



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΙΔΩΝ
Διευθύντρια: Αν. Καθηγήτρια Ευτυχία Στειακάκη

**«Μελέτη του ρόλου της απόπτωσης των
νεοπλασματικών κυττάρων στις αιματολογικές
κακοήθειες της παιδικής ηλικίας»**

Διδακτορική Διατριβή
Μαρίας Γ. Καπαρού
Ιατρού-Αιματολόγου

Ηράκλειο 2013

Στη μητέρα μου, που έφυγε τόσο νωρίς...

Στον πατέρα μου και τα αδέρφια μου

Στο Βασίλη μου

Επταμελής Επιτροπή

1. Ευτυχία Στειακάκη, Αν. Καθηγήτρια Παιδιατρικής Αιματολογίας-Ογκολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης
2. Μιχαήλ Αλεξανδράκης, Καθηγητής Αιματολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης
3. Αντώνιος Μακρυγιαννάκης, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης
4. Βασίλειος Γεωργούλιας, Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης
5. Ευστάθιος Σταθόπουλος, Καθηγητής Παθολογοανατομίας Πανεπιστημίου Κρήτης
6. Παναγιώτης Θεοδωρόπουλος, Αν. Καθηγητής Βιοχημείας Πανεπιστημίου Κρήτης
7. Ευαγγελία Παπακωνσταντή, Επικ. Καθηγήτρια Βιοχημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία	7
i. Εισαγωγή	7
ii. Επιδημιολογία	7
iii. Σημειολογία-Συμπτωματολογία	8
iv. Ταξινόμηση	9
2. Απόπτωση	14
i. Κασπάσες	17
ii. Εξωγενής οδός απόπτωσης	23
iii. Ενδογενής οδός απόπτωσης	25
iv. Οικογένεια Bcl-2 πρωτεϊνών	27
- Πρωτεΐνη Bcl-2	32
- Πρωτεΐνη Bax	35
v. Σύμπλεγμα Fas/FasL	36
3. Απόπτωση και νεοπλασματικά νοσήματα	41

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Σκοπός	44
2. Ασθενείς - Μεθοδολογία	44
3. Αποτελέσματα	65
4. Συζήτηση	78
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	90
ΠΕΡΙΛΗΨΗ (ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ)	116
ΑΝΑΤΥΠΟ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗΣ	118

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αν. Καθηγήτρια Παιδιατρικής Αιματολογίας-Ογκολογίας Ευτυχία Στειακάκη για τη συμπαράσταση, τη συνεχή επίβλεψη και την ουσιαστική καθοδήγησή της στη διεκπεραίωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Στο σημείο αυτό θα ήταν παράλειψή μου να μην ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Παιδιατρικής Αιματολογίας-Ογκολογίας Μαρία Καλμαντή, κατά τη θητεία της οποίας η συγκεκριμένη μελέτη σχεδιάστηκε και άρχισε να υλοποιείται.

Ευχαριστώ τον Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας Αντώνιο Μακρυγιαννάκη και τον Καθηγητή Αιματολογίας Μιχαήλ Αλεξανδράκη για τη συνολική συμβολή τους στην ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Ευχαριστίες εκφράζω στις Βιολόγους Εμμανουέλα Λιναρδάκη, Δέσποινα Χουμεριανού και Γεωργία Μαρτιμιανάκη για την πολύτιμη βοήθεια τους στην εκμάθηση των τεχνικών.

Ευχαριστώ, επίσης, τη Λέκτορα Παιδιατρικής Χρυσούλα Περδικογιάννη για τη συμβολή της καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά το Λέκτορα Ρευματολογίας-Κλινικής Ανοσολογίας Γεώργιο Μπερτσιά για την ουσιαστική του συμβολή στην παρούσα διατριβή.

Ευχαριστώ, επίσης, τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, τον Καθηγητή Παθολογίας-Ογκολογίας Βασίλειο Γεωργούλια, τον Καθηγητή Παθολογοανατομίας Ευστάθιο Σταθόπουλο, τον Αν. Καθηγητή Βιοχημείας Παναγιώτη Θεοδωρόπουλο και την Επίκ. Καθηγήτρια Βιοχημείας Ευαγγελία Παπακωνσταντή, για την αξιολόγηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά την οικογένειά μου και το σύζυγό μου για την αμέριστη κατανόηση και στήριξή τους σε όλη τη διάρκεια της προσπάθειας αυτής.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία

Η Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (ΟΛΛ) αποτελεί κλωνική διαταραχή των αιμοποιητικών προβαθμίδων της λεμφικής σειράς. Χαρακτηρίζεται από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των άωρων μορφών των λεμφοκυττάρων (λεμφοβλαστών), με αποτέλεσμα τη συσσώρευσή τους στο μυελό των οστών και στο περιφερικό αίμα και την αδυναμία τους να διαφοροποιηθούν στις ώριμες βαθμίδες.

Επιδημιολογία

Η ΟΛΛ αποτελεί την πιο συχνή νεοπλασματική νόσο της παιδικής ηλικίας, με τη μέγιστη επίπτωση να παρατηρείται στις ηλικίες 2-5 ετών (1-3), ενώ φαίνεται ότι προσβάλλεται συχνότερα το άρρεν φύλο (1).

Η αιτιολογία της νόσου παραμένει, μέχρι στιγμής, άγνωστη. Εντούτοις, παιδιά με συγκεκριμένες χρωμοσωμικές ανωμαλίες (π.χ. σ. Down, σ. Bloom, Αταξία Τηλεαγγειεκτασία) διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου (ΟΛΛ) (4,5), ενώ μικρή αύξηση του σχετικού κινδύνου έχει παρατηρηθεί ανάμεσα σε αδέρφια (6). Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί έχουν δείξει πιθανή συσχέτιση της εκδήλωσης της νόσου με ποικίλες παραμέτρους (έκθεση σε περιβαλλοντικούς/χημικούς παράγοντες, ακτινοβολία, μη φυσιολογική ανοσολογική απάντηση σε κοινές λοιμώξεις) (7-10).

Σημειολογία – Συμπτωματολογία

Τα σημεία και τα συμπτώματα της ΟΛΛ δεν είναι ειδικά και οφείλονται στη μη ελεγχόμενη ανάπτυξη των λευχαιμικών κυττάρων στο μυελό των οστών, στα λεμφικά όργανα, αλλά και σε άλλες εξωμυελικές θέσεις (Κεντρικό Νευρικό Σύστημα, όρχεις, ήπαρ, σπλήνας, νεφροί).

Η διήθηση του μυελού των οστών οδηγεί σε αναιμία, θρομβοπενία και ουδετεροπενία, με αποτέλεσμα οι κλινικές εκδηλώσεις να περιλαμβάνουν αδυναμία, καταβολή, αιμορραγική διάθεση ή εμπύρετο, αντίστοιχα (11).

Η κλινική εικόνα στα παιδιά μπορεί να περιλαμβάνει έντονα και επίμονα οστικά άλγη, κυρίως στα μακρά οστά των κάτω άκρων, που περιορίζουν τη δραστηριότητά τους (12).

Παθολογική διόγκωση λεμφαδένων παρατηρείται στο 50% των παιδιών κατά τη διάγνωση, ενώ μπορεί να διαπιστωθεί και μάζα στο μεσοθωράκιο, η οποία, ανάλογα με το μέγεθος και την ακριβή της θέση, προκαλεί αντίστοιχη συμπτωματολογία (άλγος, δύσπνοια, δυσφαγία, σύνδρομο άνω κοίλης φλέβας κ.α.) (11).

Ένα ποσοστό παιδιών (<5%) μπορεί να εκδηλώσει σημεία και συμπτώματα διήθησης του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος, με αποτέλεσμα το παιδί να εμφανίζει κεφαλαλγία, εμέτους, λήθαργο ή/και αυχενική δυσκαμψία, σπανίως δε σημεία προσβολής των κρανιακών νεύρων. Σε σπάνιες περιπτώσεις, παρατηρείται ανώδυνη, ετερόπλευρη διόγκωση των όρχεων (11, 13,14).

Ταξινόμηση

Η ΟΛΛ της παιδικής ηλικίας είναι μία ετερογενής νόσος που ταξινομείται με βάση μορφολογικές, ανοσολογικές, βιοχημικές, κυτταρογενετικές και μοριακές παραμέτρους.

Μορφολογική ταξινόμηση: Το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο σύστημα αναπτύχθηκε από το French-American-British (FAB) Cooperative Working Group και διακρίνει τις λεμφοβλάστες σε 3 κατηγορίες:

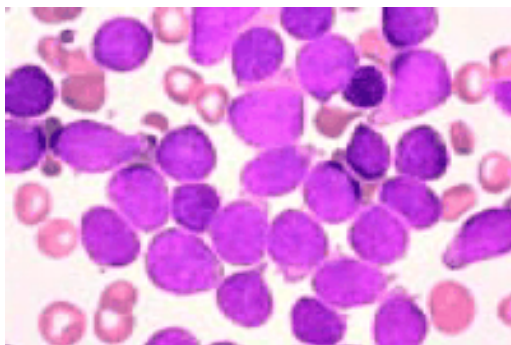
L1: ομοιόμορφες, μικρές σε μέγεθος, με ελάχιστο πρωτόπλασμα, στρογγυλό πυρήνα και ένα ασαφές πυρήνιο (**εικόνα 1**).

L2: μεγαλύτερες σε μέγεθος, αν και εμφανίζουν ετερογένεια. Το πυρήνιο είναι εμφανές, συχνά δε αναγνωρίζονται περισσότερα του ενός, ενώ ο πυρήνας έχει ακανόνιστο σχήμα και φέρει εντομή. Η ποσότητα του πρωτοπλάσματος είναι μετρίως αυξημένη (**εικόνα 2**).

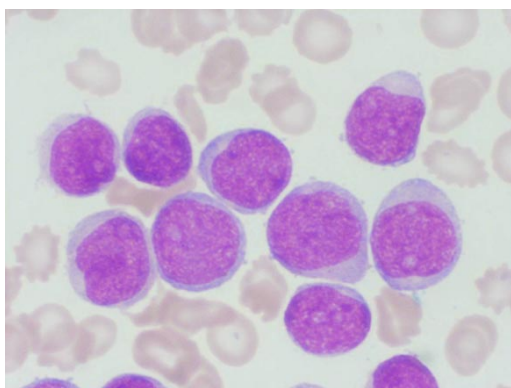
L3: μεγάλες σε μέγεθος με έντονα βασεόφιλο πρωτόπλασμα, στο οποίο διακρίνονται άφθονα κενοτόπια. Ο πυρήνας είναι ομαλός και έχει ένα ή περισσότερα σαφή πυρήνια (**εικόνα 3**).

Η L1 μορφολογία αποτελεί το συχνότερο υπότυπο της παιδικής ηλικίας (απαντάται στο 85% των παιδιών με ΟΛΛ), σε αντίθεση με τον L2 υπότυπο που χαρακτηρίζει τους ενήλικες. Ο L3 υπότυπος χαρακτηρίζει μόνο το 1%-2% των ασθενών με ΟΛΛ (15,16).

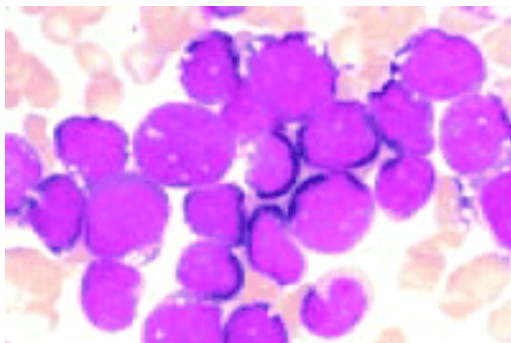
Εικόνα 1. Μορφολογία λεμφοβλάστη L1



Εικόνα 2. Μορφολογία λεμφοβλάστη L2



Εικόνα 3. Μορφολογία λεμφοβλάστη L3



Ανοσοφαινοτυπική ταξινόμηση: Η πρόοδος στην κυτταρομετρία ροής, με τη χρήση μεγάλου αριθμού μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι λευκοκυτταρικών αντιγόνων, προήγαγε τη μελέτη του ανοσοφαινοτύπου των βλαστικών κυττάρων κατά τη διάγνωση της ΟΛΛ. Διακρίνονται, κατά κύριο λόγο, δύο τύποι ΟΛΛ, η Β- (85%) και η Τ- (15%) προέλευσης ΟΛΛ, που ταξινομούνται σε περαιτέρω υποκατηγορίες (**πίνακας 1**).

Πίνακας 1. Ανοσοφαινοτυπική ταξινόμηση ΟΛΛ

B-ΟΛΛ	
Προ-προ-B	HLA-DR+, TdT+, CD19+
Κοινή	HLA-DR+, TdT+, CD19+, CD10+
Προ-B	HLA-DR+, TdT+, CD19+, CD10±, cIgM+
Ωριμη Β	HLA-DR+, TdT-, CD19+, CD10±, cIgM+, sIgM+
T-ΟΛΛ	
Προ-T	TdT+, cCD3+, CD7+
Θυμική Τα	TdT+, cCD3+, CD7+, CD1a+, CD3±
Ωριμη Τ	TdT+, cCD3+, CD7+, CD5+, CD3+

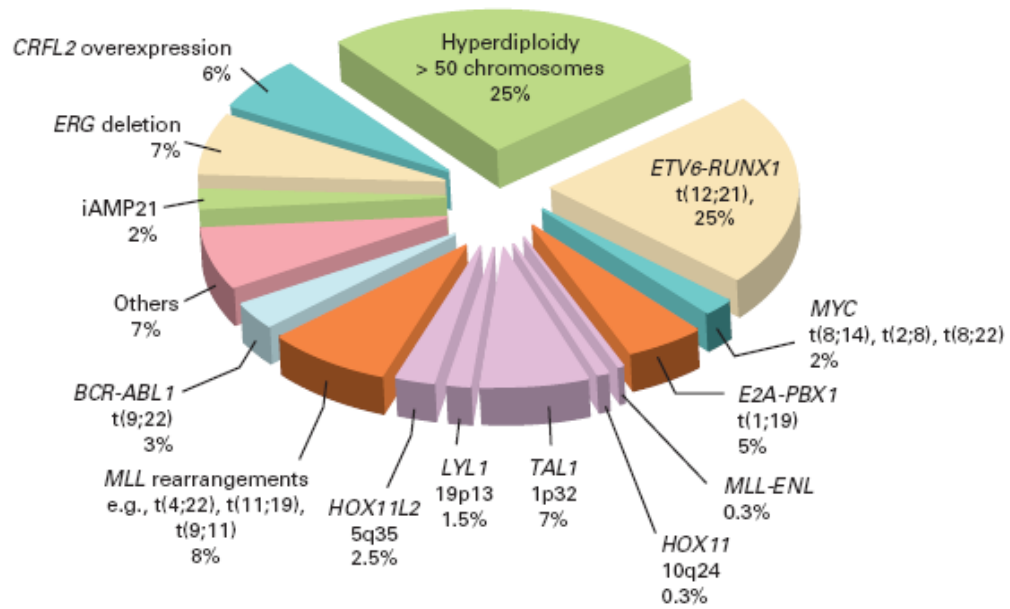
Υπάρχουν συγκεκριμένα κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά τόσο των ασθενών, όσο και του κλώνου της νόσου που έχουν συσχετισθεί με την πρόγνωση. Τα παιδιά με ΟΛΛ, συνεπώς, κατηγοριοποιούνται σε ομάδες κινδύνου με βάση τις ακόλουθες παραμέτρους (**πίνακας 2**)

- Αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων κατά τη διάγνωση
- Ηλικία κατά τη διάγνωση
- Κυτταρογενετικές ανωμαλίες (αριθμητικές ή/και δομικές) (**εικόνα 4**)
- Ανοσοφαινότυπος
- Ανταπόκριση στη θεραπεία (Μέτρηση Ελάχιστης Υπολειπόμενης Νόσου) (17-27).

Αναλυτικότερα, αριθμός μελετών έχουν αποδείξει ότι παιδιά με αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων $<50.000/\mu\text{l}$, καθώς και ηλικίας 1-9.9 ετών κατά τη διάγνωση, έχουν ευνοϊκότερη πρόγνωση. Όσον αφορά δε το κυτταρογενετικό προφίλ των παιδιών με ΟΛΛ, η υπερδιπλοειδία, ο δείκτης DNA index ≥ 1.16 , οι τρισωμίες 4, 10 και 17, αλλά και η διαμετάθεση t(12;21), έχουν επίσης συσχετισθεί με θετική έκβαση της νόσου. Αντιθέτως, αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων $>50.000/\mu\text{l}$ και ηλικία <1 έτος ή >9.9 έτη κατά τη διάγνωση, η υποδιπλοειδία, ο δείκτης DNA index < 1.16 , το ισοχρωμόσωμα iAMP21, οι διαμεταθέσεις t(v;11q23) και t(9;22), το παθολογικό χρωμόσωμα 17p, η έλλειψη του μακρού σκέλους του χρωμοσώματος 13 (del13q) και οι υπότυποι T και ώριμης B ΟΛΛ κατατάσσονται μεταξύ των δυσμενών προγνωστικών παραμέτρων. Ένας επιπλέον παράγοντας με αρνητική προγνωστική αξία θεωρείται η ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία, η οποία αξιολογείται με τη μέτρηση της ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου σε συγκεκριμένα στάδια της θεραπείας (17-27).

Εικόνα 4. Κυτταρογενετικές ανωμαλίες στην ΟΑΔ

Pui et al



Απόπτωση

Η ΟΛΛ αντιπροσωπεύει σχεδόν το ένα τρίτο όλων των παιδιατρικών νεοπλασιών και το 75% του συνόλου των παιδικών λευχαιμιών. Η ετήσια επίπτωσή της είναι περίπου 30 περιστατικά ανά εκατομμύριο παιδιών, προσβάλλοντας συχνότερα παιδιά ηλικίας 2-5 ετών (28). Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, έχουν προκύψει νέα δεδομένα σχετικά με τους παθογενετικούς μηχανισμούς, τη θεραπεία και την υποστηρικτική αγωγή, οδηγώντας σε σημαντική βελτίωση της έκβασης της νόσου. Η πρόοδος στον τομέα της διαγνωστικής προσέγγισης με τη βοήθεια νέων μοριακών τεχνικών και η επακόλουθη στρατηγική ταξινόμησης των ασθενών βάσει παραγόντων κινδύνου έχουν επιφέρει ποσοστά ίασης που υπερβαίνουν πλέον το 80%, για συγκεκριμένες δε υποομάδες τα ποσοστά προσεγγίζουν ακόμα και το 90% (28). Ωστόσο, υπάρχει ένα ποσοστό παιδιών με ΟΛΛ που δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία και, συχνά, αυτή η αποτυχία ανταπόκρισης παρατηρείται σε ασθενείς χωρίς δυσμενή προγνωστικά χαρακτηριστικά κατά τη διάγνωση (29,30).

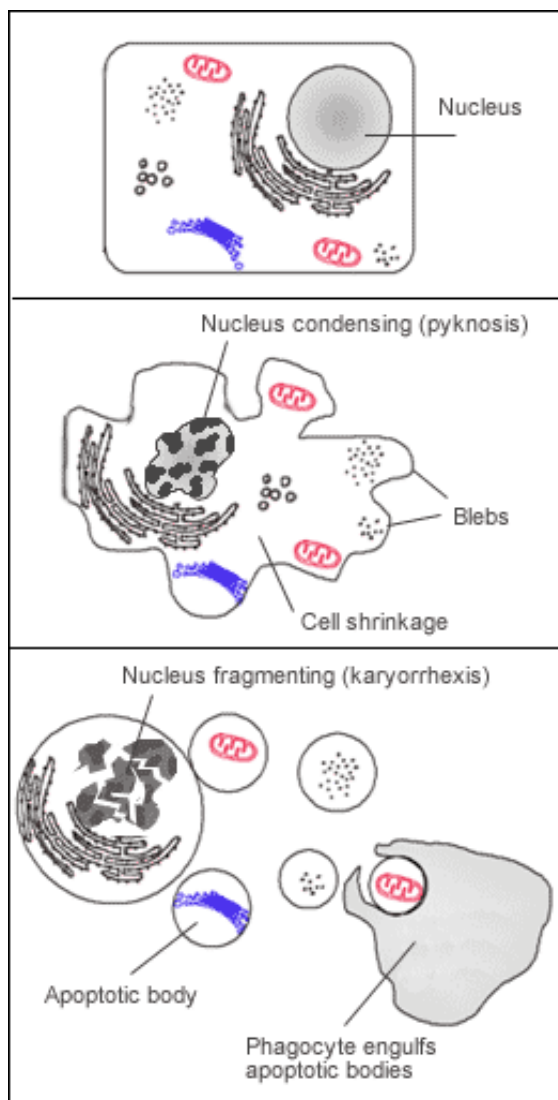
Τα τελευταία χρόνια έχει διερευνηθεί η υπόθεση ότι στον παθογενετικό μηχανισμό της λευχαιμίας εμπλέκεται και η διαταραχή της ισορροπίας ανάμεσα στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του αίματος και την ικανότητά τους να οδηγηθούν σε απόπτωση (31).

Απόπτωση ονομάζεται ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος. Πρόκειται για μία γενετικά ελεγχόμενη διαδικασία, η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εμβρυογένεση και την ανάπτυξη, τη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος και τη διατήρηση της ομοιόστασης, διασφαλίζοντας έτσι τη φυσιολογική ανάπτυξη και τις ομαλές λειτουργίες του οργανισμού (32). Απορρύθμιση ή διαταραχή στην αλληλουχία των γεγονότων που χαρακτηρίζουν την απόπτωση μπορεί να προκαλέσει παθολογικές καταστάσεις, όπως νεοπλασίες, αυτοάνοσα νοσήματα ή ακόμα και ιογενείς λοιμώξεις (32-34).

Ο αποπτωτικός μηχανισμός πυροδοτείται από ποικίλα ενδογενή ή εξωγενή ερεθίσματα (π.χ. πρόσδεση συνδέτη σε υποδοχέα κυτταρικής επιφάνειας, ελαττωματικοί μηχανισμοί επιδιόρθωσης βλαβών του DNA, θεραπεία με κυτταροτοξικά φάρμακα ή ακτινοβολία, έλλειψη σημάτων επιβίωσης), οδηγώντας το κύτταρο σε συγκεκριμένες μορφολογικές και βιοχημικές αλλαγές (31).

Η απόπτωση είναι μία λειτουργία ενεργητική (απαιτεί κατανάλωση ATP) και εξελικτικά διατηρημένη, η οποία οδηγεί το κύτταρο σε «αυτοκτονία» μέσω μιας αλληλουχίας μορφογενετικών αλλαγών. Συγκεκριμένα, η κυτταροπλασματική μεμβράνη εμφανίζει προεξοχές, χωρίς να χάνει την ακεραιότητά της, και η χρωματίνη συσσωρεύεται στην πυρηνική μεμβράνη. Κατά τη διάρκεια των αρχικών σταδίων της απόπτωσης, το κυτταρόπλασμα συρρικνώνεται και ο πυρήνας συμπυκνώνεται. Σταδιακά, υπάρχει απώλεια των μικρολαχνών και των κόμβων χάσματος (gap junctions), καθώς επίσης παρατηρείται κατάτμηση του πυρήνα και διασπορά του διαμέσου του κυτταροπλάσματος. Η διαδικασία ολοκληρώνεται με τον κατακερματισμό του κυττάρου σε μικρότερα σώματα και το σχηματισμό μεμβρανικών κύστεων που ονομάζονται αποπτωτικά σώματα. Τα αποπτωτικά σώματα γρήγορα αναγνωρίζονται και φαγοκυτταρώνονται είτε από τα μακροφάγα είτε από γειτονικά επιθηλιακά κύτταρα, χωρίς να προκαλείται φλεγμονώδης αντίδραση. Σε αντίθετη περίπτωση, αν δηλαδή το αποπτωτικό κύτταρο δεν αναγνωρισθεί, τότε θα οδηγηθεί τελικά σε νέκρωση (δευτερογενής νέκρωση), βλάπτοντας παρακείμενους ιστούς (35,36) (σχήμα 1).

Σχήμα 1. Αποπτωτική διαδικασία



Κασπάσες

Οι περισσότερες μορφολογικές και βιοχημικές αλλαγές που χαρακτηρίζουν την απόπτωση προκαλούνται από την ενεργοποίηση ενδοκυττάρων πρωτεασών, των κασπασών. Ο αγγλικός όρος **caspases** αποτελεί ακρωνύμιο των ακόλουθων λέξεων cysteine-dependent aspartate-specific proteases (35,37).

Οι κασπάσες χαρακτηρίζονται από ομολογία, έχουν συντηρηθεί κατά τη διάρκεια της εξέλιξης και ανευρίσκονται σε έντομα, νηματοειδή έως τον άνθρωπο (38). Το ανθρώπινο γονιδίωμα κωδικοποιεί περισσότερες από 12 κασπάσες, αναλόγως συγκεκριμένων πολυμορφισμών, και από αυτές περίπου τα 2/3 φαίνεται να συμμετέχουν στη διαδικασία του αποπτωτικού θανάτου. Όλες οι μέχρι τώρα γνωστές κασπάσες έχουν μια ενεργό θέση κυστεΐνης και αποδομούν υποστρώματα σε θέσεις μετά το ασπαρτικό οξύ (38,39).

Στο εσωτερικό του κυττάρου οι κασπάσες συντίθενται ως καταλυτικά ανενεργά προ-ένζυμα, τις προ-κασπάσες. Οι προ-κασπάσες αποτελούνται από μία προ-μονάδα (prodomain), η οποία ακολουθείται από μια μεγάλη (20 kDa) και μία μικρή (10 kDa) υπομονάδα. Η προ-μονάδα ξεκινάει με ένα αμινο-τελικό άκρο και η μικρή υπομονάδα καταλήγει σε ένα καρβοξυτελικό άκρο. Κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης, το προ-ένζυμο διασπάται σε περιοχές του ασπαρτικού οξέος, οπότε απομακρύνεται το αμινοτελικό άκρο και, συνήθως, και η προ-μονάδα και προκύπτουν δύο ενεργείς υπομονάδες, μια μεγάλη και μια μικρή. Το ενεργό ένζυμο αποτελείται από ένα ετεροτετραμερές που συντίθεται από 2 μεγάλες και 2 μικρές υπομονάδες και 2 ενεργείς θέσεις κυστεΐνης ανά μόριο (35,40,41) (**εικόνα 5**). Η παρατήρηση ότι οι κασπάσες αποδομούν υποστρώματα σε θέσεις μετά το ασπαρτικό οξύ, καθώς και ότι οι ίδιες ενεργοποιούνται με πρωτεόλυση σε θέσεις ασπαρτικού οξέος, καθιστά εμφανές, τόσο ότι οι κασπάσες συνεργάζονται σε πρωτεολυτικά μονοπάτια, όσο και ότι ενεργοποιεί η μία την άλλη. Στη συνέχεια, κάθε ενεργοποιούμενη κασπάση μπορεί να πρωτεολύσει πολλά

μόρια προ-ενζύμων ώστε να γίνουν ενεργά. Με αυτό τον τρόπο, μία αρχική ενεργοποίηση ενός μικρού αριθμού πρωτεασών μπορεί να οδηγήσει, μέσω μιας ενισχυμένης αλυσιδωτής αντίδρασης, στην ενεργοποίηση μεγάλου αριθμού κασπασών, με τελικό στόχο τον κυτταρικό θάνατο (35).

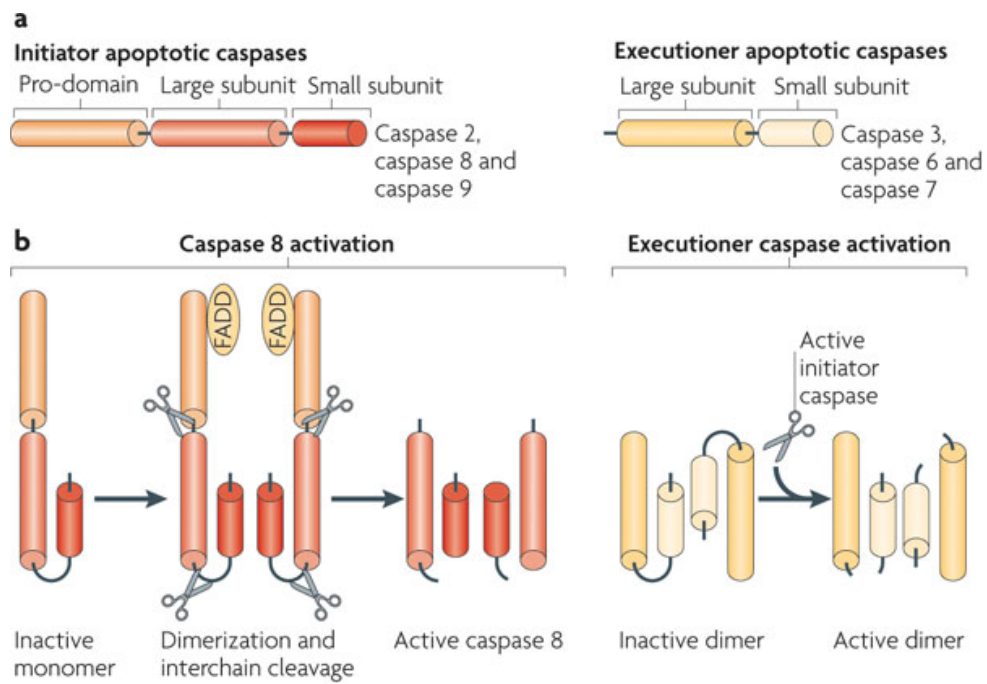
Οι προ-αποπτωτικές κασπάσες μπορούν να διαιρεθούν στις ακόλουθες δύο κατηγορίες, αντανακλώντας δομικές και λειτουργικές διαφορές: κασπάσες «εκκίνησης» (initiator/activator) και κασπάσες «εκτέλεσης» (effector/executioner) (42,43).

Οι κασπάσες «εκκίνησης» συμπεριλαμβάνουν τις προ-κασπάσες 2, 8, 9 και 10. Φέρουν μακρές αμινοτελικές προ-μονάδες, οι οποίες επιτρέπουν τη συσσώρευση και την αυτο-ενεργοποίησή τους. Συγκεκριμένα, μέσω των προ-μονάδων τους συγκεντρώνονται και ενεργοποιούνται σε απάντηση είτε της πρόσδεσης συνδέτη σε υποδοχέα κυτταρικής επιφάνειας είτε σε σήματα που προέρχονται από το εσωτερικό του κυττάρου και, εν συνεχεία, αποδομούν και ενεργοποιούν τις κασπάσες «εκτέλεσης» (40).

Η ομάδα των κασπασών «εκτέλεσης», αντιθέτως, συμπεριλαμβάνει τις προ-κασπάσες 3, 6 και 7, χαρακτηρίζεται από κοντές προ-μονάδες και είναι υπεύθυνη για την αποδόμηση κυτταρικών στόχων, οδηγώντας στην απόπτωση (40,44).

Έχει περιγραφεί και μία τρίτη κατηγορία κασπασών, η οποία συμμετέχει και προωθεί τη φλεγμονώδη αντίδραση (45).

Εικόνα 5. Δομή κασπάσης



Nature Reviews | [Molecular Cell Biology](#)

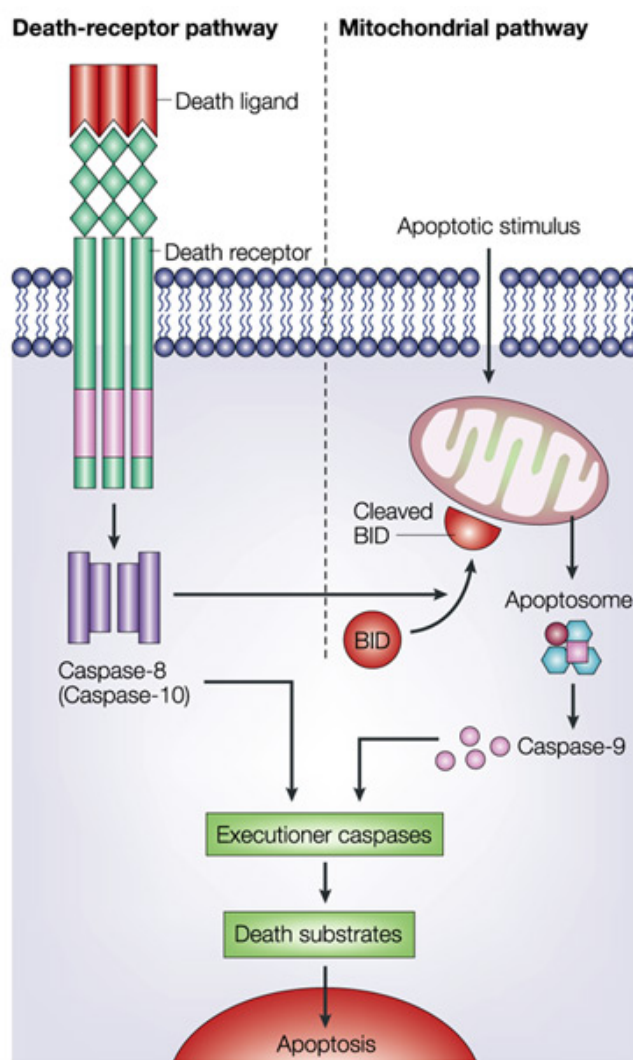
ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ

Η απόπτωση ελέγχεται γενετικά και ρυθμίζεται από δύο κύριες σηματοδοτικές οδούς: α) των υποδοχέων (εξωγενής) και β) τη μιτοχονδριακή (ενδογενής) (46-48). Το τελικό αποτέλεσμα και των δύο κύριων οδών είναι η ενεργοποίηση της κασπάσης 3 και η αποδόμηση συγκεκριμένων υποστρωμάτων, οδηγώντας το κύτταρο σε απόπτωση, αλλά έκαστη οδός προϋποθέτει τη δράση διαφορετικής κασπάσης «εκκίνησης» (45,49) (**εικόνα 6**).

Μία τρίτη και δευτερεύουσα οδός είναι η ενεργοποίηση των κασπασών από το granzyme B, μια πρωτεάση σερίνης που συντίθεται στα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα. Μέσω της περφορίνης, μιας πρωτεΐνης που σχηματίζει οπές, τα τελευταία ενίουν στα κύτταρα-στόχους το granzyme B, το οποίο με τη σειρά του αποδομεί και ενεργοποιεί ορισμένες κασπάσες, συμπεριλαμβανομένης της προ-κασπάσης 3. Με τον τρόπο αυτό, παρακάμπτεται και η εξωγενής και η ενδογενής αποπτωτική οδός (50,51).

Πριν προχωρήσουμε στην περιγραφή των κύριων οδών του αποπτωτικού θανάτου, θεωρείται σκόπιμο να αναφερθεί ότι υπάρχουν μόρια που ευνοούν την απόπτωση (προ-αποπτωτικά), με το Bax να είναι το πιο αντιπροσωπευτικό, ενώ άλλα μόρια αναστέλλουν την απόπτωση (αντι-αποπτωτικά), όπως τα Bcl-2, Bcl-x1, Mcl-1 (36) (**πίνακας 2**).

Εικόνα 6. Η διαδικασία της απόπτωσης πραγματοποιείται μέσω δύο εναλλακτικών οδών: είτε μέσω ενεργοποίησης υποδοχέων στην κυτταρική επιφάνεια (εξωγενής οδός) είτε με τη συμμετοχή των μιτοχονδρίων (ενδογενής οδός). Το τελικό αποτέλεσμα και στις δύο περιπτώσεις είναι η ενεργοποίηση συγκεκριμένης κασπάσης «εκκίνησης» (της κασπάσης-8 και πιθανόν της κασπάσης-10 για το εξωγενές μονοπάτι και της κασπάσης-9 για το ενδογενές μονοπάτι). Οι κασπάσες «εκκίνησης», στη συνέχεια, ενεργοποιούν αντίστοιχες κασπάσες «εκτέλεσης». Οι τελευταίες αποδομούν τα υποστρώματα, οδηγώντας στον αποπτωτικό θάνατο. Παρατηρείται αλληλεπίδραση ανάμεσα στις δύο αποπτωτικές οδούς.



Πίνακας 2. Γονίδια και μόρια που ρυθμίζουν την απόπτωση

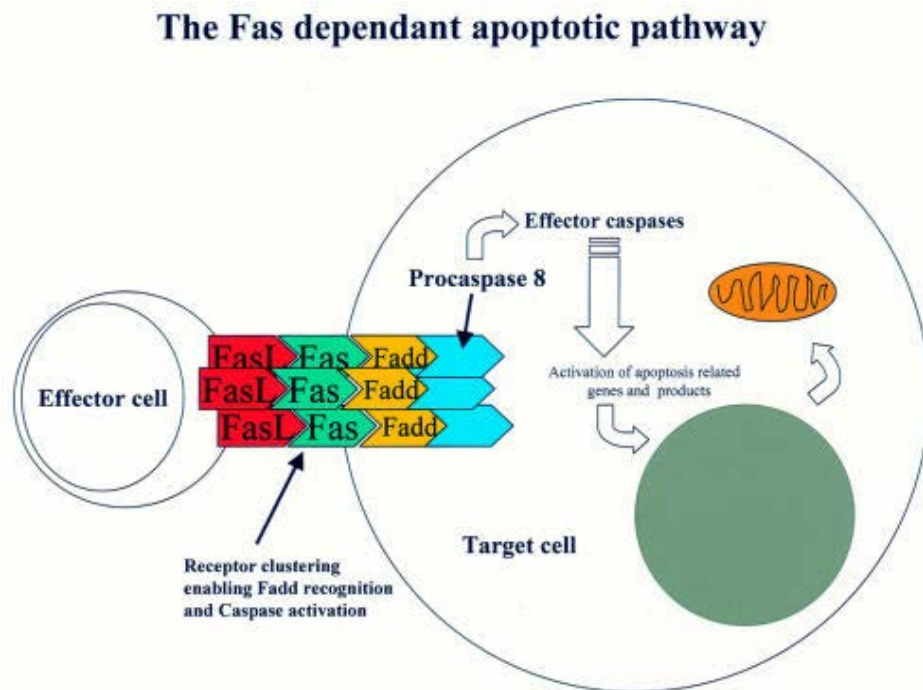
Γονίδια/Μόρια	Δράση
Bcl-2 υπο-οικογένεια	
Bcl-2	Ευδοώνει την επιβίωση
Bcl-xl	Ευδοώνει την επιβίωση
Bcl-w	Ευδοώνει την επιβίωση
Bcl-xs	Προάγει το θάνατο
Bax οικογένεια	
Bax	Προάγει το θάνατο
Bak	Προάγει το θάνατο
Bok	Προάγει το θάνατο
BH3 υπο-οικογένεια	
Bad	Προάγει το θάνατο
Bik	Προάγει το θάνατο
Bid	Προάγει το θάνατο
Blk	Προάγει το θάνατο
HRK	Προάγει το θάνατο
BimL	Προάγει το θάνατο

Εξωγενής οδός απόπτωσης (οδός υποδοχέων)

Το εξωγενές μονοπάτι ενεργοποιείται με τη δέσμευση ειδικών υποδοχέων που βρίσκονται στην επιφάνεια του κυττάρου. Υπάρχουν μόρια-συνδέτες (π.χ. Fas Ligand/FasL, Tumor Necrosis Factor /TNF, TNF-related apoptosis-inducing ligand /TRAIL), τα οποία προσδένονται στον υποδοχέα τους (FasR, TNF-R, TRAIL-R αντίστοιχα) και προκαλούν τον τριμερισμό του τελευταίου. Στη συνέχεια, ο τριμερής πλέον υποδοχέας προσελκύει μόρια προσαρμογής (FADD, TRADD), τα οποία προσδένονται σε συγκεκριμένες περιοχές του ενδοκυττάρου τμήματός του (death domains/DD). Τα μόρια προσαρμογής, εκτός από τα death domains/DD, περιέχουν και death effector domains/DED, περιοχές που δεσμεύουν στο σύμπλοκο του υποδοχέα την προ-κασπάση «εκκίνησης» 8, σχηματίζοντας το σύμπλοκο έναρξης της σηματοδότησης του θανάτου (Death Inducing Signaling Complex/DISC). Η προ-κασπάση «εκκίνησης» 8 ενεργοποιείται από πρωτεολυτική διάσπασή της και σχηματίζει την ενεργό κασπάση 8, η οποία με τη σειρά της διασπά και, ως εκ τούτου, ενεργοποιεί κασπάσες «εκτέλεσης». Το τελικό αποτέλεσμα είναι ο αποπτωτικός θάνατος του κυττάρου. Μερικές φορές, ο καταρράκτης που περιγράφεται παραπάνω είναι αρκετός για να οδηγήσει από μόνος του στην απόπτωση (τύπου 1, σηματοδότηση), αλλά σε άλλες περιπτώσεις, το σήμα που προέρχεται από το DISC πρέπει να ενισχυθεί μέσω των εξαρτημένων από μιτοχόνδρια αποπτωτικών μονοπατιών (τύπου 2 σηματοδότηση) (36,45,52,53) (εικόνα 7).

Εικόνα 7. Ο αποπτωτικός θάνατος που επιτυγχάνεται μέσω του υποδοχέα Fas

Κύτταρα βοηθητικά (effector), όπως τα ενεργοποιημένα Τ λεμφοκύτταρα, εκφράζουν στην επιφάνειά τους το συνδέτη Fas ligand (FasL), ο οποίος συνδεόμενος με τον υποδοχέα Fas προκαλεί τη συσσώρευση μορίων του τελευταίου στο κύτταρο-στόχο. Η συσσώρευση των μορίων του υποδοχέα Fas αποτελεί το πρώτο βήμα στην πυροδότηση του ενδοκυττάριου αποπτωτικού καταρράκτη, οδηγώντας στην ενεργοποίηση αρχικά της προ-κασπάσης 8 και, εν συνεχεία, των υπόλοιπων κασπασών, με τελικό αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο.

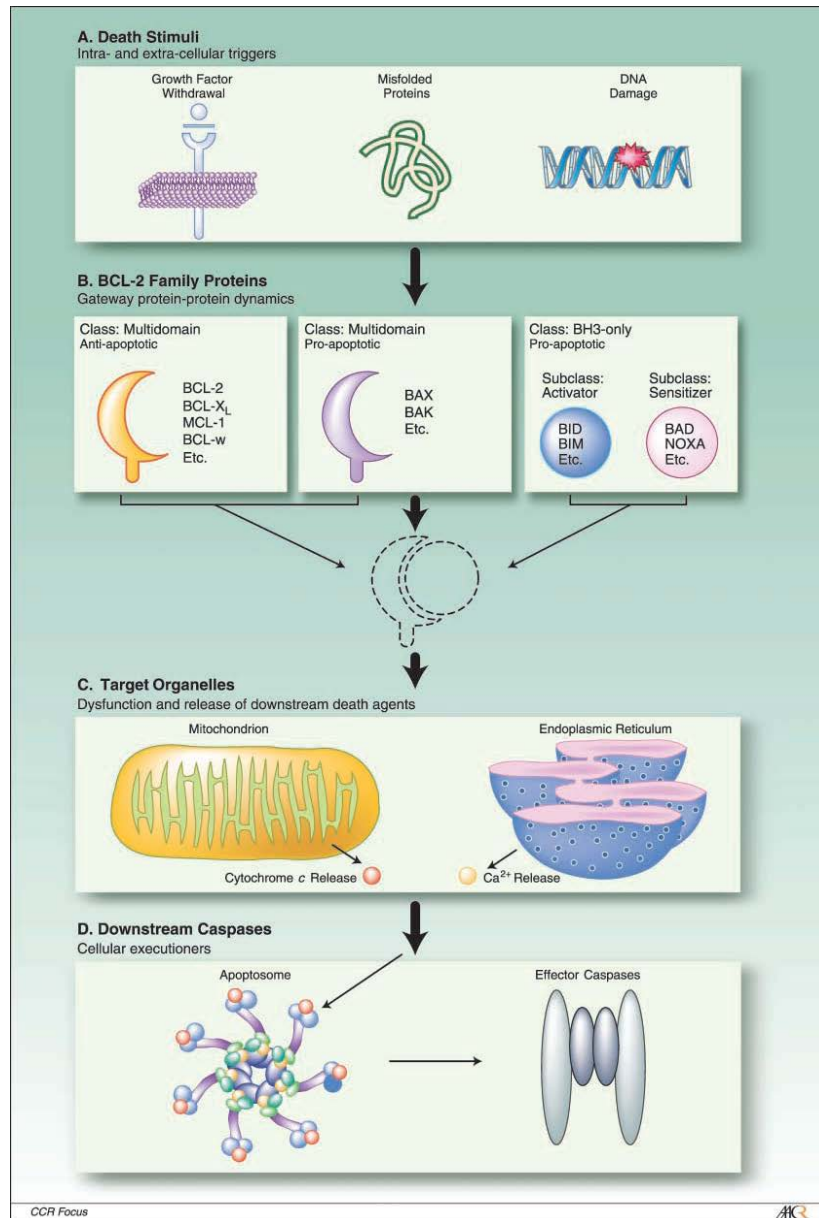


Ενδογενής οδός απόπτωσης (οδός μιτοχονδρίων)

Τα μιτοχόνδρια είναι απαραίτητα, όχι μόνο για την ενίσχυση και τη μεσολάβηση του εξωγενούς αποπτωτικού μονοπατιού, αλλά και για να ενσωματώσουν και να διαδώσουν τα μηνύματα θανάτου που προέρχονται από το εσωτερικό του κυττάρου (π.χ. βλάβες στο DNA, οξειδωτικό stress, ασιτία, χημειοθεραπευτικά φάρμακα, κλπ) (54,55). Το αποπτωτικό ερέθισμα προκαλεί τη μεταβολή του εσωτερικού διαμεμβρανικού δυναμικού των μιτοχονδρίων ($\Delta\psi$) και αυξάνει τη διαπερατότητα της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Συγκεκριμένα, προ-αποπτωτικά μόρια της Bcl-2 οικογένειας (π.χ. Bax, Bak) μετακινούνται προς την εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων όπου και ολιγομερίζονται, ενώ ταυτόχρονα η δράση των αντι-αποπτωτικών μορίων της Bcl-2 οικογένειας αναστέλλεται από τις BH3-only πρωτεΐνες (40,56). Οι πρωτεΐνες Bax και Bak σχηματίζουν μεγάλα ομο-ολιγομερή συμπλέγματα στα μιτοχόνδρια, με συνέπεια να λαμβάνει χώρα οσμοτικό μιτοχονδριακό οίδημα, οδηγώντας σε ρήξη της έξω μιτοχονδριακής μεμβράνης και στην απελευθέρωση προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών (κυτοχρώματος c, Apoptosis-Inducing Factor/AIF, endonuclease endoG, Smac/Diablo κ.α.) στο κυτταρόπλασμα (40,57-59). Το απελευθερωμένο κυτόχρωμα-c δεσμεύεται στο μονομερές μόριο του παράγοντα Apoptosis activating factor (Apaf-1), το οποίο μέσω dATP-εξαρτώμενης διαδικασίας ολιγομερίζεται σε μια επταμερή δομή. Το επταμερές αυτό μόριο έχει μορφή τροχού, ονομάζεται αποπτόσωμα και ενεργοποιεί την προ-κασπάση 9. Πιο συγκεκριμένα, μόρια προ-κασπάσης 9 δεσμεύονται στο εσωτερικό του αποπτοσώματος, σχηματίζουν διμερείς δομές και ενεργοποιούνται. Τα ενεργά μόρια της κασπάσης 9 πυροδοτούν την επακόλουθη ενεργοποίηση άλλων κασπασών «εκτέλεσης», με απώτερη κατάληξη τον κυτταρικό θάνατο (60) (εικόνα 8).

Εικόνα 8. Σχηματική απεικόνιση της ενδογενούς οδού απόπτωσης

Το αποπτωτικό ερέθισμα ενεργοποιεί τις BH3-only προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες και μεταδίδεται στα προ-αποπτωτικά και αντι-αποπτωτικά μόρια της BCL-2 οικογένειας. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών οδηγεί στην ενεργοποίηση των BAX και BAK στα οργανίλια-στόχους (μιτοχόνδρια και ενδοπλασματικό δίκτυο), γεγονός που ευοδώνει τη διαδικασία της απόπτωσης μέσω απελευθέρωσης αποπτογόνων παραγόντων και Ca^{2+} , αντίστοιχα.



Οικογένεια Bcl-2 πρωτεϊνών

Το διαμεσολαβούμενο από μιτοχόνδρια μονοπάτι, όπως περιγράφηκε παραπάνω, βρίσκεται υπό τον έλεγχο της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών. Στην οικογένεια αυτή, όπως έχει ήδη αναφερθεί, ανήκουν προ-αποπτωτικά (Bax, Bak, Bid, Bad) και αντι-αποπτωτικά (Bcl-2, Bcl-x1, Bcl-w, Mcl-1) μέλη, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους σχηματίζοντας ομοδιμερή ή ετεροδιμερή συμπλέγματα (36,61-63).

Υπάρχουν τουλάχιστον 20 γνωστά μέλη της οικογένειας Bcl-2 στα θηλαστικά, με ποικίλη εντόπιση και λειτουργία, διακρίνονται δε 3 υπο-οικογένειες. Όλα τα μέλη χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός ή περισσότερων διατηρημένων αλληλουχιών που ονομάζονται Bcl-2 ομόλογες (Bcl-2 homology: BH) περιοχές. Μέσω των BH περιοχών επιτυγχάνεται η αλληλεπίδραση μεταξύ προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών εκπροσώπων (40) (εικόνα 9).

Ο κύριος εκπρόσωπος της υπο-οικογένειας των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών είναι η Bcl-2. Πρόκειται για το ιδρυτικό μέλος της Bcl-2 οικογένειας, το οποίο μελετήθηκε αρχικά στα λεμφώματα B προέλευσης (64), λόγω της ικανότητάς του να εμποδίζει την απόπτωση. Εκτός από το Bcl-2, και άλλα μόρια, όπως τα Bcl-x1, Bcl-w, A1 και Mcl-1, στα οποία διακρίνονται περιοχές BH1, BH2, BH3 και BH4, μπορούν να προστατεύσουν το κύτταρο από ένα μεγάλο αριθμό ερεθισμάτων που προκαλούν αποπτωτικό θάνατο (40,65).

Μια δεύτερη υπο-οικογένεια συμπεριλαμβάνει τις πρωτεΐνες Bax, Bak και Bok. Είναι δομικά παρόμοιες με τη Bcl-2 (περιλαμβάνουν στη δομή τους τρεις BH περιοχές -BH1, BH2 και BH3) και ευοδώνουν την απόπτωση (40,65).

Τέλος, έχει περιγραφεί και μία τρίτη υπο-οικογένεια, η BH3-only, στην οποία ανήκουν τουλάχιστον 8 προ-αποπτωτικά μόρια, που κατά κύριο λόγο ανταγωνίζονται την προστατευτική δράση της Bcl-2 οικογένειας. Οι

εκπρόσωποι αυτής της υπο-οικογένειας (Bid, Bim, Bad, Bmf, Hrk, Noxa, Puma, Blk, BNIP3, Spike) φέρουν ένα βραχύ BH3 τμήμα, ανταποκρίνονται σε διάφορα σήματα και στη συνέχεια, είτε ευαισθητοποιώντας είτε ενεργοποιώντας άμεσα την Bax/Bak ομάδα, ευοδώνουν την απόπτωση (40,66,67).

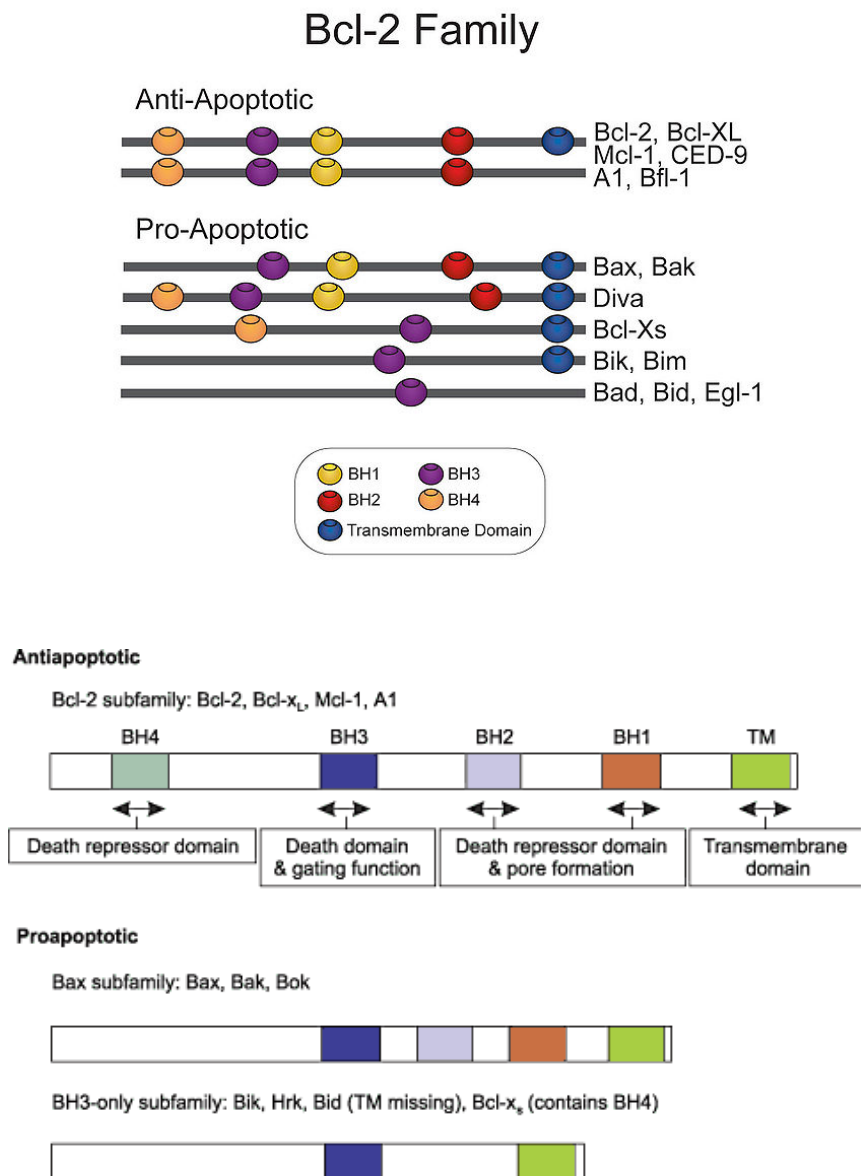
Ενώ τα μόρια Bax και Bak παίζουν κεντρικό ρόλο στην προ-αποπτωτική δράση της Bcl-2 οικογένειας, που ρυθμίζεται από τα αντι-αποπτωτικά μέλη Bcl-2 και Bcl-x1, τα μέλη της BH3-only υπο-οικογένειας απαιτούνται για την ενεργοποίηση της προ-αποπτωτικής Bax/Bak λειτουργίας. Οι BH3-only πρωτεΐνες, δηλαδή, έχουν πλέον αναγνωρισθεί ως οι βασικοί εκκινητές του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (68).

Τα περισσότερα μέλη της Bcl-2 οικογένειας φέρουν μία καρβοξυτελική υδρόφοβη αλληλουχία αμινοξέων μέσω των οποίων αγκιστρώνονται στις μεμβράνες, κυρίως στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, το ενδοπλασματικό δίκτυο και τον πυρηνικό φάκελο.

Εντούτοις, τουλάχιστον δύο προ-αποπτωτικές BH3-only πρωτεΐνες, η Bad και η Bid, δε φέρουν τέτοιες αλληλουχίες, αλλά οι περιοχές που εντοπίζονται αυτές οι πρωτεΐνες ελέγχονται δυναμικά από τη σύνδεση με/απόσπαση από άλλα μέλη της Bcl-2 οικογένειας. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη ρυθμιζόμενη μετακίνηση μεταξύ του κυτταροπλάσματος και των διαφόρων μεμβρανικών επιφανειών. Οι BH3-only πρωτεΐνες λειτουργούν είτε ως ενεργοποιητές του Bax είτε ως αναστολείς των Bcl-2/Bcl-x1 (69). Η ικανότητα των μελών της Bcl-2 οικογένειας να σχηματίζουν κανάλια σε συνεργασία με τις ενδοκυττάριας μεμβράνες, καθώς και η εντόπισή τους στην έξω μιτοχονδριακή μεμβράνη, φαίνεται να είναι καθοριστικές για την αποπτωτική τους δράση (70). Ως απάντηση σε ένα αποπτωτικό ερέθισμα, τα BH3-only μέλη ενεργοποιούνται μέσω μεταγραφικής ενίσχυσης (Bax, Noxa, Puma), υποκυτταρικής μετακίνησης (Bim, Bmf), αποφωσφορυλίωσης (Bad) ή πρωτεόλυσης (Bid). Οι ενεργοποιημένες BH3-only πρωτεΐνες εμποδίζουν τα αντι-αποπτωτικά μόρια να αναστείλουν τη δράση των προ-αποπτωτικών

μορίων. Επιπλέον, μπορεί να προκαλούν άμεση αλλαγή στη δομή των Bax και Bak, τα οποία ολιγομερίζονται και εισέρχονται στη μιτοχονδριακή μεμβράνη όπου και σχηματίζουν οπές. Έτσι, προ-αποπτωτικοί παράγοντες απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα και ενεργοποιείται ο μηχανισμός της απόπτωσης (71).

Εικόνα 9. Η δομή των μορίων της Bcl-2 οικογένειας



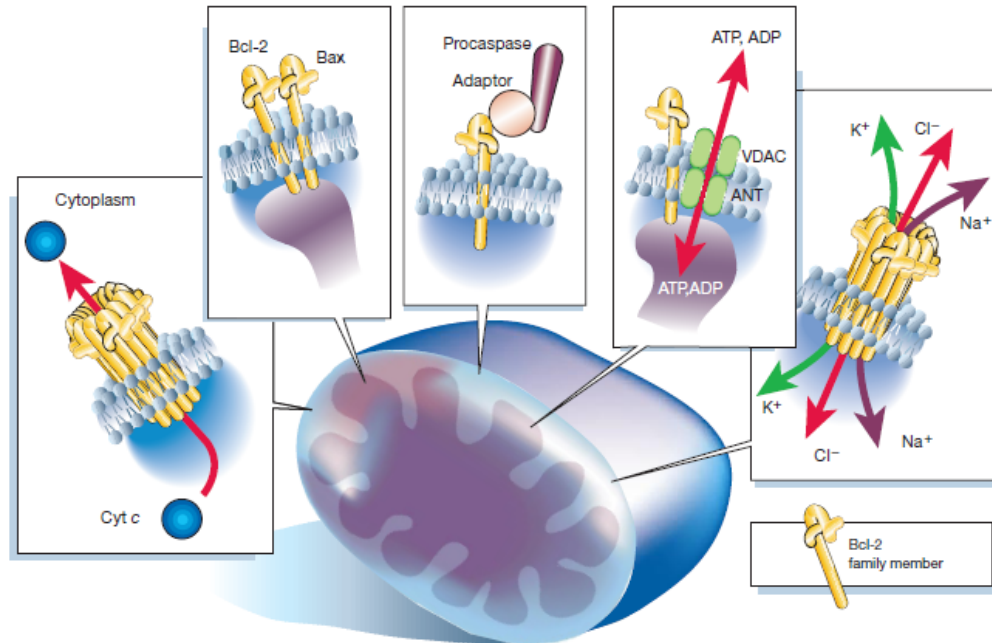
Τα προ-αποπτωτικά μόρια της Bcl-2 οικογένειας βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα σε ανενεργό μορφή. Το αποπτωτικό ερέθισμα σηματοδοτεί την ενεργοποίησή τους μέσω πρωτεόλυσης, αποφωσφορυλίωσης ή άλλων μηχανισμών. Τα προ- και αντι-αποπτωτικά μόρια απαντώνται στην επιφάνεια των μιτοχονδρίων, όπου και ανταγωνίζονται την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c. Τα δύο αποπτωτικά μονοπάτια συνήθως λειτουργούν ανεξάρτητα. Υπάρχει, όμως, πιθανότητα μετάβασης από το εξωγενές στο ενδογενές μέσω της δράσης του προ-αποπτωτικού μορίου Bid (38).

Το αποπτωτικό σήμα αλλάζει τη φυσιολογία των μιτοχονδρίων (πχ ανταλλαγή ιόντων ή οξειδωτική φωσφορυλίωση), με αποτέλεσμα τη διόγκωση των οργανυλλίων, τη ρήξη της έξω μεμβράνης και την απελευθέρωση των πρωτεϊνών του διαμεμβρανικού χώρου στο κυτταρόπλασμα (άμεση ρύθμιση της ομοιόστασης των μιτοχονδρίων). Η ομοιόσταση των μιτοχονδρίων, όμως, μπορεί να ρυθμιστεί και έμμεσα με τη συμβολή άλλων μιτοχονδριακών πρωτεϊνών (38).

Πιθανοί μηχανισμοί δράσης των μελών της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών είναι οι ακόλουθοι (**εικόνα 10**):

- 1) Σχηματισμός πόρου μέσω του οποίου το κυτόχρωμα c και άλλες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες μετακινούνται προς το κυτταρόπλασμα.
- 2) Ετεροδιμερισμός μεταξύ προ- και αντι- αποπτωτικών μορίων (η BH3 περιοχή ενός μορίου δεσμεύεται σε υδρόφοβη θήκη που σχηματίζεται από τις BH1, BH2 και BH3 περιοχές άλλου μορίου).
- 3) Άμεση ρύθμιση των κασπασών μέσω μορίων προσαρμογής.
- 4) Αλληλεπίδραση με άλλες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες (voltage-dependent anion channel/VDAC, adenosine nucleotide transporter/ANT) είτε για να διευρύνει τον πόρο και να διευκολύνει την έξοδο του κυτοχρώματος c είτε για να ρυθμίσει τη μιτοχονδριακή ομοιόσταση (άνοιγμα του permeability transition pore/PTP).
- 5) Ολιγομερισμός για το σχηματισμό ασθενώς επιλεκτικού καναλιού ιόντων (38).

Εικόνα 10. Η βιοχημεία της απόπτωσης



Ο σχετικός λόγος των αντι-αποπρωτικών και προ-αποπρωτικών αντιπροσώπων της Bcl-2 οικογένειας είναι αυτός που τελικά καθορίζει την ευαισθησία ή την αντίσταση των κυττάρων στα ποικίλα αποπρωτικά ερεθίσματα (αυξητικοί παράγοντες, υποξία, ακτινοβολία, χημειοθεραπευτικά φάρμακα, οξειδωτικοί παράγοντες, περίσσεια Ca⁺) (32,35). Οποιαδήποτε μεταβολή, επομένως, στα πρωτεϊνικά αυτά μόρια συσχετίζεται με παθολογικές καταστάσεις, όπως νεοπλάσματα, αυτοάνοσες παθήσεις, σύνδρομο ανοσοανεπάρκειας, κ.α.(60,72,73).

Η έκφραση των γονιδίων bcl-2 και bax ρυθμίζεται από το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53. Συγκεκριμένα, το p53 ενεργοποιεί τον επαγωγέα του γονιδίου

bax, επάγοντας τη σύνθεση της αντίστοιχης πρωτεΐνης. Από την άλλη πλευρά, συνδέεται με ένα αρνητικό ρυθμιστικό στοιχείο (μεταγραφικώς σιωπηρό) έξω από τον επαγωγέα του γονιδίου bcl-2, προκαλώντας την αποδόμηση του τελευταίου. Κάθε διαταραχή, επομένως, στη λειτουργία του p53 επιδρά στην ευαισθησία του κυττάρου στην αποπτωτική διαδικασία (74-76).

Πρωτεΐνη Bcl-2

Η πρωτεΐνη Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) κωδικοποιείται από το ομώνυμο γονίδιο (bcl-2). Το bcl-2 αποτέλεσε το πρώτο παράδειγμα ογκογονιδίου που παρεμπόδιζε τον κυτταρικό θάνατο. Εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 18 και στο λεμφοζιδιακό λέμφωμα συχνά υπερεκφράζεται δεσμευόμενο στο χρωμόσωμα 14 στην περιοχή της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών στα πλαίσια της διαμετάθεσης t(14;18)(q32; q21) (77-79).

Στους ενήλικες, περιορίζεται στα πρόδρομα κύτταρα και στα μακράς επιβίωσης κύτταρα των ιστών, αλλά υπερεκφράζεται στο αναπτυσσόμενο έμβρυο. Εντοπίζεται, επίσης, στα B λεμφοκύτταρα των βλαστικών κέντρων που τελικά επιβιώνουν. Στο θύμο αδένα, το γονίδιο bcl-2 είναι παρόν στα ώριμα θυμοκύτταρα του μυελού που επιβιώνουν, αλλά δεν εντοπίζεται στην πλειοψηφία των ανώριμων θυμοκυττάρων του φλοιού, τα περισσότερα από τα οποία αποπίπτουν (80,81).

Το γονίδιο bcl-2 κωδικοποιεί δύο εναλλακτικές μορφές της πρωτεΐνης. Η μία μορφή Bcl-2b (όμοια με την a εκτός από το καρβοξυτελικό άκρο) αποτελείται από 205 αμινοξέα και μοριακό βάρος 22kDa, ενώ η δεύτερη Bcl-2a αποτελείται από 239 αμινοξέα και μοριακό βάρος 26kDa, που προσθέτουν στο μόριο μια υδρόφοβη ουρά αγκίστρωσης στη μεμβράνη, η οποία φαίνεται να είναι χρήσιμη για την αποπτωτική ικανότητα του μορίου (82).

Έχουν περιγραφεί δύο ισομορφές της πρωτεΐνης Bcl-2, η ισομορφή 1 ή 1G5M και η ισομορφή 2 ή 1G5O/1GJH, οι οποίες έχουν μεν παρόμοια δομή, αλλά εμφανίζουν διαφορετική αντι-αποπτωτική δραστηριότητα (83).

Το πρωτεϊνικό προϊόν Bcl-2 εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια, στο ενδοπλασματικό δίκτυο και σε πυρηνικές μεμβράνες και η αντι-αποπτωτική του δράση έχει αποδειχθεί ότι επιτυγχάνεται με την αναστολή του κυτταρικού θανάτου και όχι μέσω ευόδωσης του πολλαπλασιασμού. Αν και δε φαίνεται να επηρεάζει την παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου, προστατεύει το κύτταρο και τα συστατικά του, συμπεριλαμβανομένων των λιπιδικών μεμβρανών, από την οξειδωτική καταστροφή (84). Συγκεκριμένα, αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη Bax και, όταν η τελευταία βρίσκεται σε περίσσεια, τα κύτταρα εκτελούν την εντολή θανάτου, ενώ η επικράτηση της Bcl-2 συνεπάγεται την κυτταρική επιβίωση (85,86).

Η τρισδιάστατη δομή της Bcl-2 αποτελείται από 2 κεντρικές, υδρόφοβες κατά κύριο λόγο άλφα-έλικες, οι οποίες περιβάλλονται από 6 ή 7 αμφίπαθες άλφα-έλικες ποικίλου μήκους. Ένας μακρύς, μη δομημένος βρόγχος βρίσκεται μεταξύ των 2 πρώτων άλφα-ελίκων. Ένα εμφανές υδρόφοβο αυλάκι βρίσκεται στην επιφάνεια των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών και αποτελεί την περιοχή πρόσδεσης πεπτιδίων που μιμούνται την BH3 περιοχή των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως Bak και Bad. Η τρισδιάστατη δομή που περιγράφηκε παραπάνω εμφανίζει εντυπωσιακές ομοιότητες με εκείνη βακτηριακών τοξινών, οι οποίες κατά την ενσωμάτωσή τους σε βακτηριακές μεμβράνες σχηματίζουν διαύλους-πόρους. Αυτό το εύρημα οδήγησε σε πειράματα, τα οποία με τη σειρά τους απέδειξαν ότι το μόριο Bcl-2 σχηματίζει διαύλους-πόρους σε τεχνητές μεμβράνες (87,88).

Τουλάχιστον τρεις λειτουργίες του Bcl-2 και ορισμένων αντι-αποπτωτικών ομολόγων του (Bcl-x1) έχουν αναγνωρισθεί: (α) διμερισμός με άλλα μέλη της Bcl-2 οικογένειας (β) σύνδεση με μη ομόλογες πρωτεΐνες και (γ) σχηματισμός καναλιών ιόντων/οπών (69).

Τα αντι-αποπτωτικά μέλη της Bcl-2 οικογένειας απομακρύνουν τα προ-αποπτωτικά, δεσμευόμενα στις BH3 περιοχές, εμποδίζοντας την ενεργοποίηση/ολιγομερισμό του Bax ή Bak και κατ'επέκταση τα μιτοχονδριακά γεγονότα (69). Το μόριο Bcl-2 ελέγχει έμμεσα την ενεργοποίηση του αποπτοσώματος, αλλά και αναστέλλει τα αποπτωτικά μονοπάτια που δε σχετίζονται με το σύμπλεγμα Araf-1/caspase-9 (αυτά πιθανόν εξαρτώνται από την κασπάση-7) (89).

Ένας σημαντικός αριθμός προ- και αντι-αποπτωτικών μορίων της Bcl-2 οικογένειας εντοπίζονται σε ξεχωριστά διαμερίσματα του κυττάρου, εφόσον δεν υπάρχει ερέθισμα θανάτου. Τα αντι-αποπτωτικά μέλη υπό φυσιολογικές συνθήκες απαντώνται ως ακέραιες πρωτεΐνες στις μεμβράνες των μιτοχονδρίων, του ενδοπλασματικού δικτύου ή του πυρήνα. Τα προ-αποπτωτικά μόρια, εν αντιθέσει, εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα ή στον κυτταρικό σκελετό. Το αποπτωτικό ερέθισμα συνεπάγεται αλλαγή στη στερεοδομή τους, γεγονός που τους επιτρέπει να μεταναστεύσουν και να προσδεθούν στις μεμβράνες, κυρίως την έξω μιτοχονδριακή.

Η ενεργοποίηση του προ-αποπτωτικού Bax, το οποίο βρίσκεται ως μονομερές στο κυτταρόπλασμα ή χαλαρά προσδεμένο σε μεμβράνες (το αμινο-τελικό άκρο είναι καλυμμένο-προστατευμένο), συνεπάγεται τη μετακίνηση στα μιτοχόνδρια, όπου προσδέεται στη μεμβράνη και σχηματίζει ομοδιμερή (αποκαλύπτεται το αμινο-τελικό άκρο). Η παρουσία αντι-αποπτωτικών μορίων (Bcl-2 or Bcl-x1) εμποδίζει την ενεργοποίηση του Bax. Σε αντίθεση με το Bax, το Bcl-2 είναι μια ακέραιη πρωτεΐνη που εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια (90).

Η παρουσία μιας αλληλουχίας υδρόφοβων αμινοξέων στο καρβοξυτελικό άκρο του Bcl-2 μορίου επιτρέπει τη μετα-μεταφραστική είσοδό του στις ενδοκυττάρειες μεμβράνες, κυρίως στην έξω μιτοχονδριακή, στον πυρηνικό φάκελο και σε τμήματα του ενδοπλασματικού δικτύου (69,91).

Πρωτεΐνη Bax

Η πρωτεΐνη Bax (Bcl-2-associated X) ανήκει στην οικογένεια των Bcl-2 πρωτεϊνών. Κωδικοποιείται από το ομώνυμο γονίδιο (bax), το οποίο ήταν το πρώτο προ-αποπτωτικό γονίδιο της Bcl-2 οικογένειας που ανακαλύφθηκε (92). Η έκφραση του γονιδίου bax ρυθμίζεται θετικά (upregulated) από την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53. Συγκεκριμένα, η p53 ενεργοποιείται στα πλαίσια απάντησης του κυττάρου στο stress, προσδένεται στον υποκινητή του γονιδίου bax και δρα ως μεταγραφικός παράγοντας ενεργοποιώντας την έκφραση της πρωτεΐνης Bax. Η p53 διαδραματίζει και έναν επιπλέον ρόλο στον αποπτωτικό μηχανισμό: αλληλεπιδρά με την Bax, προωθώντας την ενεργοποίησή της, καθώς και την είσοδό της στη μιτοχονδριακή μεμβράνη (92-95).

Η Bax είναι μια πρωτεΐνη 21 kDa με εκτενή ομολογία αμινοξέων με τη Bcl-2. Κωδικοποιείται από 6 εξόνια και εμφανίζει ένα περίπλοκο μοντέλο εναλλακτικού RNA ματίσματος, με αποτέλεσμα να προκύπτουν μία 21 kDa μεμβρανική (alpha) και δύο μορφές κυτταροπλασματικών (beta and gamma) πρωτεϊνών (92).

Το μόριο της Bax βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και μετά την έναρξη της αποπτωτικής διαδικασίας επιδέχεται δομικές μεταβολές προκειμένου να διευκολυνθεί η είσοδός της σε μεμβρανικά οργανύλλια, κυρίως της εξωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων (96-98).

Ένα μόριο Bax μπορεί να συνδέεται με ένα μόριο Bcl-2 και να σχηματίζει το ετεροδιμερές Bcl-2/Bax ή να συνδέεται με ένα άλλο μόριο Bax και να σχηματίζει ομοδιμερή Bax/Bax. Ο σχηματισμός ομοδιμερών συνεπάγεται τη ρήξη της μιτοχονδριακής μεμβράνης και την απελευθέρωση προ-αποπτωτικών μορίων (κυτόχρωμα c, the inhibitors of apoptosis proteins {IAP} Smac/Diablo and HtrA2/Omi, πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην αποδόμηση της χρωματίνης Endo G και Apoptosis Inducing Factor/AIF) (40).

Η αναλογία Bax/Bcl-2 καθορίζει την ευαισθησία του κυττάρου στην διαδικασία της απόπτωσης. Σε κύτταρα με υπερέκφραση Bax επικρατούν τα ομοδιμερή Bax/Bax και μεγενθύνεται η ευαισθησία των συγκεκριμένων κυττάρων στα αποπτωτικά ερεθίσματα. Τα ετεροδιμερή Bcl-2/Bax επικρατούν σε κύτταρα που υπερεκφράζουν το Bcl-2 με αποτέλεσμα να ελαττώνεται η ευαισθησία τους σε αποπτωτικά ερεθίσματα (84,92,99).

Σύμπλεγμα Fas/FasL

Το μόριο Fas (γνωστό και ως Fas receptor/FasR, apoptosis antigen 1/APO-1 ή APT, cluster of differentiation 95/CD95, Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily member 6/TNFRSF6) είναι μέλος της οικογένειας των Tumor Necrosis Factor/Nerve Growth Factor (TNF/NGF) υποδοχέων. Κωδικοποιείται από το γονίδιο *TNFRSF6*, το οποίο εντοπίζεται στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 10 (10q24.1) και είναι οργανωμένο σε 9 εξόνια. Η έκφρασή του ενισχύεται από την IFN- γ , τον TNF, καθώς και από την ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων (100-102).

Έχουν αναγνωρισθεί 8 splice variants του γονιδίου, τα οποία μεταφράζονται σε 7 ισομορφές της πρωτεΐνης. Ο Fas είναι ένας τύπου I διαμεμβρανικός υποδοχέας, τον οποίο συναντάμε κατ'εξοχήν στην επιφάνεια των κυττάρων, αλλά και σε διαλυτές μορφές ως αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος (103-105).

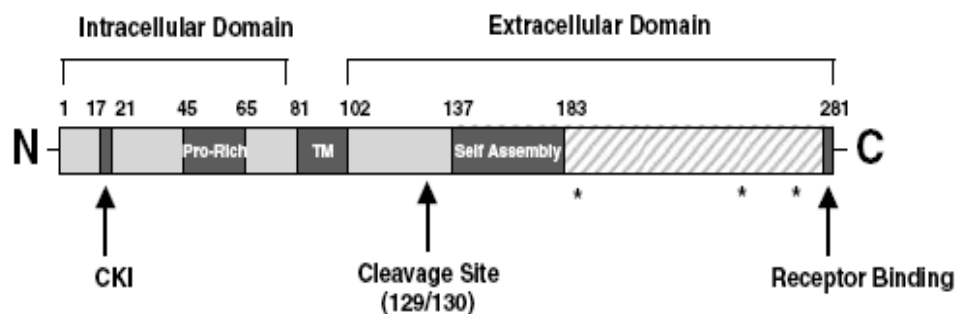
Η ώριμη μορφή του Fas έχει 319 αμινοξέα, μοριακό βάρος 45 kDa και διαιρείται σε 3 περιοχές: μία εξωκυττάρια, μία διαμεμβρανική και μία κυτταροπλασματική. Η εξωκυττάρια περιοχή αποτελείται από 157 αμινοξέα, έχει πλούσιες σε κυστεΐνη επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες και κωδικοποιείται από τα εξόνια 1-5. Η διαμεμβρανική και η κυτταροπλασματική περιοχή έχουν 17 και 145 αμινοξέα αντίστοιχα και η μεν πρώτη κωδικοποιείται από το εξόνιο 6, ενώ η κυτταροπλασματική από τα εξόνια 7-9. Εντός του κυτταροπλάσματος βρίσκεται μια φορτισμένη περιοχή

που ονομάζεται ενδοκυττάρια περιοχή θανάτου (death domain/DD), απαραίτητη για τη μετάδοση του αποπτωτικού μηνύματος (100,104,106) (εικόνα 11).

Ο συνδέτης του Fas (Fas ligand/FasL) αναγνωρίστηκε το 1993 ως μία τύπου II διαμεμβρανική πρωτεΐνη 40 kDa, η οποία ανήκει στην TNF οικογένεια. Πρόκειται για ένα από τα κυριότερα μόρια που επιδρούν στα CD8+ κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα και τους φυσικούς φονείς (Natural Killers/NK). Απαντάται σε δύο μορφές, τη μεμβρανική (membrane - mFasL) και τη διαλυτή (soluble – sFasL). Η μεμβρανική μορφή δρα τοπικά μέσω διακυτταρικής επαφής. Το εξωκυττάριο τμήμα της mFasL μπορεί να δεχθεί την πρωτεολυτική δράση μεταλλοπρωτεασών (MMPs), όπως της MMP-7 και της MMP-3, με αποτέλεσμα να προκύπτει η διαλυτή μορφή. Η τελευταία μπορεί, επίσης, να απελευθερώνεται από ενεργοποιημένα μονοκύτταρα (106, 107).

Το διαλυτό μόριο FasL είναι λιγότερο ενεργό από τη μεμβρανική μορφή και δε φαίνεται να προκαλεί τριμερισμό του υποδοχέα και σχηματισμό του DISC (106,108).

Εικόνα 11. Δομή του ανθρώπινου μορίου FasL



Η δέσμευση του FasL στο μεμβρανικό υποδοχέα Fas μεταδίδει το σήμα του αποπτωτικού θανάτου, αλλά και ενεργοποιεί τη φλεγμονώδη αντίδραση (106,107).

Ο κυτταρικός θάνατος που προκαλείται από το σύστημα Fas-FasL συμμετέχει σε σειρά λειτουργιών του ανοσολογικού συστήματος, με αποτέλεσμα μεταλλάξεις στον υποδοχέα ή/και στο συνδέτη του να προκαλούν αυτοάνοσες καταστάσεις (104).

Γενικά, το μόριο Fas εκφράζεται ασθενώς σε ποικιλία λεμφικών και μη κυττάρων, αλλά τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος είναι περισσότερο ευαίσθητα στη δράση του Fas, καθώς και στην αύξηση της έκφρασης (up-regulation) του Fas από την IFN- γ και την ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων (100,104,109).

Ο υποδοχέας Decoy receptor 3 (DcR3) είναι ένας πρόσφατα μελετημένος υποδοχέας της TNF υπερ-οικογένειας. Είναι ένα διαλυτό μόριο που δεν έχει ικανότητα μετάδοσης ερεθίσματος. Συγκεκριμένα, δεσμεύεται ανταγωνιστικά με το διαμεμβρανικό μόριο FasL και εμποδίζει την αλληλεπίδραση του τελευταίου με τον υποδοχέα Fas (110).

Οι Fas-FasL αλληλεπιδράσεις υπόκεινται σε ποικίλα επίπεδα ελέγχου. Η σύνθεση και η διακίνηση του FasL ελέγχονται αυστηρά, με αποτέλεσμα να περιορίζεται η παραγωγή βιολογικά δραστικών μορίων σε λίγους τύπους κυττάρων. Αν και σχεδόν όλα τα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα εκφράζουν μόρια υποδοχέα Fas, υπάρχουν πολλοί μηχανισμοί ρύθμισης της αποτελεσματικότητας της Fas-διαμεσολαβούμενης απόπτωσης. Με τον τρόπο αυτό, επιτυγχάνεται η εξολόθρευση των αυτοαντιδραστικών T και B κυττάρων, χωρίς όμως να παραβλάπτεται η άνοση απάντηση του οργανισμού στα παθογόνα (106).

Ο υποδοχέας Fas τριμερίζεται ώστε να συνδεθεί σωστά με το συνδέτη του FasL, ο οποίος συντίθεται ως τριμερές μόριο. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, στο ενδοκυττάριο τμήμα του ο υποδοχέας Fas φέρει συντηρημένη αλληλουχία που ονομάζεται «death domain/DD». Μετά την πρόσδεση του FasL στον Fas,

ένα μόριο προσαρμογής, η πρωτεΐνη FADD (Fas-associating protein with death domain), αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα Fas. Συγκεκριμένα, η FADD μέσω της αλληλουχίας death domain συνδέεται με την αλληλουχία death domain της κυτταροπλασματικής ουράς του υποδοχέα Fas. Επιπλέον, στο μόριο της FADD (στο αμινοτελικό άκρο) αναγνωρίζεται μία περιοχή που ονομάζεται death effector domain/DED, η οποία διευκολύνει την πρόσδεση στην περιοχή DED της FADD-like ICE (FLICE), ευρέως γνωστή και ως κασπάση 8. Το σύμπλεγμα που σχηματίζεται ονομάζεται death-inducing signaling complex ή DISC. Η πρόσδεση της προ-κασπάσης 8 στο μόριο FADD ακολουθείται από την πρωτεολυτική αποδόμηση της πρώτης, με αποτέλεσμα η ενεργός μορφή (κασπάση 8) να απελευθερώνεται από το σύμπλεγμα DISC και, τελικά, να πυροδοτείται η αποπτωτική διαδικασία (108, 109, 111, 112).

Τα μόρια Fas και FasL διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση ποικίλων αποπτωτικών διεργασιών (113). Αναλυτικότερα,

- **Ομοίσταση T-λεμφοκυττάρων:** η ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων οδηγεί στην έκφραση μορίων FasL από αυτά. Τα T λεμφοκύτταρα αρχικά εμφανίζουν αντοχή στη Fas-διαμεσολαβούμενη απόπτωση κατά τη διάρκεια της κλωνικής ανάπτυξης. Προοδευτικά γίνονται πιο ευαίσθητα όσο περισσότερο ενεργοποιούνται, με τελικό αποτέλεσμα το θάνατο (activation-induced cell death/AICD). Αυτή η διαδικασία είναι αναγκαία προκειμένου να αποφευχθεί η υπέρμετρη άνοση απάντηση και να καταστραφούν τα αυτοαντιδραστικά T-κύτταρα. Έχει βρεθεί ότι μεταλλάξεις στο μόριο του Fas ή του FasL προκαλούν συσσώρευση περίσσειας T κυττάρων, με αποτέλεσμα την εμφάνιση λεμφαδενοπάθειας, σπληνομεγαλίας και ερυθματώδους λύκου (106).

- **Δραστικότητα κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων:** μέσω της Fas-διαμεσολαβούμενης απόπτωσης, καθώς και μέσω της οδού της περφορίνης, τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα εξολοθρεύουν όποια κύτταρα εκφράζουν ξένα αντιγόνα (114).

- **Πλεονέκτημα ανοσίας:** η μεταγραφική ρύθμιση του FasL συμβάλλει στην ιδιοσυστασιακή έκφραση από κύτταρα ιστών, όπως ο αμφιβληστροειδής και οι όρχεις. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η απόπτωση, κατ'επέκταση η απομάκρυνση από την κυκλοφορία, λεμφοκυττάρων που διηθούνται στους συγκεκριμένους ιστούς, οπότε περιορίζεται ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός τους. Επιπλέον, μόρια FasL που εκφράζονται δυναμικά σε T κύτταρα ευοδώνουν την απόπτωση σε Fas-ευαίσθητα κύτταρα ιστών όπου το FasL μπορεί να μην εκφράζεται (106,115).

- **Μητρική αντοχή:** ο συνδέτης FasL μπορεί να είναι καθοριστικής σημασίας για την πρόληψη της μετακίνησης κυττάρων μεταξύ μητέρας και εμβρύου, αν και μέχρι στιγμής προβλήματα της κύησης δεν έχουν αποδοθεί σε ελαττωματικό Fas-FasL σύστημα (116-118).

- **Αντεπίθεση στον όγκο:** τα κακοήθη κύτταρα μπορεί να υπερεκφράζουν FasL και να προκαλούν την απόπτωση των λεμφοκυττάρων, τρόπος με τον οποίο διαφεύγουν της ανοσολογικής απάντησης του οργανισμού (119).

Οποιαδήποτε διαταραχή στο σύστημα Fas/FasL έχει ενοχοποιηθεί για ηπατική δυσλειτουργία, αυτοάνοσες παθήσεις και ανοσολογική ανεπάρκεια. Για το λόγο αυτό, η αξία του συστήματος Fas/FasL αναγνωρίστηκε κυρίως σε σχέση με την ικανότητά του να ευοδώνει την απόπτωση. Υπάρχουν, εντούτοις, δεδομένα που αποδεικνύουν τη συσχέτιση της ενεργοποίησης του Fas με μη αποπτωτικές διεργασίες, όπως τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ή την ενεργοποίηση του NF-κβ (120,121).

Πρόσφατα έχει αποδειχθεί ότι το μόριο Fas ευνοεί την ανάπτυξη του όγκου. Αυτό επιτυγχάνεται ως εξής: 1) στα καρκινικά κύτταρα η έκφραση του μορίου αυτού είναι συνήθως μειωμένη και 2) τα κακοήθη κύτταρα καθίστανται ανθεκτικά στην απόπτωση (122).

Απόπτωση και νεοπλασματικά νοσήματα

Στους διάφορους οργανισμούς, η περίσσεια των κυττάρων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, καθώς και τα δυνητικά επιβλαβή κύτταρα, εξουδετερώνονται μέσω ποικίλων μηχανισμών (123).

Ο ανθρώπινος οργανισμός, υπό φυσιολογικές συνθήκες, καθημερινά παράγει και παράλληλα καταστρέφει περίπου 60 δισεκατομμύρια κύτταρα, με τα νέα κύτταρα να σχηματίζονται μέσω κυτταρικής διαίρεσης και τα γηρασμένα να αποδομούνται κυρίως μέσω της αποπτωτικής διαδικασίας. Η απορρύθμιση της ισορροπίας ανάμεσα στην κυτταρική διαίρεση και τον αποπτωτικό θάνατο, όπως έχει ήδη αναφερθεί, μπορεί να οδηγήσει στην καρκινογένεση (124).

Ο ρόλος του αποπτωτικού θανάτου στην καρκινογένεση παρέμενε υποεκτιμημένος για περισσότερα από 15 χρόνια. Ήδη από το 1970 έχει υποστηριχθεί η άποψη ότι η αποπτωτική διαδικασία μπορεί να επιδρά στον καρκινικό φαινότυπο. Έχει αποδειχθεί, επιπλέον, ότι η απορρύθμιση της αποπτωτικής διαδικασίας συμβάλλει και στη μεταναστευτική ικανότητα των νεοπλασματικών κυττάρων (125).

Η ορθή ρύθμιση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου είναι σημαντική, ιδιαίτερα σε κυτταρικούς πληθυσμούς με υψηλό δείκτη πολλαπλασιασμού, όπως το αιμοποιητικό σύστημα. Συνεπώς, η ελάττωση της απόπτωσης, σε συνδυασμό με την κακοήθη εξαλλαγή, είναι πιθανό να οδηγήσουν σε ανάπτυξη λεμφώματος ή λευχαιμίας. Δεδομένου ότι οι ογκογενετικές μεταβολές και τα ελαττώματα στις οδούς της απόπτωσης κατά την ογκογένεση είναι πιθανό να συμμετέχουν και στην ανάπτυξη αντίστασης στη θεραπεία, μπορεί να υποστηριχθεί ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ καρκινογένεσης και θεραπείας (126). Η ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να διαφεύγουν του αποπτωτικού θανάτου είναι ένα βασικό χαρακτηριστικό που επιτρέπει τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό τους. Επιπλέον, η αποτελεσματικότητα των κυτταροτοξικών θεραπειών που χρησιμοποιούνται

(χημειοθεραπεία, ακτινοβολία, ανοσοθεραπεία) βασίζεται στην εξουδετέρωση των νεοπλασματικών κυττάρων μέσω επιτυχούς πυροδότησης της αποπτωτικής διαδικασίας (126,127).

Ένας αριθμός μελετών έχει αναδείξει υψηλή συχνότητα απόπτωσης σε όγκους που υποστράφηκαν αυτόματα, καθώς και σε όγκους που θεραπεύονται με κυτταροτοξικούς χημειοθεραπευτικούς παράγοντες (125, 128).

Τα μέλη της Bcl-2 οικογένειας διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου (124). Ειδικότερα, η κλωνοποίηση και ο χαρακτηρισμός του ογκογονιδίου bcl-2 καθιέρωσε τη σημασία του αποπτωτικού θανάτου στο σχηματισμό του όγκου. Το bcl-2, όμως, δε συμπεριφέρεται σαν ένα τυπικό ογκογονίδιο. Η ογκογενετική του δράση επιτυγχάνεται μέσω αναστολής της απόπτωσης και όχι μέσω διαταραχής του φυσιολογικού πολλαπλασιασμού. Το μόριο Bax, αντιθέτως, το οποίο ευοδώνει την απόπτωση, απενεργοποιείται σε συγκεκριμένους τύπους νεοπλασμάτων του παχέος εντέρου, αλλά και σε αιματολογικές νεοπλασίες. Αν και οι αρχικές μελέτες στην πρωτεΐνη Bcl-2 καθιέρωσαν το ρόλο της απόπτωσης στην καρκινογένεση, είναι πλέον σαφές ότι μεταλλάξεις σε πολλά καρκινικά γονίδια μπορούν να διαταράξουν την αποπτωτική διαδικασία. Η απορρύθμιση της οδού του υποδοχέα Fas, για παράδειγμα, μπορεί να συνεπάγεται την εμφάνιση λεμφοϋπερπλαστικών νοσημάτων ή συμπαγών όγκων (125).

Τα τελευταία χρόνια, η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός των μορίων και των οδών που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου έχει θέσει τα θεμέλια για την ανάπτυξη νέων διαγνωστικών εργαλείων και μοριακών θεραπευτικών τεχνικών, με απώτερο σκοπό την αντιμετώπιση των συμπαγών νεοπλασμάτων και των αιματολογικών κακοηθειών (129,130).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η παρούσα μελέτη έχει σαν στόχο τη διερεύνηση του ρόλου της απόπτωσης στην Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (ΟΛΛ) των παιδιών και τη συσχέτισή της με την επιθετικότητα της νόσου, την ανταπόκριση στη θεραπεία και την πορεία-έκβασή της.

Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης δύο βασικών γονιδίων που σχετίζονται με την απόπτωση, του bcl-2 και του bax, τόσο ξεχωριστά όσο και ως λόγος bax/bcl-2. Επιπλέον, αξιολογήθηκαν τα επίπεδα του πρωτεϊνικού υποδοχέα Fas και του συνδέτη του FasL, καθώς επίσης και η συνέκφρασή τους σε λευχαιμικά κύτταρα παιδιών με ΟΛΛ. Η μελέτη της έκφρασης των παραπάνω μορίων πραγματοποιήθηκε κατά τη διάγνωση, αλλά και σε διάφορα στάδια της θεραπείας (ύφεση την ημέρα 33, τέλος της θεραπείας). Τέλος, διερευνήθηκαν πιθανές συσχετίσεις των επιπέδων έκφρασης με την ανταπόκριση στη θεραπεία, καθώς και με ήδη γνωστές προγνωστικές παραμέτρους της νόσου, τόσο κλινικές όσο και βιολογικές (ηλικία, αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων, τιμή της αιμοσφαιρίνης, ομάδα κινδύνου), σε μια προσπάθεια να αξιολογηθεί ο ρόλος των υπό μελέτη γονιδίων/πρωτεϊνών ως πιθανών προγνωστικών παραγόντων.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Ασθενείς

Στη μελέτη συμμετείχαν 26 παιδιά (18 αγόρια, 8 κορίτσια) με νεοδιαγνωσθείσα ΟΛΛ (23 Β - σειράς, 3 Τ - σειράς). Η διάμεση ηλικία τους κατά τη διάγνωση ήταν 4.2 έτη (1.2-18 έτη), η διάμεση τιμή της συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης ήταν 8.15 g/dl (4.4-15.4 g/dl) και ο διάμεσος αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων ήταν 9.15 K/μl (0.7-247 K/μl).

Τα χαρακτηριστικά των ασθενών παραθέτονται στους **Πίνακες 3 και 4**. Όλοι οι ασθενείς διαγνώσθηκαν, υποβλήθηκαν σε θεραπεία και παρακολούθηθηκαν στο Τμήμα Παιδιατρικής Αιματολογίας-Ογκολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης.

Ως μάρτυρες μελετήθηκαν 34 παιδιά αντίστοιχης ηλικίας, εκ των οποίων 20 είχαν διαγνωσθεί με καλοήθεις αιματολογικές παθήσεις (12 με Ανοσολογικής Αρχής Θρομβοπενία και 8 με Αυτοάνοση Ουδετεροπενία), και 14 με Συμπαγείς Όγκους χωρίς διήθηση του μυελού των οστών.

Οι παιδιατρικοί ασθενείς με ΟΛΛ έλαβαν χημειοθεραπεία με βάση το Πρωτόκολλο ALL-BFM Berlin-Frankfurt-Munster του 2000 (**Σχήμα 2**). Σύμφωνα με τα κριτήρια του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου, 12 ασθενείς ταξινομήθηκαν στην ομάδα Υψηλού Κινδύνου (High Risk/HR), ενώ 14 χαρακτηρίστηκαν ως ασθενείς Ενδιάμεσου Κινδύνου (Median Risk/MR).

Δείγματα μυελού των οστών ελήφθησαν από όλους τους ασθενείς, μετά από έγγραφη συγκατάθεση των γονέων/κηδεμόνων τους.

Οι κυτταρογενετικές ανωμαλίες εξετάστηκαν με συμβατικό καρυότυπο και με τη μέθοδο FISH (Fluorescence In Situ Hybridization). Η ύφεση αξιολογήθηκε, τόσο από την επισκόπηση των επιχρισμάτων του μυελού των οστών στο μικροσκόπιο, όσο και με κυτταρομετρία ροής.

Πίνακας 3. Χαρακτηριστικά των ασθενών

A/a	ΦΥΛΟ	ΤΥΠΟΣ	ΗΛΙΚΙΑ (έτη)	WBC (Dx) (K/μl)	Hb (Dx) (g/dl)	DNA INDEX	ΚΥΤΤΑΡΟ ΓΕΝΕΤΙΚΑ	ΟΜΑΔΑ ΚΙΝΑΥΝΟΥ
1	♀	B common	2.5	0.7	8		t(12;21)(p13;q22)	Μεσαίου
2	♂	B common	5.4	27.2	10.4			Μεσαίου
3	♂	T	12	9.2	15.4			Μεσαίου
4	♂	Pre-B	1.2	7.7	7.8	1		Μεσαίου
5	♀	Pre-B	2.5	15.2	8.2	1	t(12;21)(p13;q22)	Μεσαίου
6	♂	B common	18	5.7	11.1			Υψηλού
7	♀	Pre-B	9	98.6	12	1		Υψηλού
8	♂	Pre-B	17.5	133.1	13.6	1	del(9p21)x2	Υψηλού
9	♂	B common	1.8	1.4	11.3		υπερδιπλοειδία	Μεσαίου
10	♂	B common	4	1.6	7.3		t(12;21)(p13;q22), del(21q22)	Μεσαίου
11	♂	Pre-B	1.6	15.2	6.9	1.35	υπερδιπλοειδία del(9p21)x2	Μεσαίου
12	♂	B common	3	8.2	11.4	1		Μεσαίου
13	♂	Pre-B	4.5	3.5	6		t(4;11)	Υψηλού
14	♀	Pre-B	1.8	13.4	4.4		υπερδιπλοειδία	Μεσαίου
15	♀	B common	5.5	4.7	6.3			Μεσαίου
16	♂	Pre-B	18	11.7	7.1	1		Μεσαίου
17	♂	T	9	247	15.4		del(9p21), μονοσωμία 9	Υψηλού
18	♂	T	15.5	25.1	10.9			Μεσαίου
19	♂	B common	13	3.6	9.7	0.94		Μεσαίου
20	♂	B common	1.6	10.4	5.4	1.25	υπερδιπλοειδία	Μεσαίου
21	♂	B common	17.3	4.6	5.8	1.01	del(9p21)	Υψηλού
22	♀	B common	3.8	8.1	10	1.17	υπερδιπλοειδία (τρισωμία 21, τρισωμία 22, σύμπλοκος καρύοτυπος)	Υψηλού
23	♂	Pre-B	2.5	9.1	8.1	1.26	υπερδιπλοειδία	Υψηλού
24	♂	Pre-B	3.7	33.6	6.1	1	t(12;21)(p13;q22)	Μεσαίου
25	♀	Pre-B	2.8	10.6	9.9	1.22	υπερδιπλοειδία (τρισωμία 9)	Μεσαίου
26	♀	B common	7.3	4.5	7.7	1.01	t(9;22)(q34;q11)	Υψηλού

Dx: διάγνωση

Πίνακας 4. Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ΟΛΛ

Αριθμός ασθενών	26 ¹
Ηλικία (έτη)	7.1 ± 1.2
Φύλο (♀/♂)	8/18
ΟΛΛ τύπος (B/T)	23/3
WBC (K/μL)	27.5 ± 10.6
Hb (g/dL)	9.1 ± 0.6
Κυτταρογενετικά	
• Υπερδιπλοειδία (αριθμός ασθενών)	7
• t(12;21) (αριθμός ασθενών)	4
• del(9p21) (αριθμός ασθενών)	4
• Άλλες ανωμαλίες	5
Ομάδα κινδύνου (Ενδιάμεσου/Υψηλού)	17/9

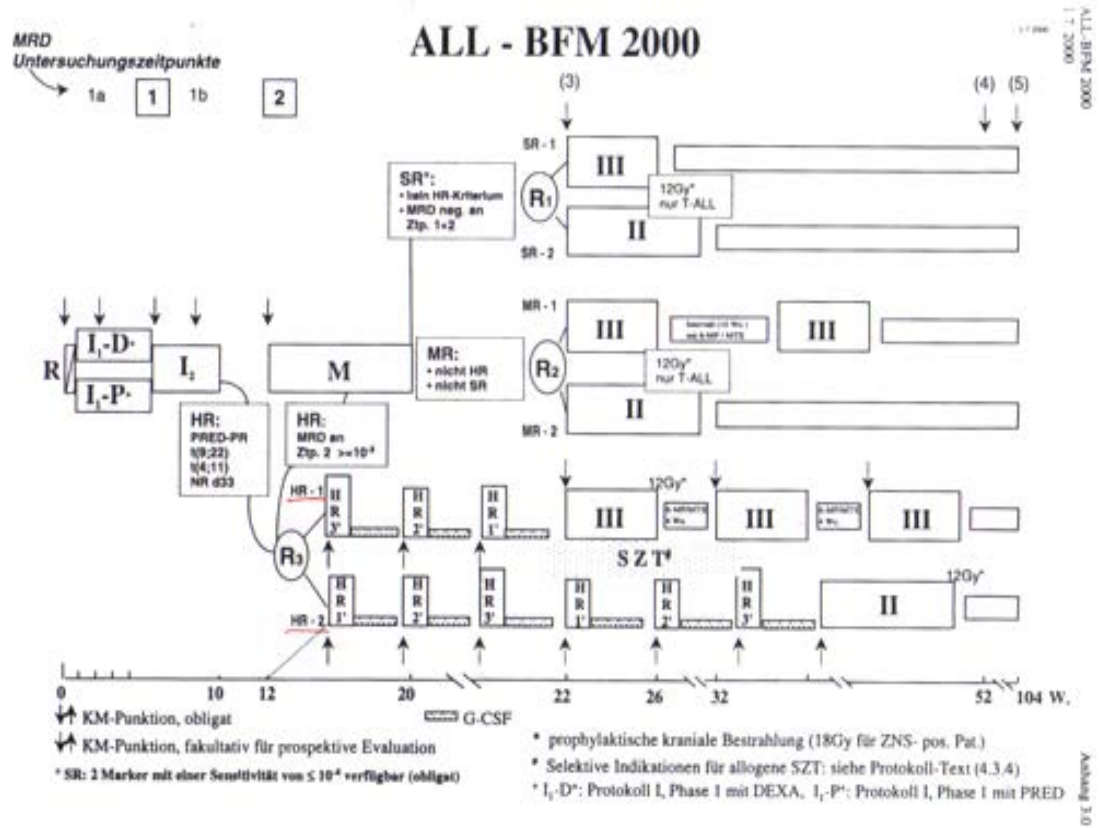
¹ τα δεδομένα παρουσιάζονται ως N or mean ± SE

WBC: αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων

Hb: αιμοσφαιρίνη

ΟΛΛ: Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία

Σχήμα 2. Πρωτόκολλο ALL-BFM 2000



Μέθοδοι

Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων

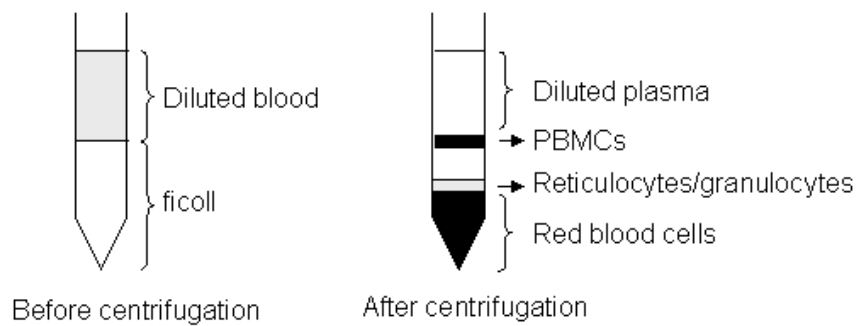
Τα μονοπύρηνια κύτταρα (MNCs) απομονώθηκαν από το μυελό των οστών των ασθενών στη διάγνωση, καθώς και σε διαφορετικά στάδια της θεραπείας (ύφεση την ημέρα 33, τέλος της θεραπείας). Αποτελούνταν σχεδόν αποκλειστικά από βλάστες, λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι κατά τη διάγνωση της λευχαιμίας το ποσοστό διήθησης του μυελού των οστών ήταν μεγαλύτερο από 90%.

Ο μυελός των οστών (ποσότητα περίπου 2 ml) συλλέχθηκε σε αποστειρωμένο σωληνάριο 15 ml στο οποίο είχαν προστεθεί 5 ml IMDM II και 20 μl ηπαρίνης περιεκτικότητας 1000 μονάδων/ml.

Η διαδικασία της απομόνωσης των μονοπύρηνων κυττάρων περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

- Καλή ανάδευση με σύριγγα 19G (5-6 φορές).
- Επίστρωση του (αραιωμένου) μυελού σε φικόλη (Ficoll Hypaque - Lymphoprep-Nycomed d=1077 g/ml). Ο όγκος της φικόλης πρέπει να είναι ο ίδιος με τον όγκο του επιστρωθέντος υλικού.
- Φυγοκέντρηση σε 1800 rpm για 30 λεπτά (brake off), με την οποία επιτυγχάνεται ο σχηματισμός λευκής στιβάδας (στιβάδα μονοπυρήνων).
- Λήψη της στιβάδας των μονοπυρήνων και διάλυσή της σε 5 ml RPMI(f), αν η στιβάδα είναι μικρή [σε 10 ml RPMI (f), αν η στιβάδα είναι μεγάλη].
- Νέα φυγοκέντρηση σε 1600 rpm για 10 λεπτά.
- Απόρριψη του υπερκείμενου υγρού. Μ' αυτόν τον τρόπο σχηματίζεται παχύρρευστη κυτταρική στιβάδα (πελέτα).
- Προσθήκη 10 ml RPMI(f) και ήπια ανάδευση με σύριγγα 19G.
- Λήψη δείγματος 10 μl για μέτρηση των κυττάρων.

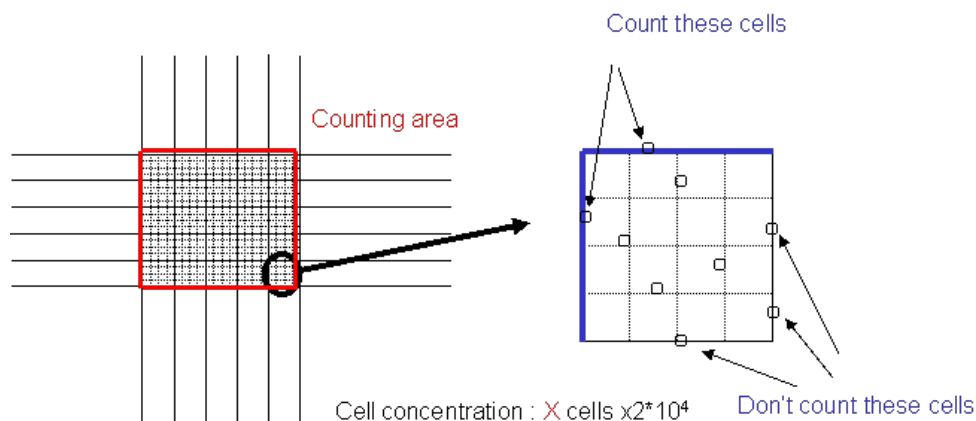
- Φυγοκέντρηση στις 1600 rpm για 10 λεπτά.
- Απόρριψη του υπερκείμενου υγρού και λήψη εκ νέου της κυτταρικής στιβάδας (πελέτας).
- Διάλυση της κυτταρικής στιβάδας (πελέτας) σε τόση ποσότητα RPMI(f), ώστε η αναλογία κυττάρων να είναι 2×10^6 κύτταρα ανά 1ml RPMI(f).
- Αποθήκευση των κυττάρων στους -80°C .



Ποσοτική μέτρηση των μονοπύρηνων κυττάρων

Για την ποσοτική μέτρηση των μονοπύρηνων κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η πλάκα Neubauer.

- Ελήφθησαν 10 μl από τη διαλυμένη κυτταρική στιβάδα και τοποθετήθηκαν σε σωληνάριο erpendorf 1,5 ml.
- Προστέθηκαν 10 μl μπλε χρωστικής Tripan blue (αραίωση 1:1). Αν υπάρχει πρόσμιξη RBCs, προσθέτω οξικό οξύ (40 μl), προκειμένου να καταστραφούν τα RBCs (σε αυτή την περίπτωση η αραίωση είναι 1:5).
- Η χρωστική προσλαμβάνεται από τα νεκρά κύτταρα, ενώ τα ζωντανά κύτταρα παραμένουν άχρωμα.
- Το δείγμα τοποθετήθηκε στην πλάκα Neubauer και καλύφθηκε με καλυπτρίδα.
- Στη συνέχεια έγινε μικροσκόπηση της πλάκας και προσμετρήθηκαν τα ζωντανά κύτταρα στα 25 μεγάλα τετράγωνα της πλάκας Neubauer.
- Ο τελικός αριθμητικός τύπος υπολογισμού των κυττάρων είναι ο εξής: αριθμός κυττάρων που προσμετρήθηκαν $\times 2 \times 10^4$.



Κατάψυξη μονοπύρηνων κυττάρων

Η κατάψυξη των μονοπύρηνων κυττάρων πραγματοποιήθηκε με την ακόλουθη διαδικασία:

- Τοποθέτηση 3×10^6 κυττάρων σε cryovial του 1ml.
- Φυγοκέντρηση στις 1600 στροφές για 10 λεπτά.
- Απόρριψη υπερκείμενου υγρού.
- Προσθήκη 1ml κρυοπροστατευτικού διαλύματος (90% FBS + 10% DMSO) ανά 3×10^6 κύτταρα.
- Φύλαξη στους -80°C .

Απομόνωση RNA

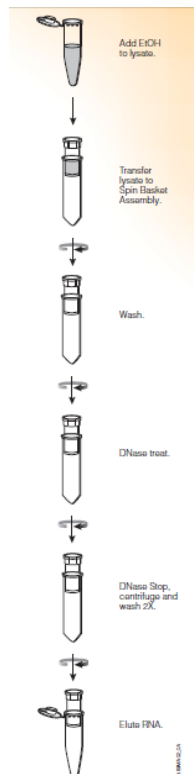
Το RNA απομονώθηκε από κατεψυγμένα κύτταρα με SV Total RNA Isolation kit (Promega, Madison, WI, USA). Το kit περιλάμβανε τα εξής αντιδραστήρια:

1. Spin Column Assemblies and Elution Tubes
2. RNA Lysis Buffer
3. RNA Dilution Buffer
4. β -Mercaptoethanol 48,7% (αδρανοποίηση RNases, οπότε εξασφαλίζεται απομόνωση ακέραιου RNA)
5. DNase I (lyophilized)
6. MnCl_2 0.09M
7. Yellow Core Buffer
8. DNase Stop Solution
9. RNA Wash Solution
10. Nuclease-Free Water

Τα στάδια της απομόνωσης RNA είναι τα ακόλουθα:

- Απόψυξη σταδιακή των eppendorfs με τα κατεψυγμένα μονοκύτταρα (η απόψυξη γίνεται σε δοχείο με πάγο).
- Μεταφορά του διαλύματος από το eppendorf σε ένα μεγαλύτερο σωλήνα falkon και προσθήκη 4 ml αποστειρωμένου PBS.
- Φυγοκέντρηση στις 1800 rpm για 10 λεπτά και σχηματισμός πελέτας.
- Απόρριψη του υπερκείμενου υγρού.
- Προσθήκη 175μl SV RNA Lysis Buffer και ανάδευση με την πιπέτα (λύση των κυττάρων).
- Προσθήκη 350μl RNA Dilution Buffer και ανάδευση με ανακίνηση (3-4 φορές).
- Θέρμανση στους 70⁰C για 3 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση σε 12.000-14.000 x g για 10 λεπτά.
- Μεταφορά του υπερκείμενου υγρού σε σωληνάριο.
- Προσθήκη 200μl αιθανόλης 95% και ανάδευση με την πιπέτα (3-4 φορές).
- Μεταφορά σε Spin Column Assembly, το οποίο αποτελείται από ένα Spin Basket και ένα Collection Tube.
- Φυγοκέντρηση σε 12.000-14.000 x g για 1 λεπτό.
- Απόρριψη του υγρού από το Collection Tube και διατήρηση του Spin Basket (το RNA συγκρατείται στη μεμβράνη του Spin Basket).
- Προσθήκη 600μl RNA Wash Solution.
- Φυγοκέντρηση σε 12.000-14.000 x g για 1 λεπτό.
- Απόρριψη του υγρού από το Collection Tube και διατήρηση του Spin Basket.
- Προσθήκη 50 μl μίγματος (40μl Yellow Core Buffer, 5μl MnCl₂ 0.09M, 5μl DNase I) απευθείας πάνω στη μεμβράνη του Spin Basket (απομάκρυνση τυχόν συνυπάρχοντος DNA).
- Επώαση στους 20-25⁰C για 30-40 λεπτά.
- Προσθήκη 200μl DNase Stop Solution στο Spin Basket.
- Φυγοκέντρηση σε 12.000-14.000 x g για 1 λεπτό.

- Προσθήκη 600μl RNA Wash Solution.
- Φυγοκέντρηση σε 12.000-14.000 x g για 1 λεπτό.
- Απόρριψη του περιεχομένου από το Collection Tube.
- Προσθήκη 250μl RNA Wash Solution.
- Φυγοκέντρηση σε 17.000 x g για 2 λεπτά.
- Απομάκρυνση του πώματος από το Spin Basket.
- Μεταφορά του Spin Basket από το Collection Tube στο Elution Tube.
- Προσθήκη 100μl Nuclease Free Water στη μεμβράνη του Spin Basket.
- Φυγοκέντρηση σε 12.000-14.000 x g για 1 λεπτό.
- Απόρριψη του Spin Basket
- Το RNA έχει συλλεχθεί στο Elution Tube.
- Αποθήκευση στους -70°C



Ακολούθησε η ποσοτικοποίηση του RNA, η οποία έγινε με τη χρήση φασματοφωτόμετρου και με βάση τον τύπο:

ένδειξη φωτόμετρου x σταθερά διάλυσης x 40 = RNA μ g/ml, όπου

1) ένδειξη φωτόμετρου = 260 nm

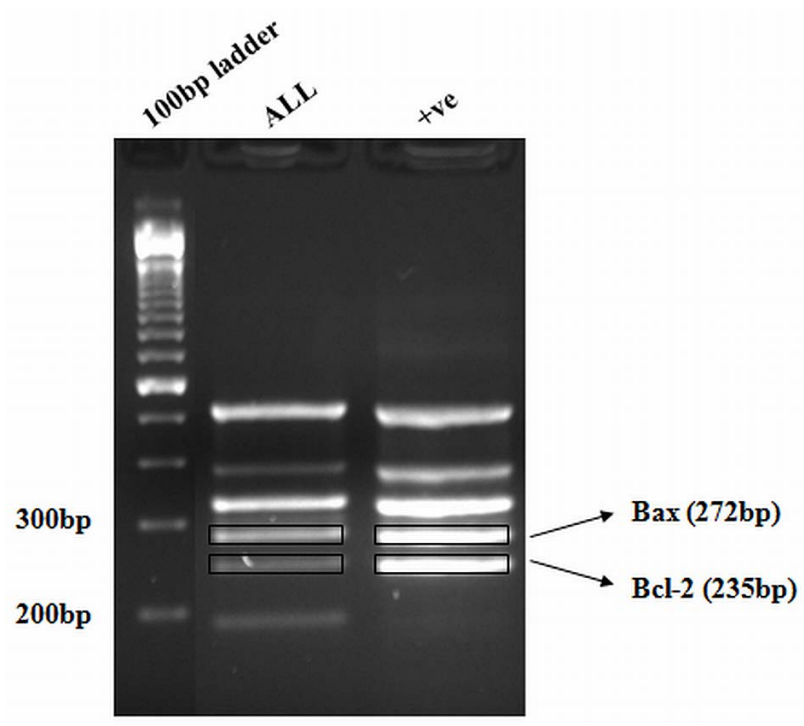
2) σταθερά διάλυσης = 100 (διαλύω 4 μ l RNA σε 400 μ l Water for Injection)

3) η απορρόφηση 1 μονάδος (A260) αντιστοιχεί σε 40 μ g single-stranded RNA/ml

Η ποιότητα του απομονωθέντος RNA αξιολογήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% , αφού είχε προηγηθεί η σύνθεση cDNA.

Το πήκτωμα σχηματίζεται σε υδατικό μέσο που περιέχει 1xTBE ρυθμιστικό διάλυμα (10.8 g/l Tris pH 8.0, 0.002 EDTA). Ο σχηματισμός του πηκτώματος επιτυγχάνεται με στερεοποίηση της αγαρόζης με την πτώση της θερμοκρασίας, αφού έχει προηγηθεί τήξη με βρασμό και έχει προστεθεί και βρωμιούχο αιθίδιο. Το δείγμα cDNA που πρόκειται να ηλεκτροφορηθεί επαναιωρείται σε διάλυμα φόρτωσης που περιέχει 0.25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0.25% κυανό του ξυλενίου και 25% φικόλη (**Εικόνα 12**).

Εικόνα 12. Παράδειγμα ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης σε ένα από τα δείγματα της μελέτης.



Σύνθεση cDNA

Από κάθε δείγμα, 0,5 µg RNA χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση cDNA με το kit IM-PROM Reverse Transcription System (Promega). Το kit περιλάμβανε τα εξής αντιδραστήρια:

- ImProm-II™ Reverse Transcriptase
- ImProm-II™ 5X Reaction Buffer
- MgCl₂ 25mM
- dNTP Mix
- Oligo(dT)15 Primer
- 1.2kb Kanamycin Positive Control RNA
- Nuclease-Free Water
- Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor

Τα στάδια της σύνθεσης cDNA είναι τα ακόλουθα:

- 0.5 µg ολικού RNA αναμείχθηκε με 1 µL Oligo(dT) [χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές].
- Θέρμανση του μίγματος στους 70⁰C για 5 λεπτά και, εν συνεχεία, τοποθέτηση στον πάγο για 5 λεπτά.
- Προσθήκη 10.5 µL μίγματος που αποτελούνταν από 4 µL ImProm-II™ 5X Reaction Buffer, 4 µL 25mM MgCl₂, 1 µL dNTP Mix, 0.5 µL Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor και 15 units ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης ImProm-II™ Reverse Transcriptase.
- Επώαση στους 25⁰C για 5 λεπτά και εν συνεχεία στους 42⁰C για 60 λεπτά.
- Επώαση στους 70⁰C για 15 λεπτά, προκειμένου να απενεργοποιηθεί το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση.
- Φύλαξη του cDNA στους -20⁰C.

Ποσοτική Real-Time PCR

Αρχή της μεθόδου

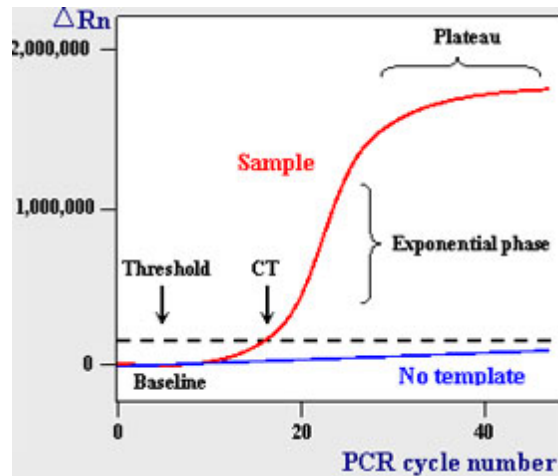
Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια τεχνική, η οποία επιτρέπει τη λογαριθμική ενζυμική ενίσχυση μικρών αλληλουχιών DNA (100-600 bp), χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ένα μεγαλύτερο δίκλωνο μόριο DNA. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται δύο εκκινητές (primers), καθένας από τους οποίους είναι συμπληρωματικός προς μια συγκεκριμένη αλληλουχία μιας εκ των δύο αλυσίδων του DNA. Η αλληλουχία των εκκινητών επιμηκύνεται μέσω της DNA πολυμεράσης, με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή αντιγράφων της επιθυμητής αλληλουχίας. Οι εκκινητές επαναχρησιμοποιούνται πολλές φορές για την περαιτέρω ενίσχυση της συγκεκριμένης αλληλουχίας από τα ήδη υπάρχοντα αντίγραφα, με αποτέλεσμα τη λογαριθμική αύξηση των αντιγράφων. Σε κάθε κύκλο της διαδικασίας ενίσχυσης, οι δύο κλώνοι της αλληλουχίας του DNA αποδιατάσσονται μέσω αύξησης της θερμοκρασίας. Ακολουθεί μείωση της θερμοκρασίας για την πρόσδεση των εκκινητών και σύνθεση της αλληλουχίας μέσω της DNA πολυμεράσης.

Η ποσοτική PCR (Quantitative PCR, QPCR) είναι μια γρήγορη, αξιόπιστη και ευαίσθητη μέθοδος, η οποία επιτρέπει την ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων αλληλουχιών-στόχων. Υπάρχουν δύο είδη ποσοτικής PCR: η τελικού σημείου (end-point) και η πραγματικού χρόνου (Real-Time) PCR. Στην end-point PCR ο υπολογισμός του προϊόντος πραγματοποιείται στο τέλος της αντίδρασης, με εμφανές μειονέκτημα τη μείωση της αποδοτικότητας της αντίδρασης, λόγω της κατανάλωσης των αντιδρώντων και της συσσώρευσης αναστολέων, κάτι που δυσχεραίνει την αξιόπιστη ποσοτικοποίηση. Αντίθετα, στη Real-Time PCR, η μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος πραγματοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω

της παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, ο φθορισμός μετρείται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), γεγονός που επιτρέπει στον ερευνητή να παρακολουθεί όλη τη διαδικασία της αντίδρασης. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος.

Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε τρεις φάσεις: την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση κορεσμού. Κατά την εκθετική φάση (exponential phase), σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται ακριβής διπλασιασμός του προϊόντος, καθώς όλα τα απαραίτητα για την PCR συστατικά (π.χ. dNTPs, εκκινητές, πολυμεράση) βρίσκονται σε περίσσεια (100% αποδοτικότητα). Καθώς συνεχίζεται η αντίδραση, επέρχεται η γραμμική φάση, κατά την οποία κάποια από τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται, ενώ παράλληλα συσσωρεύονται, σταδιακά, αναστολές. Στη συγκεκριμένη φάση, η αντίδραση της ενίσχυσης επιβραδύνεται, καθώς μειώνεται η αποδοτικότητά της και τελικά σταματάει εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau). Το σημείο κορεσμού διαφέρει μεταξύ των δειγμάτων και εξαρτάται από τις κινητικές των αντιδράσεών τους.

Οι μετρήσεις για την ποσοτικοποίηση αφορούν την εκθετική φάση της αντίδρασης. Σημαντική παράμετρο για την ποσοτικοποίηση αποτελεί η τιμή Ct (threshold cycle). Πρόκειται για τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που απαιτούνται, ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold). Η τιμή του ορίου αυτού ορίζεται πάνω από την αντίστοιχη του μη-ειδικού σήματος (background). Η τιμή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος: όσο μικρότερη είναι η τιμή Ct τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος (131,132) (**Σχήμα 3**).

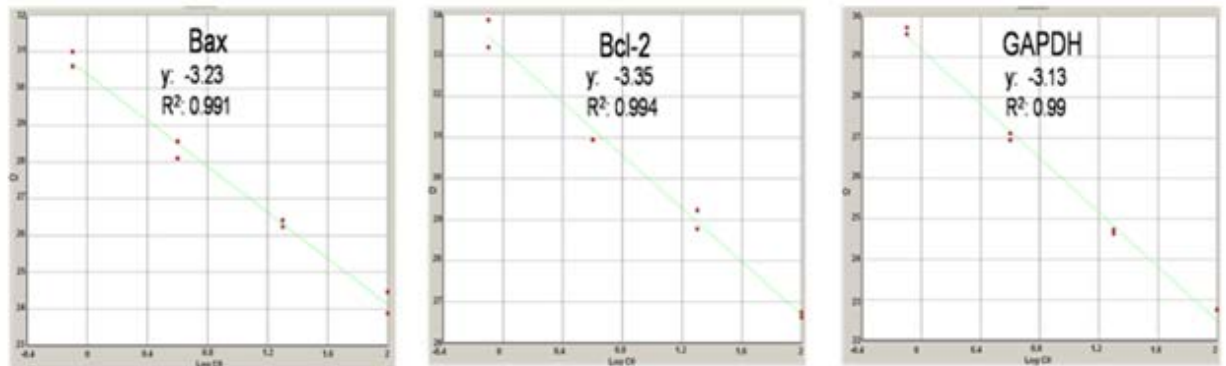


Σχήμα 3. Χαρακτηριστική καμπύλη ενίσχυσης, όπου διακρίνονται η εκθετική, η γραμμική και η φάση κορεσμού. Το όριο φθορισμού που τίθεται για τον προσδιορισμό της τιμής Ct, ορίζεται έτσι ώστε να βρίσκεται πάνω από το επίπεδο ‘θορύβου’ (baseline) και στην αρχή της εκθετικής φάσης. Στον οριζόντιο άξονα παριστάνεται ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης, ενώ στον κατακόρυφο η τιμή των επιπέδων φθορισμού.

Για την αξιολόγηση της έκφρασης των γονιδίων *bax* και *bcl-2* σε κάθε δείγμα, έγινε παράλληλα Real Time PCR για τα δύο αυτά γονίδια και το γονίδιο Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), σε 96-well plates. Το GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας, προκειμένου να κανονικοποιηθούν τα επίπεδα της έκφρασης των *bax* και *bcl-2*. Ένα διάγραμμα των Ct σε συνάρτηση του log χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων, με σύγκριση με μια πρότυπο καμπύλη, προερχόμενη από 4-διαδοχικές αραιώσεις του cDNA μιας κυτταρικής σειράς (HL-60) που χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς. Για κάθε δείγμα, όπου αναλύθηκε ο λόγος *bax*/GAPDH ή *bcl-2*/GAPDH, οι αντιδράσεις έγιναν σε duplicates. Τα αντιδραστήρια για 20μl αντίδρασης περιλάμβαναν 1x Quantitect SYBR Green mix (QIAGEN, Hilden, Germany), 1x Quantitect Primer (*bax* QT00997381, *bcl-2* QT00025011, GAPDH QT01192646 από την QIAGEN) και 1.2μl cDNA. Όλες οι αντιδράσεις έγιναν στο Σύστημα

ανίχνευσης ακολουθίας ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Οι θερμικές συνθήκες περιλάμβαναν ένα στάδιο hot start στους 95°C επί 15 λεπτά, ακολουθούμενο από 40 κύκλους στους 95°C για 15 δευτερόλεπτα, 55°C για 30 δευτερόλεπτα και 72°C για 30 δευτερόλεπτα (Σχήμα 4).

Σχήμα 4. Καμπύλες Real-Time PCR για τα γονίδια *bax*, *bcl-2* και GAPDH στην κυτταρική σειρά HL-60.



Κυτταρομετρία ροής

Αρχές της μεθόδου

Η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιείται για την ανάλυση φαινοτυπικών ιδιοτήτων κυττάρων που έχουν κοινά χαρακτηριστικά, όπως το μέγεθος, ο όγκος, η κοκκίωση, το pH και το ηλεκτρικό τους δυναμικό (φυσικοχημικά χαρακτηριστικά). Η αρχή λειτουργίας του κυτταρομετρητή ροής έχει ως εξής: τα κύτταρα τα οποία είναι συνδεδεμένα με ένα φθορίζον μόριο (χρωμοφόρο) διέρχονται ένα προς ένα μέσα από μία ακτίνα φωτός, συνήθως ένα laser, οπότε τα ηλεκτρόνια του χρωμοφόρου διεγείρονται και εν συνεχεία αποδιεγείρονται καθώς επιστρέφουν στα τροχιακά της θεμελιώδους κατάστασης. Το φως που σκεδάζεται από τα κύτταρα ή εκπέμπεται από τα διάφορα χρωμοφόρα κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, παρέχει κύματα που κατευθύνονται, διερχόμενα μέσα από ένα ειδικό δίκτυο διχροϊκών κατόπτρων και φίλτρων, σε μία ομάδα φωτοανιχνευτών που μετατρέπουν τα φωτεινά σήματα σε ηλεκτρικές ώσεις, οι οποίες έχουν ένταση ανάλογη με την ένταση των φωτεινών σημάτων που φθάνουν σε αυτούς. Τα ηλεκτρικά σήματα προσλαμβάνονται, καταγράφονται και αναλύονται από ηλεκτρονικό υπολογιστή με κατάλληλο λογισμικό. Η πιο διαδεδομένη χρήση της μεθόδου είναι η ταυτοποίηση επιφανειακών ή ενδοκυττάρων πρωτεϊνών που χρησιμεύει στην αναγνώριση διάφορων κυτταρικών υποτύπων, αλλά και στη μελέτη της διακύμανσης του αριθμού τους ή στη μεταβολή του φαινοτύπου τους σε παθολογικές καταστάσεις. Για τη χρώση των πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται μονοκλωνικά αντισώματα ειδικά για τις υπό μελέτη πρωτεΐνες, τα οποία συζεύγνυνται με κάποιο χρωμοφόρο και ακολουθεί επώαση με το αντίσωμα, παρουσία ξένης πρωτεΐνης [FBS ή λευκωματίνη ορού βοός (bovine serum albumin/BSA)], ικανής να αποτρέψει τη μη ειδική δέσμευση του αντισώματος. Εν συνεχεία, και κατόπιν

μονιμοποίησης των κυττάρων με PFA, αυτά διέρχονται από τον κυτταρομετρητή και αναλύονται με βάση τις αρχές που περιγράφηκαν παραπάνω.

Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής

Για την ανάλυση της κυτταρομετρίας ροής, μη πηγμένος ολικός μυελός των οστών μεταφέρθηκε σε σωληνάρια πολυστερίνης 12x75 mm, με στρογγυλή βάση (55.476.005, Sarstedt) και επώασθη με 10μL μονοκλωνικού αντισώματος PC5-anti-CD45 [CD45-PC5 A07785, IOTEST, Beckman Coulter, Brea, CA, USA], 20μl μονοκλωνικού αντισώματος FITC-anti-Fas ισοθειοκυανική φλουοροσκεΐνη (fluorescein isothiocyanate, FITC) [Fas (DX2): sc-52524, FITC, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA, USA] και 20μl μονοκλωνικού αντισώματος PE-anti-Fas-L φυκοερυθρίνη (phycoerythrin, PE) [Fas-L (NOK-1): sc-19681, PE, Santa Cruz Biotechnology, Inc]. Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ελέγχου κεχρωσμένα με PC5-anti-CD45, PE-mouse IgG1(A07796, IOTest, Beckman Coulter) και FITC-mouse IgG1 (A07795, IOTest, Beckman Coulter). Η διαδικασία ήταν η ακόλουθη:

- Επώαση των δειγμάτων για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι.
- Πλύσιμο με PBS (18912-014, Gibco, Invitrogen Corporation) +2% FBSSV (30160.03, Hyclone, Thermo Scientific, Logan, UT, USA) + 5% Sodium Azide (106688, Merck, Darmstadt, Germany) για 5 min στις 2000 rpm.
- Απόρριψη του υπερκείμενου υγρού και λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων με το Immunoprep Reagent System (Beckman Coulter).
- Αποθήκευση των δειγμάτων στους 4°C στο σκοτάδι μέχρι τη μέτρηση.

Τα κύτταρα αναλύθηκαν στον κυτταρομετρητή (Epics Elite; Coulter, Miami, FL) και μετρήθηκε το ποσοστό των κυττάρων που ήταν θετικά ως προς το φθορισμό του μονοκλωνικού αντισώματος που είχε προσδεθεί στη μεμβράνη.

Συγκεκριμένα, έγινε περίφραξη (gate) στον CD45+ πληθυσμό και, στη συνέχεια, η αναγνώριση των λεμφοκυττάρων πραγματοποιήθηκε με βάση τα φυσικά χαρακτηριστικά τους (forward scatter/FSC και side scatter /SSC). Τέλος, καθορίστηκε η έκφραση των Fas, Fas-L, καθώς και η συνέκφρασή τους.

Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη χρήση του λογισμικού SPSS 16.0 (Statistical Package for the Social Sciences). Οι διαφορές στην έκφραση των γονιδίων μεταξύ των ομάδων αξιολογήθηκαν με το μη παραμετρικό Mann-Whitney U test. Υπολογίσθηκαν, επίσης, οι συσχετίσεις με το Spearman's test. Τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικά, όταν η τιμή $p < 0.05$. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (mean \pm SE), εκτός κι αν αυτό ορίζεται διαφορετικά.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Έκφραση των γονιδίων bax και bcl-2 σε παιδιά με Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία και συσχέτιση με κλινικά χαρακτηριστικά.

Οι μελέτες που έχουν διεξαχθεί έως σήμερα έχουν αναδείξει μεγαλύτερη συχνότητα υπερέκφρασης του bcl-2 mRNA και μικρότερη συχνότητα υπερέκφρασης του bax mRNA σε περιπτώσεις ΟΛΛ, καθώς και ότι η έκφραση του μορίου Bcl-2 στους διάφορους τύπους της νόσου ποικίλλει ανάλογα με το στάδιο ωρίμανσης των Β λεμφοκυττάρων του κλώνου. Παρ'όλα αυτά, δεν έχει αποδειχθεί οποιαδήποτε συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση των συγκεκριμένων γονιδίων και τη συνολική επιβίωση των ασθενών.

Στη δική μας μελέτη, μετρήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων bax και bcl-2, καθώς και ο λόγος τους bax/bcl-2, στους λεμφοβλάστες του μυελού των οστών παιδιών με ΟΛΛ, καθώς και στα λεμφομονοπύρρηνα κύτταρα των ομάδων-μαρτύρων.

Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων bax και bcl-2 και του λόγου τους δεν αποδείχθηκε να διαφέρουν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ανάμεσα στους ασθενείς με ΟΛΛ στη διάγνωση και στην ομάδα των μαρτύρων. Παρ'όλα αυτά, τα επίπεδα του bcl-2 ήταν πολύ υψηλότερα στην ομάδα των παιδιών με ΟΛΛ, συγκρινόμενα με την ομάδα των μαρτύρων (ΟΛΛ vs Συμπαγείς Όγκοι: 4.01 ± 2.37 vs 0.55 ± 0.18 , $p=0.129$ / ΟΛΛ vs Κυτταροπενίες: 4.01 ± 2.37 vs 2.74 ± 1.06 , $p=0.629$) (πίνακες 5 και 6).

Οι μετρήσεις στην ομάδα των παιδιών με ΟΛΛ ανέδειξαν υψηλότερη έκφραση του bcl-2 κατά τη διάγνωση, εύρημα που είναι συμβατό με τα αποτελέσματα πολλών ερευνητικών ομάδων. Η παραπάνω παρατήρηση, όμως, δεν είχε στατιστικά σημαντική ισχύ.

Επιπλέον, τα επίπεδα του *bax* κατά τη διάγνωση βρέθηκε ότι συσχετίζονται σε στατιστικά σημαντικό βαθμό με τα επίπεδα του *bcl-2* ($\rho=0.46$, $p=0.001$), αλλά και με το λόγο *bax/bcl-2* ($\rho=0.47$, $p<0.001$).

Τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις των επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων επιχειρήθηκε, εν συνεχεία, να συσχετισθούν με άλλες παραμέτρους των παιδιών με ΟΛΛ (όπως η ηλικία) είτε της νόσου (αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων, επίπεδα αιμοσφαιρίνης, κυτταρογενετικά χαρακτηριστικά του κλώνου).

Δεν αποδείχθηκε κάποια στατιστικά σημαντική σχέση ανάμεσα στην ηλικία των ασθενών ή στα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης κατά τη διάγνωση και την έκφραση των γονιδίων *bax* ή *bcl-2*.

Παρατηρήθηκε, εντούτοις, αρνητική συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των λευκοκυττάρων στη διάγνωση και της έκφρασης του *bcl-2*, συσχέτιση που ήταν στατιστικά σημαντική ($\rho= -0.57$, $p=0.007$). Δεδομένου ότι η πρωτεΐνη *Bcl-2* έχει αντι-αποπτωτική δράση, καθώς και ότι ο αυξημένος αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων στη διάγνωση της ΟΛΛ θεωρείται δυσμενής προγνωστικός παράγοντας για την έκβαση της νόσου, το παραπάνω εύρημα προβάλλει οξύμωρο.

Σύμφωνα με το Πρωτόκολλο ALL-BFM 2000, όπως έχει ήδη αναφερθεί, δώδεκα από τα παιδιά που συμμετείχαν στη μελέτη κατατάχθηκαν στην ομάδα Υψηλού Κινδύνου (High Risk), ενώ τα υπόλοιπα δεκατέσσερα στην ομάδα Ενδιάμεσου Κινδύνου (Median Risk).

Η ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων *bax* και *bcl-2*, καθώς και του λόγου τους *bax/bcl-2*, δεν ανέδειξε καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων κινδύνου.

Το γονίδιο *bcl-2* εκφραζόταν σε υψηλότερα επίπεδα στην ομάδα Υψηλού Κινδύνου, αλλά το εύρημα αυτό δεν ήταν στατιστικά σημαντικό (7.67 ± 5.42 vs 1.27 ± 0.58 , $p=0.247$). Όσον αφορά την έκφραση του γονιδίου *bax*, βρέθηκε αυξημένη στην ομάδα Ενδιάμεσου Κινδύνου, αλλά ούτε αυτό το

εύρημα είχε στατιστικά σημαντική αξία (0.80 ± 0.67 vs 0.67 ± 0.25 , $p=0.277$).

Παρ' όλο που, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, δεν αποδείχθηκε κάποια στατιστικά σημαντική σχέση ανάμεσα στην ηλικία των ασθενών κατά τη διάγνωση και την έκφραση των γονιδίων *bax* ή *bcl-2*, τα αποτελέσματα διέφεραν όταν οι συγκεκριμένες παράμετροι μελετήθηκαν σε κάθε ομάδα κινδύνου ξεχωριστά. Συγκεκριμένα, τα μεγαλύτερα παιδιά (>10 ετών) στην ομάδα Υψηλού Κινδύνου εμφάνισαν υψηλότερες τιμές του λόγου *bax/bcl-2*, συγκρινόμενα με παιδιά μικρότερης ηλικίας (0.71 ± 0.20 versus 0.15 ± 0.24 , $p=0.031$).

Η σύγκριση της έκφρασης των επιπέδων των γονιδίων *bax* και *bcl-2* ανάμεσα στις ομάδες κινδύνου και τους μάρτυρες ανέδειξε κάποια ενδιαφέροντα ευρήματα. Τα παιδιά με ΟΛΛ που ανήκαν στην ομάδα Υψηλού Κινδύνου εξέφραζαν υψηλότερα επίπεδα του *bcl-2* σε σύγκριση με την ομάδα των παιδιών με Συμπαγείς Όγκους (7.67 ± 5.42 vs 0.55 ± 0.17 , $p=0.036$) (**πίνακας 8**), ενώ η έκφραση του *bax* βρέθηκε ασθενέστερη στην ομάδα Ενδιάμεσου Κινδύνου, όταν η τελευταία συγκρίθηκε με την ομάδα των παιδιών με καλοήθεις/αυτοάνοσες κυτταροπενίες (0.8 ± 0.67 vs 1.02 ± 0.27 , $p=0.019$) (**πίνακας 11**).

Ορισμένα από τα αποτελέσματα των μετρήσεων της μελέτης, καθώς και η στατιστική τους ισχύ, παρατείνονται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 5

	Ομάδα Κινδύνου	Διάγνωση ΟΛΛ (mean)	D33 ΟΛΛ (mean)	<i>p</i>
bax	Υψηλού	0.67±0.25	1.65±0.95	0.743
	Ενδιάμεσου	0.8±0.67	1.56±1.19	0.036
bcl-2	Υψηλού	7.67±5.42	1.63±1.0	0.2
	Ενδιάμεσου	1.27±0.58	2.85±2.33	0.872
bax/bcl-2	Υψηλού	0.32±0.12	0.05±0.02	0.019
	Ενδιάμεσου	0.68±0.27	0.58±0.13	0.291

Πίνακας 6

	Διάγνωση ΟΛΛ (mean)	Συμπαγείς Όγκοι (mean)	<i>p</i>
bax	0.75±0.39	0.32±0.11	0.855
bcl-2	4.01±2.37	0.55±0.17	0.129
bax/bcl-2	0.54±0.17	0.45±0.13	0.474

Πίνακας 7

	Διάγνωση ΟΛΛ (mean)	Κυτταροπενίες (mean)	<i>p</i>
bax	0.75±0.39	1.02±0.27	0.055
bcl-2	4.01±2.37	2.74±1.06	0.629
bax/bcl-2	0.54±0.17	0.7±0.32	0.723

Πίνακας 8

	Υψηλού Κινδύνου (mean)	Συμπαγείς Όγκοι (mean)	<i>p</i>
bax	0.67±0.25	0.32±0.11	0.855
bcl-2	7.67±5.42	0.55±0.17	0.036
bax/bcl-2	0.32±0.12	0.45±0.13	0.474

Πίνακας 9

	Υψηλού Κινδύνου (mean)	Κυτταροπενίες (mean)	<i>p</i>
bax	0.67±0.25	1.02±0.27	0.053
bcl-2	7.67±5.42	2.75±1.06	0.294
bax/bcl-2	0.32±0.12	0.7±0.32	0.743

Πίνακας 10

	Ενδιάμεσου Κινδύνου (mean)	Συμπαγείς Όγκοι (mean)	<i>p</i>
bax	0.8±0.67	0.32±0.11	0.56
bcl-2	1.27±0.58	0.55±0.17	0.538
bax/bcl-2	0.68±0.27	0.45±0.13	0.650

Πίνακας 11

	Ενδιάμεσου Κινδύνου (mean)	Κυτταροπενίες (mean)	<i>p</i>
bax	0.8±0.67	1.02±0.27	0.019
bcl-2	1.27±0.58	2.75±1.06	0.289
bax/bcl-2	0.68±0.27	0.7±0.32	0.808

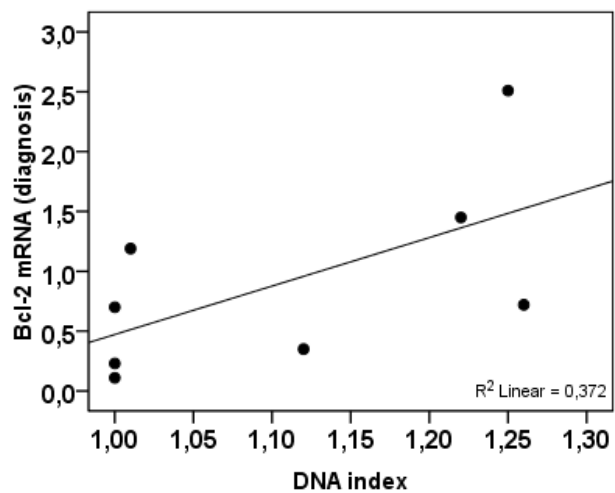
Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων bax και bcl-2 σε παιδιά με Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία κατά τη διάγνωση και συσχέτιση με κυτταρογενετικές ανωμαλίες.

Οι οξείες λευχαιμίες αποτελούν τα καλύτερα μελετημένα νεοπλασματικά νοσήματα από γενετικής άποψης. Τις τελευταίες δεκαετίες έχει σημειωθεί αξιόλογη πρόοδος στην αναγνώριση και ταξινόμηση των μοριακών μεταβολών, η κατανόηση, εντούτοις, του μηχανισμού με τον οποίο αυτές συμβάλλουν στο λευχαιμικό φαινότυπο ή οδηγούν σε αντίσταση στη θεραπεία παραμένει στοιχειώδης. Πρόσφατες μελέτες αρχίζουν να διαλευκάνουν τη διαδικασία της λευχαιμογένεσης και να προσδιορίζουν την πρόγνωση και, σε ορισμένες περιπτώσεις, συνεισφέρουν στην ανάπτυξη της στοχευμένης θεραπείας.

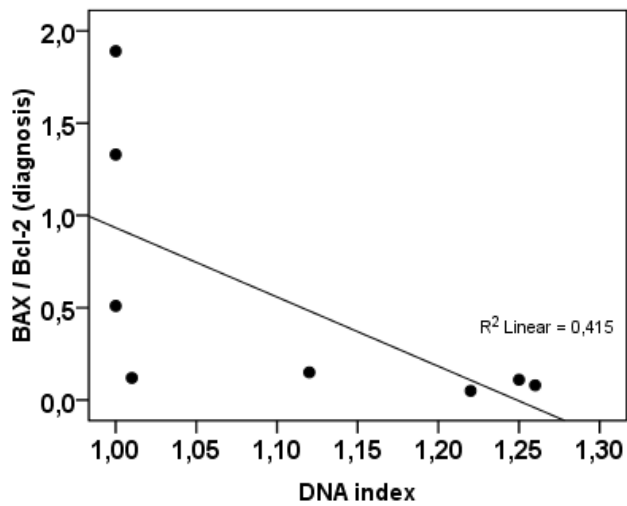
Η έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την απόπτωση διαφέρει μεταξύ των διαφόρων υποομάδων της ΟΛΛ, ανάλογα με το βαθμό διαφοροποίησης του κυττάρου προέλευσης της νόσου και τα κυτταρογενετικά χαρακτηριστικά του κλώνου.

Η υπερδιπλοειδία, όπως ορίζεται ο αριθμός χρωμοσωμάτων >50 ή ο δείκτης DNA index ≥ 1.16 , έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται με ευνοϊκή έκβαση της νόσου. Στη συγκεκριμένη μελέτη, παρατηρήθηκε ότι η παράμετρος DNA index ≥ 1.16 συσχετίζεται με υψηλότερα επίπεδα του αντι-αποπτωτικού γονιδίου bcl-2 στη διάγνωση ($\rho=0.71$, $p=0.05$). Σε αντιστοιχία με το εύρημα αυτό, ο DNA index παρουσίασε αρνητική συσχέτιση με το λόγο bax/bcl-2 ($\rho= -0.88$, $p=0.004$) (Σχήματα 5,6).

Σχήμα 5. Συσχέτιση μεταξύ του Bcl-2 mRNA στη διάγνωση και του DNA index



Σχήμα 6. Συσχέτιση μεταξύ του λόγου Bax/Bcl-2 στη διάγνωση και του DNA index



Όσον αφορά τη συσχέτιση με κυτταρογενετικές ανωμαλίες του κλώνου, η διαμετάθεση t(12;21)(p13;q22) απαντάται στο 15%-35% των περιπτώσεων παιδιατρικής ΟΛΛ, και αποτελεί την πιο συχνή χρωμοσωμική ανωμαλία. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία ενός χμαιρικού γονιδίου TEL-AML1 (ETV6-RUNX1), το οποίο με τη σειρά του θα κωδικοποιήσει την ομώνυμη πρωτεΐνη. Η πρόγνωση των ασθενών της συγκεκριμένης ομάδας είναι ευνοϊκή. Στη δική μας μελέτη, η αναδιάταξη t(12;21)(p13;q22), την οποία έφεραν 4 από τα 26 εξεταζόμενα παιδιά (ποσοστό 15.4%), συσχετίστηκε με υψηλότερο λόγο bax/bcl-2 (1.45 ± 0.23 versus 0.46 ± 0.30 , $p=0.030$), εύρημα που συνηγορεί υπέρ αυξημένης αποπτωτικής δραστηριότητας.

Οι ελλείψεις που αφορούν τη χρωμοσωμική ζώνη 9p21 [del(9p)] έχουν περιγραφεί στην ΟΛΛ. Οι ασθενείς με τη χρωμοσωμική ανωμαλία del(9p) δεν αποτελούν ξεχωριστή διαγνωστική και προγνωστική κατηγορία στην ταξινόμηση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (2008), δεδομένο που δεν αποκλείεται να αλλάξει τα επόμενα χρόνια.

Η έλλειψη στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 9 (del 9p), εν αντιθέσει με την αναδιάταξη t(12;21)(p13;q22), την οποία ανέδειξε ο κυτταρογενετικός έλεγχος 4 παιδιών, δε φάνηκε να συσχετίζεται σε στατιστικά σημαντικό βαθμό με καμία από τις παραμέτρους bax, bcl-2 ή λόγος bax/bcl-2. Παρατηρήθηκε, παρ'όλα αυτά, ότι τα παιδιά με del 9p εξέφραζαν υψηλότερα επίπεδα bax στη διάγνωση, αλλά και μεγαλύτερο λόγο bax/bcl-2 στην ύφεση μετά τη χημειοθεραπεία εφόδου.

Έκφραση των γονιδίων bax και bcl-2 σε παιδιά με Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία στην ύφεση μετά τη θεραπεία εφόδου.

Η μέτρηση των bax και bcl-2 στα μονοπύρρηνα κύτταρα του μυελού των οστών πραγματοποιήθηκε και κατά την ύφεση (ημέρα 33 μετά τη θεραπεία εφόδου). Ο στόχος ήταν να μελετηθούν οι διακυμάνσεις στην έκφραση των συγκεκριμένων μορίων και να συσχετισθούν με την ανταπόκριση στη θεραπεία και την πορεία-έκβαση των ασθενών με ΟΛΛ.

Τα επίπεδα έκφρασης του bax βρέθηκαν υψηλότερα στην ύφεση, σε σχέση με την ημέρα της διάγνωσης, ενώ η έκφραση του bcl-2 ήταν μειωμένη. Τα ευρήματα αυτά, όμως, δεν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά.

Η ανάλυση και η επεξεργασία των μετρήσεων στις επιμέρους ομάδες κινδύνου οδήγησε σε περισσότερο ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις.

Στην ομάδα Υψηλού Κινδύνου παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση του bax, καθώς και ελαττωμένη έκφραση του bcl-2 στην ύφεση (ημέρα 33 μετά τη χημειοθεραπεία), αν και τα συγκεκριμένα ευρήματα δεν ήταν στατιστικώς σημαντικά.

Ο λόγος bax/bcl-2 βρέθηκε σημαντικά μικρότερος στην ύφεση, συγκριτικά με τη διάγνωση, στην ομάδα Υψηλού Κινδύνου (0.05 ± 0.02 versus 0.32 ± 0.12 , $p=0.019$). Οι ασθενείς της ομάδας Υψηλού Κινδύνου, κατ' αντιστοιχία, εμφάνισαν χαμηλότερα επίπεδα του λόγου bax/bcl-2 στην ύφεση, συγκρινόμενοι με εκείνους της ομάδας Ενδιάμεσου Κινδύνου (0.05 ± 0.02 versus 0.58 ± 0.13 , $p=0.009$). Τα ευρήματα αυτά μπορούν να ερμηνευθούν βασιζόμενα στη γνώση ότι το μόριο Bax προάγει την αποπτωτική διαδικασία. Η έκφραση των σχετιζόμενων με την απόπτωση γονιδίων μετά την επίτευξη της ύφεσης, όπως προκύπτει από τη συγκεκριμένη μελέτη, συσχετίζεται και με συγκεκριμένα κυτταρογενετικά ευρήματα. Πρώτα από όλα, αρνητική συσχέτιση παρατηρήθηκε ανάμεσα στο προ-αποπτωτικό bax και το DNA index ($\rho = -0.85$, $p=0.015$). Τα επίπεδα του λόγου bax/bcl-2, αντιστοίχως, ήταν υψηλότερα σε στατιστικά σημαντικό βαθμό σε ασθενείς με DNA index

<1.16, πάντα σε σύγκριση με ασθενείς με DNA index ≥ 1.16 (0.80 ± 0.78 versus 0.08 ± 0.03 , $p=0.025$). Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε αντίθεση με τα δεδομένα αφενός ότι η πρωτεΐνη bax έχει προ-αποπτωτική δράση, αφετέρου ότι η υποδιπλοειδία αποτελεί δυσμενές χαρακτηριστικό των ασθενών με ΟΛΛ.

Επιπλέον, οι ασθενείς που έφεραν την έλλειψη στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 9 (del 9p) εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερο λόγο bax/bcl-2 σε σύγκριση με αυτούς στους οποίους δεν ανιχνεύτηκε η δεδομένη κυτταρογενετική ανωμαλία (0.51 vs 20 , $p=0.007$).

Έκφραση των Fas και FasL σε παιδιά με Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία κατά τη διάγνωση και μετά την επίτευξη της ύφεσης.

Επιπρόσθετα με τα προ-αποπτωτικά και αντι-αποπτωτικά μόρια, μελετήθηκε και ο αποπτωτικός υποδοχέας Fas, καθώς και ο συνδέτης του FasL. Σκοπός της μελέτης αυτής ήταν να προσδιορισθεί η έκφραση των παραπάνω πρωτεϊνικών μορίων, καθώς και η συνέκφρασή τους, στα κύτταρα του μυελού των οστών παιδιών με ΟΛΛ στη διάγνωση και στις διάφορες φάσεις θεραπείας, αλλά και να γίνει σύγκριση με την έκφρασή τους σε άλλα αιματολογικά (καλοήθη ή κακοήθη) νοσήματα.

Το ποσοστό των Fas⁺ μονοπυρήνων προσδιορίστηκε σημαντικά αυξημένο με την επίτευξη της ύφεσης συγκριτικά με τη διάγνωση ($24.0 \pm 6.1\%$ vs $8.0 \pm 1.9\%$, $p=0.035$) (**Σχήμα 7**). Τα FasL⁺ κύτταρα, αντιθέτως, εμφάνισαν μη στατιστικά σημαντική μείωση στο στάδιο της ύφεσης ($2.4 \pm 0.8\%$ στην ύφεση vs $4.6 \pm 1.4\%$ στη διάγνωση). Δεν ήταν δυνατή η ανάδειξη συσχέτισης μεταξύ της συνέκφρασης Fas/FasL και των κλινικών ή κυτταρογενετικών χαρακτηριστικών των ασθενών.

Αναλυτικότερα, κατά τη διάγνωση της ΟΛΛ προσδιορίστηκαν τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του Fas με σταδιακή αύξηση μέχρι την

επίτευξη ύφεσης την ημέρα 33, για να μειωθούν κατά τη θεραπεία εδραίωσης και να αυξηθούν εκ νέου στο τέλος της θεραπείας. Αντίθετα, στην ίδια ομάδα ασθενών, ο συνδέτης FasL μειώνεται σταδιακά, για να παρουσιάσει αύξηση στο τέλος της θεραπείας. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι μετρήσεις στη διάγνωση έγιναν στους λεμφοβλάστες, ενώ στα υπόλοιπα στάδια της νόσου τα μόρια μετρήθηκαν στα φυσιολογικά αιμοποιητικά κύτταρα, δεδομένου ότι στα στάδια αυτά δεν αποδείχθηκε διήθηση του μυελού των οστών από νεοπλασματικά κύτταρα.

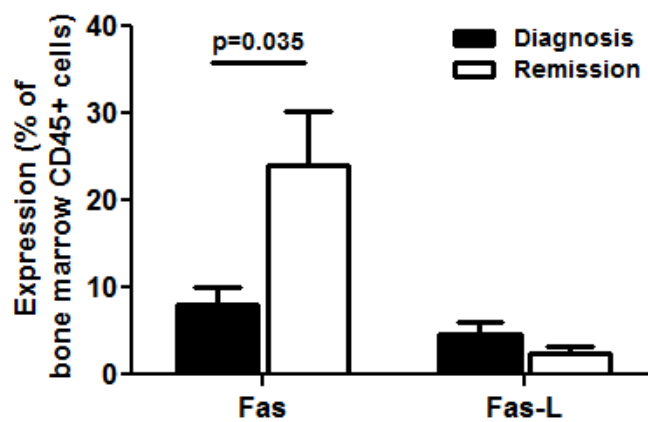
Στην ομάδα των Συμπαγών Όγκων τα επίπεδα του Fas δεν παρουσιάζουν διαφορά μεταξύ διάγνωσης και υπό θεραπεία (16.04 ± 2.2 vs 15.19 ± 6.4), ενώ ο FasL παρουσιάζει τα υψηλότερα επίπεδα από όλες τις ομάδες στη διάγνωση των Συμπαγών Όγκων και σημαντική διαφορά με τις τιμές υπό θεραπεία (10.91 ± 3.32 vs 2.92 ± 0.79 , $p=0.052$).

Στην ομάδα των Κυτταροπενιών τα επίπεδα του Fas και του FasL δεν παρουσιάζουν σημαντική διαφορά σε σύγκριση με όλες τις υπόλοιπες ομάδες.

Όσον αφορά δε τη συνέκφραση Fas⁺/FasL⁺, δεν προκύπτουν διαφορές μεταξύ διάγνωσης ΟΛΛ, τέλους θεραπείας και Συμπαγών Όγκων, ενώ οι χαμηλότερες τιμές προσδιορίστηκαν στις Κυτταροπενίες. Όταν αντιπαρατέθηκαν οι μετρήσεις ανάμεσα στους Συμπαγείς Όγκους στη διάγνωση και στις Κυτταροπενίες, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά, με τα υψηλότερα επίπεδα να παρατηρούνται στην ομάδα των Συμπαγών Όγκων (0.68 ± 0.095 vs 0.26 ± 0.08 , $p=0.031$).

Στη διάγνωση της ΟΛΛ, επομένως, προσδιορίζονται τα χαμηλότερα επίπεδα του Fas, τα οποία αυξάνονται με την επίτευξη ύφεσης και μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας, ευρήματα που πιθανά να σχετίζονται με την αποπτωτική δραστηριότητα του κλώνου της νόσου και την απάντηση στη θεραπεία.

Σχήμα 7. Έκφραση του Fas και του Fas-L στα μονοπύρρηνα κύτταρα του μυελού των οστών σε ασθενείς με ΟΛΛ κατά τη διάγνωση και στην ύφεση μετά τη θεραπεία εφόδου.



ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η απορρύθμιση του αποπτωτικού μηχανισμού διαταράσσει την ισορροπία ανάμεσα στην επιβίωση και το θάνατο των κυττάρων, διαδραματίζοντας καθοριστικό ρόλο στην παθογένεση των αιματολογικών νεοπλασιών. Παράλληλα, ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος αποτελεί διαδικασία, μέσω της οποίας θεωρείται ότι επιτελείται η εξουδετέρωση των καρκινικών κυττάρων με τη χορήγηση της χημειοθεραπείας, αν και ο ακριβής τρόπος δεν έχει αποσαφηνισθεί.

Αντικείμενο μελέτης πολλών ερευνητών έχουν αποτελέσει οι μεταβολές στον αποπτωτικό μηχανισμό σε σχέση με τα χαρακτηριστικά του λευχαιμικού φαινοτύπου των ασθενών με ΟΛΛ, καθώς και η πιθανή συσχέτισή τους με την ανταπόκριση στη θεραπεία και την πρόγνωση της νόσου (133-135). Σύμφωνα με μελέτες, ο βαθμός της απόπτωσης πριν την έναρξη της χημειοθεραπείας μάλλον δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός παράγοντας στα παιδιά με ΟΛΛ. Αντίθετα, οι αλλαγές στον αποπτωτικό μηχανισμό κατά τη διάρκεια της θεραπείας εισαγωγής στην ύφεση μπορεί να είναι ενδεικτικές της αποτελεσματικότητας της θεραπείας και της έκβασης της νόσου (51, 136). Φαίνεται, ωστόσο, ότι παράγοντες, όπως οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της απόπτωσης, η διακύμανση της αυτόματης απόπτωσης στην ΟΛΛ, καθώς οι τεχνικές απομόνωσης των βλαστικών κυττάρων, διαδραματίζουν καταλυτικό ρόλο στην εξαγωγή των όποιων συμπερασμάτων (51).

Τα γονίδια *bax* και *bcl-2* έχουν αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας, τόσο σε συμπαγείς όγκους, όσο και σε αιματολογικές κακοήθειες. Έχουν δημοσιευθεί δεδομένα, σύμφωνα με τα οποία στην Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία (ΟΜΛ) των ενηλίκων τα αυξημένα μετάγραφα του γονιδίου *bax* αποτελούν ευνοϊκό προγνωστικό δείκτη, ενώ άλλη μελέτη υποστηρίζει το αντίθετο (137). Στο διάχυτο από μεγάλα Β κύτταρα λέμφωμα, καθώς και στα συμπαγή νεοπλάσματα, όπως των ωοθηκών και του παγκρέατος,

παρατηρήθηκε η παράδοξη σχέση μεταξύ υψηλών μεταγράφων του προ-αποπτωτικού γονιδίου *bax* και δυσμενούς πρόγνωσης (137). Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε πρωτεϊνικό επίπεδο ανέδειξαν ότι, αν και το πρωτεϊνικό μόριο *Bax* αποτελεί ευνοϊκή προγνωστική παράμετρο σε μία μελέτη η οποία αναφερόταν σε ασθενείς με ΟΜΛ, σε άλλη μελέτη που αφορούσε την ΟΛΛ της παιδικής ηλικίας βρέθηκε συσχέτιση με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής (137).

Η παρουσία του μορίου *Bcl-2* αλλάζει τη βιολογική συμπεριφορά των λεμφωμάτων και έχει συσχετισθεί με δυσμενή πρόγνωση, παρεμποδίζοντας την απόπτωση. Έχει παρατηρηθεί ότι υψηλά επίπεδα του *Bcl-2* σχετίζονται με αντίσταση στη χημειοθεραπεία σε ενήλικες ασθενείς με ΟΜΛ, καθώς και ότι θεραπεία στοχευμένη έναντι του *Bcl-2* mRNA βελτιώνει την ευαισθησία των λευχαιμικών κυττάρων στην αρασυτίνη *in vitro*. Αριθμός κλινικών μελετών έχει ενισχύσει τη συσχέτιση ανάμεσα στο μόριο *Bcl-2* και την αντοχή στη χημειοθεραπεία, τόσο σε νεοπλασίες του λεμφικού ιστού, όσο και σε συμπαγείς όγκους, όπως πχ στον καρκίνο του προστάτη (138). Όσον αφορά τις κακοήθειες του λεμφικού ιστού, έχει παρατηρηθεί ότι στη Χρόνια Λεμφογενή Λευχαιμία (ΧΛΛ) η έκφραση του γονιδίου *bcl-2* δε συσχετίζεται με κλινικά χαρακτηριστικά, αντιθέτως υψηλότερα επίπεδα έκφρασής του μετρήθηκαν σε ασθενείς με χειρότερη έκβαση της νόσου (139).

Μελέτη των επιπέδων έκφρασης σχετιζόμενων με την απόπτωση πρωτεϊνών σε *de novo* περιπτώσεις ΟΜΛ έχει αποδείξει ότι υψηλά επίπεδα *Bcl-2* ή αυξημένος λόγος *Bcl-2/Bax* κατά τη διάγνωση συσχετίζονται με δυσμενή έκβαση της νόσου (140).

Τα παραπάνω δεδομένα αφορούν ως επί τω πλείστον τις νεοπλασίες των ενηλίκων. Η έκφραση των γονιδίων *bax* και *bcl-2* σε παιδιά με ΟΛΛ έχει ερευνηθεί σε κάποιες μελέτες (141-143). Ασθενείς ενήλικες με ΟΛΛ που ανταποκρίνονται στην χημειοθεραπεία εφόδου παρατηρήθηκε ότι εκφράζουν χαμηλότερα επίπεδα *bcl-2* στη διάγνωση, σε σύγκριση με τους μη ανταποκριθέντες (142). Αν και τα υψηλά επίπεδα του *bcl-2* χαρακτηρίζουν

την ΟΛΛ των παιδιών, καμία συσχέτιση δεν έχει αναφερθεί ανάμεσα στην αυξημένη έκφραση του bcl-2 και τη δυσμενή πρόγνωση (143). Επιπλέον, η αυξημένη έκφραση του bcl-2 στην ΟΛΛ των παιδιών, αν και φάνηκε ότι ευοδώνει την ικανότητα των λεμφοβλαστών να επιβιώνουν απουσία θρεπτικών παραγόντων, δεν αντανakλά ούτε την επιθετικότητα της νόσου ούτε την αντοχή στη χημειοθεραπεία (144).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, φαίνεται ότι στους ασθενείς με ΟΜΛ, η αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 συσχετίζεται με φτωχή ανταπόκριση στη θεραπεία (145,146), ενώ η εκτίμηση του λόγου bax/bcl-2 είναι πιο σημαντική στην υποτροπή, από ό,τι τα επίπεδα bcl-2 μεμονωμένα (147).

Αριθμός μελετών έχουν συσχετίσει την απορρύθμιση της απόπτωσης και της έκφρασης των γονιδίων της Bcl-2 οικογένειας με την παθογένεση και τη μη ανταπόκριση στα χημειοθεραπευτικά σχήματα στην ΟΛΛ.

Οι Wojcik και συνεργάτες (148) παρατήρησαν υψηλή συχνότητα υπερέκφρασης του γονιδίου bcl-2 και χαμηλή συχνότητα υπερέκφρασης του γονιδίου bax σε ενήλικες ασθενείς με ΟΛΛ και ΟΜΛ, υποδηλώνοντας ότι η τροποποίηση στη μεταγραφή των συγκεκριμένων γονιδίων είναι πιθανό να εμπλέκεται στη λευχαιμογένεση.

Επιπλέον, το γονίδιο bcl-2 σε νεοπλασματικά κύτταρα από ενήλικες ασθενείς με πρόδρομη Β-ΟΛΛ (B-precursor ALL), τυπική ΧΛΛ, άτυπη ΧΛΛ και Λέμφωμα Μανδύα βρέθηκε να υπερεκφράζεται σε ποσοστό 84%, 77%, και 75% και 55% των περιπτώσεων αντίστοιχα, εύρημα συμβατό με την ποικίλη έκφραση του μορίου Bcl-2 ανάλογα με το στάδιο ωρίμανσης του Β λεμφοκυττάρου (149).

Συμπερασματικά, η διαταραχή στην έκφραση του γονιδίου bcl-2 φαίνεται να επηρεάζει την ικανότητα επιβίωσης των Β πρόδρομων κυττάρων και, επομένως, να συμβάλλει στη λευχαιμογένεση (150).

Η ομάδα των Prokop και συνεργατών παρατήρησε ότι η έκφραση του bax και του λόγου bax/bcl-2 σε παιδιά με ΟΛΛ είναι σημαντικά μειωμένη στην υποτροπή, ενώ δεν ανέδειξαν διαφορά στην έκφραση του bcl-2, σε σύγκριση

με την αρχική διάγνωση (141). Τα υψηλότερα επίπεδα του γονιδίου *bax*, παρόλο που το πρωτεϊνικό του παράγωγο έχει προ-αποπτωτική δράση, βρέθηκαν να σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής στην ΟΛΛ της παιδικής ηλικίας (151), ενώ οι Narayan και συνεργάτες, έδειξαν ότι ο χαμηλός λόγος *bax/bcl-2* συσχετίζεται με ευνοϊκή πρόγνωση (152). Όσον αφορά το μόριο *Bcl-2*, δε φαίνεται να μπορεί από μόνο του να προβλέψει την αντίσταση των λεμφοβλαστών σε παιδιά με ΟΛΛ στην επαγόμενη από χημειοθεραπευτικούς παράγοντες απόπτωση (143).

Στη μελέτη μας, οι ασθενείς που ανήκαν στην ομάδα Υψηλού Κινδύνου εξέφραζαν μεγαλύτερο λόγο *bax/bcl-2* στη διάγνωση συγκριτικά με την ύφεση, ενώ κάτι αντίστοιχο δεν παρατηρήθηκε στην ομάδα Ενδιάμεσου Κινδύνου. Η συγκεκριμένη παρατήρηση θα μπορούσε να ενισχύσει την αρνητική προγνωστική αξία του λόγου *bax/bcl-2* στη φάση της διάγνωσης της νόσου. Στο σημείο αυτό, βέβαια, θα πρέπει να τονισθεί η αντιφατικότητα της προαναφερθείσας παρατήρησης, δεδομένου ότι το μόριο *Bax* προάγει την αποπτωτική διαδικασία, συνεπώς η αυξημένη έκφρασή του θα έπρεπε να συσχετίζεται με ευμενή έκβαση. Η παρατήρηση αυτή, όμως, βρίσκεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της μελέτης των Hogarth και συνεργατών (151).

Όσον αφορά τη μεμονωμένη έκφραση των γονιδίων *bax* και *bcl-2* στις συγκεκριμένες ομάδες ασθενών, ουδεμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση προέκυψε.

Η έκφραση των επιπέδων των γονιδίων *bax* και *bcl-2*, καθώς και του λόγου τους, στους ασθενείς με ΟΛΛ στη διάγνωση δεν αποδείχθηκε να διαφέρει σε στατιστικά σημαντικό βαθμό συγκριτικά με την ομάδα των μαρτύρων. Παρ' όλα αυτά, τα επίπεδα του *bcl-2* βρέθηκαν πολύ υψηλότερα στην ομάδα των παιδιών με ΟΛΛ, συγκρινόμενα με την ομάδα των μαρτύρων, εύρημα συμβατό με τη μελέτη της ομάδας του Aref και συνεργατών (142).

Η συσχέτιση ανάμεσα σε άλλες προγνωστικές παραμέτρους (όπως το φύλο, η ηλικία ή ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων στη διάγνωση, ο

καρυότυπος) και την έκφραση των bcl-2 ή bax στην ΟΛΛ της παιδικής ηλικίας, έχει αναλυθεί σε πολλές μελέτες, οδηγώντας σε αντικρουόμενα αποτελέσματα (151-154). Η πλειοψηφία των μελετών (151,152,154) δεν κατόρθωσε να αναδείξει συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης των bcl-2, bax ή του λόγου bax/bcl-2 και το φύλο, την ηλικία ή τον αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων στη διάγνωση.

Μια πρόσφατη μελέτη ανέδειξε ότι, σε παιδιά με ΟΛΛ, υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του μορίου Bcl-2 συσχετίζονται με αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων <50.000/mm στη διάγνωση, καθώς και με ταξινόμηση σε ομάδα χαμηλότερου κινδύνου (155).

Στην παρούσα μελέτη, παρά το γεγονός ότι η έκφραση των σχετιζόμενων με την απόπτωση γονιδίων δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των ομάδων κινδύνου, υψηλός αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων συσχετίστηκε με ελαττωμένη έκφραση του αντι-αποπτωτικού bcl-2. Ωστόσο, όταν αξιολογήθηκε ξεχωριστά η ηλικία, υψηλότερα επίπεδα του λόγου bax/bcl-2 παρατηρήθηκαν σε μεγαλύτερα παιδιά (>10 ετών) μόνο στην ομάδα Υψηλού Κινδύνου. Το εύρημα αυτό, που διαφέρει από τα αποτελέσματα άλλων μελετών, υποδηλώνει ότι αυξημένα επίπεδα του λόγου προ-αποπτωτικών/αντι-αποπτωτικών γονιδίων στους λεμφοβλάστες των παιδιών με ΟΛΛ σχετίζονται με δυσμενή πρόγνωση.

Η ΟΛΛ χαρακτηρίζεται από σημαντική ετερογένεια σε κυτταρογενετικό και μοριακό επίπεδο. Στα λευχαιμικά κύτταρα του μυελού των οστών έχει περιγραφεί ένας αριθμός επίκτητων κυτταρογενετικών ανωμαλιών, συμπεριλαμβανομένων χρωμοσωμικών διαμεταθέσεων, ανευπλοειδίας, απώλειας ή ενίσχυσης γενετικού υλικού. Ορισμένες γενετικές διαταραχές θεωρούνται παθογνωμονικές και μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες παρακολούθησης της ανταπόκρισης του ασθενούς στη θεραπεία. Επιπρόσθετα με το θεραπευτικό πρωτόκολλο, την ηλικία και τον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων στη διάγνωση, αλλά και τον προσδιορισμό της ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου, το γενετικό προφίλ της Λευχαιμίας

αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την έκβαση της νόσου, ιδιαίτερα δε για τον κίνδυνο υποτροπής (21).

Περίπου το 1/3 των περιπτώσεων ΟΛΛ εμφανίζουν αύξηση στον αριθμό των χρωμοσωμάτων (π.χ. υπερδιπλοειδία ή >47 χρωμοσώματα και «υψηλή» υπερδιπλοειδία ή >50 χρωμοσώματα) και μάλιστα στις περιπτώσεις αυτές τα βλαστικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από αυξημένη απόπτωση *in vitro*, καθώς και από ευαισθησία σε ποικίλους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. Η ευνοϊκή έκβαση που παρατηρείται σε περιπτώσεις υπερδιπλοειδίας αποδίδεται κυρίως στις τρισωμίες των χρωμοσωμάτων 4, 10 και 17 (156-158).

Ειδικότερα, η υψηλή υπερδιπλοειδία με 51-67 χρωμοσώματα αποτελεί μία μεγάλη κυτταρογενετική υπο-ομάδα των παιδιών με πρόδρομη Β-ΟΛΛ (B-precursor) (159). Απαντάται λιγότερο συχνά σε ενήλικες με πρόδρομη Β-ΟΛΛ (B-precursor) (10%), η έκβαση των οποίων είναι μεν ευνοϊκότερη συγκριτικά με τις άλλες ομάδες, αλλά όχι τόσο ευνοϊκή όπως στα παιδιά (160-162). Η συχνότητα της υψηλής υπερδιπλοειδίας είναι εξαιρετικά σπάνια στην Τ-ΟΛΛ, καθώς επίσης και στην ώριμη Β-ΟΛΛ (163).

Όσον αφορά τα νεοπλασματικά κύτταρα με υποδιπλοειδικό καρυότυπο, τα προγνωστικά χαρακτηριστικά τους κάθε άλλο παρά ευοίωνα εμφανίζονται. Αν και έχει παρατηρηθεί ότι η πορεία των ασθενών με καρυότυπο 45 χρωμοσωμάτων δε διαφέρει από εκείνων με φυσιολογικό καρυότυπο, η Επιβίωση Ελεύθερη Νόσου για τις περιπτώσεις με 33-44 χρωμοσώματα υπερτερούσε έναντι εκείνων με χρωμοσώματα λιγότερα από 28 (156,164,165).

Χρωμοσωμικές διαμεταθέσεις, δίχως μεταβολή στον αριθμό των χρωμοσωμάτων, περιγράφονται στο 30% των περιπτώσεων ΟΛΛ της παιδικής ηλικίας. Οι κύριες διαμεταθέσεις που έχουν παρατηρηθεί είναι τέσσερις, καθεμία από τις οποίες καθορίζει μία ξεχωριστή υποκατηγορία ασθενών.

Συγκεκριμένα, η διαμετάθεση $t(1;19)(q23;q13)$ χαρακτηρίζεται από τη σύντηξη των γονιδίων E2A και PBX και, παρά το γεγονός ότι συσχετιζόταν με δυσμενή πρόγνωση, η χορήγηση εντατικοποιημένων χημειοθεραπευτικών πρωτοκόλλων συνετέλεσε στη βελτίωση της επιβίωσης. Επιπρόσθετα, έχει περιγραφεί αυξημένος κίνδυνος υποτροπής στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα σε παιδιά τα οποία φέρουν τη συγκεκριμένη διαμετάθεση (166,167).

Οι διαμεταθέσεις ανάμεσα στο γονίδιο MLL (Mixed Lineage Leukemia), το οποίο βρίσκεται στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 11 (11q23), και σε περισσότερα από 30 διαφορετικά χρωμοσώματα χαρακτηρίζουν το 6% των περιπτώσεων ΟΛΛ και σχετίζονται με φτωχή πρόγνωση. Οι διαμεταθέσεις του προαναφερθέντος γονιδίου, κυρίως η $t(4;11)(q21;q23)$, εντοπίζονται στην πλειοψηφία των βρεφών με ΟΛΛ, ιδιαίτερα σε ηλικίες <6 μηνών. Στα μεγαλύτερα παιδιά η αρνητική επίπτωση του 11q23 δεν είναι τόσο ισχυρή, εντούτοις τα κατατάσσει σε ομάδα υψηλού κινδύνου (156,166,167).

Το χρωμόσωμα Philadelphia (Ph) είναι το αποτέλεσμα της διαμετάθεσης $t(9;22)(q34;q11)$ και το αντίστοιχο πρωτεϊνικό προϊόν είναι το BCR-ABL, ένα μόριο με δράση κινάσης τυροσίνης. Η συγκεκριμένη ανωμαλία παρατηρείται μόλις στο 3%-5% των παιδιών, αλλά στο 20% των ενηλίκων με ΟΛΛ, η έκβαση δε των ασθενών αυτών είναι δυσμενέστατη. Τα τελευταία χρόνια, η προσθήκη του αναστολέα τυροσινικής κινάσης (Imatinib mesylate) στα εντατικοποιημένα χημειοθεραπευτικά πρωτόκολλα φαίνεται ότι βελτιώνει την Επιβίωση Ελεύθερη Συμβαμάτων στα 5 έτη (156,157,168).

Η πιο συχνή διαμετάθεση είναι η $t(12;21)(p13;q22)$, η οποία αναγνωρίζεται στο 25% των παιδιών με πρόδρομη Β (B-precursor) ΟΛΛ. Το αποτέλεσμα της συγκεκριμένης χρωμοσωμικής ανωμαλίας είναι η σύντηξη της περιοχής TEL του χρωμοσώματος 12 (η οποία ονομάζεται και ETV6) με το γονίδιο AML1 (ή CBFA2 ή RUNX1) και το αντίστοιχο πρωτεϊνικό προϊόν είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας. Η θετική έκβαση των ασθενών με τη διαμετάθεση TEL/AML1 έχει αποδειχθεί σε σειρά μελετών. Δεδομένου ότι *in vitro* μελέτες έχουν αναδείξει αυξημένη ευαισθησία των TEL/AML1(+)

βλαστικών κυττάρων στην ασπαραγινάση, χημειοθεραπευτικά πρωτόκολλα που συμπεριλαμβάνουν το παραπάνω φάρμακο μπορεί να αποδειχθούν ιδιαίτερα αποτελεσματικά για τη συγκεκριμένη υπο-ομάδα ασθενών (156,157).

Η σχέση μεταξύ πλοειδίας και πρόγνωσης της ΟΛΛ, αν και έχει περιγραφεί εδώ και αρκετές δεκαετίες, έχει καλά προσδιορισθεί κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών, με το δείκτη υπερπλοειδίας (DNA index ≥ 1.16) να θεωρείται ως ευνοϊκή προγνωστική παράμετρος (158). Μελέτες έχουν δείξει αυξημένη επίπτωση αυθόρμητης απόπτωσης σε βλαστικά κύτταρα με υπερδιπλοειδικό καρυότυπο, γεγονός που πιθανόν να ερμηνεύει την ευνοϊκή έκβαση της νόσου στη συγκεκριμένη υπο-ομάδα ασθενών (162).

Στην παρούσα ανάλυση, η έκφραση του bcl-2 mRNA εμφάνισε θετική συσχέτιση με τον DNA index τόσο στη διάγνωση όσο και στην ύφεση, ενώ η έκφραση του bax συσχετιζόταν αντιστρόφως ανάλογα με το DNA index στην ύφεση. Ο λόγος bax/bcl-2 βρέθηκε να συσχετίζεται αντιστρόφως ανάλογα με το DNA index στη διάγνωση και την ύφεση, προτείνοντας ότι η ανίχνευση υψηλού λόγου bax/bcl-2 στο μυελό των οστών στην ύφεση πιθανόν να συσχετίζεται με λιγότερο ευνοϊκή πρόγνωση, παρατήρηση που έρχεται σε αντίθεση με το γεγονός ότι το γονίδιο bax έχει προ-αποπτωτική δράση και, συνεπώς, υψηλός λόγος bax/bcl-2 θα έπρεπε να συσχετίζεται με θετική έκβαση της νόσου.

Επιπρόσθετα, η αναδιάταξη t(12;21)(p13;q22), την οποία έφεραν 4 από τα 26 (ποσοστό 15.4%) εξεταζόμενα παιδιά της μελέτης, συσχετίστηκε με υψηλότερο λόγο bax/bcl-2, εύρημα που δεν μπορεί να αξιολογηθεί σχετιζόμενο με την πρόγνωση λόγω του μικρού αριθμού ασθενών που μελετήθηκαν.

Εκτός από τις συχνότερες κυτταρογενετικές ανωμαλίες που χαρακτηρίζουν την ΟΛΛ της παιδικής ηλικίας, για τις οποίες έγινε σύντομη αναφορά σε προηγούμενες παραγράφους, έχουν μελετηθεί και αρκετές άλλες. Η απενεργοποίηση της περιοχής 9p21, για παράδειγμα, έχει περιγραφεί σε

ποικίλους κακοήθεις όγκους (μελάνωμα, μεσοθηλίωμα, νεόπλασμα ουροδόχου κύστης, χλώρωμα, όγκοι γαστρεντερικού σωλήνα) (169-172), καθώς και στην ΟΛΛ (173-176).

Σε παιδιά με ΟΛΛ, ανωμαλίες του χρωμοσώματος 9 απαντώνται σε μεγάλη συχνότητα (20–27% σύμφωνα με μεγάλες σειρές) (177-180). Επιπλέον, ενήλικες ασθενείς με πρόδρομη Β-ΟΛΛ (B-precursor), οι οποίοι φέρουν τη χρωμοσωμική ανωμαλία del 9p, έχουν δυσμενή πρόγνωση (181). Δεν υπάρχουν, όμως, επαρκή δεδομένα για τα παιδιά και τα μέχρι τώρα ευρήματα είναι αμφιλεγόμενα (182-186). Έχει πλέον αναγνωρισθεί ότι η ομοζυγωτία del 9p είναι συχνότερη στην Τ-ΟΛΛ (2/3) συγκριτικά με την πρόδρομη Β-ΟΛΛ (1/3) (187,188). Αν και η ομοζυγωτία del 9p21 αποτελεί δυσμενή προγνωστικό παράγοντα σε ασθενείς με Τ-ΟΛΛ, η σημασία της συγκεκριμένης παραμέτρου είναι αμφισβητούμενη σε ασθενείς με πρόδρομη Β-ΟΛΛ (21,183,186,189,190). Στην πιο πρόσφατη μελέτη, οι Kuchinskaya και συνεργάτες, παρατήρησαν ότι η έλλειψη του βραχέος σκέλους του χρωμοσώματος 9 (del 9p21) ανιχνεύεται σε όλες τις ηλικιακές ομάδες, με σταθερά αυξανόμενη συχνότητα με την ηλικία. Η επίπτωση ήταν υψηλότερη στον Τ-υπότυπο (38%), συγκριτικά με το Β-υπότυπο (15.7%). Δεν παρατηρήθηκε, όμως, σημαντική διαφορά στην έκβαση ανάμεσα σε ασθενείς με και χωρίς τη συγκεκριμένη χρωμοσωμική ανωμαλία ή σε ασθενείς με ομοζυγωτία ή ετεροζυγωτία. Στη δεδομένη μεγάλη σειρά παιδιών με ΟΛΛ, η del 9p21 δε συσχετίστηκε με δυσμενή πρόγνωση (180).

Επειδή η διαταραχή del9p βρέθηκε στο 15% των ασθενών της παρούσας μελέτης, διερευνήθηκε η συσχέτισή της με το λόγο bax/bcl-2. Τα παιδιά με del 9p εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα bax, αλλά καμιά διαφορά στα επίπεδα bcl-2, κατά τη διάγνωση, σε σύγκριση με παιδιά που δεν έφεραν τη συγκεκριμένη ανωμαλία. Είναι ενδιαφέρον ότι στην παρούσα μελέτη ο λόγος bax/bcl-2 βρέθηκε να είναι πολύ υψηλότερος εντός της ομάδας del 9p στην ύφεση, σε σύγκριση με την ομάδα των ασθενών χωρίς αυτή την ανωμαλία. Τα πρώτα δεδομένα θα μπορούσαν να είναι ενδεικτικά για ένα πιθανό

προγνωστικό ρόλο της del 9p σε παιδιατρικούς ασθενείς με ΟΛΛ, αν και ο αριθμός των ασθενών είναι πολύ μικρός για να προκύψουν οριστικά συμπεράσματα.

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, τα μέλη της Bcl-2 οικογένειας αποτελούν καθοριστικούς ρυθμιστές του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου και οποιαδήποτε απορρυθμισή τους συνεπάγεται, μεταξύ άλλων, την εκδήλωση του λευχαιμικού φαινοτύπου. Η σκέψη, επομένως, ότι θα μπορούσαμε να διαχειρισθούμε τη λειτουργία των συγκεκριμένων μορίων ενισχύοντας την ογκοκατασταλτική τους δράση αποτελεί μια λογική στρατηγική στο σχεδιασμό αντινεοπλασματικών παραγόντων.

Στους ασθενείς με ΧΛΛ, για παράδειγμα, η διαταραχή στην απόπτωση λόγω υπερέκφρασης της πρωτεΐνης Bcl-2 ενοχοποιείται για την αντοχή στα χημειοθεραπευτικά πρωτόκολλα. Αν και οι χορηγούμενες θεραπείες (ανοσοθεραπείες, ανοσο-χημειοθεραπείες) έχουν πολύ καλά αποτελέσματα, η προσθήκη του αντι-Bcl-2 ολιγονουκλεοτιδίου Oblimersen φαίνεται πολλά υποσχόμενη.

Το Oblimersen έχει, επίσης, χορηγηθεί στη θεραπεία εφόδου, αλλά και σταθεροποίησης σε ηλικιωμένους ασθενείς με ΟΜΛ, τα δε αποτελέσματα ήταν ιδιαίτερα ενθαρρυντικά.

Υπάρχουν ομάδες επιστημόνων που μελετούν τη δράση αναστολέων των μορίων της Bcl-2 οικογένειας (όπως των ABT-737 και ABT-263) στην ΟΛΛ και τα συμπεράσματα είναι ιδιαίτερος ενδιαφέροντα (191).

Σε διάφορες αιματολογικές κακοήθειες (Non Hodgkin λεμφώματα, λεμφώματα Hodgkin, Οξείες Λευχαιμίες) έχουν εντοπισθεί μεταλλάξεις στο γονίδιο Fas. Σε ασθενείς με ΟΜΛ παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση του Fas και την ανταπόκριση στη θεραπεία, ενώ αυξημένα επίπεδα του μορίου sFas συσχετίστηκαν με μειωμένη επιβίωση ασθενών με T- λευχαιμία (130).

Τα παραπάνω δεδομένα έχουν προκύψει από μελέτες σε ενήλικες, ενώ όσον αφορά τους παιδιατρικούς ασθενείς, ο αριθμός των μελετών είναι

μικρότερος. Παρ'όλο που τα παιδιά με ΟΛΛ τα οποία δε φέρουν δυσμενή χαρακτηριστικά αναμένεται να έχουν καλή πρόγνωση, ο μικρός αριθμός αυτών που υποτροπιάζουν είναι ενδεικτικός της ύπαρξης άγνωστων μηχανισμών που παίζουν ρόλο σε αυτή την αποτυχία. Ένας από αυτούς τους μηχανισμούς είναι η διαμεσολαβούμενη από το FAS οδός απόπτωσης, η οποία χρήζει περαιτέρω μελέτης. Η ισορροπία ανάμεσα στην έκφραση του Fas και του bcl-2 θα μπορούσε πιθανώς να ελέγξει την ευαισθησία των λευχαιμικών κυττάρων στους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες και, κατ'επέκταση, να έχει αντίκτυπο στην πρόγνωση (142). Σε γενικές γραμμές, η έκφραση του Fas στη διάγνωση έχει συσχετισθεί με ευνοϊκή έκβαση στην ΟΛΛ των παιδιών (μεγαλύτερη επιβίωση ελεύθερη υποτροπών και συνολική επιβίωση). Ειδικότερα, στη Β-σειράς ΟΛΛ, τα βλαστικά κύτταρα εμφανίζουν αντοχή στο διαμεσολαβούμενο από το FAS αποπτωτικό θάνατο. Σύμφωνα με τους Wood και συνεργάτες, η μειωμένη έκφραση και λειτουργία της πρωτεΐνης FAS θα μπορούσε να είναι μια πιθανή εξήγηση (192). Στην ΟΛΛ των παιδιών τα αυξημένα επίπεδα της έκφρασης του Fas, συσχετίστηκαν με τη μεγαλύτερη επιβίωση των ασθενών που είχαν επιτύχει πλήρη ύφεση (193), ενώ άλλες μελέτες δεν μπόρεσαν να αποδείξουν κάποια συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση του Fas ή τη λειτουργία του και την έκβαση της ΟΛΛ (141, 194,195). Το γεγονός ότι οι διαλυτές μορφές του μορίου Fas και του συνδέτη του FasL (sFas and sFasL) έχουν συσχετισθεί με πρόοδο νόσου σε διάφορες κακοήθειες, οδήγησε σε σειρά πειραμάτων, ορισμένα από τα οποία ανέδειξαν πιθανή ευνοϊκή προγνωστική αξία του sFasL σε παιδιά με ΟΛΛ (196).

Στην παρούσα μελέτη, οι ασθενείς με ΟΛΛ εμφάνισαν χαμηλά επίπεδα του Fas στη διάγνωση, ενώ σταδιακή αύξηση παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια της ύφεσης.

Τα δεδομένα από τη διεθνή βιβλιογραφία παρουσιάζουν αντικρουόμενα αποτελέσματα σχετικά με τα επίπεδα των Fas και FasL στη διάγνωση της ΟΛΛ της παιδικής ηλικίας. Συγκεκριμένα, σε ασθενείς με ΟΛΛ οι οποίοι ανταποκρίθηκαν στη χημειοθεραπεία εφόδου, μετρήθηκαν υψηλότερα

επίπεδα έκφρασης του μορίου Fas στη διάγνωση (142). Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξε και η ομάδα του Hazar, που παρατήρησε σημαντική μείωση στα επίπεδα του μορίου sFasL στην ύφεση, προτείνοντας το μόριο αυτό ως δυναμικό δείκτη παρακολούθησης της Πλήρους Ύφεσης σε παιδιά με λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα (197). Τα αποτελέσματα από τη μελέτη άλλης ερευνητικής ομάδας αναδεικνύουν πιθανή συσχέτιση χαμηλότερης έκφρασης του Fas στη διάγνωση ΟΛΛ σε παιδιατρικούς ασθενείς με φτωχή ανταπόκριση στη θεραπεία, κατά συνέπεια, με δυσμενέστερη πρόγνωση (155).

Εντούτοις, θα μπορούσε να προταθεί ότι τα αυξανόμενα επίπεδα έκφρασης των συγκεκριμένων μορίων κατά τη διάρκεια της ύφεσης αποτελούν ένα δυναμικό δείκτη ανταπόκρισης στη θεραπεία. Απαιτείται μεγαλύτερος αριθμός μελετών, αλλά και μακροχρόνια παρακολούθηση των ασθενών, προκειμένου να γίνει αποδεκτή η παραπάνω πρόταση.

Συμπερασματικά, η μελέτη μας τονίζει μας ότι, στην ΟΛΛ των παιδιών ο υψηλός λόγος *bax/bcl-2* συσχετίζεται με χαρακτηριστικά υψηλού κινδύνου (μεγαλύτερη ηλικία και υψηλός αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων στη διάγνωση), με υπερδιπλοειδία, καθώς και με τη χρωμοσωμική ανωμαλία *del 9p*. Η σταδιακή αύξηση της έκφρασης του Fas κατά τη διάρκεια της θεραπείας, επιπλέον, θα μπορούσε να αποτελέσει έναν ευνοϊκό προγνωστικό παράγοντα ανταπόκρισης στη χημειοθεραπεία, αλλά η παρατήρηση αυτή χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Η σκιαγράφηση του ρόλου της απόπτωσης στην παθογένεση και την πρόγνωση της ΟΛΛ της παιδικής ηλικίας θεωρείται ένα σημαντικό βήμα στην προσπάθεια σχεδιασμού στοχευμένης θεραπευτικής προσέγγισης των ασθενών με ΟΛΛ.

Βιβλιογραφία

1. Svendsen AL, Feychting M, Klaeboe L et al. (2007) Time trends in the incidence of acute lymphoblastic leukemia among children 1976-2002: a population-based Nordic study. *J Pediatr* 151(5):548-550.
2. McNally RJ, Rowland D, Roman E, et al. (1997) Age and sex distributions of hematological malignancies in the U.K. *Hematol Oncol* 15(4):173-189.
3. Dores GM, Devesa SS, Curtis RE, et al. (2012) Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the United States, 2001-2007. *Blood* 119(1):34-43.
4. Gurney JG, Bondy ML (2001) Epidemiologic research methods and childhood cancer. *Principles and Practice of Pediatric Oncology*, 4th ed, Pizzo PA, Poplack DG (Eds), Lippincott-Raven, Philadelphia.
5. Buffler PA, Kwan ML, Reynolds P, et al. (2005) Environmental and genetic risk factors for childhood leukemia: appraising the evidence. *Cancer Invest* 23(1):60-75.
6. Draper GJ, Heaf MM, and Kinnier Wilson LM (1977) Occurrence of childhood cancers among sibs and estimation of familial risks. *J Med Genet* 14(2):81-90.
7. Greaves M (2006) Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer* 6(3):193-203.

8. Kroll ME, Swanson J, Vincent TJ, et al. (2010) Childhood cancer and magnetic fields from high-voltage power lines in England and Wales: a case-control study. *Br J Cancer* 103(7):1122-1127.
9. Urayama KY, Ma X, Selvin S, et al. (2011) Early life exposure to infections and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Int J Cancer* 128(7):1632-1643.
10. Reid A, Glass DC, Bailey HD, et al. (2011) Risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia following parental occupational exposure to extremely low frequency electromagnetic fields. *Br J Cancer* 105(9):1409-1413.
11. Margolin JF, Steuber CP and Poplack DG (2001) Acute Lymphoblastic Leukemia. *Principles and Practice of Pediatric Oncology*, 4th ed, Pizzo PA, Poplack DG (Eds), Lippincott-Raven, Philadelphia.
12. Sinigaglia R, Gigante C, Bisinella G, et al. (2008) Musculoskeletal manifestations in pediatric acute leukemia. *J Pediatr Orthop* 28(1):20-28.
13. Ingram LC, Fairclough DL, Furman WL, et al. (1991) Cranial nerve palsy in childhood acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer* 67(9):2262-2268.
14. Bleyer WA (1988) Central nervous system leukemia. *Pediatr Clin North Am* 35(4):789-814.
15. Miller DR, Leikin S, Albo V, et al. (1981) Prognostic importance of morphology (FAB classification) in childhood acute lymphoblastic leukaemia (ALL). *Br J Haematol* 48(2):199-206.

16. Lilleyman JS, Hann IM, Stevens RF, et al. (1992) Cytomorphology of childhood lymphoblastic leukaemia: a prospective study of 2000 patients. United Kingdom Medical Research Council's Working Party on Childhood Leukaemia. *Br J Haematol* 81(1):52-57.
17. Schultz KR, Pullen DJ, Sather HN, et al. (2007) Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG). *Blood* 109(3):926-935.
18. Smith M, Arthur D, Camitta B, et al. (1996) Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 14(1):18-24.
19. Silverman LB, Gelber RD, Dalton VK, et al. (2001) Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01. *Blood* 97(5):1211-1218.
20. Harrison CJ (2009) Cytogenetics of paediatric and adolescent acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 144(2):147-156.
21. Moorman AV, Ensor HM, Richards SM, et al. (2010) Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. *Lancet Oncol* 11(5):429-438.
22. Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA, et al. (2002) Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* 1(2):133-143.

23. Coustan-Smith E, Mullighan CG, Onciu M, et al. (2009) Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol* 10(2):147-156.
24. Laughton SJ, Ashton LJ, Kwan E, et al. (2005) Early responses to chemotherapy of normal and malignant hematologic cells are prognostic in children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 23(10):2264-2271.
25. Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, et al. (2000) Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 96(8):2691-2696.
26. Nyvold C, Madsen HO, Ryder LP, et al. (2002) Precise quantification of minimal residual disease at day 29 allows identification of children with acute lymphoblastic leukemia and an excellent outcome. *Blood* 99(4):1253-1258.
27. Borowitz MJ, Devidas M, Hunger SP, et al. (2008) Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. *Blood* 111(12):5477-85.
28. Pui CH and Evans WE (2006) Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 354:166–178.
29. Winick NJ, Carroll WL and Hunger SP (2004) Childhood leukemia- new advances and challenges. *N Engl J Med* 351:601–603.

30. Carroll WL, Bhojwani D, Min DJ, et al. (2006) Childhood acute lymphoblastic leukemia in the age of genomics. *Pediatr Blood Cancer* 46:570-578.
31. Peters R, Leyraz S and Perey L (1998) Apoptotic Regulation in Primitive Hematopoietic Precursors. *Blood* 92:2041-2052.
32. Giorgi C, Wieckowski MR, Pandolfi PP, et al. (2011) Mitochondria associated membranes (MAMs) as critical hubs for apoptosis. *Commun Integr Biol* 4(3):334-5.
33. Philpott NJ, Turner AJ, Scopes J, et al. (1996) The use of 7-amino actinomycin D in identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques. *Blood* 87(6):2244-2251.
34. Sartorius U, Schmitz I and Krammer PH (2001) Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. *Chembiochem* 2(1):20-29.
35. Reed JC (2000) Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 157(5):1415-1430.
36. Afford S and Randhawa S (2000) Apoptosis. *Mol Pathol* 53(2):55-63.
37. Earnshaw WC, Martins LM and Kaufmann SH (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68:383-424.
38. Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407(6805):770-776.

39. Reed JC and Pellecchia M (2005) Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies. *Blood* 106(2):408-418.
40. Martin DA and Elkon KB (2004) Mechanisms of apoptosis. *Rheum Dis Clin North Am* 30(3):441-454.
41. Wickremasinghe RG and Hoffbrand AV (1999) Biochemical and genetic control of apoptosis: relevance to normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Blood* 93(11):3587-3600.
42. Shi Y (2002) Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 9(3):459-470.
43. Boatright KM, Renatus M, Scott FL, et al. (2003) A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* 11(2):529-541.
44. Denault JB and Salvesen GS (2002) Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chem Rev* 102(12):4489-4500.
45. Testa Ugo and Riccioni Roberta (2007) Deregulation of apoptosis in AML. *Haematologica* 92(01):81-94.
46. Hacker G (2000) The morphology of apoptosis. *Cell and Tissue Research* 301:5-17.
47. Lincz LF (1998) Deciphering the apoptotic pathway: All roads lead to death. *Immunology and cell biology* 76:1-19.
48. Lodish H, Baltimore D, Berk A, et al. (2000) *Molecular Cell Biology* (4th ed.). Chapters 23 and 27.

49. Zimmermann KC and Green DR (2001) How cells die: apoptosis pathways. *J Allergy Clin Immunol* 108(4 Suppl):S99-103.
50. Schimmer AD, Hedley DW, Penn LZ, et al. (2001) Receptor- and mitochondrial-mediated apoptosis in acute leukemia: a translational view. *Blood* 98(13):3541-3553.
51. Schuler D and Szende B (2004) Apoptosis in acute leukemia. *Leuk Res* 28(7):661-666.
52. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, et al. (1998) Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* 17(6):1675-1687.
53. Ashkenazi A (2002) Targeting death and decoy receptors of the tumor necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2(6):420-430.
54. Kaufmann SH and Gores GJ (2000) Apoptosis in cancer: cause and cure. *Bioessays* 22(11):1007-1017.
55. Wang X (2001) The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 15(22):2922-2933.
56. Newmeyer DD and Ferguson-Miller S (2003) Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* 112(4):481-490.
57. Susin SA, Lorenzo HK, et al. (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397(6718):441-446.

58. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, et al. (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102(1):43-53.
59. Li LY, Luo X and Wang X (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412(6842):95-99.
60. Acehan D, Jiang X, Morgan DG, et al. (2002) Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding and activation. *Mol Cell* 9(2):423-432.
61. Reed JC (1997) Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 387(6635):773-776.
62. Adams JM and Cory S (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281(5381):1322-1326.
63. Gross A, McDonnell JM and Korsmeyer SJ (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13(15):1899-1911.
64. McDonnell TJ, Deane N, Platt FM, et al. (1989) Bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 57(1):79-88.
65. Cory S and Adams JM (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2(9):647-656.
66. Mund T, Gewies A, Schoenfeld N, et al. (2003) Spike, a novel BH3-only protein, regulates apoptosis at the endoplasmic reticulum. *FASEB J* 17(6):696-698.

67. Danial NN, Gramm CF, Scorrano L, et al. (2003) BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature* 424(6951):952-956.
68. Bouillet P and Strasser A (2002) BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sci* 115(Pt 8):1567-1574.
69. Reed JC (1998) Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 17(25):3225-3236.
70. Harris MH and Thompson CB (2000) The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability. *Cell Death Differ* 7(12):1182-1191.
71. Borner C (2003) The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol* 39(11):615-647.
72. Wang X (2001) The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 15(22):2922-2933.
73. Reed JC (1996) Mechanisms of Bcl-2 family protein function and dysfunction in health and disease. *Behring Inst Mitt* 97:72-100.
74. Miyashita T, Harigai M, Hanada M, et al. (1994) Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer Res* 54(12):3131-3135.
75. Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, et al. (1994) Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9(6):1799-1805.

76. Miyashita T and Reed JC (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80(2):293-299.
77. Vaux DL, Cory S and Adams JM (1988) Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335(6189):440-442.
78. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, et al. (1984) "Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation". *Science* 226 (4678): 1097–1099.
79. Cleary ML, Smith SD and Sklar J (1986). "Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation". *Cell* 47 (1): 19–28.
80. Korsmeyer SJ (1992) Bcl-2: an antidote to programmed cell death. *Cancer Surv* 15:105-118.
81. Hockenbery DM (1992) The bcl-2 oncogene and apoptosis. *Semin Immunol* 4(6):413-420.
82. Tsujimoto Y and Croce CM (1986) Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(14):5214-5218.
83. Petros AM, Medek A, Nettesheim DG, et al. (2001) Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(6):3012-3017.

84. Korsmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, et al. (1993) Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin Cancer Biol* 4(6):327-332.
85. Korsmeyer SJ (1999) BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res* 59(7 Suppl):1693s-1700s.
86. Reed JC, Zha H, Aime-Sempe C, et al. (1996) Structure-function analysis of Bcl-2 family proteins. Regulators of programmed cell death. *Adv Exp Med Biol* 406:99-112.
87. Petros AM, Olejniczak ET and Fesik SW (2004) Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta* 1644(2-3):83-94.
88. García-Sáez AJ, Mingarro I, Pérez-Payá E, et al. (2004) Membrane-insertion fragments of Bcl-xL, Bax, and Bid. *Biochemistry* 43(34):10930-10943.
89. Marsden VS, O'Connor L, O'Reilly LA, et al. (2002) Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Nature* 419(6907):634-637.
90. Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, et al. (2000) Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ* 7(12):1166-1173.
91. Hanada M, Aimé-Sempé C, Sato T, et al. (1995) Structure-function analysis of Bcl-2 protein. Identification of conserved domains important for homodimerization with Bcl-2 and heterodimerization with Bax. *J Biol Chem* 270(20):11962-11969.

92. Oltvai ZN, Milliman CL and Korsmeyer SJ (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74(4):609-619.
93. Schuler M and Green DR (2001) Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans* 29(Pt 6):684-688.
94. Haupt S, Berger M, Goldberg Z, et al. (2003) Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci* 116(Pt 20):4077-4085.
95. Deng X, Gao F, Flagg T, et al. (2006) Bcl2's flexible loop domain regulates p53 binding and survival. *Mol Cell Biol* 26(12):4421-4434.
96. Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, et al. (1997) Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 139(5):1281-1292.
97. Nechushtan A, Smith CL, Lamensdorf I, et al. (2001) Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *J Cell Biol* 153(6):1265-1276.
98. Griffiths GJ, Dubrez L, Morgan CP, et al. (1999) Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol* 144(5):903-914.
99. Yang E and Korsmeyer SJ (1996) Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* 88:386-401.
100. Nagata S and Goldstein P (1995) The Fas Death Factor. *Science* 267: 1449-1456.

101. Lichter P, Walczak H, Weitz S, et al. (1992). The human APO-1 (APT) antigen maps to 10q23, a region that is syntenic with mouse chromosome 19. *Genomics* 14(1):179–180.
102. Inazawa J, Itoh N, Abe T, et al. (1992) Assignment of the human Fas antigen gene (Fas) to 10q24.1. *Genomics* 14(3):821–822.
103. Oehm A, Behrmann I, Falk W, et al. (1992) Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J Biol Chem* 267:10709-10715.
104. Itoh N, Yonehara S, Ishii A, et al. (1991) The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66:233-243.
105. Cheng J, Zhou T, Liu C, et al. (1994) Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 263:1759-1762.
106. Ramaswamy M, Cleland SY, Cruz AC, et al. (2009) Many checkpoints on the road to cell death: regulation of Fas-FasL interactions and Fas signaling in peripheral immune responses. *Results Probl Cell Differ* 49:17-47.
107. Herrero R, Kajikawa O, Matute-Bello G, et al. (2011) The biological activity of FasL in human and mouse lungs is determined by the structure of its stalk region. *J Clin Invest* 121(3):1174-1190.

108. Kavurma MM and Khachigian LM (2003) Signaling and transcriptional control of Fas ligand gene expression. *Cell Death Differ* 10(1):36-44.
109. Janeway, C., Travers, P. Walport, M., et al. (2001) *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. New York, New York: Garland Publishing. p. 214-215, 313-314.
110. Sheikh MS and Fornace AJ (2000) Death and decoy receptors and p53-mediated apoptosis. *Leukemia* 14(8):1509–1513.
111. Hueber, A.-O, Zornig, M., Lyon, D., et al. (1997) Requirement for the CD95 Receptor-Ligand Pathway in c-Myc-Induced Apoptosis. *Science* 278:1305-1309.
112. Israels LG and Israels ED (1999) Apoptosis. *Oncologist* 4(4):332-339.
113. Müschen M, Warskulat U and Beckmann MW (2000) Defining CD95 as a tumor suppressor gene. *J Mol Med (Berl)* 78(6):312-325. Review.
114. Andersen MH, Schrama D, Thor Straten P, et al. (2006). "Cytotoxic T cells". *J Invest Dermatol* 126(1):32–41.
115. Stuart PM, Griffith TS, Usui N, et al. (1997) CD95 ligand (FasL)-induced apoptosis is necessary for corneal allograft survival. *J Clin Invest* 99(3):396-402.

116. Pongcharoen S, Searle RF and Bulmer JN (2004) Placental Fas and Fas ligand expression in normal early, term and molar pregnancy. *Placenta* 25(4):321-330.
117. Kauma SW, Huff TF, Hayes N, et al. (1999) Placental Fas ligand expression is a mechanism for maternal immune tolerance to the fetus. *J Clin Endocrinol Metab* 84(6):2188-2194.
118. Rogers AM, Boime I, Connolly J, et al. (1998) Maternal-fetal tolerance is maintained despite transgene-driven trophoblast expression of MHC class I, and defects in Fas and its ligand. *Eur J Immunol* 28(11):3479-3487.
119. Igney FH and Krammer PH (2005) Tumor counterattack: fact or fiction? *Cancer Immunol Immunother* 54(11):1127–1136.
120. Wajant H, Pfizenmaier K and Scheurich P (2003) Non-apoptotic Fas signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 14(1):53-66.
121. Linkermann A, Qian J, Lettau M, et al. (2005) Considering Fas ligand as a target for therapy. *Expert Opin Ther Targets* 9(1):119-134.
122. Chen L, Park SM, Tumanov AV., et al. (2010). CD95 promotes tumour growth. *Nature* 465 (7297):492–496.
123. Olsson M and Zhivotovsky B (2011) Caspases and cancer. *Cell Death Differ* 18(9):1441-1449.
124. Yip KW and Reed JC (2008) Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene* 27:6398–6406.

125. Lowe SW and Lin AW (2000) Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 21(3):485-495.
126. Fulda S (2009) Inhibitor of apoptosis proteins in hematological malignancies. *Leukemia* 23:467-476.
127. Melet A, Song K, Bucur O, et al. (2008) Apoptotic pathways in tumor progression and therapy. *Adv Exp Med Biol* 615:47-79.
128. Kerr JF, Winterford CM and Harmon BV (1994) Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73(8):2013-2026.
129. Rodriguez-Nieto S and Zhivotovsky B (2006) Role of alterations in the apoptotic machinery in sensitivity of cancer cells to treatment. *Curr Pharm Des* 12(34):4411-4425.
130. Fulda S (2009) Cell death in hematological tumors. *Apoptosis* 14(4):409-423.
131. Bustin, SA, BenesV, Nolan T, et al. (2005) Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *J Mol Endocrinol* 34:597-601.
132. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, et al. (2006) The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27:95-125.
133. Liu T, Raetz E, Moos PJ, et al. (2002) Diversity of the apoptotic response to chemotherapy in childhood leukemia. *Leukemia* 16:223-232.

134. Stahnke K, Fulda S, Friesen C, et al. (2001) Activation of apoptosis pathways in peripheral blood lymphocytes by in vivo chemotherapy. *Blood* 98:3066-3073.
135. Cario G, Stanulla M, Fine B, et al. (2005) Distinct gene expression profiles determine molecular treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 105:821-826.
136. Invernizzi R, Pecci A, Bellotti L, et al. (2001) Expression of p53, bcl-2 and ras oncoproteins and apoptosis levels in acute leukemias and myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma* 42:481-489.
137. Hess CJ, Berkhof J, Denkers F, et al. (2007) Activated Intrinsic Apoptosis Pathway Is a Key Related Prognostic Parameter in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol* 25:1209-1215.
138. Reed JC (2008) Bcl-2-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. *Blood* 111(7):3322-3330.
139. Srinivas G, Kusumakumary P, Nair MK, et al. (2000) Mutant p53 protein, Bcl-2/Bax ratios and apoptosis in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *J Cancer Res Clin Oncol* 126(1):62-67.
140. van Stijn A, Kok A, van der Pol MA, et al. (2003) A flow cytometric method to detect apoptosis-related protein expression in minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 17:780-786.
141. Prokop A, Wieder T, Sturm I, et al. (2000) Relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia is associated with a decrease of the Bax/Bcl-2

ratio and loss of spontaneous caspase-3 processing in vivo. *Leukemia* 14:1606-1613.

142. Aref S, Salama O, Al-Tonbary Y, et al. (2004) Assessment of Bcl-2 Expression as Modulator of Fas Mediated Apoptosis in Acute Leukemia. *Hematology* 9:113-121.

143. Findley H, Gu L, Yeager A, et al. (1997) Expression and regulation of Bcl-2, Bcl-x1, and Bax correlate with p53 status and sensitivity to apoptosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 89:2986-2993.

144. Coustan-Smith E, Kitanaka A, Pui CH, et al. (1996) Clinical relevance of BCL-2 overexpression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 87(3):1140-1146.

145. Campos L, Rouault JP, Sabido O, et al. (1993) High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Blood* 81(11):3091-3096.

146. Tóthová E, Fricova M, Stecová N, et al. (2002) High expression of Bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Neoplasma* 49(3):141-144.

147. Braes J, Schneiderat P, Schoch C, et al. (2004) Functional analysis of apoptosis induction in acute myeloid leukaemia-relevance of karyotype and clinical treatment response. *Br J Haematol* 126:338-347.

148. Wojcik I, Szybka M, Golanska E, et al. (2005) Abnormalities of the P53, MDM2, BCL2 and BAX genes in acute leukemias. *Neoplasma* 52(4): 318–324.

149. Menendez P, Vargas A, Bueno V, et al. (2004) Quantitative analysis of bcl-2 expression in normal and leukemic human B-cell differentiation. *Leukemia* 18(3):491–498.
150. Campana D, Coustan-Smith E, Manabe A, et al. (1993) Prolonged survival of B-lineage acute lymphoblastic leukemia cells is accompanied by overexpression of bcl-2 protein. *Blood* 81(4):1025–1031.
151. Hogarth AL and Hall GA (1999) Increased BAX expression is associated with an increased risk of relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 93:2671-2678.
152. Narayan S, Chandra J, Sharma M, et al. (2007) Expression of apoptosis regulators Bcl-2 and Bax in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Hematology* 12:39-43.
153. Uckun FM, Yang Z, Sather H, et al. (1997) Cellular Expression of Antiapoptotic BCL-2 Oncoprotein in Newly Diagnosed Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: A Children's Cancer Group Study. *Blood* 89(10):3769-3777.
154. Gala JL, Vermynen C, Cornu G, et al. (1994) High expression of bcl-2 is the rule in acute lymphoblastic leukemia, except in Burkitt subtype at presentation, and is not correlated with the prognosis. *Ann Haematol* 69:17-24.
155. Mata JF, Silveira VS, Mateo EC, et al. (2010) Low mRNA expression of the apoptosis-related genes CASP3, CASP8, and FAS is associated with low induction treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Pediatric Blood and Cancer* 55(1):100–107.

156. Carroll WL, Bhojwani D, Min DJ, et al. (2003) Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 102-131.
157. Ching-Hon Pui, William L. Carroll, et al. (2011) Risk Stratification, and Therapy of Pediatric Acute Leukemias: An Update. *J Clin Oncol* 29:551-565.
158. Aricò M, Valsecchi MG, Rizzari C, et al. (2008) Long-term results of the AIEOP-ALL-95 TRIAL for childhood acute lymphoblastic leukemia: Insight on the prognostic value of DNA Index in the framework of Berlin-Frankfurt-Muenster-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 26:283-289.
159. Paulsson K and Johansson B (2009) High hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 48(8):637–660.
160. Pullarkat V, Slovak ML, Kopecky KJ, et al. (2008) Impact of cytogenetics on the outcome of adult acute lymphoblastic leukemia: results of Southwest Oncology Group 9400 study. *Blood* 111(5):2563–2572.
161. Moorman AV, Chilton L, Wilkinson J, et al (2010) A population-based cytogenetic study of adults with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 115(2):206–214.
162. Zhang Y, Lu J, van den Berghe J, et al. (2002) Increased incidence of spontaneous apoptosis in the bone marrow of hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Exp Hematol* 30(4):333-339.
163. Talamo A, Marazzi A, Rovo A, et al. (2012) High hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia in adults shows clonal heterogeneity and

chromosomal instability at diagnosis and during the course of the disease. *Ann Hematol* 91(5):793-796.

164. Salzer WL, Devidas M, Carroll WL, et al. (2010) Long-term results of the pediatric oncology group studies for childhood acute lymphoblastic leukemia 1984-2001: A report from the Children's Oncology Group. *Leukemia* 24:355-370.

165. Nachman JB, Heerema NA, Sather H, et al. (2007) Outcome of treatment in children with hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 110:1112-1115.

166. Pui CH, Campana D, Pei D, et al. (2009) Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation. *N Engl J Med* 360:2730-2741.

167. Pui CH, Robison LL and Look AT (2008) Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 371:1030-1043.

168. Arico M, Valsecchi MG, Camitta B, et al. (2000) Outcome of treatment in children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 42(14):998-1006.

169. Chiosea S, Krasinskas A, Cagle PT, et al. (2008) Diagnostic importance of 9p21 homozygous deletion in malignant mesotheliomas. *Modern Pathology* 21:742-747.

170. Haller F, Löbke C, Ruschhaupt M, et al. (2008) Loss of 9p leads to p16INK4A down-regulation and enables RB/E2F1-dependent cell cycle

promotion in gastrointestinal stromal tumours (GISTs). *The Journal of Pathology* 215:253–262.

171. Hallor KH, Staaf J, Jönsson G, et al. (2008) Frequent deletion of the CDKN2A locus in chordoma: analysis of chromosomal imbalances using array comparative genomic hybridisation. *British Journal of Cancer* 98:434–442.

172. Walker GJ, Flores JF, Glendening JM, et al. (1998) Virtually 100% of melanoma cell lines harbor alterations at the DNA level within CDKN2A, CDKN2B, or one of their downstream targets. *Genes Chromosomes Cancer* 22:157–163.

173. Heyman M and Einhorn S (1996) Inactivation of the p15INK4B and p16INK4 genes in hematologic malignancies. *Leukaemia and Lymphoma* 23: 235–245.

174. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, et al. (2007) Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 446:758–764.

175. Ogawa S, Hangaishi A, Miyawaki S, et al. (1995) Loss of the cyclin-dependent kinase 4- inhibitor (p16; MTS1) gene is frequent in and highly specific to lymphoid tumors in primary human hematopoietic malignancies. *Blood* 86:1548–1556.

176. Tsuzuki S, Karnan S, Horibe K, et al. (2007) Genetic abnormalities involved in t(12;21) TELAML1 acute lymphoblastic leukemia: analysis by means of array-based comparative genomic hybridization. *Cancer Science* 98: 698–706.

177. Perez-Vera P, Salas C, Montero-Ruiz O, et al. (2008) Analysis of gene rearrangements using a fluorescence in situ hybridization method in Mexican patients with acute lymphoblastic leukemia: experience at a single institution. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 184:94–98.
178. Sulong S, Moorman AV, Irving JA, et al. (2008) A comprehensive analysis of the CDKN2A gene in childhood acute lymphoblastic leukaemia reveals genomic deletion, copy number neutral loss of heterozygosity and association with specific cytogenetic subgroups. *Blood* 113:100–107.
179. Woo HY, Kim DW, Park H, et al. (2005) Molecular cytogenetic analysis of gene rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Korean Medical Science* 20:36–41.
180. Kuchinskaya E, Heyman M, Nordgren A, et al. (2011) Interphase fluorescent in situ hybridization deletion analysis of the 9p21 region and prognosis in childhood acute lymphoblastic leukaemia (ALL): results from a prospective analysis of 519 Nordic patients treated according to the NOPHO-ALL 2000 Protocol. *BJH* 152(5):615-622.
181. Nahi H, Hägglund H, Ahlgren T, et al. (2008) An investigation into whether deletions in 9p reflect prognosis in adult precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia: a multi-center study of 381 patients. *Haematologica* 93:1734-1738.
182. Heerema NA, Sather HN, Sensel MG, et al. (1999) Association of Chromosome Arm 9p Abnormalities With Adverse Risk in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: A Report From the Children's Cancer Group. *Blood* 94:1537-1544.

183. Calero Moreno TM, Gustafsson G, Garwicz S, et al. (2002) Deletion of the Ink4-locus (the p16ink4a, p14ARF and p15ink4b genes) predicts relapse in children with ALL treated according to the Nordic protocols NOPHO-86 and NOPHO-92. *Leukemia* 16:2037–2045.
184. Faderl S, Kantarjian HM, Manshouri T, et al. (1999) The prognostic significance of p16INK4a/p14ARF and p15INK4b deletions in adult acute lymphoblastic leukemia. *Clinical Cancer Research* 5:1855–1861.
185. Graf Einsiedel H, Taube T, Hartmann R, et al. (2001) Prognostic value of p16(INK4a) gene deletions in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 97:4002–4004.
186. Mirebeau D, Acquaviva C, Suci S, et al. (2006) The prognostic significance of CDKN2A, CDKN2B and MTAP inactivation in B-lineage acute lymphoblastic leukemia of childhood. Results of the EORTC studies 58881 and 58951. *Haematologica* 91:881–885.
187. Bertin R, Acquaviva C, Mirebeau D, et al. (2003) CDKN2A, CDKN2B, and MTAP gene dosage permits precise characterization of mono- and biallelic 9p21 deletions in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 37:44–57.
188. Takeuchi S, Koike M, Seriu T, et al. (1997) Homozygous deletions at 9p21 in childhood acute lymphoblastic leukemia detected by microsatellite analysis. *Leukemia* 11:1636–1640.
189. van Zutven LJ, van Drunen E, de Bont JM, et al. (2005) CDKN2 deletions have no prognostic value in childhood precursor-B acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia* 19:1281–1284.

190. Yamada et al, 1997 Deletions of p15 and/or p16 genes as a poor-prognosis factor in adult T-cell leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 15, 1778–1785).
191. Tzifi F, Economopoulou C, Gourgiotis D, et al. (2012) The Role of BCL2 Family of Apoptosis Regulator Proteins in Acute and Chronic Leukemias. *Adv Hematol* 2012:524308. doi: 10.1155/2012/524308. Epub 2011 Sep 14.
192. Wood CM, Goodman PA, Vassilev AO, et al. (2003) CD95 (APO-1/FAS) deficiency in infant acute lymphoblastic leukemia: detection of novel soluble Fas splice variants. *Eur J Haematol* 70:156-171.
193. Baryshnikov A, Polosukhira ER, Baryshnikov AYu, et al. (1999) CD95(FAS/APO-1) antigen is a new prognostic marker of blast cells of acute lymphoblastic leukemia patients. *Adv Exp Med Biol* 457:251-258.
194. Wuchter C, Karawajew L, Ruppert V, et al. (2000) Constitutive expression levels of CD95 and Bcl-2 as well as CD95 function and spontaneous apoptosis in vitro do not predict the response to induction chemotherapy and relapse rate in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Br J Haematol* 110:154-160.
195. Fulda S. (2009) Therapeutic opportunities for counteracting apoptosis resistance in childhood leukemia. *Br J Haematol* 145:441-454.
196. Fathi M, Amirghofran Z and Shahriari M (2012) Soluble Fas and Fas ligand and prognosis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Med Oncol* 29(3):2046-2052.

197. Hazar V, Berber Z, Pestereli E, et al. (2005) Clinical importance of circulating and cellular expression levels of Fas and Fas Ligand in pediatric patients with lymphoproliferative malignancies. *Pediatr Hematol-Oncol* 22:247-256.

ABSTRACT

Introduction: Acute lymphoblastic leukemia (ALL) accounts for nearly 1/3 of all pediatric malignancies and 75% of all childhood leukemias. The annual incidence of ALL has been estimated to 30 cases per million, with a peak incidence in children aged two to five years. Progress in the diagnosis with novel molecular techniques, risk classification, and treatment strategy in ALL has led to cure rates that now exceed 80%. However, a significant proportion (20%) of patients fails to respond to therapy, and treatment failure can occur even in patients with favorable prognostic features.

It has been suggested that leukemia is characterized by impaired balance between proliferation of blood cells and their capacity to undergo apoptosis.

The aim of this study was to assess the expression of the apoptosis-related genes bcl-2 and bax in childhood ALL, both at the time of diagnosis and at remission achieved post induction treatment. In addition, we measured the levels of the apoptotic receptors Fas, FasLigand, and their co-expression on patients' leukemic cells. To explore the prognostic significance of apoptosis-related genes in childhood ALL, we examined associations between expression levels and established clinical and cytogenetic disease parameters.

Materials-Methods: The study included 26 children (eighteen boys, eight girls) with newly diagnosed ALL (twenty-three B-ALL, three T-ALL). The mean age was 7.1 ± 1.2 years, the mean white blood cell count was 27.5 ± 10.6 K/ μ L and the mean hemoglobin was 9.1 ± 0.6 g/dL. All patients were diagnosed, treated and followed at the Department of Pediatric Hematology-Oncology, University Hospital of Heraklion - Crete, and they received chemotherapy according to the ALL BFM 2000 protocol.

There were 34 age-matched children who served as controls (20 children with benign blood diseases -12 with Idiopathic Thrombocytopenic Purpura, 8 with

Autoimmune Neutropenias- and 14 children with solid tumors without bone marrow infiltration).

Bone marrow specimens were obtained from all children, under informed consent signed by the parents/guardians. Cytogenetic abnormalities were examined with conventional karyotype and FISH. Disease remission following induction therapy was assessed by bone marrow microscopic evaluation and flow cytometry. Measurement of bcl-2 and bax mRNA was performed by quantitative real-time PCR, and membrane expression of Fas and Fas-L was assessed by flow cytometry in bone marrow mononuclear cells, both at diagnosis and at remission following induction chemotherapy.

Results: At diagnosis, increased level of the apoptotic bax/bcl-2 ratio was observed in children older than 10 years and with higher white blood cell count. DNA index <1.16 was associated with increased bax/bcl-2 both at diagnosis and at remission, and the del(9p) abnormality with increased bax/bcl-2 at remission. Expression of the apoptotic receptor Fas was significantly higher at remission compared to diagnosis, which might reflect enhanced sensitivity of the leukemic clone to apoptosis and response to treatment.

Conclusions: In conclusion, our study highlights the association between the apoptotic bax/bcl-2 ratio with high-risk features in children with ALL, such as older age, white blood cell count, the del(9p) abnormality and DNA index <1.16. The increase in Fas expression once remission has been achieved after induction treatment, could represent a prognostic factor of favorable response to chemotherapy and deserves further investigation. Delineation of the role of apoptosis in pathogenesis and prognosis of pediatric ALL should enable the design of novel targeted therapies.