



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
Β' ΠΡΟΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ «ΑΤΤΙΚΟΝ»
ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ: ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΑΜΑΝΤΑ ΨΥΡΡΗ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΩΝ ΜΥΕΛΙΚΩΝ ΚΑΚΟΗΘΕΙΩΝ ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΟΥΣ
ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗΣ ΤΟΥ DNA

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ανθή Μπούχλα
Ιατρός, Αιματολόγος

ΑΘΗΝΑ, 2024

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

Ὀρκίζομαι ἐπὶ τὸν Ἀπόλλωνα τὸν ἰατρὸν καὶ τὸν Ἀσκληπιό
καὶ ἐπὶ τὴν ὕψις καὶ ἐπὶ τὴν Πανάκειαν καὶ εἴ οἱ θεοὶ
τοὺς θεοὺς ἐπικαλούμενοι τὴν μαρτυρίαν τοῦ, νὰ τη-
ρήσῃ πιστὰ κατὰ τὴν δύναμιν καὶ τὴν κρίσιν μου αὐτὸ τὸν
ὄρκον καὶ τὸ εὐμβολαῖόν μου αὐτό. νὰ θέλω, αὐτὸν ποῦ
μου διδάξῃ αὐτὴ τὴν τέχνην ἰεὸς με τοὺς γονεῖς μου καὶ
νὰ μοιραῖόν μου ταῦτα ὑπάρχοντα μου καὶ τὰ χήμα-
τά μου ἂν ἔχει ἀνάγκη φροντίζε. νὰ θέλω τοὺς ἀπο-
γονοὺς τοὺς ἰεοὺς με τὰ ἀδελφία μου καὶ νὰ τοὺς δι-
δάξῃ τὴν τέχνην αὐτὴν ἂν θέλω, νὰ τὴν μαθῶν, χωρὶς
ἀμοιβῆς καὶ εὐμβολαίου καὶ νὰ μεταδώσῃ με γάρ-
τελλες, ὀδηγέας καὶ συμβούλους ὅλη τὴν ὑπόλοιπὴ προ-
σέξιν μου καὶ ἐπὶ τὰ παιδιά μου καὶ ἐπὶ τὰ παιδιά ἐκείνου ποῦ με
διδάξῃ καὶ ἐπὶ τοὺς ἄλλους μαθητὰς ποῦ ἔχουν κάνει
τραπετὴν συμφωνίαν μαζί μου καὶ εἴ αὐτοὺς ποῦ ἔχουν
ὀρκισθεὶ ἐπὶ τὸν ἰατρικὸ νόμον καὶ εἰς κανόναν ἄλλο καὶ
νὰ θεραπεύω τοὺς πάσχοντες κατὰ τὴν δύναμιν μου
καὶ τὴν κρίσιν μου χωρὶς ῥοῦ, ἐκούσιος, νὰ τοὺς
βλάψῃ ἢ νὰ τοὺς ἀδικήσῃ. καὶ νὰ μὴ δώσῃ ποτε εἰς
κανένα, ἔστιν κὶ ἂν μου τὸ ζητήσῃ, θανάτηφορο
φάρμακον, οὔτε νὰ δώσῃ ποτε τέτοια συμβουλή.
ὁμοίως, νὰ μὴ δώσῃ ποτε εἰς γυναῖκα φάρμακον γιὰ
νὰ ἀποβάλλῃ. νὰ διατηρήσῃ δὲ τὴν ζωὴν μου καὶ τὴν
τέχνην μου καθαρὴν καὶ ἀγνήν, καὶ νὰ μὴ χειροῦργησῃ
πάσχοντες ἀπὸ λίθους ἀλλὰ νὰ ἀφήσῃ τὴν πρᾶξιν αὐτὴν
γιὰ τοὺς ἐδικούς. καὶ εἴ ὅποια ἐπιπία κὶ ἂν μῆν, νὰ
μῆν γιὰ τὴν ὠφελείαν τῶν πάσχοντων ἀποφεύγοντας
κάθε ἐκούσιον ἀδικίαν καὶ βλάβην καὶ καθὲ γέμεθρον
πρᾶξιν καὶ μετὰ γυναῖκες καὶ μετὰ ἀνδρας, ἐλευθέρους
καὶ δούλους. καὶ ὅτι δὴ ἢ ἀκούσῃ κατὰ τὴν δέξιν
τοῦ ἐπαγγέλματος μου, ἢ κὶ ἐκτός, γιὰ τὴν ζωὴν τῶν ἀν-
θρώπων, ποῦ δὲν πρέπει ποτε νὰ κοινωποιήσῃ, νὰ εἰσ-
πῆσῃ καὶ νὰ τὴν ἔχω μυστικόν. ἂν τὸν ὄρκον μου αὐτό
τηρήσῃ πιστὰ καὶ δὲν τὸν ἀθέτῃ, εἴθε νὰ ἀπολαύσῃ
γιὰ πάντα τὴν ἐκτίμησιν ὅλων τῶν ἀνθρώπων γιὰ τὴν ζωὴν
μου καὶ γιὰ τὴν τέχνην μου, ἂν ὅμως παραβῇ καὶ ἀθε-
τήσῃ τὸν ὄρκον μου νὰ ὑποστῇ τὰ ἀντιθέτα ἀπὸ αὐτά.

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

Καθηγήτρια Βασιλική Παππά
Καθηγήτρια Μαρία Αγγελοπούλου
Καθηγήτρια Νόρα-Αθηνά Βύνιου

Ημερομηνία Κατάθεσης Θέματος:
21/06/2017, Αρ.Πρωτ. 1617030520

Ημερομηνία Κατάθεσης Πρώτης Έκθεσης Προόδου:
12/03/2018, Αρ.Πρωτ. 1718021251

Ημερομηνία Κατάθεσης Δεύτερης Έκθεσης Προόδου:
20/3/2019, Αρ. Πρωτ.1819025982

Ημερομηνία Κατάθεσης Τρίτης Έκθεσης Προόδου:
24/2/2020, Αρ. Πρωτ.1920020996

Ημερομηνία Κατάθεσης Τέταρτης Έκθεσης Προόδου:
29/5/2024, Αρ. Πρωτ.49879

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Όνομα: Ανθή

Επώνυμο: Μπούχλα

Έτος γεννήσεως: 1978

Διεύθυνση E-mail: anthibouhla@hotmail.com

Ακαδημαϊκά Προσόντα

Πτυχίο Ιατρικής (Βαθμός 'Λίαν Καλώς')- Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ), Δεκέμβριος 2003

Τίτλος Ειδίκευσης στην Αιματολογία, Ιούνιος του 2015

Μεταπτυχιακός Τίτλος: (Βαθμός Άριστα) Αιμορραγία, Θρόμβωση, Ιατρική των Μεταγγίσεων-ΕΚΠΑ, Μάιος 2016

Υποψήφια Διδάκτωρ ΕΚΠΑ: Μελέτη της παθογένειας των μυελικών κακοηθειών με έμφαση στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης DNA από Μάρτιο 2017 εως σήμερα

Μεταπτυχιακή Φοιτήτρια ΠΜΣ: «Βιοστατιστική» ΕΚΠΑ από Σεπτέμβριο 2020 εως σήμερα

Κλινική Εμπειρία

Αγροτική Ιατρός στο Κέντρο Υγείας Πάτμου από 19/4/2004 εως 8/5/2006

Ιδιώτης ιατρός στην Κέφαλο της Κώ 1/6/2006 εως 1/11/2007

Ακαδημαϊκή Υπότροφος ΕΚΠΑ, Τμήμα Εργοσπιρομετρίας και Αποκατάστασης από 1/4/2007 εως 31/10/2007

Ειδικεύομενη ιατρός Παθολογίας στη ΒΠΠΚ του ΠΓΝ Αττικών από 13/11/2007 εως 13/11/2009

Ειδικεύομενη Ιατρός Αιματολογίας στη ΒΠΠΚ του ΠΓΝ Αττικών από 13/11/2010 εως 29/05/2015

Αιματολόγος- Ακαδημαϊκή Υπότροφος στη ΒΠΠΚ του ΠΓΝ Αττικών από 27/3/2017 εως και 10/1/2019

Αιματολόγος-Επικουρική Ιατρός στη ΒΠΠΚ του ΠΓΝ Αττικών από 11/1/2019 εως 10/1/2020

Αιματολόγος- Ακαδημαϊκή Υπότροφος στη ΒΠΠΚ του ΠΓΝ Αττικών από 8/4/2020 εως σήμερα

Ξένες Γλώσσες

Αγγλικά: Proficiency of Cambridge

Γαλλικά: Diplome Approfondi de Langue Francaise- Dalf C2

Γερμανικά: Kleines Deutches Sprachdiplom, Goethe Institut

Διδακτικό Έργο

Εκπαιδύτρια των Φοιτητών του 6^{ου}, 7^{ου} και 8^{ου} εξαμήνου της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών στην Παθολογία (Κλινική Σημειολογία- Νοσολογία και Διαφορική Διαγνωστική) στο χειμερινό και εαρινό εξάμηνο από το ακαδημαϊκό έτος 2021-2022 έως σήμερα

Συμμετοχή στο εκπαιδευτικό πρόγραμμα των ειδικευομένων ιατρών στην Αιματολογία από το ακαδημαϊκό έτος 2020-2021 έως σήμερα.

Οργανωτικό Έργο

Μέλος της Επιστημονικής Ομάδας Εργασίας για την ανάπτυξη, επεξεργασία και επικαιροποίηση του Εθνικού Μητρώου Ασθενών Νεοπλασματικές Ασθένειες.

Ερευνητικό Έργο- Δημοσιεύσεις

Bouchla A, Karatzanos E, Dimopoulos S, Tasoulis A, Agapitou V, Diakos N, Tseliou E, Terrovitis J, Nanas S. The addition of strength training to aerobic interval training: effects on muscle strength and body composition in CHF patients. J Cardiopulm Rehabil Prev. 2011 Jan-Feb;31(1):47-51

Tsirigotis P, Girkas K, Economopoulou C, **Bouchla A** et al. Pure Red Cell Aplasia due to B19 Parvovirus Infection after Autologous Stem Cell Transplantation. Case Rep Transplant. 2011; 2011: 251930

Papageorgiou SG, Vasilatou D, Kontos CK, Foukas P, Kefala M, Ioannidou ED, **Bouchla A**, et al. Treatment with 5-Azacytidine improves clinical outcome in high-risk MDS patients in the 'real life' setting: A single center observational study. Hematology. 2016 Jan;21(1):34-41

Papageorgiou SG, Kontos CK, Diamantopoulos MA, **Bouchla A** et al. MicroRNA-155-5p Overexpression in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Chronic Lymphocytic Leukemia Patients Is a Novel, Independent Molecular Biomarker of Poor Prognosis. Dis Markers. 2017;2017:2046545

Bouchla A, Papageorgiou S and Pappa V. Treatment of atypical cases of mixed MDS/MPN patients. *Haema* 2017; (8): 42-51. 28th Panhellenic Hematological Congress

Bouchla A, Papageorgiou SG, Tsakiraki Z et al. Plasmablastic Lymphoma in an Immunocompetent Patient with MDS/MPN with Ring Sideroblasts and Thrombocytosis-A Case Report. *Case Rep Hematol*. 2018 Nov 4;2018

Papageorgiou SG, Kontos CK, Tsiakanikas P, Stavroulaki G, **Bouchla A**, et al. Elevated miR-20b-5p expression in peripheral blood mononuclear cells: A novel, independent molecular biomarker of favorable prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*. 2018 Jul;70:1-7

Papageorgiou SG, Kontos CK, Kotsianidis I, Vasilatou D, Symeonidis A, Galanopoulos A, **Bouchla A** et al. The outcome of patients with high-risk MDS achieving stable disease after treatment with 5-azacytidine: A retrospective analysis of the Hellenic (Greek) MDS Study Group. *Hematol Oncol*. 2018 Oct;36(4):693-700

Gardikas N, Vikentiou M, Konsta E, Kontos CK, Papageorgiou SG, Spathis A, Bazani E, **Bouchla A** et al. Immunophenotypic Profile of CD34+ Subpopulations and Their Role in the Diagnosis and Prognosis of Patients with De-Novo, Particularly Low-Grade Myelodysplastic Syndromes. *Cytometry B Clin Cytom*. 2019 Jan;96(1):73-82

Papageorgiou SG, Diamantopoulos MA, Kontos CK, **Bouchla A** et al. MicroRNA-92a-3p overexpression in peripheral blood mononuclear cells is an independent predictor of prolonged overall survival of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2019 Mar;60(3):658-667

Papageorgiou SG, Kontos CK, Kotsianidis I, Karousi P, Symeonidis A, Galanopoulos A, **Bouchla A**, et al. Effectiveness of 5-Azacytidine in older patients with high-risk myelodysplastic syndromes and oligoblastic acute myeloid leukemia: A retrospective analysis of the Hellenic (Greek) MDS Study Group. *J Geriatr Oncol*. 2019 Jul 27. pii: S1879-4068(19)30111-0

Bouchla A, Thomopoulos T, Papageorgiou SG, Tsigotis P, Bazani E, Gkirkas Vasilatou D, Glezou E, Stavroulaki G, Gkontopoulos K, Dimitriadis G, and Pappa V. Coexistence of myeloid and lymphoid neoplasms. A single center experience. *Adv Hematol*, *Adv Hematol*. 2019 Nov 3;2019:1486476

Bouchla A and Pappa V. Treatment Advances in Myelodysplastic Syndromes. 30rd Panhellenic Hematological Congress. *Haema* 2019 (10) 398-9

Papageorgiou SG, Thomopoulos TP, Spathis A, **Bouchla A**, Glezou E, Stavroulaki G et al. Prognostic significance of monoclonal gammopathy in Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Hematol Oncol*, 2019;37(5):634-7

Pavlidis G, Papageorgiou SG, Bazani E, **Bouchla A**, Glezou E, Gkontopoulos K, Thomopoulos T, Pappa V, Vlahakos DV. Discontinuation of the renin-angiotensin system inhibitors improves erythropoiesis in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *Ther Adv Hematol*. 2021, 13;12:2

Papageorgiou SG, Divane A, Roumelioti M, Kottaridi C, **Bouchla A**, et al. Erdheim-Chester Disease and Acute Myeloid Leukemia with Mutated NPM1 in a Patient with Clonal Hematopoiesis: A Case Report. *Onco Targets Ther* 2020 Nov 16;13:11689-11695

Mpakou V, Spathis A, **Bouchla A** et al. Upregulated hypoxia inducible factor 1 α signaling pathway in high risk myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia patients is associated with better response to 5-azacytidine-data from the Hellenic myelodysplastic syndrome study group. *Hematol Oncol*. 2020 Dec 17.

Papageorgiou SG, Kotsianidis I, **Bouchla A** et al. Serum ferritin and ECOG performance status predict the response and improve the prognostic value of IPSS or IPSS-R in patients with high-risk myelodysplastic syndromes and oligoblastic acute myeloid leukemia treated with 5-azacytidine: a retrospective analysis of the Hellenic national registry of myelodysplastic and hypoplastic syndromes. *Ther Adv Hematol*. 2020 Dec 8;11:

Papadopoulos V, Diamantopoulos PT, Papageorgiou SG, Papoutselis M, Vrachiolias G, Pappa V, Galanopoulos AG, Vassilakopoulos TP, Hatzimichael E, Zikos P, Papadaki HA, **Bouchla A** et al. Estimated glomerular filtration rate independently predicts outcome of azacitidine therapy in higher-risk Myelodysplastic syndromes. Results from 536 patients of the Hellenic National Registry of Myelodysplastic and Hypoplastic syndromes. *Hematol Oncol*. 2020 Oct;38(4):541-553

Papageorgiou S, Katsikas T, Voukelatou P, Vrettos I, Papanikolaou A, **Bouchla A** et al. Multiple osteolytic lesions due to Double-Expressor Primary non-Hodgkin Lymphoma of the Bone. *Autops Case Rep*. 2020 May 6;10(2):e2020141

Bouchla A, Thomopoulos TP, Papageorgiou SG, Apostolopoulou C, Loucari C, Mpazani E, Pappa V. Predicting outcome in higher-risk myelodysplastic syndrome patients treated with azacitidine. *Epigenomics*. 2021 Jul;13(14):1129-1143

Sotirios G Papageorgiou, Thomas P Thomopoulos, Ioannis Katagas, **Anthi Bouchla**, Vassiliki Pappa. Prognostic molecular biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era and their therapeutic implications. *Ther Adv Hematol*. 2021 May 24;12: 20406207211013987

S Chatzileontiadou, E Hatjiharissi, M Angelopoulou... **A Bouchla** et al. Thromboembolic events in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH): Real world data of a Greek nationwide multicenter retrospective study. *Front Oncol*. 2023 Mar 7;13:1128994.

Anthi Bouchla, Anastasios G Kriebardis, Hara T Georgatzakou, Sotirios P Fortis et al. Red Blood Cell Abnormalities as the Mirror of SARS-CoV-2 Disease Severity: A Pilot Study. *Front Physiol*. 2022 Jan 20;12:825055

Christos Fokoloros, Periklis Foukas, Nikolaos Georgakopoulos, Zoi Tsakiraki, **Anthi Bouchla** et al. Systemic Mastocytosis in a Patient with BCR-ABL1-Positive Chronic Myeloid Leukemia in the Remission Phase. *Case Rep Hematol*. 2022 Nov 3;2022:7251658

Constantinos C Loucari, Periklis G Foukas, Aris Spathis, Zoi Tsakiraki, Christina Apostolopoulou, Thomas Thomopoulos, **Anthi Bouchla** et al. Solitary extramedullary plasmacytoma of the nasopharynx: The role of flow cytometry. *Oral Oncol*. 2021 Jul;118:105351

Anthi Bouchla, Sotirios G Papageorgiou, Argyris Symeonidis, Ioanna Sakellari, Panagiotis Zikos et al. Evaluation of complete response to azacitidine according to the revised International Working Group 2023 response criteria for higher risk MDS. Does it make a difference in patients' outcome? *Leukemia*. 2023 Dec;37(12):2517-2519

Theodora Chatzilygeroudi, Ismini Darmani, Natali El Gkotmi, Pinelopi Vryttia, Stavroula Douna, **Anthi Bouchla** et al. Real-Life Multicenter Experience of Venetoclax in Combination with Hypomethylating Agents in Previously Untreated Adult Patients with Acute Myeloid Leukemia in Greece. *J Clin Med*. 2024 Jan 19;13(2):584

Thomas P Thomopoulos, Margherita Rosati, Evangelos Terpos, Dimitris Stellas , Xintao Hu, Sevasti Karaliota, **Anthi Bouchla** et al. Kinetics of Nucleocapsid, Spike and Neutralizing Antibodies, and Viral Load in Patients with Severe COVID-19 Treated with Convalescent Plasma. *Viruses*. 2021 Sep 15;13(9):1844.

Vasiliki Pappa, **Anthi Bouchla**, Evangelos Terpos, Thomas P Thomopoulos et al. A Phase II Study on the Use of Convalescent Plasma for the Treatment of Severe COVID-19- A Propensity Score-Matched Control Analysis. *Microorganisms*. 2021 Apr 11;9(4):806

Sotirios G Papageorgiou, Ioanna Mavroeydi, Marios Kostakis..., **Bouchla A** et al. Primary Adrenal Lymphomas with Cushing's Syndrome: Two Cases with Evidence of Endogenous Cortisol Production by the Neoplastic Lymphoid Cells. *J Clin Med* . 2023 Jul 31;12(15):5032

Ερευνητικό Έργο- Ανακοινώσεις σε Διεθνή Συνέδρια

Renieris P, Gerovasili V, El Ali M, Theodoridis T, Poriasi M, **Bouchla A** et al. High incidence of positive heparin antibodies in a multidisciplinary intensive care unit. *Crit Care*. 2007; 11(Suppl 2): P372

Mpakou V, Ioannidou E.D., Vikentiou M... **Bouchla A**... et al. Quantitative and Qualitative Analysis of Regulatory T Cells (Tregs) in B Cell Chronic Lymphocytic Leukemia (B-CLL). The 57st American Society of Hematology (ASH) Meeting 2015. *Blood Volume* 126, Issue 23, 3 December 2015, Page 2928

Mpakou V, Spathis A, Kontsioti F, A. **Bouchla A** et al. Primary Resistance To Azacytidine In MDS: Preliminary Data On The Potential Role Of Hif-1a Expression – The Hellenic MDS Study Group. The 14th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes May 3-6, 2017 Valencia, Spain/ *Leukemia Research* 55 S1 (2017) S45–S167

Bouchla A, Argyriou E, Pappa V, Papageorgiou S. Assessment of the quality of reporting of randomized clinical trials in refractory relapsed multiple myeloma based on the CONSORT 2010 Statement. 5th Aegean Hematology – Oncology Symposium (AHOS 2018) Porto Heli, Greece

Bouchla A, Tsakiraki Z, Pavlidis G et al. Plasmablastic lymphoma in HIV negative patient with MDS with ring sideroblasts and thrombocytosis- a case report. Oncology Symposium (AHOS 2018) Porto Heli, Greece

Papageorgiou S, Papadopoulos V, Papoutselis , **Bouchla A** et al: Estimated Glomerular Filtration Rate Is an Independent Predictor of Outcome in High-Risk Myelodysplastic

Syndrome (MDS) and Low Blast Count Acute Myeloid Leukaemia (AML) Patients Treated with Azacitidine (AZA). a Retrospective Study from the MDS Registry of the Hellenic MDS Study Group. The 61st American Society of Hematology (ASH) Meeting 2019 Orlando Florida- Blood (2019) 134 (Supplement_1): 5423

Kontsioti F, Maratou E, **Bouchla A** et al. DNA Repair Genes' Expression Abnormalities in De Novo Acute Myelogenous Leukemia (AML): Implications for Targeted Treatment. The 61st ASH Meeting 2019 Orlando Florida- Blood (2019) 134 (Supplement_1): 5176

Kontsioti F, Maratou E, **Bouchla A**, et al. Ppp1r15a Gene Is Overexpressed In Chemoresistant Acute Myeloid Leukemia (AML). The 24th European Hematology Association (EHA) Meeting 2019 Amsterdam, the Netherlands- HemaSphere: June 2019 - Volume 3 - Issue S1 - p 784-785

Anthi Bouchla, Georgia Deliconstantinos, Theodoros Loupis , Frieda Kontsioti et al. GADD45A is Over-Expressed in The Bone Marrow Of Patients With De Novo Acute Myeloid Leukemia Refractory to Induction Chemotherapy. Hemasphere 2022; 6:S3

Kontsioti F, Maratou E, Mpakou V, **Bouchla A**. Differential Gene Expression Profile Alterations In Chemoresistant Aml Cells Following Their Exposure To Idarubicin And Cytarabine. The 23rd EHA meeting 2018 Stockholm, Sweden

Mpakou V, Spathis A, **Bouchla A** et al. Molecular Mechanisms of Primary Resistance to Azacitidine in MDS/AML Patients - Data of the Hellenic MDS Study Group. Blood (2019) 134 (Supplement_1): 5403

Anthi Bouchla, Thomas Thomopoulos, Constantinos Loucari et al. Luspatercept in the treatment of mds patients. A single center experience. 17th International Congress on Myelodysplastic Syndromes (MDS 2023), Marseille, France.

Bouchla, Anthi, Delikonstantinos, Georgia, Loupis, Theodoros et al. Differential Expression of DNA-Damage Response Genes in AML and their Correlation with Clinical Outcomes. European School of Hematology 6th International Conference on Acute Myeloid Leukemia "Molecular and Translational": Advances in Biology and Treatment

Anthi Bouchla, Theodoros Loupis, Georgia Deliconstantinos et al. Differential Gene Expression Profile in DNA Damage Signaling Pathways, in De Novo Acute Myeloid Leukemia Patients Before Induction Chemotherapy. 64th ASH Annual Meeting and Exposition, 2022 New Orleans, Louisiana.

Anthi Bouchla, Georgia Delikonstantinou, Theodoros Loupis et al. Differential Gene Expression Profile In DNA Damage Signaling Pathways, In De Novo Acute Myeloid Leukemia And Low-Risk Mds Patients. European Hematology Association Congress 2023, Frankfurt

Papageorgiou Sotirios, **Anthi Bouchla**, Konstantinos Gkontopoulos et al. The combination of ponatinib plus chemotherapy upfront achieves durable complete molecular remissions in adults patients with philadelphia chromosome- positive (ph+) acute lymphoblastic leukemia. European Hematology Association Congress 2023, Frankfurt

Konstantina Giavi , Stavros Glentis , **Anthi Bouchla** et al. A Novel Variant of the CYCS Gene Alters Apoptosis of Megakaryocytes in a Family with Thrombo-cytopenia. American Society of Hematology Meeting, San Diego 2023

T. Thomopoulos, **A. Bouchla**, A. Antoniadou, E. Terpos et al. Administration of convalescent plasma for the treatment of severe covid-19: results of a multicenter phase ii trial. European Hematology Association Congress 2022 Madrid, Spain

E.S. Fasouli, K. Giavi, C. Makri, L. Bystrykh, **A. Bouchla** et al. Distinct Role of STAT3 and STAT5 Factors in MDS and AML. American Society of Hematology Meeting, San Diego 2023

Pinelopi Vryttia , Konstantina Theocharaki , Eugenia Kazolia... **Anthi Bouchla** et al. Myelodysplastic Syndrome Red Blood Cell Physiology Abnormalities and Their Correlation with Disease Risk and Therapeutic Interventions. American Society of Hematology Meeting, San Diego 2023

Sotiropoulos D, Symeonidis... **Bouchla A**...et al. Greek Registry of Essential Thrombocythemia: Baseline Characteristic and Therapeutic Strategy. Blood 2013;122(21):2084

Zoi Tsakiraki, Sotiris Papageorgiou, Aris Spathis... **Anthi Bouchla** et al. Prognostic and Predictive Significance of Elements of the Adaptive Immunity in the Microenvironment of Myelodysplastic Syndromes Treated With 5-Azacididine. HemaSphere | 2022; 6:S3

M. Anastasiou, Z. Tsakiraki, A. Spathis, **A. Bouchla** et al. The Prognostic Role of Myocyte-Specific Enhancer Factor 2c (Mef2c) in Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphomas (DLBCL). HemaSphere 3(S1):928

Ερευνητικό Έργο- Ανακοινώσεις σε Ελληνικά Συνέδρια

A. Μπούχλα, Α. Κριεμπάρδης, Χ. Γεωργατζάκου, Σ. Φόρτης και συν. Διαταραχές των ερυθρών αιμοσφαιρίων στη λοίμωξη Sars-Cov-2 και συσχέτιση τους με την βαρύτητα της νόσου. 32^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, 2021 Αθήνα

A. Μπούχλα, Θ. Θωμόπουλος, Α. Αντωνιάδου, Ε. Τέρπος και συν. Θεραπεία με πλάσμα ιαθέντων για την αντιμετώπιση σοβαρής Covid-19: η Ελληνική εμπειρία. 32^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, 2021 Αθήνα

A. Μπούχλα, Α. Κριεμπάρδης, Σ. Φόρτης, Χ. Γεωργατζάκου και συν. Διαταραχές των ερυθροκυττάρων στη λοίμωξη Sars-Cov-2 και συσχέτιση τους με τη συγκέντρωση μικροκυστιδίων πλάσματος. 33^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, 2022 Θεσσαλονίκη

A. Μπούχλα, Χ. Γεωργατζάκου, Χ. Αποστολοπούλου, Σ. Παπαγεωργίου και συν. Αύξηση της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης πλάσματος σε ασθενείς με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο. 33^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, 2022 Θεσσαλονίκη

A. Μπούχλα, Σ. Παπαγεωργίου, Ε. Μπαζάνη, Κ. Γκοντόπουλος και συν. Ο συνδυασμός Ponatinib και χημειοθεραπείας σε ασθενείς με Β οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία Ph(+). Η εμπειρία ενός κέντρου. 33^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, 2022 Θεσσαλονίκη

A. Μπούχλα, Χ. Σωτηροπούλου, Γ. Δεληκωνσταντίνου, Θ. Λούπης και συν. Η διαταραχή του μηχανισμού απάντησης στη βλάβη του DNA στην οξεία μυελογενή λευχαιμία. Η συμμετοχή του *PPP1R15A* στην χημειοανθεκτικότητα. 33^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, 2023 Αθήνα

Ομιλήτρια σε Συνέδρια

Ημερίδα Νεοπλασματικά Αιματολογικά Νοσήματα σε Ηλικιωμένους (2019): Σύγχρονες Θεραπείες –Στόχοι – Επιτεύγματα: Ασθενής 78 ετών με λέμφωμα Hodgkin προχωρημένου σταδίου

Συνέδριο Αττικές Μέρες Παθολογίας (2021): Μικροαγγειοπαθητικές Αιμολυτικές Αναιμίες

Ημερίδα Τα Μονοκλωνικά Αντισώματα στην Κλινική Πράξη(2017): T-Αναπλαστικό NHL (CD30+) σε ασθενή <60 ετών

Ημερίδα Νέες Θεραπείες και Προκλήσεις στη Θεραπεία των Αιματολογικών Νοσημάτων (2021). ΡΗ Θετική οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία-Θεραπευτικές εξελίξεις

8^ο Περιφερικό Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Αιμαφαίρεσης 2021: Θεραπευτική Πλασμαφαίρεση: επιλογή ασθενών, τεχνικές, έλεγχος αντισωμάτων, εφαρμογή

Ημερίδα: από τη Στόχευση Αντιγόνων στην Ανοσοτροποποίηση και στη Στόχευση Μοριακών Μονοπατιών: Ασθενής με λέμφωμα μανδύα σε υποτροπή μετά από αυτόλογη μεταμόσχευση μυελού

Αιματολογικό Διήμερο Κεντρικής Ελλάδας: Αναδυόμενες Θεραπευτικές Επιλογές στην Αιματολογία. Συνύπαρξη μυελικής και λεμφικής νεοπλασίας στον ίδιο ασθενή

Ημερίδα Δερματικό Λέμφωμα 2022: Δερματικά αναπλαστικά CD30+ θεραπεία με brentuximab

48^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο 2021: Αιματολογία στην Πρωτοβάθμια Φροντίδα Υγείας

Ημερίδα Διαγνωστικές και Θεραπευτικές Προκλήσεις στα Αιματολογικά Νοσήματα (2023): Θεραπευτικές προκλήσεις στα ΜΔΣ: Υποπλαστικά ΜΔΣ και ΜΔΣ με ίνωση

34^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο (2023): Νεότερες θεραπευτικές εξελίξεις στα χαμηλού κινδύνου ΜΔΣ

Επιστημονική Εκδήλωση του Τμήματος «Μυελοδυσπλαστικών Συνδρόμων & Μυελικής Ανεπάρκειας» της Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρείας (2023): Ανθεκτικότητα στους υπομεθυλιωτικούς παράγοντες. Υπάρχουν επιλογές αντιμετώπισης;

Διημερίδα Ενσωματώνοντας το Μοντέρνο στο Κλασικό (2023): ΜΔΣ χαμηλού κινδύνου: Αδιέξοδα και αποδράσεις

Ημερίδα Εξατομικευμένη Θεραπεία στις Αιματολογικές Κακοήθειες: Μύθος ή Πραγματικότητα; Θεραπεία 1^{ης} Γραμμής στα Περιφερικά T- Λεμφώματα
Κλινικοεργαστηριακή Εκπαίδευση Στην Αιματολογία, 12ος Κύκλος:
Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία (2022): Θεραπεία ασθενών μη κατάλληλων για εντατική χημειοθεραπεία: αλγόριθμοι επιλογής και θεραπευτικοί στόχοι

9η Συνάντηση για τα Νέα Δεδομένα στις Θεραπείες για τον Καρκίνο (2023): Αιματολογικές Κακοηθειες Στην Ογκολογική Πρακτική- Μυελοδυσπλαστικό Σύνδρομο

Εμπειρία σε Παρεμβατικές Κλινικές Μελέτες

Astellas 2215-CL-0302: A Study of ASP2215 (Gilteritinib), Administered as Maintenance Therapy Following Induction/Consolidation Therapy for Subjects With FMS-like Tyrosine Kinase 3 (FLT3/ITD) Acute Myeloid Leukemia (AML) in First Complete Remission

Takeda Pevonedistat 3001: Pevonedistat Plus Azacitidine Versus Single-Agent Azacitidine as First-Line Treatment for Participants With Higher-Risk Myelodysplastic Syndromes (HR MDS), Chronic Myelomonocytic Leukemia (CMML), or Low-Blast Acute Myelogenous Leukemia (AML) (PANTHER)

Bayer 17833: Study of Copanlisib in Combination With Standard Immunochemotherapy in Relapsed Indolent Non-Hodgkin's Lymphoma (iNHL) (CHRONOS-4)

Bayer 17067: Copanlisib and Rituximab in Relapsed Indolent B-cell Non-Hodgkin's Lymphoma (iNHL)(CHRONOS-3)

Celgene: The Efficacy and Safety of Oral Azacitidine Plus Best Supportive Care Versus Placebo and Best Supportive Care in Subjects With Red Blood Cell (RBC) Transfusion-Dependent Anemia and Thrombocytopenia Due to International Prognostic Scoring System (IPSS) Low Risk Myelodysplastic Syndrome (MDS). The AZA-MDS-003 Study

Takeda: An Efficacy Study Comparing Ponatinib Versus Imatinib, Administered in Combination With Reduced-Intensity Chemotherapy, in Participants With Newly Diagnosed Ph+ ALL

Abbvie: A Safety and Efficacy Study of Oral Venetoclax Tablets and Injectable Azacitidine Versus Best Supportive Care as Maintenance Therapy in Adult Participants With Acute Myeloid Leukemia in First Remission After Conventional Chemotherapy to Evaluate Improvement in Relapse-Free Survival

GSK: Study of Single Agent Belantamab Mafodotin Versus Pomalidomide Plus Low-dose Dexamethasone (Pom/Dex) in Participants With Relapsed/Refractory Multiple Myeloma (RRMM)

Roche: A phase III, randomized, open-label, active-controlled, multicenter study evaluating the efficacy and safety of crovalimab versus eculizumab in adult and adolescent patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria currently treated with complement inhibitors.

BMS: ACE-536-MF-002 /INDEPENDENCE A Phase 3, Double-blind, Randomized Study to Compare the Efficacy and Safety of Luspatercept (ACE-536) Versus Placebo in Subjects with Myeloproliferative Neoplasm-Associated Myelofibrosis on Concomitant JAK2 Inhibitor Therapy and Who Require Red Blood Cell Transfusions

BMS: Commands a Phase 3, open-label, randomized study evaluating the efficacy and safety of Reblozyl versus epoetin alfa, for the treatment of anemia due to very low-, low- or

intermediate-risk (IPSS-R) myelodysplastic syndrome (MDS) in patients who are red blood cell (RBC) transfusion dependent and were erythropoiesis stimulating agent (ESA) naïve.

Abbvie: Transform A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 3 Study Of Navitoclax In Combination With Ruxolitinib Versus Ruxolitinib In Subjects With Myelofibrosis (TRANSFORM-1)

BMS: Study of Safety and Efficacy of Iberdomide (CC-220) and CC-99282 Combined With R-CHOP to Treat Lymphoma

Incyte: A Phase 3 Study to Assess Efficacy and Safety of Tafasitamab Plus Lenalidomide and Rituximab Compared to Placebo Plus Lenalidomide and Rituximab in Patients With Relapsed/Refractory (R/R) Follicular Lymphoma or Marginal Zone Lymphoma. (InMIND)

Roche: Polatuzumab Vedotin Plus Rituximab, Gemcitabine, And Oxaliplatin In Patients With Relapsed/Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma

GSK Dreamm14 A Phase 2, Randomized, Parallel, Open-label Study to Investigate the Safety, Efficacy, and Pharmacokinetics of Various Dosing Regimens of Single-agent Belantamab Mafodotin in Participants With Relapsed or Refractory Multiple Myeloma

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Καθηγήτρια Αιματολογίας κα Βασιλική Παππά για την πολύτιμη καθοδήγησή της από τα πρώτα στάδια της ενασχόλησής μου με την Αιματολογία. Με δίδαξε πώς να αντιμετωπίζω τον αιματολογικό ασθενή και πώς να αναπτύξω κριτική σκέψη στην έρευνα. Χάρη στην άριστη ακαδημαϊκή της κατάρτιση, την υπομονή και το ενδιαφέρον της, έγινε πραγματικότητα ένας προσωπικός μου στόχος, η εκπόνηση της διδακτορικής αυτής διατριβής. Η σύλληψη της ιδέας και ο συντονισμός της εργασίας οφείλονται αποκλειστικά στην ίδια. Η κα Παππά είναι ένας αξιόλογος επιστήμων και άνθρωπος που ξεχωρίζει για το εύρος των γνώσεων της και το ήθος της ανάμεσα στους ομότιμούς της και ήταν εξαιρετική τύχη για μένα να την έχω ως επιβλέπουσα στην ερευνητική αυτή εργασία.

Ιδιαίτερα θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον επίκουρο Καθηγητή Αιματολογίας Σωτήριο Παπαγεωργίου, ο οποίος με ενθάρρυνε στην επιλογή μου να ασχοληθώ με την ειδικότητα της Αιματολογίας και με έχει στηρίξει σε κάθε βήμα έκτοτε, τόσο σε κλινικό όσο και σε ερευνητικό επίπεδο.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω τον Καθηγητή Ογκολογίας-Αιματολογίας και Ερευνητή του Johns Hopkins Baltimore Θεόδωρο Καραντάνο, ο οποίος με τις γνώσεις του και την πολυετή εμπειρία του συνέβαλε καθοριστικά στη διενέργεια των πειραμάτων και το σχεδιασμό της έρευνας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τη συνεργάτη και χημικό κα Χριστίνα Σωτηροπούλου, για την άρτια κατάρτισή της στο πεδίο, την διαθεσιμότητά της, την ταχύτητα και την αποτελεσματικότητά της στην διεξαγωγή των πειραμάτων και την επίλυση των προβλημάτων που προέκυπταν στη διάρκεια της έρευνας.

Επίσης, για τη βοήθειά τους και την ενεργό συμμετοχή τους στην εκπόνηση της διατριβής θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής και συγκεκριμένα, τις καθηγήτριες Αιματολογίας Νόρα-Αθηνά Βύνιου και Μαρία Αγγελοπούλου καθώς επίσης και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω το σύζυγό μου για την υπομονή και την υποστήριξη του όλα αυτά τα χρόνια.

Στη μνήμη της μητέρας μου

Πρόλογος

Η Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία (AML) αποτελεί μια ετερογενή ομάδα μυελικών κακοηθειών και είναι ιδιαίτερα επικίνδυνη για τη ζωή. Επί δεκαετίες ο βασικός κορμός της θεραπείας εφόδου για την AML είναι ο συνδυασμός των χημειοθεραπευτικών παραγόντων Ιδαρουβική και Κυταραβίνη σε επιλεγμένους ασθενείς. Δυστυχώς, τα ποσοστά πρωτοπαθούς αντίστασης και υποτροπής μετά τη θεραπεία αυτή παραμένουν σημαντικά, με αποτέλεσμα να καθίσταται επιτακτική η ανάγκη ανάπτυξης νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων.

Ο μηχανισμός ανταπόκρισης στη βλάβη του DNA (DDR) αποτελείται από ένα πολύπλοκο δίκτυο μορίων και μονοπατιών που ενεργοποιείται από την επίδραση παραγόντων που προκαλούν βλάβες στο DNA, όπως οι παράγοντες που προαναφέρθηκαν. Είναι επομένως πιθανόν ότι η τροποποίηση της έκφρασης κάποιου/ων μορίων που εμπλέκονται στο μηχανισμό DDR ενδεχομένως μπορεί να επηρεάζει τη χημειοευαισθησία των λευχαιμικών κυττάρων στους παράγοντες αυτούς.

Αυτό ακριβώς επιδιώξαμε να δείξουμε σε αυτή τη μελέτη. Αρχικά μελετήσαμε συνολικά ένα πλήθος γονιδίων που εμπλέκονται στο μηχανισμό DDR και με την εφαρμογή κατάλληλης μεθοδολογίας επιλέξαμε να μελετήσουμε την αλλαγή της χημειοευαισθησίας των λευχαιμικών κυττάρων μετά από τροποποίηση της έκφρασης του γονιδίου *PPP1R15A* in vitro. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν δείχνουν ότι η μείωση της έκφρασης του *PPP1R15A* θα μπορούσε να αποτελέσει θεραπευτικό στόχο στην αντιμετώπιση της AML στο μέλλον.

Περιεχόμενα:	Σελίδες
<u>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 1.</u> Η Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία (AML)	
Κλινικά Χαρακτηριστικά AML	19
Η Παθογένεση της AML	25
Μηχανισμοί Γενετικής Βλάβης στην AML	33
<u>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 2.</u> Η Απάντηση στη Βλάβη του DNA	36
Βλάβες του DNA	39
Μηχανισμοί Επιδιόρθωσης Του DNA	44
Ο Μηχανισμός Ανταπόκρισης του DNA Στη Βλάβη- DNA Damage Response (DDR)	49
Η Κλινική Σημασία Της Ανεπάρκειας Του Μηχανισμού DDR Με Έμφαση Στη Νεοπλασία	54
<u>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u>	
Εισαγωγή και Σκοπός της Μελέτης	57
Υλικό-Μέθοδοι	58
Αποτελέσματα	66
Συμπεράσματα- Συζήτηση	77
Περίληψη	82
Summary	83
Βιβλιογραφία	84

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 1. ΟΞΕΙΑ ΜΥΕΛΟΓΕΝΗΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ (AML)

ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ AML

Ορισμός, Επιδημιολογία

Η οξεία μυελογενής λευχαιμία (acute myeloid leukemia-AML) είναι μια ετερογενής ομάδα επιθετικών νοσημάτων που χαρακτηρίζονται από συσσώρευση κλωνικών πρόδρομων μυελικών κυττάρων με απώλεια της ικανότητάς τους για διαφοροποίηση σε ώριμα κύτταρα, η οποία συνοδεύεται από κυτταροπενίες(1). Η AML μπορεί να εμφανιστεί μετά από προηγούμενη αιματολογική κακοήθεια, μετά από χημειοθεραπεία ή ακτινοβολία (secondary AML), ή χωρίς κάποιο από αυτά τα γεγονότα (de novo AML)(2).

Πρόκειται για την πιο συχνή μορφή οξείας λευχαιμίας στους ενήλικες και ευθύνεται για μεγάλο αριθμό θανάτων στις Ηνωμένες Πολιτείες με εκτιμώμενο αριθμό ετησίων κρουσμάτων 20.800 νέους ασθενείς και 11.220 θανάτους από την ασθένεια το έτος 2024, σύμφωνα με την αμερικανική στατιστική βάση για τις κακοήθειες SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results Program). Σύμφωνα με την ίδια βάση δεδομένων, η διάμεση ηλικία στη διάγνωση είναι τα 69 έτη με το ένα τρίτο περίπου των ασθενών να διαγιγνώσκονται μετά τα 75 τους έτη. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html>. Επομένως, όσο ο πληθυσμός γερνά, η επίπτωση της AML (όπως και των μυελοδυσπλαστικών συνδρομών-MDS) αυξάνεται(3).

Ταξινόμηση της AML

Το 1976 διαμορφώθηκε για πρώτη φορά από την Γαλλο- Βρετανο- Αμερικάνικη ομάδα (French-British-American-FAB ταξινόμηση) το σύστημα ταξινόμησης της AML, η οποία στηριζόταν στις κυτταροχημικές χρώσεις και τη μορφολογία για να ξεχωρίσει την AML από την οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (acute lymphoblastic leukemia-ALL) και για να ταξινομήσει τη νόσο βάσει του βαθμού της μυελικής και μονοκυτταρικής ωρίμανσης(4).

Το 1999, η παγκόσμια οργάνωση υγείας (World Health Organization) ανέπτυξε ένα καινούριο σύστημα ταξινόμησης, το οποίο περιλαμβάνει επιπλέον στοιχεία κυτταρογενετικής και ενδείξεις μυελοδυσπλασίας προκειμένου να καταρτιστούν προγνωστικές υποομάδες οι οποίοι θα καθορίσουν τη θεραπευτική στρατηγική.(5) Κατά την μετάβαση από την ταξινόμηση FAB στην ταξινόμηση WHO, το ποσοστό βλαστών για τη διάκριση μεταξύ AML και υψηλού κινδύνου MDS τροποποιήθηκε. Η ταξινόμηση FAB έθεσε το όριο ανάμεσα στα

υψηλού κινδύνου MDS και την AML στο 30%, ενώ η ταξινόμηση της World Health Organization- WHO χαμήλωσε το όριο για τη διάγνωση της AML στο 20%. Αυτή η αλλαγή βασίστηκε στο εύρημα ότι η βιολογική συμπεριφορά (και η επιβίωση) της κατηγορίας ασθενών με ανθεκτικής αναιμία με περίσσεια βλαστών σε μετατροπή (refractory anemia with excess blasts in transformation-RAEB-T), η οποία περιελάμβανε ασθενείς με ποσοστό βλαστών μεταξύ 20 και 30%, ήταν παρόμοια με αυτή των ασθενών με περισσότερες από 30% βλάστες στο μυελό. Επί κλινικής ενδείξεως, η ταξινόμηση WHO επέτρεψε να χαρακτηριστεί η νόσος εκ της γενετικής βλάβης, δηλαδή t(15;17), t(8;21) inv (16) ή t(16;16) ασχέτως ποσοστού βλαστών στο μυελό.

Το 2003 η διεθνής επιτροπή International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria αποδέχθηκε τα κυτταροχημικά και ανοσοφαινοτυπικά κριτήρια της WHO για τη διάγνωση της AML, συμπεριλαμβάνοντας και τη μορφολογική δυσπλασία (6) εάν και η τελευταία δεν αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου, διότι συνδέεται σε αυξημένη συχνότητα με κακής πρόγνωσης κυτταρογενετικές βλάβες.

Το 2008, η WHO αναθεώρησε τα διαγνωστικά κριτήρια για την AML και συμπεριέλαβε σταθερές γενετικές βλάβες οι οποίες δημιουργούνταν από αμοιβαίες αντιμεταθέσεις/αναστροφές, καθώς και μια καινούρια προσωρινή κατηγορία για κάποιους από τους μοριακούς δείκτες που βρέθηκε ότι είχαν προγνωστική σημασία (7). Επιπλέον, η κατηγορία της AML με επαναλαμβανόμενες γενετικές ανωμαλίες επεκτάθηκε ώστε να περιλαμβάνει και τις ακόλουθες κυτταρογενετικές βλάβες: t(9;11)(p22;q23), t(6,9)(p23;q34) (προσωρινή οντότητα) και την t(1;22) (p13;q13)(προσωρινή οντότητα), επιπλέον των αναγνωρισμένων από την προηγούμενη ταξινόμηση t(15;17)(q22;q12)-υποκατηγορία οξείας προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας-APL, t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13.1;q22) ή t(16;16)(p13.1;q22). Άλλες προσωρινές οντότητες περιλάμβαναν την AML με σταθερές μοριακές ανωμαλίες, όπως η μετάλλαξη του γονιδίου της νουκλεοφωσμίνης (NPM1) ή της CCAAT/enhancer-binding protein alpha (CEBPA).

Το 2016 η WHO επέκτεινε τις σταθερές γενετικές βλάβες ώστε να περιλάβει δύο ακόμα προσωρινές οντότητες, την AML με μετάλλαξη του γονιδίου RUNX1 και την AML με αναδιατάξεις του γονιδίου BCR/ABL1. Η AML με μετάλλαξη του RUNX1 συνδέεται με χειρότερη πρόγνωση και αποτέλεσε νέα προσωρινή οντότητα ενώ η AML με αναδιατάξεις του BCR/ABL1 είναι μια σπάνια μορφή AML στην οποία έχουν θέση οι αναστολείς τυροσινικής κινάσης. Επιπλέον, η μετάλλαξη CEBPA επί φυσιολογικού καρυοτύπου αποτελεί ξεχωριστή οντότητα μόνο όταν αφορά και τα δύο αλληλία(8). Οι υπόλοιπες περιπτώσεις AML χωρίς σταθερές κυτταρογενετικές ή μοριακές βλάβες υπάγονται στις κατηγορίες AML

non otherwise specified-NOS (με ελάχιστη διαφοροποίηση, χωρίς ωρίμανση-M1, με ωρίμανση-M2, οξεία μυελομονοκυτταρική-M4, οξεία μονο-βλαστική/μονοκυτταρική-M5, ερυθρολευχαιμία-M6, οξεία μεγακαρυοβλαστική-M7, οξεία βασεοφιλική και οξεία πανμυέλωση με μυελοϊνώση), σχετιζόμενη με μυελοδυσπλαστικές αλλοιώσεις AML (AML-MRC), η σχετιζόμενη με χημειοθεραπεία AML (t-AML), το μυελικό σάρκωμα, η σχετιζόμενη με σύνδρομο Down AML και η AML που εμφανίζει γενετική προδιάθεση. Η παλαιότερη οντότητα ερυθρά/μυελική ερυθρολευχαιμία (acute erythroid leukaemia, erythroid/myeloid type) καταργήθηκε.

Σύμφωνα με την ταξινόμηση της WHO 2016, διάγνωση της AML τίθεται όταν παρατηρούνται 20% ή πλέον βλάστες στο μυελό ή το περιφερικό αίμα. Εάν πληρούνται οι υπόλοιπες προϋποθέσεις περιπτώσεις με λιγότερες από 20% βλάστες μπορούν να οριστούν ως AML εφόσον συνυπάρχουν οι κυτταρογενετικές βλάβες t(15;17), t(8;21), inv (16) ή t(16;16). Επομένως η ταξινόμηση της WHO εξακολουθεί να βασίζεται κατά κύριο λόγο στις κυτταρογενετικές και μοριακές βλάβες.

Σύμφωνα με την τρέχουσα ταξινόμηση WHO 2022, το όριο του 20% βλαστών για τον ορισμό της AML καταργήθηκε για τις περιπτώσεις εκείνες οι οποίες εμφανίζουν συγκεκριμένες σταθερές γενετικές βλάβες: συντήξεις *RUNX1::RUNX1T1*, *CBFB::MYH11*, *PML::RARA*, *DEK::NUP214*, αντιμεταθέσεις *KMT2A*, *MECOM*, *NUP98* και μεταλλάξεις *NPM1*. Επομένως αυτές οι γενετικές βλάβες αρκούν για να ορίσουν την AML με οποιοδήποτε ποσοστό βλαστών κι αν συνοδεύονται. Η αλλαγή αυτή προέκυψε από την παρατήρηση ότι ακόμα και ασθενείς με ποσοστό βλαστών <20%, οι οποίοι θα διαγιγνώσκονταν ως MDS σύμφωνα με την WHO 2017 είχαν το ίδιο δυσμενή πρόγνωση με τους ασθενείς με ποσοστό ≥20%. Το ποσοστό 20% παραμένει για την AML με σύντηξη *BCR::ABL1* προκειμένου να διαχωρίζεται από τη βλαστική κρίση της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (CML), καθώς και σε περιπτώσεις με μεταλλάξεις *CEBPA* για το διαχωρισμό τους από MDS με μετάλλαξη *CEBPA*.

Επιπλέον, στη νέα ταξινόμηση WHO 2022 καταργείται ο όρος AML-MRC και αντικαθίσταται από τον όρο AML σχετιζόμενη με μυελοδυσπλασία (AML-myelodysplasia related/ AML-MR). Εδώ η ανεύρεση μορφολογικά βλαβών τύπου μυελοδυσπλασίας δεν αξιολογείται και η διάγνωση στηρίζεται αποκλειστικά σε ανεύρεση βλαστών ≥20% και συγκεκριμένων κυτταρογενετικών και μοριακών βλαβών ή/και στο ιστορικό προηγθέντος MDS ή μυελοϋπερπλαστικού/ μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου- MDS/MPN. Οι κυτταρογενετικές βλάβες είναι χαρακτηριστικές των MDS, ενώ οι μοριακές βλάβες αφορούν μεταλλάξεις των γονιδίων *ASXL1*, *BCOR*, *EZH2*, *SF3B1*, *SRSF2*, *STAG2*, *U2AF1*, *ZRSR2* οι οποίες συνδέονται με

την κλωνική αιμοποίηση αγνώστου σημασίας (clonal hematopoiesis of indetermined potential- CHIP).

Τέλος, ως δευτεροπαθής AML ορίζονται οι επόμενοι τρεις υποτύποι: η AML μετά από κυτταροτοξική θεραπεία, η AML που σχετίζεται με οικογενή προδιάθεση και η AML που σχετίζεται με το σύνδρομο Down. Οι υπόλοιπες περιπτώσεις που δεν εμπίπτουν στις ανωτέρω κατηγορίες ορίζονται με βάση τη διαφοροποίηση της AML(9).

Πέρα από την ταξινόμηση της AML κατά WHO ευρέως αποδεκτή είναι και η ταξινόμηση της AML κατά τη διεθνή επιτροπή ταξινόμησης της AML (International Consensus Classification - ICC). Σύμφωνα με την πρόσφατη ταξινόμηση της ICC 2022, περιπτώσεις με $\geq 10\%$ βλάστες στο μυελό ή το περιφερικό αίμα και σταθερές γενετικές βλάβες ορίζονται ως AML. Για τις υπόλοιπες περιπτώσεις ισχύει το όριο του $\geq 20\%$ αλλά εισάγεται μια νέα κατηγορία, αυτή με ποσοστό βλαστών μεταξύ 10 και 19% οι οποίες ορίζονται ως MDS/AML. Σκοπός αυτής της κατηγορίας είναι να επιτρέψει σε ασθενείς να συμμετέχουν σε κλινικές δοκιμές που αφορούν είτε την AML είτε τα MDS ανάλογα με τις κλινικές συνθήκες. Ο ορισμός της AML ακολουθεί αυτή τη σειρά: AML με σταθερές μεταλλάξεις > AML με μετάλλαξη TP53 > AML με μοριακές βλάβες σχετιζόμενες με μυελοδυσπλασία > AML με κυτταρογενετικές βλάβες σχετιζόμενες με μυελοδυσπλασία > AML οριζόμενη με βάση τη διαφοροποίηση. Προηγούμενα κυτταροτοξική θεραπεία, MDS ή MDS/MPN και γενετική προδιάθεση αναφέρονται για να χαρακτηρίσουν περαιτέρω την AML (10)

Προγνωστική Ταξινόμηση της AML

Στον πίνακα 1 απεικονίζεται η πρόγνωση με βάση τα κυτταρογενετικά/μοριακά χαρακτηριστικά της AML πλην της APL κατά ELN2022(11).

Πίνακας 1

Κατηγορία Κινδύνου †	Γενετική βλάβη
Ευνοϊκή	<ul style="list-style-type: none">t(8;21)(q22;q22.1)/RUNX1::RUNX1T1†,‡inv(16)(p13.1q22) ή t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB::MYH11†,‡Μετάλλαξη NPM1†,§ χωρίς FLT3-ITDbZIP εντός-πλαϊσίου μετάλλαξη CEBPA
Ενδιάμεση	<ul style="list-style-type: none">Μετάλλαξη NPM1†,§ με FLT3-ITDΑμετάλλακτο NPM1 με FLT3-ITD (χωρίς

	<p>δυσμενούς κινδύνου κυτταρογενετικές βλάβες)</p> <ul style="list-style-type: none"> • t(9;11)(p21.3;q23.3)/MLLT3::KMT2A†,¶ • Κυτταρογενετικές ή/και μοριακές βλάβες που δεν ταξινομούνται ως ευνοϊκές ή δυσμενείς
Δυσμενής	<ul style="list-style-type: none"> • t(6;9)(p23.3;q34.1)/DEK::NUP214 • t(v;11q23.3)/KMT2A-αναδιαταγμένο# • t(9;22)(q34.1;q11.2)/BCR::ABL1 • t(8;16)(p11.2;p13.3)/KAT6A::CREBBP • inv(3)(q21.3q26.2) ή t(3;3)(q21.3;q26.2)/GATA2, MECOM(EVI1) • t(3q26.2;v)/MECOM(EVI1)-αναδιαταγμένο • -5 ή del(5q); -7; -17/abn(17p) • Σύνθετος καρυότυπος,** μονοσωμικός καρυότυπος†† • Μεταλλάξεις ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1, ή/και ZRSR2‡‡ • Mutated TP53^a

† Βασίζεται κυρίως σε αποτελέσματα από ασθενείς που έλαβαν εντατική χημειοθεραπεία. Η αρχική ταξινόμηση κινδύνου μπορεί να αλλάξει κατά τη διάρκεια της θεραπείας ανάλογα με τα αποτελέσματα της ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου (measurable residual disease-MRD)

‡ Η σύγχρονη εμφάνιση μεταλλάξεων KIT ή/και FLT3 δεν αλλάζει την προγνωστική κατηγορία.

§ Η AML με μετάλλαξη NPM1 και δυσμενείς κυτταρογενετικές βλάβες κατατάσσεται ως δυσμενούς κινδύνου.

|| Μόνο εντός πλαισίου μεταλλάξεις που αφορούν τη βασική περιοχή του μοτίβου «φερμουάρ» λευκίνης (bZIP) του CEBPA, ανεξάρτητα εάν είναι μονο- ή διαλληλικές σχετίζονται με ευνοϊκή έκβαση

¶ Η παρουσία της t(9;11)(p21.3;q23.3) προηγείται άλλων σπάνιων συνυπαρχουσών μεταλλάξεων δυσμενούς κινδύνου.

Εξαιρούμενης της KMT2A με μερική εν σειρά αναδιπλασιασμό (PTD).

**Σύνθετος καρυότυπος: ≥ 3 ασυσχέτιστες χρωμοσωμικές βλάβες με απουσία άλλων σταθερών γενετικών βλαβών. Εξαιρούνται οι υπερδιπλοειδικοί καρυότυποι με τρεις ή περισσότερες τρισωμίες (πολυσωμίες) χωρίς δομικές βλάβες.

†† Μονοσωμικός καρυότυπος: παρουσία δύο ή περισσότερων διακριτών μονοσωμιών (εξαιρουμένων των απωλειών του X ή Y), ή μία μονήρης αυτοσωμική μονοσωμία σε συνδυασμό με τουλάχιστον μια δομική χρωμοσωμική βλάβη (εκτός της core-binding factor AML).

‡‡ Επί του παρόντος αυτές οι βλάβες δεν πρέπει να θεωρούνται ως δυσμενούς κινδύνου εάν συνοδεύουν υποτύπους AML με ευνοϊκή πρόγνωση.

^a Μετάλλαξη TP53 με αλληλικό φορτίο mutation τουλάχιστον 10%, ανεξάρτητα εάν η μετάλλαξη είναι μόνο ή διαλληλική. Οι μεταλλάξεις του TP53 σχετίζονται σημαντικά με AML με σύνθετο ή μονοσωμικό καρυότυπο.

Διαγνωστική προσέγγιση της AML

Σύμφωνα με τις οδηγίες του NCCN (National Comprehensive Cancer Network)-https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/aml.pdf η αρχική προσέγγιση της AML στηρίζεται σε δύο άξονες: Ο πρώτος είναι ο χαρακτηρισμός της ασθένειας βάσει παραγόντων όπως η επίδραση τοξικών ουσιών, προϋπάρχουσα μυελοδυσπλασία, καθώς και κυτταρογενετικές και μοριακές βλάβες οι οποίες μπορεί να δώσουν σημαντικές πληροφορίες για την πρόγνωση του ασθενούς όσον αφορά την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία και τον κίνδυνο υποτροπής. Ο δεύτερος επικεντρώνεται σε χαρακτηριστικά του ασθενούς όπως η κατάσταση ικανότητας και οι συννοσηρότητες, οι οποίες μπορεί να επηρεάσουν την ικανότητα του ασθενούς να λάβει χημειοθεραπεία. Τόσο οι παράγοντες που αφορούν στη νόσο όσο και αυτοί που αφορούν τον ασθενή πρέπει να ληφθούν υπόψιν προκειμένου να αποφασιστεί το θεραπευτικό πλάνο.

Η αρχική διερεύνηση της νόσου περιλαμβάνει τη λήψη ιστορικού και τη φυσική εξέταση. Ο εργαστηριακός έλεγχος περιλαμβάνει ένα εκτενή βιοχημικό έλεγχο, γενική αίματος με μικροσκόπηση του περιφερικού αίματος. Το ουρικό οξύ και γαλακτική δεϋδρογενάση του ορού (LDH) έχουν προγνωστική αξία και πρέπει να διατίθενται στον αρχικό έλεγχο (12)

Η βιοψία του οστού και η μελέτη του επιχρίσματος του μυελού (η οποία περιλαμβάνει κυτταρομετρία ροής και κυτταροχημικές χρώσεις) καθώς και η κυτταρογενετική ανάλυση που περιλαμβάνει τον καρυότυπο του μυελού και φθορίζοντα in situ υβριδισμό (Fluorescent

in Situ Hybridization)- FISH) είναι απαραίτητα για την εκτίμηση του κινδύνου και τη θεραπευτική αντιμετώπιση ασθενών με AML. Μεταλλάξεις ορισμένων γονιδίων σχετίζονται με την πρόγνωση (βαθμός τεκμηρίωσης 2, βαθμός σύστασης A) και έχουν σημασία στη θεραπευτική αντιμετώπιση του ασθενούς (βαθμός τεκμηρίωσης 2, βαθμός σύστασης B). Οι μεταλλάξεις του Ckit, FLT3-ITD, FLT3-TKD, NPM1, CEBPA, IDH1/IDH2, RUNX1, ASXL1, DNMT3A, KIT, RUNX1 και TP53 περιλαμβάνονται σε αυτή την ομάδα. Όλοι οι ασθενείς πρέπει να ελέγχονται γι' αυτές τις μεταλλάξεις με βάση τα NCCN criteria 2023, ενώ συστήνεται να γίνεται έλεγχος μεταλλάξεων των ασθενών με panel γονιδιακών μεταλλάξεων και next-generation sequencing- NGS (13), για καλύτερη συνολική εκτίμηση εφόσον υπάρχει η δυνατότητα. Ο έλεγχος των μεταλλάξεων του FLT3 πρέπει να γίνεται το γρηγορότερο δυνατόν προκειμένου να είναι άμεσα διαθέσιμα τα αποτελέσματα για να ξεκινήσει ο ασθενής τον αναστολέα της FLT3 κινάσης μιντοσταυρίνη την 8^η ημέρα της θεραπείας εφόδου(14). Επιπλέον έλεγχος περιλαμβάνει τον έλεγχο της πήξης, την καρδιολογική εκτίμηση του ασθενούς με υπερηχογράφημα καρδιάς προ της χορήγησης ανθρακκικής καθώς και την τυποποίηση των αντιγόνων HLA του ασθενούς και των πρώτου βαθμού συγγενών του, σε ασθενείς με AML οι οποίοι έχουν αρνητικούς προγνωστικούς παράγοντες κινδύνου και θα χρειαστεί να οδηγηθούν σε αλλογενή μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων-αλλοΜΑΚ. Τέλος, είναι απαραίτητο να γίνεται ταυτοποίηση των μοριακών ή κυτταρικών δεικτών με βάση τους οποίους θα προσδιορίζεται η ελάχιστη υπολειπόμενη νόσος στα διάφορα στάδια της νόσου με σκοπό την λήψη θεραπευτικών αποφάσεων.

Η ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΤΗΣ AML

Το κύτταρο προέλευσης

Η AML είναι μια ετερογενής ομάδα νοσημάτων η οποία χαρακτηρίζεται από κλωνικά κύτταρα τα οποία παρουσιάζουν διαταραχές της ωρίμανσης και αντιπροσωπεύονται σε διαφορετικά στάδια διαφοροποίησης. Τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα είναι πολυδύναμα και έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται και στις 10 αιμοποιητικές σειρές με τελική παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων, αιμοπεταλίων, ουδετεροφίλων, ηωσινοφίλων, βασεοφίλων, μονοκυττάρων, T και B λεμφοκυττάρων, κυττάρων φυσικών φονέων και δενδριτικών κυττάρων. Προκειμένου να διατηρηθεί η αιμοποίηση, τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα οργανώνονται σε μια ιεραρχία ικανή για τρεις βασικές λειτουργίες:

- Τη διατήρηση του κυττάρου εκτός κυτταρικού κύκλου (quiescence)

- Την αυτοανανέωση, με ικανότητα παραγωγής νέων αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων
- Την παραγωγή δεσμευμένων προγονικών κυττάρων

Ενώ παλαιότερα υπήρχε η αντίληψη ότι τα πολυδύναμα προγονικά κύτταρα (Multipotent Progenitors- MPPs) δεσμεύονται είτε στη μυελική είτε στη λεμφική σειρά(15), πλέον είναι γνωστό ότι δεσμεύονται είτε στη μυελική/λεμφική σειρά (Lymphoid-primed Multipotent Progenitors-LMPPs) οπότε προκύπτουν τα πρόδρομα κύτταρα της κοκκιδώδους/μονοκυτταρικής σειράς (granuloid/monocytic progenitors- GMP) και της λεμφικής σειράς είτε στη μεγακαρυοκυτταρική/ερυθρά σειρά (Megakaryocyte-Erythroid Potential-MEP)(16) και από εκεί σταδιακά ωριμάζουν στις τελικές μορφές.

Η φυσιολογική αιμοποίηση είναι μια δυναμική, πολύ στενά ελεγχόμενη διαδικασία κατά την οποία δρουν αυξητικοί παράγοντες καθώς και παράγοντες μεταγραφής. Οι τελευταίοι ενεργοποιούν διάφορα γενετικά προγράμματα, με αποτέλεσμα τη δέσμευση σε μια συγκεκριμένη σειρά και την τελική διαφοροποίηση. Έχουν περιγραφεί παράγοντες μεταγραφής οι οποίοι έχουν καθοριστική σημασία για τη δέσμευση στην ερυθρά, κοκκιδώδη/μονοκυτταρική ή μεγακαρυοκυτταρική σειρά(17, 18)

Ένα πλήθος γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν αυτούς τους μεταγραφικούς παράγοντες συμμετέχουν στις σταθερές χρωμοσωμικές αντιμεταθέσεις που παρατηρούνται στην AML, καταδεικνύοντας ότι οι αντιμεταθέσεις αυτές έχουν ως αποτέλεσμα αλλαγές στις διαδικασίες που ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση. (19)

Κλωνικότητα

Η AML είναι μια κλωνική διαδικασία η οποία προκύπτει από ένα και μοναδικό μεταλλαγμένο αιμοποιητικό κύτταρο. Σε ένα μεγάλο ποσοστό οι AML θεωρείται ότι προέρχονται από μια προλευχαιμική διαταραχή, η οποία χαρακτηρίζεται από κλωνική αιμοποίηση χωρίς άλλες ενδείξεις κακοήθειας. (20, 21)Αυτή η κατάσταση ορίζεται ως κλωνική αιμοποίηση αγνώστου σημασίας- Clonal Hematopoiesis of Indeterminate potential (CHIP) και η συχνότητά της αυξάνεται με την ηλικία, ενώ συνήθως περιλαμβάνει μια μετάλλαξη στα γονίδια DNMT3A, TET2 και ASXL1 (μεταλλάξεις που σχετίζονται με αιματολογικές κακοήθειες). Ενώ η κλωνική αιμοποίηση σχετίζεται με αυξημένο ποσοστό αιματολογικής κακοήθειας, ο απόλυτος κίνδυνος για ανάπτυξη κακοήθειας είναι μικρός.

Απόδειξη για την κλωνικότητα έχουν δώσει βιοχημικές τεχνικές X -φυλοσύνδετων ισοενζύμων όπως του G6PD, ο συνήθης καρυότυπος, οι τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA και η FISH (Fluorescent In Situ Hybridization). (22-24)

Λευχαιμικά στελεχιαία κύτταρα (Leukemic Stem Cells-LSCs)

Η AML είναι μια ετερογενής νόσος με λευχαιμικά κύτταρα διαφόρων υποτύπων, τα οποία ομοιάζουν με τα φυσιολογικά κύτταρα, σε διάφορα στάδια ωρίμανσης. Παρόλα αυτά υπάρχουν αποδείξεις ότι οι λευχαιμίες, περιλαμβανομένης της AML τροφοδοτούνται από μια δεξαμενή κακοήθων κυττάρων με ικανότητα αυτό-ανανέωσης. Με βάση την ικανότητά τους να προκαλούν τη νόσο κατά τη μεταφορά τους από τον άνθρωπο στα ανοσοανεπαρκή ποντίκια (ξеноμεταμόσχευση), δημιουργήθηκε η υπόθεση ότι ένας περιορισμένος αριθμός κυττάρων μέσα στον ευρύτερο πληθυσμό των λευχαιμικών κυττάρων έχουν την ικανότητα να λειτουργούν ως αρχέγονα κύτταρα, τα οποία διατηρούν την ικανότητα για αυτό-ανανέωση(25). Αυτά τα λευχαιμικά στελεχιαία κύτταρα (LSCs) θεωρείται ότι προέρχονται από κύτταρα που ήδη διέθεταν την ικανότητα της αυτοανανέωσης ή από πρόδρομα κύτταρα που επανέκτησαν αυτή την ικανότητα.

Σύμφωνα με αυτή την υπόθεση, η πλειονότητα των λευχαιμικών κυττάρων δεν έχει ικανότητα αυτοανανέωσης και χαρακτηρίζονται από κάποιου βαθμού διαφοροποίηση, ανάλογα με την υποκείμενη γενετική βλάβη. Παρόλα αυτά η διαδικασία ξеноμεταμόσχευσης μπορεί να μην είναι το ιδανικό πειραματικό μοντέλο για τη μελέτη της δυναμικής των λευχαιμικών στελεχιαίων κυττάρων, Όταν λεμφώματα ή λευχαιμίες από δότη ποντικό μεταμοσχεύονται σε ιστοσυμβατό ποντίκι, ένα πολύ υψηλό ποσοστό δεκτών (περισσότεροι από 1 στους 10) αναπτύσσουν τη νόσο, υποδεικνύοντας ότι τα χαμηλά αντίστοιχα ποσοστά νόσησης του ποντικού κατά τη μεταφορά του ανθρώπινου αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου έχουν σχέση με το ξένο περιβάλλον στο οποίο καλούνται να αναπτυχθούν (26)

Στάδια λευχαιμικής μετατροπής

Έχουν διατυπωθεί δύο μοντέλα σχετικά με την ετερογένεια της AML η οποία παρατηρείται σε μοριακό, κυτταρογενετικό, φαινοτυπικό και κλινικό επίπεδο.

- Η μετατροπή σε λευχαιμία με αφετηρία οποιοδήποτε αιμοποιητικό κύτταρο από το στάδιο του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου ως το στάδιο του δεσμευμένου σε μια σειρά αιμοποιητικού κυττάρου
- Η μετατροπή σε λευχαιμία με αφετηρία το αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο

Η συσχέτιση μεταξύ συγκεκριμένων κυτταρογενετικών και μοριακών γενετικών βλαβών και η μορφολογία των LSCs συνηγορεί ότι η κλωνική μετατροπή συνέβη σε διάφορα στάδια της μυελικής ωρίμανσης. Αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται από την ταξινόμηση της AML η οποία στηρίζεται στο στάδιο της διαφοροποίησης, πχ με ελάχιστη διαφοροποίηση. Επιπλέον βάση για αυτή την υπόθεση παρέχει η κυτταρομετρική/μοριακή ανάλυση των λευχαιμικών κυττάρων σε ασθενείς με οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία (APL), η οποία υπονοεί ότι το λευχαιμικό κύτταρο προέρχεται από ένα δεσμευμένο πρόδρομο πληθυσμό CD34⁺/CD38⁺ κυττάρων.(27)

Στο δεύτερο μοντέλο, η λευχαιμική εκτροπή συμβαίνει στο στάδιο του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου και η ετερογένεια της νόσου οφείλεται στην ικανότητα του κυττάρου αυτού να διαφοροποιείται και να αποκτά συγκεκριμένους φαινοτυπικούς δείκτες της εκάστοτε σειράς.(28, 29)

Μελέτες σε ποντίκια έχουν δείξει ότι η AML η οποία οφείλεται σε ισχυρά γενετικά σήματα, όπως η σύντηξη του MLL γονιδίου μπορεί να προέρχεται από δεσμευμένα κύτταρα της μυελικής σειράς, τα οποία με λίγες επιπλέον γενετικές βλάβες μπορούν να οδηγήσουν στην εκδήλωση της νόσου, ενώ αντίθετα, η AML χωρίς μείζονες κυτταρογενετικές βλάβες μπορεί να προκύπτει από τη σταδιακή συσσώρευση μεγάλου αριθμού γενετικών βλαβών στο επίπεδο του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου. Θεωρείται ότι το 10-15% των AML προέρχονται από το αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο, ενώ οι υπόλοιπες προέρχονται από κύτταρα που ανήκουν σε ένα φάσμα διαφοροποίησης από άωρα πολυδύναμα έως πιο διαφοροποιημένα προγονικά κύτταρα. (30)

Η μεταμόσχευση CD34⁺ ανθρώπινων λευχαιμικών κυττάρων (CD34⁺>10% των λευχαιμικών βλαστών) σε ανοσοανεπαρκή ποντίκια έδειξε ότι το 80% των CD34⁺ AML περιέχει 2 πληθυσμούς με ανοσοφαινότυπο CD38⁻CD90⁻CD45RA⁺ ή CD38⁺CD90⁻CD45RA⁺/CD38⁺CD110⁺CD123⁺CD45RA⁺ οι οποίοι ομοιάζουν με φυσιολογικά πρώιμα ή πιο ώριμα πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα παρά με αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα. Και οι δύο πληθυσμοί διατηρούν τη δυνατότητα να προκαλούν AML στα ποντίκια μετά από διαδοχικές μεταμοσχεύσεις και διαθέτουν συγκεκριμένη ιεραρχία: Από τα περισσότερα σε αριθμό CD38⁻ κύτταρα, τα οποία ομοιάζουν προς τα φυσιολογικά LMPP (LMPP-like LSC) προέκυπταν

τα λιγότερα σε αριθμό CD38⁺ τα οποία ομοιάζουν προς τα φυσιολογικά GMP (GMP-like LSC), αλλά όχι το αντίθετο. (16)

Από την άλλη μεριά, σε περισσότερες από το 25% των AML οι βλάστες δεν εκφράζουν CD34 και σε αυτές συχνά ανευρίσκεται μετάλλαξη του NPM1. Οι 98% των κυττάρων είναι CD34⁻ ενώ το διαμέρισμα των λευχαιμικών στελεχιαίων κυττάρων (LSCs) περιλαμβάνει τόσο CD34⁻ όσο και CD34⁺ πληθυσμού. Αυτοί οι πληθυσμοί δεν διακρίνονται από σταθερή ιεραρχία και μοιράζονται την ίδια μεταγραφική υπογραφή με τα LSCs. Επομένως σε αυτή την περίπτωση πρόκειται για το ίδιο LSC που χαρακτηρίζεται από πλαστικότητα ως προς την έκφραση του CD34.(31)

Η προστασία του LSC από τα κύτταρα του στρώματος

Τα λευχαιμικά κύτταρα της AML αναπτύσσονται στο μυελό των οστών, όπου η αλληλεπίδραση με το μικροπεριβάλλον τους τα βοηθά να αποφύγουν την επιτήρηση από το ανοσοποιητικό σύστημα(32). Δύο πειράματα σε ποντίκια με APL έδειξαν ότι η διακοπή της επικοινωνίας των λευχαιμικών κυττάρων με το περιβάλλον τους μέσω αναστολής της σήμανσης του CXCR4 είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ευαισθησίας τους στη χημειοθεραπεία(33, 34). Άλλες μελέτες δείχνουν ότι ο πολλαπλασιασμός των λευχαιμικών κυττάρων δημιουργεί ένα παθολογικό μικροπεριβάλλον στο μυελό, το οποίο δεν επιτρέπει στα φυσιολογικά αιμοποιητικά κύτταρα να αναπτυχθούν(35, 36).

Ο μεταβολισμός του LSC

Το μικροπεριβάλλον του μυελού εμφανίζει χαμηλά επίπεδα οξυγόνου διατηρώντας τα HSCs ανενεργά με το μεταβολισμό τους να βασίζεται κυρίως στην αναερόβια γλυκόλυση. Η είσοδος τους στον κυτταρικό κύκλο σχετίζεται με ενεργοποίηση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, αυξημένα επίπεδα ελευθέρων ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species-ROS) και προοδευτική φθορά των κυττάρων(37). Τα LSCs χαρακτηρίζονται κι αυτά από χαμηλά επίπεδα ROS με τη διαφορά ότι εξαρτώνται από την οξειδωτική φωσφορυλίωση περισσότερο από ό,τι τα HSCs, χρησιμοποιώντας τα λιπαρά οξέα και τα αμινοξέα ως υποστρώματα, ενώ επίσης χαρακτηρίζονται από υπερέκφραση του αντιαποπτωτικού παράγοντα BCL-2, ο οποίος επιπλέον ευοδώνει την οξειδωτική φωσφορυλίωση(38). Έχει δειχθεί ο συνδυασμός αζακιτιδίνης με τον αναστολέα του BCL-2 venetoclax έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και την επιλεκτική καταστροφή των LSCs σε ασθενείς με AML(39).

Η καταστολή της φυσιολογικής αιμοποίησης

Η παγκυτταροπενία είναι συχνό φαινόμενο σε ασθενείς με AML κατά τη διάγνυσή τους. Αρχικά υπήρχε η άποψη ότι τα λευχαιμικά κύτταρα καταλάμβαναν το χώρο των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (HSCs) ή ότι τα κατέστρεφαν. Μετέπειτα έρευνες όμως έδειξαν ότι σε ασθενείς με AML ο αριθμός των φυσιολογικών HSCs είναι σταθερός ή αυξημένος. Φαίνεται ότι στην AML τα λευχαιμικά κύτταρα αναστέλλουν την ικανότητα των φυσιολογικών HSCs να παράγουν πιο ώριμα αιμοποιητικά κύτταρα, επομένως επηρεάζεται περισσότερο η λειτουργικότητά τους παρά η ποσότητά τους. Όταν τα φυσιολογικά HSCs απομακρύνθηκαν από το λευχαιμικό περιβάλλον, η ικανότητά τους για αιμοποίηση αποκαταστάθηκε. (40)

Ο ρόλος των αυξητικών παραγόντων στην AML

Είναι γνωστό ότι τα λευχαιμικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται *in vitro* ως απάντηση σε διάφορους αυξητικούς παράγοντες της αιμοποίησης, όπως οι G-CSF, GM-CSF, M-CSF, S-CSF, IL-3 και FLT3-L και συνδυασμούς τους, οι οποίοι έχουν συνεργική δράση (41),(42),(43). Σωματικές μεταλλάξεις στον υποδοχέα του G-CSF έχουν περιγραφεί σε ασθενείς με σοβαρή συγγενή ουδετεροπενία(44, 45). Κάποιοι ασθενείς με σοβαρή συγγενή ουδετεροπενία και μεταλλάξεις στον υποδοχέα του G-CSF αναπτύσσουν AML, ενισχύοντας την υπόθεση ότι η βλάβη της μετάδοσης σήματος μέσω του υποδοχέα του G-CSF προδιαθέτει σε MDS (46) ή AML (47) μέσω αντίστασης στην απόπτωση, δίνοντας περισσότερο χρόνο για ένα «δεύτερο χτύπημα» στο κύτταρο, όπως θα περιγραφεί αμέσως παρακάτω.

Σε αρκετούς ασθενείς με AML έχει περιγραφεί αυτόνομος πολλαπλασιασμός των λευχαιμικών κυττάρων ως αποτέλεσμα της αυτοκρινούς ή παρακρινούς έκκρισης αυξητικών παραγόντων, όπως του G-CSF, GM-CSF, IL-1b και IL-6 (48). Διάφοροι ερευνητές παρατήρησαν ότι αυτός ο αυτόνομος πολλαπλασιασμός *in vitro* σχετίζεται με χαμηλότερα ποσοστά ύφεσης, και πτωχή επιβίωση(49, 50). Σε μια πολυπαραγοντική ανάλυση, η έκφραση στα λευχαιμικά κύτταρα του υποδοχέα της θρομβοποιητίνης (c-mpl) σχετιζόταν με σημαντικά μικρότερη διάρκεια της ύφεσης σε ασθενείς με AML(51). Διάφοροι μηχανισμοί έχουν προταθεί σχετικά με αυτά τα ευρήματα. Η μία εξήγηση είναι ότι ο αυτόνομος πολλαπλασιασμός των λευχαιμικών κυττάρων επιτρέπει στα λευχαιμικά κύτταρα να γίνονται πιο επιθετικά, εφόσον πλέον δεν εξαρτώνται από το στρώμα για την παραγωγή αυξητικών παραγόντων (50) και ο δεύτερος ότι η αυτόνομη παραγωγή αυξητικών παραγόντων όπως

του GM-CSF μπορεί να μειώσει την τοξικότητα των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων, αλλάζοντας τον ενδοκυττάριο μεταβολισμό τους.(52) Κάποιες μελέτες δείχνουν επίσης ότι οι αυξητικοί παράγοντες μπορεί να αναστέλλουν την απόπτωση των λευχαιμικών κυττάρων στην AML (53, 54)

Η υπόθεση των δύο χτυπημάτων στη λευχαιμογένεση

Η μετατροπή σε οξεία λευχαιμία απαιτεί μια σειρά από γενετικά γεγονότα τα οποία ξεκινούν με την κλωνική έκπτυξη του λευχαιμικού κυττάρου(55),(56). Μελέτες πολυμορφισμού γονιδίων σε δείγματα ασθενών με AML χρησιμοποιούνται ως εξέταση διαλογής για την εντόπιση γονιδίων τα οποία μπορεί να συμμετέχουν στην παθογένεση της AML (57), (58).

Η υπόθεση των δύο χτυπημάτων στη λευχαιμογένεση προτείνει ότι η AML είναι αποτέλεσμα τουλάχιστον δύο μεταλλάξεων, από τις οποίες η μία προσφέρει πλεονέκτημα πολλαπλασιασμού (μετάλλαξη τάξης I) και η άλλη μπλοκάρει τη διαφοροποίηση (μετάλλαξη τάξης II)(59). Οι μεταλλάξεις τάξης I περιλαμβάνουν τις μεταλλάξεις FLT3, PTPN11, NRAS, KIT και CBL, ενώ μεταλλάξεις του RUNX1, του CEBPA και οι αντιμεταθέσεις PML/RARA, CBFβ/MYH11, RUNX1/ETO είναι τάξης II. Οι μεταλλάξεις RUNX1 και αναδιατάξεις του MLL συμπεριφέρονται και ως τύπου I και ως τύπου II μεταλλάξεις (60, 61)

Διάφορα παραδείγματα ενισχύουν τη θεωρία του διπλού χτυπήματος στη λευχαιμογένεση. Στη χρόνια φάση της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (CML), το σύνολο των λευχαιμικών κυττάρων περιέχει την αντιμετάθεση (9;22) με αποτέλεσμα το σχηματισμό του υβριδικού γονιδίου BCR/ABL, το προϊόν του οποίου είναι απαραίτητο για την παθογένεση της CML(62). Όσο η νόσος προχωρά, συσσωρεύονται επιπλέον γενετικές βλάβες(63), οι οποίες συνοδεύονται από απώλεια σημαντικών ογκοκατασταλτικών γονιδίων όπως του p53(64). Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η παρουσία ενός υβριδικού γονιδίου από μόνη της δεν αρκεί για να οδηγήσει στην AML. Για παράδειγμα, γενετικά τροποποιημένα ποντίκια που υπερέκφραζαν τη χιμαιρική πρωτεΐνη RUNX1/RUNX1T1 ήταν υγιή σε όλη τη ζωή τους αλλά αποκτούσαν AML μετά από έκθεση σε αλκυλιούντες παράγοντες (65) ή όταν υπερέκφραζαν την WT1(66). Σε δείγματα μυελού ασθενών με AML και t(8;21) μπορεί να ανιχνεύεται το χιμαιρικό γονίδιο ακόμα και μετά από μακρά ύφεση της νόσου μετά από χημειοθεραπεία (67) ενώ έχουν ανιχνευθεί σε δείγματα αίματος νεογνών που ανέπτυξαν AML σε παιδική ηλικία(68).

Πολλές μελέτες κλωνικότητας έχουν δείξει ότι ασθενείς με AML σε κλινική ύφεση εξακολουθούν να εμφανίζουν κλωνική αιμοποίηση (69-71). Αυτό οφείλεται στην παρουσία

ενός “προλευχαιμικού κυττάρου” το οποίο έχει υποστεί μια αρχική γενετική βλάβη, η οποία όμως από μόνη της δεν ήταν ικανή να οδηγήσει σε οξεία λευχαιμία. Το κατεχοχρήν λευχαιμικό κύτταρο πιθανώς δημιούργησε έναν υποκλώνο μέσα στον αρχικό προλευχαιμικό κλώνο, αποκτώντας επιπλέον γενετικές βλάβες.(72, 73)

Η αλληλούχιση όλου του γονιδιώματος ή του συνόλου των εξονίων του σε 200 ασθενείς με AML ανίχνευσε περί τις 13 μεταλλάξεις ανά δείγμα μυελού(74). Αυτός ο αριθμός ήταν σημαντικά μικρότερος σε σχέση με τον αριθμό των μεταλλάξεων που παρατηρούνται στις συμπαγείς κακοήθειες. Κάθε ασθενής είχε κατά μέσο όρο πέντε μεταλλάξεις γονιδίων, οι οποίες ανήκουν σε μια ομάδα 23 γονιδίων τα οποία εμφανίζουν επαναλαμβανόμενες μεταλλάξεις στην AML. Αυτά τα 23 γονίδια μπορούν να ταξινομηθούν περαιτέρω σε εννέα κατηγορίες γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στην λευχαιμογένεση. Αφορούν μεταλλάξεις σε μεταγραφικούς παράγοντες (22%), ογκοκατασταλτικά γονίδια (16%), τη νουκλεοφωσμίνη (27%), γονίδια που συμμετέχουν στη μεθυλίωση του DNA (44%), χιμαιρικά γονίδια (18%), τη μετάδοση σήματος (59%), την τροποποίηση των ιστονών (30%) και το σύμπλεγμα του σπλαϊσώματος (14%). Μερικά ζεύγη μεταλλάξεων παρατηρούνταν πιο συχνά από το αναμενόμενο, για παράδειγμα οι μεταλλάξεις του FLT3 και του NPM1, υποδηλώνοντας συνέργεια, ενώ άλλες εμφάνιζαν αμοιβαίο αποκλεισμό, υποδηλώνοντας κοινή παθογενετική οδό (73).

Σε μια μελέτη 7 ασθενών με AML οι οποίοι είχαν παρουσιάσει εκτροπή από MDS, σχεδόν 85% των κυττάρων του μυελού ήταν κλωνικά κατά τη διάγνωση του MDS(75). Αλληλούχιση όλου του γονιδιώματος από δείγμα δέρματος και μυελού των ασθενών ταυτοποίησε 11 γονίδια τα οποία εμφάνιζαν επαναλαμβανόμενες μεταλλάξεις. Με την γονοτύπιση των δειγμάτων μυελού από τους ίδιους ασθενείς κατά τη διάγνωση της AML, ανιχνεύθηκαν αυτές οι μεταλλάξεις οι οποίες ήταν παρούσες και στη διάγνωση του MDS, δηλαδή οι μεταλλάξεις των γονιδίων NPM1, RUNX1, SMC3, STAG2, TP53, U2AF1, UMODL1 και ZSWIM4 καθώς και μεταλλάξεις που δημιουργήθηκαν κατά την εκτροπή σε AML, πχ CDH23, RPTN11 και WT1.

Η συσσώρευση των γενετικών βλαβών είναι μια διαδικασία πολλών βημάτων στο λευχαιμικό κύτταρο, όπως φάνηκε από μια μελέτη ανάλυσης δειγμάτων μυελού και περιφερικού αίματος στην υποτροπή και δειγμάτων δέρματος από τους ίδιους ασθενείς (76). Μετά από γενετική ανάλυση μεμονωμένων λευχαιμικών κυττάρων κατέστη δυνατή η αλληλούχιση των γενετικών γεγονότων που συνόδευσε την πορεία της νόσου. Από αυτές προκύπτουν δύο κύρια ενδεχόμενα κατά την υποτροπή της νόσου. Το πρώτο είναι η υποτροπή να προέρχεται από την εξέλιξη του κυρίαρχου κλώνου, το δεύτερο είναι η υποτροπή να προέρχεται από έναν υποκλώνο. Σπανιότερα, η υποτροπή μπορεί να οφείλεται σε νέα κλωνική εκτροπή του

αρχικού προλευχαιμικού κλώνου. Κυρίαρχος κλώνος θεωρείται αυτός που εμφανίζει μια συγκεκριμένη μετάλλαξη σε περισσότερα κύτταρα από ό,τι οι υπόλοιποι κλώνοι. Στην περίπτωση που η υποτροπή προέρχεται από την εξέλιξη του αρχικού κλώνου, ανιχνεύονται όλες οι μεταλλάξεις που είχε συγκεντρώσει ο αρχικός κλώνος πριν την έναρξη της θεραπείας, ενώ στην περίπτωση που η υποτροπή προέρχεται από υποκλώνο, δεν ανιχνεύονται όλες οι μεταλλάξεις του αρχικού κλώνου πριν την έναρξη της θεραπείας (77-80).

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΒΛΑΒΗΣ ΣΤΗΝ AML

Οι γενετικοί μηχανισμοί που σχετίζονται με τη λευχαιμογένεση στην AML μπορεί να σχετίζονται με χημειοθεραπεία, ιονίζουσα ακτινοβολία, έκθεση σε χημικούς παράγοντες ή οικογενή προδιάθεση. Αν και αυτοί οι παράγοντες εξηγούν σε σημαντικό βαθμό την παθογένεση της AML, στη συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων de novo AML δεν συντρέχει κανένας από αυτούς. Μάλιστα, σε μια σειρά 127 ασθενών με AML μετά από προηγούμενη κακοήθεια, το 30% των ασθενών δεν είχε λάβει χημειοθεραπεία ή ακτινοβολία για την αρχική νεοπλασία (81).

AML επαγόμενη από χημειοθεραπεία

Είναι γνωστό ότι η χορήγηση χημειοθεραπείας με ή χωρίς αυτόλογη μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων (αυτο-ΜΑΚ) για νεοπλάσματα όπως του μαστού και το λέμφωμα Hodgkin, μπορεί να οδηγήσει ίαση της νόσου με τίμημα την μετέπειτα εξέλιξη σε MDS ή AML (82-85). Αυτό το γεγονός υπογραμμίζει τη σημασία των υποκείμενων παθογενετικών μηχανισμών που διέπουν την ανάπτυξη της AML (86, 87).

Η t-AML εμφανίζεται χαρακτηριστικά μετά από βλάβη από αλκυλιούντες παράγοντες, τρία με πέντε χρόνια μετά τη θεραπεία για την πρώτη νεοπλασία και συνήθως προηγείται της ανάπτυξης της MDS(82). Αυτή η λανθάνουσα περίοδος δείχνει ότι πολλά επιπλέον γενετικά γεγονότα συμμετέχουν στη δημιουργία του κακοήθους φαινοτύπου(55)

Κλωνικές χρωμοσωμικές βλάβες ανιχνεύονται στην πλειονότητα των ασθενών με t-AML και αφορούν συνήθως πλήρεις ελλείψεις των χρωμοσωμάτων 5 και 7 και ελλείψεις του μακρού βραχίονά τους. Άλλες t-AML σχετίζονται με αντιμεταθέσεις του γονιδίου MLL στη θέση 11q23(88). Η AML με αντιμετάθεση 11q23 συχνά εμφανίζεται μετά από θεραπεία με αναστολείς της τοποϊσομεράσης II, όπως η ετοποσίδη και οι ανθρακυκλίνες, με πολύ σύντομο λανθάνοντα χρόνο ως τη ανάπτυξη της AML, που κυμαίνεται από 12 εως 18

μήνες(89), (90),(91). Η ταχεία απώλεια των τελομερών μετά από αυτο-ΜΑΚ μπορεί να οδηγήσει σε γενετική αστάθεια με αποτέλεσμα ανάπτυξη MDS και AML(92). Τέλος, γενετικοί πολυμορφισμοί ενός πλήθους ενζύμων που συμμετέχουν στο μεταβολισμό φαρμάκων μπορεί να αυξήσουν τον κίνδυνο για εμφάνιση AML (87, 93, 94). Για παράδειγμα, πολυμορφισμοί σε γονίδια τα οποία κωδικοποιούν τις S-τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GST), ενζύμων που συμμετέχουν στο μεταβολισμό δυνητικώς μεταλλαξιογόνων φαρμάκων, μπορεί να αυξήσουν τον κίνδυνο ανάπτυξης MDS και AML (94-96). Σε μια έρευνα ασθενών με AML ο πολυμορφισμός GSTP1 με βαλίνη στο κωδικόνιο 105 ήταν πιο συχνή σε ασθενείς με t-AML και προηγήθεισα έκθεση σε χημειοθεραπεία, ιδιαίτερα μάλιστα σε παράγοντες που αποτελούν υπόστρωμα της GST (94).

Στην αναθεωρημένη έκδοση της WHO 2022 η t-AML μετονομάζεται σε «AML post cytotoxic therapy» με υπογραμμίζεται η σημασία της προϋπάρχουσας κλωνικής αιμοποίησης και συγκεκριμένα ο μηχανισμός της επιλογής του κλώνου αυτού μετά την επίδραση της χημειοθεραπείας ή της ακτινοβολίας(97).

Ιονίζουσα ακτινοβολία

Η ιονίζουσα ακτινοβολία, όπως και οι αλκυλιούντες παράγοντες, έχει την ικανότητα να βλάπτει το DNA προκαλώντας θραύσεις της διπλής έλικας του DNA, με αποτέλεσμα μεταλλάξεις, ελλείψεις ή αναδιατάξεις οι οποίες απαιτούνται για την μετατροπή του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου σε λευχαιμικό (82, 98). Για παράδειγμα, αυξημένη επίπτωση AML, ανάλογη της έκθεσης στην ακτινοβολία παρατηρήθηκε σε επιζήσαντες από έκθεση σε ραδιενέργεια και σε ακτινολόγους ιατρούς και τεχνολόγους οι οποίοι εκτέθηκαν σε υψηλά ποσά ακτινοβολίας πριν τη δεκαετία του 1950(99, 100).

Η ιονίζουσα ακτινοβολία που χρησιμοποιήθηκε στη θεραπεία των νεοπλασιών, όπως του λεμφώματος Hodgkin, το Ca μαστού, μήτρας και πνεύμονα, έχει επίσης ενοχοποιηθεί για ανάπτυξη AML(101). Ο κίνδυνος φαίνεται πως είναι μικρός όταν η ακτινοβολία είναι η μόνη θεραπεία και αυξάνεται με την ηλικία του ασθενούς και δόσεις ακτινοβολίας μεγαλύτερες των 20Gy(88, 102). Παραμένει υπό αμφισβήτηση εάν η ακτινοβολία αυξάνει τον κίνδυνο μετά από έκθεση σε χημειοθεραπεία. Αν και κάποιες μελέτες συμφωνούν με αυτό το ενδεχόμενο, άλλες μελέτες έδειξαν ότι οι υψηλές δόσεις ακτινοβολίας περιορισμένου πεδίου σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία δεν αυξάνουν τον κίνδυνο λευχαιμικής εκτροπής(103-106).

Είναι άγνωστο εάν η έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία στα πλαίσια διαγνωστικών εξετάσεων όπως η αξονική τομογραφία οδηγεί σε αύξηση του κινδύνου για AML στους ενήλικες. Παρόλα αυτά, υπάρχουν επιδημιολογικά δεδομένα ότι η έκθεση σε ακτινοβολία X κατά την παιδική ηλικία σχετίζεται με μικρή αύξηση του κινδύνου λευχαιμογένεσης. Σε μια σειρά ατόμων οι οποίοι υποβλήθηκαν σε αξονική τομογραφία πριν την ηλικία των 22 ετών ο κίνδυνος ανάπτυξης οξείας λευχαιμίας ήταν τριπλάσιος σε αυτούς που είχαν λάβει συνολική δόση $30 \geq \text{mGy}$ (ποσότητα ισοδύναμη με 5-10 αξονικές εγκεφάλου) σε σχέση με αυτούς που είχαν λάβει $<5\text{mGy}$ (107). Παρόλα αυτά, η έκθεση στην ακτινοβολία σε παιδική ηλικία μπορεί να οδηγεί σε αύξηση του κινδύνου λευχαιμογένεσης λόγω και του αυξημένου προσδόκιμου ζωής των παιδιών.

Έκθεση σε χημικούς παράγοντες

Έκθεση σε υψηλά επίπεδα βενζολίου έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης AML(71, 108). Μέτρια έκθεση σε προϊόντα πετρελαίου σε διανομείς καυσίμων σχετίζεται με ανάπτυξη MDS αλλά όχι AML.(109, 110). Ο κίνδυνος εμφάνισης μυελικής κακοήθειας φαίνεται να είναι δόσοεξαρτώμενος, χωρίς να έχει αναγνωριστεί σαφές όριο έκθεσης(111). Η συσχέτιση με τη φορμαλδεϋδη είναι αμφιλεγόμενη, με αντικρουόμενα αποτελέσματα από τις επιδημιολογικές μετα-αναλύσεις.(112-115)

Η παρουσία των μεταλλάξεων RAS σε ασθενείς με AML έχει συσχετισθεί με επαγγελματική έκθεση σε χημικές ουσίες, καταδεικνύοντας ότι αυτή η έκθεση μπορεί να προκαλέσει γενετική βλάβη με αποτέλεσμα AML(116). Σε μια μελέτη ασθενών-μαρτύρων, το κάπνισμα τσιγάρου συνδεόταν με ελαφρώς αυξημένο κίνδυνο λευχαιμογένεσης, καθώς παρατηρήθηκε διπλάσιος κίνδυνος σε ασθενείς άνω των 60 ετών(117). Πολυμορφισμοί που οδηγούν σε απενεργοποίηση της NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1), ενός ενζύμου που καθαίρει τις κινόνες και μειώνει το οξειδωτικό stress, έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο de novo (118) αλλά και t-AML(119), καθώς και αυξημένο κίνδυνο αιματολογικής τοξικότητας και κακοήθειας από βενζόλιο(120). Στην de novo AML, η πιο σημαντική επίδραση των χαμηλών επιπέδων ή της έλλειψης NQO1 παρατηρήθηκε σε ασθενείς με χρωμοσωμικές αναδιατάξεις και αναστροφές (2,4 φορές αύξηση του κινδύνου) και ήταν ιδιαίτερα αυξημένη σε ασθενείς με inv(16) (8,1 φορές αύξηση του κινδύνου).

Τέλος, γενετικοί πολυμορφισμοί στο γονίδιο της μικροσωμικής υδρολάσης του υποξειδίου (HYL1), ενός ενζύμου που συμμετέχει στο μεταβολισμό του βενζολίου, προκαλούν το σχηματισμό καρκινογόνων ενώσεων, και αυξημένη συχνότητα AML. Έχει δειχθεί ότι το

κάπνισμα ή/και η έκθεση σε βενζόλιο σε άνδρες με έλλειψη HYL1 μπορεί να έχει σχετίζεται με την ανάπτυξη AML και t(8;21) ή -7/del(7q)(121, 122)

Οικογενής AML

Οι περισσότεροι ασθενείς με AML δεν έχουν κάποια οικογενή προδιάθεση για ανάπτυξη AML. Παρόλα αυτά, έχουν περιγραφεί σπάνιες περιπτώσεις οικογενειών με πολλαπλά περιστατικά AML και έχουν χαρακτηριστεί ως οικογενής AML και περιλαμβάνονται στην ταξινόμηση της WHO 2022(9), ενώ χάρη στις τεχνικές αλληλούχησης επόμενης γενιάς (NGS) ταυτοποιούνται συνεχώς καινούριες. Η οικογενής AML μπορεί να παρατηρηθεί στο πλαίσιο ενός ευρύτερου συνδρόμου ή να είναι μεμονωμένο γεγονός. Οικογενείς διαταραχές που σχετίζονται με ανεπαρκή διόρθωση βλαβών του DNA, όπως η αναιμία Fanconi, η συγγενής δυσκεράτωση, η μελαγχρωματική ξηροδερμία, τα σύνδρομα Bloom, Werner και Nijmegen έχουν συσχετισθεί με αυξημένη επίπτωση AML(123, 124), όπως θα συζητηθεί στο επόμενο τμήμα του γενικού μέρους.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 2. Η ΑΠΑΝΤΗΣΗ ΣΤΗ ΒΛΑΒΗ ΤΟΥ DNA

DNA: Δομή και Λειτουργία(125)

Η δομή του DNA περιγράφηκε από τους Watson και Crick το 1953 οι οποίοι διαπίστωσαν ότι αποτελείται από δύο περιελισσόμενες αλυσίδες νουκλεοτιδίων που προχωρούν σε αντίθετες κατευθύνσεις οργανωμένες σε διπλή έλικα. Ο σκελετός κάθε κλώνου της έλικας αποτελείται από ένα αμετάβλητο σάκχαρο-φώσφορο-σάκχαρο-φωσφορικό πολυμερές, όπου το σάκχαρο δεσοξυριβόζη και οι φωσφορικές ομάδες ενώνονται με εστερικούς δεσμούς στις 3' και 5' υδροξυλικές ομάδες. Στην 1' θέση του σακχαρικού δακτυλίου είναι ενωμένες μια από τις τέσσερις αζωτούχες βάσεις. Δύο από αυτές, η αδενίνη (A) και η γουανίνη (G) είναι πουρίνες, ενώ οι άλλες δύο, η κυτοσίνη (C) και η θυμίνη (T) είναι πυριμιδίνες. Οι βάσεις είναι τοποθετημένες στο εσωτερικό της έλικας όπως ένας σωρός νομισμάτων, σε απόσταση 3,4 Å η μια από την άλλη. Η έλικα συγκρατείται με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων (αδενίνη- θυμίνη και γουανίνη- κυτοσίνη).

Ακολούθως, αποκαλύφθηκε ότι οι βάσεις του DNA κωδικοποιούν γονίδια που μεταγράφονται σε αγγελιοφόρο ριβονουκλεϊκό οξύ (messenger RNA-mRNA) και στη συνέχεια μεταφράζονται σε πρωτεΐνες. Επομένως η αλληλουχία του DNA εμπεριέχει

πληροφορίες που καθορίζουν το χρόνο και το ποσό της πρωτεϊνικής έκφρασης σε ένα δεδομένο κυτταρικό τύπο. Το γονιδιακό DNA εμφανίζει περαιτέρω διακριτές περιοχές, τα ιντρόνια (νουκλεοτιδικές αλληλουχίες εντός του γονιδίου οι οποίες απομακρύνονται με τη συναρμογή του mRNA κατά την ωρίμανση του τελικού προϊόντος RNA) και τα εξόνια (που κωδικοποιούν τμήματα του ώριμου mRNA που παράγεται από αυτό το γονίδιο). Περιοχές του DNA που δεν κωδικοποιούν mRNA λέγονται διαγονιδιακές.

Η μέθοδος πακεταρίσματος του DNA συνίσταται σε ένα πολύπλοκο σύστημα περιέλιξης. Βασικές πρωτεΐνες, που ονομάζονται ιστόνες (4 ζεύγη-H2A, H2B, H3, και H4) σχηματίζουν ένα πυρήνα γύρω από τον οποίο το DNA περιελίσσεται σε διπλό βρόγχο που αποτελείται από 146bp DNA. Αυτή η μονάδα ονομάζεται νουκλεόσωμα και κατά αυτό τον τρόπο το DNA συμπυκνώνεται κατά 7 φορές. Το ανθρώπινο γονιδίωμα συνίσταται σε $2,9 \times 10^9$ ζεύγη νουκλεοτιδίων πακεταρισμένα σε 22 αυτοσωμικά χρωμοσώματα και 2 φυλετικά χρωμοσώματα.

Ο Κυτταρικός Κύκλος

Προκειμένου ένα κύτταρο να μπορέσει να διαιρεθεί με επιτυχία κατά τη διαδικασία της μίτωσης, χρειάζεται να περάσει με τη αυστηρή σειρά ιεραρχίας τα εξής τέσσερα στάδια: Καταρχήν μπαίνει στην προπαρασκευαστική φάση πρωτεϊνοσύνθεσης (G1), κατά την οποία το κύτταρο αυξάνει σε μέγεθος εν αναμονή του διπλασιασμού του DNA (φάση S). Η πρωτεΐνη PPP1R15A οδηγεί μέσω αποφωσφορυλίωσης του παράγοντα αναστολής έναρξης της μετάφρασης eIF-2A/EIF2S1, σε επανέναρξη της πρωτεϊνοσύνθεσης και έξοδο των κυττάρων από το stress. Συνεπώς η αυξημένη της έκφραση οδηγεί σε πλεονέκτημα επιβίωσης των κυττάρων μετά την επίδραση βλαπτικών ερεθισμάτων (126) .

Το κύτταρο κατόπιν προχωρά στη φάση G2 κατά την οποία προετοιμάζεται για τον ομότιμο διαχωρισμό του γενετικού υλικού που θα λάβει χώρα στη φάση της μίτωσης (φάση M), οπότε και θα προκύψουν δύο όμοια θυγατρικά κύτταρα. Από τη φάση G1 το κύτταρο έχει τη δυνατότητα να βγει από τον κυτταρικό κύκλο και να μπει σε φάση αδράνειας (φάση G0), να υποστεί περαιτέρω διαφοροποίηση ή να επανεισέλθει στον κυτταρικό κύκλο προκειμένου να πολλαπλασιαστεί ως απάντηση σε διέγερση από αυξητικούς παράγοντες. Οι αυξητικοί παράγοντες προσδένονται σε ειδικούς υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας και ενεργοποιούν οδούς μετάδοσης σήματος όπως η οδοί RAS/RAF, JAK/STAT και PI3K/STAT με αποτέλεσμα την επαγωγή του κυτταρικού κύκλου(127-129).

Ο κύριος μοριακός μηχανισμός ο οποίος ελέγχει τον κυτταρικό κύκλο στα θηλαστικά αποτελείται από μια οικογένεια πρωτεϊνικών κινασών σερίνης/θρεονίνης, οι οποίες λέγονται

κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (cyclin-dependent kinases -CDKs). Πρόκειται για ενζυμικές πρωτεΐνες οι οποίες ενεργοποιούνται ως επί το πλείστον από τη σύνδεσή τους με τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες κυκλίνες. Η ενεργοποίηση των συμπλεγμάτων κυκλίνης/κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης (CDK/cyclin complexes) ρυθμίζεται περαιτέρω από τους αναστολείς των κυκλινοεξαρτώμενων κινάσεων (CDK inhibitors- CKIs), όπως επίσης από τη φωσφορυλίωση και την αποφωσφορυλίωση και την αποδόμηση μέσω ουμπικιτίνωσης(130). Η οικογένεια των CDKs/κυκλινών/CKIs αριθμεί πάνω από 30 διαφορετικές πρωτεΐνες, οι οποίες εμπλέκονται σε ζωτικής σημασίας κυτταρικές λειτουργίες όπως η μεταγραφή, η επιδιόρθωση των βλαβών του DNA, η επιγενετική τροποποίηση, ο μεταβολισμός, η πρωτεολυτική αποδόμηση, η ανανέωση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, οι λειτουργίες των νευρώνων και η σπερματογένεση(131).

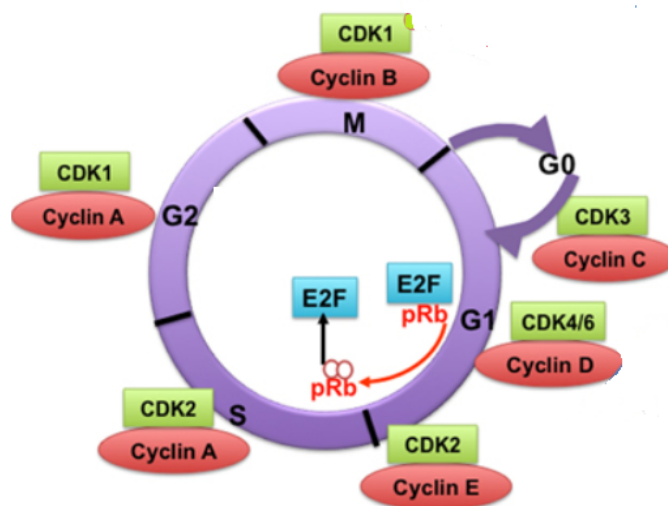
Στις κύριες CDKs οι οποίες ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο στα θηλαστικά σχηματίζοντας σύμπλεγμα με τις κυκλίνες περιλαμβάνονται οι CDK3, CDK4, CDK6, CDK2 και η CDK1. Η CDK3 σε συνδυασμό με την κυκλίνη C ωθεί το κύτταρο να εξέλθει από την αδράνεια και να μπει στον κυτταρικό κύκλο(132). Στην απλούστερη εκδοχή του, ο κυτταρικός κύκλος στα θηλαστικά εξελίσσεται ως εξής: Στην αρχή της φάσης G1, το σύμπλεγμα CDK4/CDK6 σε συνδυασμό με την κυκλίνη D λαμβάνουν σήματα μέσω των αυξητικών παραγόντων, τα οποία έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του κυτταρικού κύκλου. Καθοριστικά συμβάντα αποτελούν αφενός η έναρξη της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (retinoblastoma protein- pRb) και αφετέρου η φωσφορυλίωση και απομάκρυνση των πρωτεϊνών p21^{Cip1} και p27^{Kip1}, οι οποίες είναι αμφότερες αναστολείς της κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης CDK2. Η πρωτεΐνη p21 λέγεται αλλιώς cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKN1A). Με αυτό τον τρόπο προωθείται η ενεργοποίηση του συμπλέγματος CDK2/ cyclin E (133). Στο τέλος της φάσης G1, η CDK2 σε συνδυασμό με την κυκλίνη E ολοκληρώνει την φωσφορυλίωση- απενεργοποίηση της pRb, η οποία με τη σειρά της αποδεσμεύει τον μεταγραφικό παράγοντα E2F(134). Ο E2F προάγει την μεταγραφή της κυκλίνης E, η οποία είναι απαραίτητη για τη μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Η αποδόμηση των πρωτεϊνών Cip/Kip και η ευόδωση των κυκλινών από τον E2F έχουν ως αποτέλεσμα η διαδικασία εφεξής να μην εξαρτάται από μιτογόνους παράγοντες και την καθιστά μη αναστρέψιμη.

Η μετάβαση διαμέσου της φάσης S διαμεσολαβείται από το σύμπλεγμα CDK2/cyclin A. Το σύμπλεγμα CDK1/κυκλίνης A προετοιμάζει το κύτταρο για τη μίτωση κατά τη διάρκεια της φάσης G2(135, 136). Η φωσφορυλίωση της κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης CDK1 στη Thr14 (από την κινάση Myt1) και της Tyr15 (από την κινάση WEE-1)(137), αναστέλλει τη

δραστικότητά της κατά τη διάρκεια της φάσης G2 του κυτταρικού κύκλου, ενώ η αποφωσφορυλίωσή της στα ίδια σημεία από τη φωσφατάση CDC25C έχει ως αποτέλεσμα την επανενεργοποίηση στα αρχικά στάδια της μίτωσης (138). Η μίτωση ξεκινά μετά την αποδόμηση του WEE-1 και αφού η φωσφατάση CDC25C αναστρέψει την ανασταλτική φωσφορυλίωση του συμπλέγματος CDK1/cyclin B.

Τέλος, υπάρχει το σημείο ελέγχου της μιτωτικής ατράκτου το οποίο έχει καθοριστική σημασία για την έναρξη της ανάφασης. Πρόκειται για ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών που αναστέλλει την πρόσδεση των ινιδίων της μιτωτικής ατράκτου στους κινητοχώρους μέχρις ότου τα χρωμοσώματα παραταχθούν σωστά. Όταν ενεργοποιείται αυτό το σημείο ελέγχου, δεν γίνεται η πρόσδεση των ινιδίων τουμπουλίνης στο κεντρόσωμα, ενώ όταν αίρεται αυτό, η μίτωση προχωρά κανονικά. (139, 140)

Μια συνοπτική απεικόνιση του κυτταρικού κύκλου εμφανίζεται στην εικόνα 1.



Εικόνα 1. Ο κυτταρικός κύκλος

ΒΛΑΒΕΣ ΤΟΥ DNA

Είναι γνωστό ότι το DNA του γονιδιώματος υφίσταται απειλή από διάφορους ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες ως συνέπεια του κυτταρικού μεταβολισμού και της έκθεσης σε πηγές του περιβάλλοντος (χημικά, τοξίνες, υπεριώδης ακτινοβολία, ιονίζουσα ακτινοβολία). Οι παράγοντες αυτοί προκαλούν βλάβες στο DNA που δυνητικά οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο ή μεταλλάξεις (141).

Τα θηλαστικά έχουν αναπτύξει διάφορους μηχανισμούς με τους οποίους αντιδρούν στους παράγοντες που προσβάλλουν το γονιδίωμα. Κατά συνέπεια, κατά τη βλάβη μπορούν να

προκληθούν οι εξής κυτταρικές απαντήσεις: α) ενεργοποίηση των μηχανισμών που καθυστερούν προσωρινά την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, έστε να επιτευχθεί η επιδιόρθωση των βλαβών β) απόπτωση του κυττάρου, αν η βλάβη είναι εκτεταμένη γ) αλλαγές στο μεταγραφικό προφίλ του κυττάρου, οι οποίες αποβαίνουν ευνοϊκές για το κύτταρο δ) ανοχή της βλάβης, η οποία μπορεί να είναι δυσμενής για τον οργανισμό και να επηρεάσει την ανάπτυξή του και ε) ενεργοποίηση μηχανισμών οι οποίοι αναστρέφουν ή επιδιορθώνουν τη βλάβη. Οι μηχανισμοί αυτοί ρυθμίζονται στενά ώστε να διατηρηθεί ένα ανεκτό ποσοστό μετάλλαξης και να μην διαταραχθεί η γενετική σταθερότητα(142).

Εκτιμάται ότι ο αριθμός βλαβών του DNA που συμβαίνουν καθημερινά στο ανθρώπινο γονιδίωμα κυμαίνεται από 10^4 έως 10^6 ανά κύτταρο, οπότε στον ενήλικα (10^{12} κύτταρα) απαιτούνται 10^{16} - 10^{18} επιδιορθώσεις την ημέρα. Υπάρχουν δύο κατηγορίες βλαβών του DNA, οι ενδογενείς και οι εξωγενείς. Οι ενδογενείς βλάβες του DNA προέρχονται κατά κύριο λόγο από αντιδράσεις του DNA με το νερό και τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (Reactive Oxygen Species-ROS). Πρόκειται για αντιδράσεις υδρόλυσης και οξειδωσης αντίστοιχα. Αυτές οι αντιδράσεις συμβαίνουν φυσιολογικά μέσα στο κύτταρο. Αυτές οι βλάβες προκαλούν κατά κύριο λόγο αλλαγή στις βάσεις του DNA. Οι εξωγενείς βλάβες του DNA, από την άλλη μεριά, συμβαίνουν όταν περιβαλλοντικοί, φυσικοί ή χημικοί παράγοντες βλάπτουν το DNA. Παραδείγματα τέτοιων παραγόντων είναι η υπεριώδης ακτινοβολία (UltraViolet radiation-UV), η ιονίζουσα ακτινοβολία και διάφοροι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες. Αυτές οι βλάβες προκαλούν κατά κύριο λόγο βλάβες στο σκελετό του DNA (143)

Βλάβες του DNA από Ενδογενείς Παράγοντες

Σφάλματα κατά την αντιγραφή του DNA

Σε κάθε αντιγραφή του DNA, περίπου 3×10^9 βάσεις αντιγράφονται με τη βοήθεια των πολυμερασών υψηλής ακρίβειας δ και ϵ , οι οποίες λειτουργούν στην κατεύθυνση 5'-3'. Η πολυμεράση ϵ χρησιμοποιείται για την αντιγραφή της συνεχούς αλυσίδας του DNA (leading strand) ενώ η πολυμεράση δ χρησιμοποιεί για την αντιγραφή της ασυνεχούς αλυσίδας του DNA (lagging strand) αλλά και της συνεχούς αλυσίδας. Οι πολυμεράσες αυτές έχουν επιπλέον δράση 3'-5' εξονουκλεάσης, η οποία τους προσδίδει διορθωτική ικανότητα (proofreading) με αναγνώριση και απομάκρυνση της τελευταίας βάσης που προστέθηκε, εφόσον αυτή είναι λανθασμένη. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9839/>

Αντιδράσεις υδρόλυσης του DNA

Η απλούστερη δυνητικά βλαβερή για το DNA αντίδραση υδρόλυσης είναι αυτή η οποία διαλύει το γλυκοσιδικό δεσμό μεταξύ του σακχάρου και της βάσης στα πουρινικά νουκλεοτίδια (αυτά που έχουν ως βάση την αδερίνη ή τη γουανίνη). Το προϊόν είναι μια θέση χωρίς βάση (abasic site), η οποία έχει χάσει τη γενετική πληροφορία και κατά συνέπεια μπορεί να οδηγήσει σε μεταλλάξεις κατά τη διάρκεια της αντιγραφής. Έχει εκτιμηθεί ότι καθημερινά δημιουργούνται 10.000 αβασικές θέσεις σε κάθε ανθρώπινο κύτταρο, οι οποίες μπορούν αυθόρμητα να διασπαστούν και να σχηματίσουν κυτταροτοξικές βλάβες στη μια έλικα του DNA (Single Strand Breaks- SSBs)(144)

Μια δεύτερη υδρολυτική αντίδραση μπορεί να γίνει στις αζωτούχες ομάδες των βάσεων κυτοσίνης, 5-μεθυλοκυτοσίνης, αδερίνης και γουανίνης με προϊόντα τις βάσεις ουρακίλη, θυμίνη, υποξανθίνη και ξανθίνη αντίστοιχα. Αυτή η απώλεια της αζωτούχου ομάδας από τις βάσεις έχει ως αποτέλεσμα αλλαγές στην κωδική αλληλουχία. Η πιο σημαντική βλάβη από αυτές είναι ο σχηματισμός ουρακίλης από κυτοσίνη(145).

Βλάβες του DNA από ελεύθερες ρίζες οξυγόνου

Επιπροσθέτως, μεταβολές στις βάσεις του DNA μπορεί να προκαλέσουν τα προϊόντα κυτταρικού μεταβολισμού και κυρίως οι ρίζες οξυγόνου (Reactive oxygen species -ROS). Οι ROS είναι τυπικά παραπροϊόντα της αναπνευστικής αλυσού κατά τη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης(146). Οι κυριότερες ROS είναι οι ρίζες υπεροξειδίου ($\bullet\text{O}_2^-$), υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), και η ρίζα του υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$). Από αυτές η τελευταία είναι η πιο επιβλαβής για το DNA. Οι πιο σημαντικές βλάβες DNA που δημιουργούνται περιλαμβάνουν την 8-οξογουανίνη, η οποία είναι μεταλλαξιόγonos (συνδέεται με την αδερίνη με αποτέλεσμα την αντικατάσταση της γουανίνης από θυμίνη και της κυτοσίνης από αδερίνη) και μπορεί να σταματήσει τη μεταγραφή όπως και τη θυμινική γλυκόλη, που είναι μετρίως μεταλλαξιόγonos αλλά διακόπτει την αντιγραφή και τη μεταγραφή. Επιπλέον, καταστροφικές συνέπειες στο DNA επάγουν οι οξειδωτικές ρίζες και με έμεσο τρόπο. Για παράδειγμα, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα οξειδώνονται από ρίζες υδροξυλίου για να σχηματίσουν προϊόντα αλδεϋδών όπως η μαλονδιαλεϋδη, τα οποία αντιδρούν με την αδερίνη, τη γουανίνη και την κυτοσίνη σχηματίζοντας μεταλλαξιόγona συσσωματώματα (bulky adducts)(147). Τέλος, είναι γνωστό ότι το οξειδωτικό stress μπορεί να προκαλέσει ρήξη στο φωσφοδιεστερικό δεσμό της έλικας του DNA (148, 149) .

Μεθυλίωση του DNA

Συμπαράγοντες ενζυμικών αντιδράσεων, όπως η S-αδενοσυλμεθειονίνη, μπορούν να προσθέσουν μεθυλική ομάδα στο DNA σχηματίζοντας τη σχετικώς ακίνδυνη 7-μεθυλγουανίνη και την 3-μεθυλαδενίνη η οποία δρα ανασταλτικά στην αντιγραφή του DNA. Το πιο τοξικό προϊόν μεθυλίωσης είναι η O⁶-μεθυλγουανίνη, η οποία επιδιορθώνεται από ξεχωριστό μονοπάτι (Direct Repair-DR). Οι υπόλοιπες βλάβες του DNA που προκαλούνται από προϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού επιδιορθώνονται με το μηχανισμό Base Excision Repair (150).

Βλάβες του DNA από Εξωγενείς Παράγοντες

Η πιο συχνή εξωγενής πηγή που δε μπορεί να αποφευχθεί είναι η υπεριώδης ακτινοβολία (UltraViolet radiation-UV) από την ηλιοφάνεια, η οποία δημιουργεί συσσωματώματα μεταξύ κλασμάτων πυριμιδίνης. Καταστροφικοί για το γονιδίωμα είναι οι παράγοντες που βρίσκονται στον καπνό του τσιγάρου καθώς και τα περιβαλλοντικά μεταλλαξιογόνα (αρωματικές αμίνες και υδρογονάνθρακες). Αυτοί σχηματίζουν συσσωματώματα και οδηγούν σε τοπική παραμόρφωση της έλικας του DNA αναστέλλοντας την αντιγραφή και τη μεταγραφή. Τα θηλαστικά απαλλάσσονται από αυτά τα συσσωματώματα με το μηχανισμό Nucleotide Excision Repair (NER)(151).

Βλάβες της διπλής έλικας του DNA (Double Strand Breaks -DSBs)

Παρόλο που όλες οι βλάβες του DNA μπορούν να αποβούν απειλητικές για τη γονιδιακή ακεραιότητα, οι βλάβες DSBs θεωρούνται οι πιο θανατηφόρες βλάβες DNA. Ως DSBs ορίζονται οι βλάβες που προκύπτουν όταν λαμβάνουν χώρα ταυτόχρονα δύο θραύσεις σε δύο συμπληρωματικές αλυσίδες του DNA. Δημιουργούνται κατά τη διάρκεια φυσιολογικών διεργασιών όπως κατά τον επιχιασμό των ομόλογων χρωμοσωμάτων στη μείωση I (152) αλλά και κατά τη διαδικασία γενετικής αναδιάταξης και ωρίμανσης των B και T λεμφοκυττάρων(153).

Μετά από επίδραση ιονίζουσας ακτινοβολίας στο DNA επέρχεται διάσπαση του φωσφοδιεστερικού δεσμού που αποτελεί το σκελετό του μορίου άμεσα ή έμεσα, με το σχηματισμό ελευθέρων ριζών (ROS). Ο μηχανισμός με τον οποίο συμβαίνει αυτό είναι ο ακόλουθος: Αρχικά συμβαίνει μια σύγκρουση μεταξύ σωματιδίων υψηλής ενέργειας ή φωτονίων και μορίων νερού, πλησίον του DNA δημιουργώντας ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου(154). Αυτές οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με το γειτονικό DNA προκαλώντας

βλάβες στη μονή άλυσσο του DNA (Single-Strand Breaks-SSBs). Γειτονικές βλάβες SSBs σε συμπληρωματικές έλικες DNA μπορούν αυτομάτως να προκαλέσουν DSBs. Απεναντίας, οι SSBs που οφείλονται σε ελεύθερες ρίζες δεν οδηγούν κατά κανόνα στο σχηματισμό DSBs. Η πιο προφανής εξήγηση είναι ότι η προκαλούμενη από ελεύθερη ρίζα SSB αποτελεί μεμονωμένο γεγονός, ενώ η πρόσκρουση με έστω και ένα σωματίδιο ιονίζουσας ακτινοβολίας δημιουργεί πολλαπλές βλάβες στις οποίες περιλαμβάνονται και DSBs (155).

Εκτός από την ιονίζουσα ακτινοβολία, DSBs μπορεί να προκαλέσουν διάφοροι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες, όπως η μπλεομυκίνη και η ετοποσίδη και οι αναστολείς τοποϊσομεράσης I και II, οι οποίοι μπορούν να παράγουν DSBs σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου (156)

Οι βλάβες DSBs είναι ιδιαίτερα επικίνδυνες γιατί μπορεί να οδηγήσουν στη συσσώρευση χρωμοσωμικών ανωμαλιών. Οι DSBs αποτελούν πρόκληση για επιδιόρθωση, εφόσον σε αντίθεση με όλες τις άλλες βλάβες και οι δύο έλικες του DNA έχουν καταστραφεί και επομένως δε διατίθεται συμπληρωματική αλυσίδα για να χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο για την επιδιόρθωσή τους. Οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί διαθέτουν δύο μηχανισμούς για την άρση των DSBs: ο ένας ονομάζεται Non Homologous End Joining (NHEJ) και ο άλλος Homologous Recombination (HR). Ο πρώτος παίζει τον κυρίαρχο ρόλο στα ανώτερα θηλαστικά(157).

DNA Interstrand Cross Links -ICLs

Οι ICLs είναι βλάβες του DNA που δημιουργούνται από ομοιοπολικούς δεσμούς μεταξύ δύο βάσεων σε συμπληρωματικές έλικες. Οι ICLs αποτρέπουν το διαχωρισμό της διπλής έλικας, εμποδίζοντας σημαντικές διεργασίες όπως η μετάφραση και η αντιγραφή. Χημειοθεραπευτικοί παράγοντες που δημιουργούν ICL προκαλούν σοβαρές χρωμοσωμικές ανωμαλίες όπως θραύσεις, ελλείψεις και αντιμεταθέσεις. Τα παράγωγα της πλατίνας και το ψωραλένιο δημιουργούν μεγάλη παραμόρφωση στη δομή του DNA. Αυτή η βλάβη αναγνωρίζεται απευθείας από τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA. Άλλοι παράγοντες, όπως η μιτομυκίνη C προξενούν μικρότερες παραμορφώσεις στο DNA (158, 159). Παρόλα αυτά, μπορούν να παραμείνουν και να προκαλέσουν εμπλοκή στο μηχανισμό της μεταγραφής ή της μετάφρασης του DNA (160). Στην επιδιόρθωση των ICLs εμπλέκεται ο μηχανισμός Fanconi Anemia (FA) όπως θα συζητηθεί πιο κάτω.

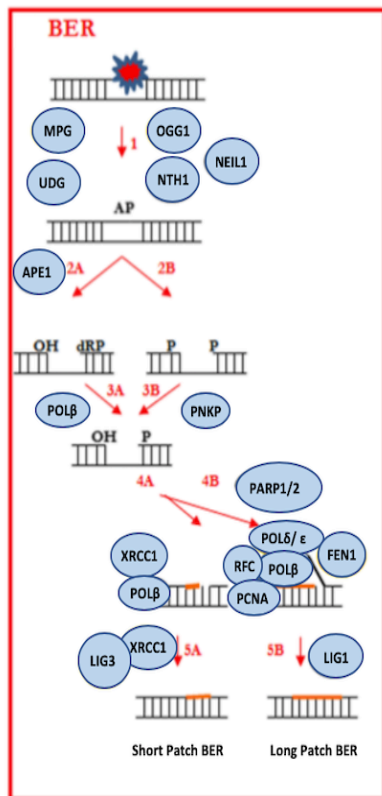
ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗΣ ΤΟΥ DNA

Άμεση επιδιόρθωση

Η άμεση επιδιόρθωση της βλάβης του DNA (Direct Repair of DNA damage-DR) δεν είναι πολύπλοκη διαδικασία και δεν απαιτεί πολλά βήματα ή τη μεσολάβηση πολλών πρωτεϊνών (161). Στα θηλαστικά, μόνο τα συσσωματώματα O- μεθυλγουανίνης επιδιορθώνονται με το μηχανισμό DR. Αυτά τα συσσωματώματα δημιουργούνται από τους αλκυλιούντες παράγοντες του περιβάλλοντος αλλά και αυτούς που χρησιμοποιούνται ως χημειοθεραπευτικά στην κλινική πράξη(162). Η O- τρανσφεράση της γουανίνης (alkylguanine transferase -AGT, η οποία είναι γνωστή και ως MGMT) είναι το βασικό ένζυμο του μηχανισμού DR, το οποίο αναστρέφει τη μεταλλαξιγόνο δράση της O⁶-μεθυλγουανίνης. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω μιας αναστρέψιμης αντίδρασης μεταφοράς της μεθυλικής ομάδας από το DNA σε ένα υπόλειμμα κυστεΐνης του ενζύμου. Η προσθήκη της μεθυλικής ομάδας στο ένζυμο το αδρανοποιεί και αμέσως μετά το ένζυμο διασπάται (ένζυμο αυτοκτονίας)(162, 163).

Base excision repair (BER)

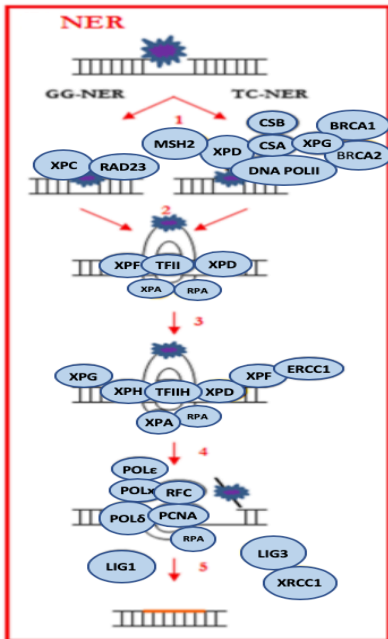
Ο μηχανισμός BER επιδιορθώνει βλάβες στις βάσεις του DNA παρόμοιες σε σχήμα και μέγεθος με τις φυσιολογικές βάσεις. Σε αυτές περιλαμβάνονται τα προϊόντα απαμίωσης, οξείδωσης καθώς και μερικοί τύποι αλκυλίωσης των βάσεων καθώς επίσης και οι αβασικές θέσεις του DNA (164). Δύο επιμέρους οδοί χρησιμοποιούνται, η οδός short-patch BER (SP-BER) και η οδός long- patch BER (LP-BER). Αυτές διαφέρουν ως προς τον είδος των ενζύμων που συμμετέχουν καθώς και από το μέγεθος του DNA που σχηματίζεται. Ο πλήρης μηχανισμός BER περιγράφεται στην εικόνα 2.



Εικόνα 2. Ο μηχανισμός BER (base excision repair) απομακρύνει αλλοιωμένες βάσεις στο DNA. Μπορεί να αντικατασταθεί μία μόνο βάση (short patch, SP-BER, αριστερά) ή πολλαπλές βάσεις (long patch LP-BER, δεξιά). Το σημείο επιδιόρθωσης της βλάβης απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα. Η διαδικασία λαμβάνει χώρα σε πέντε βήματα: 1) γίνεται αναγνώριση και αποκοπή της αλλοιωμένης βάσης από τις DNA γλυκολάσες με αποτέλεσμα το σχηματισμό αβασικής θέσης (AP site). Η OGG1 (8-oxoguanine glycosylase) αφαιρεί την οξογουανίνη, η NTH1 (Endonuclease III-like protein-1) αφαιρεί την θυμινική γλυκόλη, η NEIL1 (Nei Endonuclease VIII-like protein) απομακρύνει την γουανιδινοϋδαντοΐνη, η UDG (Uracil DNA glycosylase) απομακρύνει την ουρακίλη ή την N-μεθυλ-γουανίνη και η MPG (N-methyl purine-DNA glycosylase) απομακρύνει την N-μεθυλ-αδενίνη. 2) Τομή της αλυσίδας του DNA κοντά στην αβασική θέση. Το ένζυμο APE1 (Apyriminic apyrimidinic endonuclease -1) απαιτείται για να κόψει το DNA δίπλα στην αβασική θέση που δημιουργήθηκε από την δράση της UDP και της MPG γλυκολάσης (2A). Οι άλλες γλυκολάσες OGG1, NTH1 και NEIL1 διαθέτουν δραστικότητα λύασης της 3' απυρινικής-απουριμιδικής θέσης (AP site) και δημιουργούν μια εγκοπή στη μονή αλυσίδα του DNA με 3' φωσφορικό άκρο (2B), 3) επεξεργασία των άκρων από τη DNA πολυμεράση β (3A) ή από τη φωσφατάση PNKP (3B) για τη δημιουργία 5' φωσφορικού άκρου (5'P) και ζύδροξυτελικού άκρου (3'OH), αντίστοιχα. 4) Σύνθεση του DNA. Στο μηχανισμό SP-BER (4A), η πολυμεράση β ενεργοποιείται από τον παράγοντα XRCC1 με αποτέλεσμα τη σύνθεση του DNA. Στο μηχανισμό LP-BER (4B) απαιτούνται τα ένζυμα PCNA, RFC και οι πολυμεράσες β, δ και ε. Το 5' κομμάτι του DNA το οποίο προέκυψε από τη σύνθεση του νέου DNA και την αντικατάσταση της αλυσίδας του DNA, απομακρύνεται από την ενδοουκλεάση FEN1. 5) ένωση των άκρων του DNA. Στον μηχανισμό SP-BER τα άκρα ενώνονται από την λιγκάση 3 (LIG3) και τον XRCC1(5A). Στο μηχανισμό LP-BER, η ένωση των άκρων γίνεται με τη λιγκάση 1 (LIG1)(5B). (164)

Nucleotide excision repair (NER)

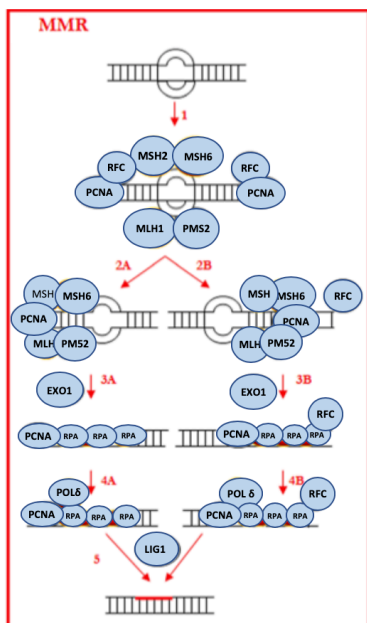
Ο μηχανισμός επιδιόρθωσης του DNA Nucleotide Excision Repair-NER είναι υπεύθυνος για την απομάκρυνση ογκωδών παραγώγων των βάσεων, όπως αυτά που σχηματίζονται από την υπεριώδη ακτινοβολία (UV), διάφορα περιβαλλοντικά μεταλλαξιογόνα (όπως οι αρωματικοί υδρογονάνθρακες και η ακρολεΐνη) καθώς και βλάβες του DNA που προκαλούνται από απροσδόκητους περιβαλλοντικούς παράγοντες και μερικούς χημειοθεραπευτικούς παράγοντες(165). Δύο ξεχωριστές οδοί επιστρατεύονται: ο μηχανισμός global genome NER (GG-NER), ο οποίος χρησιμοποιείται για την επιδιόρθωση του DNA το οποίο δεν μεταγράφεται (και το οποίο αφορά την κύρια μάζα του DNA) και ο μηχανισμός transcription-coupled NER (TC-NER), ο οποίος δρα αποκλειστικά κατά την ενεργό μεταγραφή των γονιδίων(166). Ο μηχανισμός NER περιγράφεται στην εικόνα 3.



Εικόνα 3. Ο μηχανισμός NER (Nucleotide Excision Repair) επιδιορθώνει νουκλεοτιδία που περιέχουν ογκώδη παράγωγα των βάσεων. Το επιδιορθωμένο τμήμα απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα. Η οδός αυτή χωρίζεται σε δύο σκέλη: global genome nucleotide excision repair (GG-NER), το οποίο αναγνωρίζει βλάβες οπουδήποτε στο γονιδίωμα, ενώ ο μηχανισμός transcription-coupled repair (TCR) αναγνωρίζει μόνο βλάβες στα γονίδια που βρίσκονται στο στάδιο της μετάφρασης. Αυτά τα δύο σκέλη διαφέρουν ως προς το μηχανισμό που εμπλέκεται στην αναγνώριση της βλάβης του DNA αλλά έχουν κοινό μηχανισμό εγκοπής της βλάβης, επιδιορθωσης και επανασύνδεσης. Η διαδικασία αποτελείται από: 1) Αναγνώριση της βλάβης του DNA 2) Άνοιγμα της διπλής αλυσίδας του DNA με τη δράση των ελικασών XPB και XPD 3) Διπλή εγκοπή στα δύο σημεία βλάβης, η οποία διενεργείται από τις ετεροδιμερείς ενδονουκλεάσες ERCC1/XPF and ERCC1/XPG 4) Σύνθεση του DNA από τις DNA πολυμεράσες ϵ , δ και ϵ 5) Σύνδεση του DNA από τη DNA ligase 1 κατά τη διάρκεια της φάσης during S του κυτταρικού κύκλου ή τη Ligase 3/XRCC1 η οποία είναι ενεργή καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου(167).

Mismatch repair (MMR)

Ο μηχανισμός mismatch repair (MMR) παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην εξάλειψη λαθών στο ζευγάρι των βάσεων (mismatches) καθώς και ενθέσεις ή ελλείψεις νουκλεοτιδίων που οφείλονται σε σφάλματα της πολυμεράσης κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του DNA(168). Βλάβες στο μηχανισμό MMR έχουν ως συνέπεια λάθη στην αντιγραφή απλών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών του DNA και οδηγούν στο φαινόμενο που αποκαλείται microsatellite instability (MSI), και το οποίο είναι το κατεξοχήν χαρακτηριστικό ανεπάρκειας του μηχανισμού MMR(169). Ο μηχανισμός MMR περιγράφεται στην εικόνα 4.

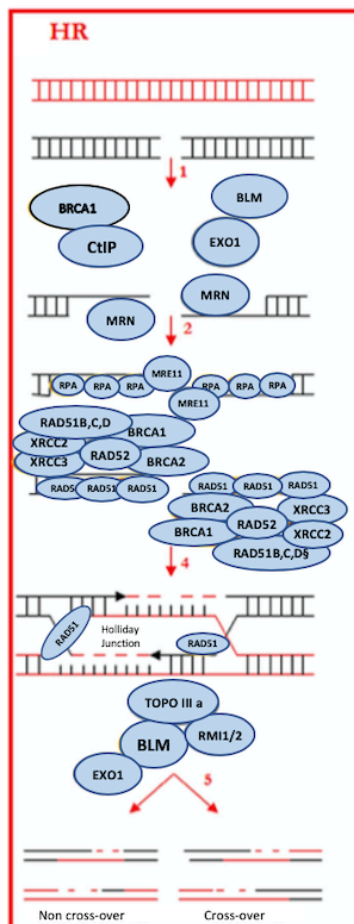


Εικόνα 4. Ο μηχανισμός MisMatch Repair (MMR) χρησιμοποιείται για αναγνώριση και να επιδιορθώνει λάθη στο ζευγάρι των βάσεων. Η επιδιορθωμένη περιοχή απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα. Η διαδικασία χαρακτηρίζεται από: 1) Αναγνώριση του λάθους από τα ετεροδιμερή MutS και MutL 2) Το σύμπλεγμα MutS-MutL μετακινείται προς το σύμπλεγμα PCNA-RFC, το οποίο μπορεί να βρίσκεται πριν (2A) ή μετά (2B) από τη βλάβη 3) τα ετεροδιμερή MutS και MutL διαθέτουν δραστηριότητα ενδονουκλεάσης και δημιουργούν εγκοπή σε μια αλυσίδα του DNA. Αποκοπή τμήματος της αλυσίδας από την εξωνουκλεάση Exo1 4) Ορθή επανασύνθεση του DNA από την πολυμεράση δ και 5) Επανάσυνθεση του DNA από τη Ligase 1. (168)

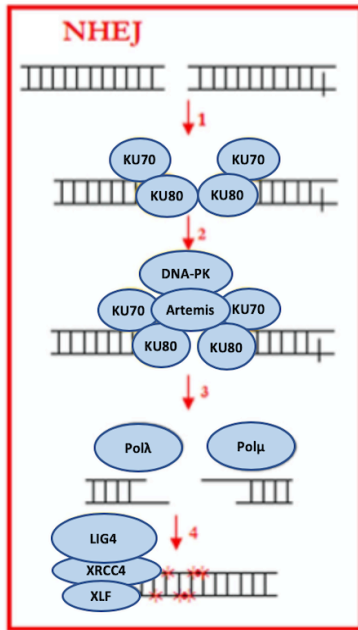
Επιδιόρθωση των DSBs

Στην επιδιόρθωση των βλαβών της διπλής έλικας του DNA -Double Strand Breaks (DSB) εμπλέκονται κυρίως η οδός Homologous Recombination (HR pathway) και η οδός Non-Homologous End Joining (NHEJ). Η οδός HR επιδιορθώνει μόνο το 10% των DSBs στα κύτταρα των θηλαστικών, ενώ είναι ο κύριος μηχανισμός επιδιόρθωσης στα βακτήρια και τους ζυμομύκητες (161). Πρόκειται για μηχανισμό υψηλής ακριβείας, ο οποίος χρησιμοποιεί εκτεταμένες ομόλογες περιοχές από την αδελφή χρωματίδη του DNA ως πρότυπο. Γι' αυτό το λόγο ο μηχανισμός HR χρησιμοποιείται μόνο κατά τη διάρκεια της φάσης S και G2, οπότε υπάρχει διαθέσιμη η ομόλογη αλληλουχία, και είναι πολύ σημαντικός για τα ταχέως πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα.(170). Ο μηχανισμός HR περιγράφεται στην εικόνα 5.

Η οδός NHEJ είναι η κύρια οδός επιδιόρθωσης των DSBs στα θηλαστικά αφού είναι υπεύθυνη για την επιδιόρθωση περισσότερων από 90% των βλαβών του DSBs(171). Περιλαμβάνει την ένωση των άκρων της βλάβης είτε χωρίς να χρησιμοποιεί ομόλογες περιοχές ως πρότυπο, είτε χρησιμοποιώντας ομόλογες περιοχές με πολύ περιορισμένη έκταση(165). Επομένως είναι κυρίως ενεργός στη φάση G1 και είναι επιρρεπής σε λάθη πολύ περισσότερο από το μηχανισμό HR. Ο μηχανισμός NHEJ περιγράφεται στην εικόνα 6.



Εικόνα 5. Οδός HR. Η διαδικασία λαμβάνει χώρα μόνο κατά τη φάση S και G2 του κύκλου κι εξελίσσεται στα εξής βήματα: 1) Αναγνώριση της βλάβης του DNA και εκτομή στο 5' άκρο από τις ενδονουκλεάσες MRN, Exo1 και CtIP. Το σύμπλεγμα MRN αποτελείται από τις πρωτεΐνες NBN, MRE11 και RAD50. 2) Σταθεροποίηση των μονών ελίκων από την RPA 3) Πρόσδεση του Rad51 στο DNA και αναζήτηση του ομόλογου προτύπου στην έτερη χρωματίδη 4) Αντίδραση ανταλλαγής μεταξύ των ελίκων κατεστραμμένου και φυσιολογικού DNA που δημιουργεί διακλαδούμενες δομές DNA (Holliday junction). Οι δομές αυτές μετακινούνται κατά μήκος του DNA 5) Διάσπαση των Holliday Junctions από την τοποϊσομεράση III a και τις ελικάσες BLM, RMI1/2. Κατά τον HR η αδελφή χρωματίδη στο ομόλογο χρωμόσωμα συμπεριφέρεται ως πρότυπο για την σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA (απεικονίζεται με κόκκινο).(172)



Εικόνα 6. Η οδός NHEJ είναι μια λιγότερο αξιόπιστη οδός επιδιόρθωσης της βλάβης, η οποία χρησιμοποιείται σε όλα τα στάδια του κυτταρικού κύκλου και αποτελείται από τα εξής βήματα: 1) Ανίχνευση της βλάβης του DNA από το ετεροδιμερές ku70/ku80 2) Προσέλκυση της πρωτεΐνης DNA-PK και της νουκλεάσης Artemis και επεξεργασία των άκων της βλάβης από την Artemis 3) Σύνθεση του DNA από τις πολυμεράσες μ και λ 4) Σύνδεση μέσω της λιγκάσης 4-XRCC4-XLF. Το αποτέλεσμα είναι απώλεια ή περίσσεια νουκλεοτιδίων (απεικονίζονται με αστερίσκο ανάμεσα στις έλικες του DNA. (173)

Η ανοχή της βλάβης του DNA

Κατά τη διάρκεια της φάσης S και ενώ το DNA αντιγράφεται, εάν η DNA πολυμεράση συναντήσει κάποιο εμπόδιο, όπως συσσωματώματα νουκλεοτιδίων που δεν απομακρύνθηκαν με το μηχανισμό NER ή παραμορφώσεις στην αλυσίδα του DNA, τότε δεν προχωρά πλέον η διχάλα διπλασιασμού και η αντιγραφή σταματά. Αυτό ορίζεται ως replication stress (174). Παρατεταμένη παρεμπόδιση της διχάλας διπλασιασμού του DNA έχει ως αποτέλεσμα την κατάρρευσή της. Ένας μηχανισμός που έχει προταθεί για την κατάρρευση είναι η ενεργοποίηση της ενδονουκλεάσης Mus81 η οποία προκαλεί DSBs, με αποτέλεσμα τη γενετική αστάθεια(175). Γι' αυτό το λόγο αναπτύχθηκαν ο μηχανισμός της σύνθεσης διαμέσου της βλάβης (translesion synthesis-TLS), ο οποίος αποτελεί τον κυριότερο μηχανισμό ανοχής της βλάβης του DNA. Αυτή η διαδικασία δεν απομακρύνει τη βλάβη, αλλά εξασφαλίζει την αντιγραφή πέραν από το σημείο της βλάβης και επιτρέπει την επιδιόρθωση της βλάβης σε δεύτερο χρόνο, μειώνοντας τον κίνδυνο γενετικής αστάθειας. Κατά τον μηχανισμό TLS, αντί των συνήθως χρησιμοποιούμενων υψηλής πιστότητας πολυμερασών δ και ε χρησιμοποιούνται οι λιγότερο αξιόπιστες πολυμεράσες Rev1, Pol ζ, Pol κ, Pol η, και Pol ι (176-178). Παρόλο που ο μηχανισμός TLS μπορεί να παρακάμψει τη βλάβη, η μειωμένη αξιοπιστία του γενικά οδηγεί σε μεταλλαξιγένεση.

Ο ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΤΟΥ DNA ΣΤΗ ΒΛΑΒΗ- DNA DAMAGE RESPONSE (DDR)

Σε περίπτωση βλάβης της έλικας του DNA ενεργοποιείται ο μηχανισμός της πολύ-ADP ριβοζυλίωσης (poly ADP ribosylation- PAR) των ιστονών. Πρόκειται για την προσθήκη πολλαπλών γραμμικών ή διακλαδιζόμενων μορίων ADP-ριβόζης στις ιστόνες μέσω των μορίων PARP (Poly(ADP-ribose) polymerases). Με αυτό τον τρόπο χαλαρώνει η πρόσδεση της χρωματίνης στις ιστόνες και διευκολύνεται η προσκόλληση και ενεργοποίηση των μορίων DDR στο σημείο της βλάβης(179).

Η οδός ATM

Σε απάντηση στη βλάβη του DNA, τα κύτταρα ενεργοποιούν ένα πολύπλοκο δίκτυο σηματοδότησης το οποίο μεσολαβεί την επιδιόρθωση του DNA και την αναστολή του κυτταρικού κύκλου, ή εάν η βλάβη είναι πιο πολύπλοκη ενεργοποιούν την απόπτωση. Τα δύο κύρια μόρια τα οποία εμπλέκονται στην έναρξη του μηχανισμού DDR είναι οι phosphatidylinositol-3-OH-kinases (PI3K) ATM και ATR(180). Συγκεκριμένα, η ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated) ενεργοποιείται από τις βλάβες στη διπλή έλικα του DNA (DSB) οι οποίες αναγνωρίζονται αρχικά από το σύμπλεγμα MRN, το οποίο αποτελείται από τις υποομάδες MRE11-RAD50 και NBS1. Το ATM, επιστρατεύεται στην περιοχή της βλάβης του DNA και φωσφορυλιώνει την ιστόνη H2AX στη σερίνη 139 πλησίον της βλάβης. Η ιστόνη H2AX απαντάται σε ποσοστό περίπου 5%-25% στα οκταμερή ιστόνης, αλλά η φωσφορυλιωμένη μορφή της (gH2AX) εντοπίζεται ως μικροσκοπικά διακριτές δομές (DNA repair foci), οι οποίες εκτείνονται σε έκταση αρκετών μεγαβάσεων. Η φωσφορυλίωση της H2AX είναι ένα πρώιμο γεγονός μετά τη γενετική βλάβη, αμέσως μετά την πρόσδεση του παράγοντα MRN και την ενεργοποίηση της ATM. Αυτές οι δομές gH2AX συνυπάρχουν με τους περισσότερους από τους παράγοντες DDR και θεωρείται ότι αποτελούν σημεία πρόσδεσης για την επιστράτευση των τελευταίων στο σημείο της βλάβης (181). Για παράδειγμα, η ιστόνη gH2AX προσδένεται στο μόριο MDC1 και προσελκύει ακόμα περισσότερα μόρια MRN πολλαπλασιάζοντας το σήμα. Επιπλέον η gH2AX αναγνωρίζεται από μόρια του μηχανισμού DDR όπως το BRCA1 και το 53BP1(182-184). Τα μόρια BRCA1 και 53BP1 έχουν καθοριστικό ρόλο στην επιλογή του μηχανισμού επιδιόρθωσης των DSBs προωθώντας το μηχανισμό HR ή το μηχανισμού NHEJ αντίστοιχα. Το μόριο ATM είναι καθοριστικής σημασίας για την ενεργοποίηση του σημείου ελέγχου στη φάση G1/S του κυτταρικού κύκλου, εμποδίζοντας κύτταρα που φέρουν βλάβη στο DNA από το να εισέλθουν στη φάση S. Αυτό καθίσταται δυνατόν καθώς η κινάση ATM με άμεσο ή έμμεσο τρόπο – μέσω ενεργοποίησης του μορίου

CHK2 – φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί το γονίδιο p53, το οποίο με τη σειρά του ενεργοποιεί αφενός το μόριο p21 (CDKN1a), το οποίο εμπλέκεται στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου (όπως μέσω του σχηματισμού σύμπλοκων μορίων της πρωτεΐνης E2F με τον αναστατή της, πρωτεΐνη του ρετινοβλατώματος Rb (Rb-E2F complexes formation) (185) και αφετέρου γονίδια όπως τα PUMA και NOXA τα οποία ενεργοποιούν την απόπτωση του κυττάρου (186, 187). Η κινάση ATM περαιτέρω συνεισφέρει στην αύξηση της συγκέντρωσης και τη σταθεροποίηση του p53 φωσφορυλιώνοντας και αδρανοποιώντας τον αναστατή της, MMD2(188).

Η οδός ATR/CHK1

Το μόριο ATR (Ataxia-Telangiectasia-Related) ενεργοποιείται από βλάβες μονής έλικας του DNA (SSBs) οι οποίες δημιουργούνται σε απέναντι περιοχές (DSBs), κατά την επεξεργασία των άκρων του DNA ή σε περιπτώσεις παρακώλυσης της διχάλας αντιγραφής. Ο ATR προκαλεί την παροδική αναστολή του κυτταρικού κύκλου, την επιδιόρθωση του DNA, τη σταθεροποίησή του και την επανεκκίνηση της διχάλας αντιγραφής. Πολλές από αυτές τις δράσεις μεσολαβούνται από την CHK1, που είναι απώτερος (downstream) στόχος της ATR. Συγκεκριμένα, μετά τη δημιουργία των SSBs, η πρωτεΐνη replication protein A (RPA) συνδέεται στη μονή έλικα του DNA και επιστρατεύει τα συμπλέγματα Rad17/9-1-1 (γνωστό και ως Rad17-Rad1-Hus1-Rad9) και ATR/ATRIP, οδηγώντας στη φωσφορυλίωση CHK1 στη σερίνη 317 και τη σερίνη 345. Η ενεργοποίηση της CHK1 από την ATR απαιτεί επιπλέον μεσολαβητές όπως η claspin, το BRCA1 και το TOBP1(180, 189, 190). Εφόσον οι SSBs λειτουργούν ως ενδιάμεσα συστατικά των DSBs, κατ' επέκταση και η ATM συμμετέχει στην ενεργοποίηση της CHK1. Η ATM και το σύμπλεγμα MRN μεσολαβούν την απομάκρυνση των DSBs οδηγώντας σε σχηματισμό SSBs ως ενδιάμεση μορφή επιδιόρθωσης του DNA, ευοδώνοντας την ενεργοποίηση της CHK1 μέσω της πρόσδεσης του συμπλέγματος RPA/ATR-ATRIP (191, 192).

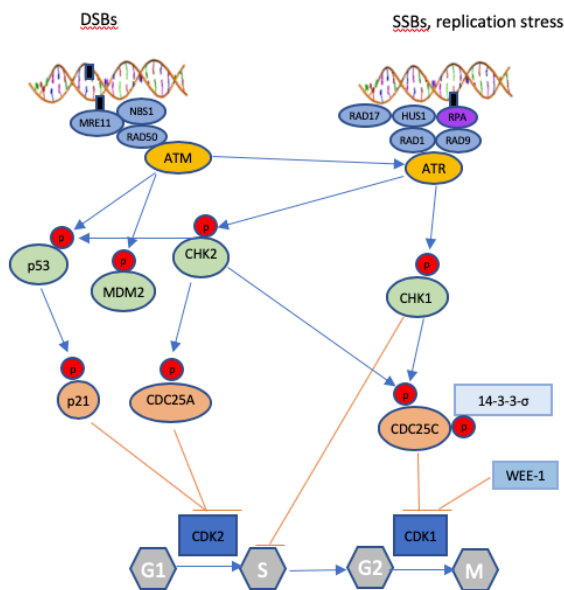
Η οδός ATR/CHK1 παίζει ένα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου στο μέσο της φάσης S τόσο κατά τη φυσιολογική εξέλιξη της φάσης S όσο και σε απάντηση στη βλάβη του DNA. Αναστέλλει την πυροδότηση των σημείων αντιγραφής (replication origins) του DNA μεσολαβώντας την αποδόμηση της CDC25A (Cell Division Cycle 25A) μέσω της CHK1, η οποία με τη σειρά της καθυστερεί την πρόοδο της αντιγραφής και παρέχει χρόνο για την απομάκρυνση του στρεσογόνου παράγοντα.(191, 193, 194). Η οδός ATR/ CHK1 επίσης μεσολαβεί στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου στη φάση μετάβασης G2/M, έτσι ώστε να αποτρέψει την είσοδο του κυττάρου στη μίτωση, πριν την πλήρη επιδιόρθωση της βλάβης

του DNA. Αφού ενεργοποιηθεί από την ATR, η CHK1 φωσφορυλιώνει την φωσφατάση CDC25C στη σερίνη 216, οδηγώντας στη σύνδεσή της με τη σύμπλεγμα 14-3-3 και την έξοδο της CDC25C (Cell Division Cycle 25C) στο κυτταρόπλασμα (195, 196). Φυσιολογικά, η αποφωσφορυλίωση από την CDC25C οδηγεί στην ενεργοποίηση της CDK1 στον πυρήνα και την είσοδο στη μίτωση (197). Η φωσφορυλίωση της κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης CDK1 από την κινάση WEE-1 αναστέλλει τη δραστηριότητά της κατά τη διάρκεια της φάσης G2 του κυτταρικού κύκλου (137). Η CHK1 επίσης παίρνει μέρος στο σημείο ελέγχου της μιτωτικής ατράκτου, το οποίο εξασφαλίζει την σωστή παράταξη των χρωμοσωμάτων κατά τη μίτωση, για την ισότιμη κατανομή του γενετικού υλικού στα θυγατρικά κύτταρα και την αποφυγή χρωμοσωμικής αστάθειας και ανευπλοειδίας (190, 198, 199).

Ο ρόλος της p53 στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου

Η ενεργοποίηση του p53 μέσω του μηχανισμού DDR έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή του p21 (CDKN1A), ενός αναστολέα του συμπλόκου κυκλίνης E/CDK2, το οποίο σύμπλοκο ευοδώνει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου από τη φάση G1 στη φάση S, κι έτσι αναστέλλεται ο κυτταρικός κύκλος (200, 201). Επίσης, η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (pRB) παραμένει φωσφορυλιωμένη, προσδεδεμένη με τον μεταγραφικό παράγοντα E2F με αποτέλεσμα ο κυτταρικός κύκλος να μην προχωρά πέρα από το όριο της φάσης G1/S (185). Η πρωτεΐνη PCNA (proliferating cell nuclear antigen) συμμετέχει στην αντιγραφή και την επιδιόρθωση του DNA. Το p21 προσδένεται στο PCNA και εμποδίζει την επιμήκυνση του DNA κατά την αντιγραφή του, εμποδίζοντας τον διπλασιασμό των κυττάρων τα οποία ήδη έχουν εισέλθει στη φάση S (202). Αν και το κατεχοχόν σημείο ελέγχου από το p53 είναι στη φάση G1/S, και το σημείο ελέγχου G2/M ελέγχεται από το p53 με διαφόρους μηχανισμούς όπως π.χ. αναστέλλοντας τη δράση ή/και τη μεταγραφή της κυκλίνης B και της κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης CDK1, (203-205), ενεργοποιώντας το σύμπλεγμα πρωτεϊνών 14-3-3σ, οι οποίες αδρανοποιούν τις πρωτεΐνες CDC25C στο κυτταρόπλασμα (206) και, τέλος, επάγοντας την πρωτεΐνη GADD45, η οποία αναστέλλει το σύμπλεγμα κυκλίνης B-CDK1 (207). Η έκφραση του GADD45 επίσης ενεργοποιεί την οδό p38/JNK, μέσω ενεργοποίησης της METK1/ MEKK4 με αποτέλεσμα την αναστολή του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση του κυττάρου (208).

Οι μηχανισμοί απάντησης στη βλάβη του DNA φαίνονται στην εικόνα 7



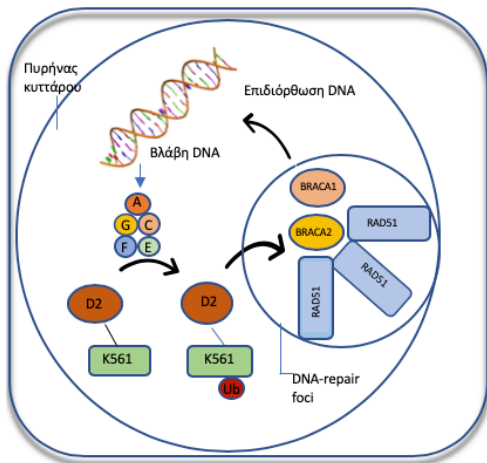
Εικόνα 7. Η κινάση Ataxia-telangiectasia mutated (ATM) ενεργοποιείται ως απάντηση στην ιονίζουσα ακτινοβολία και τους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες που προκαλούν Double Strand Breaks (DSBs). Η κινάση Ataxia-telangiectasia-related (ATR) ενεργοποιείται από ένα ευρύτερο φάσμα βλαβών οι οποίες προκαλούν Single Strand Breaks (SSBs) καθώς και από replication stress. Επιπλέον, η ATM μπορεί να ενεργοποιήσει την ATR. Η αρχική ανίχνευση της βλάβης γίνεται από το σύμπλεγμα NBS1-MRE11-RAD50 (για τις DSBs). Ακολουθεί η φωσφορυλίωση των CHK2, p53, MDM2 και CHK1, οι οποίες μεσολαβούν τη ρύθμιση των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου με αποτέλεσμα την αναστολή του έως ότου επιδιορθωθεί η βλάβη του DNA. Η ενεργοποιημένη p53 επάγει την πρωτεΐνη p21 και αναστέλλει την CDC25A, με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η CDK2 και η μετάβαση στη φάση G1/S του κυτταρικού κύκλου. Η φωσφορυλίωση της CDC25C από την CHK1 και η εκτόπισή της στο κυτταρόπλασμα από την 14-3-3σ απενεργοποιεί το σύμπλεγμα CDK1/κυκλίνης B εμποδίζοντας το κύτταρο να προχωρήσει στη μίτωση. Η CHK1 επίσης ενεργοποιεί την WEE-1, η οποία φωσφορυλιώνει το σύμπλεγμα CDK1/cyclin B στην Tyr15 και το απενεργοποιεί με αποτέλεσμα αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2, εξασφαλίζοντας χρόνο για την επιδιόρθωση του DNA (209).

Επιπλέον βιολογικές δράσεις των ATM και ATR

Η ATR ενεργοποιεί την οδό επιδιόρθωσης Fanconi Anemia

Ενώ η ATR φωσφορυλιώνει πολλά υποστρώματα κοινά με την ATM (210), μπορεί επίσης να έχει επιπλέον δράσεις- συγκεκριμένα σε οδούς οι οποίες σχετίζονται με την επιδιόρθωση της διχάλας αντιγραφής του DNA. Μια από αυτές τις οδούς είναι η οδός Fanconi Anemia (FA), η οποία ευοδώνει την επιδιόρθωση των ICLs (211). Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι η ATR επάγει την ουμπικουιλίνωση της FANCD2, που αποτελεί σημαντικό βήμα στην οδό FA (212).

Κληρονομούμενες βλάβες της οδού επιδιόρθωσης FA εκδηλώνονται ως αναιμία Fanconi, η οποία χαρακτηρίζεται από μυελική ανεπάρκεια με προδιάθεση σε MDS και AML και συνοδεύεται συχνά με μικροκεφαλία και νανισμό. Παρόμοιες εκδηλώσεις εμφανίζονται στο σύνδρομο Seckel (SCKL1), το οποίο οφείλεται σε μετάλλαξη της ATR. Αυτά τα κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ των δύο συνδρόμων επίσης υποδηλώνουν το ρόλο της ATR στην επιδιόρθωση των ICL μέσω της οδού FA (218)(219).



Εικόνα 8. Η οδός Fanconi anaemia/BRCA. Διάφορες πρωτεΐνες του συμπλέγματος FA, οι οποίες περιλαμβάνουν τις A, C, E, F και G, δημιουργούν ένα σύμπλεγμα στον πυρήνα του κυττάρου. Σε απάντηση στη βλάβη του DNA ή κατά τη διάρκεια της φάσης S του κυτταρικού κύκλου αυτό το σύμπλεγμα μεσολαβεί την μονοουμπικουιλίνωση (Ub) της FANCD2 στη λυσίνη 561 (K561). Η ενεργοποιημένη FANCD2, με τη σειρά της, μετατοπίζεται στην χρωματίνη και στις ειδικά διαμορφωμένες περιοχές επιδιόρθωσης (DNA-repair foci). Αυτές οι περιοχές περιέχουν το σύμπλεγμα πρωτεϊνών BRCA1 και BRCA2 (FANCD1). Η BRCA2/FANCD1 συνδέεται απευθείας στο RAD51 και το DNA, συμμετέχοντας στην επιδιόρθωση του DNA βάσει ομόλογης περιοχής (HR). Συνολικά, αυτό το μοντέλο δείχνει ότι η οδός FA/BRCA συμμετέχει στην επιδιόρθωση του DNA (213).

Ενεργοποίηση ως απάντηση στη δυσλειτουργία των τελομερών

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, τα άκρα των χρωμοσωμάτων δεν πυροδοτούν τον μηχανισμό DDR διότι το DNA των τελομερών συνδέεται με το σύμπλεγμα νουκλεοπρωτεΐνης σελτερίνη, το οποίο αναστέλλει τη δράση των πρωτεϊνών ATM, ATR και DNA-PK με πολλούς μηχανισμούς(214). Για παράδειγμα, το συστατικό της σελτερίνης TRF2 επάγει το σχηματισμό μιας δομής T-loop στο τελομερικό άκρο του DNA μπλοκάροντας την πρόσδεση της πρωτεΐνης Ku του συμπλέγματος MRN και την αντίστοιχη ενεργοποίηση της κινάσης ATM και των DNA-PK. Επίσης, το συστατικό POT1 της σελτερίνης προσδέεται στη μονή έλικα τελομερικού DNA, αποτρέποντας την πρόσδεση του replication protein A (RPA) και την ενεργοποίηση της ATR. Σε κύτταρα που δεν έχουν τελομεράση, τα τελομερή προσδευτικά συρρικνώνονται μετά από κάθε κύκλο αντιγραφής του DNA και στο τέλος δυσλειτουργούν και αναγνωρίζονται ως DSBs, προκαλώντας την επαγόμενη από την ATM/ATR αναστολή του κυτταρικού κύκλου και οδηγώντας σε κυτταρική γήρανση (215). Η κυτταρική γήρανση (senescence) θεωρείται αντίδραση στο stress, κατά την οποία το κύτταρο, ενώ είναι ζωντανό, αδυνατεί να πολλαπλασιαστεί περαιτέρω. Επειδή ακριβώς πρόκειται για αντίδραση στο stress, πρέπει να διαφοροποιηθεί από την αδράνεια, κατά την οποία το κύτταρο παραμένει εκτός κυτταρικού κύκλου αλλά διατηρεί την ικανότητά του για διαίρεση (quiescence) ή την τελική διαφοροποίηση(216).

Απόπτωση

Σε περίπτωση που η αρχική βλάβη του DNA δεν μπορεί να επιδιορθωθεί το κύτταρο μπορεί να οδηγηθεί στην απόπτωση. Υπάρχουν δύο διακριτοί, κοινοί στο τελικό τους στάδιο μηχανισμοί(217): η αποκαλούμενη εξωγενής οδός, η οποία ενεργοποιείται από την

πρόσδεση μελών της οικογένειας του tumor necrosis factor (TNFR) ή μορίων ευόδωσης του κυτταρικού θανάτου όπως το FAS-ligand σε υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας και η ενδογενής, η οποία ενεργοποιείται από συνθήκες stress όπως η έλλειψη κυτταροκινών, το stress του ενδοπλασματικού δικτύου (ER stress) και η βλάβη του DNA. Η ενδογενής οδός μεσολαβείται από τα μόρια της οικογένειας του BCL-2. Το πρώτο στάδιο είναι η ενεργοποίηση των προαποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας BH3-only (BIM, PUMA, BID, BMF, BAD, BIK, NOXA, HRK). Αυτές οι πρωτεΐνες δεσμεύουν ανασταλτικά τις αντιποπτωτικές πρωτεΐνες (BCL-2, BCL-XL, MCL-1, BCL-W and A1/BFL1) απελευθερώνοντας τους παράγοντες κυτταρικού θανάτου BAX και BAC. Αυτή η ενεργοποίηση προκαλεί αύξηση της διαπερατότητας της εξωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου και απελευθέρωση του κυτοχρώματος C στο κυτταρόπλασμα. Αυτό είναι το σημείο χωρίς επιστροφή για την απόπτωση με τη δημιουργία του αποπτωσώματος από τα μονομερή του APAF-1, την ενεργοποίηση της κασπάσης 9 και την επακόλουθη ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών. Τελικό αποτέλεσμα είναι η αποδόμηση του κυττάρου(218). Όπως έχει προαναφερθεί οι πρωτεΐνες PUMA και NOXA αποτελούν μεταγραφικούς στόχους της p53, συνδέοντας την οδό DDR με αυτήν της απόπτωσης (186, 187, 219).

Η ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑΣ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ DDR ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΗ ΝΕΟΠΛΑΣΙΑ

Όπως αναμένεται, ανεπάρκεια του μηχανισμού DDR οδηγεί σε αυξημένη συχνότητα μεταλλάξεων. Πράγματι, έχει δειχθεί ότι βλάβες στο μηχανισμό MMR και στο μηχανισμό HR συζάνουν το ποσοστό μεταλλάξεων στο κύτταρο(220-222). Οι χρωμοσωμικές αναδιατάξεις και η ανευπλοειδία επίσης αυξάνουν σε ασθενείς με διαταραχές του μηχανισμού HR(223).

Σε ασθενείς με ανεπάρκεια του μηχανισμού DDR λόγω κληρονομούμενων μεταλλάξεων ο κίνδυνος ανάπτυξης νεοπλασίας είναι σημαντικά αυξημένος. Συχνά οι καταστάσεις αυτές εκδηλώνονται ως σύνδρομο γενετικής αστάθειας, για παράδειγμα το σύνδρομο αταξίας-τελαγγειεκτασίας, λόγω μετάλλαξης του ATM, το σύνδρομο Nijmegen Breakage Syndrome (NBS), λόγω βλαβών στην οδό HR, το σύνδρομο Xeroderma Pigmentosum λόγω βλάβης στο μηχανισμό NER, το σύνδρομο Li Fraumeni, από μεταλλάξεις του p53 και η αναιμία Fanconi από βλάβες της οδού Fanconi/BRCA1(224, 225). Πέραν του σημαντικά αυξημένου κινδύνου για ανάπτυξη νεοπλασίας στα σύνδρομα αυτά, συνοδεύονται επίσης συχνά από νευρολογική σημειολογία, ανοσοανεπάρκεια και πρόωρη γήρανση. Όσον αφορά τη νευρολογική

σημειολογία έχουν προταθεί διάφορες αιτίες, όπως για παράδειγμα ότι οι νευρώνες παράγουν ενέργεια μέσω της μιτοχονδριακής αναπνοής παράγοντας έτσι αυξημένα ποσά ελευθέρων ριζών, οι οποίες μπορεί να βλάψουν τόσο το μιτοχονδριακό όσο και το πυρηνικό DNA. Μια άλλη αιτία μπορεί να είναι ότι το νευρικό σύστημα έχει περιορισμένη ικανότητα για αναγέννηση των κυττάρων του μετά από βλάβη στην ενήλικη ζωή καθώς επίσης, επειδή τα νευρικά κύτταρα βρίσκονται στην G0 φάση του κυτταρικού κύκλου, οι DSBs δεν μπορούν να επιδιορθωθούν με το μηχανισμό HR παρά μόνο με τον χαμηλής ακρίβειας μηχανισμό NHEJ(226). Όσον αφορά την ανοσοανεπάρκεια, φαίνεται να ευθύνεται η συμμετοχή του μηχανισμού HR στη διαδικασία VDJ recombination στο λεμφοκύτταρο, στην αναδιάταξη των βαρέων αλυσέων των ανοσοσφαιρινών και στην αλλαγή τάξης των ανοσοσφαιρινών(156). Όσον αφορά τη γήρανση, διάφορες ερευνητικές ομάδες έχουν συσχετίσει τη σηματοδότηση μέσω της αυξητικής ορμόνης και του IGF-1 (insulin-like growth factor 1) ως ρυθμιστή της μακροζωίας, ενώ έχει φανεί ότι αυτή η σηματοδότηση μειώνεται ως απάντηση στη βλάβη του DNA (227). Επιπλέον, σε μελέτες με ποντίκια με βλάβες στις οδούς Fanconi Anemia, NR, MMR ή NHEJ έχει παρατηρηθεί δυσλειτουργία των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (stem cells)(228, 229), με συνοδό γήρανση και απόπτωση (230).

Κληρονομούμενη ανεπάρκεια του μηχανισμού DDR μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση του κινδύνου ανάπτυξης νεοπλασίας χωρίς άλλες φαινοτυπικές διαταραχές. Για παράδειγμα σε μεταλλάξεις του BCRA1 και BRCA2 παρατηρείται αυξημένη συχνότητα ανάπτυξης καρκίνου του μαστού και των ωοθηκών και σε βλάβες της οδού MMR παρατηρείται αυξημένη συχνότητα ανάπτυξης καρκίνου ορθού και του κόλου (hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). Υπεύθυνος μηχανισμός είναι η παραγωγή σφαλμάτων αντιγραφής σε απλές επαναληπτικές αλληλουχίες που οδηγεί στην επονομαζόμενη microsatellite instability (MSI)(231, 232).

Σε μικρότερο βαθμό αυξάνουν τον κίνδυνο για ανάπτυξη κακοήθειας διάφοροι γενετικοί πολυμορφισμοί του μηχανισμού DDR. Τέτοιοι πολυμορφισμοί έχουν περιγραφεί τόσο στα MDS (233, 234), όσο και στην οξεία μυελογενή λευχαιμία, (235) και σχετίζονται με γενετική αστάθεια.

Όπως συζητήθηκε παραπάνω, η ανεπάρκεια του μηχανισμού DDR οδηγεί σε αυξημένη συχνότητα κακοηθειών. Από την άλλη μεριά, η ίδια η ανεπάρκεια του μηχανισμού DDR μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη δραστικότητα των χημειοθεραπευτικών παραγόντων σε ασθενείς με νεοπλασίες. Είναι γνωστό για παράδειγμα ότι ασθενείς με καρκίνο όρχεως ή μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονος οι οποίοι έχουν χαμηλή έκφραση του ERCC1, το οποίο εμπλέκεται στο μηχανισμό επιδιόρθωσης των ICLs εμφανίζουν καλύτερη ανταπόκριση στη

χορήγηση παραγώγων πλατίνας(236, 237). Επίσης, η αποτελεσματικότητα της τεμοζολαμίδης, ενός αλκυλιωτικού παράγοντα που μεταφέρει μια μεθυλική ομάδα στις πουρινικές βάσεις του DNA είναι σημαντικά ενισχυμένη σε ασθενείς με γλοιοβλάστωμα εγκεφάλου και ανεπάρκεια του ενζύμου άμεσης επιδιόρθωσης O⁶-methylguanine methyltransferase (MGMT)(238).

Η ανεπάρκεια του μηχανισμού DDR σε ασθενείς με νεοπλασία μπορεί να αξιοποιηθεί θεραπευτικά μέσω του μηχανισμού “synthetic lethality”. Ο όρος χρησιμοποιείται για να περιγράψει την θανατηφόρο επίδραση για το κύτταρο δύο γενετικών παραλλαγών όταν συμβαίνουν ταυτόχρονα, αλλά δεν επιφέρουν το θάνατο του κυττάρου όταν συμβαίνουν ξεχωριστά η μία από την άλλη. Χαρακτηριστικό παράδειγμα “synthetic lethality” αποτελεί η χορήγηση PARP αναστολέα (Olaparib) σε ασθενείς με νεοπλασίες οι οποίες φέρουν μεταλλάξεις του BRCA1 ή BRCA2. Η PARP εμπλέκεται στην επιδιόρθωση των SSBs (BER) (183), όταν όμως αναστέλλεται, οι θραύσεις μετατρέπονται σε DSBs λόγω κατάρρευσης του αντιγραφικού βρόχου. Αυτές μπορούν να επιδιορθωθούν είτε με HR είτε με NHEJ. Σε ανεπάρκεια όμως του μηχανισμού BRCA1 ή του BRCA2 ο μηχανισμός ακριβείας HR δε λειτουργεί με αποτέλεσμα να επιστρατεύεται αποκλειστικά ο NHEJ, ο οποίος είναι επιρρεπής σε σφάλματα και οδηγεί σε γενωμική αστάθεια και θάνατο του καρκινικού κυττάρου. (239, 240).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η AML είναι μια εξαιρετικά απειλητική για τη ζωή νόσος η οποία αντιμετωπίζεται με τη χορήγηση εντατικής χημειοθεραπείας εφόδου σε επιλέξιμους ασθενείς νεότερης ηλικίας και χωρίς σημαντικές συννοσηρότητες. Παρόλο που πρόκειται για μια ιδιαίτερα ετερογενή νόσο, ο κορμός της χημειοθεραπείας εφόδου παραμένει ο συνδυασμός της ιδαρουβικίνης (ή της δοξορουβικίνης) με την κυταραβίνη. Και οι δύο αυτοί χημειοθεραπευτικοί παράγοντες δρουν μέσω της πρόκλησης βλάβης στο DNA των λευχαιμικών κυττάρων, με αποτέλεσμα την καταστροφή τους(241, 242).

Παρόλο που ο παραπάνω συνδυασμός χημειοθεραπευτικών παραγόντων είναι αποτελεσματικός, σημαντικό ποσοστό ασθενών είτε δεν απαντά στη θεραπείας εφόδου είτε χάνει την αρχική ανταπόκριση, με αποτέλεσμα τα ποσοστά πενταετούς επιβίωσης να κυμαίνονται κάτω από 5% στους ασθενείς νεότερους των 60 ετών(243). Επομένως η κατανόηση των μηχανισμών αντίστασης στην χημειοθεραπεία εφόδου είναι ιδιαίτερα σημαντική για τον σχεδιασμό νέων, στοχευμένων θεραπευτικών προσεγγίσεων οι οποίες θα μπορούσαν να βελτιώσουν τα ποσοστά ανταπόκρισης και τη συνολική επιβίωση στους ασθενείς με AML.

Ο μηχανισμός ανταπόκρισης στη βλάβη του DNA (DNA Damage Response-DDR) αποτελεί ένα ελκυστικό βιολογικό μοντέλο για την έρευνα στη θεραπεία των κακοήθων νεοπλασιών. Πρόκειται για ένα πολύπλοκο μηχανισμό ανταπόκρισης στη βλάβη του DNA, το οποίο περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό μορίων και μονοπατιών. Η κύρια λειτουργία του είναι η παρεμπόδιση της επέκτασης της βλάβης μέσω της αναστολής του κυτταρικού κύκλου έως την επιδιόρθωση της βλάβης, ειδάλλως οδηγεί τα κύτταρα στην απόπτωση.

Διαταραχές του μηχανισμού DDR έχουν σχετισθεί με την παθογένεια της AML, μέσω την συσσώρευσης γενετικών βλαβών. Συγκεκριμένες καταστάσεις όπως συγγενείς ανεπάρκειες του DDR(123), συγγενείς ή σωματικές μεταλλάξεις του *TP53* (244) καθώς και αρκετοί πολυμορφισμοί των γονιδίων DDR (235) έχουν συσχετισθεί με αυξημένη συχνότητα εμφάνισης AML. Ο DDR συμπεριφέρεται ως «δίκικοπο μαχαίρι», με την έννοια ότι διαταραχές του μπορούν να οδηγήσει σε λευχαιμογένεση, ενώ αντίθετα η υπερ-ενεργοποίησή του μπορεί να αναστρέψει την βλάβη που προκλήθηκε στο DNA των λευχαιμικών κυττάρων από τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα και να οδηγήσει σε χημειοανθεκτικότητα.

Σε αυτή τη μελέτη δείχνουμε ότι διάφορα γονίδια DDR υπερεκφράζονται σε κυτταρικές σειρές μετά την επίδραση ιδιουβικίνης και κυταραβίνης. Ένα από αυτά, το *PPP1P15A* παρουσιάζει αυξημένη έκφραση στο μυελό ασθενών με AML σε σύγκριση με το μυελό των ασθενών της ομάδας ελέγχου, ενώ επίσης η καταστολή της έκφρασής του σε κυτταρικές σειρές AML, η οποία μελετήθηκε με δύο διαφορετικές μεθόδους, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της χημειοευαισθησίας των κυττάρων.

ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΙ

Δείγματα Ασθενών και ομάδας ελέγχου

Μονοπύρνα κύτταρα απομονώθηκαν από δείγματα μυελού των οστών από 74 ασθενείς με *de novo* ΟΜΛ και 30 ασθενείς με Λέμφωμα χωρίς ένδειξη συμμετοχής του μυελού των οστών και οι οποίοι θεωρήθηκαν ως η υγιής ομάδα ελέγχου. Όλοι οι ασθενείς με ΟΜΛ έλαβαν μία με δύο θεραπείες εφόδου με το συνδυασμό κυταραβίνης και ιδιουβικίνης και η ανταπόκριση στη θεραπεία αξιολογήθηκε μετά το τέλος της θεραπείας εφόδου. Όλοι οι ασθενείς καθώς και τα άτομα της ομάδας ελέγχου έδωσαν έντυπη συγκατάθεση όπως αυτή προβλέπεται από την Διακήρυξη του Ελσίνκι. Η απομόνωση των μονοπύρνων κυττάρων έγινε με φυγοκέντρηση κλίσης πυκνότητας με τη χρήση του Ficoll-Paque (Lymphoprep, STEM CELL Technologies). Τα κύτταρα φυλάχθηκαν σε θρεπτικό μέσο, RPMI (Gibco) εμπλουτισμένο με 10% εμβρυικό ορό βοδιού (FBS, Gibco) και 5% διμέθυλο-σουλφοξείδιο (DMSO, Origen) και καταψύχθηκαν για σύντομο χρονικό διάστημα στους -80°C. Τα κύτταρα ομογενοποιήθηκαν με τη χρήση της κολώνας QIAshredder (Qiagen Ltd., Hilden, Germany).

Καλλιέργειες Κυττάρων

Τέσσερις αθανатоποιήμενες κυτταρικές σειρές της AML, η MV-4-11, η MOLM-13 (σύντηξη των γονιδίων MLL-AF9 και μετάλλαξη στο γονίδιο FLT3-ITD), η KASUMI-1 (Core Binding Factor AML) και η TF-1 (ερυθρολευχαιμική κυτταρική σειρά) καλλιεργήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες της ATCC®, σε κατάλληλο κλίβανο με 5% διοξείδιο του άνθρακα, 95% αέρα και θερμοκρασία 37°C.

Δοκιμασία Τετραζολίου (MTT assay)

Τα κύτταρα των κυτταρικών σειρών KASUMI-1 και MV-4-11 επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 1×10^5 κύτταρα/mL και στρώθηκαν σε πλάκα κυτταρικής καλλιέργειας των 96 πηγαδιών. Μετά από 16 ώρες, στα κύτταρα χορηγήθηκε ιδιουβικίνη και κυταραβίνη σύμφωνα με τις πηγές της βιβλιογραφίας με σκοπό να εξακριβωθεί το προφίλ της γονιδιακής

τους έκφρασης. Τα κύτταρα των κυτταρικών σειρών MOLM-13 και KASUMI-1 επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 1×10^5 κύτταρα/mL και στρώθηκαν σε πλάκα κυτταρικής καλλιέργειας των 96 πηγαδιών. Έπειτα στα κύτταρα χορηγήθηκε ιδارουβικίνη ή κυταραβίνη σε εύρος συγκεντρώσεων 1nM- 10μM (δεκαπλάσια σταδιακή αύξηση συγκεντρώσεων) και επώαστηκαν για 24, 48, και 72 ώρες. Τα κύτταρα της κυτταρικής σειράς TF-1 επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 1×10^5 κύτταρα/mL και στρώθηκαν σε πλάκα κυτταρικής καλλιέργειας των 96 πηγαδιών. Έπειτα τους χορηγήθηκε ιδارουβικίνη (0.01, 0.05, 0.1, 0.2 and 0.5μM) ή κυταραβίνη (0.1, 0.5, 0.1, 2, 5μM) και επώαστηκαν για 24, 48, και 72 ώρες. Η χρωματομετρική μέθοδος 3-(διμεθυλθιαζολη-2-yl)-2,5-διφαινυλο τετραζολιο βρομίδιο (MTT) χρησιμοποιήθηκε για να εξακριβωθεί η κυτταρική βιωσιμότητα σε κάθε χρονικό σημείο και σε καθεμία συγκέντρωση των προαναφερόμενων παραγόντων. Το MTT (Sigma, USA) διαλύθηκε σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (PBS) σε συγκέντρωση 5mg/ml και προστέθηκε σε τελικό όγκο 20μL στις πλάκες κυτταρικής καλλιέργειας των 96 πηγαδιών. Μετά από επώαση για 4 ώρες στους 37°C και σε 5% διοξείδιο του άνθρακα, οι κρύσταλλοι του formazan διαλύθηκαν σε διάλυμα SDS-HCl και οι πλάκες μετρήθηκαν σε φωτόμετρο στα 570 nm. Όλα τα πειράματα έγιναν σε τρεις επαναλήψεις.

Δοκιμασία Trypan Blue

Επίσης για τον καθορισμό της κυτταρικής βιωσιμότητας μετά τη χορήγηση των προαναφερθέντων παραγόντων στις διάφορες συγκεντρώσεις χρησιμοποιήθηκε και η δοκιμασία trypan blue για 24, 48 και 72 ώρες. Τα κύτταρα των κυτταρικών σειρών MOLM-13 και KASUMI-1 επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 1×10^5 κύτταρα/mL και στρώθηκαν σε πλάκα κυτταρικής καλλιέργειας των 6 πηγαδιών και επώαστηκαν για τα τρία χρονικά σημεία. Έπειτα, ένα μέρος κυτταρικού εναιωρήματος και ένα μέρος διαλύματος 0,4 % trypan blue (Sigma-Aldrich, Merck) αναμείχθηκε και μετρήθηκε σε αιμοκυτταρόμετρο σε 3 με 5 λεπτά. Όλα τα πειράματα έγιναν σε τρεις επαναλήψεις.

Υπολογισμός της συγκέντρωσης αναστολής 50%

Οι τιμές της ανασταλτικής συγκέντρωσης 50% (IC50) στα τρία χρονικά σημεία, 24, 48 και 72 ώρες στις διάφορες συγκεντρώσεις της ιδارουβικίνης ή της κυταραβίνης στις κυτταρικές σειρές MOLM-13 και KASUMI-1, υπολογίστηκαν σχεδιάζοντας διαγράμματα της % κυτταρικής βιωσιμότητας συναρτήσει του χρόνου για κάθε συγκέντρωση των δύο

παραγόντων. Τα αποτελέσματα της κυτταρικής βιωσιμότητας που προέκυψαν από τη δοκιμασία τετραζολίου (MTT) επιβεβαιώθηκαν και με τη δοκιμασία της trypan blue.

Δοκιμασία Κλωνογονικότητας

Τα κύτταρα της κυτταρικής σειράς TF-1 μετρήθηκαν και επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 2000 κύτταρα/ml σε καλλιεργητικό μέσο βασισμένο στη μεθυλο-κυτταρίνη. Μετά από 10 με 14 μέρες επώασης στους 37°C και 5% διοξείδιο του άνθρακα η ανάκτηση των μονάδων που δημιουργήσαν αποικίες προσδιορίστηκε με μέτρηση των αποικιών σε οπτικό μικροσκόπιο. Τα κυτταρικά συσσωματώματα άνω των 50 κυττάρων θεωρήθηκαν ως αποικία.

Διαμόλυνση με siRNA

Τα κύτταρα των κυτταρικών σειρών MOLM-13 και KASUMI-1 επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε πλάκα κυτταρικής καλλιέργειας των 6 πηγαδιών σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις. Μετά από την καθορισμένη περίοδο επώασης, στα MOLM-13 κύτταρα χορηγήθηκε ιδαρουβικίνη (10 nM) ή κυταραβίνη (100 nM) ενώ στα κύτταρα της KASUMI-1 χορηγήθηκε ιδαρουβικίνη (1 nM) ή κυταραβίνη (100 nM). Συμπεριλήφθηκαν πηγάδια με κύτταρα χωρίς χορήγηση των προαναφερθέντων παραγόντων (αρνητικές ομάδες ελέγχου). Μετά από 24 ώρες 10 pmoI siRNA διαλύθηκε σε κάθε πηγάδι. Στην πειραματική διάταξη συμπεριλήφθηκαν πηγάδια με 10 pmoI από ανακατεμένη (scrambled) αλληλουχία καθώς επίσης και πηγάδια μόνο με τα αντιδραστήρια της διαμόλυνσης. Κάθε αντίδραση έγινε σε τρεις επαναλήψεις με τη χρήση του Lipofectamine™ RNAiMAX (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc.). Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 και 48 ώρες με τα διαλύματα της διαμόλυνσης. Η αρχή του σχεδιασμού των αλληλουχιών φαίνεται στον πίνακα 2.

Πίνακας 2. Οι αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν για τη διαμόλυνση με siRNA.

oligo	Primer sequence (5'→ 3')
siRNA	AAGGCTGTGTACGCTGTCACG
Negative control (scrambled)	GTGCGCATGCCTTCGGTAAGA

Απομόνωση ολικού RNA και έλεγχος ποιότητας RNA

Με τη χρήση του RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen Ltd., Hilden, Germany) απομονώθηκε το συνολικό RNA από τα δείγματα των ασθενών. Επιπλέον, συνολικό RNA απομονώθηκε και από τις διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές με τη χρήση του NucleoZOL (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Germany). Η συγκέντρωση του ολικού RNA υπολογίστηκε με το BioSpec-nano Micro-volume UV-vis (Shimadzu, Kyoto, Japan) φασματοφωτόμετρο και η ακεραιότητά του παρατηρήθηκε μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2%.

Αντίστροφη μεταγραφική και ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου.

200 ng από κάθε απομονωμένο RNA των δειγμάτων των ασθενών χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη αλληλουχία για τη σύνθεση συμπληρωματικού DNA. Η σύνθεση της πρώτης αλυσίδας έγινε με τη χρήση της M-MLV (Life Technologies Ltd., Carlsbad, CA, USA) αντίστροφης μεταγραφάσης και με εκκινητές ολιγο-δεοξυθυμιδίνης. Όλες οι αντιδράσεις έγιναν σύμφωνα με της οδηγίες του κατασκευαστή. 100 ng από κάθε συμπληρωματικό DNA διαλύθηκε σε QuantiNova Yellow Template Dilution Buffer και αναμίχθηκε με 10μl από 2x QuantiNova SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen Ltd., Hilden, Germany), 2 μl από 10x QuantiTect primer, και RNase free water. Στις δοκιμασίες ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου χρησιμοποιήθηκε το KAPA™ SYBR® FAST qPCR master mix (2X) (Kapa Biosystems Inc., Woburn, MA, USA). Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στο QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc.) και σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Η γονιδιακή έκφραση κανονικοποιήθηκε σχετικά με την έκφραση του γονιδίου κυτταρικής οικονομίας, GAPDH και η σχετική γονιδιακή έκφραση υπολογίστηκε με την ΔCt μέθοδο. Η γονιδιακή έκφραση συσχετίστηκε με την κατάσταση της νόσου (ομάδα ελέγχου σε σχέση με τους OML ασθενείς που αποκρίθηκαν στην θεραπεία και με τους OML ασθενείς που δεν αποκρίθηκαν στην θεραπεία) και με τον κυτταρογενετικό κίνδυνο στην OML ομάδα σύμφωνα με τα ELN2017 κριτήρια(245).

Για να διερευνηθεί η επίδραση της ιδιουβικίνης και της κυταραβίνης στις αντίστοιχες ανασταλτικές συγκεντρώσεις 50% στην έκφραση του PPP1R15A στις OML κυτταρικές σειρές, χρησιμοποιήθηκε το προαναφερθέν πρωτόκολλο ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου και προσδιορίθηκε η έκφραση του PPP1R15A μετά την επίδραση κάθε χημειοθεραπευτικού παράγοντα ως log2fold change. Για να αποσαφηνιστεί η λειτουργική σημαντικότητα του PPP1R15A στην κυτταρική βιωσιμότητα και την απόκριση στη θεραπεία της OML διενεργήθηκαν πειράματα αποσιώπησης του γονιδίου PPP1R15A με siRNA στις κυτταρικές σειρές MOLM-13 and KASUMI-1. Η απόδοση της αποσιώπησης

εξακριβώθηκε με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, συγκρίνοντας τα επίπεδα έκφρασης με αυτά των κυττάρων που διαμολύνθηκαν με ανακατεμένη αλληλουχία. Συγκρίσεις κυτταρικής βιωσιμότητας μεταξύ των κυττάρων με αποσιωπημένο PPP1R15A και της αντίστοιχης ομάδας ελέγχου έγιναν μετά τη χορήγηση κυταραβίνης και ιδουρουβικίνης στις ανασταλτικές συγκεντρώσεις 50% για 24 και 48 ώρες. Τα GAPDH, HRPT1 και B2M χρησιμοποιήθηκαν ως γονίδια αναφοράς.

Το ολικό RNA από κύτταρα που δεν τους χορηγήθηκε κάποιος παράγοντας (αρνητική ομάδα ελέγχου), από κύτταρα στα οποία χορηγήθηκε χημειοθεραπεία και σε ζωντανά κύτταρα μετά την έκθεσή τους σε χημειοθεραπεία, αξιολογήθηκε για μεταβολές στη γονιδιακή έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το DNA damage μονοπάτι σηματοδότησης μέσω ανάλυσης συστοιχιών ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης της Qiagen RT² Profiler PCR Array (96-Well Format and 384-Well [4 x 96] Format) Human DNA Damage Signaling Pathway). Η αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση αξιολογήθηκαν και αναλύθηκαν με τη βοήθεια του εργαλείου ανάλυσης, RT2 Profiler PCR Array data analysis tool (Rotor-Gene_2_3_5_1). Οι μεταβολές για κάθε κατάσταση υπολογίστηκαν σε σύγκριση με την αντίστοιχη αρνητική ομάδα ελέγχου.

Όλες οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τα παραπάνω πειράματα φαίνονται στους πίνακες 3 και 4.

Πίνακας 3. Οι εκκινητές QuantiTect

Gene	QuantiTech
<i>PPP1R15A</i>	QT00013321
<i>CDKN1A</i>	QT00062090
<i>EXO1</i>	QT00080717
<i>GADD45G</i>	QT00200557
<i>GADD45A</i>	QT00014084
<i>GAPDH</i>	QT00079247

Πίνακας 4. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του *PPP1R15A*.

Gene	Direction	Primer sequence (5'→ 3')
<i>PPR115A</i>	Sense	GATTCAGAAGCAGCCTTGGG
	Antisense	ATAGATGGCCACTCGGAAGG
<i>GAPDH</i>	Sense	ATGGGGAAGGTGAAGGTCTG
	Antisense	GATATTGTTGCCATCAATGACCC
<i>HPRT1</i>	Sense	TGGAAAGGGTGTATTTCCTCAT
	Antisense	TTGCTGACCTGCTGGATTACAT
<i>B2M</i>	Sense	ACTGAATTCACCCCCACTGA
	Antisense	TCCAAATTCTGCTTGCTTGCTT

Εξάλειψη του γονιδίου *PPP1R15A* με τη χρήση της CRISPR-CAS9

Η αθανатоποιημένη κυτταρική σειρά HEK-293FT διαμολύθηκε με τους PLKO.1-ριγο λεντιϊκούς vectors οι οποίοι εκφράζουν την CRISPR-CAS9 και δύο διαφορετικούς οδηγούς RNA (sgRNAs) που στοχεύουν το γονίδιο *PPP1R15A* (sgRNA1: AGGTCCTGGGAGTATCGTTC, sgRNA2: GGACAACACTCCCGGTGTGA) ή με την ανακατεμένη (scrambled) RNA αλληλουχία (GTGTAGTTCGACCATTCGTG) (Αγοράστηκαν από την VectorBuilder). Τα κύτταρα της TF-1 κυτταρικής σειράς διαμολύθηκαν με τους λεντιϊούς και επιλέχθηκαν με πουρομυκίνη (2μg/ml). Η κλωνοποίηση μοναδιαίων κυττάρων αξιολογήθηκε με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για να επιλεχθούν οι κλώνοι που φέρουν την εξάλειψη του *PPP1R15A* γονιδίου.

Κυτταρομετρία Ροής

Τα κύτταρα των αθανатоποιημένων κυτταρικών σειρών KASUMI-1 και MV-4-11 αξιολογήθηκαν με βάση την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής της χρώσης με Annexin-V για την ανίχνευση των αποπτωτικών κυττάρων. Τα κύτταρα μετά τη χορήγηση με ιραδουβικίνη ή κυταραβίνη πλύθηκαν με παγωμένο φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (PBS) και επαναδιαλυτοποιήθηκαν με σε διάλυμα σύνδεσης της Annexin-V (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂, pH 7.4). Τα κύτταρα βιάφτηκαν με Annexin-V (BD Biosciences Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit) συζευγμένη με τη φθορίζουσα FITC σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η διαλογή των αποπτωτικών κυττάρων από τα ζωντανά έγινε σύμφωνα με την ένταση φθορισμού του FITC και των FSC/SSC χαρακτηριστικών των κυττάρων. Η διαδικασία εκτελέστηκε στους 4οC. Τα κύτταρα της TF-1 κυτταρικής σειράς μονιμοποιήθηκαν

με 4% φορμαλδεΐδη για 15 λεπτά και έγιναν διαπερατά σε μακρομόρια (τους διανοίχθηκαν μεμβρανικές τρύπες) με διάλυμα 100% μεθανόλης για 30 λεπτά. Έπειτα έγινε χρώση των κυττάρων με αντίσωμα ειδικό για το PPP1R15A συζευγμένο με PE (φυκοερυθρίνη) αγορασμένο από την Santa Cruz (sc-373815).). Επιλέχθηκαν οι πληθυσμοί με το σαφέστερο σήμα φθορισμού ή εάν αυτό δεν ήταν εφικτό εκείνοι που διαφοροποιούνταν περισσότερο από τα αρνητικά controls. Η τιμές της Μέσης Έντασης Φθορισμού υπολογίστηκαν με το FlowJo FlowJo analysis software version 10.0.8 (FlowJo, Ashland, CO, USA)

Western blot

Για τη μελέτη της έκφρασης της πρωτεΐνης PPP1R15A, έπειτα από σίγαση του αντίστοιχου γονιδίου, απομονώθηκε ολική πρωτεΐνη από κύτταρα σε διάλυμα απομόνωσης πρωτεϊνών NP-40, το οποίο περιέχουν αναστολείς πρωτεασών (PIC). Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 20.000xg (4°C), συλλογή του υπερκείμενου και προσδιορισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στο εκάστοτε δείγμα με τη μέθοδο Bradford. Στη συνέχεια, τα δείγματα αναλύθηκαν σε ομοιογενές πήκτωμα ακρυλαμίδης (12%) (2 ώρες, 120 Volt, 25°C), μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (2.5 ώρες, 300 mA, 4°C) και η μεμβράνη επώαστηκε για 30 λεπτά σε διάλυμα κάλυψης μη ειδικών θέσεων (25°C). Το πρωτογενές και δευτερογενές αντίσωμα που έφερε την υπεροξειδάση του ραπανικίου (HRP) βρίσκονταν διαλυμένα σε διάλυμα κάλυψης μη ειδικών θέσεων και επώαστηκαν με τη μεμβράνη σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Μετά την επώαση με τα αντισώματα ακολούθησαν 3 ολιγόλεπτα πλυσίματα της μεμβράνης με διάλυμα TBS-T (1x) (25°C). Η ανίχνευση του συμπλόκου αντιγόνου (πρωτεΐνη υπό μελέτη) αντισώματος έγινε με τη μέθοδο ECL και τη χρήση υπεροξειδίου (υπόστρωμα για την υπεροξειδάση) και λουμινόλης ως ενισχυτή χημειοφωταύγειας. Στο τελικό στάδιο, η χημειοφωταύγεια αποτυπώθηκε σε φιλμ αυτοραδιογραφίας σε σκοτεινό θάλαμο και η εμφάνιση των φιλμ πραγματοποιήθηκε με τη μεταφορά των φιλμ σε διάλυμα εμφάνισης (Developer, D-19). Ακολούθησε ξέπλυμα των φιλμ σε νερό βρύσης και εμβάπτιση των φιλμ σε διάλυμα μονιμοποίησης (Fixer). Τελικά τα φιλμ ξεπλύθηκαν καλά με νερό βρύσης, ψηφιοποιήθηκαν με τη χρήση οπτικού σαρωτή (scanner) και επεξεργάστηκαν με τη χρήση του λογισμικού Fiji Image J. Για τον έλεγχο ισοφόρτωσης αλλά και κανονικοποίησης των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη.

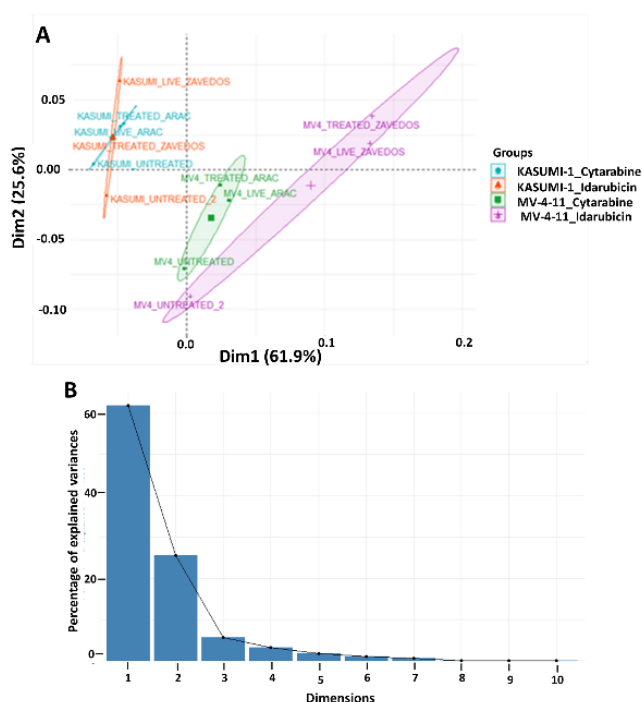
Στατιστική Ανάλυση

Για την απεικόνιση του αντίστοιχου προφίλ γονιδιακής έκφρασης μετά την επίδραση κάθε χημειοθεραπευτικού παράγοντα στις κυτταρικές σειρές KASUMI-1 and MV4-11, χρησιμοποιήθηκε ανάλυση κατά κύριες συνιστώσες (Principal Component Analysis- PCA) σύμφωνα με τις τιμές $2^{-\Delta\Delta Ct}$ για τα 84 DDR γονίδια που προέκυψαν από την PCR συστοιχία Qiagen's RT2 Profiler PCR Array. Για τη διαφορική γονιδιακή έκφραση στα δείγματα των ασθενών και της ομάδας ελέγχου, έγινε στατιστική ανάλυση με Kruskal-Wallis test, ενώ το Dunn's test χρησιμοποιήθηκε για τις διάφορες κατά ζεύγη συγκρίσεις. Στατιστικά σημαντικά θεωρήθηκαν τα αποτελέσματα με $p\text{-value} < 0,05$. Ανάλυση συσχετίσεων έγινε με το Spearman's Rho και η ανάλυση της επιβίωσης έγινε με τη μέθοδο Kaplan Meier και το log-rank test. Η στατιστική ανάλυση έγινε το πρόγραμμα STATA 17.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

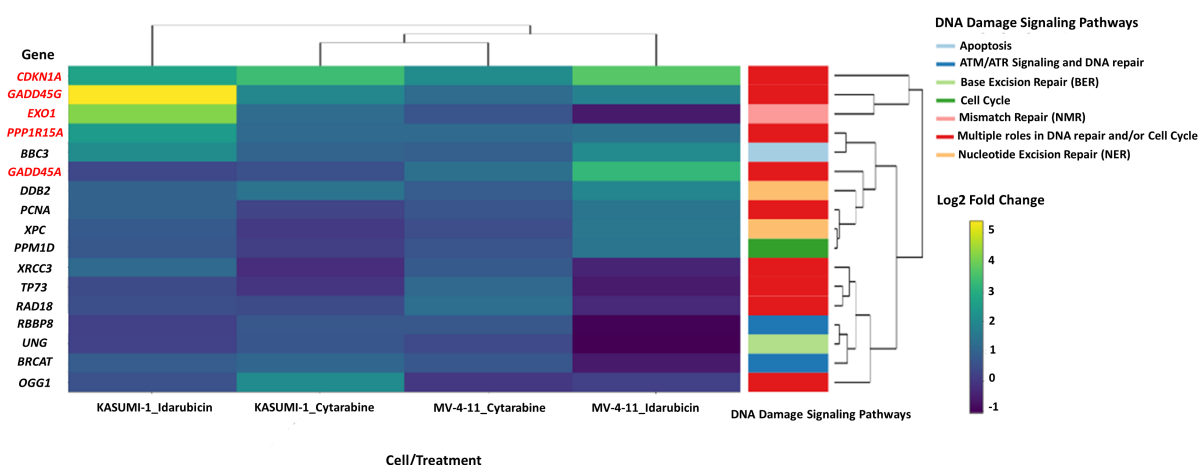
Διαφορική έκφραση γονιδίων DDR σε λευχαιμικές σειρές μετά την επίδραση χημειοθεραπείας

Η ανάλυση PCA των 84 γονιδίων που εμπλέκονται στον DDR αποκάλυψε διαφορετικά πρότυπα έκφρασης στην κυτταρική σειρά MV4-11 και στην KASUMI-1 πριν και μετά την επίδραση ιδارουβικίνης ή κυταραβίνης. Η έκφραση των γονιδίων DDR μετά τη θεραπεία μετρήθηκε τόσο στο συνολικό πληθυσμό των κυττάρων όσο και στα ζωντανά κύτταρα και τα αποτελέσματα απεικονίζονται στην εικόνα 9.



Εικόνα 9. Ανάλυση διακύμανσης της έκφρασης 84 γονιδίων DDR στις κυτταρικές σειρές KASUMI-1 και MV4-11 πριν και μετά την έκθεση σε κυταραβίνη και ιδارουβικίνη. Α. Η απεικόνιση με άξονες τις δύο κύριες συνιστώσες διακρίνει επαρκώς τις διαφορετικές συνθήκες του πειράματος. Β. Ο δύο κύριες συνιστώσες εξηγούν >80% της συνολικής διακύμανσης της έκφρασης των γονιδίων DDR.

Τα παρακάτω γονίδια παρουσίαζαν υπερδιπλάσια αύξηση της log₂ έκφρασης στα ζωντανά κύτταρα μετά από την επίδραση και με τους δύο χημειοθεραπευτικούς παράγοντες: Τα *PPP1R15A*, *CDKN1A* και *GADD45G* υπερεκφράζονταν και στις δύο κυτταρικές σειρές, το *GADD45A* στα ζωντανά κύτταρα MV4-11 και το *EXO1* στα ζωντανά κύτταρα KASUMI-1 (Εικόνα 10).



Εικόνα 10. Heatmap της διαφορικής έκφρασης των γονιδίων με τουλάχιστον μια στατιστικά σημαντική διαφορά στην log₂ έκφραση ($p < 0.05$) είτε στα ζωντανά KASUMI-1 είτε στα ζωντανά MV4-11 κύτταρα μετά την επίδραση ιδارουβικίνης ή κυταραβίνης. Με έντονους χαρακτήρες σημειώνονται τα γονίδια που επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη της έκφρασης σε ασθενείς με AML.

Η σχετική έκφραση αυτών των γονιδίων μελετήθηκε με τη μέθοδο ΔCt.

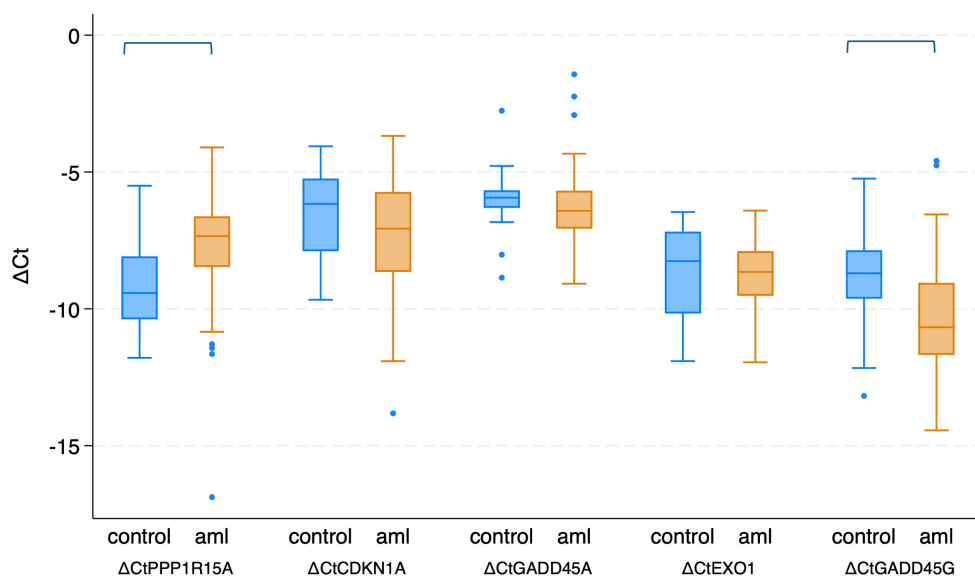
Αποτελέσματα qPCR σε ασθενείς AML και ομάδα ελέγχου

Για να χαρακτηρίσουμε περαιτέρω το σύνολο των 5 επιλεγμένων γονιδίων DDR ερευνήσαμε την έκφρασή τους στο μυελό 74 ασθενών με AML και 30 ατόμων της ομάδας ελέγχου και κάναμε συσχέτιση της έκφρασης με το βαθμό του κυτταρογενετικού κινδύνου στην ομάδα AML. Τα χαρακτηριστικά της ομάδας των ασθενών και της ομάδας ελέγχου απεικονίζονται στον πίνακα 5.

Πίνακας 5. Χαρακτηριστικά ομάδας ασθενών AML και ομάδας ελέγχου

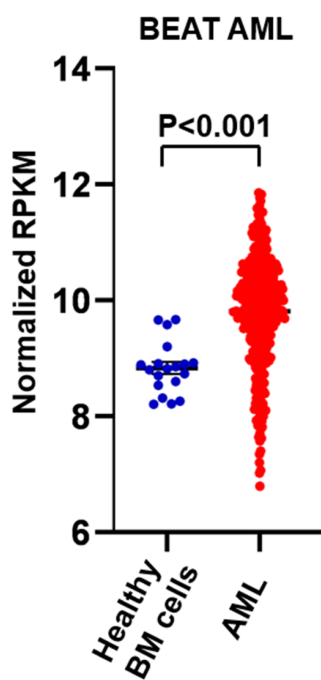
(N)	AML (74)	CONTROL (30)	P
Ηλικία, έτη (διάμεση (5-95% CI))	54 (26-68)	63.5 (23-84)	0.10
	AML		
Καρυότυπος (N)	Ευνοϊκός (10) Ενδιάμεσος (49) Δυσμενής (11) Μη διαθέσιμος (4)		
FLT3-ITD μετάλλαξη (N)	Μη ανιχνεύσιμη (41) Ανιχνεύσιμη (20) Μη διαθέσιμη (13)		
NPM1 μετάλλαξη (N)	Μη ανιχνεύσιμη (37) Ανιχνεύσιμη (25) Μη διαθέσιμη (12)		
Απάντηση στη θεραπεία εφόδου	Πλήρης ύφεση (62) Όχι πλήρης ύφεση (12)		

Η ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων DDR έδειξε μια σημαντική αύξηση στην έκφραση του *PPP1R15A* καθώς και σημαντική μείωση της έκφρασης του *GADD45G* σε ασθενείς AML σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.01$ αντίστοιχα). Το *GADD45A* και το *CDKN1A* είχαν επίσης μειωμένη έκφραση στους ασθενείς με AML σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, μολονότι μη στατιστικά σημαντική ($p = 0.076$ και $p = 0.088$ αντίστοιχα). Η έκφραση του *EXO1* δεν παρουσίαζε διαφοροποίηση μεταξύ της ομάδας της AML και της ομάδας ελέγχου (εικόνα 11).



Εικόνα 11. Διαφορετική έκφραση των γονιδίων DDR στους ασθενείς με AML σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Οι αγκύλες υποδηλώνουν $p < 0.05$.

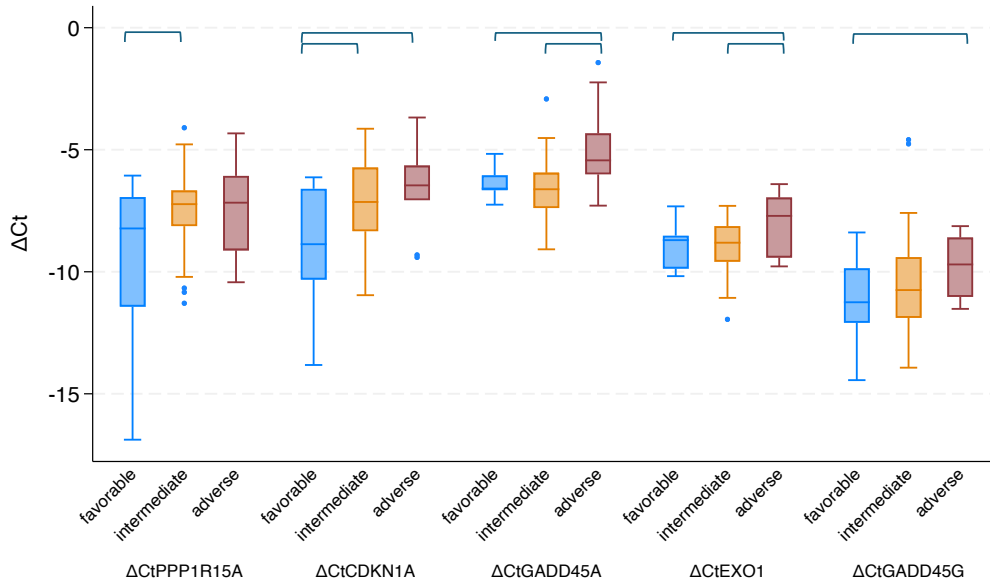
Για να επιβεβαιώσουμε τα ευρήματά μας σε μια ανεξάρτητη δημόσια βάση δεδομένων συγκρίναμε τα επίπεδα RNA του *PPP1R15A* σε μονοπύρρηνα κύτταρα ασθενών AML και υγιών ατόμων χρησιμοποιώντας δεδομένα από τη βάση BEAT AML(246). Η ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων DDR έδειξε μια σημαντική αύξηση στην έκφραση του *PPP1R15A* στα μονοπύρρηνα του μυελού των ασθενών με AML σε σχέση με των υγιών ατόμων (Εικόνα 12).



Εικόνα 12. Η έκφραση του *PPP1R15A* στα μονοπύρρηνα του μυελού ασθενών με AML σε σχέση με αυτά υγιών της ομάδας ελέγχου βασισμένη σε δεδομένα της βάσης BEAT AML.

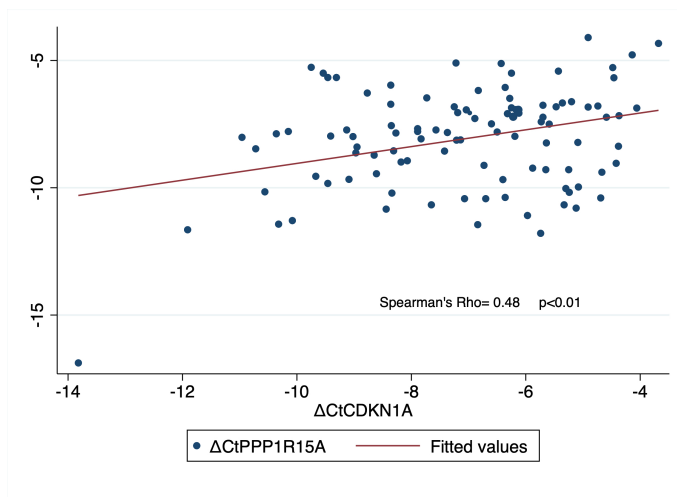
Η ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων DDR με βάση τον κυτταρογενετικό κίνδυνο έδειξε ότι και τα 5 γονίδια υπερεκφράζονται στους ασθενείς με AML όσο αυξάνει ο κυτταρογενετικός κίνδυνος.

Πιο συγκεκριμένα το *PPP1R15A* εμφάνιζε αύξηση στους ασθενείς ενδιάμεσου κινδύνου σε σχέση με τους ασθενείς ευνοϊκού κινδύνου, το *CDKN1A* υπερεκφράζεται στην AML με ενδιάμεσο και δυσμενή καρύτυπο σε σχέση με την AML με ευνοϊκό καρύτυπο, το *GADD45A* και το *EXO1* υπερεκφράζονται σε ασθενείς με δυσμενή καρύτυπο έναντι των ασθενών με ενδιάμεσο και ευνοϊκού κινδύνου καρύτυπο και το *GADD45G* υπερεκφράζεται σε ασθενείς δυσμενούς κινδύνου έναντι των ασθενών ευνοϊκού κινδύνου (Εικόνα 13).



Εικόνα 13. Διαφορετική έκφραση των γονιδίων DDR στις διάφορες κατηγορίες κυτταρογενετικού κινδύνου στους ασθενείς με AML της μελέτης μας. Οι αγκύλες υποδηλώνουν $p < 0.05$.

Τέλος, παρατηρήθηκε μια σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του *PPP1R15A* και του *CDKN1A* στους ασθενείς AML της μελέτης μας (Εικόνα 14).



Εικόνα 14. Συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του *PPP1R15A* και του *CDKN1A* στους ασθενείς με AML.

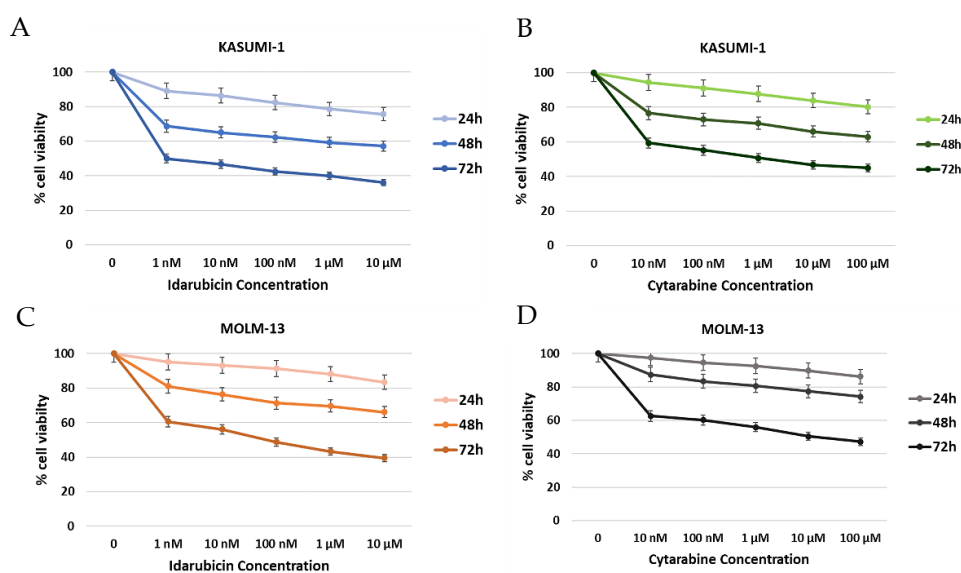
Τα αποτελέσματά μας δεν δείχνουν διαφορά στην έκφραση των 5 γονιδίων DDR μεταξύ των ασθενών με AML που ανταποκρίθηκαν στην χημειοθεραπεία εφόδου (πέτυχαν πλήρη ύφεση της νόσου) σε σχέση με αυτούς που δεν ανταποκρίθηκαν. Επίσης δεν βρήκαμε διαφορά στην

έκφραση των γονιδίων αυτών όσον αφορά τους ασθενείς AML με ή χωρίς μεταλλάξεις του NPM1 ή του FLT3. Τέλος, δεν παρατηρήθηκε επίδραση της έκφρασης των γονιδίων αυτών στη συνολική επιβίωση ή στην επιβίωση χωρίς νόσο των ασθενών.

Συνολικά, τα ευρήματά μας δείχνουν ότι το *PPP1R15A* είναι το μόνο από τα 5 επιλεγμένα γονίδια DDR που παρουσιάζει αύξηση της έκφρασης μετά την επίδραση κυταραβίνης ή ιδارουβικίνης σε κυτταρικές σειρές AML και το οποίο υπερεκφράζεται σε ασθενείς με AML, ενώ η υπερέκφρασή του σχετίζεται με αυξημένο κυτταρογενετικό κίνδυνο.

Τμές ανασταλτικής συγκέντρωσης 50% (IC50) μετά από θεραπεία με ιδارουβικίνη ή κυταραβίνη σε κυτταρικές σειρές AML

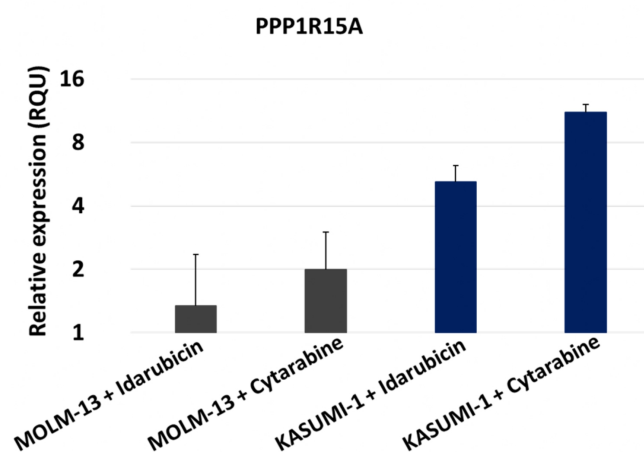
Η ανάλυσή μας, βασισμένη στην δοκιμασία MTT έδειξε ότι η ιδارουβικίνη έχει ένα IC50 10nM στην κυτταρική σειρά MOLM-13 και 1nM στην κυτταρική σειρά KASUMI-1. Η κυταραβίνη απεναντίας, έχει IC50 100 nM τόσο στην MOLM-13 όσο και στην KASUMI-1 κυτταρική σειρά. Όλες οι ανασταλτικές συγκεντρώσεις 50% παρατηρήθηκαν στις 72 ώρες μετά την έκθεση σε θεραπεία (εικόνα 15). Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η ιδارουβικίνη διαθέτει ελαφρώς εντονότερη επίδραση στην κυτταρική βιωσιμότητα σε σχέση με την κυταραβίνη.



Εικόνα 15. Προσδιορισμός της IC50 μετά από χημειοθεραπεία σε κυτταρικές σειρές MOLM-13 και KASUMI-1 χρησιμοποιώντας της μέθοδο MTT

Συγκριτική έκφραση του γονιδίου *PPP1R15A* στην κυτταρική σειρά MOLM-13 και KASUMI-1 μετά από επίδραση με ιδارουβικίνη και κυταραβίνη

Μετά από 72 ώρες έκθεσης, παρατηρήσαμε αύξηση της σχετικής έκφρασης του *PPP1R15A* και στις δύο κυτταρικές σειρές MOLM-13 και KASUMI-1 σε σχέση με τα μη εκτεθέντα κύτταρα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η διαφορά στην αύξηση της έκφρασης του *PPP1R15A* μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών μετά την επίδραση της ιδارουβικίνης μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών. Στην κυτταρική σειρά MOLM-13, η έκθεση σε συγκέντρωση ιδارουβικίνης ίση με την IC50 είχε ως αποτέλεσμα μια ήπια αύξηση της έκφρασης του *PPP1R15A* σε σχέση με τα μη εκτεθέντα κύτταρα. Αντίστοιχα, η επίδραση της κυταραβίνης σε συγκέντρωση ίση με την IC50 είχε ως αποτέλεσμα μια παρόμοια αύξηση της έκφρασης του *PPP1R15A* στα εκτεθέντα σε σχέση με τα μη εκτεθέντα κύτταρα. Στην περίπτωση της κυτταρικής σειράς KASUMI-1, η έκθεση τόσο σε ιδارουβικίνη όσο και σε κυταραβίνη είχε ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη αύξηση της έκφρασης του *PPP1R15A*. Συγκεκριμένα, η έκθεση σε ιδارουβικίνη οδήγησε σε πενταπλασιασμό της έκφρασης του *PPP1R15A* στα εκτεθέντα σε σχέση με τα μη εκτεθέντα κύτταρα. Ακόμα πιο εντυπωσιακή ήταν η αύξηση της έκφρασης του *PPP1R15A* μετά από έκθεση σε κυταραβίνη, η οποία δωδεκαπλασιάστηκε. Αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι τόσο η ιδارουβικίνη όσο και η κυταραβίνη τροποποιούν την έκφραση του *PPP1R15A* στις κυτταρικές σειρές AML, με την κυτταρική σειρά KASUMI-1 να είναι πιο ευαίσθητη στην επίδραση και των δύο χημειοθεραπευτικών παραγόντων (εικόνα 16).

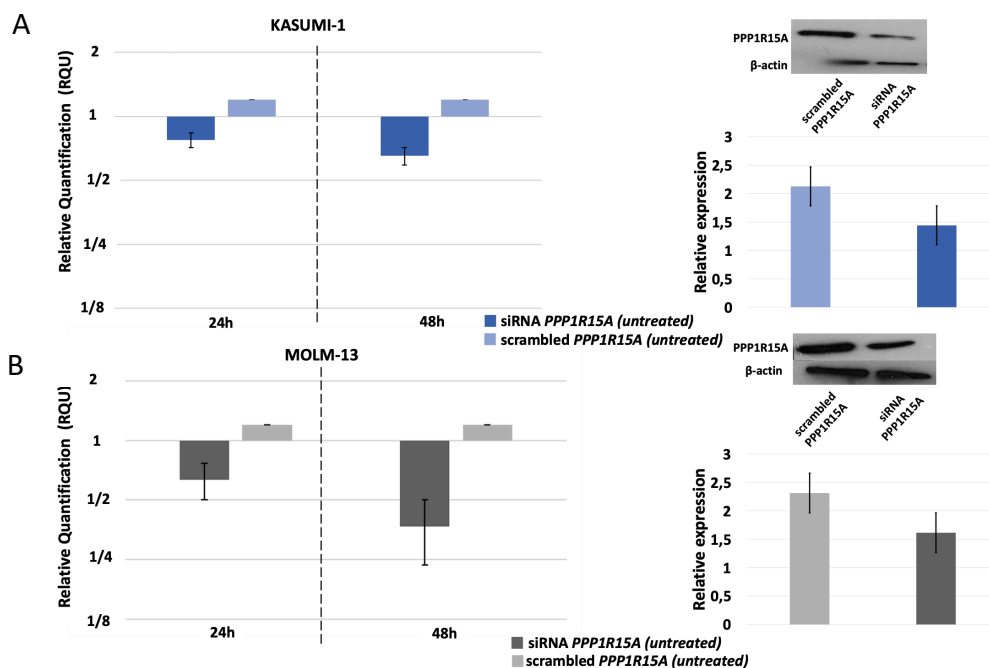


Εικόνα 16. Συγκριτική έκφραση του *PPP1R15A* στις κυτταρικές σειρές MOLM-13 και KASUMI-1 μετά από επίδραση της κυταραβίνης και της ιδارουβικίνης στις αντίστοιχες IC50

Η επίδραση της αποσιώπησης του *PPP1R15A* στη βιωσιμότητα των κυτταρικών σειρών AML και η απόκριση στην ιδارουβικίνη ή την κυταραβίνη

Προκειμένου να διερευνήσουμε την λειτουργική σημασία του *PPP1R15A* στην βιωσιμότητα των λευχαιμικών κυττάρων προχωρήσαμε σε πειράματα αποσιώπησης του *PPP1R15A* χρησιμοποιώντας siRNA στις κυτταρικές σειρές MOLM-13 και KASUMI-1. Αρχικά, εκτιμήσαμε την αποτελεσματικότητα της αποσιώπησης του *PPP1R15A* με qPCR, συγκρίνοντας τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου σε κύτταρα διαμολυμένα με ανακατεμένη (scrambled) αλληλουχία.

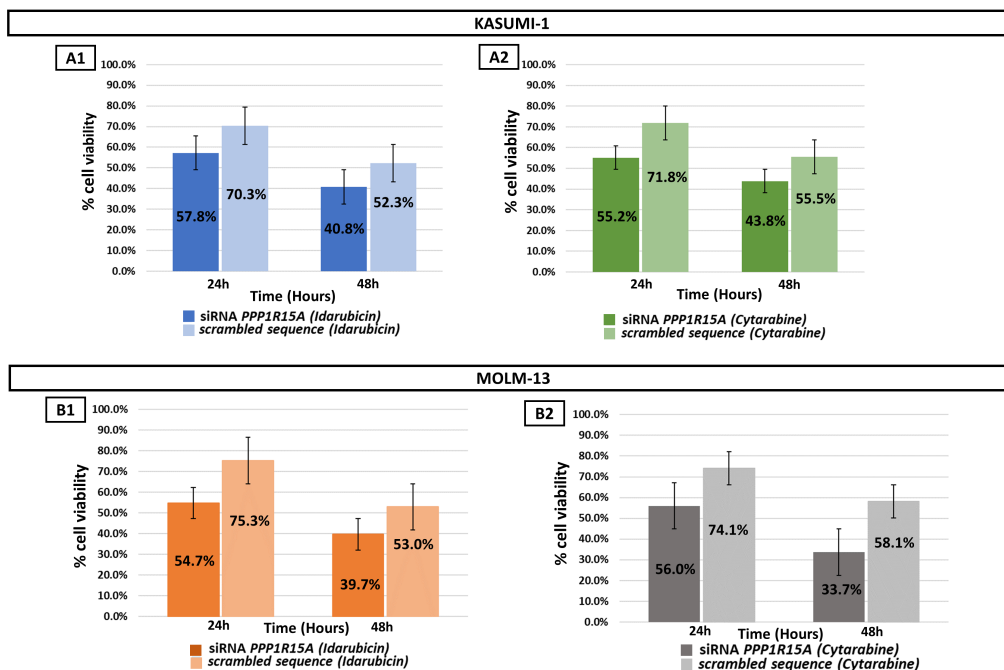
Τόσο στα κύτταρα της σειράς MOLM-13 όσο και σε αυτά την KASUMI-1, η αποσιώπηση μέσω siRNA είχε ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση τόσο των επιπέδων του *PPP1R15A* όσο και της πρωτεΐνης *PPP1R15A* (εικόνα 17).



Εικόνα 17. Επιτυχής αποσιώπηση του γονιδίου *PPP1R15A* μετά από επιμόλυνση της KASUMI-1 και της MOLM-13 με siRNA με qPCR και Western blot

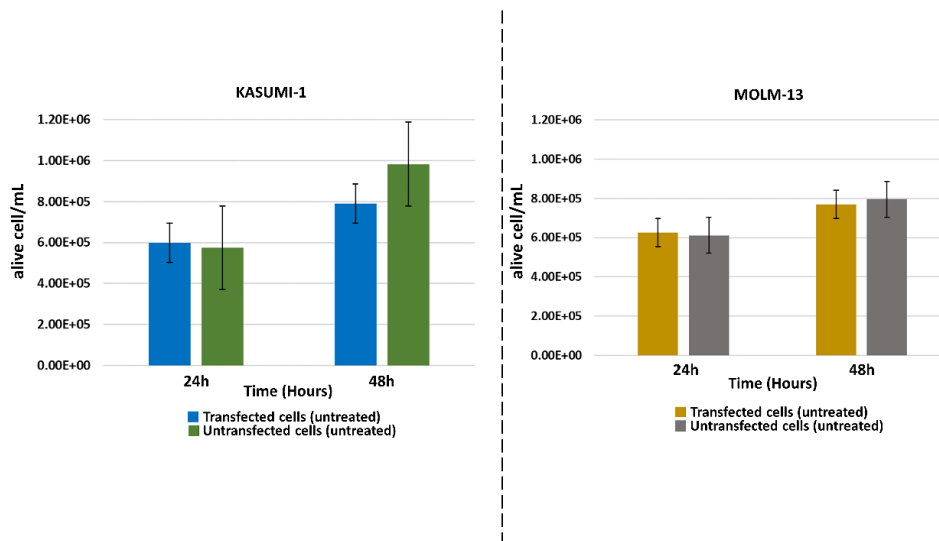
Μετά την αποσιώπηση του *PPP1R15A* και οι δυο κυτταρικές σειρές εκτέθηκαν σε συγκεντρώσεις ιδارουβικίνης και κυταραβίνης ίσες με την ανασταλτική συγκέντρωση 50%. Παρατηρήσαμε σημαντική μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων στα κύτταρα στα οποία είχε γίνει αποσιώπηση του *PPP1R15A* μετά τη χορήγηση χημειοθεραπείας σε σχέση με τα

κύτταρα στα οποία δεν είχε προηγηθεί αποσιώπηση. Αυτή η μείωση ήταν εμφανής τόσο στα κύτταρα της MOLM-13 όσο και της MV4-11 (Εικόνα 18).



Εικόνα 18. Βιωσιμότητα των κυττάρων μετά από έκθεση για 24 και για 48 ώρες σε ιδαρουβικίνη και σε κυταραβίνη. Στην επάνω σειρά απεικονίζεται η βιωσιμότητα των κυττάρων της σειράς KASUMI-1 με και χωρίς την αποσιώπηση του γονιδίου *PPP1R15A* και στην κάτω σειρά η αντίστοιχη βιωσιμότητα στα κύτταρα της σειράς MOLM-13.

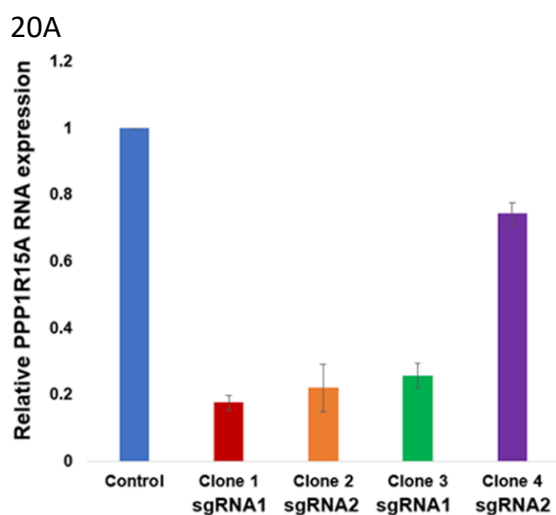
Αξίζει να αναφερθεί ότι η βιωσιμότητα των λευχαιμικών κυττάρων δεν διαφοροποιήθηκε ιδιαίτερα στις κυτταρικές σειρές στις οποίες είχε προηγηθεί αποσιώπηση του γονιδίου *PPP1R15A* σε σχέση με τις κυτταρικές σειρές όπου δεν είχε γίνει αποσιώπηση, όταν τα κύτταρα δεν εκτέθηκαν σε ιδαρουβικίνη ή κυταραβίνη (εικόνα 19).



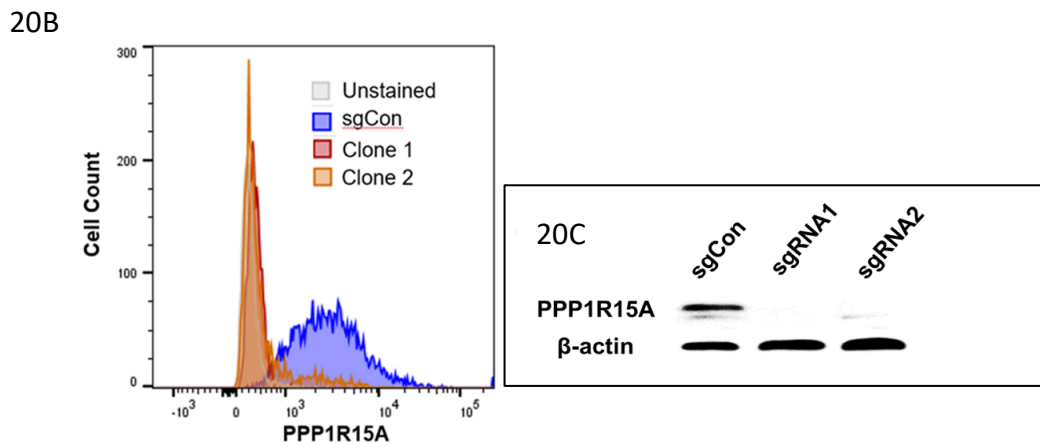
Εικόνα 19. Η αποσιώπηση του *PPP1R15A* δεν μεταβάλλει τη βιωσιμότητα των κυτταρικών σειρών KASUMI-1 και MOLM-13 όταν δεν έχουν εκτεθεί σε χημειοθεραπεία.

Η εξάλειψη του *PPP1R15A* με τη μέθοδο CRISPR-Cas9 αυξάνει την ευαισθησία της κυτταρικής σειράς TF-1 στην ιδαρουβική και την κυταραβίνη

Προκειμένου να εκτιμήσουμε την συμμετοχή του *PPP1R15A* στην χημειοευαισθησία των λευχαιμικών κυττάρων, προχωρήσαμε σε εξάλειψη του γονιδίου με τη μέθοδο CRISPR-Cas9 στη χημειοανθεκτική σειρά TF-1 χρησιμοποιώντας δύο ανεξάρτητα sgRNAs. Μετά από επιλογή με πουρομυκίνη, προχωρήσαμε στην επιλογή των κλώνων ένα προς ένα και οι κλώνοι ελέγχθηκαν χρησιμοποιώντας qPCR για την έκφραση του *PPP1R15A* (εικόνα 20A).



Η καταστολή του PPP1R15A σε κυτταρικό επίπεδο επιβεβαιώθηκε με κυτταρομετρία ροής (εικόνα 20B) και σε επίπεδο πρωτεΐνης με Western blot (εικόνα 20C).



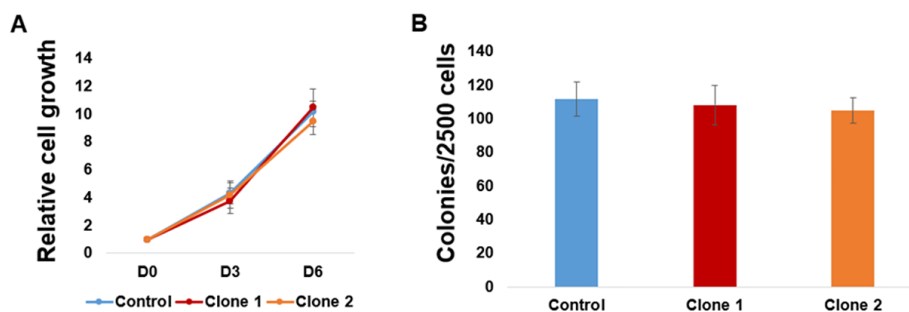
Εικόνα 20. Αποτέλεσμα της καταστολής του *PPP1R15A* με CRISPR-cas9 στην κυτταρική σειρά TF-1

(A) Ταυτοποίηση κλώνων με καταστολή του *PPP1R15A* με qPCR

(B) Επιβεβαίωση της καταστολής με κυτταρομετρία ροής

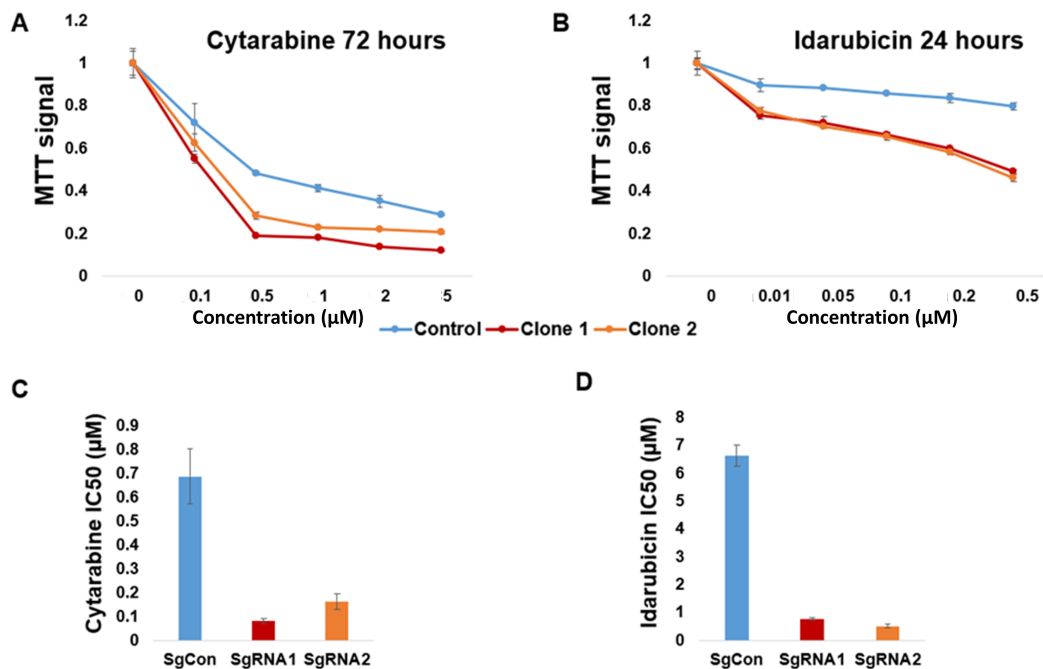
(C) Επιβεβαίωση της καταστολής με Western blot

Μετρώντας τα τεθνεύτα TF-1 κύτταρα με τη δοκιμασία trypan blue τις ημέρες 0, 3 και 6, δεν διαπιστώσαμε κάποια επίδραση της καταστολής του *PPP1R15A* στην ανάπτυξη των κυττάρων (Εικόνα 21A), ενώ η δοκιμασία κλωνογονικότητας με μεθυλσελουλόζη δεν ανέδειξε επίδραση της καταστολής του *PPP1R15A* στην ικανότητα των κυττάρων να σχηματίζουν αποικίες (Εικόνα 21B)



Εικόνα 21. Η καταστολή του *PPP1R15A* δεν μεταβάλλει τη βιωσιμότητα της TF1 όταν δεν έχει εκτεθεί σε χημειοθεραπεία (A) Μέτρηση των ζωντανών κυττάρων με τη μέθοδο trypan blue (B) Δοκιμασία κλωνογονικότητας σε μεθυλσελουλόζη

Τα μη κατεσταλμένα TF-1 κύτταρα (κύτταρα ελέγχου), ο κλώνος 1 (sgRNA1) και ο κλώνος 2 (sgRNA2) εκτέθηκαν σε 0-5 μM κυταραβίνης για 72 ώρες και 0-0,5 μM ιδαρουβικίνης για 24 ώρες. Οι κατεσταλμένοι για το *PPP1R15A* κλώνοι (κλώνος 1 και 2) ήταν σημαντικά πιο ευαίσθητοι στη χημειοθεραπεία σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου (Εικόνα 22 A-B), ενώ παρουσίαζαν μειωμένη IC50 σε σχέση τόσο με την ιδαρουβικίνη όσο και με την κυταραβίνη (Εικόνα 22 C-D).



Εικόνα 22. Η καταστολή του *PPP1R15A* με CRISP—cas9 οδηγεί σε αυξημένη χημειοευαισθησία στην κυταραβίνη (A) και στη ιδαρουβικίνη (B) σε σχέση με τα μη κατεσταλμένα TF1. Οι κατεσταλμένοι κλώνοι εμφανίζουν μειωμένη IC50 στην κυταραβίνη (C) και την ιδαρουβικίνη (D) σε σχέση με τα μη κατεσταλμένα TF1. Επίσης παρατηρήθηκε μείωση της IC50 τόσο για την κυταραβίνη όσο για την ιδαρουβικίνη στους κατεσταλμένους κλώνους σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου.

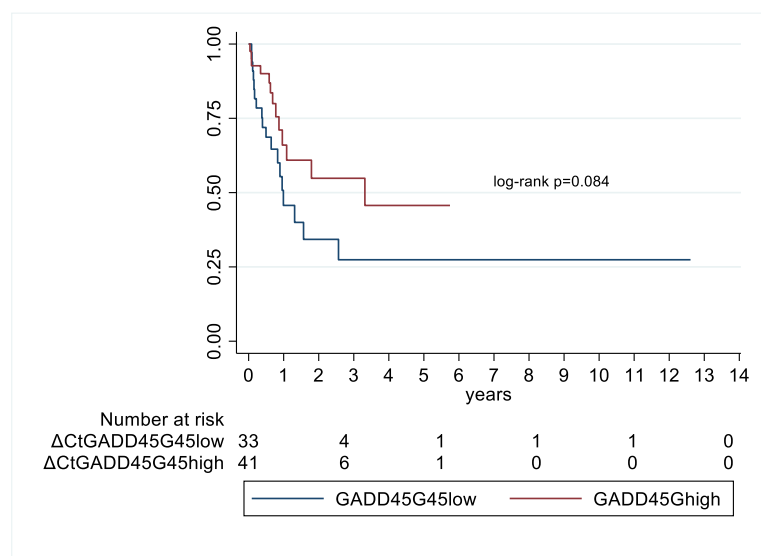
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σε αυτή την εργασία εξετάσαμε την επίδραση της ιδιαιδικής και της κυταραβίνης στην έκφραση μιας σειράς γονιδίων DDR σε κυτταρικές σειρές AML. Γονίδια τα οποία παρουσίαζαν σημαντική αύξηση στο επίπεδο έκφρασής τους επιλέχθηκαν για να μελετηθούν στο μυελό των οστών ασθενών με AML και στο μυελό ατόμων της ομάδας ελέγχου. Τέλος, μελετήσαμε την επίδραση της μείωσης της έκφρασης του γονιδίου *PPP1R15A*, το οποίο ήταν το μόνο γονίδιο DDR που εμφάνιζε αυξημένη έκφραση στους ασθενείς με AML σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, ενώ η έκφρασή του αυξανόταν με την αύξηση του κυταρογενετικού κινδύνου. Δείξαμε για πρώτη φορά ότι η μείωση της έκφρασης του γονιδίου αυξάνει την χημειοευαισθησία των κυττάρων της AML.

Χρησιμοποιώντας μικροσυστοιχίες PCR παρατηρήσαμε μια αύξηση της έκφρασης πέντε γονιδίων DDR (*CDKN1A*, *GADD45A*, *GADD45G*, *EXO1* and *PPP1R15A*) στις κυτταρικές σειρές Kasumi and MV4-11 μετά την έκθεση σε ιδιαιδική και κυταραβίνη. Η χημειοθεραπεία προκαλεί βλάβες στο γονιδίωμα με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μηχανισμού DDR, ενδεχομένως με αλλαγή στην έκφραση των DDR γονιδίων. Αυτή η υπόθεση επιβεβαιώνεται από τα ευρήματα της μελέτης, ότι δηλαδή η έκφραση των γονιδίων DDR αυξάνει όσο αυξάνει ο κυταρογενετικός κίνδυνος σε ασθενείς με AML, δεδομένου ότι ο πιο δυσμενής καρυότυπος σχετίζεται με αύξηση των φορτίου των βλαβών του DNA. Επιπλέον, μια προγενέστερη εργασία από τους Cavelier και συν (247) ανέδειξε μια θετική συσχέτιση μεταξύ του σύνθετου καρυότυπου και της ανίχνευσης της βλάβης του DNA μέσω της φωσφορυλίωσης της ιστόνης 2X, η οποία οδήγησε σε ενεργοποίηση της CHK1 με αποτέλεσμα αναστολή του κυτταρικού. Συνολικά αυτά τα ευρήματα προτείνουν μια σύνδεση μεταξύ της γενετικής αστάθειας και της υπερέκφρασης του DDR. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε σχέση με τον συμβατικό καρυότυπο, η γενετικές βλάβες μπορούν να ανιχνευθούν με υψηλότερη ευκρίνεια συνδυάζοντας γενωμικά και μεταγραφικά δεδομένα(248). Η συσχέτιση της γενωμικής αστάθειας με μεθόδους υψηλής ευκρίνειας με τον DDR πιθανόν να δίνει ακόμα περισσότερες πληροφορίες και θα είχε ενδιαφέρον να διερευνηθεί.

Τα γονίδια *GADD45A* και *GADD45G* ανήκουν σε οικογένεια των γονιδίων που σχετίζονται με την αναστολή της ανάπτυξης του κυττάρου και τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης της βλάβης του DNA και εμπλέκονται στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου, τη διόρθωση των βλαβών του DNA, την επιβίωση, τη γήρανση και την απόπτωση του κυττάρου ως απάντηση στο stress του γονιδιώματος(249). Στην εργασία μας βρήκαμε σημαντική μείωση της έκφρασης του

GADD45G στους ασθενείς με AML σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, επιβεβαιώνοντας τα ευρήματα της εργασίας των Guo και συν(250). Σε συμφωνία με τα ευρήματά των προηγούμενων, παρατηρήσαμε μια τάση για μειωμένη επιβίωση ελεύθερη νόσου στους ασθενείς που είχαν έκφραση του γονιδίου μεγαλύτερη από το 45^ο εκατοστημόριο του συνόλου των ασθενών AML της μελέτης μας ($p=0.084$), όπως φαίνεται στην εικόνα 23.



Εικόνα 23. Συνολική επιβίωση ασθενών με χαμηλή-low (<45%) και υψηλή-high (>45%) έκφραση του *GADD45G*

Στη μελέτη μας βρήκαμε μια μη στατιστικά σημαντική μείωση του *GADD45A* στους ασθενείς με AML σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Το *GADD45A* έχει βρεθεί ότι υπο-εκφράζεται στην FLT3-ITD AML (251) όπως επίσης και στους ασθενείς με MDS/AML που φέρουν την καρβοξυτελική μετάλλαξη του RUNX1(252). Επιπλέον οι Perugini και συν. έχουν δείξει ότι υψηλά επίπεδα μεθυλίωσης του *GADD45A* σχετίζονται με πτωχότερη συνολική επιβίωση στην AML(253).

Επίσης βρήκαμε μια μη στατιστικά σημαντική μείωση της έκφρασης του *CDKN1A* (cyclin dependent kinase inhibitor 1A) στον AML πληθυσμό σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Το *CDKN1A* υπερεκφράζεται μετά από βλάβη του DNA μέσω της πρωτεΐνης p53, με αποτέλεσμα διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 (254) και υπερεκφράζεται στην AML-ETO AML(255).

Όσον αφορά το γονίδιο *EXO1* δεν βρήκαμε διαφορά στα επίπεδα έκφρασής του στην AML σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Το *EXO1* εμπλέκεται στην επιδιόρθωση του DNA και συγκεκριμένα στο μηχανισμό mismatch repair (MMR). Πρόσφατα αναφέρθηκε ότι υπερ-

εκφράζεται στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα(256). Δεν υπάρχουν αναφορές στη βιβλιογραφία για διαταραχή στην έκφρασή του σε ασθενείς με AML.

Μολονότι και τα πέντε γονίδια εμφάνιζαν αυξημένη έκφραση στα δείγματα των ασθενών με AML και ενδιάμεσο ή υψηλό κυτταρογενετικό κίνδυνο σε σχέση με τα δείγματα ασθενών με ευνοϊκό κυτταρογενετικό κίνδυνο, μόνο η έκφραση του *PPP1R15A* βρέθηκε αυξημένη σε δείγματα ασθενών με AML σε σχέση με αυτά της ομάδας ελέγχου, καταδεικνύοντας τη σημασία του γονιδίου ως μεσολαβητή του DDR στη νόσο.

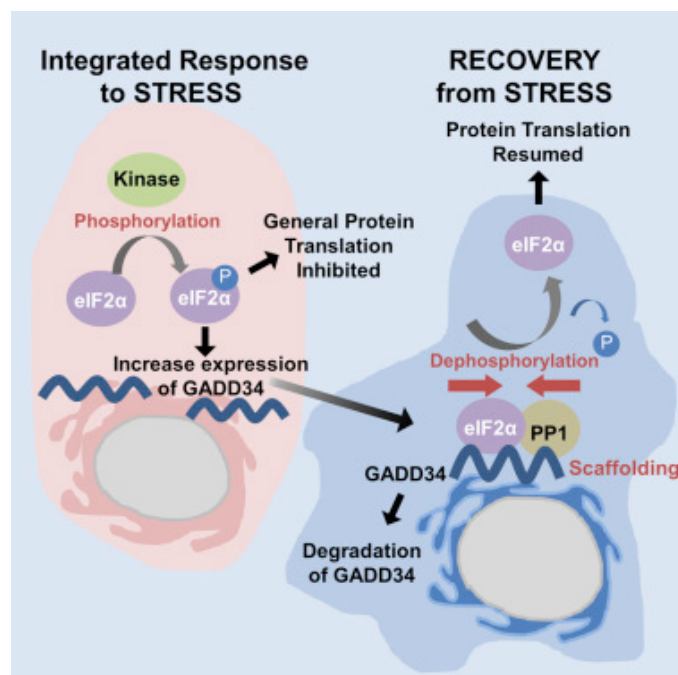
Η μελέτη μας δείχνει για πρώτη φορά ότι το *PPP1R15A* υπερεκφράζεται στους ασθενείς με AML σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Τα αποτελέσματά μας επιβεβαιώθηκαν από αυτά της βάσης δεδομένων BEAT AML. Επίσης αναφέρουμε για πρώτη φορά την αύξηση της χημειοευαισθησίας στις κυτταρικές σειρές AML μετά την μείωση της έκφρασης του *PPP1R15A*. Η πρωτεΐνη *PPP1R15A* είναι μια φωσφατάση η οποία αποτελείται από δύο υποομάδες, την *PPP1* και την *R15A*. Η έκφραση του *PPP1R15A* (γνωστού και ως *GADD34*) επάγεται μετά από θεραπεία με παράγοντες που προκαλούν βλάβες στο DNA(257), ενώ η ανεπάρκειά του φάνηκε να μειώνει το μέγεθος του ηπατοκυτταρικού όγκου σε ένα πειραματικό μοντέλο με ποντίκια(258). Το *PPP1R15A* ευοδώνει την απόπτωση ανεξαρτήτως της p53 μετά από θεραπεία με κάποιους, αλλά όχι όλους τους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες που βλάπτουν το DNA αυξάνοντας έτσι τη χημειοευαισθησία(259). Έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η παρατήρηση ότι στην 11q23 AML, η απόπτωση μέσω *PPP1R15A* μειώνεται λόγω της ανασταλτικής δράσης της πρωτεΐνης σύντηξης στο *PPP1R15A*(260). Αυτές οι αναφορές υποδηλώνουν ότι η απόπτωση μέσω του *PPP1R15A* εξαρτάται τόσο από την υποκείμενη νόσο όσο και από τον θεραπευτικό παράγοντα που χορηγείται για τη θεραπεία της.

Στη μελέτη μας δείξαμε ότι το *PPP1R15A* υπερεκφράζεται στην AML, πιθανώς στα πλαίσια γενετοξικού stress. Επιπρόσθετα, η μείωση της έκφρασής του σχετίζεται με μειωμένη βιωσιμότητα των κυτταρικών σειρών AML μετά την επίδραση χημειοθεραπείας, καταδεικνύοντας ότι το *PPP1R15A* μπορεί να έχει πολλαπλούς μηχανισμούς δράσης στον DDR πέραν της πρόκλησης απόπτωσης. Σε αυτή την υπόθεση συνηγορούν πειραματικά δεδομένα από άλλες μελέτες. Οι Liu και συν, χρησιμοποίησαν ένα μοντέλο αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα σε ποντίκια και έδειξαν ότι η ιστική υποξία αποτελεί ερέθισμα για την έκφραση του *PPP1R15A*. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευση κατασταλτικών κυττάρων μυελικής προέλευσης (myeloid-derived suppressor cells -MDSCs), τα οποία με τη σειρά τους παράγουν αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα α (vascular

endothelial growth factor α) και τροποποιητικό αυξητικό παράγοντα β (transforming growth factor β). Επίσης έδειξαν ότι η καταστολή της έκφρασης του *PPP1R15A* οδήγησε σε συρρίκνωση του όγκου καθώς επίσης και μείωση της συγκέντρωσης των MDSCs.(261).

Εκτός από την ιστική υποξία, το *PPP1R15A* εμπλέκεται στην κυτταρική αυτοφαγία, με διαδικασία η οποία διατηρεί την ανάπτυξη του κακοήθους όγκου κάτω από συνθήκες ιστικής υποξίας και έλλειψης θρεπτικών παραγόντων(262). Το *PPP1R15A* ενισχύει την αυτοφαγία σε διάφορους συμπαγείς όγκους, ενώ ο περιορισμός της αυτοφαγίας ενισχύει την χημειοευασθησία των διαφόρων καρκινικών κυττάρων στα οποία χορηγείται ο αναστολέας του *PPP1R15A* Guanabenz(263, 264). Ο μηχανισμός που διέπει την αυξημένη έκφραση του *PPP1R15A* στην AML χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Η κύρια λειτουργία του *PPP1R15A* είναι η απενεργοποίηση της α υποομάδας του παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eukaryotic initiation factor 2 (eIF2 α). Η πρωτεΐνη *PPP1R15A* προσδένεται στην καταλυτική υποομάδα PP1c του eIF2 α και ευοδώνει την αποφωσφορυλίωση/απενεργοποίηση του eIF2 α . Ο eIF2 α ενεργοποιείται σε συνθήκες ενδοπλασματικού stress, ελλείψεως αμινοξέων, έκθεσης σε ιονίζουσα ακτινοβολία UV και ιογενείς λοιμώξεις και δρα αναστέλοντας την μετάφραση των πρωτεϊνών έτσι ώστε να αποκατασταθεί η πρωτεόσταση. Αυξημένα επίπεδα eIF2 α έχουν ως αποτέλεσμα την αντιρροπιστική αύξηση της έκφρασης του *PPP1R15A* έτσι να αποκατασταθεί η πρωτεϊνοσύνθεση και να ανακάμψει το κύτταρο από το stress (126, 265, 266). Ο τρόπος δράσης του *PPP1R15A* φαίνεται στην εικόνα 22.



Εικόνα 24. Τρόπος δράσης του *PPP1R15A* (267)

Η αναστολή του *PPP1R15A* είναι υπό διερεύνηση για τη θεραπεία των νευροεκφυλιστικών παθήσεων που συνδέονται με παθολογική αναδίπλωση των πρωτεϊνών που συνεπάγονται αυξημένο ενδοπλασματικό stress (268). Είναι αξιοσημείωτο ότι στους ασθενείς της μελέτης μας βρήκαμε μια σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του *PPP1R15A* και του *CDKN1A*. Η έκφραση του *CDKN1A* ευοδώνεται μετά από ενεργοποίηση της p53 από βλάβη του DNA, με αποτέλεσμα αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1(185). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι το ενδοπλασματικό stress οδηγεί σε μείωση της έκφρασης των επιπέδων του p21^{CDKN1A} σε κυτταρικές σειρές από συμπαγείς κακοήθειες. Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν μια πιθανή σύνδεση μεταξύ του ενδοπλασματικού stress και του DDR(254), σε συμφωνία με τα δικά μας ευρήματα στην AML.

Οι μελέτες σίγασης του *PPP1R15A*, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν με δύο ανεξάρτητες μεθόδους υποδεικνύουν ότι η καταστολή του *PPP1R15A* αυξάνει την ευαισθησία των κυττάρων της AML στην ιδαρουβικίνη και την κυταραβίνη. Ιδιαίτερα σημαντικό είναι το γεγονός ότι τα κύτταρα στα οποία έγινε η καταστολή αλλά δεν επέδρασε χημειοθεραπεία δεν εμφάνισαν μείωση της βιωσιμότητάς τους. Αυτό υποδεικνύει ότι η καταστολή του γονιδίου δεν προκαλεί κυτταρικό θάνατο υπό φυσιολογικές συνθήκες. Μια προγενέστερη μελέτη σε ποντίκια έδειξε ότι η ομοζυγωτία σε μετάλλαξη που οδηγούσε σε μειωμένη λειτουργικά έκφραση του γονιδίου *PPP1R15A* δεν προκαλούσε αποκλίσεις από το φυσιολογικό φαινότυπο(269).

Συνοψίζοντας, αυτή η εργασία επιβεβαιώνει τα ευρήματα προηγούμενων ερευνών αναφορικά με τη διαταραχή της έκφρασης γονιδίων DDR στην AML, ενώ για πρώτη φορά αναφέρεται η υπερ-έκφραση του *PPP1R15A* στη νόσο. Τέλος, αναδεικνύει τη λειτουργική σημασία του *PPP1R15A* στη βιωσιμότητα των κυττάρων με AML και τη χημειοευαισθησία.

Μέσω της κατανόησης του ρόλου του *PPP1R15A* στη χημειοευαισθησία, θα μπορέσουμε ενδεχομένως να αναπτύξουμε πρωτοπόρες στρατηγικές για την ενίσχυση της δράσης της χημειοθεραπείας και την βελτίωση των κλινικών εκβάσεων των ασθενών με AML. Φυσικά απαιτείται περισσότερη έρευνα για να διευκρινιστούν πλήρως οι μοριακοί μηχανισμοί που συνδέουν το *PPP1R15A* με την επίδραση της χημειοθεραπείας στο λευχαιμικό κύτταρο, δημιουργώντας έτσι τις προϋποθέσεις για την ανάπτυξη στοχευμένων θεραπειών στην AML.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία (AML) είναι μια απειλητική για τη ζωή μυελική κακοήθεια, της οποίας η θεραπεία συνίσταται στο συνδυασμό των κυτταροτοξικών παραγόντων ιδارουβικίνη και κυτταραβίνη σε ασθενείς που είναι επιλέξιμοι για εντατική χημειοθεραπεία. Δυστυχώς, το ποσοστό αποτυχίας στο συνδυασμό (αντίσταση στη θεραπεία ή υποτροπή της νόσου) είναι υψηλό, με αποτέλεσμα να είναι επιτακτική η ανάγκη για την ανάπτυξη νέων θεραπειών.

Ο μηχανισμός ανταπόκρισης στη βλάβη του DNA (DDR) αποτελεί ένα εκτεταμένο δίκτυο βιολογικών μορίων και μονοπατιών που δρουν με σκοπό την αναστολή του κυτταρικού κύκλου έως την επιδιόρθωση της βλάβης του DNA, διαφορετικά οδηγούν το κύτταρο στην απόπτωση.

Χρησιμοποιώντας κυτταρικές σειρές AML μετά την έκθεσή τους σε ιδارουβικίνη και κυτταραβίνη, μελετήσαμε την έκφραση 84 γονιδίων που εμπλέκονται στο μηχανισμό DDR, μέσω ανάλυσης συστοιχίων αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Επιλέξαμε πέντε γονίδια DDR (*PPP1R15A*, *CDKN1A*, *GADD45A*, *GADD45G* και *EXO1*) των οποίων η έκφραση ήταν σημαντικά αυξημένη στα ζώντα λευχαιμικά κύτταρα μετά την επίδραση της χημειοθεραπείας *in vitro*. Στη συνέχεια μελετήσαμε την έκφρασή τους σε δείγματα διάγνωσης 74 ασθενών με *de novo* AML και 30 δειγμάτων ελέγχου. Η έκφραση και των πέντε αυτών γονιδίων DDR φάνηκε ότι αυξάνεται στα δείγματα των ασθενών με την αύξηση του κυτταρογενετικού κινδύνου. Επιπλέον, το γονίδιο *PPP1R15A* εμφάνιζε σημαντικά αυξημένη έκφραση στα δείγματα AML σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

Κατόπιν, προχωρήσαμε σε αποσιώπηση και καταστολή του γονιδίου *PPP1R15A* σε κυτταρικές σειρές AML σε δύο ανεξάρτητα πειράματα χρησιμοποιώντας τις μεθόδους siRNA και CRISPR-cas9 αντίστοιχα. Η βιωσιμότητα των λευχαιμικών κυττάρων δεν επηρεαζόταν από τη μείωση της έκφρασης του *PPP1R15A*. Μετά την επίδραση χημειοθεραπείας όμως, ήταν σημαντικά μειωμένη σε σχέση με αυτή των λευχαιμικών κυττάρων με διατηρημένη έκφραση του *PPP1R15A* και στα δύο πειράματα.

Τα ευρήματά μας επισημαίνουν ότι ο μηχανισμός DDR υπερεκφράζεται σε ασθενείς με υψηλό κυτταρογενετικό κίνδυνο, αναντανακλώντας αυξημένο γενετοξικό stress. Ειδικότερα, το γονίδιο *PPP1R15A* σχετίζεται με την επιβίωση του κυττάρου από το stress. Η μείωση της έκφρασής του μπορεί να είναι ένας ασφαλής και αποτελεσματικός τρόπος για την αύξηση της χημειοευαισθησίας στην AML.

SUMMARY

Acute Myeloid Leukemia (AML) is a life-threatening myeloid malignancy whose induction treatment consists of combination chemotherapy with idarubicin and cytarabine for fit patients. Treatment failures (primary resistance to treatment or disease relapse) are frequent, urging the need for the development of novel treatments for this disease.

The DNA Damage Response Mechanism (DDR) comprises numerous molecules and pathways intended to arrest the cell cycle until DNA damage is repaired or else drive the cell to apoptosis.

AML-derived cell lines after treatment with idarubicin and cytarabine were used for studying the expression profile of 84 DDR genes, through polymerase chain reaction (PCR) arrays. We chose 5 DDR genes (*PPP1R15A*, *CDKN1A*, *GADD45A*, *GADD45G*, and *EXO1*), which exhibited increased expression in live cells after chemotherapy treatment *in vitro*. Consequently, we studied their expression in 74 *de novo* AML patient and 30 control samples. All five DDR genes were overexpressed in AML samples with increasing cytogenetic risk. Moreover, we found *PPP1R15A* expression to be increased in AML compared to control samples.

Next, we performed *PPP1R15A* silencing in AML cell lines in two separate experiments using siRNA and CRISPR-cas9, respectively. Cell viability was not affected by *PPP1R15A* downregulation alone. However, it was markedly decreased upon treatment with Idarubicin and Cytarabine in both experiments compared to cell lines with preserved *PPP1R15A* expression.

Our findings highlight that DDR regulators demonstrate increased expression in patients with high cytogenetic risk possibly reflecting increased genotoxic stress. Especially, *PPP1R15A* is mainly involved in the recovery of the cells from stress. Its downregulation might be a safe and effective way to increase sensitivity to chemotherapy in this disease.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Dohner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *The New England journal of medicine*. 2015;373(12):1136-52.
2. Lindsley RC, Mar BG, Mazzola E, Grauman PV, Shareef S, Allen SL, et al. Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations. *Blood*. 2015;125(9):1367-76.
3. Juliusson G. Older patients with acute myeloid leukemia benefit from intensive chemotherapy: an update from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia*. 2011;11 Suppl 1:S54-9.
4. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *British journal of haematology*. 1976;33(4):451-8.
5. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1999;17(12):3835-49.
6. Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, Buchner T, Willman CL, Estey EH, et al. Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2003;21(24):4642-9.
7. 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(5):937-51.
8. 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(20):2391-405.
9. Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*. 2022;36(7):1703-19.
10. Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, Borowitz MJ, Calvo KR, Kvasnicka HM, et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood*. 2022;140(11):1200-28.
11. Dohner H, Wei AH, Appelbaum FR, Craddock C, DiNardo CD, Dombret H, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood*. 2022;140(12):1345-77.
12. Ferrara F, Mirto S. Serum LDH value as a predictor of clinical outcome in acute myelogenous leukaemia of the elderly. *British journal of haematology*. 1996;92(3):627-31.
13. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *The New England journal of medicine*. 2016;374(23):2209-21.

14. Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, Laumann K, Geyer S, Bloomfield CD, et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *The New England journal of medicine*. 2017;377(5):454-64.
15. Botnick LE, Hannon EC, Hellman S. Nature of the hemopoietic stem cell compartment and its proliferative potential. *Blood Cells*. 1979;5(2):195-210.
16. Goardon N, Marchi E, Atzberger A, Quek L, Schuh A, Soneji S, et al. Coexistence of LMPP-like and GMP-like leukemia stem cells in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2011;19(1):138-52.
17. Orkin SH. Transcription factors and hematopoietic development. *J Biol Chem*. 1995;270(10):4955-8.
18. Tenen DG, Hromas R, Licht JD, Zhang DE. Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood*. 1997;90(2):489-519.
19. Rabbitts TH. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature*. 1994;372(6502):143-9.
20. Genovese G, Kahler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med*. 2014;371(26):2477-87.
21. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med*. 2014;371(26):2488-98.
22. Ferraris AM, Canepa L, Mareni C, Baule G, Meloni T, Salvidio E, et al. Reexpression of normal stem cells in erythroleukemia during remission. *Blood*. 1983;62(1):177-9.
23. Fearon ER, Burke PJ, Schiffer CA, Zehnbauser BA, Vogelstein B. Differentiation of leukemia cells to polymorphonuclear leukocytes in patients with acute nonlymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 1986;315(1):15-24.
24. Keinanen M, Griffin JD, Bloomfield CD, Machnicki J, de la Chapelle A. Clonal chromosomal abnormalities showing multiple-cell-lineage involvement in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 1988;318(18):1153-8.
25. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 1997;3(7):730-7.
26. Kelly PN, Dakic A, Adams JM, Nutt SL, Strasser A. Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells. *Science*. 2007;317(5836):337.
27. Turhan AG, Lemoine FM, Debert C, Bonnet ML, Baillou C, Picard F, et al. Highly purified primitive hematopoietic stem cells are PML-RARA negative and generate nonclonal progenitors in acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 1995;85(8):2154-61.
28. McCulloch EA. Stem cells in normal and leukemic hemopoiesis (Henry Stratton Lecture, 1982). *Blood*. 1983;62(1):1-13.
29. Bonnet D. Normal and leukaemic stem cells. *Br J Haematol*. 2005;130(4):469-79.
30. Fisher JN, Kalleda N, Stavropoulou V, Schwaller J. The Impact of the Cellular Origin in Acute Myeloid Leukemia: Learning From Mouse Models. *Hemasphere*. 2019;3(1):e152.
31. Quek L, Otto GW, Garnett C, Lhermitte L, Karamitros D, Stoilova B, et al. Genetically distinct leukemic stem cells in human CD34- acute myeloid leukemia are arrested at a hemopoietic precursor-like stage. *J Exp Med*. 2016;213(8):1513-35.

32. Ustun C, Miller JS, Munn DH, Weisdorf DJ, Blazar BR. Regulatory T cells in acute myelogenous leukemia: is it time for immunomodulation? *Blood*. 2011;118(19):5084-95.
33. Zeng Z, Shi YX, Samudio IJ, Wang RY, Ling X, Frolova O, et al. Targeting the leukemia microenvironment by CXCR4 inhibition overcomes resistance to kinase inhibitors and chemotherapy in AML. *Blood*. 2009;113(24):6215-24.
34. Nervi B, Ramirez P, Rettig MP, Uy GL, Holt MS, Ritchey JK, et al. Chemosensitization of acute myeloid leukemia (AML) following mobilization by the CXCR4 antagonist AMD3100. *Blood*. 2009;113(24):6206-14.
35. Colmone A, Amorim M, Pontier AL, Wang S, Jablonski E, Sipkins DA. Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. *Science*. 2008;322(5909):1861-5.
36. Cheng H, Hao S, Liu Y, Pang Y, Ma S, Dong F, et al. Leukemic marrow infiltration reveals a novel role for Egr3 as a potent inhibitor of normal hematopoietic stem cell proliferation. *Blood*. 2015;126(11):1302-13.
37. Patel SB, Nemkov T, D'Alessandro A, Welner RS. Deciphering Metabolic Adaptability of Leukemic Stem Cells. *Front Oncol*. 2022;12:846149.
38. Lagadinou ED, Sach A, Callahan K, Rossi RM, Neering SJ, Minhajuddin M, et al. BCL-2 inhibition targets oxidative phosphorylation and selectively eradicates quiescent human leukemia stem cells. *Cell Stem Cell*. 2013;12(3):329-41.
39. Pollyea DA, Stevens BM, Jones CL, Winters A, Pei S, Minhajuddin M, et al. Venetoclax with azacitidine disrupts energy metabolism and targets leukemia stem cells in patients with acute myeloid leukemia. *Nat Med*. 2018;24(12):1859-66.
40. Miraki-Moud F, Anjos-Afonso F, Hodby KA, Griessinger E, Rosignoli G, Lillington D, et al. Acute myeloid leukemia does not deplete normal hematopoietic stem cells but induces cytopenias by impeding their differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(33):13576-81.
41. Ikeda H, Kanakura Y, Tamaki T, Kuriu A, Kitayama H, Ishikawa J, et al. Expression and functional role of the proto-oncogene c-kit in acute myeloblastic leukemia cells. *Blood*. 1991;78(11):2962-8.
42. Piacibello W, Fubini L, Sanavio F, Brizzi MF, Severino A, Garetto L, et al. Effects of human FLT3 ligand on myeloid leukemia cell growth: heterogeneity in response and synergy with other hematopoietic growth factors. *Blood*. 1995;86(11):4105-14.
43. Meshinchi S, Appelbaum FR. Structural and functional alterations of FLT3 in acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*. 2009;15(13):4263-9.
44. Dong F, Brynes RK, Tidow N, Welte K, Lowenberg B, Touw IP. Mutations in the gene for the granulocyte colony-stimulating-factor receptor in patients with acute myeloid leukemia preceded by severe congenital neutropenia. *N Engl J Med*. 1995;333(8):487-93.
45. Tidow N, Pilz C, Teichmann B, Muller-Brechlin A, Germeshausen M, Kasper B, et al. Clinical relevance of point mutations in the cytoplasmic domain of the granulocyte colony-stimulating factor receptor gene in patients with severe congenital neutropenia. *Blood*. 1997;89(7):2369-75.
46. Wolfler A, Erkeland SJ, Bodner C, Valkhof M, Renner W, Leitner C, et al. A functional single-nucleotide polymorphism of the G-CSF receptor gene predisposes individuals to high-risk myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2005;105(9):3731-6.

47. Hunter MG, Avalos BR. Granulocyte colony-stimulating factor receptor mutations in severe congenital neutropenia transforming to acute myelogenous leukemia confer resistance to apoptosis and enhance cell survival. *Blood*. 2000;95(6):2132-7.
48. Young DC, Griffin JD. Autocrine secretion of GM-CSF in acute myeloblastic leukemia. *Blood*. 1986;68(5):1178-81.
49. Lowenberg B, van Putten WL, Touw IP, Delwel R, Santini V. Autonomous proliferation of leukemic cells in vitro as a determinant of prognosis in adult acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 1993;328(9):614-9.
50. Hunter AE, Rogers SY, Roberts IA, Barrett AJ, Russell N. Autonomous growth of blast cells is associated with reduced survival in acute myeloblastic leukemia. *Blood*. 1993;82(3):899-903.
51. Wetzler M, Baer MR, Bernstein SH, Blumenson L, Stewart C, Barcos M, et al. Expression of c-mpl mRNA, the receptor for thrombopoietin, in acute myeloid leukemia blasts identifies a group of patients with poor response to intensive chemotherapy. *J Clin Oncol*. 1997;15(6):2262-8.
52. Koistinen P, Wang C, Curtis JE, McCulloch EA. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 protect leukemic blast cells from ara-C toxicity. *Leukemia*. 1991;5(9):789-95.
53. Lotem J, Sachs L. Hematopoietic cytokines inhibit apoptosis induced by transforming growth factor beta 1 and cancer chemotherapy compounds in myeloid leukemic cells. *Blood*. 1992;80(7):1750-7.
54. Lisovsky M, Estrov Z, Zhang X, Consoli U, Sanchez-Williams G, Snell V, et al. Flt3 ligand stimulates proliferation and inhibits apoptosis of acute myeloid leukemia cells: regulation of Bcl-2 and Bax. *Blood*. 1996;88(10):3987-97.
55. Jacobs A. Leukaemia Research Fund annual guest lecture 1990. Genetics lesions in preleukaemia. *Leukemia*. 1991;5(4):277-82.
56. Ley TJ, Mardis ER, Ding L, Fulton B, McLellan MD, Chen K, et al. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature*. 2008;456(7218):66-72.
57. Radtke I, Mullighan CG, Ishii M, Su X, Cheng J, Ma J, et al. Genomic analysis reveals few genetic alterations in pediatric acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(31):12944-9.
58. Walter MJ, Payton JE, Ries RE, Shannon WD, Deshmukh H, Zhao Y, et al. Acquired copy number alterations in adult acute myeloid leukemia genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(31):12950-5.
59. Reilly JT. Pathogenesis of acute myeloid leukaemia and inv(16)(p13;q22): a paradigm for understanding leukaemogenesis? *Br J Haematol*. 2005;128(1):18-34.
60. Bachas C, Schuurhuis GJ, Hollink IH, Kwidama ZJ, Goemans BF, Zwaan CM, et al. High-frequency type I/II mutational shifts between diagnosis and relapse are associated with outcome in pediatric AML: implications for personalized medicine. *Blood*. 2010;116(15):2752-8.
61. Takahashi S. Current findings for recurring mutations in acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol*. 2011;4:36.
62. Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science*. 1990;247(4944):824-30.

63. Rubin CM, Larson RA, Anastasi J, Winter JN, Thangavelu M, Vardiman JW, et al. t(3;21)(q26;q22): a recurring chromosomal abnormality in therapy-related myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Blood*. 1990;76(12):2594-8.
64. Feinstein E, Cimino G, Gale RP, Alimena G, Berthier R, Kishi K, et al. p53 in chronic myelogenous leukemia in acute phase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(14):6293-7.
65. Yuan Y, Zhou L, Miyamoto T, Iwasaki H, Harakawa N, Hetherington CJ, et al. AML1-ETO expression is directly involved in the development of acute myeloid leukemia in the presence of additional mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(18):10398-403.
66. Nishida S, Hosen N, Shirakata T, Kanato K, Yanagihara M, Nakatsuka S, et al. AML1-ETO rapidly induces acute myeloblastic leukemia in cooperation with the Wilms tumor gene, WT1. *Blood*. 2006;107(8):3303-12.
67. Nucifora G, Larson RA, Rowley JD. Persistence of the 8;21 translocation in patients with acute myeloid leukemia type M2 in long-term remission. *Blood*. 1993;82(3):712-5.
68. Wiemels JL, Xiao Z, Buffler PA, Maia AT, Ma X, Dicks BM, et al. In utero origin of t(8;21) AML1-ETO translocations in childhood acute myeloid leukemia. *Blood*. 2002;99(10):3801-5.
69. Fialkow PJ, Janssen JW, Bartram CR. Clonal remissions in acute nonlymphocytic leukemia: evidence for a multistep pathogenesis of the malignancy. *Blood*. 1991;77(7):1415-7.
70. Bartram CR, Ludwig WD, Hiddemann W, Lyons J, Buschle M, Ritter J, et al. Acute myeloid leukemia: analysis of ras gene mutations and clonality defined by polymorphic X-linked loci. *Leukemia*. 1989;3(4):247-56.
71. Busque L, Gilliland DG. Clonal evolution in acute myeloid leukemia. *Blood*. 1993;82(2):337-42.
72. Jowitt SN, Liu Yin JA, Saunders MJ, Lucas GS. Clonal remissions in acute myeloid leukaemia are commonly associated with features of trilineage myelodysplasia during remission. *Br J Haematol*. 1993;85(4):698-705.
73. Jinnai I, Nagai K, Yoshida S, Toyoda A, Murohashi I, Bessho M, et al. Incidence and characteristics of clonal hematopoiesis in remission of acute myeloid leukemia in relation to morphological dysplasia. *Leukemia*. 1995;9(10):1756-61.
74. Cancer Genome Atlas Research N, Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2013;368(22):2059-74.
75. Walter MJ, Shen D, Ding L, Shao J, Koboldt DC, Chen K, et al. Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2012;366(12):1090-8.
76. Ding L, Ley TJ, Larson DE, Miller CA, Koboldt DC, Welch JS, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature*. 2012;481(7382):506-10.
77. Vosberg S, Greif PA. Clonal evolution of acute myeloid leukemia from diagnosis to relapse. *Genes Chromosomes Cancer*. 2019;58(12):839-49.
78. Parkin B, Ouillette P, Li Y, Keller J, Lam C, Roulston D, et al. Clonal evolution and devolution after chemotherapy in adult acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2013;121(2):369-77.

79. Bochtler T, Stolzel F, Heilig CE, Kunz C, Mohr B, Jauch A, et al. Clonal heterogeneity as detected by metaphase karyotyping is an indicator of poor prognosis in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2013;31(31):3898-905.
80. Welch JS, Ley TJ, Link DC, Miller CA, Larson DE, Koboldt DC, et al. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell.* 2012;150(2):264-78.
81. Pagana L, Pulsoni A, Tosti ME, Avvisati G, Mele L, Mele M, et al. Clinical and biological features of acute myeloid leukaemia occurring as second malignancy: GIMEMA archive of adult acute leukaemia. *Br J Haematol.* 2001;112(1):109-17.
82. Levine EG, Bloomfield CD. Leukemias and myelodysplastic syndromes secondary to drug, radiation, and environmental exposure. *Semin Oncol.* 1992;19(1):47-84.
83. Miller JS, Arthur DC, Litz CE, Neglia JP, Miller WJ, Weisdorf DJ. Myelodysplastic syndrome after autologous bone marrow transplantation: an additional late complication of curative cancer therapy. *Blood.* 1994;83(12):3780-6.
84. Darrington DL, Vose JM, Anderson JR, Bierman PJ, Bishop MR, Chan WC, et al. Incidence and characterization of secondary myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia following high-dose chemoradiotherapy and autologous stem-cell transplantation for lymphoid malignancies. *J Clin Oncol.* 1994;12(12):2527-34.
85. Stone RM, Neuberg D, Soiffer R, Takvorian T, Whelan M, Rabinowe SN, et al. Myelodysplastic syndrome as a late complication following autologous bone marrow transplantation for non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol.* 1994;12(12):2535-42.
86. Seedhouse C, Russell N. Advances in the understanding of susceptibility to treatment-related acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2007;137(6):513-29.
87. Guillem V, Tormo M. Influence of DNA damage and repair upon the risk of treatment related leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2008;49(2):204-17.
88. Thirman MJ, Gill HJ, Burnett RC, Mbangkollo D, McCabe NR, Kobayashi H, et al. Rearrangement of the MLL gene in acute lymphoblastic and acute myeloid leukemias with 11q23 chromosomal translocations. *N Engl J Med.* 1993;329(13):909-14.
89. Albain KS, Le Beau MM, Ullirsch R, Schumacher H. Implication of prior treatment with drug combinations including inhibitors of topoisomerase II in therapy-related monocytic leukemia with a 9;11 translocation. *Genes Chromosomes Cancer.* 1990;2(1):53-8.
90. Pedersen-Bjergaard J, Philip P. Two different classes of therapy-related and de-novo acute myeloid leukemia? *Cancer Genet Cytogenet.* 1991;55(1):119-24.
91. Super HJ, McCabe NR, Thirman MJ, Larson RA, Le Beau MM, Pedersen-Bjergaard J, et al. Rearrangements of the MLL gene in therapy-related acute myeloid leukemia in patients previously treated with agents targeting DNA-topoisomerase II. *Blood.* 1993;82(12):3705-11.
92. Chakraborty S, Sun CL, Francisco L, Sabado M, Li L, Chang KL, et al. Accelerated telomere shortening precedes development of therapy-related myelodysplasia or acute myelogenous leukemia after autologous transplantation for lymphoma. *J Clin Oncol.* 2009;27(5):791-8.
93. Calado RT, Regal JA, Hills M, Yewdell WT, Dalmazzo LF, Zago MA, et al. Constitutional hypomorphic telomerase mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(4):1187-92.

94. Allan JM, Wild CP, Rollinson S, Willett EV, Moorman AV, Dovey GJ, et al. Polymorphism in glutathione S-transferase P1 is associated with susceptibility to chemotherapy-induced leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(20):11592-7.
95. Dahabreh IJ, Giannouli S, Gota V, Voulgarelis M. GSTT1 and GSTM1 polymorphisms and myelodysplastic syndrome risk: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 2010;126(7):1716-23.
96. Chen H, Sandler DP, Taylor JA, Shore DL, Liu E, Bloomfield CD, Bell DA. Increased risk for myelodysplastic syndromes in individuals with glutathione transferase theta 1 (GSTT1) gene defect. *Lancet*. 1996;347(8997):295-7.
97. Takahashi K, Wang F, Kantarjian H, Doss D, Khanna K, Thompson E, et al. Preleukaemic clonal haemopoiesis and risk of therapy-related myeloid neoplasms: a case-control study. *Lancet Oncol*. 2017;18(1):100-11.
98. Little JB. Cellular, molecular, and carcinogenic effects of radiation. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1993;7(2):337-52.
99. Ichimaru M, Tomonaga M, Amenomori T, Matsuo T. Atomic bomb and leukemia. *J Radiat Res*. 1991;32 Suppl 2:14-9.
100. Yoshinaga S, Mabuchi K, Sigurdson AJ, Doody MM, Ron E. Cancer risks among radiologists and radiologic technologists: review of epidemiologic studies. *Radiology*. 2004;233(2):313-21.
101. Shuryak I, Sachs RK, Hlatky L, Little MP, Hahnfeldt P, Brenner DJ. Radiation-induced leukemia at doses relevant to radiation therapy: modeling mechanisms and estimating risks. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98(24):1794-806.
102. Kaldor JM, Day NE, Band P, Choi NW, Clarke EA, Coleman MP, et al. Second malignancies following testicular cancer, ovarian cancer and Hodgkin's disease: an international collaborative study among cancer registries. *Int J Cancer*. 1987;39(5):571-85.
103. Valagussa P, Santoro A, Fossati-Bellani F, Banfi A, Bonadonna G. Second acute leukemia and other malignancies following treatment for Hodgkin's disease. *J Clin Oncol*. 1986;4(6):830-7.
104. Blayney DW, Longo DL, Young RC, Greene MH, Hubbard SM, Postal MG, et al. Decreasing risk of leukemia with prolonged follow-up after chemotherapy and radiotherapy for Hodgkin's disease. *N Engl J Med*. 1987;316(12):710-4.
105. van Leeuwen FE, Somers R, Taal BG, van Heerde P, Coster B, Dozeman T, et al. Increased risk of lung cancer, non-Hodgkin's lymphoma, and leukemia following Hodgkin's disease. *J Clin Oncol*. 1989;7(8):1046-58.
106. Andrieu JM, Ifrah N, Payen C, Fermanian J, Coscas Y, Flandrin G. Increased risk of secondary acute nonlymphocytic leukemia after extended-field radiation therapy combined with MOPP chemotherapy for Hodgkin's disease. *J Clin Oncol*. 1990;8(7):1148-54.
107. Pearce MS, Salotti JA, Little MP, McHugh K, Lee C, Kim KP, et al. Radiation exposure from CT scans in childhood and subsequent risk of leukaemia and brain tumours: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2012;380(9840):499-505.
108. Austin H, Delzell E, Cole P. Benzene and leukemia. A review of the literature and a risk assessment. *Am J Epidemiol*. 1988;127(3):419-39.
109. Schnatter AR, Glass DC, Tang G, Irons RD, Rushton L. Myelodysplastic syndrome and benzene exposure among petroleum workers: an international pooled analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2012;104(22):1724-37.

110. Rushton L, Schnatter AR, Tang G, Glass DC. Acute myeloid and chronic lymphoid leukaemias and exposure to low-level benzene among petroleum workers. *Br J Cancer*. 2014;110(3):783-7.
111. Irons RD, Gross SA, Le A, Wang XQ, Chen Y, Ryder J, Schnatter AR. Integrating WHO 2001-2008 criteria for the diagnosis of Myelodysplastic Syndrome (MDS): a case-case analysis of benzene exposure. *Chem Biol Interact*. 2010;184(1-2):30-8.
112. Pohl P, Lintermans P, Marin M, Couturier M. Epidemiological study of *Salmonella enteritidis* strains of animal origin in Belgium. *Epidemiol Infect*. 1991;106(1):11-6.
113. Beane Freeman LE, Blair A, Lubin JH, Stewart PA, Hayes RB, Hoover RN, Hauptmann M. Mortality from lymphohematopoietic malignancies among workers in formaldehyde industries: the National Cancer Institute Cohort. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(10):751-61.
114. Bachand AM, Mundt KA, Mundt DJ, Montgomery RR. Epidemiological studies of formaldehyde exposure and risk of leukemia and nasopharyngeal cancer: a meta-analysis. *Crit Rev Toxicol*. 2010;40(2):85-100.
115. Coggon D, Ntani G, Harris EC, Palmer KT. Upper airway cancer, myeloid leukemia, and other cancers in a cohort of British chemical workers exposed to formaldehyde. *Am J Epidemiol*. 2014;179(11):1301-11.
116. Taylor JA, Sandler DP, Bloomfield CD, Shore DL, Ball ED, Neubauer A, et al. ras oncogene activation and occupational exposures in acute myeloid leukemia. *J Natl Cancer Inst*. 1992;84(21):1626-32.
117. Sandler DP, Shore DL, Anderson JR, Davey FR, Arthur D, Mayer RJ, et al. Cigarette smoking and risk of acute leukemia: associations with morphology and cytogenetic abnormalities in bone marrow. *J Natl Cancer Inst*. 1993;85(24):1994-2003.
118. Smith MT, Wang Y, Kane E, Rollinson S, Wiemels JL, Roman E, et al. Low NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 activity is associated with increased risk of acute leukemia in adults. *Blood*. 2001;97(5):1422-6.
119. Larson RA, Wang Y, Banerjee M, Wiemels J, Hartford C, Le Beau MM, Smith MT. Prevalence of the inactivating 609C-->T polymorphism in the NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) gene in patients with primary and therapy-related myeloid leukemia. *Blood*. 1999;94(2):803-7.
120. Rothman N, Smith MT, Hayes RB, Traver RD, Hoener B, Campleman S, et al. Benzene poisoning, a risk factor for hematological malignancy, is associated with the NQO1 609C-->T mutation and rapid fractional excretion of chlorzoxazone. *Cancer Res*. 1997;57(14):2839-42.
121. Lebailly P, Willett EV, Moorman AV, Roman E, Cartwright R, Morgan GJ, Wild CP. Genetic polymorphisms in microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to adult acute myeloid leukaemia with defined cytogenetic abnormalities. *Br J Haematol*. 2002;116(3):587-94.
122. Mrozek K, Marcucci G, Paschka P, Bloomfield CD. Advances in molecular genetics and treatment of core-binding factor acute myeloid leukemia. *Curr Opin Oncol*. 2008;20(6):711-8.
123. Sharma R, Lewis S, Wlodarski MW. DNA Repair Syndromes and Cancer: Insights Into Genetics and Phenotype Patterns. *Front Pediatr*. 2020;8:570084.

124. Kam MLW, Nguyen TTT, Ngeow JYY. Telomere biology disorders. *NPJ Genom Med.* 2021;6(1):36.
125. Kao J, Rosenstein BS, Peters S, Milano MT, Kron SJ. Cellular response to DNA damage. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2005;1066:243-58.
126. Carrara M, Sigurdardottir A, Bertolotti A. Decoding the selectivity of eIF2alpha holophosphatases and PPP1R15A inhibitors. *Nat Struct Mol Biol.* 2017;24(9):708-16.
127. Macaluso M, Russo G, Cinti C, Bazan V, Gebbia N, Russo A. Ras family genes: an interesting link between cell cycle and cancer. *Journal of cellular physiology.* 2002;192(2):125-30.
128. Hou SX, Zheng Z, Chen X, Perrimon N. The Jak/STAT pathway in model organisms: emerging roles in cell movement. *Developmental cell.* 2002;3(6):765-78.
129. Chang F, Lee JT, Navolanic PM, Steelman LS, Shelton JG, Blalock WL, et al. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia.* 2003;17(3):590-603.
130. Aleem E, Kiyokawa H, Kaldis P. Cdc2-cyclin E complexes regulate the G1/S phase transition. *Nature cell biology.* 2005;7(8):831-6.
131. Lim S, Kaldis P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development.* 2013;140(15):3079-93.
132. Ren S, Rollins BJ. Cyclin C/cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit. *Cell.* 2004;117(2):239-51.
133. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & development.* 1999;13(12):1501-12.
134. Kaldis P, Aleem E. Cell cycle sibling rivalry: Cdc2 vs. Cdk2. *Cell cycle.* 2005;4(11):1491-4.
135. Nigg EA. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology.* 1995;17(6):471-80.
136. Edgar BA, Lehner CF. Developmental control of cell cycle regulators: a fly's perspective. *Science.* 1996;274(5293):1646-52.
137. McGowan CH, Russell P. Cell cycle regulation of human WEE1. *The EMBO journal.* 1995;14(10):2166-75.
138. Boutros R, Lobjois V, Ducommun B. CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nature reviews Cancer.* 2007;7(7):495-507.
139. Musacchio A. The Molecular Biology of Spindle Assembly Checkpoint Signaling Dynamics. *Current biology : CB.* 2015;25(20):R1002-18.
140. Foley EA, Kapoor TM. Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signalling at the kinetochore. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(1):25-37.
141. Spry M, Scott T, Pierce H, D'Orazio JA. DNA repair pathways and hereditary cancer susceptibility syndromes. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library.* 2007;12:4191-207.
142. Madhusudan S, Middleton MR. The emerging role of DNA repair proteins as predictive, prognostic and therapeutic targets in cancer. *Cancer Treat Rev.* 2005;31(8):603-17.
143. Chatterjee N, Walker GC. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and molecular mutagenesis.* 2017;58(5):235-63.
144. Lindahl T. Recovery of antediluvian DNA. *Nature.* 1993;365(6448):700.

145. Frederico LA, Kunkel TA, Shaw BR. A sensitive genetic assay for the detection of cytosine deamination: determination of rate constants and the activation energy. *Biochemistry*. 1990;29(10):2532-7.
146. Henle ES, Linn S. Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(31):19095-8.
147. Beckman KB, Ames BN. Oxidative decay of DNA. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(32):19633-6.
148. Bertoni CR, Meneghini R. DNA strand breaks produced by oxidative stress in mammalian cells exhibit 3'-phosphoglycolate termini. *Nucleic acids research*. 1995;23(15):2995-3002.
149. Sundaram K, Panneerselvam KS. Oxidative stress and DNA single strand breaks in skeletal muscle of aged rats: role of carnitine and lipoic acid. *Biogerontology*. 2006;7(2):111-8.
150. Bignami M, O'Driscoll M, Aquilina G, Karran P. Unmasking a killer: DNA O(6)-methylguanine and the cytotoxicity of methylating agents. *Mutation research*. 2000;462(2-3):71-82.
151. Ravanat JL, Douki T, Cadet J. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology*. 2001;63(1-3):88-102.
152. de Massy B. Initiation of meiotic recombination: how and where? Conservation and specificities among eukaryotes. *Annual review of genetics*. 2013;47:563-99.
153. Soulas-Sprauel P, Rivera-Munoz P, Malivert L, Le Guyader G, Abramowski V, Revy P, de Villartay JP. V(D)J and immunoglobulin class switch recombinations: a paradigm to study the regulation of DNA end-joining. *Oncogene*. 2007;26(56):7780-91.
154. Yamaguchi H, Uchihori Y, Yasuda N, Takada M, Kitamura H. Estimation of yields of OH radicals in water irradiated by ionizing radiation. *Journal of radiation research*. 2005;46(3):333-41.
155. Cannan WJ, Pederson DS. Mechanisms and Consequences of Double-Strand DNA Break Formation in Chromatin. *Journal of cellular physiology*. 2016;231(1):3-14.
156. Shrivastav M, De Haro LP, Nickoloff JA. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell research*. 2008;18(1):134-47.
157. Paques F, Haber JE. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR. 1999;63(2):349-404.
158. Noll DM, Mason TM, Miller PS. Formation and repair of interstrand cross-links in DNA. *Chemical reviews*. 2006;106(2):277-301.
159. Smeaton MB, Hlavin EM, McGregor Mason T, Noronha AM, Wilds CJ, Miller PS. Distortion-dependent unhooking of interstrand cross-links in mammalian cell extracts. *Biochemistry*. 2008;47(37):9920-30.
160. Jones MJ, Huang TT. The Fanconi anemia pathway in replication stress and DNA crosslink repair. *Cellular and molecular life sciences* : CMLS. 2012;69(23):3963-74.
161. Hakem R. DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. *The EMBO journal*. 2008;27(4):589-605.

162. Mishina Y, Duguid EM, He C. Direct reversal of DNA alkylation damage. *Chemical reviews*. 2006;106(2):215-32.
163. Yi C, He C. DNA repair by reversal of DNA damage. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2013;5(1):a012575.
164. Baute J, Depicker A. Base excision repair and its role in maintaining genome stability. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 2008;43(4):239-76.
165. Scharer OD. Chemistry and biology of DNA repair. *Angewandte Chemie*. 2003;42(26):2946-74.
166. Svejstrup JQ. Mechanisms of transcription-coupled DNA repair. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2002;3(1):21-9.
167. Friedberg EC. How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nature reviews Cancer*. 2001;1(1):22-33.
168. Jiricny J. The multifaceted mismatch-repair system. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2006;7(5):335-46.
169. Velangi MR, Matheson EC, Morgan GJ, Jackson GH, Taylor PR, Hall AG, Irving JA. DNA mismatch repair pathway defects in the pathogenesis and evolution of myeloma. *Carcinogenesis*. 2004;25(10):1795-803.
170. Helleday T, Lo J, van Gent DC, Engelward BP. DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA repair*. 2007;6(7):923-35.
171. Kanaar R, Wyman C, Rothstein R. Quality control of DNA break metabolism: in the 'end', it's a good thing. *The EMBO journal*. 2008;27(4):581-8.
172. Moynahan ME, Jasin M. Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2010;11(3):196-207.
173. Bunting SF, Nussenzweig A. End-joining, translocations and cancer. *Nature reviews Cancer*. 2013;13(7):443-54.
174. Zeman MK, Cimprich KA. Causes and consequences of replication stress. *Nature cell biology*. 2014;16(1):2-9.
175. Hanada K, Budzowska M, Davies SL, van Drunen E, Onizawa H, Beverloo HB, et al. The structure-specific endonuclease Mus81 contributes to replication restart by generating double-strand DNA breaks. *Nature structural & molecular biology*. 2007;14(11):1096-104.
176. Waters LS, Minesinger BK, Wiltrout ME, D'Souza S, Woodruff RV, Walker GC. Eukaryotic translesion polymerases and their roles and regulation in DNA damage tolerance. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 2009;73(1):134-54.
177. Friedberg EC, Lehmann AR, Fuchs RP. Trading places: how do DNA polymerases switch during translesion DNA synthesis? *Molecular cell*. 2005;18(5):499-505.
178. Lehmann AR. Translesion synthesis in mammalian cells. *Experimental cell research*. 2006;312(14):2673-6.
179. Hou WH, Chen SH, Yu X. Poly-ADP ribosylation in DNA damage response and cancer therapy. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2019;780:82-91.
180. Weber AM, Ryan AJ. ATM and ATR as therapeutic targets in cancer. *Pharmacology & therapeutics*. 2015;149:124-38.
181. Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *The Journal of cell biology*. 1999;146(5):905-16.

182. Grenon M, Gilbert C, Lowndes NF. Checkpoint activation in response to double-strand breaks requires the Mre11/Rad50/Xrs2 complex. *Nature cell biology*. 2001;3(9):844-7.
183. Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(45):42462-7.
184. Melander F, Bekker-Jensen S, Falck J, Bartek J, Mailand N, Lukas J. Phosphorylation of SDT repeats in the MDC1 N terminus triggers retention of NBS1 at the DNA damage-modified chromatin. *The Journal of cell biology*. 2008;181(2):213-26.
185. Engeland K. Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. *Cell Death Differ*. 2022;29(5):946-60.
186. Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, et al. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*. 2000;288(5468):1053-8.
187. Nakano K, Vousden KH. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Molecular cell*. 2001;7(3):683-94.
188. Khosravi R, Maya R, Gottlieb T, Oren M, Shiloh Y, Shkedy D. Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(26):14973-7.
189. Cortez D, Guntuku S, Qin J, Elledge SJ. ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science*. 2001;294(5547):1713-6.
190. Carrassa L, Sanchez Y, Erba E, Damia G. U2OS cells lacking Chk1 undergo aberrant mitosis and fail to activate the spindle checkpoint. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2009;13(8A):1565-76.
191. Bartek J, Lukas C, Lukas J. Checking on DNA damage in S phase. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2004;5(10):792-804.
192. Jazayeri A, Falck J, Lukas C, Bartek J, Smith GC, Lukas J, Jackson SP. ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nature cell biology*. 2006;8(1):37-45.
193. Xiao Z, Chen Z, Gunasekera AH, Sowin TJ, Rosenberg SH, Fesik S, Zhang H. Chk1 mediates S and G2 arrests through Cdc25A degradation in response to DNA-damaging agents. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(24):21767-73.
194. Sorensen CS, Syljuasen RG, Falck J, Schroeder T, Ronnstrand L, Khanna KK, et al. Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer cell*. 2003;3(3):247-58.
195. Peng CY, Graves PR, Thoma RS, Wu Z, Shaw AS, Piwnicka-Worms H. Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science*. 1997;277(5331):1501-5.
196. Sanchez Y, Wong C, Thoma RS, Richman R, Wu Z, Piwnicka-Worms H, Elledge SJ. Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science*. 1997;277(5331):1497-501.
197. Kumagai A, Dunphy WG. Binding of 14-3-3 proteins and nuclear export control the intracellular localization of the mitotic inducer Cdc25. *Genes & development*. 1999;13(9):1067-72.

198. Zachos G, Black EJ, Walker M, Scott MT, Vagnarelli P, Earnshaw WC, Gillespie DA. Chk1 is required for spindle checkpoint function. *Developmental cell*. 2007;12(2):247-60.
199. Chila R, Celenza C, Lupi M, Damia G, Carrassa L. Chk1-Mad2 interaction: a crosslink between the DNA damage checkpoint and the mitotic spindle checkpoint. *Cell cycle*. 2013;12(7):1083-90.
200. el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*. 1993;75(4):817-25.
201. Waldman T, Kinzler KW, Vogelstein B. p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res*. 1995;55(22):5187-90.
202. Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature*. 1994;369(6481):574-8.
203. Taylor WR, DePrimo SE, Agarwal A, Agarwal ML, Schonthal AH, Katula KS, Stark GR. Mechanisms of G2 arrest in response to overexpression of p53. *Mol Biol Cell*. 1999;10(11):3607-22.
204. Agarwal ML, Agarwal A, Taylor WR, Stark GR. p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(18):8493-7.
205. Flatt PM, Tang LJ, Scatena CD, Szak ST, Pietenpol JA. p53 regulation of G(2) checkpoint is retinoblastoma protein dependent. *Mol Cell Biol*. 2000;20(12):4210-23.
206. Chan TA, Hermeking H, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature*. 1999;401(6753):616-20.
207. Kastan MB, Zhan Q, el-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, et al. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell*. 1992;71(4):587-97.
208. Takekawa M, Saito H. A family of stress-inducible GADD45-like proteins mediate activation of the stress-responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK. *Cell*. 1998;95(4):521-30.
209. Aleem E, Arceci RJ. Targeting cell cycle regulators in hematologic malignancies. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2015;3:16.
210. Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, McDonald ER, 3rd, Hurov KE, Luo J, et al. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science*. 2007;316(5828):1160-6.
211. Ceccaldi R, Sarangi P, D'Andrea AD. The Fanconi anaemia pathway: new players and new functions. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2016;17(6):337-49.
212. Andreassen PR, D'Andrea AD, Taniguchi T. ATR couples FANCD2 monoubiquitination to the DNA-damage response. *Genes & development*. 2004;18(16):1958-63.
213. D'Andrea AD, Grompe M. The Fanconi anaemia/BRCA pathway. *Nature reviews Cancer*. 2003;3(1):23-34.
214. de Lange T. How telomeres solve the end-protection problem. *Science*. 2009;326(5955):948-52.

215. d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, et al. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*. 2003;426(6963):194-8.
216. d'Adda di Fagagna F. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(7):512-22.
217. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annual review of biochemistry*. 2000;69:217-45.
218. Green DR. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell*. 2005;121(5):671-4.
219. Senturk E, Manfredi JJ. p53 and cell cycle effects after DNA damage. *Methods in molecular biology*. 2013;962:49-61.
220. Narayanan L, Fritzell JA, Baker SM, Liskay RM, Glazer PM. Elevated levels of mutation in multiple tissues of mice deficient in the DNA mismatch repair gene Pms2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(7):3122-7.
221. Hegan DC, Narayanan L, Jirik FR, Edelman W, Liskay RM, Glazer PM. Differing patterns of genetic instability in mice deficient in the mismatch repair genes Pms2, Mlh1, Msh2, Msh3 and Msh6. *Carcinogenesis*. 2006;27(12):2402-8.
222. Tutt AN, van Oostrom CT, Ross GM, van Steeg H, Ashworth A. Disruption of Brca2 increases the spontaneous mutation rate in vivo: synergism with ionizing radiation. *EMBO reports*. 2002;3(3):255-60.
223. German J. Bloom's syndrome. I. Genetical and clinical observations in the first twenty-seven patients. *American journal of human genetics*. 1969;21(2):196-227.
224. Kerzendorfer C, O'Driscoll M. Human DNA damage response and repair deficiency syndromes: linking genomic instability and cell cycle checkpoint proficiency. *DNA repair*. 2009;8(9):1139-52.
225. Terabayashi T, Hanada K. Genome instability syndromes caused by impaired DNA repair and aberrant DNA damage responses. *Cell biology and toxicology*. 2018;34(5):337-50.
226. Rass U, Ahel I, West SC. Defective DNA repair and neurodegenerative disease. *Cell*. 2007;130(6):991-1004.
227. Schumacher B, Garinis GA, Hoeijmakers JH. Age to survive: DNA damage and aging. *Trends in genetics : TIG*. 2008;24(2):77-85.
228. Park Y, Gerson SL. DNA repair defects in stem cell function and aging. *Annual review of medicine*. 2005;56:495-508.
229. Nijnik A, Woodbine L, Marchetti C, Dawson S, Lambe T, Liu C, et al. DNA repair is limiting for haematopoietic stem cells during ageing. *Nature*. 2007;447(7145):686-90.
230. Sharpless NE, DePinho RA. How stem cells age and why this makes us grow old. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(9):703-13.
231. Kawakami H, Zaanan A, Sinicrope FA. Microsatellite instability testing and its role in the management of colorectal cancer. *Current treatment options in oncology*. 2015;16(7):30.
232. Giardiello FM, Allen JI, Axilbund JE, Boland CR, Burke CA, Burt RW, et al. Guidelines on genetic evaluation and management of Lynch syndrome: a consensus statement by the US Multi-Society Task Force on colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2014;147(2):502-26.

233. Joshi D, Korgaonkar S, Shanmukhaiah C, Vundinti BR. Association of XPD (Lys751Gln) and XRCC1 (Arg280His) gene polymorphisms in myelodysplastic syndrome. *Annals of hematology*. 2016;95(1):79-85.
234. Ribeiro HL, Jr., de Oliveira RT, Maia AR, Pires Ferreira Filho LI, de Sousa JC, Heredia FF, et al. Polymorphisms of DNA repair genes are related to the pathogenesis of myelodysplastic syndrome. *Hematological oncology*. 2015;33(4):220-8.
235. Esposito MT, So CW. DNA damage accumulation and repair defects in acute myeloid leukemia: implications for pathogenesis, disease progression, and chemotherapy resistance. *Chromosoma*. 2014;123(6):545-61.
236. Welsh C, Day R, McGurk C, Masters JR, Wood RD, Koberle B. Reduced levels of XPA, ERCC1 and XPF DNA repair proteins in testis tumor cell lines. *International journal of cancer*. 2004;110(3):352-61.
237. Simon GR, Sharma S, Cantor A, Smith P, Bepler G. ERCC1 expression is a predictor of survival in resected patients with non-small cell lung cancer. *Chest*. 2005;127(3):978-83.
238. Hegi ME, Diserens AC, Godard S, Dietrich PY, Regli L, Ostermann S, et al. Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004;10(6):1871-4.
239. Javle M, Curtin NJ. The role of PARP in DNA repair and its therapeutic exploitation. *Br J Cancer*. 2011;105(8):1114-22.
240. Morales J, Li L, Fattah FJ, Dong Y, Bey EA, Patel M, et al. Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*. 2014;24(1):15-28.
241. Cersosimo RJ. Idarubicin: an anthracycline antineoplastic agent. *Clin Pharm*. 1992;11(2):152-67.
242. Faruqi A, Tadi P. Cytarabine. *StatPearls*. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Prasanna Tadi declares no relevant financial relationships with ineligible companies. 2023.
243. Kantarjian H, Kadia T, DiNardo C, Daver N, Borthakur G, Jabbour E, et al. Acute myeloid leukemia: current progress and future directions. *Blood Cancer J*. 2021;11(2):41.
244. George B, Kantarjian H, Baran N, Krockner JD, Rios A. TP53 in Acute Myeloid Leukemia: Molecular Aspects and Patterns of Mutation. *Int J Mol Sci*. 2021;22(19).
245. Dohner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017;129(4):424-47.
246. Burd A, Levine RL, Ruppert AS, Mims AS, Borate U, Stein EM, et al. Precision medicine treatment in acute myeloid leukemia using prospective genomic profiling: feasibility and preliminary efficacy of the Beat AML Master Trial. *Nat Med*. 2020;26(12):1852-8.
247. Cavelier C, Didier C, Prade N, Mansat-De Mas V, Manenti S, Recher C, et al. Constitutive activation of the DNA damage signaling pathway in acute myeloid

- leukemia with complex karyotype: potential importance for checkpoint targeting therapy. *Cancer Res.* 2009;69(22):8652-61.
248. Klever MK, Strang E, Hetzel S, Jungnitsch J, Dolnik A, Schopflin R, et al. AML with complex karyotype: extreme genomic complexity revealed by combined long-read sequencing and Hi-C technology. *Blood Adv.* 2023.
249. Liebermann DA. Gadd45 in Normal Hematopoiesis and Leukemia. *Adv Exp Med Biol.* 2022;1360:41-54.
250. Guo D, Zhao Y, Wang N, You N, Zhu W, Zhang P, et al. GADD45g acts as a novel tumor suppressor, and its activation suggests new combination regimens for the treatment of AML. *Blood.* 2021;138(6):464-79.
251. Perugini M, Kok CH, Brown AL, Wilkinson CR, Salerno DG, Young SM, et al. Repression of Gadd45alpha by activated FLT3 and GM-CSF receptor mutants contributes to growth, survival and blocked differentiation. *Leukemia.* 2009;23(4):729-38.
252. Satoh Y, Matsumura I, Tanaka H, Harada H, Harada Y, Matsui K, et al. C-terminal mutation of RUNX1 attenuates the DNA-damage repair response in hematopoietic stem cells. *Leukemia.* 2012;26(2):303-11.
253. Perugini M, Iarossi DG, Kok CH, Cummings N, Diakiw SM, Brown AL, et al. GADD45A methylation predicts poor overall survival in acute myeloid leukemia and is associated with IDH1/2 and DNMT3A mutations. *Leukemia.* 2013;27(7):1588-92.
254. Mlynarczyk C, Fahraeus R. Endoplasmic reticulum stress sensitizes cells to DNA damage-induced apoptosis through p53-dependent suppression of p21(CDKN1A). *Nat Commun.* 2014;5:5067.
255. Peterson LF, Yan M, Zhang DE. The p21Waf1 pathway is involved in blocking leukemogenesis by the t(8;21) fusion protein AML1-ETO. *Blood.* 2007;109(10):4392-8.
256. Ma J, Jin J, Lu H, Zhang J, Li Y, Cai X. Exonuclease 1 is a Potential Diagnostic and Prognostic Biomarker in Hepatocellular Carcinoma. *Front Mol Biosci.* 2022;9:889414.
257. Hollander MC, Sheikh MS, Yu K, Zhan Q, Iglesias M, Woodworth C, Fornace AJ, Jr. Activation of Gadd34 by diverse apoptotic signals and suppression of its growth inhibitory effects by apoptotic inhibitors. *Int J Cancer.* 2001;96(1):22-31.
258. Chen N, Nishio N, Ito S, Tanaka Y, Sun Y, Isobe K. Growth arrest and DNA damage-inducible protein (GADD34) enhanced liver inflammation and tumorigenesis in a diethylnitrosamine (DEN)-treated murine model. *Cancer Immunol Immunother.* 2015;64(6):777-89.
259. Hollander MC, Zhan Q, Bae I, Fornace AJ, Jr. Mammalian GADD34, an apoptosis- and DNA damage-inducible gene. *J Biol Chem.* 1997;272(21):13731-7.
260. Adler HT, Chinery R, Wu DY, Kussick SJ, Payne JM, Fornace AJ, Jr., Tkachuk DC. Leukemic HRX fusion proteins inhibit GADD34-induced apoptosis and associate with the GADD34 and hSNF5/INI1 proteins. *Mol Cell Biol.* 1999;19(10):7050-60.
261. Liu L, Ito S, Nishio N, Sun Y, Tanaka Y, Isobe K. GADD34 Promotes Tumor Growth by Inducing Myeloid-derived Suppressor Cells. *Anticancer Res.* 2016;36(9):4623-8.
262. Yang ZJ, Chee CE, Huang S, Sinicrope FA. The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. *Mol Cancer Ther.* 2011;10(9):1533-41.

263. Holczer M, Banhegyi G, Kapuy O. GADD34 Keeps the mTOR Pathway Inactivated in Endoplasmic Reticulum Stress Related Autophagy. *PLoS One*. 2016;11(12):e0168359.
264. Ho KH, Lee YT, Chen PH, Shih CM, Cheng CH, Chen KC. Guanabenz Sensitizes Glioblastoma Cells to Sunitinib by Inhibiting GADD34-Mediated Autophagic Signaling. *Neurotherapeutics*. 2021;18(2):1371-92.
265. Wek RC. Role of eIF2alpha Kinases in Translational Control and Adaptation to Cellular Stress. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018;10(7).
266. Harding HP, Zhang Y, Scheuner D, Chen JJ, Kaufman RJ, Ron D. Ppp1r15 gene knockout reveals an essential role for translation initiation factor 2 alpha (eIF2alpha) dephosphorylation in mammalian development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(6):1832-7.
267. Choy MS, Yusoff P, Lee IC, Newton JC, Goh CW, Page R, et al. Structural and Functional Analysis of the GADD34:PP1 eIF2alpha Phosphatase. *Cell Rep*. 2015;11(12):1885-91.
268. Das I, Krzyzosiak A, Schneider K, Wrabetz L, D'Antonio M, Barry N, et al. Preventing proteostasis diseases by selective inhibition of a phosphatase regulatory subunit. *Science*. 2015;348(6231):239-42.
269. Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S, Novoa I, Zhang Y, Jungreis R, et al. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev*. 2004;18(24):3066-77.