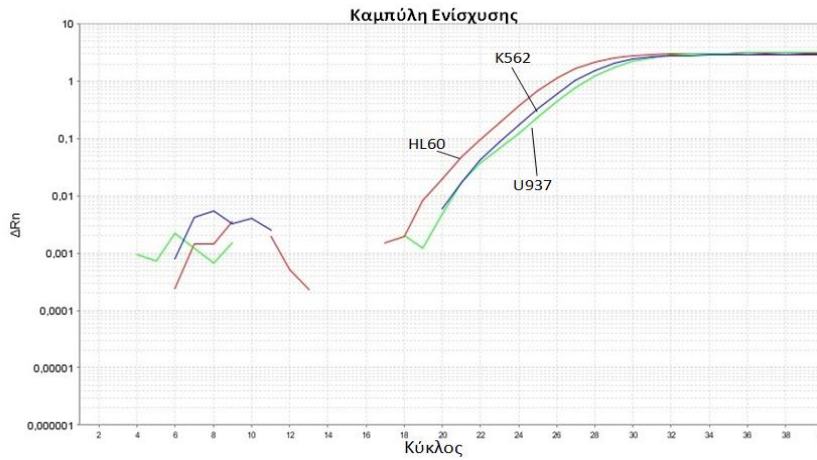


Εικόνα 3.27. Συσχέτιση έκφρασης των τεσσάρων μεταγράφων του γονιδίου της ριβονουκλεάσης κ κατά Spearman.

3.6 ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΥ 9 ΣΕ ΛΕΥΧΑΙΜΙΚΕΣ ΚΥΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΚΑΙ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΟΛΛ

Για την ποσοτική εκτίμηση και την επιβεβαίωση έκφρασης του μεταγράφου 9, πραγματοποιήθηκε Real-Time PCR σε δείγματα cDNA από λευχαιμικές κυτταρικές σειρές (U937, K562, HL60). Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε και πάλι η *HPRT-1* Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε η qPCR ήταν οι βέλτιστες, έτσι ώστε για το μελετούμενο μετάγραφο 9 να υπάρχει μοναδικό προϊόν και να υπάρχουν όσο το δυνατόν λιγότερα διμερή των εκκινητών. Στην Εικόνα 3.28. παρουσιάζονται ενδεικτικά οι καμπύλες ενίσχυσης για το 9 στις παραπάνω κυτταρικές σειρές. Για τον έλεγχο της

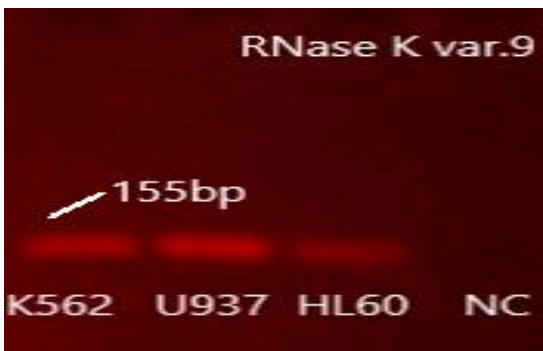
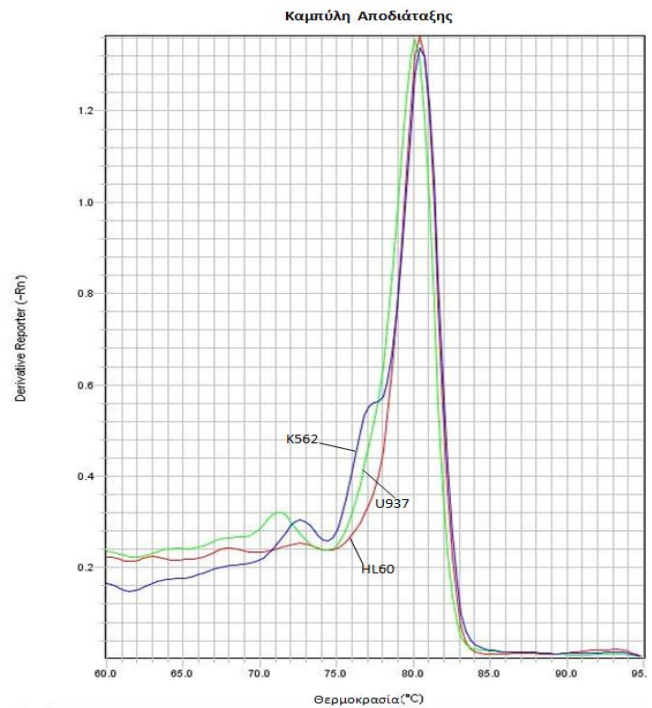
ποιότητας των προϊόντων της αντίδρασης απεικονίζονται και οι καμπύλες αποδιάταξης (βλ. Εικόνα 3.29.), όπου φαίνεται η μοναδικότητα των προϊόντων και τα αντίστοιχα T_m .



Εικόνα 3.28. Καμπύλες ενίσχυσης *Real-TimePCR* για το μετάγραφο 9 σε cDNA από τις κυτταρικές σειρές U937, K562, HL60

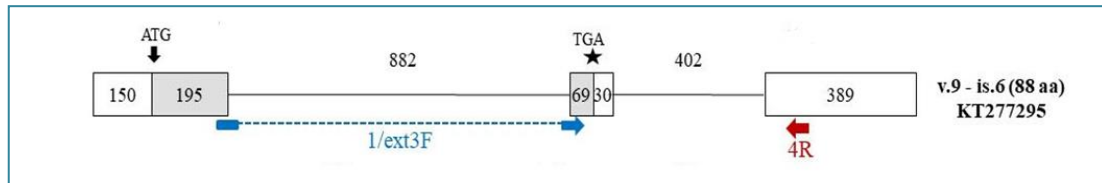
Εικόνα 3.29. Καμπύλες αποδιάταξης *Real-TimePCR* για το μετάγραφο 9 σε cDNA από τις κυτταρικές σειρές U937(A) με $T_m=80,58$, K562(B) με $T_m=80,13$, HL60(Γ) με $T_m=80,43$

Τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν για να επιβεβαιωθεί η μοναδικότητα και το μέγεθος του προϊόντος. Στην Εικόνα 3.30 φαίνεται η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων για το μετάγραφο 9. Τα προϊόντα έχουν μέγεθος 155bp και είναι μοναδικά.



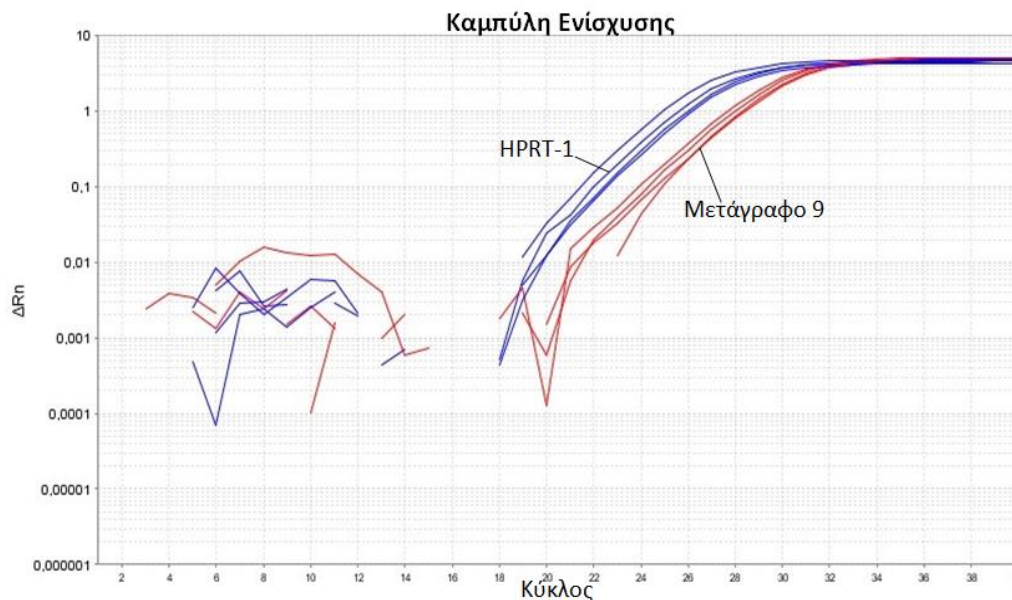
Εικόνα 3.30. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων qPCR για το μετάγραφο 9 του γονιδίου της RNase κ σε gel αγαρόζης 2% w/v, σε cDNA λευχαιμικών κυτταρικών σειρών.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για το μετάγραφο 9 ήταν ο 1/ext3F με τον 4R, οι αλληλουχίες των οποίων παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.2.. Στην εικόνα 3.31. απεικονίζεται σχηματικά το μετάγραφο 9 καθώς και τα σημεία όπου υβριδοποιούνται οι εκκινητές του.

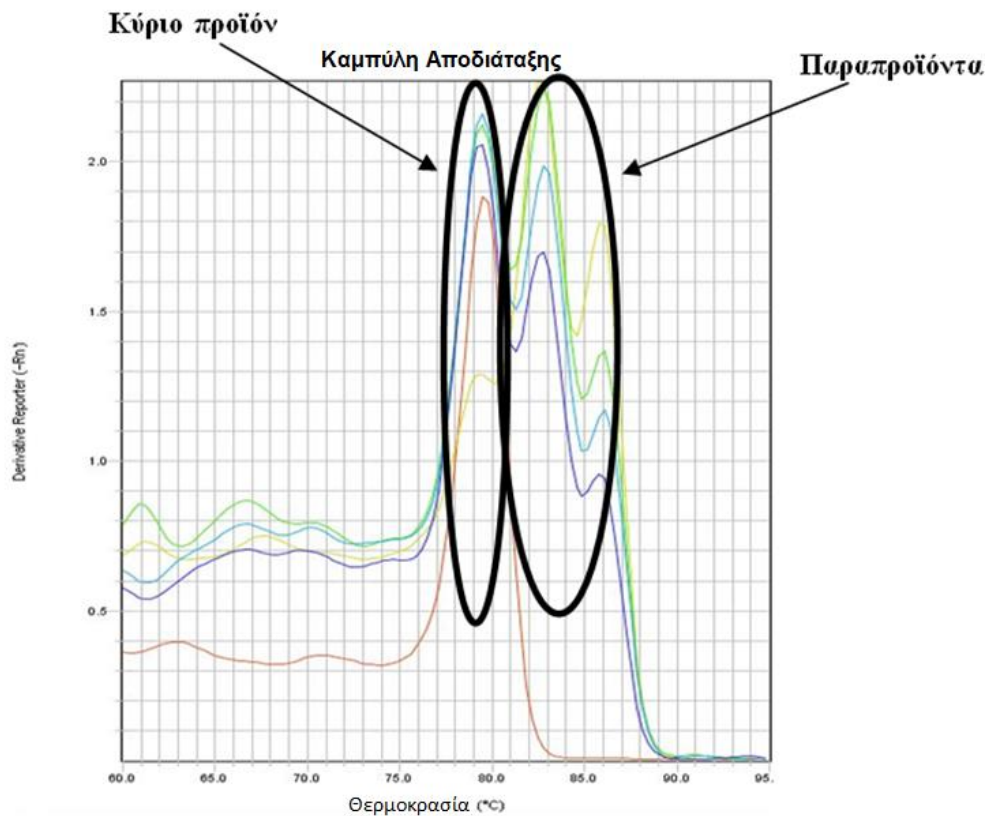


Εικόνα 3.31. Απεικόνιση του μεταγράφου 9 της RNase K και τα σημεία υβριδοποίησης των εκκινητών του.

Παρά το γεγονός ότι η μεθοδολογία ενίσχυση του μεταγράφου 9 σε κυτταρικές σειρές φαίνεται να λειτουργεί ικανοποιητικά, η εφαρμογή της σε δείγματα ασθενών με ΟΛΛ δεν έδωσε μοναδικά προϊόντα. Παρακάτω, στην Εικόνα 3.32 παρουσιάζονται ενδεικτικά οι καμπύλες ενίσχυσης για το 9 όπως αυτές σχηματίστηκαν κατά την έκφρασή του σε δείγματα ασθενών με ΟΛΛ, ενώ στην Εικόνα 3.33. φαίνονται οι πολλαπλές καμπύλες αποδιάταξης, που υποδεικνύουν την ύπαρξη παραπροϊόντων.

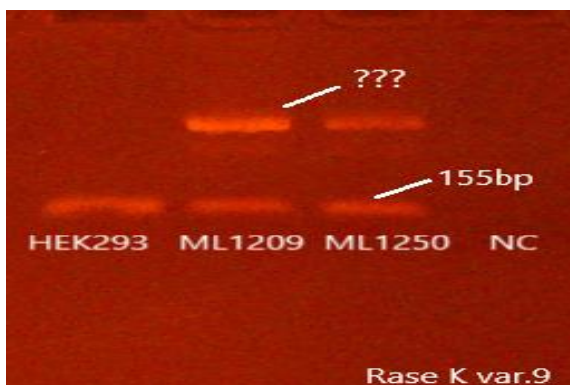


Εικόνα 3.32. Καμπύλες ενίσχυσης Real-TimePCR για το γονίδιο της HPRT-1 και το μετάγραφο 9 σε cDNA της κυτταρικής σειράς HEK293 και σε δείγματα ασθενών με ΟΛΛ.



Εικόνα 3.33. Καμπύλες αποδιάταξης *Real-TimePCR* για το μεταγράφο 9 με $Tm=79,62$ σε *cDNA* από τη κυτταρική σειρά *HEK293* και ενδεικτικά μερικά από τα δείγματα των ασθενών που μελετήθηκαν.

Τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε gel αгарόζης 2% όπου και παρατηρήθηκε ένα ακόμα προϊόν σε ύψος μεγαλύτερο από εκείνο του μεταγράφου 9 (βλ. Εικόνα 3.34.).



Εικόνα 3.34. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων *qPCR* σε gel αгарόζης 2% w/v σε *cDNA* δειγμάτων ασθενών. Τα *HEK293* αποτελούν το θετικό μάρτυρα και το *NC* το αρνητικό.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ΟΛΛ) είναι η πιο συνηθισμένη παιδική κακοήθεια και αντιπροσωπεύει το 25% όλων των καρκίνων παιδικής ηλικίας. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, περίπου 3000 παιδιά διαγιγνώσκονται με ΟΛΛ ετησίως. Τα τελευταία 50 χρόνια έχουν σημειωθεί σπουδαία βήματα στη διαχείριση της παιδικής ΟΛΛ, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα τη βελτίωση των ποσοστών θεραπείας από περίπου 10% έως και 90% . Η ορθολογική χρήση της χημειοθεραπείας και η θεραπεία συντήρησης με διάρκεια (2-3 χρόνια), η προστασία του ΚΝΣ καθώς και η υποστήριξη που παρέχουν τα αντιβιοτικά και τα προϊόντα αίματος ήταν υπεύθυνες για την βελτίωση των ποσοστών θεραπείας.

Ταυτόχρονα οι πληροφορίες για την ετερογενή βιολογία της ΟΛΛ και η παρακολούθηση της ελάχιστης υπολειμματικής νόσου (MRD) έχουν βοηθήσει στην τελειοποίηση της θεραπείας με βάση τον κίνδυνο υποτροπής. Στόχος είναι να μεγιστοποιηθούν τα ποσοστά θεραπείας και να ελαχιστοποιηθούν οι τοξικότητες. Για παράδειγμα, η ταυτοποίηση του χρωμοσώματος της Φιλαδέλφειας σε ένα υποσύνολο ασθενών με ΟΛΛ έχει καταστήσει δυνατή την ενσωμάτωση αναστολέων κινάσης τυροσίνης ABL σε θεραπευτικά σχήματα χημειοθεραπείας. Αυτή η προσέγγιση θεραπείας βελτίωσε τα ποσοστά επιβίωσης ασθενών με ΟΛΛ που είναι θετικοί στο χρωμόσωμα Philadelphia από 35% έως περίπου 70% τα τελευταία 10 χρόνια.

Επιπλέον, επειδή η πλειονότητα των παιδιών με ΟΛΛ αντιμετωπίζονται ομοιόμορφα σε μεγάλες κλινικές δοκιμές, υπάρχουν διαθέσιμες καλά σχολιασμένες κλινικές πληροφορίες για συσχέτιση με τα βιολογικά ευρήματα. Οι εκτεταμένες συνεργατικές προσπάθειες μεταξύ διαφόρων μελετών σε διεθνές επίπεδο διαδραμάτισαν ζωτικό ρόλο στην αξιοσημείωτη πρόοδο που σημειώθηκε όχι μόνο στη βελτίωση των θεραπευτικών αποτελεσμάτων, αλλά και στην αποκρυπτογράφηση της πολύπλοκης βιολογίας της παιδικής ΟΛΛ.

Ωστόσο η ΟΛΛ είναι μία νόσος με πολύπλοκη βιολογία και παθοφυσιολογία και λόγω μεγάλης συχνότητας στις παιδικές ηλικίες (2 και 5 ετών) είναι αναγκαία η αποσαφήνιση καινούργιων δεικτών προγνωστικής αξίας. Η μεγάλη ετερογένεια της νόσου, που ξεκινά ακόμα από τον ίδιο το τύπο της νόσου (ανωμαλίες στην ωρίμανση των Β λεμφοκυττάρων στο μυελό των οστών ή των Τ λεμφοκυττάρων στο θύμο), η μεγάλη συχνότητα εμφάνισης, οι παρενέργειες της τοξικότητας των φαρμάκων σε αρκετούς ασθενείς και ο κίνδυνος

υποτροπής και επανεμφάνισης είναι μερικοί από τους λόγους, για τους οποίους απαιτούνται εξειδικευμένοι προγνωστικοί δείκτες. Αξίζει να σημειωθεί ότι το ποσοστό των υποτροπών σε παιδιατρικούς ασθενείς με ΟΛΛ αγγίζει το 15-20% και το προσδόκιμο ζωής τους είναι μόλις μερικοί μήνες, το γεγονός αυτό αποδεικνύει την ανάγκη για εξέλιξη της εξατομικευμένης ιατρικής ώστε να μπορούν να διαχειριστούν και οι ασθενείς που υποτροπιάζουν.

Πολλοί δείκτες χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση και τη διαφοροδιάγνωση της ΟΛΛ, που βασίζονται στη μορφολογία των κυττάρων, τον καρυότυπο και άλλες μοριακές διαταραχές και μεταλλάξεις. Πολλοί από αυτούς αποτελούν δυσμενείς προγνωστικούς παράγοντες για την εξέλιξη της νόσου, ενώ άλλοι είναι ευνοϊκότεροι. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ηλικία, όπου παιδιά 1 έως 6 ετών έχουν καλύτερη πρόγνωση, παιδιά 6 έως 10 ετών μέτρια πρόγνωση ενώ ασθενείς ηλικίας >10 ετών ή νεογνά έχουν πολύ κακή πρόγνωση. Επίσης, οι ασθενείς με Β-ΟΛΛ (CALLA+) έχουν επίσης καλύτερη πρόγνωση σε σχέση με ασθενείς με Β-ΟΛΛ (CALLA-) ή Τ-ΟΛΛ. Όσον αφορά τον καρυότυπο, το χρωμόσωμα Φιλαδέλφεια και ο υποδιπλοειδισμός αποτελούν δυσμενείς δείκτες, ενώ η μετατόπιση t(12;21) και η υπερδιπλοειδία είναι ευνοϊκοί. Επιπλέον, ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων κατά τη διάγνωση (>50000 κυτ./μL) και ο αριθμός των βλαστών την 8^η μέρα (>1000 βλαστ./μL) αποτελούν δείκτες κακής πρόγνωσης. Τέλος, ιδιαίτερη σημασία έχει η κατάσταση του μυελού τη 15^η ημέρα, όπου η κατάσταση M1 είναι καλός δείκτης, η M2 μέτριος και η M3 δυσμενής. Οι παραπάνω δείκτες έχουν συμβάλει στην διαμόρφωση και εφαρμογή των κατάλληλων θεραπευτικών προσεγγίσεων. Πιο συγκεκριμένα, ασθενείς που παρουσιάζουν δυσμενείς προγνωστικούς δείκτες απαιτούν πιο ισχυρή και εντατική χημειοθεραπεία, ενώ όσοι εκφράζουν καλύτερους προγνωστικούς δείκτες μπορούν να ακολουθήσουν ηπιότερες θεραπευτικές προσεγγίσεις και να γλιτώσουν κα τις όποιες παρενέργειες και τοξικότητες.

Οι ριβονουκλεάσες αποτελούν μόρια, τα οποία αποικοδομούν τα RNAs σε μικρότερα τμήματα μέσω υδρόλυσης, διασπώντας τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς μεταξύ των βάσεων του εκάστοτε RNA μορίου. Οι RNases ανήκουν στην κατηγορία των νουκλεασών και εξυπηρετούν πολλές κυτταρικές λειτουργίες, αλλά η ρύθμισή τους παραμένει άγνωστη σε μεγάλο βαθμό. Έχει δειχθεί ότι επηρεάζουν την έκφραση mRNAs ογκογονιδίων και παραγόντων νέκρωσης όγκων και εμπλέκονται στην έκφραση miRNAs τα οποία και ρυθμίζουν την κυκλοφορία πολλών mRNAs. Έτσι, οι ριβονουκλεάσες έχουν διττό ρόλο

στην καρκινογένεση, καθώς μπορούν να δράσουν ευνοϊκά διασπώντας mRNAs ογκογονιδίων ή να τη προκαλέσουν διασπώντας ογκοκατασταλτικά mRNAs. Σχετικά τώρα με τη ριβονουκλεάση κ, που τα τελευταία χρόνια αποτελεί αντικείμενο μελέτης του εργαστηρίου μας, παρουσιάζει δράση ενδοριβονουκλεάσης διασπώντας ειδικά μονόκλωνες αλυσίδες σε θέσεις με ApU και ApG φωσφοδιεστερικούς δεσμούς, ενώ υδρολύει και σε χαμηλότερο βαθμό UrU δεσμούς.

Στις πρόσφατες διπλωματικές εργασίες των Πετροπούλου Χριστίνας και Μειντάνη Αγγελικής, βρέθηκαν και επιβεβαιώθηκαν νέα εναλλακτικά μετάγραφα του γονιδίου της ριβονουκλεάσης κ, που φαίνεται να παρουσιάζουν διαφορετική έκφραση αναλόγως τη μελετούμενη κυτταρική σειρά και έγινε προσπάθεια ανίχνευσης συσχέτισης της έκφρασης των εναλλακτικών μεταγράφων της ριβονουκλεάσης κ με την ΟΛΛ. Έχοντας ως δεδομένο ότι οι ριβονουκλεάσες εμπλέκονται σε περιπτώσεις καρκινογένεσης και διαθέσιμα κάποια αποτελέσματα τα οποία απαιτούσαν μεγαλύτερο αριθμό ασθενών για ασφαλέστερα συμπεράσματα, συνεχίσαμε τη μελέτη προσθέτοντας καινούργια δείγματα ασθενών αλλά και συμπεριλαμβάνοντας δύο ακόμα εναλλακτικά μετάγραφα της ριβονουκλεάσης κ.

Ο στόχος της μελέτης είναι να διαπιστωθεί το κατά πόσο αυτά τα μετάγραφα παρουσιάζουν τροποποιημένη έκφραση σε σχέση με τα διάφορα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών και σε περιπτώσεις υποτροπής. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν: το κλασικό μεταγραφο ή αλλιώς 1, τα μετάγραφα 4, 9, 14 και 19 του γονιδίου της RNase κ, σε παιδιατρικούς ασθενείς με ΟΛΛ. Επιπλέον, η έκφραση των τεσσάρων από τα πέντε μεταγράφων συσχέτισθηκε και με την ολική επιβίωση των ασθενών. Το μετάγραφο 9 αποκλείστηκε από τη μελέτη λόγω μη ικανοποιητικής έκφρασης, που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Για την υλοποίηση των παραπάνω, συλλέχθηκε ολικό αίμα από 79 ασθενείς με παιδική ΟΛΛ, 60 ασθενείς από τη προηγούμενη διπλωματική εργασία και 19 νέοι. Πραγματοποιήθηκε απομόνωση ολικού RNA από μυελό των οστών των δειγμάτων, υπολογίσθηκε η συγκέντρωσή του και η καθαρότητά του και συντέθηκε cDNA με RT-PCR αντίδραση για κάθε δείγμα. Αντίστοιχα, η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τα κύτταρα HEK293 (θετικός μάρτυρας), από το RNA των οποίων συντέθηκε cDNA που χρησιμοποιήθηκε και ως κοινό pool για όλες τις αντιδράσεις Real-Time. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε πρωτόκολλο Real-TimePCR αντίδρασης για την ποσοτική ανάλυση

της έκφρασης του κλασικού μεταγράφου και των μεταγράφων 4, 9, 14 και 19 στα δείγματα cDNA που είχαν παρασκευαστεί. Τα προϊόντα της qPCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης για τον έλεγχο τους, ενώ τα στοιχεία της έκφρασης των μεταγράφων χρησιμοποιήθηκαν για βιοστατιστική ανάλυση με το λογισμικό SPSS (αξιολογήσιμα ήταν τα δεδομένα για 67 ασθενείς).

Πρώτα από όλα έγινε σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των μεταγράφων: κλασικό, 4 και 14 ανάμεσα σε ασθενείς και υγιείς και ανάμεσα στην ημέρα διάγνωσης και την 33^η μέρα θεραπείας. Τα αποτελέσματα για τους 67 ασθενείς και τους 36 υγιείς έδωσαν στατιστικώς σημαντική υποέκφραση ($p < 0,001$) των μεταγράφων στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς. Ωστόσο, δεν λήφθησαν ανάλογα αποτελέσματα για την ημέρα διάγνωσης και την 33^η μέρα θεραπείας, καθώς δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά στα επίπεδα των 3 μεταγράφων.

Για το κλασικό μετάγραφο της ριβονουκλεάσης κ, μελετήθηκαν και αξιολογήθηκαν 67 ασθενείς, από τους οποίους οι 54 έπασχαν από Β-ΟΛΛ και οι 13 από Τ-ΟΛΛ. Όσον αφορά λοιπόν την έκφραση του κλασικού μεταγράφου, στους ασθενείς με Τ-ΟΛΛ φαίνεται να είναι αυξημένη, χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντική η διαφορά, $p = 0,366$. Στη συνέχεια έγινε μελέτη του καρυοτύπου των ασθενών, μελετώντας την ύπαρξη της μετατόπισης t(12;21) και την υπερδιπλοειδία (>46 χρωμοσώματα). Στη πρώτη περίπτωση τα αποτελέσματα δεν είχαν κάποια στατιστική σημαντικότητα $p = 0,437$. Στην περίπτωση της υπερδιπλοειδίας όμως, οι ασθενείς με υπερδιπλοειδία εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα έκφρασης με $p = 0,048$ (στατιστικά σημαντικό). Επιπλέον, όσοι ασθενείς παρουσίασαν την ημέρα διάγνωσής τους αριθμό λευκών κυττάρων (WBC) μεγαλύτερο των 50000, εμφάνισαν και αυξημένα επίπεδα του κλασικού μεταγράφου ($p = 0,032$, στατιστικά σημαντικό). Όσον αφορά την prednisone response την 8^η μέρα, όπου μετριέται ο αριθμός των βλαστών, για τους ασθενείς με >1000 βλάστες/μL τα αποτελέσματα δεν παρουσίασαν κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση. Αντίθετα, για τη 15^η μέρα, όπου η κατάσταση του μυελού χωρίζεται σε M1 και M2-M3, τα επίπεδα έκφρασης του κλασικού μεταγράφου ήταν αυξημένα στους ασθενείς M2-M3, $p = 0,179$. Επίσης, οι ασθενείς με θετική MRD την 15^η μέρα είχαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του κλασικού μεταγράφου, $p = 0,185$. Βάσει του Danger Score, το variant 1 της RNase κ φαίνεται να έχει αυξημένη έκφραση, μη στατιστικώς σημαντική ($p = 0,191$), για τους ασθενείς υψηλού κινδύνου (high risk). Όσον αφορά την επιβίωση των ασθενών χωρίς υποτροπή, δεν φαίνεται κάποια

διαφορά ανάμεσα σε αυτούς που υπερεκφράζουν το κλασσικό μετάγραφο σε σχέση με αυτούς που το υπόεκφράζουν. Πιο συγκεκριμένα, από τους 66 ασθενείς, οι 29 υποεκφράζουν το κλασσικό μετάγραφο, με 5 γεγονότα υποτροπής, ενώ οι 37 το υπερεκφράζουν με 6 γεγονότα υποτροπής. Η μέση επιβίωση των ασθενών χωρίς υποτροπή, που έχουν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του κλασσικού μεταγράφου είναι 100 μήνες, ενώ όσοι έχουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του μεταγράφου αυτού, επιβιώνουν χωρίς υποτροπή για 98 μήνες. Η παραπάνω παρατήρηση δεν είναι στατιστικώς σημαντική ($p=0,841$), καθώς υπάρχει μικρό ποσοστό υποτροπών, το οποίο είναι και ισομοιρασμένο ανάμεσα στις δύο κατηγορίες των ασθενών. Όσον αφορά την ολική επιβίωση των ασθενών με παιδική ΟΛΛ, όσοι υπερεκφράζουν το κλασσικό μετάγραφο φαίνεται να έχουν χειρότερη επιβίωση και μεγαλύτερο κίνδυνο θανάτου, με $p=0,283$. Συγκεκριμένα, από τους 66 ασθενείς, οι 29 που υποεκφράζουν το κλασσικό μετάγραφο παρουσίασαν 4 θανάτους, ενώ οι 37 που το υπερεκφράζουν παρουσίασαν 8 γεγονότα θανάτου. Η μέση ολική επιβίωση των ασθενών με χαμηλότερα επίπεδα του κλασσικού μεταγράφου ανέρχεται στους 105 μήνες, ενώ των ασθενών με υψηλότερα επίπεδα έκφρασής του, στους 94 μήνες. Επιπλέον, από την ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox (Cox regression analysis) προκύπτει, πως στο ίδιο χρονικό διάστημα, οι ασθενείς που υπερεκφράζουν το κλασσικό μετάγραφο παρουσιάζουν 1,129 φορές πιο αυξημένο κίνδυνο υποτροπής, σε σχέση με όσους το υπόεκφράζουν, για το ίδιο χρονικό διάστημα (HR=1,129 με $p=0,842$ και διάστημα εμπιστοσύνης 95%: 0,343-3,709). Αντίστοιχα, όσον αφορά την ολική επιβίωση, οι ασθενείς που υπερεκφράζουν το μετάγραφο 1 παρουσιάζουν 1,908 φορές πιο αυξημένο κίνδυνο θανάτου σε σχέση με τους ασθενείς που το υπόεκφράζουν (HR=1,908 με $p=0,293$ και διάστημα εμπιστοσύνης 95%: 0,573-6,357).

Για τα μετάγραφα 4 & 14 της ριβονουκλεάσης κ, μελετήθηκαν και αξιολογήθηκαν 67 ασθενείς, από τους οποίους οι 54 έπασχαν από Β-ΟΛΛ και οι 13 από Τ-ΟΛΛ. Όσον αφορά λοιπόν την μελέτη έκφρασής τους σε σχέση με τον ανοσοφαινότυπο, δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά. Για το μετάγραφο 4 η στατιστική δοκιμασία έδωσε $p=0,569$ και για το 14 έδωσε $p=0,274$, (μη στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα). Επιπλέον, σχετικά με τον αριθμό λευκών κυττάρων (WBC) την ημέρα τα διάγνωσης, δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά, ανάμεσα στους ασθενείς με αριθμό λευκών >50000 και τους ασθενείς με <50000 λευκά αιμοσφαίρια. Η ανάλυση για το 4 & το 14 έδωσε $p=0,588$ & $p=0,308$ αντίστοιχα, (μη στατιστικά

σημαντικό). Η μελέτη συσχέτισης των μεταγράφων με τη μετατόπιση $t(12;21)$, για το var.4 η ανάλυση έδωσε $p=0,802$ και για το var.14 έδωσε $p=0,714$ (μη στατιστικώς σημαντικά). Στην περίπτωση της υπερδιπλοειδίας, η ανάλυση για τους ασθενείς με υπερδιπλοειδία για το var.4 έδωσε $p=0,577$ και για το var.14, $p=0,274$ (μη στατιστικώς σημαντικά).

Σε ότι αφορά τον αριθμό των βλαστών την 8^η μέρα θεραπείας, οι ασθενείς με >1000 βλάστες/ μL δεν παρουσίασαν κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση ούτε με το μετάγραφο 4 ($p=0,634$) ούτε και με το 14 ($p=0,623$). Ανάλογα αποτελέσματα λήφθηκαν και για τη 15^η μέρα, όπου η κατάσταση του μυελού που χωρίζεται σε M1 και M2-M3, τα επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων 4 & 14 δεν παρουσίασαν κάποια αξιόλογη μεταβολή ανάμεσα στους ασθενείς, οι αναλύσεις έδωσαν $p=0,978$ και $p=0,462$ αντίστοιχα.

Παρότι τα δύο αυτά μετάγραφα δεν έχουν παρουσιάσει κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τους παραπάνω δείκτες, αξίζει να σημειωθεί το γεγονός ότι οι ασθενείς με θετική MRD την 15^η μέρα είχαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του var. 4, $p=0,064$, αποτέλεσμα μεγάλης τάσης σημαντικότητας. Ωστόσο οι ίδιοι ασθενείς δεν είχαν αυξημένα επίπεδα και του var.14 ($p=0,852$). Βάσει του Danger Score, το variant 14 της RNase κ φαίνεται να έχει αυξημένη έκφραση, με αυξημένη τάση σημαντικότητας ($p=0,079$), για τους ασθενείς υψηλού κινδύνου (high risk), κάτι που δεν παρατηρήθηκε όμως και για το 4 ($p=0,807$).

Όσον αφορά την επιβίωση των ασθενών χωρίς υποτροπή αλλά και την ολική επιβίωση, και για τα δύο μετάγραφα δεν προκύπτει κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση καθώς τα γεγονότα υποτροπής και θανάτου είναι ίσα μοιρασμένα στους 67 ασθενείς που τα υποεκφράζουν και τα υπερκφράζουν. Η μέση επιβίωση των ασθενών χωρίς υποτροπή, που έχουν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων 4 & 14 είναι 101 και 105 μήνες αντίστοιχα, ενώ όσοι έχουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης αυτών, επιβιώνουν χωρίς υποτροπή για 98 και 97 μήνες. Οι παραπάνω παρατηρήσεις δεν είναι στατιστικώς σημαντικές ($p=0,902$ & $p=0,533$), το ποσοστό των υποτροπών άλλωστε είναι μικρό, όπως θα ήταν αναμενόμενο, σε ένα μικρό δείγμα ασθενών. Η μέση ολική επιβίωση των ασθενών, που έχουν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων 4 & 14 είναι 95 και 98 μήνες αντίστοιχα, ενώ όσοι έχουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης αυτών, η ολική τους επιβίωση είναι 100 και 96 μήνες. Οι παραπάνω παρατηρήσεις δεν είναι στατιστικώς σημαντικές ($p=0,620$ & $p=0,821$), το ποσοστό των συμβάντων θανάτου άλλωστε είναι μικρό, όπως θα ήταν αναμενόμενο, σε ένα μικρό δείγμα ασθενών. Επιπλέον, από την

ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox (Cox regression analysis), πως στο ίδιο χρονικό διάστημα, οι ασθενείς που υπόεκφράζουν το μετάγραφο 4 δεν παρουσιάζουν στην ουσία πιο αυξημένο κίνδυνο υποτροπής, σε σχέση με όσους το υπέρκφράζουν, για το ίδιο χρονικό διάστημα (HR=0,928 με $p=0,922$ και διάστημα εμπιστοσύνης 95%: 0,283-3,046). Αντίστοιχα, όσον αφορά την ολική επιβίωση, οι ασθενείς που υπόεκφράζουν το μετάγραφο 4 παρουσιάζουν 1,316 φορές πιο αυξημένο κίνδυνο θανάτου σε σχέση με τους ασθενείς που το υπέρεκφράζουν (HR=1,316 με $p=0,622$ και διάστημα εμπιστοσύνης 95%: 0,441-3,921). Όσον αφορά το μετάγραφο 14, οι ασθενείς που το υπέρκφράζουν παρουσιάζουν 1,490 φορές πιο αυξημένο κίνδυνο υποτροπής, σε σχέση με όσους το υπόεκφράζουν, για το ίδιο χρονικό διάστημα (HR=1,490 με $p=0,537$ και διάστημα εμπιστοσύνης 95%: 0,420-5,287). Αντίστοιχα, σχετικά με την ολική επιβίωση, οι ασθενείς που υπέρεκφράζουν το μετάγραφο 14 παρουσιάζουν 1,136 φορές πιο αυξημένο κίνδυνο θανάτου σε σχέση με τους ασθενείς που το υπόεκφράζουν (HR=1,136 με $p=0,821$ και διάστημα εμπιστοσύνης 95%: 0,371-3,377).

Η μελέτη του μεταγράφου 19 και η αξιολόγηση της έκφρασής του σε παιδιατρικούς ασθενείς ξεκίνησε στην παρούσα διπλωματική εργασία. Έγινε προσπάθεια συλλογής όσο το δυνατόν περισσότερων δειγμάτων. Συνολικά εξετάστηκαν 31 ασθενείς. Οι 23 έπασχαν από Β-ΟΛΛ και οι υπόλοιποι 8 από Τ-ΟΛΛ, ο έλεγχος συσχέτισης του μεταγράφου 19 με τον υπότυπο ΟΛΛ δεν έδωσε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα ($p=0,786$). Επίσης, η έκφραση του εξετάστηκε ως προς την ηλικία των ασθενών και τον αριθμό λευκών κυττάρων την ημέρα της διάγνωσης. Οι ασθενείς ηλικίας άνω των 10 ετών εμφάνισαν αυξημένη έκφραση του μεταγράφου 19, αποτέλεσμα στατιστικά σημαντικό ($p=0,039$). Επιπλέον, όσοι ασθενείς παρουσίασαν την ημέρα διάγνωσης τους αριθμό λευκών κυττάρων (WBC) μεγαλύτερο των 50000, εμφάνισαν επίσης αυξημένα επίπεδα του μεταγράφου 19, αποτέλεσμα με μεγάλη τάση σημαντικότητας ($p=0,076$). Βάσει του Danger Score, το variant 19 της RNase κ φαίνεται να έχει αυξημένη έκφραση, για τους ασθενείς υψηλού κινδύνου (high risk). Οι 8 από τους 31 ασθενείς ανήκαν σε ομάδα υψηλού κινδύνου, εμφάνισαν ελαφρώς αυξημένα επίπεδα έκφρασης του 19 χωρίς ωστόσο κάποια στατιστική σημαντικότητα ($p=0,652$), κατά πάσα πιθανότητα λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων. Το πιο σημαντικό, από όλα, εύρημα αποτελεί η αυξημένη έκφραση του μεταγράφου 19 σε ασθενείς ηλικίας άνω των 10 ετών και σε ασθενείς που την ημέρα διάγνωσης είχαν πάνω από 50000 αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων. Η ηλικία και ο αριθμός

WBC αποτελούν προγνωστικούς δείκτες για την ΟΛΛ και μάλιστα η ηλικία άνω των 10 ετών και ο αριθμός των λευκών άνω των 50000 αποτελούν δυσμενείς δείκτες. Φαίνεται λοιπόν ότι το μετάγραφο 19 έχει κάποια ισχυρή συσχέτιση με αρνητικούς προγνωστικούς δείκτες για την ΟΛΛ, μένει όμως να αυξηθεί ο αριθμός των δειγμάτων για ασφαλή συμπεράσματα.

Αξίζει να σημειωθεί και συσχέτιση της έκφρασης των 4 μεταγράφων, σε ασθενείς με παιδική ΟΛΛ, όπου έγινε με ανάλυση κατά Spearman. Η ανάλυση αυτή έδειξε μια θετική συσχέτιση των μεταγράφων, όπου καλύτερη συσχέτιση παρουσιάζει το μετάγραφο 19 με τα μετάγραφα 4 και 14 με συντελεστή συσχέτισης $RS=0,245$ με $p<0,001$ και $RS=0,516$ με $p<0,001$ αντίστοιχα. Ενώ και τα δύο τελευταία μεταξύ τους παρουσιάζουν καλή συσχέτιση με συντελεστή συσχέτισης $RS=0,695$ με $p<0,001$.

Όσον αφορά τη μελέτη του μεταγράφου 9, παρατηρήθηκαν πολλαπλές καμπύλες αποδιάταξης, που υποδεικνύουν την ύπαρξη και παραπροϊόντων εκτός από το μετάγραφο 9. Τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε gel αγαρόζης όπου και παρατηρήθηκε ένα ακόμα προϊόν σε ύψος πολύ μεγαλύτερο από εκείνο του μεταγράφου 9. Συμπερασματικά λοιπόν, το μετάγραφο 9 δεν θα μπορούσε να συμπεριληφθεί στην μελέτη. Σε όσους ασθενείς εξετάστηκε, το αποτέλεσμα ήταν το ίδιο. Υπάρχουν δύο εκδοχές που μπορούν να εξηγήσουν τα παραπάνω ευρήματα. Η ύπαρξη ενός ακόμα μεταγράφου της ριβονουκλεάσης κ, που ίσως δεν έχει χαρακτηριστεί ή η υβριδοποίηση των εκκινητών σε κάποιο άλλο γονίδιο στους συγκεκριμένους ασθενείς. Σε κάθε περίπτωση, τα αποτελέσματα απαιτούν αποσαφήνιση με Sequencing.

**ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ
ΝΕΩΝ ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΤΗΣ RNase κ ΣΤΗΝ
ΟΞΕΙΑ ΛΕΜΦΟΒΛΑΣΤΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ ΣΕ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΟΥΣ
ΑΣΘΕΝΕΙΣ**

Λερούνη Αικατερίνη

Ερευνητική Εργασία Διπλώματος Ειδίκευσης

Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ΟΛΛ) είναι μια μορφή κακοήθειας των λεμφοκυττάρων. Χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση ανώριμων κυττάρων αίματος στο μυελό των οστών. Η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία αποτελεί μία από τις πιο σημαντικές κακοήθειες νόσους της παιδικής ηλικίας, με τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης να παρουσιάζεται μεταξύ των παιδιών ηλικίας 2 και 5 ετών. Διαχρονικά, η ΟΛΛ αποτελεί πεδίο έρευνας για αυτό και υπάρχουν αρκετοί δείκτες, που χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση και τη διαφοροδιάγνωσή της. Οι ριβονουκλεάσες, που τα τελευταία χρόνια έχει αποδειχτεί η συμμετοχή τους σε πολλές περιπτώσεις καρκινογένεσης ανήκουν στην κατηγορία των νουκλεασών, μόρια που αποικοδομούν δηλαδή τα RNAs σε μικρότερα τμήματα. Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι η αύξηση του αριθμού των δειγμάτων και η συνέχιση της μελέτης των επιπέδων έκφρασης των μεταγράφων 1, 4, και 14 αλλά και η εκ νέου μελέτη των μεταγράφων 9 και 19 του γονιδίου της ριβονουκλεάσης κ, σε περιπτώσεις ασθενών με παιδική ΟΛΛ. Συνολικά μελετήθηκαν 70 ασθενείς με παιδική ΟΛΛ, από τους οποίους απομονώθηκε ολικό RNA από δείγματα μυελού (ολικό αίμα) και συντέθηκε cDNA με την αντίδραση της RT-PCR. Η μελέτη των επιπέδων έκφρασης των 5 μεταγράφων πραγματοποιήθηκε με ανάλυση Real-Time PCR, με τη χρήση της χρωστικής SYBR-GREEN και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων για τη συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης με διάφορα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών.

Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης αποδεικνύουν ότι τα επίπεδα έκφρασης των τριών μεταγράφων (1,4 και 14) είναι μειωμένα στους ασθενείς σε σχέση με

τους υγιείς ($p_{\text{clas}} < 0,001$, $p_{v4} < 0,001$, $p_{v14} < 0,001$), ενώ αντίστοιχα για τα ζεύγη των ασθενών μεταξύ της ημέρας διάγνωσης και της 33^{ης} ημέρας, δεν εμφανίζονται μεγάλες διαφορές στα επίπεδα έκφρασης στο τέλος της θεραπείας εφόδου ($p_{\text{clas}} = 0,614$, $p_{v4} = 0,627$, $p_{v14} = 0,548$). Όσον αφορά το κλασικό μετάγραφο, παρουσιάζει αυξημένη έκφραση παρουσία δυσμενών δεικτών, όπως ο φαινότυπος B-ΟΛΛ και T-ΟΛΛ ($p_{\text{clas}} = 0,366$), ο αριθμός λευκών $\text{WBC} > 50.000 \text{ cells}/\mu\text{L}$ ($p_{\text{clas}} = 0,032$), η απουσία υπερδιπλοειδίας ($p_{\text{clas}} = 0,048$). Επιπλέον στις περιπτώσεις θετικής MRD και ασθενών υψηλού κινδύνου, το μετάγραφο 1 παρουσιάζει ελαφρώς μια αυξημένη έκφραση με $p_{\text{clas}} = 0,185$ και $p_{\text{clas}} = 0,191$ αντίστοιχα. Η ανάλυση επιβίωσης Kaplan Meier και η Cox regression ανάλυση παλινδρόμησης δείχνουν ότι όσοι ασθενείς υπερεκφράζουν το κλασικό μετάγραφο εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο θανάτου (HR=1,908 με $p = 0,293$ και διάστημα εμπιστοσύνης 95%: 0,573-6,357). Αντίστοιχα τα μετάγραφα 4 και 14, παρότι δεν έχουν παρουσιάσει κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τους παραπάνω δείκτες, αξίζει να σημειωθεί το γεγονός ότι οι ασθενείς με θετική MRD την 15^η μέρα είχαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του var. 4, $p = 0,064$, αποτέλεσμα μεγάλη τάση σημαντικότητας. Ωστόσο οι ίδιοι ασθενείς δεν είχαν αυξημένα επίπεδα και του var.14 ($p = 0,852$). Βάσει του Danger Score, το variant 14 της RNase K φαίνεται να έχει αυξημένη έκφραση, με αυξημένη τάση σημαντικότητας ($p = 0,079$), για τους ασθενείς υψηλού κινδύνου (high risk), κάτι που δεν παρατηρήθηκε όμως και για το 4 ($p = 0,807$). Γενικά όμως, φαίνεται ότι τα μετάγραφα 4 και 14 ακολουθούν παρόμοιο μοτίβο έκφρασης συγκριτικά με τα κλινικοπαθολογικά δεδομένα των ασθενών, το οποίο αποδεικνύεται και από την ανάλυση συσχέτισης κατά Spearman (RS=0,695, $p < 0,001$). Συνολικά, για το μετάγραφο 19 εξετάστηκαν 31 ασθενείς, η έκφραση του οποίου εξετάστηκε ως προς την ηλικία των ασθενών και τον αριθμό λευκών κυττάρων την ημέρα της διάγνωσης. Οι ασθενείς ηλικίας άνω των 10 ετών εμφάνισαν αυξημένη έκφραση του μεταγράφου 19, αποτέλεσμα στατιστικά σημαντικό ($p = 0,039$). Επιπλέον, όσοι ασθενείς παρουσίασαν την ημέρα διάγνωσης τους αριθμό λευκών κυττάρων (WBC) μεγαλύτερο των 50000, εμφάνισαν επίσης αυξημένα επίπεδα του μεταγράφου 19, αποτέλεσμα με μεγάλη τάση σημαντικότητας ($p = 0,076$). Όσον αφορά τη μελέτη του μεταγράφου 9, παρατηρήθηκαν πολλαπλές καμπύλες αποδιάταξης, που υποδεικνύουν την ύπαρξη και παραπροϊόντων εκτός από το μετάγραφο 9. Σε όσους ασθενείς εξετάστηκε, το αποτέλεσμα ήταν το ίδιο. Σε κάθε περίπτωση, τα αποτελέσματα απαιτούν αποσαφήνιση με Sequencing.

Συμπερασματικά, τα επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων 1 και 19 φαίνεται να έχουν μια σοβαρή συσχέτιση με κακούς προγνωστικούς δείκτες για την ΟΛΛ. Το κλασικό μετάγραφο μπορεί επίσης να παρέχει πληροφορίες ως προς την ολική επιβίωση. Όσον αφορά τα μετάγραφα 4 και 14 πέρα από δύο ευρήματα σχεδόν στατιστικώς σημαντικά, δεν υπήρξε κάποια άλλη αξιολογη παρατήρηση. Στο γενικότερο πλαίσιο της μελέτης τα περισσότερα αποτελέσματα δεν είναι στατιστικώς σημαντικά, λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων που αναλύθηκαν. Μετά τη προσπάθεια αύξησης του cohort των ασθενών που μελετήθηκαν, λήφθηκαν κάποιες αξιολογες παρατηρήσεις και μάλιστα με στατιστική σημαντικότητα ενώ κάποιες άλλες έδειξαν προς τα που θα πρέπει να κινηθεί η έρευνα. Το μόνο σίγουρο είναι ότι απαιτείται μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων για την άντληση ασφαλέστερων και πιο αξιόπιστων αποτελεσμάτων.

**EXPRESSION ANALYSIS AND CLINICAL STUDY OF NEW
ALTERNATIVE VARIANTS OF RNase κ IN CHILDHOOD ACUTE
LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA**

Lerouni Catherine

Master Thesis

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

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a form of lymphocytic malignancy. It is characterized by the accumulation of immature blood cells in the bone marrow. Acute lymphoblastic leukemia is one of the most important malignancies in childhood, with the highest incidence occurring in children between the ages of 2 and 5 years. Over the years, ALL has been a field of research for this and there are several indicators used to diagnose and differentiate it. Ribonucleases, which in recent years have been shown to be involved in many carcinogenesis breakdowns, belong to the category of nucleases, which are the degradable molecules of RNAs in smaller segments. The purpose of this postgraduate study is to increase the number of samples and to continue the study of expression levels of variants 1, 4, and 14 and to re-study variants 9 and 19 of the ribonuclease κ gene in pediatric patients. ALL. A total of 70 patients with childhood ALL were studied, from which total RNA was isolated from marrow samples (whole blood) and cDNA synthesized by RT-PCR reaction. The expression levels of the 5 transcripts were studied by Real-Time PCR analysis using SYBR-GREEN dye followed by statistical analysis of the results to correlate the expression levels with different clinical characteristics.

The results of the statistical analysis show that the expression levels of the three variants (1,4 and 14) are decreased in the patients compared to the healthy (p_{1,4} <0.001, p_{v4} <0.001, p_{v14} <0.001), respectively for the pairs of patients. between the day of diagnosis and day 33, there were no significant differences in expression levels at the end

of the onset treatment (pclas = 0.614, pv4 = 0.627 pv14 = 0.548). Regarding the classical variant, there is increased expression in the presence of adverse markers, such as the B-ALL and T-ALL phenotype (pclas = 0.366), the number of white WBCs > 50,000 cells / μ L (pclas = 0.032), the absence of hyperdiploidy (pclas = 0.048). In addition, in cases of positive MRD and high-risk patients, transcript 1 shows slightly increased expression with pclas = 0.185 and pclas = 0.191, respectively. Kaplan Meier survival analysis and Cox regression regression analysis showed that patients overexpressing the classic variant had an increased risk of death (HR = 1.908 with p = 0.293 and 95% confidence interval: 0.573-6.357). Respectively, 14 and 4 have not shown any statistically significant correlation with the above markers, it is worth noting though that patients with positive MRD at day 15 had elevated levels of var.4 expression (p = 0.064), result with high significance trend. However, the same patients did not have elevated levels of var.14 (p = 0.852). According to the Danger Score, variant 14 of RNase κ appears to have increased expression, with a significant tendency (p = 0.079) for high risk patients, but not for 4 (p = 0.807). In general, however, variants 4 and 14 appear to have a similar expression pattern compared to the clinicopathological data of patients, which is also demonstrated by Spearman's correlation analysis (RS = 0.695, p <0.001). In total, 31 patients were screened for transcript 19, whose expression was examined for patient age and white cell count at the day of diagnosis. Patients over 10 years of age showed increased expression of transcript 19, which was statistically significant (p = 0.039). In addition, patients with a WBC count greater than 50,000 on the day of diagnosis also showed elevated levels of transcript 19, a result that was highly significant (p = 0.076). For the transcript 9 study, multiple denaturation curves were observed, indicating the presence of by-products other than transcript 9. In all the patients examined, the result was the same. In any case, the results require clarification with Sequencing.

In conclusion, the expression levels of transcripts 1 and 19 appear to have a significant correlation with poor prognostic markers for ALL. The classic transcript can also provide information on overall survival. With regard to transcripts 4 and 14 beyond two almost statistically significant findings, there was no other remarkable observation. In the general context of the study most of the results are not statistically significant due to the small number of samples analyzed. After trying to increase the cohort of the patients studied, some remarkable and even statistically significant observations were received

while others indicated where the research should be moved. The only sure thing is that a larger number of samples are needed to obtain safer and more reliable results.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. <https://www.allbloodcancers.org/leukemia> (τελευταία επίσκεψη: Οκτώβριος 2019)
2. https://www.lls.org/sites/default/files/file_assets/understandingleukemia.pdf
3. <https://www.leukaemiacare.org.uk/support-and-information/information-about-blood-cancer/blood-cancer-information/leukaemia/> (τελευταία επίσκεψη: Οκτώβριος 2019)
4. Γεράσιμος Α. Πάγκαλης, «Αιματολογία στη κλινική πράξη», 1^η έκδοση, Εκδόσεις Πασχαλίδης, Αθήνα, 2003, ISBN:978-960-399-776-4
5. Ward E, DeSantis C, Robbins A, Kohler B, Jemal A. Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 2014;64:83–103.
6. National Cancer Institute. SEER cancer statistics review, 1975-2013:Leukemia, annual incidence rates (acute lymphocytic leukemia).
7. Paul S, Kantarjian H, Jabbour EJ. Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Mayo Clin Proc* 2016; 91: 1645–1666.
8. Terwilliger, T., and M. J. B. C. J. Abdul-Hay. "Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update." *Blood cancer journal* 7.6 (2017): e577.
9. Pui CH, Evans WE. A 50-year journey to cure childhood acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol.* 2013;50:185–196.
10. Hunger SP, Lu X, Devidas M, et al. Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group. *J Clin Oncol.* 2012;30:1663–1669.
11. Schultz KR, Carroll A, Heerema NA, et al. Long-term follow-up of imatinib in pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: Children's Oncology Group study AALL0031. *Leukemia.* 2014;28:1467–1471.
12. Jabbour E, O'Brien S, Konopleva M, Kantarjian H. New insights into the pathophysiology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 2015; 121: 2517–2528.
13. Shah A, John BM, Sondhi V. Acute lymphoblastic leukemia with treatment—naive Fanconi anemia. *Indian Pediatr* 2013; 50: 508–510.
14. German J. Bloom's syndrome. XX. The first 100 cancers. *Cancer Genet Cytogenet* 1997; 93: 100–106.

15. Bielorai B, Fisher T, Waldman D, Lerenthal Y, Nissenkorn A, Tohami T et al. Acute lymphoblastic leukemia in early childhood as the presenting sign of ataxia-telangiectasia variant. *Pediatr Hematol Oncol* 2013; 30: 574–582.
16. Chessells J, Harrison G, Richards S, Bailey C, Hill F, Gibson B et al. Down's syndrome and acute lymphoblastic leukaemia: clinical features and response to treatment. *Arch Dis Child* 2001; 85: 321–325.
17. Spector LG, R J, Robison LL, Bhatia S. *Epidemiology and Etiology Childhood Leukemias*, 2nd edition. Cambridge University Press, pp 48–66.
18. Sehgal S, Mujtaba S, Gupta D, Aggarwal R, Marwaha RK. High incidence of Epstein Barr virus infection in childhood acute lymphocytic leukemia: a preliminary study. *Indian J Pathol Microbiol* 2010; 53: 63–67.
19. Geriniere L, Bastion Y, Dumontet C, Salles G, Espinouse D, Coiffier B. Heterogeneity of acute lymphoblastic leukemia in HIV-seropositive patients. *Ann Oncol* 1994; 5: 437–440.
20. Mullighan CG, Collins-Underwood JR, Phillips LA, Loudin ML, Liu W, Zhang J et al. Rearrangement of CRLF2 in B-progenitor and down syndrome associated acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 2009; 41: 1243–1246.
21. Holmfeldt L, Wei L, Diaz-Flores E, Walsh M, Zhang J, Ding L et al. The genomic landscape of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 2013; 45: 242–252.
22. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009; 114: 937–951.
23. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016; 127: 2391–2405.
24. Kristina Karrman and Bertil Johansson, 2016, *Pediatric T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia*, John Wiley & Sons, pp 1-81
25. Deepa Bhojwani, Jun J. Yang, and Ching-Hon Pui, 2015, *Biology of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia*, *Pediatr Clin North Am.*, **62(1)**: 47–60

26. Sarah K Tasian, Mignon L Loh, and Stephen P Hunger, 2015, Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Integrating Genomics into Therapy, *Cancer*, **121(20)**: 3577–3590.
27. Hunger, Stephen P., and Charles G. Mullighan. "Redefining ALL classification: toward detecting high-risk ALL and implementing precision medicine." *Blood* 125.26 (2015): 3977-3987.
28. Iacobucci, Ilaria, and Charles G. Mullighan. "Genetic basis of acute lymphoblastic leukemia." *Journal of Clinical Oncology* 35.9 (2017): 975.
29. Gleißner B, Gökbuget N, Bartram CR, Janssen B, Rieder H, Thiel E. Leading prognostic relevance of the BCR-ABL translocation in adult acute B-lineage lymphoblastic leukemia: a prospective study of the german multicenter trial group and confirmed polymerase chain reaction analysis. *Blood*.2002;99:1536–43.
30. Cytogenetic abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia: correlations with hematologic findings outcome. A collaborative study of the group français de cytogénétique hématologique. *Blood*.1996;87:3135–42.
31. Westbrook CA, Hooberman AL, Spino C, Dodge RK, Larson RA, Bloomfield CD. Clinical significance of the BCR-ABL fusion gene in adult acute lymphoblastic leukemia: a cancer and leukemia group B study (8762) *Blood*. 1992;80:2983–90.
32. Rieder H, Ludwig WD, Gassmann W, Maurer J, Janssen JW, Fonatsch C. Prognostic significance of additional chromosome abnormalities in adult patients with Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 1996;95:678–91.
33. Chisoe SL, Bodenteich A, Wang YF, Wang YP, Burian D, Roe BA. Sequence and analysis of the human ABL gene, the BCR gene, and regions involved in the Philadelphia chromosomal translocation. *Genomics*. 1995;27:67–82.
34. Jain N, Roberts KG, Jabbour E, Patel K, Eterovic AK, Konopleva M. Ph-like acute lymphoblastic leukemia: a high-risk subtype in adults. *Blood*. 2017;129:572–81.
35. Man LM, Morris AL, Keng M. New Therapeutic strategies in acute lymphocytic leukemia. *Curr Hematol Malig Rep*. 2017;12:197–206.
36. Den Boer ML, van Slegtenhorst M, De Menezes RX, Cheek MH, Buijs-Gladdines JG, Peters ST, Van Zutven LJ, Beverloo HB, Van der Spek PJ, Escherich G, Horstmann MA, Janka-Schaub GE, Kamps WA, Evans WE, Pieters R. A subtype

- of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *Lancet Oncol.* 2009;10:125–34
37. Roberts KG, Morin RD, Zhang J, Hirst M, Zhao Y, Richard P. Genetic alterations activating kinase and cytokine receptor signaling in high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell.* 2013;22:153–66.
 38. Chiaretti S, Zini G, Bassan R. Diagnosis and subclassification of acute lymphoblastic leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2014;6:e2014073.
 39. Liu-Dumlao T, Kantarjian H, Thomas DA, O'Brien S, Ravandi F. Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia: current treatment options. *Curr Oncol Rep.* 2012;14:387–94
 40. Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, Branford S, Radich J, Goldman JM. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood.* 2006;108:28–37.
 41. Mullighan CG, Su X, Zhang J, Radtke I, Phillips LA, Miller CB, Ma J, Liu W, Cheng C, Schulman BA, Harvey RC, Chen IM, Clifford RJ, Carroll WL, Reaman G, Bowman WP, Devidas M, Gerhard DS, Yang W, Relling MV, Shurtleff SA, Campana D, Borowitz MJ, Pui CH, Smith M, Hunger SP, Willman CL, Downing JR Children's Oncology Group. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 2009;360:470–80.
 42. Tasian SK, Loh ML, Hunger SP. Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2017;130:2064–72.
 43. Reshmi SC, Harvey RC, Roberts KG, Stonerock E, Smith A, Hunger SP. Targetable kinase gene fusions in high-risk B-ALL: a study from the children's oncology group. *Blood.* 2017;129:3352–62
 44. Roberts KG, Li Y, Payne-Turner D, Harvey RC, Yang YL, Mullighan CG. Targetable kinase-activating lesions in ph-like acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 2014;371:1005–15.
 45. Roberts KG, Gu Z, Payne-Turner D, McCastlain K, Harvey RC, Chen IM, Pei D, Iacobucci I, Valentine M, Pounds SB, Shi L, Li Y, Zhang J, Cheng C, Rambaldi A, Tosi M, Spinelli O, Radich JP, Minden MD, Rowe JM, Luger S, Litzow MR, Tallman MS, Wiernik PH, Bhatia R, Aldoss I, Kohlschmidt J, Mrózek K, Marcucci

- G, Bloomfield CD, Stock W, Kornblau S, Kantarjian HM, Konopleva M, Paietta E, Willman CL, Mullighan CG. High frequency and poor outcome of philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia in adults. *J. Clin. Oncol.* 2017;35:394–401.
46. van der Veer A, Waanders E, Pieters R, Willemse ME, Van Reijmersdal SV, Russell LJ, Harrison CJ, Evans WE, van der Velden VH, Hoogerbrugge PM, Van Leeuwen F, Escherich G, Horstmann MA, Mohammadi Khankahdani L, Rizopoulos D, De Groot-Kruseman HA, Sonneveld E, Kuiper RP, Den Boer ML. Independent prognostic value of BCR-ABL1-like signature and IKZF1 deletion, but not high CRLF2 expression, in children with B-cell precursor ALL. *Blood.* 2013;122:2622–9.
 47. Boer JM, Koenders JE, Van Der Holt B, Exalto C, Sanders MA, Rijneveld AW. Expression profiling of adult acute lymphoblastic leukemia identifies a BCR-ABL1-like subgroup characterized by high non-response and relapse rates. *Haematologica.* 2015;100:e261–4.
 48. Boer JM, Steeghs EM, Marchante JR, et al. : Tyrosine kinase fusion genes in pediatric *BCR-ABL1*-like acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget.* 2017;8(3):4618–28. 10.18632/oncotarget.13492
 49. Imamura T, Kiyokawa N, Kato M, et al. : Characterization of pediatric Philadelphia-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with kinase fusions in Japan. *Blood Cancer J.* 2016;6:e419. 10.1038/bcj.2016.28
 50. Russell LJ, Capasso M, Vater I, et al. Deregulated expression of cytokine receptor gene, CRLF2, is involved in lymphoid transformation in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2009;114:2688–2698.
 51. Mullighan CG, Zhang J, Harvey RC, et al. JAK mutations in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106:9414–9418
 52. Harvey RC, Mullighan CG, Chen IM, et al. Rearrangement of CRLF2 is associated with mutation of JAK kinases, alteration of IKZF1, Hispanic/Latino ethnicity, and a poor outcome in pediatric B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2010;115:5312–5321.
 53. Cario G, Zimmermann M, Romey R, et al. Presence of the P2RY8-CRLF2 rearrangement is associated with a poor prognosis in non-high-risk precursor B-cell

- acute lymphoblastic leukemia in children treated according to the ALL-BFM 2000 protocol. *Blood*. 2010;115:5393–5397.
54. Roberts KG, Pei D, Campana D, et al. : Outcomes of children with *BCR-ABL1*-like acute lymphoblastic leukemia treated with risk-directed therapy based on the levels of minimal residual disease. *J Clin Oncol*. 2014;32(27):3012–20. 10.1200/JCO.2014.55.
 55. Moorman AV, Harrison CJ, Buck GA, Richards SM, Secker-Walker LM, Dewald GW. Karyotype is an independent prognostic factor in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of cytogenetic data from patients treated on the medical research council (MRC) UKALLXII/eastern cooperative oncology group (ECOG) 2993 trial. *Blood*. 2007;109:3189–97.
 56. Li Y, Schwab C, Ryan SL, et al. Constitutional and somatic rearrangement of chromosome 21 in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2014;508(7494):98–102
 57. Rand V, Parker H, Russell LJ, et al. Genomic characterization implicates *iAMP21* as a likely primary genetic event in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2011;117:6848–6855.
 58. Moorman AV, Robinson H, Schwab C, et al. Risk-directed treatment intensification significantly reduces the risk of relapse among children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia and intrachromosomal amplification of chromosome 21: a comparison of the MRC ALL97/99 and UKALL2003 trials. *J Clin Oncol*. 2013;31:3389–3396.
 59. Uckun FM, Zheng Y, Cetkovic-Cvrlje M, Vassilev A, Lisowski E, Chen CL. In vivo pharmacokinetic features, toxicity profile, and chemosensitizing activity of α -cyano- β -hydroxy- β -methyl-N-(2,5-dibromophenyl)propenamide (LFM-A13), a novel antileukemic agent targeting Bruton's tyrosine kinase. *Clin Cancer Res*. 2002;8:1224–33.
 60. Mühlbacher V, Zenger M, Schnittger S, Weissmann S, Kunze F, Haferlach C. Acute lymphoblastic leukemia with low hypodiploid/near triploid karyotype is a specific clinical entity and exhibits a very high TP53 mutation frequency of 93% *Genes Chromosom Cancer*. 2014;53:524–36.
 61. Wakeford R., 2008, Childhood leukaemia following medical diagnostic exposure to ionizing radiation in utero or after birth., *Radiat Prot Dosimetry*, **132(2)**:166-74

62. Karrman K, Forestier E, Heyman M, Andersen MK, Autio K, Blennow E, Borgström G, Ehrencrona H, Golovleva I, Heim S, Heinonen K, Hovland R, Johannsson JH, Kerndrup G, Nordgren A, Palmqvist L, Johannsson B; Nordic Society of Pediatric Hematology, Oncology (NOPHO); Swedish Cytogenetic Leukemia Study Group (SCLSG); NOPHO Leukemia Cytogenetic Study Group (NLCSG)., 2009, Clinical and cytogenetic features of a population-based consecutive series of 285 pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemias: rare T-cell receptor gene rearrangements are associated with poor outcome., *Genes Chromosomes Cancer.*, **48(9)**:795-805
63. Weng AP, Ferrando AA, Lee W, et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science.* 2004;306:269–271.
64. Thompson BJ, Buonamici S, Sulis ML, et al. The SCFFBW7 ubiquitin ligase complex as a tumor suppressor in T cell leukemia. *J Exp Med.* 2007;204:1825–1835.
65. Real PJ, Tosello V, Palomero T, et al. Gamma-secretase inhibitors reverse glucocorticoid resistance in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med.* 2009;15:50–58.
66. Wu Y, Cain-Hom C, Choy L, et al. Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors. *Nature.* 2010;464:1052–1057.
67. Coustan-Smith E, Mullighan CG, Onciu M, et al. Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol.* 2009;10:147–156
68. Zhang J, Ding L, Holmfeldt L, et al. The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature.* 2012;481:157–163
69. Patrick K, Wade R, Goulden N, et al. Outcome for children and young people with Early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia treated on a contemporary protocol, UKALL 2003. *Br J Haematol.* 2014;166:421–424.
70. Richard A. Larson and John Anastasi, *Acute Leukemias*, Springer Berlin Heidelberg New York, 2008, pp. 109-118
71. Riley RD, Sauerbrei W, Altman DG. Prognostic markers in cancer: the evolution of evidence from single studies to meta-analysis, and beyond. *Br J Cancer.* 2009; 100 (8): 1219–29

72. Tezak Z, Kondratovich M, Mansfield E. US FDA and personalized medicine: in vitro diagnostic regulatory perspective. *Per Med.* 2010; 7 (5): 517–30.]
73. Italiano A. Prognostic or predictive? It's time to get back to definitions *J Clin Oncol.* 2011; 29 (35): 4718–9
74. Oldenhuis CN, Oosting SF, Gietema JA, de Vries EG. Prognostic versus predictive value of biomarkers in oncology. *Eur J Cancer.* 2008; 44 (7): 946–53.
75. Hingorani AD, Windt DA, Riley RD, Abrams K, Moons KG, Steyerberg EW, et al. Prognosis research strategy (PROGRESS) 4: stratified medicine research. *BMJ.* 2013; 346: e5793.
76. Rowe JM, Buck G, Burnett AK, Chopra R, Wiernik PH, Richards SM et al. Induction therapy for adults with acute lymphoblastic leukemia: results of more than 1500 patients from the international ALL trial:
77. Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet.* 2008;371:1030–43.
78. Stanulla M, Schrappe M. Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol.* 2009;46:52–63.
79. Hunger SP, Lu X, Devidas M, et al. Improved Survival for Children and Adolescents With Acute Lymphoblastic Leukemia Between 1990 and 2005: A Report From the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol.* 2012
80. Bassan R, Hoelzer D. Modern therapy of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 2011;29:532–43.
81. Pui CH, Campana D, Pei D, et al. Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation. *N Engl J Med.* 2009;360:2730–41.
82. Pieters R, Schrappe M, De Lorenzo P, et al. A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): an observational study and a multicentre randomised trial. *Lancet.*
83. Rowe, Jacob M. "Prognostic factors in adult acute lymphoblastic leukaemia." *British journal of haematology*150.4 (2010): 389-405.
84. Faderl, S HM Kantarjian, et al, T.U.o.T.M.D.A.C.C. Department of Leukemia, Houston, Texas, T.U.o.T.M.D.A.C.C. Department of Leukemia, P.O. Box 428, 1515 Holcombe Blvd., Houston, TX 77030, S. Jeha, T.U.o.T.M.D.A.C.C. Department of Leukemia, Houston, Texas, The biology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer,* 2017; 98: 1337–1354.

85. Pullarkat V, Slovak ML, Kopecky KJ, Forman SJ, Appelbaum FR. Impact of cytogenetics on the outcome of adult acute lymphoblastic leukemia: results of Southwest Oncology Group 9400 study. *Blood* 2008; 111: 2563–2572.
86. Dongen JJMv, v.d. Velden VHJ, Brüggemann M, Orfao A. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood* 2015; 125: 3996–4009.
87. Brüggemann M, Raff T, Flohr T, Gokbuget N, Nakao M, Droese J et al. Clinical significance of minimal residual disease quantification in adult patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2006; 107: 1116–1123.
88. Jacquy C, Delepaut B, Van Daele S, Vaerman JL, Zenebergh A, Brichard B et al. A prospective study of minimal residual disease in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukaemia: MRD level at the end of induction is a strong predictive factor of relapse. *Br J Haematol* 1997; 98: 140–146.
89. Sutton R, Venn NC, Tolisano J, Bahar AY, Giles JE, Ashton LJ et al. Clinical significance of minimal residual disease at day 15 and at the end of therapy in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2009; 146: 292–299.
90. Bassan R, Spinelli O, Oldani E, Intermesoli T, Tosi M, Peruta B et al. Improved risk classification for risk-specific therapy based on the molecular study of minimal residual disease (MRD) in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood* 2009; 113: 4153–4162.
91. Campana D. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol* 2009; 46: 100–106.
92. Borowitz MJ, Devidas M, Hunger SP, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children’s Oncology Group study. *Blood*. 2008;111:5477–85.
93. Conter V, Bartram CR, Valsecchi MG, et al. Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. *Blood*. 2010;115:3206–14
94. Schrappe M, Valsecchi MG, Bartram CR, et al. Late MRD response determines relapse risk overall and in subsets of childhood T-cell ALL: results of the AIEOP-BFM-ALL 2000 study. *Blood*. 2011;118:2077–84.

95. Basso G, Veltroni M, Valsecchi MG, et al. Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow. *J Clin Oncol*. 2009;27:5168–74.
96. Gokbuget N, Kneba M, Raff T, et al. Adults with acute lymphoblastic leukemia and molecular failure display a poor prognosis and are candidates for stem cell transplantation and targeted therapies. *Blood*. 2012
97. van Dongen JJ, van der Velden VH, Brüggemann M, et al. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood*. 2015;125:3996–4009
98. Stow P, Key L, Chen X, et al. Clinical significance of low levels of minimal residual disease at the end of remission induction therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2010;115:4657–63.
99. Coustan-Smith E, Song G, Clark C, et al. New markers for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2011;117:6267–76.
100. Alvarnas JC, Brown PA, Aoun P, Ballen KK, Barta SK, Borate U et al. Acute lymphoid leukemia (version 2.2015). *Natl Comprehens Cancer Netw* 2015; 13: 1240–1279.
101. Huguet F, Leguay T, Raffoux E, Thomas X, Beldjord K, Delabesse E et al. Pediatric-inspired therapy in adults with Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia: the GRAALL-2003 study. *J Clin Oncol* 2009; 27: 911–918.
102. Stock W, La M, Sanford B, Bloomfield CD, Vardiman JW, Gaynon P et al. What determines the outcomes for adolescents and young adults with acute lymphoblastic leukemia treated on cooperative group protocols? A comparison of Children's Cancer Group and Cancer and Leukemia Group B studies. *Blood* 2008; 112: 1646–1654.
103. Gokbuget N, Kneba M, Raff T, et al. Adult patients with acute lymphoblastic leukemia and molecular failure display a poor prognosis and are candidates for stem cell transplantation and targeted therapies. *Blood*. 2012;120:1868–1876.
104. Ribera JM, Oriol A, Morgades M, et al. Treatment of high-risk Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia in adolescents and adults according to early cytologic response and minimal residual disease after

- consolidation assessed by flow cytometry: final results of the PETHEMA ALL-AR-03 trial. *J Clin Oncol*. 2014;32:1595–1604.
105. Beldjord K, Chevret S, Asnafi V, et al. Oncogenetics and minimal residual disease are independent outcome predictors in adult patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2014;123:3739–3749.
 106. Dhedin N, Huynh A, Maury S, et al. Role of allogeneic stem cell transplantation in adult patients with Ph-negative acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2015;125:2486–2496. quiz 2586.
 107. Vidriales MB, Perez JJ, Lopez-Berges MC, et al. Minimal residual disease in adolescent (older than 14 years) and adult acute lymphoblastic leukemias: early immunophenotypic evaluation has high clinical value. *Blood*. 2003;101:4695–4700.
 108. Bassan R, Spinelli O, Oldani E, et al. Different molecular levels of post-induction minimal residual disease may predict hematopoietic stem cell transplantation outcome in adult Philadelphia-negative acute lymphoblastic leukemia. *Blood Cancer J*. 2014;4:e225.
 109. Farber S, Diamond LK, Mercer RD. Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid 374. *N Engl J Med*. 1948;238:787–793.
 110. Frei E, Freireich EJ, Gehan E, Pinkel D, Holland JF, Selawry O, Haurani F, Spurr CL, Hayes DM, James GW, Rothberg H, Sodee DB, Rundles RW, Schroeder LR, Hoogstraten B, Wolman IJ, Traggis DG, Cooper T, Gendel BR, Ebaugh F, Taylor R. Studies of sequential and combination antimetabolite therapy in acute leukemia: 6-mercaptopurine and methotrexate. *Blood*. 1961;18:431–454.
 111. Pinkel D. Five-year follow-up of “total therapy” of childhood lymphocytic leukemia. *JAMA*. 1971;216:648–652.
 112. Henze G, Langermann HJ, Brämshwig J, Breu H, Gadner H, Schellong G, Welte K, Riehm H. The BFM 76/79 acute lymphoblastic leukemia therapy study (author’s transl) *Klin Padiatr*. 1981;193:145–154.
 113. Sallan SE, Hitchcock-Bryan S, Gelber R, Cassady JR, Frei E 3rd, Nathan DG. Influence of intensive asparaginase in the treatment of childhood non-T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res*. 1983;43:5601–5607.

114. Carroll WL, Raetz EA. Clinical and laboratory biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr.* 2012;160:10–18.
115. Moleski M. Neuropsychological, neuroanatomical, and neurophysiological consequences of CNS chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia. *Arch Clin Neuropsychol.* 2000;15:603–630.
116. Krull KR, Brinkman TM, Li C, Armstrong GT, Ness KK, Srivastava DK, Gurney JG, Kimberg C, Krasin MJ, Pui CH, Robison LL, Hudson MM. Neurocognitive outcomes decades after treatment for childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the St Jude lifetime cohort study. *J Clin Oncol.* 2013;31:4407–4415.
117. Follin C, Erfurth EM. Long-term effect of cranial radiotherapy on pituitaryhypothalamus area in childhood acute lymphoblastic leukemia survivors. *Curr Treat Options Oncol.* 2016;17:50.
118. Richards S, Pui CH, Gayon P; Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Collaborative Group (CALLCG) Systematic review and meta-analysis of randomized trials of central nervous system directed therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer.* 2013;60:185–195.
119. Bhatia S, Armenian SH, Landier W. How I monitor long-term and late effects after blood or marrow transplantation. *Blood.* 2017;130:1302–1314.
120. ALL IC-BFM 2009 – TRIAL STEERING COMMITTEE, 2009, A Randomized Trial of the I-BFM-SG for the Management of Childhood non-B Acute Lymphoblastic Leukemia.
121. Inaba H, Pui CH. Glucocorticoid use in acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol.* 2010;11:1096–106.
122. Igarashi S, Manabe A, Ohara A, et al. No advantage of dexamethasone over prednisolone for the outcome of standard- and intermediate-risk childhood acute lymphoblastic leukemia in the Tokyo Children’s Cancer Study Group L95-14 protocol. *J Clin Oncol.* 2005;23:6489–98.
123. Bertrand Y, Suci S, Benoit Y, et al. Dexamethasone(DEX)(6mg/sm/d) and prednisolone(PRED)(60mg/sm/d) in induction therapy of childhood ALL are equally effective: results of the 2nd interim analysis of EORTC Trial 58951. *ASH Annual Meeting Abstracts.* 2008;112:8s.

124. Pui CH, Mullighan CG, Evans WE, Relling MV. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? *Blood*. 2012;120:1165–74.
125. Schultz KR, Bowman WP, Aledo A, et al. Improved early event-free survival with imatinib in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: a children's oncology group study. *J Clin Oncol*. 2009;27:5175–81.
126. Ravandi F, O'Brien S, Thomas D, et al. First report of phase 2 study of dasatinib with hyper-CVAD for the frontline treatment of patients with Philadelphia chromosome-positive (Ph+) acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2010;116:2070–7.
127. Ottmann O, Dombret H, Martinelli G, et al. Dasatinib induces rapid hematologic and cytogenetic responses in adult patients with Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia with resistance or intolerance to imatinib: interim results of a phase 2 study. *Blood*. 2007;110:2309–15.
128. Porkka K, Koskenvesa P, Lundan T, et al. Dasatinib crosses the blood-brain barrier and is an efficient therapy for central nervous system Philadelphia chromosome-positive leukemia. *Blood*. 2008;112:1005–12.
129. Seibel NL, Steinherz PG, Sather HN, et al. Early postinduction intensification therapy improves survival for children and adolescents with high-risk acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Blood*. 2008;111:2548–55.
130. Matloub Y, Bostrom BC, Hunger SP, et al. Escalating intravenous methotrexate improves event-free survival in children with standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Blood*. 2011;118:243–51.
131. Mattano LA, Jr, Devidas M, Nachman JB, et al. Effect of alternate-week versus continuous dexamethasone scheduling on the risk of osteonecrosis in paediatric patients with acute lymphoblastic leukaemia: results from the CCG-1961 randomised cohort trial. *Lancet Oncol*. 2012;13:906–15.
132. Dombret H, Gabert J, Boiron JM, Rigal-Huguet F, Blaise D, Thomas X et al. Outcome of treatment in adults with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia—results of the prospective multicenter LALA-94 trial. *Blood* 2002; 100: 2357–2366.

133. Jamieson CH, Amylon MD, Wong RM, Blume KG. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for patients with high-risk acute lymphoblastic leukemia in first or second complete remission using fractionated total-body irradiation and high-dose etoposide: a 15-year experience. *Exp Hematol* 2003; 31: 981–986.
134. Jain N, Lamb AV, O'Brien S, Ravandi F, Konopleva M, Jabbour E et al. Early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia/lymphoma (ETP-ALL/LBL) in adolescents and adults: a high-risk subtype. *Blood* 2016; 127: 1863–1869.
135. Balduzzi A, Valsecchi MG, Uderzo C, et al. Chemotherapy versus allogeneic transplantation for very-high-risk childhood acute lymphoblastic leukaemia in first complete remission: comparison by genetic randomisation in an international prospective study. *Lancet*. 2005;366:635–42.
136. Marks DI, Wang T, Perez WS, et al. The outcome of full-intensity and reduced-intensity conditioning matched sibling or unrelated donor transplantation in adults with Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia in first and second complete remission. *Blood*. 2010;116:366–74.
137. Leung W, Campana D, Yang J, et al. High success rate of hematopoietic cell transplantation regardless of donor source in children with very high-risk leukemia. *Blood*. 2011;118:223–30.
138. Fielding AK, Richards SM, Chopra R, Lazarus HM, Litzow MR, Buck G et al. Outcome of 609 adults after relapse of acute lymphoblastic leukemia (ALL); an MRC UKALL12/ECOG 2993 study. *Blood* 2007; 109: 944–950.
139. Bader P, Kreyenberg H, Henze GH, et al. Prognostic value of minimal residual disease quantification before allogeneic stem-cell transplantation in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia: the ALL-REZ BFM Study Group. *J Clin Oncol*. 2009;27:377–84.
140. Leung W, Pui CH, Coustan-Smith E, et al. Detectable minimal residual disease before hematopoietic cell transplantation is prognostic but does not preclude cure for children with very-high-risk leukemia. *Blood*. 2012
141. Schindler J, Gajavelli S, Ravandi F, Shen Y, Parekh S, Braunchweig I et al. A Phase I Study of a Combination of anti-CD19 and anti-CD22 Immunotoxins (Combotox) in Adult Patients with Refractory B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Br J Haematol* 2011; 154: 471–476.

142. Thomas DA, O'Brien S, Jorgensen JL, Cortes J, Faderl S, Garcia-Manero G et al. Prognostic significance of CD20 expression in adults with de novo precursor B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 13: 6330–6337.
143. Schrappe M, Hunger SP, Pui CH, et al. Outcomes after induction failure in childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 2012;366:1371–81.
144. Dreyer ZE, Dinndorf PA, Camitta B, et al. Analysis of the role of hematopoietic stem-cell transplantation in infants with acute lymphoblastic leukemia in first remission and MLL gene rearrangements: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol.* 2011;29:214–22.
145. Mann G, Attarbaschi A, Schrappe M, et al. Improved outcome with hematopoietic stem cell transplantation in a poor prognostic subgroup of infants with mixed-lineage-leukemia (MLL)-rearranged acute lymphoblastic leukemia: results from the Interfant-99 Study. *Blood.* 2010;116:2644–50. [
146. Schafer ES, Hunger SP. Optimal therapy for acute lymphoblastic leukemia in adolescents and young adults. *Nat Rev Clin Oncol.* 2011;8:417–24.
147. Mullighan CG, Phillips LA, Su X, et al., 2008, Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia., *Science.*, **322**:1377–1380.
148. Ma X, Edmonson M, Yergeau D, et al., 2015, Rise and fall of subclones from diagnosis to relapse in pediatric B-acute lymphoblastic leukaemia., *Nat Commun.*, 6
149. Mullighan CG, Zhang J, Kasper LH, et al., 2011, CREBBP mutations in relapsed acute lymphoblastic leukaemia., *Nature*, **471**:235–239
150. Malinowska-Ozdowy K, Frech C, Schonegger A, et al., 2015, KRAS and CREBBP mutations: a relapse-linked malicious liaison in childhood high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia., *Leukemia*
151. Tzoneva G, Perez-Garcia A, Carpenter Z, et al., 2013, Activating mutations in the NT5C2 nucleotidase gene drive chemotherapy resistance in relapsed ALL., *Nat Med.*, **19**:368–371.
152. Meyer JA, Wang J, Hogan LE, et al., 2013, Relapse-specific mutations in NT5C2 in childhood acute lymphoblastic leukemia., *Nat Genet.*, **45**:290–294.
153. Yang JJ, Bhojwani D, Yang W, et al., 2008, Genome-wide copy number profiling reveals molecular evolution from diagnosis to relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia., *Blood.*, **112**:4178–4183.

154. Mar BG, Bullinger LB, McLean KM, et al., 2014, Mutations in epigenetic regulators including SETD2 are gained during relapse in paediatric acute lymphoblastic leukaemia., *Nat Commun.*, **5**:3469.
155. Bhatla T, Jones CL, Meyer JA, Vitanza NA, Raetz EA, Carroll WL., 2014, The biology of relapsed acute lymphoblastic leukemia: opportunities for therapeutic interventions., *J Pediatr Hematol Oncol.*, **36**:413–418.
156. Sarah K Tasian, Mignon L Loh, and Stephen P Hunger, 2015, Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Integrating Genomics into Therapy, *Cancer*, **121(20)**: 3577–3590.
157. Shah NN, Stevenson MS, Yuan CM, Richards K, Delbrook C, Kreitman RJ et al. Characterization of CD22 expression in acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2015; 62: 964–969.
158. Piccaluga PP, Arpinati M, Candoni A, Laterza C, Paolini S, Gazzola A et al. Surface antigens analysis reveals significant expression of candidate targets for immunotherapy in adult acute lymphoid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2011; 52: 325–327.
159. Chevallier P, Robillard N, Houille G, Ayari S, Guillaume T, Delaunay J et al. Simultaneous study of five candidate target antigens (CD20, CD22, CD33, CD52, HER2) for antibody-based immunotherapy in B-ALL: a monocentric study of 44 cases in *Leukemia* 2009; England pp 806–807.
160. Carnahan J, Wang P, Kendall R, Chen C, Hu S, Boone T et al. Epratuzumab, a humanized monoclonal antibody targeting CD22: characterization of *in vitro* properties. *Clin Cancer Res* 2003; 9(10 Pt 2): 3982s–3990ss.
161. Advani AS, McDonough S, Coutre S, Wood B, Radich J, Mims M et al. SWOG S0910: a phase 2 trial of clofarabine/cytarabine/epratuzumab for relapsed/refractory acute lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2014; 165: 504–509.
162. Sharkey RM, Govindan SV, Cardillo TM, Goldenberg DM. Epratuzumab–SN-38: A New Antibody–Drug Conjugate for the Therapy of Hematologic Malignancies. *Mol Cancer Ther* 2012; 11: 224–234.
163. Otero DC, Omori SA, Rickert RC. CD19-dependent Activation of Akt Kinase in B-lymphocytes. *J Biol Chem* 2001; 276: 1474–1478.

164. Chung EY, Psathas JN, Yu D, Li Y, Weiss MJ, Thomas-Tikhonenko A. CD19 is a major B cell receptor-independent activator of MYC-driven B-lymphomagenesis. *J Clin Invest* 2012; 122: 2257–2266.
165. Ning BT, Tang YM, Chen YH, Shen HQ, Qian BQ. Comparison between CD19 and CD20 expression patterns on acute leukemic cells. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2005; 13: 943–947.
166. Horton TM, Gannavarapu A, Blaney SM, D'Argenio DZ, Plon SE, Berg SL. Bortezomib interactions with chemotherapy agents in acute leukemia *in vitro*. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006; 58: 13–23.
167. Cortes J, Thomas D, Koller C, Giles F, Estey E, Faderl S et al. Phase I Study of Bortezomib in Refractory or Relapsed Acute Leukemias. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3371–3376.
168. Messinger YH, Gaynon PS, Sposto R, v.d. Giessen J, Eckroth E, Malvar J et al. Bortezomib with chemotherapy is highly active in advanced B-precursor acute lymphoblastic leukemia: Therapeutic Advances in Childhood Leukemia & Lymphoma (TACL) Study. *Blood* 2012; 120: 285–290.
169. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, Miller CB, Coustan-Smith E, Dalton JD et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2007; 446: 758–764.
170. Maude SL, Tasian SK, Vincent T, Hall JW, Sheen C, Roberts KG et al. Targeting JAK1/2 and mTOR in murine xenograft models of Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2012; 120: 3510–3518.
171. Tasian SK, Doral MY, Borowitz MJ, Wood BL, Chen IM, Harvey RC et al. Aberrant STAT5 and PI3K/mTOR pathway signaling occurs in human CRLF2-rearranged B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2012; 120: 833–842.
172. Dai H, Wang Y, Lu X, Han W. Chimeric Antigen Receptors Modified T-Cells for Cancer Therapy. *NatlCancer Inst* 2016; 108: pii djv439.
173. Maude SL, Teachey DT, Porter DL, Grupp SA. CD19-targeted chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2015; 125: 4017–4023.
174. Suerth JD, Schambach A, Baum C. Genetic modification of lymphocytes by retrovirus-based vectors. *Curr Opin Immunol* 2012; 24: 598–608.

175. Riet T, Holzinger A, Dorrie J, Schaft N, Schuler G, Abken H. Nonviral RNA transfection to transiently modify T cells with chimeric antigen receptors for adoptive therapy. *Methods Mol Biol* 2013; 969: 187–201.
176. Barrett DM, Liu X, Jiang S, June CH, Grupp SA, Zhao Y. Regimen-specific effects of RNA-modified chimeric antigen receptor T cells in mice with advanced leukemia. *Hum Gene Ther* 2013; 24: 717–727.
177. Gilbert W. and De Souza, 1999: *Introns and the RNA world*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 221-232.
178. Atkins J.F., Gesteland R.F., Cech T., 2011, *RNA worlds: from life's origins to diversity in gene regulation*, Cold Spring Harbor Lab Press
179. Nicholson A.W., 2006, Function, mechanisms and regulation of bacterial ribonucleases, *FEMS Microbiol Rev* 23:371-390.
180. Jonathan Houseley and David Tollervey, 2009, *The Many Pathways of RNA Degradation*, *Cell* **136**: 763–776
181. Koczera Patrick, Lucas Martin, Gernot Marx and Tobias Schueholz, 2016, The ribonuclease A superfamily in humans: Canonical RNases as the Buttress of Innate Immunity, *Int J Mol Sci*, 17:1278.
182. <http://agscientific.com/blog/2017/02/17-need-to-know-facts-about-rnase-a/>, (τελευταία επίσκεψη Ιούλιος 2018)
183. Lomax Jo Ellen, 2014, *Ribonucleases and Ribonuclease Inhibitors: Structure, Function and Evolution*, 319.
184. Cooper GM., *The Cell: A Molecular Approach*, Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2nd edition., 2000
185. Allen W. Nicholson, 1999, Function, mechanism and regulation of bacterial ribonucleases, *FEMS Microbiology Reviews*, **23**:371-390
186. Reznik K.B., Lykke –Anded J., 2010, Regulated and quality-control mRNA turnover pathways in eukaryotes, *Biochem Trans*, 38:1506-1511.
187. O.M.G. Stoecklin, 2013, “RNA decay mechanisms: Specificity through diversity”, *Biochem Biophys Acta*, 4:3.
188. Schweingruber C., Rufener SC, Zund D., Yamashita A., Mublemann O., 2013, Nonsense- mediated mRNA decay-mechanisms of substrate mRNA recognition and degradation in mammalian cells, *Biochim Biophys Acta* 612-623.
189. Blackburn P., Jailkhani B.L., 1979, *J Biol Chem* 254, 12488-12493.

190. Lomax Jo Ellen, 2014, Ribonucleases and Ribonuclease Inhibitors: Structure, Function and Evolution, 319.
191. Takahashi Y., Mase K., Suzuki Y., 1970, J Neurochem 17 1433-1440.
192. Houseley J., Tollervey D., 2009, The many pathways of RNA degradation, Cell, 136:763-776.
193. Kimberly A. Dickson, Marcia C. Haigis, and Ronald T. Raines, 2005, Ribonuclease Inhibitor: Structure and Function, Prog Nucleic Acid Res Mol Biol., **80**:349–374
194. Yuhong Zuo and Murray Deutscher, 2001, Exoribonucleases surefamily: structural analysis and phylogenetic distribution, Nuc Acids Res 1017-1026.
195. Robinson R. Sophie, Antony W. Oliver, Timothy J. Chevassut and Sarah F. Newbury, 2015, The 3' to 5' exoribonuclease DIS3 from structure and mechanisms to biological Functions and Role in Human Disease, Biomolecules, 5(3)1515-1539.
196. Li M.W., Barnes t. and Lee C.H. (2010) Endoribonucleases- enzymes gaining spotlight in mRNA metabolism, FEBS Journal 277, 627-641.
197. Yuhong Zuo and Murray P. Deutscher, 2001, Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution, Nucleic Acids Res., **29(5)**: 1017–1026
198. Sorrentino S., 2011, The eight human canonical ribonucleases: Molecular diversity, catalytic properties and special biological actions of the enzyme proteins, FEBS, Lett 584:2194-2200.
199. Zhongwei Li and Murray P. Deutscher, 2004, Exoribonucleases and Endoribonucleases, EcoSalPlus
200. Deutscher M.P., 1990, Ribonucleases , tRNA nucleitidyltransferase, and the 3' processing of tRNA Prog Nucleic Acids Res. Mol. Biol. 39, 209-240.
201. Cecilia M. Arraiano, Jose M. Andrade, Susana Domingues, Ines B. Guinote, Michal Malecki, Rute G. Matos, Ricardo N. Moreira, Vania Pobre, Filipa P. Reis, Margarida Saramago, Ines J. Silva and Sandra C. Viegas, 2010, The critical role of RNA processing and degradation in the control of gene expression, FEMS Microbiol Rev., **34**:883–923
202. Wai Ming Li, Tavish Barnes and Chow H. Lee., 2010, Endoribonucleases – enzymes gaining spotlight in mRNA metabolism, FEBS Journal, **277**:627–641

203. Theodoros N. Rampias, Emmanuel G. Fragoulis and Diamantis C. Sideris, 2008, Genomic structure and expression analysis of the RNase j family ortholog gene in the insect *Ceratitis capitata*, *FEBS Journal*, **275**:6217–6227
204. Sideris DC, Fragoulis EG., 1987, Purification and characterization of a ribonuclease specific for poly(U) and poly(C) from the larvae of *Ceratitis capitata*, *Eur J Biochem* 164:309-315
205. Economopoulou MA.,Fragoulis EG., Sideris DC., 2007, Molecular cloning and characterization of the human RNase kappa, an ortholog of Cc RNase, *Nucleic Acids Res* 35:6389-6398.
206. Theodoros N. Rampias, Diamantis C. Sideris and Emmanuel G. Fragoulis, 2003, Cc RNase: the *Ceratitis capitata* ortholog of a novel highly conserved protein family in metazoans, *Nucleic Acids Research*, **31(12)**: 3092-3100
207. Marie-angela I. Economopoulou, Emmanuel G. Fragoulis and Diamantis C. Sideris, 2007, Molecular cloning and characterization of the human RNase κ , an ortholog of Cc RNase, *Nucleic Acids Research*, **35(19)**:6389–6398
208. Marianna N. Kiritsi, Emmanuel G. Fragoulis and Diamantis C. Sideris, 2012, Essential cysteine residues for human RNase κ catalytic activity, *FEBS Journal*, **279**:1318–1326
209. Evangelos D. Karousis and Diamantis C. Sideris, 2014, A Subtle Alternative Splicing Event Gives Rise to a Widely Expressed Human RNase κ Isoform, *PLOS ONE*, 9(5)
210. Brent A. Hackett, Ari Yasunaga, Debasis Panda, Michael A. Tartell, Kaycie C. Hopkins, Scott E. Hensley and Sara Cherrya, 2015, RNASEK is required for internalization of diverse acid-dependent viruses, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **112(25)**:7797–7802
211. Jill M. Perreira, Aaron M. Aker, George Savidis, ..., Annick Gauthier, Michael Franti, Abraham L. Brass, 2015, RNASEK Is a V-ATPase-Associated Factor Required for Endocytosis and the Replication of Rhinovirus, Influenza A Virus, and Dengue Virus, *Cell Reports*, **12**:850–863
212. Stetefeld Jorg and Ruegg A. Markus, 2010, Structural and Functional diversity generated by alternative mRNA splicing, *Bioch Sci*, Vol.30, 9:515-521.
213. Matlin AJ., Clark F., Smith CW., 2005, Understanding alternative splicing towards a cellular code, *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:386-398.

214. Berg J.M., Tymoczko J.L. and Stryer L., Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 7^η Έκδοση, 2012, σελ. 903-909.
215. Αναστασιάδου Βαλεντίνη-Χριστίνα, 2010, Συσχέτιση επιγενετικών μηχανισμών και του εναλλακτικού ματίσματος σε γονιδιακές θέσεις που έχουν αναλυθεί από το Human Epigenome Project, Διπλωματική Εργασία για την απόκτηση Τίτλου Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης.
216. Lee Yeon and Rio C. Donald, 2005, Mechanisms and Regulation of alternative Pre-mRNA Splicing, *Annu Rev Biochem*, 291-323.
217. Hoskins AA., Moore MJ., 2012, The spliceosome: a flexible, reversible macromolecular machine, *Trends Biochem Sci* 37:179-188.
218. Eddo Kim, Amir Goren and Gill Ast, 2008, Alternative splicing: current perspectives, *Bioessays*, 30:38-47.
219. Shlyakhovenko VO., 2016, Ribonucleases. Possible new approach in cancer therapy., *Exp Oncol.*, **38(1)**:2-8.
220. Chen Mo and Manley L. James, 2009, Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from the molecular and genomics approaches, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(11): 741-754.
221. Yan Wang, Jing Liu, Bo Huang, Yan-Mei Xu, Jing Li, Lin-Feng Huang, Jin Lin, Jing Zhang, Qing-Hua Min, Wei-Ming Yang and Xiao-Zhong Wang, 2015, Mechanism of alternative splicing and its regulation, *Biomed Rep.*, **3(2)**: 152–158
222. Stamm S., Ben Aris S., Rafalska I., Tang Y., Zhang Z. et al., 2005, Function of alternative splicing , *Gene* 344:422-430.
223. Dou Y., Fox Walsh KL., Baldi PF., Hertel K., 2006, Genomic splice-site analysis reveals frequent alternative splicing close to the dominant splice site, *RNA* 12:2047-2056
224. Gkratsou AS, Fragoulis EG, Sideris DC, 2013, The effect of cytostatic Drugs on the mRNA Expression levels of Ribonuclease κ in breast and ovarian cancer cell lines , *Anticancer Agents Med Chem*.
225. Περεντέ Γεωργία, 2016, Μελέτη της επίδρασης αντικαρκινικών φαρμάκων στα επίπεδα έκφρασης των ισομορφών της ανθρώπινης RNase κ , Διπλωματική Εργασία για την Απόκτηση του Τίτλου Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης.

226. Wan-Cheol Kim and Chow H. Lee, 2009, The role of mammalian ribonucleases (RNases) in cancer, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1796**: 99–113
227. E. Suswam, Y. Li, X. Zhang, G.Y. Gillespie, X. Li, J.J. Shacka, L. Lu, L. Zheng and P.H. King, 2008, Tristetraprolin down-regulates interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in malignant glioma cells, *Cancer Res.*, **68**:674–682.
228. K. Zhang, N. Dion, B. Fuchs, T. Damron, S. Gitelis, R. Irwin, M. O'Connor, H. Schwartz, S.P. Scully, M.G. Rock, M.E. Bolander and G. Sarkar, 2002 The human homolog of yeast SEP1 is a novel candidate tumor suppressor gene in osteogenic sarcoma, *Gene*, **298**:121–127.
229. Πετροπούλου Χριστίνα, 2017, Διπλωματική εργασία, ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΝΕΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΤΗΣ RNase κ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ, ΕΚΠΑ.
230. Μειντάνη Αγγελική, 2018, Διπλωματική εργασία, ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΝΕΩΝ ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ RNase κ ΣΕ ΛΕΥΧΑΙΜΙΕΣ, ΕΚΠΑ
231. Chomczynski, P. and N. Sacchi, The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc*, 2006. 1(2): p.581-5.