



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ - ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών  
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑ-ΟΓΚΟΛΟΓΙΑ ΠΑΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΕΦΗΒΩΝ**



## **ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Μελέτη των πολυμορφισμών των γονιδίων *IKZF1* (rs4132601) και *CDKN2A* (rs3731217) στην Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία παιδιών και εφήβων**

**Κατσαρού Σπυριδούλα - Διονυσία  
Βιολόγος**

*Ηράκλειο, Ιούνιος 2021*

## **Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή**

1. Στειακάκη Ευτυχία - Καθηγήτρια Παιδιατρικής Αιματολογίας - Ογκολογίας (Επιβλέπουσα)
2. Γουλιέλμος Γεώργιος - Καθηγητής Γενετικής (Μοριακής Γενετικής του Ανθρώπου με έμφαση στην Παθολογία)
3. Ποντίκογλου Χαράλαμπος - Αναπληρωτής Καθηγητής Αιματολογίας

*Στον πατέρα μου που λείπει,  
αλλά είναι πάντα εδώ*

*Στην οικογένειά μου*

## Πρόλογος - Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στην Κλινική Αιματολογίας - Ογκολογίας Παίδων (Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου) και στο Εργαστήριο Βιολογίας Αιματολογικών νόσων και Καρκίνου στα Παιδιά (Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης).

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους συνεργάτες στην Κλινική Αιματολογίας - Ογκολογίας Παίδων του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου και των εργαστηρίων, διότι χωρίς τη συνεισφορά τους δε θα ήταν εφικτή η πραγματοποίηση της εργασίας αυτής.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω στην Καθηγήτρια και Διευθύντρια της Κλινικής κ. Στειακάκη Ευτυχία για την επιμέλεια του θέματος και την πολύτιμη καθοδήγησή της σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας, καθώς επίσης και για την εμπιστοσύνη που έδειξε προς το πρόσωπό μου, δίνοντάς μου την ευκαιρία να ενταχθώ στην επιστημονική ομάδα του εργαστηρίου.

Συνεχίζοντας με τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τον Καθηγητή κ. Γουλιέλμο Γεώργιο για τη συμβολή, την καθοδήγηση και τις συμβουλές του για την παρούσα ερευνητική μελέτη, όπως και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ποντίκογλου Χαράλαμπο για τη συμμετοχή και τις συμβουλές του στη μελέτη μου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Ζερβού Μαρία (Βιολόγο M.Sc-Ph.D, μέλος ΕΔΙΠ) για την πολύτιμη βοήθειά της, χωρίς την οποία δεν θα είχε περατωθεί η εργασία μου.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ οφείλω, ακόμα, στη συνάδελφό μου Λούρου Μαριλένα, υποψήφια διδάκτορα και μέλος του εργαστηρίου, τόσο για την εξαίρετη συνεργασία μας στο πειραματικό σκέλος της εργασίας μου, όσο και για τις πολύτιμες συμβουλές της και την αμέριστη βοήθεια που μου προσέφερε. Η καθοδήγηση, η συμπαράστασή της, αλλά και η υπομονή της ήταν συνεχής καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της ερευνητικής μελέτης μου και την ευχαριστώ θερμά γι' αυτό.

Τέλος, ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στους γονείς μου, Μαρία και Μάνθο, γιατί ανέκαθεν βρίσκονταν στο πλευρό μου, στηρίζοντάς με σε κάθε μου προσπάθεια. Ήταν πάντα για μένα οι ρίζες που με κρατούν σταθερή στις αρχές με τις οποίες με μεγάλωσαν και με έκαναν τον άνθρωπο που είμαι σήμερα και με αυτές ελπίζω να συνεχίσω να πορεύομαι. Ακόμα, ευχαριστώ θερμά και τον αδελφό μου, Δημήτρη, για τη βοήθεια, τις συμβουλές και την αμέριστη συμπαράσταση που μου προσέφερε ακούραστα όλα αυτά τα χρόνια. Χωρίς την αγάπη, την υπομονή και τη στήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια δε θα είχα φτάσει εδώ.

Ηράκλειο, Ιούνιος 2021

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

---

	Σελίδα
<b>Περίληψη</b>	1
<b>Abstract</b>	3
<b>Συντομογραφίες</b>	5
<b>1. Εισαγωγή</b>	
1.1. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΗΣ ΠΑΙΔΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΦΗΒΙΚΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ	7
1.1.1. Γενικά	7
1.1.2. Διαφορές καρκίνου παιδικής ηλικίας με ενηλίκων	7
1.1.3. Παράγοντες κινδύνου και αιτίες καρκίνου στα παιδιά και τους εφήβους	8
1.2. ΟΞΕΙΑ ΛΕΜΦΟΒΛΑΣΤΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ	9
1.2.1. Γενική περιγραφή	9
1.2.2. Επιδημιολογία	9
1.2.3. Αιτιολογία	9
1.2.4. Εμβρυϊκή προέλευση	12
1.2.5. Παθογενετικός μηχανισμός	13
1.2.6. Ταξινόμηση	16
1.2.7. Κλινική εικόνα	18
1.2.8. Θεραπεία	19
1.3. ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ	21
1.3.1. Γενικά	21
1.3.2. Γενετικοί πολυμορφισμοί στον καρκίνο	22
1.4. ΓΟΝΙΔΙΑ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ	23
1.4.1. <i>IKZF1</i>	23
1.4.2. <i>CDKN2A</i>	24
1.4.3. Γενετικοί πολυμορφισμοί στα γονίδια <i>IKZF1</i> και <i>CDKN2A</i>	26
<b>2. Σκοπός της μελέτης</b>	27
<b>3. Υλικά και Μέθοδοι</b>	
3.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ (ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ)	30
3.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ (ΟΜΑΔΑ ΑΣΘΕΝΩΝ)	31
3.3. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA	32
3.4. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	33
3.4.1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για τη μελέτη του πολυμορφισμού rs4132601 του γονιδίου <i>IKZF1</i>	35
3.4.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για τη μελέτη του πολυμορφισμού rs3731217 του γονιδίου <i>CDKN2A</i>	35
3.5. ΕΝΖΥΜΑ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ	36
3.5.1. Πέψη με το περιοριστικό ένζυμο <i>MboI</i> για τη μελέτη του πολυμορφισμού rs4132601 του γονιδίου <i>IKZF1</i>	36

---

---

3.5.2.	Πέψη με το περιοριστικό ένζυμο <i>MnaI</i> για τη μελέτη του πολυμορφισμού rs3731217 του γονιδίου <i>CDKN2A</i>	37
3.6.	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	37
<b>4</b>	<b>Αποτελέσματα</b>	
4.1.	Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ rs4132601 ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>IKZF1</i> ΣΤΗΝ ΟΛΑ ΠΑΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΕΦΗΒΩΝ	40
4.2.	Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ rs3731217 ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>CDKN2A</i> ΣΤΗΝ ΟΛΑ ΠΑΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΕΦΗΒΩΝ	41
<b>5.</b>	<b>Συζήτηση</b>	43
	<b>Χρηματοδότηση</b>	49
<b>6.</b>	<b>Βιβλιογραφία</b>	50

---

## Περίληψη

Τίτλος εργασίας: Μελέτη των πολυμορφισμών των γονιδίων *IKZF1* (rs4132601) και *CDKN2A* (rs3731217) στην Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία παιδιών και εφήβων

Κατσαρού Σπυριδούλα - Διονυσία

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

1. Στειακάκη Ευτυχία - Καθηγήτρια Παιδιατρικής Αιματολογίας - Ογκολογίας (Επιβλέπουσα)
2. Γουλιέλμος Γεώργιος – Καθηγητής Γενετικής (Μοριακής Γενετικής του Ανθρώπου με έμφαση στην Παθολογία)
3. Ποντίκογλου Χαράλαμπος – Αναπληρωτής Καθηγητής Αιματολογίας

Ημερομηνία: Ιούνιος 2021

Ο καρκίνος είναι η δεύτερη αιτία θανάτου στην παιδική ηλικία, μετά τα ατυχήματα, και η πρώτη αιτία θανάτου σχετιζόμενη με νόσο. Η Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (ΟΛΛ) είναι η πιο συχνή νεοπλασματική νόσος της παιδικής ηλικίας και αποτελεί το 75% περίπου των νέων περιπτώσεων λευχαιμίας κάθε χρόνο. Η νόσος είναι το αποτέλεσμα της διαταραχής της κυτταρικής ανάπτυξης και διαφοροποίησης του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου. Ο λευχαιμικός κλώνος που δημιουργείται αυτοανανεώνεται, αδυνατεί να εξελιχθεί προς ώριμες μορφές λευκών αιμοσφαιρίων κι έτσι, παρατηρείται άθροιση βλαστών στο μυελό των οστών και τελικά, καταστολή της φυσιολογικής αιμοποίησης.

Μέχρι πρότινος, για τη διάγνωση και ταξινόμηση της νόσου χρησιμοποιούνταν κυτταρογενετικές τεχνικές (π.χ. καρυότυπος, *in situ* υβριδισμός) για την ανίχνευση χρωμοσωμικών ανωμαλιών. Τις τελευταίες δεκαετίες μέσα από πολυάριθμες μελέτες έχει προκύψει γνώση για την παθογένεση της ΟΛΛ, η οποία οφείλεται σε μια σειρά γενετικών αλλαγών που περιλαμβάνουν διάφορα κυτταρογενετικά συμβάντα, κάποια από τα οποία έχουν συσχετισθεί με την πρόγνωση και την ανταπόκριση στην εκάστοτε θεραπεία. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια διάφορες μέθοδοι γενετικής ανάλυσης χρησιμοποιούνται και πλέον έχουν αναδείξει το σπουδαίο ρόλο των γενετικών πολυμορφισμών στη διαδικασία της λευχαιμογένεσης.

Πρόσφατες έρευνες έχουν ανιχνεύσει ισχυρή σύνδεση μεταξύ κληρονομούμενων γενετικών πολυμορφισμών και ευαισθησίας για ανάπτυξη ΟΛΛ, συμπεριλαμβανομένων και SNPs στα γονίδια *IKZF1* και *CDKN2A*, μεταξύ άλλων. Το γονίδιο *IKZF1* κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη IKAROS που αποτελεί σημαντικό μεταγραφικό παράγοντα και εμπλέκεται στη διαδικασία της αιμοποίησης. Αποτελεί κύριο ρυθμιστή της διαφοροποίησης των λεμφοκυττάρων και ογκοκατασταλτικό

γονίδιο. Ο ρόλος της πρωτεΐνης έχει ερευνηθεί εκταταμένα και έχει διαπιστωθεί η παθογενετική της σχέση με διάφορα νοσήματα. Το γονίδιο *CDKN2A* κωδικοποιεί για δύο διαφορετικές πρωτεΐνες, τις p16<sup>INK4a</sup> και p14<sup>ARF</sup>. Ανήκει στην ομάδα των ογκοκατασταλτικών γονιδίων και οι πρωτεΐνες είναι αναστολείς του κυτταρικού κύκλου. Συγκεκριμένα, η p14<sup>ARF</sup>, που αποτελεί και το πεδίο μελέτης σε αυτήν την εργασία, είναι κύριος ρυθμιστής της πρωτεΐνης p53.

Πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν ασχοληθεί με τη διερεύνηση της πιθανής συσχέτισης της ύπαρξης πολυμορφισμών αυτών των γονιδίων με την εμφάνιση ΟΛΛ τόσο σε παιδιά, όσο και σε ενήλικες. Η παρούσα εργασία κινήθηκε στο ίδιο πλαίσιο και μελέτησε τη συχνότητα εμφάνισης του πολυμορφισμού rs4132601 του γονιδίου *IKZF1* και rs3731217 του γονιδίου *CDKN2A* σε παιδιά και εφήβους με ΟΛΛ σε σύγκριση με υγιή άτομα. Σκοπός της ερευνητικής εργασίας ήταν η διερεύνηση πιθανής συσχέτισης της εμφάνισης κάποιου γονοτύπου ή αλληλομόρφου με την εκδήλωση της νόσου.

Στη μελέτη συμμετείχαν 50 παιδιά και έφηβοι με ΟΛΛ, που αποτέλεσαν την ομάδα ασθενών και 91 υγιή άτομα, που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου. Γεωμικό DNA απομονώθηκε από δείγματα περιφερικού αίματος και των δύο ομάδων και οι υπό μελέτη γενετικοί τόποι πολλαπλασιάστηκαν με τη μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR). Στη συνέχεια, το προϊόν της PCR επώαστηκε με το κατάλληλο για τον κάθε γενετικό πολυμορφισμό περιοριστικό ένζυμο και ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης, ώστε να γίνει η γονοτύπηση του κάθε ατόμου.

Μετά τη στατιστική τους ανάλυση τα αποτελέσματα δεν έδειξαν την ύπαρξη συσχέτισης κάποιου γονοτύπου ή αλληλομόρφου για κανέναν από τους δύο πολυμορφισμούς με την εμφάνιση της νόσου. Ο ρόλος των συγκεκριμένων πολυμορφισμών στην ΟΛΛ είναι ακόμα υπό διερεύνηση, καθώς τα δεδομένα είναι αντικρουόμενα σε αρκετές περιπτώσεις. Παρόλο που τα περισσότερα δεδομένα στην ΟΛΛ της παιδικής και εφηβικής ηλικίας δείχνουν την ύπαρξη συσχέτισης του πολυμορφισμού rs4132601 του γονιδίου *IKZF1* και του rs3731217 του γονιδίου *CDKN2A* με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου, παρουσιάζονται αρκετές μελέτες οι οποίες υποστηρίζουν το αντίθετο, στις οποίες συγκαταλέγεται και η παρούσα. Επομένως, θα παρουσίαζε εξαιρετικά μεγάλο ενδιαφέρον η περαιτέρω μελέτη των συγκεκριμένων SNPs, αλλά και γενικότερα διαφόρων άλλων γενετικών πολυμορφισμών, με απώτερο σκοπό την αποσαφήνιση του ρόλου τους στην ανάπτυξη της Οξείας Λεμφοβλαστικής Λευχαιμίας παιδιών και εφήβων.

Λέξεις κλειδιά: Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία, πολυμορφισμοί, *IKZF1*, *CDKN2A*



## Abstract

Title: *IKZF1* (rs4132601) and *CDKN2A* (rs3731217) polymorphisms in children and adolescents with Acute Lymphoblastic Leukaemia

By: Katsarou Spyridoula - Dionysia

Three Member Evaluating Committee:

1. Stiakaki Eftichia - Professor of Pediatric Hematology- Oncology (Supervisor)
2. Goulielmos George - Professor of Human Molecular Genetics
3. Pontikoglou Charalampos - Associate Professor of Haematology

Date: June 2021

Cancer is the second leading cause of death in childhood and the leading cause of disease-related mortality. Acute lymphoblastic leukaemia (ALL) is the most prevalent paediatric malignancy, accounting for 75% of new leukaemia diagnoses per year. The disease arises from the disruption of normal cell growth and differentiation of the haematopoietic stem cell. The leukaemic clone that is created is characterised by self-renewal, inability to develop into more mature forms of white blood cells and thus, lymphoblasts accumulate in the bone marrow and eventually suppress normal haematopoiesis.

Until recently, cytogenetic techniques for detecting chromosomal abnormalities were used to diagnose and classify the disease. Over the last decades, numerous studies have provided information on the pathogenesis of ALL, which arises from a series of genetic alterations that include various cytogenetic aberrations, some of which have prognostic value and are associated with response to therapy. However, over the past years the importance of genetic polymorphisms in leukaemogenesis has been highlighted.

Several recent studies have identified inherited polymorphisms that are overrepresented in ALL patients compared with non-ALL controls, including SNPs in *IKZF1* and *CDKN2A*, among others. The *IKZF1* gene encodes IKAROS protein, an essential transcription factor in haematopoiesis. It is a key regulator of lymphoid differentiation and has been established as one of the most clinically relevant tumour suppression genes in ALL. The role of IKAROS has been extensively studied revealing its pathogenetic and clinical impact on various human diseases. The *CDKN2A* gene is a recognised tumour suppressor and encodes two distinct proteins, p16<sup>INK4a</sup> and p14<sup>ARF</sup>, that induce cell cycle arrest. In particular, p14ARF, which is in the context of this study, is a key regulator of p53.

Many researchers have investigated the possible association of the genetic polymorphisms in these genes with the occurrence of ALL in both children and adults. The present research was in the same context and studied the incidence of

rs4132601 polymorphism in the *IKZF1* gene and rs3731217 in the *CDKN2A* gene in children and adolescents with ALL compared to healthy individuals. The purpose of the research was to investigate the possible association of the genotypes or alleles with the occurrence of the disease.

The study was comprised of 50 children and adolescents with ALL and 91 healthy controls. Genomic DNA was isolated from peripheral blood samples of both groups and both genetic loci were amplified using the Polymerase Chain Reaction (PCR) method. The PCR products were then incubated with the restriction enzyme appropriate for each genetic polymorphism and electrophorated on agarose gel in order to detect the genotype of each individual.

Statistical analysis revealed no correlation of any genotype or allele for either of the two polymorphisms with the occurrence of the disease. The role of these polymorphisms in ALL is still under investigation, as the data are contradictory in several cases. Although most data show an association between rs4132601 polymorphism in the *IKZF1* gene and rs3731217 in the *CDKN2A* gene with an increased risk of developing ALL in childhood, there are several studies supporting the opposite. Therefore, it would be of great interest to further study these specific SNPs, as well as other genetic polymorphisms, with the ultimate goal of clarifying their role in the development of Acute Lymphoblastic Leukemia in children and adolescents.

Key words: Acute Lymphoblastic Leukaemia, polymorphisms, IKZF1, CDKN2A

## Συντομογραφίες

- OAA:** Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία
- ΚΝΣ:** Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
- NGS:** Next-generation sequencing (αλληλούχηση επόμενης γενιάς)
- OMA:** Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία
- LSC:** Leukaemic Stem Cell (λευχαιμικό αρχέγονο κύτταρο)
- EFS:** Event-free survival (επιβίωση ελεύθερη συμβαμάτων)
- ITP:** Immune Thrombocytopenia (θρομβοπενία ανοσολογικής αρχής)
- MRD:** Minimal Residual Disease (ελάχιστη υπολειπόμενη νόσος)
- HSCT:** Haematopoietic Stem Cell Transplant (μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων)
- CAR-T cell:** Chimeric Antigen Receptor - T cell (χμιαρικοί αντιγονικοί υποδοχείς T-κυττάρων)
- B-OAA:** Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία Β κυτταρικής σειράς
- SNP:** Single Nucleotide Polymorphism (μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός)
- PCR:** Polymerase Chain Reaction (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης)
- RFLP:** Restriction Fragment Length Polymorphisms (πολυμορφισμοί μήκους τμημάτων περιορισμού)
- HDAC:** Histone deacetylase (απακετυλάση ιστονών)
- CDKI:** Cyclin-dependent kinase inhibitor (αναστολέας κυκλινο-εξαρτώμενης κινάσης)
- BCP-ALL:** B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia (Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία από άωρο-προγονικό Β-κύτταρο)
- AYAs:** Adolescents and Young Adults (έφηβοι και νεαροί ενήλικες)
- UTR:** Untranslated region (αμετάφραστη περιοχή)
- DLBCL:** diffuse large B-cell lymphoma (διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β-κύτταρα)
- OS:** overall survival (χρόνος ολικής επιβίωσης)

# **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

## **1.1. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΗΣ ΠΑΙΔΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΦΗΒΙΚΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ**

### **1.1.1. Γενικά**

Οι νεοπλασίες είναι σπάνια νοσήματα στα παιδιά και τους εφήβους και αποτελούν λιγότερο από το 1% των περιπτώσεων καρκίνου σε όλες τις ηλικίες. Παρόλ' αυτά, ο καρκίνος είναι η δεύτερη αιτία θανάτου στην παιδική ηλικία, μετά τα ατυχήματα, και η πρώτη αιτία θανάτου σχετιζόμενη με νόσο στις ανεπτυγμένες χώρες [1]. Κάθε χρόνο περίπου 300.000 παιδιά και έφηβοι (ηλικίας έως 19 ετών) παγκοσμίως διαγιγνώσκονται με κάποια μορφή καρκίνου [2]. Στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής εκτιμάται ότι το 2020 11.050 παιδιά (ηλικίας έως 14 ετών) και 5.800 έφηβοι (ηλικίας 15 έως 19 ετών) διεγνώστησαν με καρκίνο και ότι από αυτούς οι 1.190 και 540, αντίστοιχα, κατέληξαν από τη νόσο [1]. Στην Ελλάδα οι διαγνώσεις καρκίνου στα παιδιά και τους εφήβους ανέρχονται σε 300 περίπου κάθε έτος.

Τον πιο συχνό τύπο καρκίνου της παιδικής ηλικίας (έως 14 ετών) αποτελούν οι λευχαιμίες που αντιπροσωπεύουν το 28% των περιπτώσεων, ακολουθούν οι όγκοι του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) (26%), τα λεμφώματα (non Hodgkin και Hodgkin) (12%), το νευροβλάστωμα (6%), το νεφροβλάστωμα (5%), οι όγκοι οστών (4%), τα σαρκώματα μαλακών μορίων (π.χ. ραβδομυοσάρκωμα) (3%), οι όγκοι από αρχέγονα γεννητικά κύτταρα (3%) κ.ά. [1].

Οι τύποι καρκίνου που εμφανίζονται στους εφήβους (15-19 ετών), αλλά και η κατανομή τους διαφέρει σημαντικά σε σχέση με τα παιδιά. Παραδείγματος χάριν, στους εφήβους τον πιο συχνό τύπο αποτελούν οι όγκοι εγκεφάλου και ΚΝΣ (21%), ακολουθούμενοι από τα λεμφώματα (20%), στα οποία σε αντίθεση με τα παιδιά κυριαρχούν τα Hodgkin. Οι λευχαιμίες κατέχουν ποσοστό της τάξης του 13% και ακολουθούν οι όγκοι από αρχέγονα γεννητικά κύτταρα και γονάδων, όπως και ο καρκίνος θυρεοειδούς με 11%. Τέλος, μικρότερο, αλλά σημαντικό ποσοστό κατέχουν οι όγκοι οστών (5%) και το μελάνωμα (4%) [1].

### **1.1.2. Διαφορές καρκίνου παιδικής ηλικίας με ενηλίκων**

Θεμελιώδεις είναι οι διαφορές που διαχωρίζουν τον καρκίνο της παιδικής ηλικίας από αυτόν των ενηλίκων. Αρχικά, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η συχνότητα εμφάνισης νεοπλασίας στα παιδιά είναι κατά πολύ μικρότερη από αυτήν που παρατηρείται στον πληθυσμό των ενηλίκων. Πέρα από αυτό όμως, και οι τύποι καρκίνου που αναπτύσσουν τα παιδιά και οι ενήλικες διαφέρουν σημαντικά. Στον ενήλικο πληθυσμό κυριαρχούν οι νεοπλασίες επιθηλιακής προέλευσης, οι οποίες είναι αρκετά σπάνιες στα παιδιά και τους εφήβους. Ωστόσο, ακόμα και στην περίπτωση καρκίνου ίδιου ιστολογικού τύπου παρατηρούνται διαφορές βιολογικής φύσεως, παραδείγματος χάριν μοριακών και ογκογενετικών μηχανισμών ή ανταπόκρισης στη θεραπεία [3]. Ειδικά για το τελευταίο, τα παιδιά, με ελάχιστες εξαιρέσεις, ανταποκρίνονται πολύ καλύτερα στη θεραπεία και ανέχονται καλύτερα εντατικότερες θεραπείες σε σχέση με τους ενήλικες. Βέβαια, αυτές οι εντατικές θεραπείες που συχνά δίνονται στα παιδιά δημιουργούν και την ανάγκη μακροχρόνιας παρακολούθησης για απώτερες επιπλοκές.

Οι ραγδαίες εξελίξεις των τελευταίων ετών στο πεδίο της Βιολογίας, όπως και της ανάπτυξης νέων τεχνολογιών, π.χ. next-generation sequencing (NGS), έχουν συμβάλει ουσιαστικά στην κατανόηση των μηχανισμών καρκινογένεσης, καθώς και των μοριακών προτύπων από τα οποία οι νόσοι χαρακτηρίζονται. Ακριβώς λόγω των παραπάνω έχουν αναδειχθεί στοιχεία που διαφοροποιούν τον καρκίνο του παιδιατρικού πληθυσμού από αυτόν των ενηλίκων. Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι το μεταλλακτικό φορτίο που φέρουν οι παιδιατρικοί καρκίνοι είναι σημαντικά χαμηλότερο από αυτό των καρκίνων των ενηλίκων. Επίσης, ένα μεγάλο ποσοστό των καρκίνων της παιδικής ηλικίας φέρει αλλαγές σε γονίδια που κωδικοποιούν για επιγενετικούς ρυθμιστές και σύμπλοκα χρωματίνης [4,5]. Οι μεταλλαγές σε γονίδια που αφορούν επιγενετικούς τροποποιητές είναι πολύ πιο συχνές, σε σχέση με εκείνες των ρυθμιστών της μεταγραφής ή των επιδιορθωτικών μηχανισμών του DNA [5]. Ένα ακόμα στοιχείο που διαφοροποιεί τον παιδιατρικό καρκίνο από αυτόν των ενηλίκων είναι η επιγενετική απορρύθμιση, που φαίνεται να κυριαρχεί στον πρώτο, σε σύγκριση με τις πολλαπλές γενετικές μεταλλάξεις, που παρατηρούνται στον δεύτερο[6].

### **1.1.3. Παράγοντες κινδύνου και αιτίες καρκίνου στα παιδιά και τους εφήβους**

Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου στους ενήλικες συνήθως περιλαμβάνουν μια μεγάλη λανθάνουσα περίοδο από την έναρξη της έκθεσης στον παράγοντα έως την κλινική εμφάνιση της νόσου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το κάπνισμα, που είναι ο κυριότερος παράγοντας κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα, με τη νόσο να είναι συνήθως το αποτέλεσμα χρόνιας έκθεσης στο καρκινογόνο. Η εξήγηση αυτή, όμως, δεν μπορεί να ισχύσει στην περίπτωση των παιδιών και των εφήβων, κυρίως λόγω είτε της παντελούς έλλειψης έκθεσης σε περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου, είτε μη επαρκούς χρονικού διαστήματος έκθεσης σε αυτούς [7]. Επομένως, τα ογκογενετικά συμβάντα που χαρακτηρίζουν τις νεοπλασίες των ενηλίκων διαφέρουν από αυτά των παιδιών. Εύκολα μπορεί κανείς, λοιπόν, να αντιληφθεί πως οι απαραίτητες ογκογενετικές διαδικασίες θα πρέπει να συμβούν κατά τη διάρκεια της κύησης και της ελάχιστης περιόδου έως τη διάγνωση.

Όπως προκύπτει, λοιπόν, από τα παραπάνω ο ρόλος των περιβαλλοντικών και άλλων εξωγενών παραγόντων στην ανάπτυξη καρκίνου της παιδικής ηλικίας δεν είναι πλήρως τεκμηριωμένος, ενώ ελάχιστα είναι τα εξωγενή αίτια που φαίνεται να σχετίζονται με την εμφάνιση της νόσου. Μερικά από αυτά είναι η έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία, η χρήση χημειοθεραπευτικών παραγόντων και άλλων φαρμάκων, οι λοιμώξεις κ.ά. [7].

Αντίθετα, ο καρκίνος στα παιδιά και τους εφήβους προκαλείται κατά κύριο λόγο από αλλαγές στο γενετικό τους υλικό. Αυτά τα ογκογενετικά συμβάντα μπορούν να διακριθούν στις εξής κατηγορίες: α) τις επίκτητες (ή σωματικές) αλλαγές, που περιορίζονται στα κακοήθη κύτταρα και δεν εντοπίζονται στα φυσιολογικά και εφόσον συμβαίνουν στα σωματικά κύτταρα δεν μπορούν να κληρονομηθούν / περάσουν από γενιά σε γενιά, και β) τις κληρονομούμενες (ή γαμετικές) μεταλλάξεις, που εντοπίζονται αρχικά στα γαμετικά κύτταρα κι από εκεί μεταβιβάζονται σε όλα τα κύτταρα του οργανισμού που δημιουργείται από αυτούς τους γαμέτες. Συνολικά, είναι η μειονότητα των τύπων καρκίνου της παιδικής ηλικίας που οφείλονται σε

καθαρά κληρονομική προδιάθεση, ενώ στην πλειονότητα των περιπτώσεων κυριαρχούν οι επίκτητες αλλαγές στο DNA, με την αιτία τους όμως να παραμένει άγνωστη [8,9].

## **1.2. ΟΞΕΙΑ ΛΕΜΦΟΒΛΑΣΤΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ**

### **1.2.1. Γενική περιγραφή**

Η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ΟΛΛ) (acute lymphoblastic leukaemia, ALL) αποτελεί την πιο συχνή νεοπλασία της παιδικής ηλικίας και από τις συχνότερες στους εφήβους [1]. Είναι νεοπλασματική νόσος που προσβάλλει τον αιμοποιητικό ιστό και παρουσιάζει ένα ευρύ φάσμα κλινικών φαινοτύπων, αλλά και υποκείμενων βιολογικών μηχανισμών παθογένειάς της. Προκύπτει κατά τη διαδικασία ανάπτυξης και διαφοροποίησης του πολυδύναμου αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου, όταν σε κάποιο στάδιο λάβει χώρα κάποια κακοήθης εξαλλαγή που έχει ως αποτέλεσμα τη διαταραχή της κυτταρικής ανάπτυξης και διαφοροποίησης, με την τελευταία να διακόπτεται στα πρώιμα στάδια. Έτσι, ο λευχαιμικός κλώνος πολλαπλασιάζεται ανεξέλεγκτα, αυτοανανεώνεται, παρουσιάζει αντίσταση σε αποπτωτικά σήματα, καθώς και αδυναμία εξέλιξης προς ώριμες μορφές λευκών αιμοσφαιρίων, με αποτέλεσμα την άθροιση βλαστών στο μυελό των οστών και τελικά την καταστολή της φυσιολογικής αιμοποίησης [10,11].

### **1.2.2. Επιδημιολογία**

Στην παιδική ηλικία η λευχαιμία αποτελεί το 28% των περιπτώσεων καρκίνου, ενώ στους εφήβους το αντίστοιχο ποσοστό είναι 13%. Συγκεκριμένα, η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία αντιπροσωπεύει περίπου το ένα πέμπτο (21%) όλων των καρκίνων στα παιδιά και μόλις το 6% στους εφήβους [1]. Από αυτά τα περιστατικά, η ΟΛΛ αφορά περίπου το 75% των νέων περιπτώσεων λευχαιμίας [10,12]. Η μέγιστη συχνότητα εμφάνισης ΟΛΛ παρατηρείται σε παιδιά ηλικίας 2-5 ετών και μεγαλύτερη επίπτωση παρατηρείται στα αγόρια σε σχέση με τα κορίτσια, με το λόγο των ποσοστών συχνότητας να κυμαίνεται μεταξύ 1,1:1 και 1,3:1 αντίστοιχα [10,12,13].

### **1.2.3. Αιτιολογία**

Όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα 1.1.3. η ακριβής αιτιολογία της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας, όπως και των υπόλοιπων τύπων καρκίνου της παιδικής ηλικίας παραμένει μέχρι και σήμερα αδιευκρίνιστη. Η πλειονότητα των περιπτώσεων αφορά επίκτητες αλλαγές στο γενετικό υλικό, με την αιτία όμως να είναι άγνωστη. Πληθώρα αιτιολογικών παραγόντων πιθανολογούνται, συμπεριλαμβανομένων των περιβαλλοντικών (όπως η έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία, τα χημικά, διάφορα φάρμακα και η διατροφή), γενετικών, αλλά και ιογενών παραγόντων (Εικόνα 1). Ακολούθως, θα παρουσιαστούν συνοπτικά αυτές οι τρεις ομάδες.

α) Περιβαλλοντικοί παράγοντες:

Η συμμετοχή της πρώτης κατηγορίας στην εμφάνιση της συγκεκριμένης νόσου, αλλά και γενικότερα σε διάφορες μορφές καρκίνου της παιδικής ηλικίας δεν έχει τεκμηριωθεί, καθώς δεν υποστηρίζεται από αρκετά επιδημιολογικά δεδομένα μέχρι στιγμής. Από τα παραπάνω, μόνο η έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία κατά την περίοδο της κύησης αποτελεί επιβεβαιωμένο παράγοντα κινδύνου για ανάπτυξη λευχαιμίας στην παιδική ηλικία. Αντίθετα, η μεταγεννητική έκθεση δε συσχετίζεται σταθερά με τον κίνδυνο λευχαιμίας στον παιδιατρικό πληθυσμό, καθώς τα δεδομένα από διάφορες μελέτες παρουσιάζονται αντικρουόμενα. Παραδείγματος χάριν, σε μελέτες που αφορούσαν παιδιά που επέζησαν των ατομικών βομβών στη Χιροσίμα και το Ναγκασάκι της Ιαπωνίας το 1945 στο Β΄ Παγκόσμιο Πόλεμο παρατηρήθηκε αυξημένη εμφάνιση λευχαιμίας σε βάθος χρόνου και ο κίνδυνος αυτής συσχετίστηκε θετικά με τη δόση της ακτινοβολίας. Ωστόσο, μελέτες σε παιδιά που επέζησαν του πυρηνικού ατυχήματος τέσσερις δεκαετίες αργότερα, το 1986, στο Τσερνόμπιλ της τότε Σοβιετικής Ένωσης δεν παρείχαν ισχυρά τεκμήρια για αύξηση των ποσοστών λευχαιμίας της παιδικής ηλικίας [12,13].

Ακόμα, στα παιδιά δεν έχει αποδειχθεί κάποια συσχέτιση καρκινογένεσης μετά από έκθεση σε χημικούς παράγοντες, παρά μόνο η ανάπτυξη δευτεροπαθούς νεοπλασίας σε παιδιά που υποβάλλονταν σε χημειοθεραπεία για την αντιμετώπιση πρωτοπαθούς νεοπλασματος. Ειδικότερα, αναφέρεται η περίπτωση εμφάνισης οξείας μυελογενούς λευχαιμίας (ΟΜΛ) δευτεροπαθώς που σχετίζεται με έκθεση σε αλκυλιωτικούς παράγοντες και αναστολείς της τοποϊσομεράσης II, όπως οι επιποδοφυλλοτοξίνες και οι ανθρακυκλίνες. Η τοποϊσομεράση II είναι ένα ένζυμο που καταλύει τη θραύση και επανασύνδεση των δύο κλώνων του DNA κατά την αντιγραφή του, ώστε να εισαχθούν αρνητικές υπερσπείρες και το DNA να καταστεί πιο επιρρεπές στην εκτύλιξη. Η δέσμευση αυτού του τύπου αναστολέα στο συγκεκριμένο ένζυμο εισάγει την πιθανότητα λανθασμένου ανασυνδυασμού μεταξύ των χρωμοσωμικών περιοχών που υφίστανται την ταυτόχρονη θραύση. Ο λανθασμένος αυτός ανασυνδυασμός μπορεί να οδηγήσει σε αναδιατάξεις του MLL γονιδίου, χαρακτηριστικές για ΟΜΛ που προκαλείται ύστερα από έκθεση σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες [13].

β) Γενετικοί παράγοντες:

Οι γενετικοί παράγοντες θεωρείται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην αιτιολογία της οξείας λευχαιμίας της παιδικής ηλικίας, επομένως και της ΟΛΛ, παρόλο που στη συντριπτική πλειονότητα των περιπτώσεων του καρκίνου στα παιδιά κυριαρχούν οι επίκτητες αλλαγές στο γενετικό υλικό, παρά οι κληρονομούμενες.

- Γενετικά σύνδρομα

Λίγες είναι οι περιπτώσεις (περίπου 5%) που συσχετίζονται με γενετικά σύνδρομα, όπως το σύνδρομο Down (τρισωμία 21), το σύνδρομο Bloom, η αταξία-τηλαγγειεκτασία, η νευροϊνωμάτωση τύπου I, η αναιμία Fanconi, η ιστιοκυττάρωση από κύτταρα Langerhans, το σύνδρομο Schwachman κ.ά. [10,12-14]. Χαρακτηριστικά, αναφέρεται πως στην περίπτωση του συνδρόμου Down τα παιδιά έχουν 10-20 φορές υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης τόσο ΟΛΛ, όσο και ΟΜΛ [10,13,15].

Μελέτες έχουν δείξει ότι η συχνότητα εμφάνισης λευχαιμίας είναι υψηλότερη σε οικογένειες ασθενών με λευχαιμία είτε αυτή αναπτύσσεται στην ίδια γενεά, είτε σε διαφορετικές. Τα αδέρφια παιδιών με λευχαιμία, συμπεριλαμβανομένης και της



οξείας λεμφοβλαστικής, παρουσιάζουν 2-4 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να νοσήσουν σε σχέση με το γενικό πληθυσμό. Τα μονοζυγωτικά δίδυμα αδέρφια όμως έχουν αυξημένο κίνδυνο, με την πιθανότητα να φτάνει το 25%. Ο κίνδυνος παρουσιάζεται αυξημένος μεταξύ διδύμων (μονο- και διζυγωτικών) κυρίως κατά τη βρεφική ηλικία, μειώνεται με το χρόνο και μετά την ηλικία των 7 ετών είναι παρόμοιος με αυτήν του γενικού πληθυσμού [10]. Η εμφάνιση λευχαιμίας σε μονοζυγωτικούς διδύμους ενισχύει περαιτέρω τη θεωρία που υποστηρίζει το ρόλο των γενετικών παραγόντων στην ανάπτυξη της νόσου, χωρίς όμως να αποκλείεται και η περίπτωση η νόσος να είναι το αποτέλεσμα της ταυτόχρονης έκθεσης σε μεταλλαξιογόνους περιβαλλοντικούς παράγοντες.

- Χρωμοσωμικές ανωμαλίες

Παρόλο που τα αίτια της λευχαιμογένεσης δεν είναι ακόμα πλήρως αποσαφηνισμένα φαίνεται πως ο μετασχηματισμός των αιμοποιητικών κυττάρων σε λευχαιμικά χαρακτηρίζεται σε μοριακό επίπεδο από την αλλαγή βασικών ρυθμιστικών διαδικασιών που ελέγχουν την αυτοανανέωση, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση. Αυτό μπορεί να συμβεί μέσω αλλαγής των σηματοδοτικών μονοπατιών με μεταλλάξεις που επηρεάζουν τη δραστηριότητα ή την έκφραση διαφόρων πρωτεϊνών, την έκφραση πρωτο-ογκογονιδίων, τη σίγηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων ή την έκφραση χημικών μεταγραφικών παραγόντων που προκύπτουν ύστερα από χρωμοσωμικές μετατοπίσεις. Αποτέλεσμα των μεταλλάξεων που συνέβησαν κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των λεμφοκυττάρων είναι ο ανώμαλος πολλαπλασιασμός και η διακοπή της διαφοροποίησης των κυττάρων, με τις δύο αυτές ιδιότητες να είναι χαρακτηριστικές της ΟΛΛ [10,16].

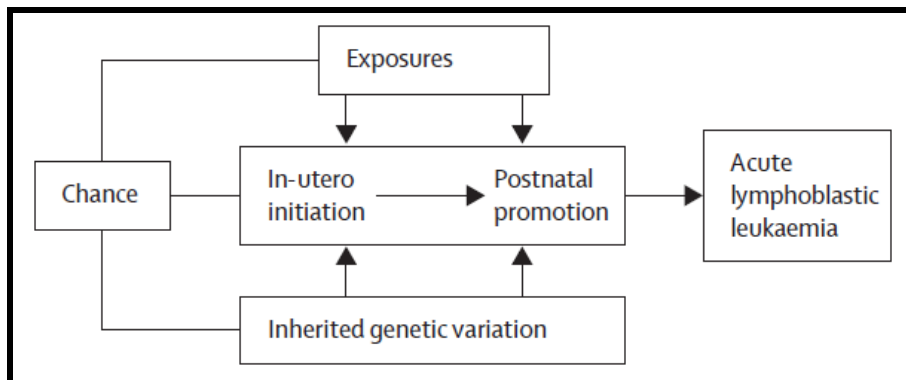
Το κύριο θέμα που αφορά πλέον την παθοβιολογία της ΟΛΛ είναι η κατανόηση των αποτελεσμάτων των γενετικών βλαβών, όσον αφορά τις επιπτώσεις στις προαναφερθείσες διαδικασίες. Η κυτταρογενετική της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας περιλαμβάνει πλήθος χρωμοσωμικών αλλοιώσεων που συμμετέχουν τόσο στην ίδια την παθογένεση, όσο και στην εξέλιξη της νόσου. Μπορεί να είναι δομικές ή αριθμητικές και σε αρκετές περιπτώσεις συναντώνται και οι δύο τύποι αλλαγών. Οι δομικές περιλαμβάνουν αμοιβαίες μετατοπίσεις, ελλείψεις, διπλασιασμούς, αναστροφές, δικεντρικά χρωμοσώματα και γενικότερα, αναδιατάξεις χρωμοσωμικών περιοχών. Οι αριθμητικές, όπως δηλώνει και το όνομά τους, περιλαμβάνουν μεταβολές στο φυσιολογικό αριθμό των χρωμοσωμάτων του ανθρώπου. Ειδικότερα, από τις δομικές ανωμαλίες οι χρωμοσωμικές μετατοπίσεις ανιχνεύονται συχνά στην ΟΛΛ, με συγκεκριμένες μετατοπίσεις να είναι χαρακτηριστικές για μοναδικούς υποτύπους της νόσου [10,14]. Ακόμη, πολύ σημαντικές είναι οι αριθμητικές αλλοιώσεις που μεταβάλλουν την πλοειδία, η οποία αποτελεί διακριτό κυτταρογενετικό χαρακτηριστικό που έχει συμβάλει στη βελτίωση της πρόβλεψης του κλινικού αποτελέσματος και του σχεδιασμού κατάλληλης θεραπείας, ανάλογα με την ομάδα κινδύνου στην οποία τοποθετείται ο εκάστοτε ασθενής [17].

γ) Ιογενείς παράγοντες:

Η υπόθεση ότι οι λοιμώξεις μπορεί να έχουν αιτιώδη ρόλο στη λευχαιμογένεση και συγκεκριμένα, στην ΟΛΛ της παιδικής ηλικίας εντοπίζεται στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα. Με αφετηρία το γεγονός ότι η λευχαιμία σε ορισμένα είδη ζώων βρέθηκε να έχει ιογενή προέλευση προτάθηκε ότι η ανάπτυξη της νόσου στα παιδιά μπορεί να οφείλεται σε κάποιον ιό, χωρίς όμως να έχει βρεθεί απόδειξη μέχρι σήμερα για τη θεωρία αυτή [18]. Ακολούθως, η εύρεση συσχέτισης μεταξύ ιογενούς λοίμωξης με την ανάπτυξη διαφόρων νοσημάτων, όπως ο ιός Epstein-Bar με τα λεμφώματα

Burkitt (ενδημικό) και Hodgkin της παιδικής ηλικίας και ο ανθρώπινος Τ-λεμφοκυτταρικός ιός HTLV-1 με λευχαιμία/λέμφωμα Τ κυττάρων στους ενήλικες, ενίσχυσε το ενδιαφέρον για αυτή τη θεωρία [10,19].

Μια υπόθεση προτάθηκε το 1988 από τον Mel Greaves, η επονομαζόμενη 'delayed-infection' hypothesis, η οποία κύριο στόχο είχε να εξηγήσει το γεγονός πως η μέγιστη συχνότητα εμφάνισης ΟΛΛ παρατηρείται σε παιδιά ηλικίας 2-5 ετών και σε κοινωνίες πιο ανεπτυγμένες οικονομικά. Σύμφωνα, λοιπόν, με την υπόθεση η λοίμωξη έχει κρίσιμο ρόλο στην προαγωγή, μέσω της ανοσολογικής απόκρισης, ενός μεταγεννητικού σφάλματος που ακολουθεί ένα ήδη υπάρχον, το οποίο σχηματίστηκε κατά την εμβρυϊκή περίοδο ανάπτυξης. Η πρόταση βασίζεται στο γεγονός ότι εξελικτικά το ανοσοποιητικό σύστημα «αναμένει» κατά τη νεογνική και βρεφική ηλικία την έκθεση σε λοιμογόνους παράγοντες και πως αυτή η έκθεση κρίνεται απαραίτητη για την προσαρμοστική οργάνωση του ανοσοποιητικού για μελλοντική αποτελεσματική απόκριση. Η απουσία ή η μειωμένη έκθεση στις λοιμώξεις μπορεί να ελαττώνει σημαντικά τη βρεφική θνητότητα, προδιαθέτει ωστόσο, το ανοσοποιητικό σύστημα σε παθολογικές αποκρίσεις ύστερα από «καθυστερημένη» έκθεση, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν την ανάπτυξη ΟΛΛ μέσω πολλαπλασιαστικού ή αποπτωτικού stress [20]. Ο κίνδυνος εμφάνισης λευχαιμίας αυξάνεται από την ύπαρξη ενός προ-λευχαιμικού κλώνου, ο οποίος δημιουργήθηκε προγεννητικά και από την ύπαρξη γενετικής προδιάθεσης, όπως αναφέρθηκε παραπάνω.



*Εικόνα 1. Σύνθεση των αιτιολογικών παραγόντων εμφάνισης οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας στην παιδική ηλικία. Έκθεση σε εξωγενείς (π.χ. λοιμώξεις) και ενδογενείς (π.χ. φλεγμονή, οξειδωτικό stress) παράγοντες, σε συνδυασμό με πιθανή γενετική προδιάθεση (π.χ. γενετικά σύνδρομα) και τον παράγοντα της τύχης οδηγούν στην ανάπτυξη ΟΛΛ στα παιδιά [21].*

#### 1.2.4. Εμβρυϊκή προέλευση

Στην περίπτωση του καρκίνου στην παιδική κυρίως, αλλά και στην εφηβική ηλικία η λανθάνουσα περίοδος που μεσολαβεί μέχρι την κλινική εκδήλωση της νόσου είναι εξαιρετικά μικρή. Αυτό υποδηλώνει πως οι ογκογενετικές διαδικασίες που θα οδηγήσουν στην ανάπτυξη του καρκίνου και εν προκειμένω στην ΟΛΛ, θα πρέπει να συμβούν κατά τη διάρκεια της κύησης και της ελάχιστης διάρκειας έως τη διάγνωση.

Η υπόθεση αυτή τα τελευταία χρόνια έχει μελετηθεί αρκετά από πολλές ερευνητικές ομάδες και έχει πλέον εδραιωθεί για διάφορους τύπους καρκίνου στον παιδιατρικό πληθυσμό, συμπεριλαμβανομένης και της ΟΛΛ.

Ο καρκίνος στον άνθρωπο είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που απαιτεί πολλά βήματα και έχει εξελιχθεί προς την κατεύθυνση της γενωμικής αστάθειας και των απειλητικών για τη ζωή φαινοτύπων. Ο καρκίνος που εμφανίζεται πολύ νωρίς στη ζωή παρουσιάζει συχνά εμβρυϊκά χαρακτηριστικά και έχει αποκτήσει ταχέως γονιδιωματική αστάθεια. Αυτή η ταχεία εξέλιξη συμβαίνει συνήθως, όταν ένα καρκινικό κύτταρο προκύπτει απ'ευθείας από ένα εμβρυϊκό ή όταν ένα ώριμο κύτταρο αποκτά χαρακτηριστικά εμβρυϊκού κυττάρου, τα οποία ευνοούν την αυξημένη επιβίωση τόσο στο προγεννητικό, όσο και στο μεταγεννητικό περιβάλλον. Αυτά τα προγεννητικά ογκογενετικά συμβάντα μπορούν να εμφανιστούν είτε σε αρχέγονα, είτε σε προγονικά κύτταρα, τα οποία φέρουν χαρακτηριστικά απαραίτητα για την ενδομήτρια, αλλά μοιραία για την μεταγεννητική ζωή [22].

Μέσα από μελέτες, λοιπόν, έχει προκύψει η γνώση πως σημαντικός αριθμός νεοπλασιών της παιδικής ηλικίας έχει εμβρυϊκή προέλευση. Συγκεκριμένα, η ιδέα της προγεννητικής προέλευσης της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας σε βρέφη και παιδιά προέρχεται από μοριακές και γενετικές μελέτες σε μονοζυγωτικούς διδύμους που ταυτόχρονα εμφάνισαν ΟΛΛ. Ανιχνεύθηκαν χρωμοσωμικές και γενετικές αλλοιώσεις σε λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος περιγεννητικά (Guthrie cards), χρόνια πριν την κλινική εκδήλωση της νόσου, πράγμα που υποδηλώνει πως οι ογκογενετικές διαδικασίες ξεκινούν από την εμβρυϊκή ζωή ακόμα [22-24].

Ωστόσο, ακόμα και στην περίπτωση της λευχαιμίας εμβρυϊκής προέλευσης (δεν υπόκεινται όλα τα περιστατικά ΟΛΛ στην κατηγορία αυτή) η ηλικία κατά την κλινική εμφάνιση της νόσου ποικίλλει σημαντικά και εξαρτάται από τον υπότυπο της λευχαιμίας, γεγονός που σημαίνει πως υπάρχουν σημαντικές διαφορές στην παθογένεση. Παραδείγματος χάριν, ο υπότυπος που φέρει τη μετάθεση t(4;11)/MLL-AF4 φαίνεται είτε να μην απαιτεί την ύπαρξη πρόσθετων ογκογενετικών συμβάντων, να είναι δηλαδή λευχαιμογόνος από μόνη της αυτή η αλλοίωση, είτε να διευκολύνει την απόκτηση αυτών των πρόσθετων, απαραίτητων για τη μετατροπή του προ-λευχαιμικού κλώνου σε λευχαιμικό, αλλαγών. Αντίθετα, ο υπότυπος που φέρει το γονίδιο σύντηξης t(12;21)/ETV6-RUNX1 (γνωστό και ως TEL-AML1) ανιχνεύεται και σε φυσιολογικά δείγματα αίματος, υποδηλώνοντας πως η συγκεκριμένη αλλοίωση από μόνη της δεν είναι ικανή να οδηγήσει σε κλινική εκδήλωση ΟΛΛ, αλλά απαιτούνται πρόσθετα μεταγεννητικά ογκογενετικά συμβάντα, ώστε να πραγματοποιηθεί ο λευχαιμικός μετασχηματισμός [23-26]. Έχει προταθεί πως διάφορες λοιμώξεις ή η καθυστερημένη έκθεση σε αυτές μπορεί να λειτουργούν ως πιθανές αιτίες για το λευχαιμικό μετασχηματισμό, έχοντας κρίσιμο ρόλο στη δημιουργία αυτών των πρόσθετων μεταγεννητικών αλλαγών, μέσω απορρυθμισμένης ανοσολογικής απόκρισης [25].

### **1.2.5. Παθογενετικός μηχανισμός**

Ήδη από τη δεκαετία του 1970 είχε προταθεί η έννοια της προέλευσης των συμπαγών όγκων, αλλά και της λευχαιμίας από ένα και μόνο κύτταρο (single-cell origin) [27]. Ειδικότερα, στην περίπτωση της λευχαιμίας, και ιδιαίτερα της ΟΛΛ, η οποία φαίνεται να έχει μια σύνθετη κλωνική δομή που χαρακτηρίζεται όχι από έναν,

αλλά από πολλούς διαφορετικούς υποκλώνους, ο Peter C. Nowell το 1976 στο εν λόγω άρθρο του εκτός από την προέλευση της νόσου τόνισε και την επιλογή στην οποία υπόκεινται οι κυρίαρχοι υποκλώνοι, υποδηλώνοντας εμμέσως τη σχέση της κλωνικής ανάπτυξης του καρκίνου με τη Δαρβινική θεωρία της φυσικής επιλογής [27,28]. Γενικά, τις τελευταίες δεκαετίες το σύνολο των επιστημόνων στον τομέα της βιολογίας του καρκίνου έχει ενστερνιστεί ένα τέτοιο εξελικτικό μοντέλο, το οποίο προσαρμόζεται ανάλογα με τη γνώση που προκύπτει με τα χρόνια, με τα δεδομένα όμως πάντα να δείχνουν την κατεύθυνση της επιλογής. Το εξελικτικό αυτό μοντέλο περιλαμβάνει τους περιορισμούς του μικροπεριβάλλοντος του καρκίνου, οι οποίοι κατ' ουσίαν αποτελούν την επιλεκτική πίεση, τους οικολογικούς ή ιστοπαθολογικούς παράγοντες (π.χ. διήθηση παρακείμενων ιστών), τον κρίσιμο ρόλο των βλαστικών ή αρχέγονων κυττάρων (stem cells) και φυσικά, τον παράγοντα της τύχης [28].

Όπως συμβαίνει και στην ειδογένεση, έτσι και στον καρκίνο (από εδώ και πέρα αφορά τη λευχαιμία) οι πληθυσμοί των λευχαιμικών κυττάρων δεν είναι αυτόνομες οντότητες, αλλά παρουσιάζουν μια σύνθετη οικολογία. Απαιτούν και εκμεταλλεύονται τις αλληλεπιδράσεις εντός του μικροπεριβάλλοντος των ιστών και συγκεκριμένα, των αιμοποιητικών νησίδων (niches). Καθώς λοιπόν, περιορίζεται ο χώρος και οι πόροι στις αιμοποιητικές νησίδες / φωλιές, η παραπάνω ανάγκη προκαλεί ανταγωνισμό μεταξύ των φυσιολογικών και των λευχαιμικών κυττάρων, με αποτέλεσμα την περαιτέρω κλωνική εξέλιξη των τελευταίων, με το γεγονός αυτό να οδηγεί τελικά στην εξάπλωση σε νέες θέσεις (όπως στη μετάσταση καρκινικών κυττάρων) ή τη διασπορά της λευχαιμίας σε εκτοπικές θέσεις (όπως το ΚΝΣ) [29-33]. Βέβαια, μέσω αυτής της εξάρτησης έχουν προκύψει σημαντικές θεραπευτικές προοπτικές, όπως η επίθεση στο μικροπεριβάλλον, παρά στον ίδιο τον καρκινικό κλώνο, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τους αντι-αγγειογενετικούς παράγοντες [28].

Για να εκδηλωθεί κλινικά η ΟΛΛ, πρέπει, λοιπόν, μέσω κλωνικής εξέλιξης να συσσωρευθούν μεταλλαγές και άλλα ογκογενετικά συμβάντα τόσο στην ενδομήτρια ζωή, όσο και μετά τη γέννηση. Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα 1.2.4. η κλινική εμφάνιση της νόσου δεν παρατηρείται σε όλες τις περιπτώσεις ύπαρξης συμβάντων από την εμβρυϊκή περίοδο, επομένως φαίνεται πως δεν είναι όλα τα κύτταρα ικανά να οδηγήσουν σε εκδήλωση νεοπλασίας, ακριβώς λόγω της γενετικής και ανοσοφαινοτυπικής ετερογένειας που χαρακτηρίζει το σύνολο των καρκινικών και εν προκειμένω των λευχαιμικών κυττάρων. Συνεπώς, αντίστοιχα με τα εξελικτικά βήματα γενικότερα, έτσι και η εξελικτική πορεία της ΟΛΛ προς εμφανή νόσο είναι μια σχετικά αναποτελεσματική διαδικασία, κατά την οποία οι περισσότεροι υποκλώνοι δε θα αποκτήσουν τις απαραίτητες αλλαγές που θα τους χαρίσουν το επιλεκτικό πλεονέκτημα, ώστε να κυριαρχήσουν στο μικροπεριβάλλον τους και τελικά να προκαλέσουν κλινική ΟΛΛ [28].

Όπως έγινε κατανοητό λοιπόν, η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία χαρακτηρίζεται από μια σύνθετη δομή που περιλαμβάνει πολλούς διαφορετικούς υποκλώνους, οι οποίοι μπορεί κατά τη διάγνωση να είναι ήσσονος σημασίας, αλλά αργότερα να προκαλέσουν υποτροπή, επηρεάζοντας έτσι σημαντικά την έκβαση της νόσου. Τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν ετερογένεια στο σύνολό τους και δεν έχουν όλα την ίδια ικανότητα πολλαπλασιασμού. Σύμφωνα με την υπόθεση του «αρχέγονου καρκινικού κυττάρου» (“cancer stem cell” hypothesis) μόνο ένας σπάνιος υποπληθυσμός κυττάρων αποκτά ή διατηρεί την ικανότητα αυτοανανέωσης και ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού, ούτως ώστε να προκαλέσει την έναρξη και συντήρηση της νόσου [34]. Μέσα από μελέτες και σύγκριση των λευχαιμικών και

προ-λευχαιμικών κυτταρικών πληθυσμών έχει βρεθεί ότι τα αρχέγονα κύτταρα δεν είναι μια σταθερή οντότητα, αλλά εξελίσσονται με το χρόνο και λειτουργούν ως υπόστρωμα για τις επιλεκτικές διεργασίες που οδηγούν στην κλωνική αρχιτεκτονική, την εξέλιξη της νόσου, τη μετάσταση, την υποτροπή και την αντίσταση στη θεραπευτική αγωγή [28,35,36]. Έτσι, τα προ-λευχαιμικά αρχέγονα ή βλαστικά κύτταρα στην ΟΛΛ διαφέρουν γονοτυπικά και ανοσοφαινοτυπικά από τα λευχαιμικά αρχέγονα κύτταρα (leukaemic stem cells, LSCs) κατά τη διάγνωση. Μια πρόταση για τον παραπάνω μετασχηματισμό είναι πως το ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί, μέσω μιας πιθανής λοίμωξης, να παράξει το απαιτούμενο ερέθισμα που θα οδηγήσει τελικά στη μετατροπή αυτή [28].

Τα τελευταία χρόνια έχει προταθεί πως η λευχαιμογένεση προκύπτει μέσω κάποιου κοινού παθογενετικού μηχανισμού, γεγονός που υποστηρίζεται από τα κοινά γονιδιακά προϊόντα μεταξύ της ΟΛΛ και της ΟΜΛ, όπως για παράδειγμα οι μεταθέσεις t(4;11), t(9;22) και t(8;21). Έτσι, μέσα από μελέτες στην ΟΜΛ έχει βρεθεί ότι, όπως και στη φυσιολογική αιμοποίηση, ο λευχαιμικός κλώνος οργανώνεται ιεραρχικά και μόνο ένας μικρός αριθμός πολλαπλασιαζόμενων προγονικών κυττάρων έχει την ικανότητα να αναπληρώνει τη δεξαμενή των LSCs [36]. Επομένως, το μοντέλο των αρχέγονων καρκινικών κυττάρων προτείνει την ύπαρξη διακριτών ομάδων κυττάρων πολλαπλασιασμού και αυτοανανέωσης.

Η ΟΛΛ της παιδικής ηλικίας είναι το αποτέλεσμα της παρεκκλίνουσας μετατροπής των προγονικών B- ή T-κυττάρων στο μυελό των οστών σε λευχαιμικά κύτταρα, προκαλώντας ΟΛΛ B- ή T-σειράς, αντίστοιχα. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός που οδηγεί στον λευχαιμικό μετασχηματισμό δεν είναι πλήρως κατανοητός, όπως επίσης δεν είναι γνωστά πολλά δεδομένα για το κύτταρο προέλευσης (cancer cell-of-origin). Αυτό συμβαίνει, κυρίως διότι η λευχαιμία συνήθως δε διαγιγνώσκεται στα πρώιμα στάδια της, με αποτέλεσμα η αναγνώριση αυτού του κυττάρου και η παρακολούθηση της φυσικής εξέλιξης της νόσου από την έναρξή της ακόμα να καθίστανται σχεδόν αδύνατες [37].

Παρ' όλ' αυτά, τις τελευταίες δεκαετίες έχει προκύψει πρόοδος ως προς τη γνώση σχετικά με την παθογένεση της ΟΛΛ, η οποία, σύμφωνα με πολυάριθμες κυτταρογενετικές μελέτες, προκύπτει από μια σειρά γενετικών αλλαγών που περιλαμβάνουν χρωμοσωμικές μεταθέσεις, αλλά και μεταβολές του αριθμού των χρωμοσωμάτων. Μερικές από τις πιο συνήθεις μεταθέσεις στην ΟΛΛ B-σειράς (που αποτελεί την πιο συχνή μορφή ΟΛΛ) είναι οι t(12;21)/ETV6-RUNX1, t(1;19)/TCF3-PBX1 και t(9;11)/BCR-ABL1, ενώ στις αριθμητικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες περιέχεται τόσο η υπερ-, όσο και η υπο-διπλοειδία [38].

Πέρα, όμως, από τις γενετικές τροποποιήσεις έχει αποδειχθεί πλέον ότι και οι ανωμαλίες στο επιγενετικό πρότυπο συμβάλλουν στην παθογένεση της ΟΛΛ στην παιδική ηλικία. Σύμφωνα με μελέτες, έχει περιγραφεί πως η παρεκκλίνουσα μεθυλίωση σχετίζεται με την πρόγνωση, τον κυτταρογενετικό υπότυπο, την πρόβλεψη του αποτελέσματος της θεραπείας και την υποτροπή στις οξείες λευχαιμίες. Ακόμα, πολλοί διαφορετικοί κυτταρογενετικοί υπότυποι ΟΛΛ εμφανίζουν κοινές, επαναλαμβανόμενες τροποποιήσεις στη μεθυλίωση του DNA, πιθανώς διότι αυτές οι αλλαγές εμπλέκονται στον παθογενετικό μηχανισμό της νόσου [37].

### 1.2.6. Ταξινόμηση

Η ΟΛΛ μπορεί να αναπτυχθεί σε κάθε βήμα κατά τη διάρκεια των πολλαπλών σταδίων διαφοροποίησης των κυττάρων που προορίζονται για τη λεμφική σειρά και αυτό αντανακλά το γεγονός ότι η νόσος είναι μια ετερογενής διαταραχή [10].

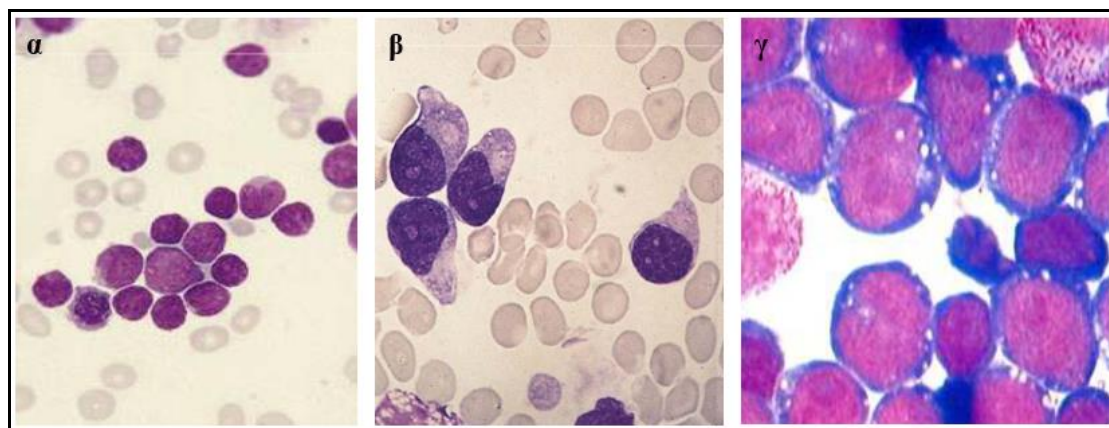
#### α) Μορφολογική ταξινόμηση:

Η ΟΛΛ μπορεί να ταξινομηθεί σε τρεις τύπους βάσει της μορφολογίας των κυττάρων (προσμετρώνται το μέγεθος των κυττάρων, ο λόγος πυρήνα προς κυτταρόπλασμα, η παρουσία πυρηνίσκων, η βασεοφιλία του κυτταροπλάσματος και η ύπαρξη κενοτοπίων) κατά FAB (French-American-British) και έχει ως εξής:

- Τύπος L<sub>1</sub>: μικρές, ομοιόμορφες βλάστες με ελάχιστο κυτταρόπλασμα και δυσδιάκριτους πυρηνίσκους (Εικόνα 2α).
- Τύπος L<sub>2</sub>: μεγαλύτερες λεμφοβλάστες με ετερογένεια στο μέγεθος, ευδιάκριτοι πυρηνίσκοι και περισσότερο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 2β).
- Τύπος L<sub>3</sub>: μεγάλες, ομοιόμορφες βλάστες με εμφανείς πυρηνίσκους και έντονα βασεόφιλο κυτταρόπλασμα που φέρει κενοτόπια (Εικόνα 2γ).

[10,16]

Η μορφολογία L<sub>1</sub> αποτελεί τη συχνότερη και παρατηρείται στο 90% των περιπτώσεων ΟΛΛ στα παιδιά. Ακολουθεί η μορφολογία L<sub>2</sub> που συναντάται σε ποσοστό 5-15%, ενώ η L<sub>3</sub> είναι η πιο σπάνια (1-2%) [16]. Η μορφολογία L<sub>1</sub> σχετίζεται με μεγαλύτερο ποσοστό επίτευξης ύφεσης μετά τη φάση εφόδου της θεραπείας, καθώς και με υψηλότερο EFS (event-free survival) σε σχέση με τον τύπο L<sub>2</sub>. Γενικά, οι ασθενείς με μορφολογία L<sub>3</sub> έχουν τη χειρότερη πρόγνωση [10].



*Εικόνα 2. Μορφολογική ταξινόμηση της ΟΛΛ κατά FAB. (α) Μορφολογικός τύπος L<sub>1</sub>. Διακρίνονται οι μικρές βλάστες με ελάχιστο κυτταρόπλασμα. (β) Μορφολογικός τύπος L<sub>2</sub>. Παρατηρούνται λεμφοβλάστες μεγαλύτερες σε μέγεθος που φέρουν ευδιάκριτους πυρηνίσκους και αρκετό κυτταρόπλασμα. (γ) Μορφολογικός τύπος L<sub>3</sub>. Μεγάλες λεμφοβλάστες με εμφανείς πυρηνίσκους και έντονα βασεόφιλο κυτταρόπλασμα που φέρει κενοτόπια.*

β) Ανοσοφαινοτυπική ταξινόμηση:

Η έκφραση κάποιων αντιγόνων στην κυτταρική επιφάνεια και το κυτταρόπλασμα των λεμφοβλαστών υποδηλώνει από τη μια πλευρά την κυτταρική σειρά (B ή T) στην οποία έχει λάβει χώρα ο λευχαιμικός μετασχηματισμός και από την άλλη το στάδιο διαφοροποίησης, καθώς άλλοι αντιγονικοί δείκτες εκφράζονται στα αρχέγονα και πιο πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα και άλλοι είναι αυτοί που χαρακτηρίζουν τα διάφορα στάδια της διαφοροποίησης προς τη λεμφοκυτταρική σειρά. Επομένως, η κατηγοριοποίηση της ΟΛΛ βάσει συγκεκριμένων ανοσολογικών δεικτών έχει ως εξής:

- Πρώιμη προ-B (pro-B): CD19+, CD22+, CD79a+, CD10-, απουσία κυτταροπλασματικής ανοσοσφαιρίνης (cIg-).
- Κοινή B (common B-ALL): CD19+, CD22+, CD79a+, CD10+, cIg-.
- Προ-B (pre-B): CD19+, CD22+, CD79a+, συνήθως CD10+, cIg+.
- Ωριμη B (mature B-ALL): CD19+, CD20+, έκφραση επιφανειακής ανοσοσφαιρίνης (sIg+), κυρίως IgM.
- Ωριμη T (mature T-ALL): CD3+, CD7+.

[10,16]

γ) Κυτταρογενετική ταξινόμηση:

Οι τεχνικές βελτιώσεις των τελευταίων χρόνων στην κυτταρογενετική ανάλυση έχουν συμβάλει σημαντικά στην κατανόηση τόσο της βιολογίας, όσο και της θεραπείας της ΟΛΛ. Εφόσον οι γενετικές αλλοιώσεις κατέχουν σημαντική θέση στη παθοβιολογία της νόσου, η μελέτη του κυτταρογενετικού προφίλ των ασθενών έχει καθιερωθεί στην κλινική πράξη και χρησιμοποιείται ευρέως για την κατηγοριοποίηση των ασθενών σε ομάδες κινδύνου. Η ταξινόμηση της ΟΛΛ βάσει των κυτταρογενετικών χαρακτηριστικών παρουσιάζεται ακολούθως, παραθέτοντας τις κύριες ομάδες:

- |  |   |                           |
|--|---|---------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Υπερδιπλοειδία:</u> 47-50 χρωμοσώματα<br/>&gt; 50 χρωμοσώματα</li> <li>• <u>Υποδιπλοειδία:</u> 41-45 χρωμοσώματα<br/>30-40 χρωμοσώματα<br/>σχεδόν απλοειδία</li> <li>• <u>Τρισωμίες</u> (4, 6, 10, 14, 17, 18, 21, X)</li> </ul> | } | Αριθμητικές<br>διαταραχές |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Γονιδιακές συντήξεις:</u> ETV6-RUNX1 [t(12;21)]<br/>E2A-PBX1 [t(1;19)]<br/>BCR-ABL [t(9;22)]<br/>MLL-AF4 [t(4;11)]</li> </ul>  | } | Δομικές<br>διαταραχές     |

- Μεταθέσεις
  - Ελλείψεις χρωμοσωμικών τμημάτων
  - Ενδοχρωμοσωμικές ενισχύσεις (iAMP21)
  - Δικεντρικά χρωμοσώματα
  - Γονιδιακές αναδιατάξεις (MLL, ZNF384)
- } Δομικές  
διαταραχές
- [10,39]

Οι αλλοιώσεις στο φυσιολογικό κυτταρογενετικό προφίλ απαντώνται συχνά στην ΟΛΛ της παιδικής ηλικίας και πολλές από αυτές συσχετίζονται με την πρόγνωση ή την ανταπόκριση στη θεραπεία. Ενδεικτικά, από τις αριθμητικές διαταραχές αναφέρονται οι περιπτώσεις της τρισωμίας 4, 10, ή 17, οι οποίες φαίνεται να σχετίζονται με ευνοϊκή πρόγνωση για τους ασθενείς. Αντίθετα, η σχεδόν απλοειδία υποδεικνύει τη δυσμενέστερη πρόγνωση, ενώ η υποδιπλοειδία με 45 χρωμοσώματα καθίσταται σχετικώς ευνοϊκή. Μεταξύ των δομικών διαταραχών τώρα, οι μεταθέσεις εμφανίζονται συχνότερα στην ΟΛΛ και συνδέονται συνήθως με τροποποιημένη ρύθμιση και λειτουργία διαφόρων ογκογονιδίων. Η συνηθέστερη μετάθεση, t(12;21), που συναντάται σε ποσοστό 25% περίπου των ασθενών με προ-B ΟΛΛ στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής συσχετίζεται με καλή πρόγνωση. Από την άλλη, η μετάθεση t(9;22) που έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία του χρωμοσώματος Philadelphia (Ph) μέχρι πρόσφατα αποτελούσε τη μετάθεση με τη χειρότερη πρόγνωση, μέχρι την επιτυχή ανάπτυξη αναστολέων τυροσινικής κινάσης, όπως το Imatinib. Η έλλειψη στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 7 (del7q) προσδίδει δυσμενή πρόγνωση, ενώ ελλείψεις σε άλλα χρωμοσωμικά τμήματα (π.χ. 9p) δε φαίνεται να σχετίζονται με την πρόγνωση [10]. Επομένως, εύκολα γίνεται αντιληπτό πως η μελέτη του κυτταρογενετικού προφίλ αποτελεί μια σύνθετη ανάλυση, απαραίτητη για την ορθή διαστρωμάτωση των ασθενών, πράγμα που καθορίζει και την κατάλληλη θεραπευτική πορεία.

### 1.2.7. Κλινική εικόνα

Τα συμπτώματα ενός παιδιού με ΟΛΛ αντικατοπτρίζουν την επίδραση της διήθησης του μυελού των οστών με λευχαιμικά κύτταρα και την έκταση της εξάπλωσης της εξωμυελικής νόσου. Τα τυπικά συμπτώματα συνήθως περιλαμβάνουν ωχρότητα, έντονο αίσθημα κόπωσης, πυρετό, οστικά άλγη, πετέχειες, εκχυμώσεις, αιμορραγίες και είναι εκδηλώσεις της υποκείμενης αναιμίας, θρομβοπενίας και ουδετεροπενίας, οι οποίες φυσικά αντανακλούν την καταστολή της φυσιολογικής αιμοποίησης. Πέραν της συμμετοχής του μυελού μπορεί να υπάρχει διήθηση και άλλων οργάνων (π.χ. ήπαρ, σπλήνας, λεμφαδένες, ΚΝΣ, δέρμα, όρχεις), με την ανάλογη συμπτωματολογία. Η λεμφαδενοπάθεια, η ηπατομεγαλία και η σπληνομεγαλία αποτελούν συχνές εκδηλώσεις εξωμυελικής εξάπλωσης [10,11,16]. Γενικά, ο βαθμός διήθησης οργάνων συσχετίζεται με τον αριθμό των βλαστών που ανιχνεύεται στο περιφερικό αίμα [16].

Εκτός των κλινικών ευρημάτων και τα εργαστηριακά δεδομένα παρέχουν συχνά ένα ευρύ φάσμα μη φυσιολογικών ευρημάτων κατά τη διάγνωση της ΟΛΛ. Η αναιμία, ο μη φυσιολογικός αριθμός λευκοκυττάρων και η θρομβοπενία είναι συχνά ευρήματα, χωρίς ωστόσο να αποτελούν τον κανόνα. Φυσιολογικές τιμές των κυττάρων του αίματος μπορεί να ανιχνευθούν, ακόμα και όταν υπάρχει σχεδόν πλήρης διήθηση του μυελού. Όσον αφορά τα λευκοκύτταρα, μπορούν να παρουσιάσουν ένα ευρύ φάσμα τιμών κατά τη διάγνωση, από πολύ χαμηλά έως και



περισσότερα από  $10^6$ /μλ. Οι βλάστες μπορεί να είναι παρούσες ή απύσες από το επίχρισμα του περιφερικού αίματος, χωρίς όμως η ανίχνευσή τους να είναι καθοριστική για τη διάγνωση της λευχαιμίας, καθώς δεν μπορεί να οριστικοποιηθεί μόνον από τη μορφολογική εξέταση του περιφερικού αίματος [16].

Τέλος, απαραίτητη για την οριστική διάγνωση της λευχαιμίας είναι η διενέργεια της οστεομυελικής βιοψίας και του μυελογράμματος για την αξιολόγηση του μυελού των οστών. Συνήθως, στην ΟΛΛ ο μυελός περιέχει βλάστες σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50%. Ακόμα, εξαιρετικά σημαντική είναι η διαφοροδιάγνωση της ΟΛΛ από άλλες νόσους, καθώς η ΟΛΛ μπορεί συχνά να εμφανίζει συμπτώματα αρκετά κοινά που συναντώνται σε διάφορα νοσήματα. Επομένως, η διαφορική διάγνωση περιλαμβάνει τη θρομβοπενία ανοσολογικής αρχής (Immune thrombocytopenia, ITP), την απλαστική αναιμία, τη νεανική ρευματοειδή αρθρίτιδα, τη λοιμώδη μονοπυρήνωση, τις μυελοδυσπλαστικές διαταραχές και τις μεταστάσεις συμπαγών όγκων στο μυελό των οστών [16]. Συνήθως, λοιπόν, μια προσεκτική λήψη ιστορικού σε συνδυασμό με τη φυσική εξέταση και τα εργαστηριακά δεδομένα του περιφερικού αίματος και του μυελού οδηγούν σε μια ξεκάθαρη διάγνωση της λευχαιμίας στην πλειονότητα των περιπτώσεων.

### 1.2.8. Θεραπεία

Τις τελευταίες δεκαετίες έχει σημειωθεί εξαιρετικά σημαντική πρόοδος όσον αφορά τη θεραπεία των παιδιών και εφήβων με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία. Η τρέχουσα κατηγοριοποίηση σε ομάδες κινδύνου έχει οδηγήσει σε εξαιρετικά ποσοστά επιβίωσης, με περισσότερο από το 80% των ασθενών που διαγιγνώσκονται μεταξύ 1 και 18 ετών να αναμένεται να είναι μακροχρόνιοι επιζώντες χωρίς συμβάντα και περίπου το 90% να θεραπεύεται εντελώς από τη νόσο. Ωστόσο, τα δεδομένα για τα παιδιά που υποτροπιάζουν ή εκδηλώνουν σημαντική τοξικότητα λόγω της θεραπείας δεν είναι το ίδιο θετικά. Ακόμα και σήμερα η υποτροπή, και όχι η αρχική νόσος, αποτελεί την κύρια αιτία θνησιμότητας που σχετίζεται με καρκίνο στα παιδιά και οι επιβιώσαντες εντατικών σχημάτων θεραπείας αντιμετωπίζουν μακροχρόνιες συνέπειες που σχετίζονται με τη θεραπεία και απώτερες επιπλοκές [40].

Οι προσπάθειες για τη βελτίωση της θεραπείας της νεοδιαγνωσθείσας ΟΛΛ και για την πρόληψη της υποτροπής της νόσου περιλαμβάνουν την κατηγοριοποίηση των ασθενών σε ομάδες κινδύνου και τη διαστρωμάτωση της έντασης της χορηγηθείσας θεραπείας βάσει διαφόρων προγνωστικών παραγόντων, σύμφωνα με τους οποίους προβλέπεται η έκβαση της νόσου. Μερικοί από τους παράγοντες αυτούς είναι η ηλικία κατά τη διάγνωση, το φύλο, η φυλή, ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων κατά τη διάγνωση, ο ανοσοφαινότυπος και τα κυτταρογενετικά χαρακτηριστικά. Οι παράγοντες αυτοί σε συνδυασμό με δείκτες ανταπόκρισης στην εκάστοτε θεραπεία (π.χ. παρακολούθηση της ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου, minimal residual disease-MRD) προσμετρώνται πολύ προσεκτικά σε κάθε περίπτωση και καθορίζουν συνήθως την έκβαση της ΟΛΛ [10,16,40].

Γενικά, τα θεραπευτικά σχήματα για παιδιά με νεοδιαγνωσθείσα οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία περιλαμβάνουν τρεις φάσεις: τη θεραπεία επαγωγής στην ύφεση (remission induction), τη θεραπεία εδραίωσης της ύφεσης ή εντατικοποίησης (consolidation or intensification) και τη θεραπεία διατήρησης της ύφεσης (maintenance). Η θεραπεία επαγωγής στην ύφεση στοχεύει στην άμεση καταστροφή

όσο το δυνατόν περισσότερων λευχαιμικών κυττάρων και στην επίτευξη ύφεσης της νόσου και κατά τη διάρκειά της εκτιμάται η απάντηση στη θεραπεία βάσει του δείκτη MRD. Η δεύτερη φάση έχει σχεδιαστεί για την περαιτέρω μείωση του συνολικού λευχαιμικού φορτίου, την προφύλαξη του ΚΝΣ με ενδοραχιαίες εγχύσεις χημειοθεραπευτικών, λόγω της συχνής προσβολής του ΚΝΣ με λευχαιμικά κύτταρα, και την αντιμετώπιση ζητημάτων ανθεκτικότητας έναντι των αντιλευχαιμικών φαρμάκων. Τέλος, η θεραπεία διατήρησης της ύφεσης περιλαμβάνει χαμηλές δόσεις χημειοθεραπείας και στοχεύει στην πλήρη εξάλειψη του υπολειπόμενου λευχαιμικού φορτίου [16,41].

Για τη θεραπεία της ΟΛΛ στα παιδιά και τους εφήβους χρησιμοποιούνται διάφοροι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες (π.χ. ανθρακυκλίνες, αντιμεταβολίτες κ.ά.) σε συνδυασμό με κορτικοστεροειδή (π.χ. πρεδνιζόνη, πρεδνιζολόνη, δεξαμεθαζόνη κ.ά.). Σε ομάδες υψηλού κινδύνου και σε περιπτώσεις αποτυχίας επίτευξης ύφεσης της νόσου μπορεί σε συγκεκριμένες υποομάδες ασθενών να προστεθεί ως θεραπευτική επιλογή και η αλλογενής μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (haematopoietic stem cell transplant, HSCT). Στο σύνολό της η θεραπεία της ΟΛΛ διαρκεί 2-3 χρόνια. Βέβαια, αρκετές προσπάθειες έχουν γίνει μέσω κλινικών δοκιμών για ελάττωση αυτής της διάρκειας, χωρίς όμως θετικά αποτελέσματα [10,16,40].

Στα μεγαλύτερα παιδιά και τους εφήβους (ηλικίας 10 έως 18 ετών κατά τη διάγνωση), που παρουσιάζουν λιγότερο ευνοϊκή πρόγνωση, χορηγούνται πιο επιθετικές θεραπείες. Ειδικότερα, οι έφηβοι παρουσιάζουν συχνότερα δυσμενή προγνωστικά χαρακτηριστικά και διατρέχουν υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης επιπλοκών σχετικών με τη θεραπεία, συγκριτικά με τα μικρότερα παιδιά. Μέσα από κλινικές μελέτες, λοιπόν, έχει διαπιστωθεί πως αυτοί οι ασθενείς έχουν θετικότερη πορεία, όταν υποβάλλονται στα παιδιατρικά θεραπευτικά σχήματα και όχι σε αυτά των ενηλίκων. Εν μέρει, αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι τα παιδιατρικά σχήματα είναι σαφώς πιο επιθετικά (διότι τα παιδιά ανέχονται καλύτερα τις εντατικότερες θεραπείες) και περιλαμβάνουν υψηλότερες αθροιστικές δόσεις συγκεκριμένων φαρμάκων, όπως η βινκριστίνη, τα κορτικοστεροειδή και η L-ασπαραγινάση [16].

Πιθανότατα, μέσω των συνεχών βελτιώσεων των νέων τεχνολογιών και της γνώσης που προκύπτει καθημερινά στο πεδίο της βιολογίας, η συμβατική κυτταροτοξική χημειοθεραπεία θα αντικατασταθεί από βραχύτερες θεραπείες που χρησιμοποιούν στόχευση βιολογικών παραγόντων για την αντιμετώπιση του καρκίνου γενικότερα και, συνεπώς, της ΟΛΛ. Βέβαια, η επιστημονική κοινότητα απέχει ακόμα από την πλήρη υλοποίηση των παραπάνω, με ορισμένες στοχευμένες θεραπείες να εφαρμόζονται, ωστόσο, σε συγκεκριμένες ομάδες ασθενών παρουσιάζοντας εξαιρετικά μέχρι τώρα αποτελέσματα. Σε περιπτώσεις, λοιπόν, υποτροπής της ΟΛΛ ή ανθεκτικής νόσου χρησιμοποιούνται αυτές οι πρωτοποριακές θεραπείες που ως στόχο έχουν συγκεκριμένα βιολογικά μόρια, για παράδειγμα, εντός σηματοδοτικών και αποπτωτικών μονοπατιών, σε συνδυασμό με τα συμβατικά χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Ενδεικτικά, αναφέρεται η περίπτωση χορήγησης Imatinib, ενός αναστολέα τυροσινικής κινάσης, σε ασθενείς με Ph+ ΟΛΛ, όπως και του Dasatinib, ενός φαρμάκου δεύτερης γενιάς που στοχεύει διάφορες κινάσες τυροσίνης [41].

Μια ακόμα πολλά υποσχόμενη θεραπεία αποτελεί και η ανάπτυξη των χιμαιρικών αντιγονικών υποδοχέων T-κυττάρων (chimeric antigen receptor-T cells, CAR-T Cells) που ανήκουν στην κατηγορία της ανοσοθεραπείας και εφαρμόζονται στην

υποτροπή της Β-ΟΛΛ. Αυτά τα T-λεμφοκύτταρα είναι γενετικά τροποποιημένα, ώστε να αναγνωρίζουν και να καταστρέφουν τα λευχαιμικά Β-κύτταρα που φέρουν το ειδικό αντιγόνο-στόχο. Η θεραπεία αυτή κατοχύρωσε έγκριση από τον Food and Drug Administration (FDA) των ΗΠΑ το 2017 για την υποτροπιάζουσα Β-ΟΛΛ σε παιδιά και ενήλικες και πιστεύεται πως σταδιακά θα ενσωματωθεί στη θεραπεία πρώτης γραμμής για τους ασθενείς που ανήκουν στις ομάδες υψηλού κινδύνου [41]. Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί ιδιαίτερη σημασία στην ανάπτυξη νέων θεραπειών που στοχεύουν τις επιγενετικές τροποποιήσεις και διαταραχές, που κυριαρχούν στον καρκίνο της παιδικής και εφηβικής ηλικίας [42].

Μετά την εξαιρετικά σημαντική βελτίωση της επιβίωσης των παιδιών με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία επόμενο μέλημα αποτελούν οι απώτερες επιπλοκές που σχετίζονται με τη νόσο και, κυρίως, με τη θεραπεία. Το είδος και η βαρύτητά τους είναι συνάρτηση της θεραπείας (είδος, αθροιστική δόση) και παραγόντων που σχετίζονται με τον ασθενή (π.χ. ηλικία κατά τη διάγνωση). Οι πιθανές απώτερες συνέπειες μπορεί να είναι τόσο οργανικές, όσο και ψυχολογικές για τους ασθενείς επηρεάζοντάς τους είτε σοβαρά, είναι δηλαδή απειλητικές για τη ζωή, είτε πιο ήπια, έχοντας όμως καθοριστικό ρόλο στην ποιότητα της ζωής. Στις οργανικές απώτερες επιπλοκές περιλαμβάνονται οι νευροαναπτυξιακές διαταραχές, η καρδιακή δυσλειτουργία, οι δευτεροπαθείς νεοπλασίες, η παχυσαρκία, το κοντό ανάστημα και πολλές ακόμα που αφορούν σχεδόν κάθε σύστημα του οργανισμού [10,16]. Επομένως, εύκολα γίνεται κατανοητό πως η ίαση μόνο δεν είναι αρκετή. Καθώς τα ποσοστά επιβίωσης των παιδιών με ΟΛΛ αυξάνουν, μαζί τους αυξάνουν και τα ποσοστά των απώτερων επιπλοκών. Στόχος είναι η επιβίωση αλλά με τις λιγότερες δυνατές επιπλοκές, που θα εξασφαλίζουν στον ενήλικα μια καλή ποιότητα ζωής.

### **1.3. ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ**

#### **1.3.1. Γενικά**

Ως **πολυμορφισμός** ορίζεται η ύπαρξη ενός γενετικού τύπου με δύο ή περισσότερα αλληλόμορφα που το καθένα συναντάται σε συχνότητα μεγαλύτερη του 1% στον πληθυσμό [43,44]. Πιο απλά, οι πολυμορφισμοί είναι οι εναλλακτικές μορφές (αλληλόμορφα) ενός χρωμοσωμικού τύπου, οι οποίες διαφέρουν ως προς τη νουκλεοτιδική τους αλληλουχία. Οι προηγούμενοι ορισμοί αναφέρονται σε γενετικό / χρωμοσωμικό τύπο και όχι σε γονίδιο, διότι οι πολυμορφικές θέσεις δε συναντώνται απαραίτητα μέσα σε ένα γονίδιο, αλλά μπορούν να βρίσκονται οπουδήποτε στο γονιδίωμα, ανεξάρτητα δηλαδή από το αν έχει κάποια επίδραση στην έκφραση κάποιου γνωρίσματος [45].

Η συχνότητα των πολυμορφισμών στο γονιδίωμα του ανθρώπου είναι πολύ υψηλή (1 ανά 350 bp περίπου) και δεδομένου ότι το μέγεθος του ανθρώπινου γονιδιώματος είναι περίπου  $3 \times 10^9$  ζεύγη βάσεων, υπολογίζεται ότι οι πολυμορφικές θέσεις ανέρχονται σε  $9 \times 10^6$  περίπου. Επομένως, οι ανθρώπινες αλληλουχίες παρουσιάζουν υψηλό βαθμό ποικιλομορφίας, χωρίς όμως αυτό να σημαίνει πως κάθε πολυμορφική θέση έχει άμεση επίδραση στο φαινότυπο των ατόμων [45]. Και αυτό διότι οι περισσότεροι πολυμορφισμοί εντοπίζονται μεταξύ των γονιδίων, εντός ιντρονίων ή

ακόμα και στις αμετάφραστες περιοχές. Φυσικά, κάποιοι εδράζονται σε κωδικοποιούμενες περιοχές, οδηγώντας έτσι σε διαφορετικές παραλλαγές πρωτεϊνών που μπορεί να οδηγήσουν σε διαφορετικούς φαινοτύπους. Μπορεί ακόμα να εντοπίζονται και σε ρυθμιστικές περιοχές, πράγμα που πιθανά να σημαίνει επίδραση είτε στην ίδια τη διαδικασία της μεταγραφής, είτε στη σταθερότητα του μορίου RNA που δημιουργείται μέσω της τελευταίας [44].

Οι πολυμορφισμοί μπορούν να διακριθούν σε τέσσερις μεγάλες κατηγορίες: α) τους **μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς** (Single Nucleotide Polymorphisms, **SNPs**), β) τους πολυμορφισμούς που προκύπτουν από προσθήκη ή έλλειψη νουκλεοτιδίων (Insertion or Deletion, Indels), γ) τις παραλλαγές του αριθμού αντιγράφων (Copy Number Variants, CNVs) και δ) οι αντιστροφές (Inversions) [44]. Στην παρούσα εργασία οι πολυμορφισμοί που μελετήθηκαν ανήκουν στην κατηγορία των SNPs, οπότε και η περαιτέρω ανάλυση θα περιοριστεί σε αυτούς. Οι SNPs αποτελούν παραλλαγές αλληλομόρφων τα οποία διαφέρουν σε ένα μόνο νουκλεοτίδιο και οι γενετικοί τόποι που χαρακτηρίζονται από SNPs φέρουν συνήθως μόνο δύο αλληλόμορφα που αντιστοιχούν στις δύο διαφορετικές βάσεις που συναντώνται σε αυτήν τη θέση. Είναι το αποτέλεσμα αυθόρμητων μεταλλαγών που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του DNA και μεταβιβάζονται από γενιά σε γενιά. Η συχνότητά τους στο ανθρώπινο γονιδίωμα είναι κατά μέσο όρο ένας SNP ανά 1.000 ζεύγη βάσεων, χωρίς όμως η κατανομή τους να είναι ίδια κατά μήκος όλου του γονιδιώματος. Οι περισσότεροι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί συναντώνται σε μη κωδικοποιούμενες περιοχές, ωστόσο σημαντικός αριθμός SNPs εμφανίζεται σε γονίδια και λειτουργικές περιοχές [44]. Οι SNPs ευθύνονται για πάνω από το 90% της γενετικής ποικιλομορφίας του ανθρώπου και αποτελούν τη συνηθέστερη ομάδα πολυμορφισμών. Λειτουργούν ως δείκτες DNA και αποτελούν εξαιρετικά χρήσιμα εργαλεία για την κατασκευή γενετικών χαρτών υψηλής ακρίβειας.

Ένα μικρό ποσοστό των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών επηρεάζει τις θέσεις περιορισμού (ενότητα 3.5) που υπάρχουν στο γονιδίωμα είτε απαλείφοντας κάποιες ήδη υπάρχουσες, είτε δημιουργώντας νέες θέσεις κοπής. Τέτοιοι SNPs μπορούν να εντοπιστούν με τη χρήση του κατάλληλου περιοριστικού ενζύμου (ενότητα 3.5.), ύστερα από ενίσχυση του υπό μελέτη τμήματος DNA με τη διαδικασία της PCR και κατόπιν, με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (η μεθοδολογία περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 3). Ακριβώς λόγω της ύπαρξης του πολυμορφισμού δημιουργείται (ή απαλείφεται) μια επιπλέον θέση περιορισμού στις ομόλογες αλληλουχίες, επομένως προκύπτουν διαφορές ανάμεσα στους χάρτες περιορισμού. Από αυτά τα διαφορετικά πρότυπα προκύπτουν οι πολυμορφισμοί μήκους τμημάτων περιορισμού (Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLPs), δηλαδή τμήματα περιορισμού διαφορετικών μεγεθών [45].

### **1.3.2. Γενετικοί πολυμορφισμοί στον καρκίνο**

Η διαδικασία της αιμοποίησης, όπως και κάθε άλλη διεργασία του ανθρώπινου οργανισμού, χαρακτηρίζεται από εξαιρετική πολυπλοκότητα όσον αφορά τη ρύθμισή της. Όπως συμβαίνει σε όλους τους τύπους νεοπλασιών, τα καρκινικά κύτταρα λόγω κακοήθων εξαλλαγών πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα και συνήθως δεν ανταποκρίνονται σε αποπτωτικά σήματα κι έτσι δημιουργείται (στην περίπτωση της ΟΛΛ) ο λευχαιμικός κλώνος. Οι μεταλλαγές αποτελούν ένα μεγάλο κομμάτι στη μελέτη του γενετικού προφίλ των ατόμων που πάσχουν από ΟΛΛ. Επομένως, και οι

SNPs, που είναι το αποτέλεσμα αυθόρμητων μεταλλαγών, έχουν αποκτήσει τα τελευταία χρόνια σημαντική θέση στην παθοβιολογία της νόσου, μέσω μελετών σε διάφορους πληθυσμούς, οι οποίες έχουν αναδείξει τη σημασία των πολυμορφισμών στη διαδικασία της λευχαιμογένεσης.

Πρόσφατες έρευνες έχουν οδηγήσει στην ανίχνευση κληρονομικής προδιάθεσης για ευαισθησία σε ανάπτυξη ΟΛΛ εντοπίζοντας πολυμορφισμούς σε αρκετούς γενετικούς τόπους, συμπεριλαμβανομένων και των SNPs στα γονίδια *IKZF1*, *ARID5B*, *CDKN2A* και *GATA3* [38,52]. Οι πολυμορφισμοί στη γαμετική σειρά εκτός της ευαισθησίας στην ανάπτυξη της νόσου επηρεάζουν και την τοξικότητα που προκαλείται από τα χημειοθεραπευτικά σχήματα, αλλά και την απόκριση στη θεραπεία. Επομένως, η βαθύτερη κατανόηση της επίδρασης των κληρονομούμενων πολυμορφισμών μπορεί να προσφέρει την ευκαιρία τροποποίησης της θεραπείας για τη μείωση της τοξικότητας χωρίς όμως να διακυβεύεται η αποτελεσματικότητά της [38].

## 1.4. ΓΟΝΙΔΙΑ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ

### 1.4.1. IKZF1

Το γονίδιο *IKZF1* (Ikaros family zinc finger 1) εδράζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 7p12.2 και κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη IKAROS που χαρακτηρίζεται από πολύπλευρη λειτουργία. Η πρωτεΐνη αποτελεί σημαντικό μεταγραφικό παράγοντα και εμπλέκεται στη διαδικασία της αιμοποίησης, ρυθμίζοντας τη δέσμευση και διαφοροποίηση των Β- και Τ-κυττάρων. Φυσιολογικά, προάγει τη διαφοροποίηση, αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και ελέγχει τις ιδιότητες των αιμοποιητικών κυττάρων που σχετίζονται με τη μετανάστευση [46,47].

Η πρωτεΐνη IKAROS προσδένεται στο DNA και ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων – στόχων του, κυρίως μέσω αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης [46,47]. Επίσης, η ρύθμιση αυτή ελέγχεται και από τη συνεργασία του *IKZF1* με απακετυλάσες ιστονών (histone deacetylases, HDACs), όπως οι HDAC1 και HDAC2. Τα σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης και απακετυλίωσης εμπλέκονται τόσο στην καταστολή της μεταγραφής, όσο και στην ενεργοποίηση αυτής. Η σίγηση των γονιδίων – στόχων του διευκολύνεται και από την αλληλεπίδρασή του με το Polycomb repressive complex 2, το οποίο προάγει την τριμεθυλίωση της λυσίνης 27 της ιστόνης 3, πράγμα που συνεπάγεται την καταστολή της μεταγραφής. Αντιστοίχως, το *IKZF1* μπορεί να συμμετέχει στην έναρξη της μεταγραφής μέσω άμεσων αλληλεπιδράσεων με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες (π.χ. TFIIIB και TBP). Ακόμα, η λειτουργία του ελέγχεται και από τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στις οποίες υπόκειται, όπως η φωσφορυλίωση, η σουμοϋλίωση και η ουβικιτινυλίωση [59].

Αρχικά, ο ρόλος του γονιδίου είχε μελετηθεί σε ποντίκια και μέσα από αυτές τις έρευνες βρέθηκε πως αποτελεί κύριο ρυθμιστή της διαφοροποίησης των λεμφοκυττάρων, καθώς και ογκοκατασταλτικό γονίδιο (tumour suppressor). Από εκεί οι μελέτες επεκτάθηκαν και στον άνθρωπο, ώστε να διαπιστωθεί αν δρα ως

ογκοκατασταλτικό γονίδιο και στην περίπτωση της λευχαιμίας. Τα δεδομένα που προέκυψαν επιβεβαίωσαν ότι δρα ως τέτοιο στην ΟΛΛ, καθώς επίσης ότι ακόμα και ήπια μείωση στην ενεργότητα της πρωτεΐνης είναι ικανή για να συμβάλει στη διαδικασία της λευχαιμογένεσης [47,59]. Σύμφωνα με έρευνες χρωμοσωμικές ελλείψεις στην περιοχή του *IKZF1* ανιχνεύονται στο 15% περίπου των περιπτώσεων ΟΛΛ Β-σειράς στα παιδιά, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό στους ενήλικες ανέρχεται σε 40-50%. Αντίθετα, στην ΟΛΛ Τ-σειράς το ποσοστό κυτταρογενετικών αλλοιώσεων του *IKZF1* φτάνει μόλις το 4-5%. Ωστόσο, η ογκοκατασταλτική δράση του *IKZF1* δεν περιορίζεται μόνο στη λεμφοκυτταρική σειρά, αλλά εκτείνεται σε ένα ευρύτερο φάσμα αιματολογικών νοσημάτων (π.χ. μυελοϋπερπλαστικά σύνδρομα, οξεία μυελογενής λευχαιμία σε παιδιά και ενήλικες) [59,60].

Πολυάριθμες μελέτες έχουν αναφερθεί στον παθογενετικό και κλινικό αντίκτυπο της πρωτεΐνης αποκαλύπτοντας σχέσεις με διάφορα νοσήματα. Παραδείγματος χάριν, κάποιοι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) επηρεάζουν την ευαισθησία σε ορισμένες διαταραχές, ενώ κυτταρογενετικές αλλοιώσεις στο *IKZF1* μπορούν να χρησιμεύσουν ως προγνωστικός δείκτης στην ΟΛΛ Β-σειράς στην παιδική ηλικία. Επομένως, πέραν του κρίσιμου ρόλου τους στη λευχαιμογένεση σχετίζονται με δυσμενή πρόγνωση, με τα ελλείμματα του *IKZF1* να λειτουργούν ως ανεξάρτητος και ισχυρός προγνωστικός παράγοντας της φτωχής έκβασης [47,59,60]. Τέλος, υπάρχουν ενδείξεις ότι η πρωτεΐνη IKAROS εμπλέκεται και στη ρύθμιση της απόπτωσης και ότι η μειωμένη ενεργότητά της στα λευχαιμικά κύτταρα πιθανά αυξάνει την αντίσταση στη χημειοθεραπεία και ειδικά σε αυτήν που βασίζεται στη χρήση αναστολέων τυροσινικής κινάσης. Απώλεια ή μειωμένη λειτουργία της πρωτεΐνης που συνεπάγεται ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/AKT/mTOR πιθανά προάγει την αντοχή στα γλυκοκορτικοειδή [47,59].

#### 1.4.2. CDKN2A

Το γονίδιο *CDKN2A* (cyclin dependent kinase inhibitor 2A) εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 9p21.3 και κωδικοποιεί για δύο διαφορετικές πρωτεΐνες, τις p16<sup>INK4a</sup> και p14<sup>ARF</sup>, που προκύπτουν μέσω εναλλακτικού ματίσματος του mRNA. Το *CDKN2A* ανήκει στην κατηγορία των ογκοκατασταλτικών γονιδίων και οι δύο πρωτεΐνες είναι αναστολείς του κυτταρικού κύκλου. Η p16<sup>INK4a</sup> είναι συγκεκριμένα αναστολέας κυκλινο-εξαρτώμενης κινάσης (cyclin-dependent kinase inhibitor, CDKI). Ειδικότερα, προκαλεί το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 αναστέλλοντας τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Rb (Retinoblastoma protein) από τις κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες CDK4 και CDK6 [48].

Αντίθετα, η πρωτεΐνη p14<sup>ARF</sup>, η οποία αποτελεί και το πεδίο μελέτης στην παρούσα εργασία, είναι κύριος ρυθμιστής της πρωτεΐνης p53. Συγκεκριμένα, αλληλεπιδρά άμεσα με την πρωτεΐνη MDM2, εμποδίζοντας έτσι την αποικοδόμηση της p53, με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση τόσο της p53 όσο και της ίδιας της MDM2. Αυτό οδηγεί στην ενεργοποίηση της πρώτης και, κατά συνέπεια, στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου ή σε απόπτωση του κυττάρου. Από την άλλη, η p53 ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση της p14<sup>ARF</sup> και έχει διαπιστωθεί η αρνητική συσχέτιση της έκφρασης της τελευταίας και της λειτουργίας της p53 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές. Ωστόσο, η έκφραση της p14<sup>ARF</sup> δεν εμπλέκεται στη διαδικασία απόκρισης σε βλάβες του DNA κι έτσι φαίνεται πως η p14<sup>ARF</sup> δρα ανεξάρτητα από την p53 [48-51].

Ένα από τα κύρια ογκογενετικά χαρακτηριστικά της ΟΛΛ είναι οι κυτταρογενετικές αλλοιώσεις στο σύμπλεγμα γονιδίων *CDKN2A/CDKN2B*. Ειδικότερα, τα ελλείμματα σε αυτή την περιοχή αποτελούν την πιο συχνή δομική διαταραχή στην ΟΛΛ Τ-σειράς, ενώ αντιπροσωπεύουν το 30% περίπου των αλλαγών στην ΟΛΛ από άωρο-προγονικό Β-κύτταρο (B-cell precursor ALL, BCP-ALL). Στην περίπτωση της τελευταίας, αποτελούν το συχνότερο δεύτερο γενετικό συμβάν (που θα οδηγήσει και στην εμφάνιση της νόσου) με τη συχνότητά τους να κυμαίνεται από 15% έως 35% στα παιδιά και από 30% έως 45% στους ενήλικες. Οι ελλείψεις αυτών των χρωμοσωμικών τμημάτων ανιχνεύονται συχνότερα στους ασθενείς που εντάσσονται στις ομάδες υψηλού κινδύνου και αυτό αφορά και τις δύο ηλικιακές ομάδες [61]. Αντίστοιχα, στην περίπτωση της ΟΛΛ Τ-σειράς τα ποσοστά ελλειμμάτων στην περιοχή των γονιδίων *CDKN2A/CDKN2B* κυμαίνονται από 50% έως 81% στα παιδιά και από 28% έως 50% στους ενήλικες. Τώρα, στην ηλικιακή ομάδα που περιλαμβάνει τους εφήβους και τους νεαρούς ενήλικες (adolescents and young adults, AYAs) η συχνότητα ανίχνευσης της συγκεκριμένης διαταραχής φτάνει το 47% [61]. Εξαιρετικά σημαντικό είναι και το εύρημα μιας μελέτης σε παιδιά με ΟΛΛ Β-σειράς, στην οποία διαπιστώθηκε πως η ομάδα των ασθενών που έφεραν ταυτόχρονα ελλείμματα στις περιοχές των γονιδίων *IKZF1* και *CDKN2A* παρουσίασε τη χειρότερη πρόγνωση και υψηλότερο ποσοστό υποτροπής, σε σχέση με την ομάδα των ασθενών που χαρακτηρίζονταν είτε από έλλειμμα μόνο στην περιοχή του *IKZF1* είτε από το αγρίου τύπου *IKZF1* [60].

Πέρα από τη συμβολή των κυτταρογενετικών αλλοιώσεων που εξετάστηκαν παραπάνω στην εμφάνιση της ΟΛΛ στα παιδιά σημαντικό ρόλο φαίνεται να έχουν και οι τροποποιήσεις στο πρότυπο μεθυλίωσης των υποκινητών στο σύμπλεγμα των γονιδίων *CDKN2A/CDKN2B*, καθώς επίσης και οι μεταλλαγές στη γαμετική σειρά, κυρίως στο γονίδιο *CDKN2A*, οι οποίες συσχετίζονται με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Αυτές οι μεταλλαγές μπορεί να συναντώνται τόσο σε κωδικές περιοχές, όσο και σε ιντρόνια και μη-κωδικές περιοχές [61].

Αρκετές μελέτες έχουν ασχοληθεί με την παθογενετική και κλινική συσχέτιση του γονιδίου *CDKN2A* με την ανάπτυξη της ΟΛΛ. Ωστόσο, τα δεδομένα από διάφορες έρευνες φαίνεται να μη συμφωνούν ακόμα. Παραδείγματος χάριν, μια τέτοια ανάλυση έδειξε πως η απορρύθμιση που προκύπτει από ελλείψεις του *CDKN2A* παρατηρείται συχνότερα κατά την υποτροπή της νόσου, σε σχέση με τη διάγνωση και πιθανώς είναι υπεύθυνη για την υποτροπή των ασθενών. Αντίθετα, άλλες έρευνες υποστηρίζουν πως αυτά τα ελλείμματα να μην παρουσιάζονται ελαφρώς συχνότερα, αλλά όχι τόσο, ώστε να υπάρχει συσχέτιση με την κλινική έκβαση [61]. Είναι προφανές, λοιπόν, πως επιπλέον μελέτες είναι απαραίτητες, ώστε να αποσαφηνιστεί ο ρόλος των αλλαγών του *CDKN2A* στην ΟΛΛ.

Τέλος, έχει μελετηθεί και ο ρόλος του *CDKN2A* σε σχέση με τη θεραπεία και την αποτελεσματικότητά της. Μέσα από έρευνες σε μοντέλα ποντικών έχει προταθεί ότι τα ελλείμματα στη συγκεκριμένη περιοχή συμβάλλουν στη μείωση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας και διευκολύνουν την ανάπτυξη αντίστασης στη χημειοθεραπεία που βασίζεται σε αναστολείς τυροσινικής κινάσης. Μάλιστα, η απενεργοποίηση της πρωτεΐνης p14<sup>ARF</sup> θα μπορούσε να συμβάλει στην αντίσταση στα συγκεκριμένα φάρμακα, ενισχύοντας τη διατήρηση των προ-λευχαιμικών κυττάρων εντός του μυελού των οστών και παρέχοντας μεγαλύτερη προσαρμοστικότητα στα λευχαιμικά κύτταρα. Έτσι, το σύστημα οδηγείται στην

ταχύτερη ανάπτυξη ανθεκτικών λευχαιμικών κλώνων στην περίπτωση της ΟΛΛ που φέρει τη γονιδιακή σύντηξη BCR-ABL [61].

### **1.4.3. Γενετικοί πολυμορφισμοί στα γονίδια *IKZF1* και *CDKN2A***

Μέσα από διάφορες μελέτες έχουν εντοπιστεί κοινοί κληρονομούμενοι πολυμορφισμοί που προδιαθέτουν για αυξημένη ευαισθησία σε ανάπτυξη ΟΛΛ σε αρκετούς γενετικούς τόπους, μεταξύ των οποίων και οι *ARID5B*, *IKZF1*, *CEBPE*, *CDKN2A* κ.ά. Οι συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί υπερεκπροσωπούνται στους ασθενείς με ΟΛΛ, σε σχέση με τις ομάδες ελέγχου. Κάθε μία από αυτές τις παραλλαγές αντιπροσωπεύει μια μέτρια αύξηση του κινδύνου ανάπτυξης της νόσου, αλλά ανεξάρτητα και σωρευτικά συμβάλλει στην ευαισθησία σε ΟΛΛ. Τα γονίδια *IKZF1* και *CDKN2A* στοχεύονται επίσης από σωματικές αλλαγές στην ΟΛΛ, υποδηλώνοντας ότι οι πολυμορφισμοί τόσο στη γαμετική σειρά, όσο και στα σωματικά κύτταρα συμμετέχουν στην παθογένεση της νόσου [38].

Ενδεικτικά, αναφέρεται ότι ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός rs4132601 (T→G) στην 3' αμετάφραστη περιοχή (untranslated region, UTR) του γονιδίου *IKZF1* έχει αναφερθεί ως παράγοντας αυξημένου κινδύνου εμφάνισης ΟΛΛ τόσο σε παιδιά, όσο και σε ενήλικες σε διάφορες μελέτες [53-56]. Αντίστοιχα, ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός rs3731217 (T→G) στο ιντρόνιο 1 του γονιδίου *CDKN2A* έχει μελετηθεί για το ρόλο του στην ανάπτυξη κυρίως της ΟΛΛ, αλλά και άλλων ασθενειών σε διάφορους πληθυσμούς. Έρευνες έχουν δείξει τη συσχέτιση του rs3731217 με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΟΛΛ B- και T-σειράς στα παιδιά [53,57,58]. Για τον συγκεκριμένο SNP (rs3731217) έχει διατυπωθεί η πρόταση ότι επηρεάζει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου, ρυθμίζοντας το εναλλακτικό μάτισμα του *CDKN2A*, μέσω του οποίου προκύπτουν οι δύο διαφορετικές ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες, p16<sup>INK4a</sup> και p14<sup>ARF</sup> [75].

Ωστόσο, η παραπάνω συσχέτιση της ύπαρξης πολυμορφισμών με την προδιάθεση για ανάπτυξη ΟΛΛ δεν έχει εδραιωθεί. Άλλες μελέτες υποστηρίζουν πως δεν υπάρχει άμεση συσχέτιση των πολυμορφισμών με την εμφάνιση της νόσου, αλλά ότι αυτοί οι κληρονομούμενοι SNPs, συμπεριλαμβανομένων αυτών των *IKZF1* και *CDKN2A*, διατηρούν το προ-λευχαιμικό περιβάλλον, ευνοώντας έτσι την εμφάνιση των πρωτογενών γενετικών βλαβών, αντί οι ίδιοι αυτοί SNPs να προκαλούν την εμφάνιση μιας συγκεκριμένης γενετικής βλάβης [61]. Εύκολα μπορεί να γίνει καταληπτό, λοιπόν, πως είναι εξαιρετικά αναγκαία η μελέτη της πιθανής σχέσης της ύπαρξης πολυμορφισμών με την ανάπτυξη της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας στα παιδιά και τους εφήβους, με απώτερο σκοπό την εις βάθος κατανόηση των μηχανισμών ανάπτυξης της νόσου.



## **2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ**

Διάφορες ερευνητικές ομάδες έχουν ασχοληθεί με τη μελέτη της πιθανής συσχέτισης της ύπαρξης πολυμορφισμών στον πληθυσμό με την εκδήλωση διαφόρων τύπων καρκίνου. Στην περίπτωση της Οξείας Λεμφοβλαστικής Λευχαιμίας (ΟΛΛ) της παιδικής και εφηβικής ηλικίας τα τελευταία χρόνια το συγκεκριμένο κομμάτι έχει ερευνηθεί για διάφορα γονίδια που εμπλέκονται με κάποιο τρόπο στη διαδικασία της λευχαιμογένεσης. Η παρούσα εργασία κινήθηκε στο ίδιο πλαίσιο και ασχολήθηκε με τη μελέτη των συχνοτήτων τόσο σε επίπεδο γονοτύπων, όσο και αλληλομόρφων των πολυμορφισμών rs4132601 του γονιδίου *IKZF1* και rs3731217 του γονιδίου *CDKN2A* σε παιδιά και εφήβους με ΟΛΛ σε σύγκριση με υγιή άτομα. Σκοπός της μελέτης ήταν η διερεύνηση πιθανής συσχέτισης της εμφάνισης κάποιου γονοτύπου ή αλληλομόρφου με την εκδήλωση της νόσου.

### **3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **3.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ (ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ)**

#### Υλικά:

- Περιφερικό αίμα υγιούς αιμοδότη σε EDTA
- Wizard® Genomic DNA Purification Kit (της εταιρίας Promega)
- Ισοπροπανόλη
- Αιθανόλη 70%
- Eppendorfs
- Πιπέτες

#### Μέθοδος:

Την ομάδα ελέγχου αποτέλεσαν 91 παιδιά και έφηβοι χωρίς νεοπλασματικό νόσημα από το αρχείο του εργαστηρίου Βιολογίας Αιματολογικών νόσων και Καρκίνου στα Παιδιά της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Αρχικά, συλλέγεται περιφερικό αίμα σε σωληνάριο που περιέχει αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) που δρα ως αντιπηκτικό. Πριν την έναρξη του πρωτοκόλλου το σωληνάριο ανακινείται, ώστε να ομογενοποιηθεί το περιεχόμενο. Για τη διαδικασία απομόνωσης του DNA χρησιμοποιείται το Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega).

Σε ένα eppendorf των 1,5 ml τοποθετούνται 900 µl Cell Lysis Solution του Kit και προστίθενται 300 µl ολικού αίματος. Έπεται ήπια ανάδευση με το χέρι 5-6 φορές και κατόπιν, επώαση του μείγματος για 10 λεπτά (minutes, min) σε θερμοκρασία δωματίου (room temperature, RT), κατά τη διάρκεια της οποίας ανά τακτά χρονικά διαστήματα (3-5 min) το eppendorf ανακινείται ελαφρώς 2-3 φορές. Με το βήμα αυτό πραγματοποιείται η λύση των ερυθροκυττάρων. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000-16.000 rcf (relative centrifugal force) για 1 min σε RT, με το πέρας της οποίας απορρίπτεται όσο το δυνατόν περισσότερο υπερκείμενο, χωρίς όμως επαφή με την πελέτα, η οποία αποτελείται από τα λευκά αιμοσφαίρια. Στη συνέχεια, το περιεχόμενο του eppendorf αναδεύεται έντονα με τη χρήση Vortex για περίπου 15 δευτερόλεπτα (seconds, sec) μέχρι να επαναδιαλυτοποιηθεί η πελέτα και να λυθεί η κυτταροπλασματική μεμβράνη των κυττάρων. Ακολουθώντας, προστίθενται 300 µl Nuclei Lysis Solution του Kit και πραγματοποιείται έντονη ανάδευση με την πιπέτα, έως ότου διαλυθεί εντελώς η πελέτα και τα κύτταρα λυθούν. Αμέσως μόλις διαλυθεί πλήρως η πελέτα, διακόπτεται η ανάδευση με σκοπό την αποφυγή της τμήσης του DNA των κυττάρων. Μετά τη διαλυτοποίηση της πελέτας προστίθεται 1,5 µl RNase Solution, το eppendorf ανακινείται ήπια με το χέρι 2-5 φορές και κατόπιν, επωάζεται για 15 min στους 37°C. Κατά τη διάρκεια της επώασης ανά 5 min το σωληνάριο ανακινείται ελαφρώς 2-3 φορές και μετά το πέρας των 15 min αφήνεται σε RT για 5 min επιπλέον, έως ότου πέσει η θερμοκρασία του και φτάσει σε RT. Έπειτα, προστίθενται 100 µl Protein Precipitation Solution και το eppendorf αναδεύεται έντονα με τη χρήση Vortex για περίπου 10-20 sec, έως ότου σχηματισθούν σκουρόχρωμα συσσωματώματα, τα οποία περιλαμβάνουν τις πρωτεΐνες, οι οποίες ύστερα από τη λύση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης έχουν απελευθερωθεί στο

διάλυμα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 16.000 rcf για 3 min σε RT, με το πέρας της οποίας δημιουργείται μια σκουρόχρωμη πελέτα από την καθίζηση των πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων. Το υπερκείμενο συλλέγεται με πολλή προσοχή, ώστε η πιπέτα να μην πλησιάσει την πελέτα και παρασυρθούν πρωτεΐνες, πράγμα που θα επηρεάσει την καθαρότητα του DNA, και προστίθεται σε καθαρό erpendorf που περιέχει 300 μl ισοπροπανόλης. Το νέο erpendorf ανακινείται ελαφρώς με το χέρι μέχρι να σχηματισθεί ένα λευκό συσσωμάτωμα που ομοιάζει με κλωστή. Το συσσωμάτωμα αυτό αποτελεί το DNA των κυττάρων. Το διάλυμα φυγοκεντρείται στις 16.000 rcf για 1 min σε RT και απορρίπτεται με προσοχή το υπερκείμενο. Στη συνέχεια, προστίθενται 300 μl αιθανόλης 70% πολύ αργά και ακουμπώντας την πιπέτα στο τοίχωμα του erpendorf που βρίσκεται απέναντι από την πελέτα, ώστε να μην αποκολληθεί η πελέτα από το κάτω μέρος του erpendorf. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 16.000 rcf για 1 min σε RT και απομακρύνεται όλο το υπερκείμενο με πολλή προσοχή, χωρίς όμως επαφή με την πελέτα του DNA. Το erpendorf αφήνεται με ανοικτό το καπάκι του για 15 min περίπου σε RT, έως ότου εξατμιστούν τα σταγονίδια αιθανόλης που πιθανώς έχουν παραμείνει στο εσωτερικό του. Ύστερα, προστίθενται 100 μl DNA Rehydration Solution του Kit και το δείγμα ανακινείται πολύ ήπια, ώστε να αποκολληθεί η πελέτα του DNA από τον πυθμένα και τέλος, το erpendorf φυλάσσεται overnight στους 4°C. Την επόμενη ημέρα το δείγμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε κάποια πειραματική διαδικασία, ειδάλως αποθηκεύεται στους -20°C για μετέπειτα χρήση (για μερικά χρόνια) ή στους -80°C για μακροχρόνια φύλαξη.

### **3.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ (ΟΜΑΔΑ ΑΣΘΕΝΩΝ)**

#### Υλικά:

- Περιφερικό αίμα ασθενούς σε EDTA
- PureLink® Genomic DNA Mini Kit (της εταιρίας Invitrogen by Thermo Fisher Scientific)
- Καθαρή αιθανόλη (>96%)
- Eppendorfs
- Πιπέτες

#### Μέθοδος:

Την ομάδα των ασθενών αποτέλεσαν 50 παιδιά και έφηβοι που διαγνώστηκαν με Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία στην Κλινική Αιματολογίας – Ογκολογίας Παίδων του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου, ηλικίας 1,5 έως 17,5 ετών και με αναλογία φύλου 1:1.

Αρχικά, συλλέγεται περιφερικό αίμα ασθενούς σε σωληνάριο που περιέχει αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) που δρα ως αντιπηκτικό. Πριν την έναρξη του πρωτοκόλλου το σωληνάριο ανακινείται, ώστε να ομογενοποιηθεί το περιεχόμενο. Για τη διαδικασία απομόνωσης του DNA

χρησιμοποιείται το PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific).

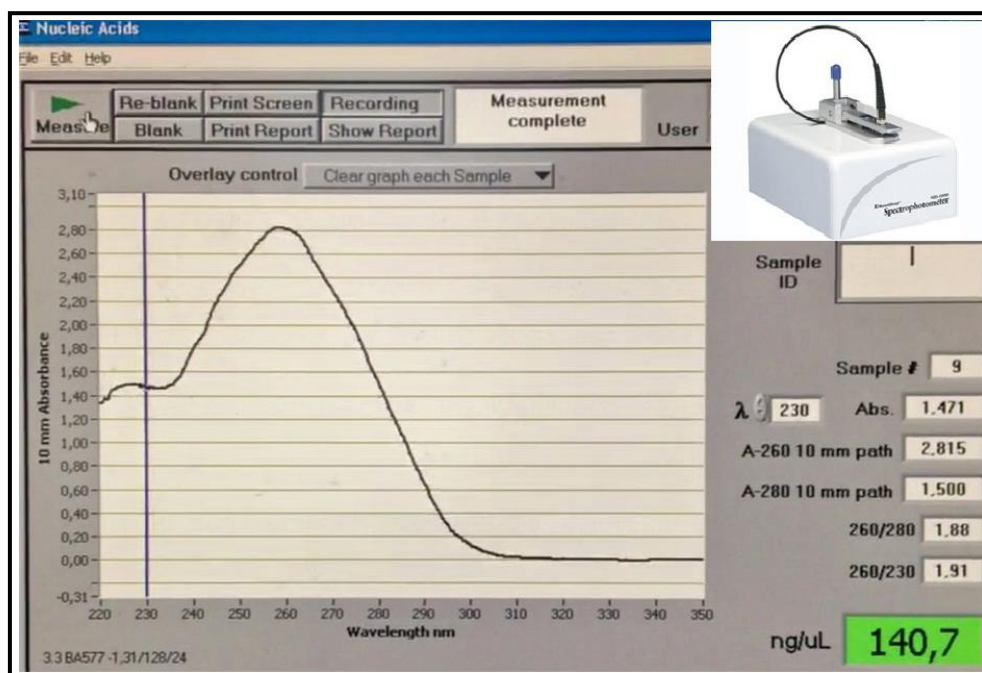
Σε ένα eppendorf των 1,5 ml τοποθετούνται 200 µl περιφερικού αίματος και προστίθενται 20 µl Proteinase K και 20 µl RNAase A. Το μείγμα αναδεύεται ήπια και επωάζεται για 2 min σε RT. Στη συνέχεια, προστίθενται 200 µl Lysis Binding Buffer του Kit και γίνεται ανάδευση με τη χρήση Vortex για 5-10 sec μέχρι να ομογενοποιηθεί το μείγμα. Ακολουθεί επώαση για 10 min στους 55°C με σκοπό τη διάλυση των πρωτεϊνών. Μετά το πέρας της επώασης προστίθενται 200 µl καθαρής αιθανόλης (>96%) και το περιεχόμενο του eppendorf αναδεύεται έντονα με τη χρήση Vortex για 5-10 sec. Το δείγμα μεταφέρεται σε μια κολώνα που βρίσκεται μέσα σε collection tube και φυγοκεντρείται στις 10.000 rcf για 1 min σε RT. Το collection tube απορρίπτεται και η κολώνα τοποθετείται σε νέο. Έπειτα, προστίθενται στην κολώνα 500 µl Wash Buffer 1 του Kit και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 10.000 rcf για 1 min σε RT, μετά το πέρας της οποίας το collection tube απορρίπτεται. Η κολώνα τοποθετείται σε νέο collection tube και σε αυτήν προστίθενται 500 µl Wash Buffer 2 του Kit. Ακολουθεί ξανά φυγοκέντρηση, αυτήν τη φορά, στις 16.000 rcf για 3 min σε RT. Το collection tube απορρίπτεται, η κολώνα τοποθετείται σε αποστειρωμένο eppendorf και σε αυτήν προστίθενται 50 µl Elution Buffer του Kit. Το δείγμα επωάζεται για 1 min σε RT και κατόπιν, φυγοκεντρείται στις 16.000 rcf για 1 min. Τέλος, η κολώνα απορρίπτεται, καθώς το δείγμα DNA έχει συγκεντρωθεί στο eppendorf, το οποίο και αποθηκεύεται στους -20°C για μετέπειτα χρήση (για μερικά χρόνια) ή στους -80°C για μακροχρόνια φύλαξη.

### **3.3. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA**

Μετά την απομόνωση του γενωμικού DNA από το αίμα τόσο των ασθενών όσο και της ομάδας ελέγχου απαιτείται ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος του DNA. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε το NanoDrop, μια συσκευή που επιτρέπει την ποσοτικοποίηση και αξιολόγηση της καθαρότητας των δειγμάτων, υπολογίζοντας την ακριβή συγκέντρωση του DNA, RNA και πρωτεϊνών, εισάγοντας μόνο 1-2 µl από το υπό μελέτη δείγμα. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer της εταιρίας Thermo Fisher Scientific.

Για τον έλεγχο του δείγματος αρχικά επιλέγεται το κατάλληλο πρόγραμμα στον ηλεκτρονικό υπολογιστή (ND100) και γίνεται επιλογή του προς μέτρηση προϊόντος, εν προκειμένω Nucleid Acid. Στον αισθητήρα της συσκευής τοποθετείται 1,5 µl Elution Buffer ή DNA Rehydration Solution, ανάλογα με το υπό εξέταση δείγμα και τη μέθοδο που ακολουθήθηκε για την απομόνωση του DNA. Κλείνεται η κεφαλή της συσκευής και στον ηλεκτρονικό υπολογιστή επιλέγεται η μέτρηση του blank. Έπειτα, καθαρίζεται απαλά η κεφαλή με απορροφητικό χαρτί και τοποθετείται στον αισθητήρα 1,5 µl δείγματος DNA. Επιλέγεται το measure και κατόπιν εμφανίζεται το αποτέλεσμα. Το δείγμα χαρακτηρίζεται από την συγκέντρωση DNA ανά µl, την καθαρότητα ως προς τα άλατα (από το λόγο 260nm/230nm) και την καθαρότητα ως προς τις πρωτεΐνες (από το λόγο 260nm/280nm) (Εικόνα 3). Μετά από την μέτρηση

κάθε δείγματος η κεφαλή καθαρίζεται απαλά με απορροφητικό χαρτί. Όση ώρα διαρκέσει η διαδικασία τα δείγματα πρέπει να συντηρούνται σε πάγο, καθώς το DNA είναι ευαίσθητο και μπορεί να επέλθει αποδιάταξη. Με το πέρας της διαδικασίας τοποθετείται στον αισθητήρα 1,5 μl ενέσιμου νερού και το πρόγραμμα στον υπολογιστή κλείνεται μέχρι την επόμενη χρήση.



*Εικόνα 3. Ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος γονωμικού DNA στο NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer. Ο λόγος 260nm/230nm χαρακτηρίζει την καθαρότητα του δείγματος DNA ως προς τα άλατα, ενώ ο λόγος 260nm/280nm την καθαρότητα του δείγματος ως προς τις πρωτεΐνες.*

### **3.4. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ**

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια εργαστηριακή τεχνική που εφευρέθηκε το 1983 από τον Αμερικανό βιοχημικό Kary Mullis, ο οποίος βραβεύθηκε για αυτήν με Nobel Χημείας το 1993. Η τεχνική αυτή επιτρέπει το γρήγορο πολλαπλασιασμό (πολλά εκατομμύρια αντίγραφα) συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA, των οποίων οι παρακείμενες αλληλουχίες είναι γνωστές, με τη χρήση ενός ειδικού ενζύμου, στηριζόμενη στις βασικές αρχές της αντιγραφής του DNA. Η χρήση της τεχνικής περιλαμβάνεται σε όλες σχεδόν τις εφαρμογές της σύγχρονης Βιολογίας και Ιατρικής και επεκτείνεται από τη φυλογενετική ανάλυση δειγμάτων αρχαίου DNA το οποίο ανακτήθηκε από απολιθώματα, σε κλωνοποίηση γονιδίων, αλληλούχιση του DNA, διάγνωση γενετικών ασθενειών, εντοπισμό μεταλλαγών στο γενετικό υλικό, διάγνωση ιογενών

λοιμώξεων, στην Ιατροδικαστική για την ταυτοποίηση ατόμων μέσω βιολογικού υλικού, στον καθορισμό του βιολογικού πατέρα σε περιπτώσεις που αμφισβητείται η πατρότητα, καθώς και σε πολλούς ακόμη τομείς. Η PCR έχει συμβάλει τα μέγιστα και στον τομέα της ογκολογίας. Μέσω αυτής ο θεράπων ιατρός έχει πλέον τη δυνατότητα να ανιχνεύσει ορισμένους τύπους καρκίνου σε πολύ πρώιμο στάδιο, να παρακολουθήσει την αποτελεσματικότητα της χημειοθεραπείας και να ανιχνεύσει έγκαιρα την επανεμφάνιση της νόσου. Ειδικά για ορισμένους τύπους λευχαιμιών που προκύπτουν λόγω χρωμοσωμικών αναδιατάξεων η PCR αποτελεί την ιδανική τεχνική ανίχνευσης [62].

Όπως αναφέρθηκε στην παραπάνω παράγραφο, η τεχνική βασίζεται στη διαδικασία της αντιγραφής του DNA. Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης απαιτείται η προσθήκη: α) της αλληλουχίας – στόχου, β) ενός ζεύγους ειδικών αλληλουχιών DNA (εκκινητές, primers) μήκους συνήθως 20-25 νουκλεοτιδίων που υβριδοποιούνται με τις παράπλευρες αλληλουχίες του στόχου, γ) των τεσσάρων τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs: dATP, dTTP, dCTP, dGTP), δ) μιας θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης (Taq πολυμεράση) που έχει απομονωθεί από το θερμοφιλό βακτήριο *Thermus aquaticus* που ζει σε θερμές πηγές, ε) ενέσιμου νερού, στ) κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος (buffer) και ζ) κατιόντων μαγνησίου ( $Mg^{2+}$ ), τα οποία παρέχουν το κατάλληλο χημικό περιβάλλον για τη σταθερότητα της DNA πολυμεράσης. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιείται σε θερμικό κυκλοποιητή και βασίζεται στην πολλαπλή επανάληψη του κύκλου αντιγραφής (συνήθως 25-35 φορές). Σε κάθε κύκλο αντιγραφής τα μόρια του DNA διπλασιάζονται, οπότε μετά από  $n$  κύκλους έχουν παραχθεί  $2^n$  αντίγραφα του αρχικού μορίου. Κάθε κύκλος αντιγραφής αποτελείται από τρία διακριτά στάδια:

1. Αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου DNA, ώστε να γίνει μονόκλωνο ( $\theta > 90^\circ C$ ).
2. Υβριδοποίηση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες των μονόκλωνων αλυσίδων ( $\theta \sim 50-65^\circ C$ , η ακριβής θερμοκρασία εξαρτάται από την αλληλουχία των εκκινητών).
3. Επιμήκυνση των εκκινητών με κατεύθυνση  $5' \rightarrow 3'$  με τη βοήθεια της DNA Taq πολυμεράσης ( $\theta=72^\circ C$ ).

Μετά την ολοκλήρωση της PCR ο διαχωρισμός των ενισχυμένων προϊόντων γίνεται με **ηλεκτροφόρηση** σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης. Η ηλεκτροφόρηση είναι μια μέθοδος με μεγάλη διαχωριστική ικανότητα και χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό βάσει μεγέθους διαφόρων μορίων (π.χ. DNA, RNA). Για να γίνει αυτό, η αγαρόζη δημιουργεί ένα στερεό και πορώδες πήκτωμα, στο οποίο εισάγονται σε ειδικές θέσεις υποδοχής («πηγάδια») τα δείγματα DNA. Όταν στο πήκτωμα εφαρμοστεί ηλεκτρικό πεδίο, τα δείγματα DNA, τα οποία είναι αρνητικά φορτισμένα, κινούνται από τον αρνητικό προς τον θετικό πόλο της συσκευής ηλεκτροφόρησης με ταχύτητα που εξαρτάται από το μέγεθός τους. Έτσι, τα προϊόντα της PCR που έχουν μικρότερο μέγεθος κινούνται ταχύτερα από εκείνα με μεγαλύτερο μέγεθος.



### **3.4.1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για τη μελέτη του πολυμορφισμού rs4132601 του γονιδίου IKZF1**

Όλα τα απαραίτητα για την πειραματική διαδικασία υλικά και αντιδραστήρια διατηρούνται σε πάγο, έως ότου χρησιμοποιηθούν. Η Taq DNA πολυμεράση, το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) και το MgCl<sub>2</sub> για την πραγματοποίηση της αντίδρασης είναι της εταιρίας Invitrogen by Thermo Fisher Scientific και τα dNTPs της Thermo Fisher Scientific. Η διαδικασία έχει ως εξής:

Για τελικό όγκο αντίδρασης 25 μl τοποθετούνται σε ειδικό θερμοανθεκτικό eppendorf 3 μl γενωμικού DNA, 2,5 μl ρυθμιστικού διαλύματος 10X (buffer), 1,5 μl MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1 μl dNTPs (12,5 mM το κάθε dNTP/δείγμα), 1,25 μl forward primer (250 ng/μl), 1,25 μl reverse primer (250 ng/μl), 14 μl ενέσιμο νερό και 0,5 μl Taq DNA πολυμεράση (2,5 units/δείγμα).

Οι εκκινητές είναι της εταιρίας Biolegio και έχουν τις κάτωθι αλληλουχίες:

Forward: 5' AACCAATCAAATGTCTGGGAAGC 3'

Reverse: 5' TGGCTATAAAAGGCAGTGAGAGG 3' [63]

Η PCR πραγματοποιείται σε θερμικό κυκλοποιητή Peltier Thermal Cycler PTC-200 (MJ RESEARCH) με τις ακόλουθες συνθήκες αντίδρασης:

95°C για 5 min

40 κύκλοι: 95°C για 1 min, 62°C για 1 min, 72°C για 1 min

72°C για 10 min

Μετά το πέρας της αντίδρασης και την ενίσχυση της αλληλουχίας – στόχου ακολουθεί ο έλεγχος της ύπαρξης του σωστού προϊόντος με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, το οποίο σε τελικό όγκο 150 ml περιέχει 3 g αγαρόζη, 15 μl SYBR safe DNA gel stain (Invitrogen) και 150 ml TBE 1X. Στη συνέχεια, το πήκτωμα εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία με αποτέλεσμα να εμφανίζονται οι ζώνες (ή μπάντες) των δειγμάτων DNA. Το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος μετά την PCR είναι 601 bp (Εικόνα 4α).

### **3.4.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για τη μελέτη του πολυμορφισμού rs3731217 του γονιδίου CDKN2A**

Όλα τα απαραίτητα για την πειραματική διαδικασία υλικά και αντιδραστήρια διατηρούνται σε πάγο, έως ότου χρησιμοποιηθούν. Η Taq DNA πολυμεράση, το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) και το MgCl<sub>2</sub> για την πραγματοποίηση της αντίδρασης είναι της εταιρίας Invitrogen by Thermo Fisher Scientific και τα dNTPs της Thermo Fisher Scientific. Η διαδικασία έχει ως εξής:

Για τελικό όγκο αντίδρασης 25 μl τοποθετούνται σε ειδικό θερμοανθεκτικό eppendorf 3 μl γενωμικού DNA, 2,5 μl ρυθμιστικού διαλύματος 10X (buffer), 1 μl MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1 μl dNTPs (12,5 mM το κάθε dNTP/δείγμα), 1,25 μl forward

primer (250 ng/μl), 1,25 μl reverse primer (250 ng/μl), 14,5 μl ενέσιμο νερό και 0,5 μl Taq DNA πολυμεράση (2,5 units/δείγμα).

Οι εκκινητές είναι της εταιρίας Biolegio και έχουν τις κάτωθι αλληλουχίες:

Forward: 5' AAAAGGGGGACAACCATTTCTC 3'

Reverse: 5' CCCCTCTCAAATATGCTGTCC 3' [64]

Η PCR πραγματοποιείται σε θερμικό κυκλοποιητή Peltier Thermal Cycler PTC-200 (MJ RESEARCH) με τις ακόλουθες συνθήκες αντίδρασης:

94°C για 5 min

35 κύκλοι: 94°C για 1 min, 58°C για 1 min, 72°C για 1 min

72°C για 10 min

Μετά το πέρας της αντίδρασης και την ενίσχυση της αλληλουχίας – στόχου ακολουθεί ο έλεγχος της ύπαρξης του σωστού προϊόντος με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, το οποίο σε τελικό όγκο 150 ml περιέχει 3 g αγαρόζη, 15 μl SYBR safe DNA gel stain (Invitrogen) και 150 ml TBE 1X. Στη συνέχεια, το πήκτωμα εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία με αποτέλεσμα να εμφανίζονται οι ζώνες (ή μπάντες) των δειγμάτων DNA. Το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος μετά την PCR είναι 280 bp (Εικόνα 5α).

### **3.5. ENZYMA ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ**

Τα **ένζυμα περιορισμού** ή **περιοριστικές ενδονουκλεάσες** (restriction enzymes) απομονώνονται από προκαρυώτες, συνήθως βακτήρια, και ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι να τα προστατεύουν από την εισβολή «ξένου» DNA. Λειτουργούν, δηλαδή, ως αμυντικός μηχανισμός κατατέμνοντας το DNA σε περιοχές που συναντώνται συγκεκριμένες αλληλουχίες, οι λεγόμενες θέσεις περιορισμού [65].

Στην περίπτωση ύπαρξης πολυμορφισμού στην περιοχή του γονιδιώματος που μελετάται μπορούν να δημιουργηθούν νέες θέσεις κοπής από το περιοριστικό ένζυμο ή αντιθέτως, να απαλειφθούν εκείνες που φυσιολογικά αναγνωρίζονταν στη θέση αυτή. Έτσι, λόγω της ιδιαιτερότητας της ικανότητας αναγνώρισης των θέσεων περιορισμού που χαρακτηρίζονται από πολύ συγκεκριμένη αλληλουχία καθίσταται δυνατή η ανίχνευση πολυμορφισμών ύστερα από την ενίσχυση του υπό μελέτη γονιδιωματικού τμήματος και την επώασή του με κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο.

#### **3.5.1. Πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *MboI* για τη μελέτη του πολυμορφισμού rs4132601 του γονιδίου *IKZF1***

Για την πέψη του DNA με περιοριστικά ένζυμα απαιτείται η ενισχυμένη αλληλουχία – στόχος (PCR-προϊόν), το κατάλληλο ένζυμο και ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) που περιέχει κατιόντα μαγνησίου ( $Mg^{2+}$ ), απαραίτητα για την κοπή του DNA

– στόχου. Όλα τα υλικά είναι της εταιρίας Thermo Fisher Scientific και ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

Συλλέγονται 8 μl από το προϊόν της PCR στα οποία προστίθενται 2 μl buffer, 9,5 μl ενέσιμου νερού και τέλος, 5 units ενζύμου *MboI*. Το μείγμα επωάζεται για 3 ώρες στους 37°C. Με τη διαδικασία αυτή το περιοριστικό ένζυμο αναγνωρίζει τις ήδη υπάρχουσες, καθώς και αυτές που δημιουργούνται λόγω της ύπαρξης του συγκεκριμένου πολυμορφισμού, θέσεις κοπής και κατατέμνει το DNA σε αυτές τις θέσεις. Τα αποτελέσματα της πέψης ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% με επακόλουθη έκθεσή του σε υπεριώδη ακτινοβολία, με σκοπό την εμφάνιση των ζωνών DNA και τη μελέτη του μεγέθους των προϊόντων ύστερα από την πέψη έτσι, ώστε να ανιχνευθεί η ύπαρξη ή μη του πολυμορφισμού.

Ανίχνευση δύο ζωνών στο πήκτωμα στα μεγέθη 321 bp και 280 bp υποδηλώνει την ύπαρξη του αλληλομόρφου αγρίου τύπου (wild type) T σε ομοζυγωτία. Στην περίπτωση αυτή δηλαδή, συναντάται ο γονότυπος TT και αυτό σημαίνει έλλειψη του πολυμορφισμού. Οι δύο αυτές μπάντες συναντώνται, διότι η συγκεκριμένη αλληλουχία εμπεριέχει ήδη μια θέση αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου, το οποίο κόβει το DNA στη συγκεκριμένη θέση ακόμα και χωρίς την ύπαρξη του πολυμορφισμού. Τρεις ζώνες στο πήκτωμα υποδηλώνουν την ύπαρξη μιας επιπλέον θέσης αναγνώρισης του ενζύμου, άρα και του εν λόγω πολυμορφισμού (T→G) σε κατάσταση ομοζυγωτίας (γονότυπος GG). Τα μεγέθη αυτών των ζωνών είναι 321 bp, 223 bp και 57 bp. Τέλος, η εμφάνιση τεσσάρων ζωνών στο πήκτωμα σημαίνουν την κατάσταση ετεροζυγωτίας (γονότυπος TG), κατά την οποία το ένα αλληλόμορφο φέρει τον πολυμορφισμό και το άλλο όχι. Επομένως, σε αυτήν την περίπτωση εμφανίζονται τα μεγέθη 321 bp, 280 bp, 223 bp και 57 bp (Εικόνα 4β).

### **3.5.2. Πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *MvaI* για τη μελέτη του πολυμορφισμού rs3731217 του γονιδίου *CDKN2A***

Για την πέψη του DNA με περιοριστικά ένζυμα απαιτείται η ενισχυμένη αλληλουχία – στόχος (PCR-προϊόν), το κατάλληλο ένζυμο και ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) που περιέχει κατιόντα μαγνησίου ( $Mg^{2+}$ ), απαραίτητα για την κοπή του DNA – στόχου. Όλα τα υλικά είναι της εταιρίας Thermo Fisher Scientific και ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

Συλλέγονται 8 μl από το προϊόν της PCR στα οποία προστίθενται 2 μl buffer, 9,5 μl ενέσιμου νερού και τέλος, 5 units ενζύμου *MvaI*. Το μείγμα επωάζεται για 3 ώρες στους 37°C. Με τη διαδικασία αυτή το περιοριστικό ένζυμο αναγνωρίζει τις θέσεις περιορισμού που δημιουργούνται λόγω της ύπαρξης του συγκεκριμένου πολυμορφισμού και κατατέμνει το DNA σε αυτές τις θέσεις. Τα αποτελέσματα της πέψης ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% με επακόλουθη έκθεσή του σε υπεριώδη ακτινοβολία, με σκοπό την εμφάνιση των ζωνών DNA και τη μελέτη του μεγέθους των προϊόντων ύστερα από την πέψη έτσι, ώστε να ανιχνευθεί η ύπαρξη ή μη του πολυμορφισμού.

Ανίχνευση μίας ζώνης στο πήκτωμα στο μέγεθος 280 bp υποδηλώνει την ύπαρξη του αλληλομόρφου αγρίου τύπου (wild type) T σε ομοζυγωτία. Στην περίπτωση αυτή δηλαδή, συναντάται ο γονότυπος TT και αυτό σημαίνει έλλειψη της θέσης περιορισμού. Δύο ζώνες στο πήκτωμα υποδηλώνουν την ύπαρξη μιας θέσης αναγνώρισης του ενζύμου, άρα και του εν λόγω πολυμορφισμού (T→G) σε κατάσταση ομοζυγωτίας (γονότυπος GG). Τα μεγέθη αυτών των ζωνών είναι 154 bp και 126 bp. Τέλος, η εμφάνιση τριών ζωνών στο πήκτωμα σημαίνουν την κατάσταση ετεροζυγωτίας (γονότυπος TG), κατά την οποία το ένα αλληλόμορφο φέρει τον πολυμορφισμό και το άλλο όχι. Επομένως, σε αυτήν την περίπτωση εμφανίζονται τα μεγέθη 280 bp, 154 bp και 126 bp (Εικόνα 5β).

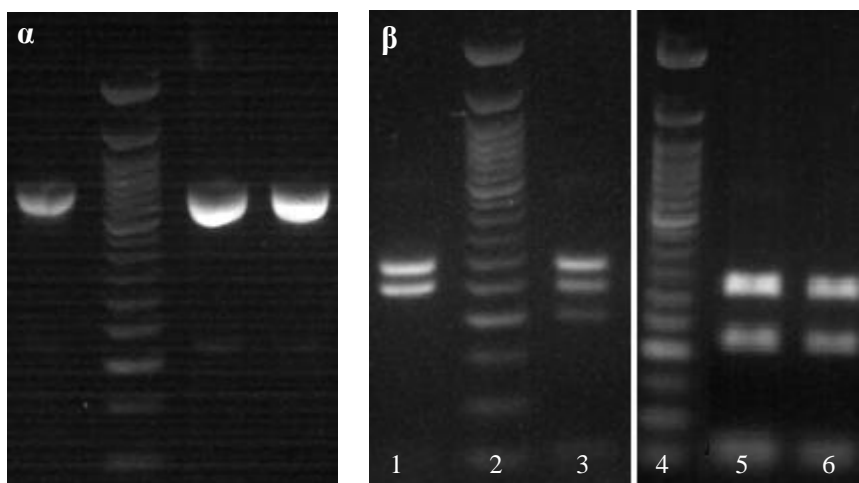
### **3.6. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ**

Οι ασθενείς και οι μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη γενετικής συσχέτισης δεν σχετίζονταν μεταξύ τους. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), εφαρμόζοντας το προσθετικό μοντέλο. Χρησιμοποιήθηκε το τεστ Chi square ( $\chi^2$ ), είτε για έναν ή για δύο βαθμούς ελευθερίας ή η ακριβής δοκιμασία Fisher, για να εξεταστούν οι διαφορές των συχνοτήτων των γονότυπων αλλά και των αλληλομόρφων μεταξύ των ασθενών και των μαρτύρων. Το  $p < 0.05$  ορίστηκε ως στατιστικά σημαντικό. Υπολογίστηκαν επίσης τα odd ratios (OR) για διάστημα εμπιστοσύνης (CI) 95% που αντιπροσωπεύουν την εκτίμηση του σχετικού κινδύνου εμφάνισης της νόσου ανάλογα με το γονότυπο ή κάποιο αλληλόμορφο.

## **4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

#### 4.1. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ rs4132601 ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *IKZF1* ΣΤΗΝ ΟΛΑ ΠΑΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΕΦΗΒΩΝ

Η μελέτη του πολυμορφισμού rs4132601 του γονιδίου *IKZF1* έγινε εφικτή ύστερα από πραγματοποίηση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με κατάλληλους εκκινητές για την ενίσχυση της αλληλουχίας – στόχου και κατόπιν, την επώαση των δειγμάτων με το κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο, εν προκειμένω το *MboI*. Μετά το πέρας της επώασης τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και εκτέθηκαν σε υπεριώδη ακτινοβολία, οπότε ανιχνεύθηκαν οι ζώνες DNA στο πήκτωμα. Η φωτογραφία αυτού ελήφθη μέσω λογισμικού του ηλεκτρονικού υπολογιστή και μελετήθηκαν τα μεγέθη των προϊόντων, ώστε να ανιχνευθεί ο γονότυπος κάθε ατόμου (Εικόνα 4).



*Εικόνα 4. IKZF1(rs4132601). (α) Προϊόν PCR στα 601 bp (DNA ladder μήκους 50 bp). (β) Προϊόν πέψης με MboI. Στήλη 1: γονότυπος TT με ζώνες DNA στα 321-280 bp. Στήλες 2 και 4: DNA ladder μήκους 50 bp. Στήλη 3: γονότυπος TG με ζώνες DNA στα 321-280-223-57 bp. Στήλες 5 και 6: γονότυπος GG με ζώνες DNA στα 321-223-57 bp.*

Στην περίπτωση του πολυμορφισμού rs4132601 του γονιδίου *IKZF1* στην ομάδα των ασθενών τα ποσοστά ανίχνευσης των γονοτύπων TT, TG και GG ήταν 68%, 26% και 6% αντίστοιχα, ενώ οι συχνότητες των αλληλομόρφων T και G ήταν 81% και 19% αντίστοιχα. Από την άλλη, η ομάδα ελέγχου παρουσίασε ποσοστά ανίχνευσης των γονοτύπων TT, TG και GG στο 66%, 23% και 11% αντίστοιχα, ενώ οι συχνότητες των αλληλομόρφων T και G ήταν 77% και 23% αντίστοιχα.

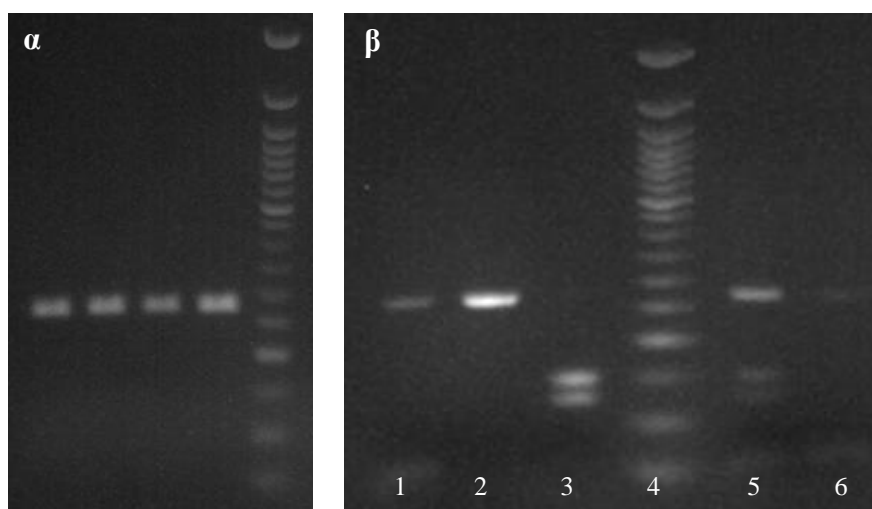
Ακολούθησε η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, μέσα από την οποία δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά όσον αφορά τη συχνότητα είτε των γονοτύπων TG και GG [ $p=0.838$ ,  $OR=0.915$ ,  $CI$  95% (0.407-2.057) και  $p=0.536$ ,  $OR=1.889$ ,  $CI$  95% (0.486-7.340) αντίστοιχα], είτε του αλληλομόρφου G [ $p=0.545$ ,  $OR=1.240$ ,  $CI$  95% (0.674-2.279)] μεταξύ της ομάδας των ασθενών και της ομάδας των μαρτύρων. Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της παραπάνω στατιστικής ανάλυσης.

Γονότυποι	ΑΣΘΕΝΕΙΣ N=50	ΜΑΡΤΥΡΕΣ N=91	p-value	OR (95% CI)
TT	34	60		
TG	13	21	p=0.838	0.915 (0.407-2.057)
GG	3	10	p=0.536	1.889 (0.486-7.340)
Αλληλόμορφα	N=100	N=182		
T	81	141		
G	19	41	p=0.545	1.240 (0.674-2.279)

Πίνακας 1. Συχνότητες γονοτύπων και αλληλομόρφων του πολυμορφισμού rs4132601 του γονιδίου IKZF1 σε 50 ασθενείς με ΟΛΛ και 91 μάρτυρες.

#### 4.2. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ rs3731217 ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ CDKN2A ΣΤΗΝ ΟΛΛ ΠΑΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΕΦΗΒΩΝ

Η μελέτη του πολυμορφισμού rs3731217 του γονιδίου *CDKN2A* πραγματοποιήθηκε ύστερα από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με κατάλληλους εκκινητές για την ενίσχυση της αλληλουχίας – στόχου και κατόπιν, επώαση των δειγμάτων με το κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο, εν προκειμένω το *MvaI*. Μετά το πέρας της επώασης τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και εκτέθηκαν σε υπεριώδη ακτινοβολία, οπότε ανιχνεύθηκαν οι ζώνες DNA στο πήκτωμα. Η φωτογραφία αυτού ελήφθη μέσω λογισμικού του ηλεκτρονικού υπολογιστή και μελετήθηκαν τα μεγέθη των προϊόντων, ώστε να ανιχνευθεί ο γονότυπος κάθε ατόμου (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. *CDKN2A* (rs3731217). (α) Προϊόν PCR στα 280 bp (DNA ladder μήκους 50 bp). (β) Προϊόν πέψης με *MvaI*. Στήλες 1,2 και 6: γονότυπος TT με ζώνη DNA στα 280 bp. Στήλη 3: γονότυπος GG με ζώνες DNA στα 154-126 bp. Στήλη 4: DNA ladder μήκους 50 bp. Στήλη 5: γονότυπος TG με ζώνες DNA στα 280-154-126 bp.

Στην περίπτωση του πολυμορφισμού rs3731217 του γονιδίου *CDKN2A* στην ομάδα των ασθενών τα ποσοστά ανίχνευσης των γονοτύπων TT, TG και GG ήταν 82%, 16% και 2% αντίστοιχα, ενώ οι συχνότητες των αλληλομόρφων T και G ήταν 90% και 10% αντίστοιχα. Από την άλλη, η ομάδα ελέγχου παρουσίασε ποσοστά ανίχνευσης των γονοτύπων TT, TG και GG στο 74,7%, 25,3% και 0% αντίστοιχα, ενώ οι συχνότητες των αλληλομόρφων T και G ήταν 87% και 13% αντίστοιχα.

Ακολούθησε η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, μέσα από την οποία δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά όσον αφορά τη συχνότητα είτε των γονοτύπων TG και GG [ $p=0.403$ , OR=1.541, CI 95% (0.650-3.651)], είτε του αλληλομόρφου G [ $p=0.566$ , OR=1.302, CI 95% (0.590-2.860)] μεταξύ της ομάδας των ασθενών και της ομάδας των μαρτύρων. Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της παραπάνω στατιστικής ανάλυσης.

Γονότυποι	ΑΣΘΕΝΕΙΣ N=50	ΜΑΡΤΥΡΕΣ N=91	p-value	OR (95% CI)
TT	41	68		
TG+GG	9	23	p=0.403	1.541 (0.650-3.651)
Αλληλόμορφα	N=100	N=182		
T	90	159		
G	10	23	p=0.566	1.302 (0.590-2.860)

*Πίνακας 2. Συχνότητες γονοτύπων και αλληλομόρφων του πολυμορφισμού rs3731217 του γονιδίου CDKN2A σε 50 ασθενείς με ΟΑΛ και 91 μάρτυρες.*



## **5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Οι νεοπλασίες είναι μεν σπάνια νοσήματα στα παιδιά και τους εφήβους, αποτελούν όμως, τη δεύτερη αιτία θανάτου στην παιδική ηλικία και την πρώτη σχετιζόμενη με νόσο [1]. Ο καρκίνος της παιδικής και εφηβικής ηλικίας είναι μια διακριτή οντότητα και οι διαφορές που εμφανίζει σε σχέση με αυτόν των ενηλίκων είναι θεμελιώδεις. Οι διαφορές αυτές ξεκινούν από τους μοριακούς μηχανισμούς και τα ογκογενετικά συμβάντα που οδηγούν στην εμφάνιση της νόσου, με την επιγενετική απορρύθμιση να κυριαρχεί στα παιδιά, σε αντίθεση με τις συσσωρευμένες γενετικές μεταλλάξεις που χαρακτηρίζουν τον καρκίνο των ενηλίκων, και επεκτείνονται μέχρι την αποτελεσματικότητα και την απόκριση στην εκάστοτε θεραπεία [3,6]. Η διάγνωση του καρκίνου της παιδικής ηλικίας έρχεται συνήθως στα πρώτα χρόνια ζωής ή ακόμα και στους πρώτους μήνες από τη γέννηση. Επομένως, παρατηρείται έλλειψη έκθεσης των ατόμων σε περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου, πράγμα που σημαίνει πως αυτοί έχουν εξαιρετικά μικρό ρόλο στην ανάπτυξη της νόσου και πως οι απαραίτητες ογκογενετικές διαδικασίες θα πρέπει να συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της κύησης και στο ελάχιστο διάστημα έως τη διάγνωση [7].

Την πιο συχνή νεοπλασία της παιδικής ηλικίας αποτελεί η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ΟΛΛ), η οποία εμφανίζεται αρκετά συχνά και στους εφήβους. Η νόσος προσβάλλει τον αιμοποιητικό ιστό και είναι το αποτέλεσμα της διαταραχής της κυτταρικής ανάπτυξης και διαφοροποίησης του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου. Ο λευχαιμικός κλώνος που δημιουργείται αυτοανανεώνεται, αδυνατεί να εξελιχθεί προς ώριμες μορφές λευκών αιμοσφαιρίων κι έτσι, παρατηρείται άθροιση βλαστών στο μυελό των οστών και τελικά, καταστολή της φυσιολογικής αιμοποίησης. Η ΟΛΛ χαρακτηρίζεται από ένα ευρύ φάσμα κλινικών φαινοτύπων και υποκείμενων βιολογικών παθογενετικών μηχανισμών [10,11]. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων κυριαρχούν οι επίκτητες αλλαγές στο DNA, με την αιτία τους όμως να παραμένει ακόμα άγνωστη, ενώ φαίνεται πως η κληρονομική προδιάθεση δεν κατέχει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της νόσου [8,9]. Η αιτιολογία, λοιπόν, της ΟΛΛ είναι αδιευκρίνιστη ακόμα και σήμερα, αν και έχουν περάσει σχεδόν δύο αιώνες από την αναγνώριση της λευχαιμίας ως μιας ξεχωριστής παθολογικής κατάστασης.

Τα λευχαιμικά κύτταρα στην ΟΛΛ, όπως και τα καρκινικά κύτταρα στους περισσότερους τύπους καρκίνου άλλωστε, χαρακτηρίζονται από γενετική και ανοσοφαινοτυπική ετερογένεια. Η νόσος φαίνεται να έχει μια σύνθετη κλωνική δομή που προκύπτει από πολλούς διαφορετικούς υποκλώνους με περίπλοκη οικολογία, η οποία οδηγεί τα κύτταρα σε κλωνική εξέλιξη και συνεπώς, σε συσσώρευση μεταλλαγών και άλλων ογκογενετικών συμβάντων κυρίως στην ενδομήτρια ζωή (χαρακτηριστικό της εμβρυϊκής προέλευσης της ΟΛΛ), αλλά και στη μεταγεννητική περίοδο [28]. Βέβαια, ο ακριβής μηχανισμός του λευχαιμικού μετασχηματισμού δεν είναι πλήρως κατανοητός. Ωστόσο, τις τελευταίες δεκαετίες μέσα από πολυάριθμες μελέτες έχει προκύψει γνώση για την παθογένεση της ΟΛΛ, η οποία οφείλεται σε μια σειρά γενετικών αλλαγών που περιλαμβάνουν διάφορα κυτταρογενετικά συμβάντα [37,38]. Διάφορα τέτοια συμβάντα έχουν συσχετισθεί με την πρόγνωση και την ανταπόκριση στη θεραπεία, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι η μελέτη του κυτταρογενετικού προφίλ των ασθενών αποτελεί μια σύνθετη ανάλυση, απαραίτητη για την κατηγοριοποίησή τους σε ομάδες κινδύνου και την επιλογή κατάλληλου θεραπευτικού σχήματος, αναλόγως των γενετικών αλλοιώσεων που φέρει ο κάθε ασθενής [10]. Η παραπάνω ταξινόμηση εφαρμόζεται αρκετά χρόνια και σε αυτήν προστίθενται τα νέα δεδομένα. Στη μελέτη του κυτταρογενετικού και επιγενετικού προφίλ των ασθενών και στην επακόλουθη ταξινόμησή τους σε ομάδες κινδύνου

οφείλεται η εξαιρετικά σημαντική πρόοδος στη θεραπεία, αλλά και η μείωση κατά το δυνατόν των απώτερων επιπλοκών που κυνηγούν τους επιβιώσαντες [40].

Μεγάλο κομμάτι της μελέτης του γενετικού προφίλ των ασθενών που πάσχουν από ΟΛΛ αποτελούν οι μεταλλαγές και κατά συνέπεια, οι πολυμορφισμοί. Ειδικά οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs), που είναι το αποτέλεσμα αυθόρμητων μεταλλαγών, τα τελευταία χρόνια έχουν αποκτήσει σταθερή θέση στη μελέτη της παθοβιολογίας της νόσου [44]. Μέσα από διάφορες μελέτες έχει αναδειχθεί ο κρίσιμος ρόλος των πολυμορφισμών στη διαδικασία της λευχαιμογένεσης. Πρόσφατες έρευνες έχουν ανιχνεύσει ισχυρή σύνδεση μεταξύ κληρονομούμενων γενετικών πολυμορφισμών και ευαισθησίας για ανάπτυξη ΟΛΛ, συμπεριλαμβανομένων και SNPs στα γονίδια *IKZF1* και *CDKN2A*, μεταξύ άλλων [38,52]. Αυτοί οι κληρονομούμενοι πολυμορφισμοί φαίνεται να επηρεάζουν ακόμα την τοξικότητα που προκαλείται από τη θεραπευτική αγωγή, αλλά και την απόκριση σε αυτήν. Επομένως, η διερεύνηση αυτών μπορεί να συμβάλει στην κατάλληλη τροποποίηση των θεραπευτικών σχημάτων, με στόχο τη μείωση της τοξικότητας με παράλληλη διατήρηση, όμως, της αποτελεσματικότητάς της [38].

Η διαδικασία της αιμοποίησης είναι εξαιρετικά πολύπλοκη όσον αφορά τη ρύθμισή της. Πολλά γονίδια εμπλέκονται και φυσικά, δεν ανήκουν όλα σε μια ομάδα. Όπως και κάθε άλλη φυσιολογική διεργασία, έτσι κι αυτή ρυθμίζεται από διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες, ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου, κυτταροκίνες, σηματοδοτικά μονοπάτια, κ.ά.. Μέσα σε αυτά ανήκουν και τα γονίδια *IKZF1* και *CDKN2A* που μελετώνται στην παρούσα εργασία. Το γονίδιο *IKZF1* κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη IKAROS που αποτελεί σημαντικό μεταγραφικό παράγοντα και εμπλέκεται στη διαδικασία της αιμοποίησης [46,47]. Αποτελεί, επίσης, κύριο ρυθμιστή της διαφοροποίησης των λεμφοκυττάρων και ογκοκατασταλτικό γονίδιο. Ο ρόλος της πρωτεΐνης έχει ερευνηθεί εκτεταμένα και έχει διαπιστωθεί η παθογενετική της σχέση με διάφορα νοσήματα. Κυτταρογενετικές αλλοιώσεις στην περιοχή του *IKZF1* ανιχνεύονται συχνά στην ΟΛΛ και φαίνεται να αποτελούν ισχυρό προγνωστικό δείκτη στην περίπτωση κυρίως της ΟΛΛ Β-σειράς, ενώ μείωση στην ενεργότητα της πρωτεΐνης μπορεί να συμβάλει στη διαδικασία της λευχαιμογένεσης και αυξάνει την αντίσταση στη χημειοθεραπεία [47,59,60].

Από την άλλη, το γονίδιο *CDKN2A* κωδικοποιεί για δύο διαφορετικές πρωτεΐνες, τις p16<sup>INK4a</sup> και p14<sup>ARF</sup>. Ανήκει στην ομάδα των ογκοκατασταλτικών γονιδίων και οι πρωτεΐνες είναι αναστολείς του κυτταρικού κύκλου [48]. Συγκεκριμένα, η p14<sup>ARF</sup> είναι κύριος ρυθμιστής της πρωτεΐνης p53 και μέσω αυτής της αρνητικής ρύθμισης το σύστημα οδηγείται σε διακοπή του κυτταρικού κύκλου ή απόπτωση [48-51]. Οι κυτταρογενετικές αλλοιώσεις του συμπλέγματος γονιδίων *CDKN2A/CDKN2B* είναι εξαιρετικά συχνές στην ΟΛΛ της παιδικής και εφηβικής ηλικίας και ανιχνεύονται κυρίως στους ασθενείς που ταξινομούνται στις ομάδες υψηλού κινδύνου [61]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το εύρημα της ταυτόχρονης ανίχνευσης ελλειμμάτων στα γονίδια *CDKN2A* και *IKZF1*, η οποία συνδέεται με δυσμενέστερη πρόγνωση και αυξημένο κίνδυνο υποτροπής της νόσου, σε σχέση με τα μεμονωμένα ελλείμματα [60]. Οι μεταλλαγές γαμετικής σειράς, τώρα, στο *CDKN2A* φαίνεται να σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΟΛΛ, με τα δεδομένα για την παθογενετική και κλινική συσχέτιση του γονιδίου με την ανάπτυξη της νόσου να είναι ακόμα υπό μελέτη. Κάποιες, όμως, μελέτες δείχνουν πως τα ελλείμματα στην περιοχή αυτή συμβάλλουν στη μείωση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας και διεκκολύνουν την ανάπτυξη αντίστασης σε αυτήν [61].

Πέρα από τη μελέτη του κυτταρογενετικού προφίλ των ασθενών με ΟΛΛ, που πλέον αποτελεί βασικό στρατηγικό πλεονέκτημα στα χέρια του θεράποντος ιατρού, τα τελευταία χρόνια σημαντική θέση κατέχει και η μελέτη των γενετικών πολυμορφισμών. Όπως προαναφέρθηκε άλλωστε, έχει αναδειχθεί ο σημαντικός τους ρόλος στην περαιτέρω διερεύνηση της παθοβιολογίας της νόσου και τη διαδικασία της λευχαιμογένεσης [38].

Διάφορες ερευνητικές εργασίες έχουν εντοπίσει κληρονομούμενους πολυμορφισμούς στα γονίδια *IKZF1* και *CDKN2A*, μεταξύ άλλων, που σχετίζονται με αυξημένη ευαισθησία ανάπτυξης ΟΛΛ [38]. Πιο συγκεκριμένα, ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός rs4132601 του γονιδίου *IKZF1* έχει αναφερθεί ως παράγοντας αυξημένου κινδύνου εμφάνισης ΟΛΛ σε παιδιά και εφήβους (κυρίως σε Καυκάσιους πληθυσμούς) σε διάφορες μελέτες [63,53-56,66-68]. Στις παραπάνω πολυάριθμες εργασίες έχει διαπιστωθεί συσχέτιση της ύπαρξης του πολυμορφισμού, καθώς και άλλων SNPs του ίδιου γονιδίου, με τον αυξημένο κίνδυνο για ΟΛΛ στην παιδική ηλικία. Οι ομόζυγοι και ετερόζυγοι φορείς του αλληλομόρφου G βρέθηκε ότι υπερεκπροσωπούνται και σχετίζονται με χειρότερα αποτελέσματα, σε σχέση με τους μάρτυρες που έφεραν το γονότυπο TT [56]. Σύμφωνα με τον Paraemmanuil και τους συνεργάτες του, το παραλλαγμένο αλληλόμορφο (G) συσχετίζεται με τη μειωμένη έκφραση του mRNA του *IKZF1*, η οποία με τη σειρά της σχετίζεται με δυσμενή πρόγνωση. Αυτή η παρατήρηση επιβεβαιώνει το μοντέλο κατά το οποίο η ύπαρξη του πολυμορφισμού επηρεάζει τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου, μειώνοντας την αποτελεσματικότητα διαφοροποίησης των Β-κυττάρων σε πρώιμα στάδια [53]. Ωστόσο, μέσα από την παρούσα μελέτη δε βρέθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ασθενών με ΟΛΛ και της ομάδας ελέγχου ούτε σε επίπεδο συχνότητας γονοτύπων, αλλά ούτε και αλληλομόρφων, οπότε φαίνεται να μην ανιχνεύεται κάποια συσχέτιση μεταξύ του συγκεκριμένου πολυμορφισμού και της εμφάνισης της νόσου.

Από την άλλη, τα ευρήματα μιας μελέτης παρέχουν στατιστικά σημαντική ένδειξη συσχέτισης του γονοτύπου GG με τη μικρότερη ηλικία κατά τη διάγνωση της ΟΛΛ στα παιδιά [69]. Εφόσον, λοιπόν, η ηλικία κατά τη διάγνωση συγκαταλέγεται στους προγνωστικούς παράγοντες δυνητικά, και μετά από περαιτέρω μελέτες ώστε να επιβεβαιωθεί αυτή η συσχέτιση, και η ύπαρξη του συγκεκριμένου πολυμορφισμού θα μπορούσε να έχει παρόμοια ισχύ. Ωστόσο, η μελέτη των πολυμορφισμών του *IKZF1* δεν περιορίζονται μόνο στην ΟΛΛ, αλλά και σε διάφορους ιστολογικούς τύπους λεμφώματος. Παραδείγματος χάριν, στο διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β-κύτταρα (diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL) σε μια μελέτη ενηλίκων ενώ δε βρέθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο γονοτύπων μεταξύ ασθενών και ομάδας ελέγχου, μελετήθηκε, όμως, η συμμετοχή του rs4132601 στην έκβαση της νόσου και βρέθηκε ότι οι ασθενείς που φέρουν το γονότυπο TT παρουσιάζουν μικρότερο χρόνο ολικής επιβίωσης (overall survival, OS) συγκριτικά με τους υπόλοιπους, υποδηλώνοντας πως η ύπαρξη του πολυμορφισμού προσδίδει κάποιον προστατευτικό ρόλο σε αυτούς τους ασθενείς [70].

Η διερεύνηση της πιθανής σχέσης του πολυμορφισμού rs4132601 του γονιδίου *IKZF1* έχει μελετηθεί ευρέως και στους ενήλικες, εκτός από τα παιδιά. Βέβαια, τα αποτελέσματα αυτών των ερευνών είναι ακόμα υπό μελέτη, καθώς πολλά από αυτά παρουσιάζονται αντικρουόμενα. Για παράδειγμα, ο Mosaad και οι συνεργάτες του αναφέρουν πως ανιχνεύουν στατιστικά ισχυρή συσχέτιση του πολυμορφισμού και της ΟΛΛ στους ενήλικες ασθενείς της Αιγύπτου, με εκείνους που δεν παρουσιάζουν

ύφεση της νόσου και έχουν μικρότερο OS να φέρουν το γονότυπο GG [54]. Παρόμοιες μελέτες τόσο σε Καυκάσιους, όσο και σε Ισπανόφωνους πληθυσμούς, καθώς και μετα-αναλύσεις έδειξαν τη συσχέτιση του πολυμορφισμού rs4132601 με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΟΛΛ [71,72]. Αντίθετα, άλλες μελέτες αναφέρουν την έλλειψη συσχέτισης στους ενήλικες και σε συγκεκριμένους πληθυσμούς, όπως οι Ασιάτες [72,73]. Πολλές εικασίες διατυπώνονται στην προσπάθεια να ερμηνευθούν αυτά τα αποτελέσματα, με κάποιες από αυτές να περιλαμβάνουν τα διαφορετικά περιβαλλοντικά ερεθίσματα, πιθανές γενετικές διαφορές που συναντώνται στους διαφορετικούς πληθυσμούς ή τον περιορισμένο αριθμό ασθενών σε κάποιες από αυτές τις μελέτες.

Παρόλο που τα περισσότερα δεδομένα στην ΟΛΛ της παιδικής και εφηβικής ηλικίας δείχνουν προς την κατεύθυνση της ύπαρξης συσχέτισης του πολυμορφισμού rs4132601 του γονιδίου *IKZF1* με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου, παρουσιάζονται αρκετές μελέτες οι οποίες υποστηρίζουν το αντίθετο. Σύμφωνα με αυτές, κυρίως στους Ασιατικούς πληθυσμούς, αλλά και σε άτομα Ευρωπαϊκής καταγωγής, δεν ανιχνεύεται η εν λόγω συσχέτιση [72,74-76]. Επομένως, ενώ μεν οι περισσότερες μελέτες συμφωνούν για την ύπαρξη της συσχέτισης, τα δεδομένα είναι ακόμα αμφιλεγόμενα. Σε αυτό το πλαίσιο θα μπορούσε να ενταχθεί και η παρούσα ερευνητική εργασία, στην οποία δεν ανιχνεύθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ασθενών με ΟΛΛ και μαρτύρων σε επίπεδο γονοτύπων και αλληλομόρφων. Βέβαια, μια πιθανή εξήγηση για το παραπάνω θα μπορούσε να είναι ο σχετικά μικρός αριθμός ασθενών (50) που συμμετείχαν στη μελέτη. Σίγουρα απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση της σχέσης των παραπάνω, ώστε να αποσαφηνιστεί ο ρόλος του πολυμορφισμού rs4132601 του γονιδίου *IKZF1* στην Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία παιδιών και εφήβων.

Αντίστοιχα, ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός rs3731217 του γονιδίου *CDKN2A* έχει μελετηθεί για το ρόλο του στην ανάπτυξη κυρίως της ΟΛΛ, αλλά και άλλων ασθενειών σε διάφορους πληθυσμούς. Έρευνες έχουν δείξει τη συσχέτιση του rs3731217 με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΟΛΛ Β- και Τ-σειράς στα παιδιά (κυρίως σε Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς) [53,57,58]. Μάλιστα, η ομάδα του Hungate και των συνεργατών του μελέτησαν και τη λειτουργική βάση της σχέσης του πολυμορφισμού με την BCP-ALL, αναφέροντας πως αυτή η γενετική παραλλαγή σχετίζεται με τη νόσο ρυθμίζοντας το εναλλακτικό μάτισμα του mRNA του *CDKN2A* [77]. Παράλληλα, η έρευνα επεκτείνεται και στην ΟΛΛ των ενηλίκων, χωρίς ωστόσο, τα αντίστοιχα αποτελέσματα με αυτά που παρουσιάστηκαν παραπάνω. Σε Καυκάσιους πληθυσμούς δε βρέθηκε καμία συσχέτιση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού με την εμφάνιση της νόσου [71,73]. Οι συγγραφείς πιθανολογούν ότι αυτό μπορεί αρχικά να οφείλεται στον αριθμό των συμμετεχόντων, ότι τα αποτελέσματα αυτά υπογραμμίζουν τις γενετικές διαφορές που συναντώνται στην ΟΛΛ των ενηλίκων σε σχέση με την ΟΛΛ των παιδιών, αλλά και ότι η επίδραση του πολυμορφισμού στο γενετικό τόπο είναι ασθενέστερη στη νόσο των ενηλίκων από ότι των παιδιών [73].

Επιπλέον, η μελέτη του ρόλου του rs3731217 δεν έχει περιοριστεί μόνο στην ΟΛΛ, αλλά αφορά και διάφορα άλλα νοσήματα. Διάφορες ερευνητικές ομάδες έχουν διαπιστώσει τη συσχέτιση του παραπάνω πολυμορφισμού με τον αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του θυρεοειδούς [79], δευτέρων νεοπλασιών σε ασθενείς με καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων κεφαλής και τραχήλου (Squamous cell carcinoma of the head and neck) [80] και καρκίνου στοματοφάρυγγα εκ πλακωδών κυττάρων

(squamous cell carcinoma of the oropharynx) [81]. Μάλιστα, στην τελευταία περίπτωση επηρεάζεται και η επιβίωση των ασθενών και προτείνεται από τους ερευνητές να λαμβάνονται υπόψιν οι γενετικοί πολυμορφισμοί και συγκεκριμένα ο rs3731217, για τη στρατηγική της θεραπείας, καθώς εμπλέκονται σε κυτταρικές διεργασίες, όπως η απόπτωση, που προκαλούνται μέσω της ακτινο- ή χημειοθεραπείας και των οποίων η ευαισθησία επηρεάζεται από τις παραλλαγές που υπάρχουν στην αλληλουχία των γονιδίων [81].

Ωστόσο, τα δεδομένα για τη σχέση του πολυμορφισμού rs3731217 του γονιδίου *CDKN2A* με την ΟΛΛ παιδιών και εφήβων παρουσιάζονται κι εδώ αντικρουόμενα σε πολλές περιπτώσεις. Σύμφωνα με τις μελέτες αυτές, δεν ανιχνεύεται συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού και της εμφάνισης της νόσου και οι υπό μελέτη πληθυσμοί αφορούν τόσο Καυκάσιους, όσο και πληθυσμούς της Αραβικής Χερσονήσου (Μέση Ανατολή) [56,68,76,77]. Η παρούσα ερευνητική εργασία έρχεται σε συμφωνία με τα παραπάνω δεδομένα, καθώς μέσα από αυτήν δε βρέθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ασθενών με ΟΛΛ και της ομάδας ελέγχου ούτε σε επίπεδο συχνότητας γονοτύπων, αλλά ούτε και αλληλομόρφων, οπότε φαίνεται να μην ανιχνεύεται κάποια συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού rs3731217 και της εμφάνισης της νόσου στα παιδιά και τους εφήβους. Περαιτέρω πειράματα είναι απαραίτητα, ώστε να προκύψουν πιο αξιόπιστα και σαφή συμπεράσματα για το ρόλο του πολυμορφισμού στην ΟΛΛ. Πάντως, μια πιθανή εξήγηση των αποτελεσμάτων της μελέτης αυτής, εκτός του περιορισμένου μεγέθους δειγμάτων, θα μπορούσε να είναι και η γενετική ποικιλομορφία που υπάρχει μεταξύ των πληθυσμών ακόμα και σε ίδιες Ηπείρους, καθώς η γεωγραφική συνεντόπισή τους δε σημαίνει πάντα και την ίδια καταγωγή.

Συμπερασματικά, η παρούσα ερευνητική εργασία ασχολήθηκε με τη μελέτη των συχνοτήτων τόσο σε επίπεδο γονοτύπων, όσο και αλληλομόρφων των πολυμορφισμών rs4132601 του γονιδίου *IKZF1* και rs3731217 του γονιδίου *CDKN2A* σε 50 παιδιά και εφήβους με ΟΛΛ σε σύγκριση με υγιή άτομα στην Ελλάδα και σκοπός της ήταν η διερεύνηση της πιθανής συσχέτισης της εμφάνισης κάποιου γονοτύπου ή αλληλομόρφου με την εκδήλωση της νόσου. Μετά τη στατιστική τους ανάλυση τα αποτελέσματα δεν έδειξαν την ύπαρξη κάποιας τέτοιας συσχέτισης για κανέναν από τους δύο πολυμορφισμούς, ο ρόλος των οποίων στην ΟΛΛ είναι ακόμα υπό διερεύνηση, καθώς τα δεδομένα είναι αντικρουόμενα σε αρκετές περιπτώσεις. Επομένως, θα παρουσίαζε εξαιρετικά μεγάλο ενδιαφέρον η περαιτέρω μελέτη των συγκεκριμένων SNPs, αλλά και γενικότερα διαφόρων άλλων γενετικών πολυμορφισμών, με απώτερο σκοπό την αποσαφήνιση του ρόλου τους στην ανάπτυξη της Οξείας Λεμφοβλαστικής Λευχαιμίας παιδιών και εφήβων.

## **Χρηματοδότηση**

Οι πόροι για την εκπόνηση της παρούσας ερευνητικής εργασίας προέκυψαν από τη χρηματοδότηση που έχει λάβει το ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑ-ΟΓΚΟΛΟΓΙΑ ΠΑΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΕΦΗΒΩΝ».

## **6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**



1. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin* 2021; 71(1):7–33.
2. Steliarova-Foucher E, Colombet M, Ries LAG, Moreno F, Dolya A, Bray F et al. International incidence of childhood cancer, 2001–10: a population-based registry study. *The Lancet Oncology* 2017; 18(6):719–31.
3. Denny C, Sakamoto K. Chapter 4: Biology of Childhood Cancer. In: Pizzo PA, Poplack DG, editors. *Principles and practice of pediatric oncology*. 6th ed. Philadelphia: Principles and practice of pediatric oncology; 2011.
4. Ma X, Liu Y, Liu Y, Alexandrov LB, Edmonson MN, Gawad C et al. Pan-cancer genome and transcriptome analyses of 1,699 paediatric leukaemias and solid tumours. *Nature* 2018; 555(7696):371–6.
5. Gröbner SN, Worst BC, Weischenfeldt J, Buchhalter I, Kleinheinz K, Rudneva VA et al. The landscape of genomic alterations across childhood cancers. *Nature* 2018; 555(7696):321–7.
6. Filbin M, Monje M. Developmental origins and emerging therapeutic opportunities for childhood cancer. *Nat Med* 2019; 25(3):367–76.
7. Scheurer ME, Bondy ML, Gurney JG. Chapter 1: Epidemiology of Childhood Cancer. In: Pizzo PA, Poplack DG, editors. *Principles and practice of pediatric oncology*. 6th ed. Philadelphia: Principles and practice of pediatric oncology; 2011.
8. Plon SE, Malkin D. Chapter 2: Childhood Cancer and Heredity. In: Pizzo PA, Poplack DG, editors. *Principles and practice of pediatric oncology*. 6th ed. Philadelphia: Principles and practice of pediatric oncology; 2011.
9. Aplan PD, Khan J. Chapter 3: Molecular and Genetic Basis of Childhood Cancer. In: Pizzo PA, Poplack DG, editors. *Principles and practice of pediatric oncology*. 6th ed. Philadelphia: Principles and practice of pediatric oncology; 2011.
10. Margolin JF, Rabin KR, Steuber PC. Chapter 19: Acute Lymphoblastic Leukemia. In: Pizzo PA, Poplack DG, editors. *Principles and practice of pediatric oncology*. 6th ed. Philadelphia: Principles and practice of pediatric oncology; 2011.
11. Pui C-H. Chapter 16: Acute lymphoblastic leukemia. In: Pui C-H, editor. *Childhood Leukemias*. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2006.
12. Bhatia S, Robison LL. Chapter 40: Epidemiology of Leukemia in Childhood. In: Nathan DG, Oski FA, Orkin SH, editors. *Nathan and Oski's hematology and oncology of infancy and childhood*. 8th ed. Philadelphia, Pa.: Elsevier Saunders; 2015.
13. Spector LG, Ross JA, Robison LL, Bhatia S. Chapter 3: Epidemiology and etiology. In: Pui C-H, editor. *Childhood Leukemias*. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2006.
14. Pui C-H, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet* 2008; 371(9617):1030–43.
15. Lee P, Bhansali R, Izraeli S, Hijiya N, Crispino JD. The biology, pathogenesis and clinical aspects of acute lymphoblastic leukemia in children with Down syndrome. *Leukemia* 2016; 30(9):1816–23.

16. Gutierrez A, Silverman LB. Chapter 50: Acute Lymphoblastic Leukemia. In: Nathan DG, Oski FA, Orkin SH, editors. Nathan and Oski's hematology and oncology of infancy and childhood. 8th ed. Philadelphia, Pa.: Elsevier Saunders; 2015.
17. Raimondi SC. Chapter 9: Cytogenetics of acute leukemias. In: Pui C-H, editor. Childhood Leukemias. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2006.
18. Greaves M. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2018; 18(8):471–84.
19. Eden T. Aetiology of childhood leukaemia. *Cancer Treat Rev* 2010; 36(4):286–97.
20. Greaves M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(3):193–203.
21. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet* 2013; 381(9881):1943–55.
22. Marshall GM, Carter DR, Cheung BB, Liu T, Mateos MK, Meyerowitz JG et al. The prenatal origins of cancer. *Nat Rev Cancer* 2014; 14(4):277–89.
23. Pui C-H, Relling MV, Downing JR. Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* 2004; 350(15):1535–48.
24. Greaves M. In utero origins of childhood leukaemia. *Early Hum Dev* 2005; 81(1):123–9.
25. Hein D, Borkhardt A, Fischer U. Insights into the prenatal origin of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Metastasis Rev* 2020; 39(1):161–71.
26. Greaves M. Chapter 39: Origins and Evolution of Pediatric Cancers. In: Nathan DG, Oski FA, Orkin SH, editors. Nathan and Oski's hematology and oncology of infancy and childhood. 8th ed. Philadelphia, Pa.: Elsevier Saunders; 2015.
27. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976; 194(4260):23–8.
28. Greaves M. Darwin and evolutionary tales in leukemia. The Ham-Wasserman Lecture. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009:3–12.
29. Merlo LMF, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(12):924–35.
30. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong W-G et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 2003; 425(6960):836–41.
31. Scadden DT. The stem cell niche in health and leukemic disease. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007; 20(1):19–27.
32. Colmone A, Amorim M, Pontier AL, Wang S, Jablonski E, Sipkins DA. Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. *Science* 2008; 322(5909):1861–5.
33. Fleming HE, Janzen V, Lo Celso C, Guo J, Leahy KM, Kronenberg HM et al. Wnt signaling in the niche enforces hematopoietic stem cell quiescence and is necessary to preserve self-renewal in vivo. *Cell Stem Cell* 2008; 2(3):274–83.

34. Warner JK, Wang JCY, Hope KJ, Jin L, Dick JE. Concepts of human leukemic development. *Oncogene* 2004; 23(43):7164–77.
35. Greaves M. Nothing in cancer makes sense except... *BMC Biol* 2018; 16(1):22.
36. Wang JCY, Dick JE. Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends Cell Biol* 2005; 15(9):494–501.
37. Raboso-Gallego J, Casado-García A, Isidro-Hernández M, Vicente-Dueñas C. Epigenetic Priming in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Front Cell Dev Biol* 2019; 7:137.
38. Bhojwani D, Yang JJ, Pui C-H. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin North Am* 2015; 62(1):47–60.
39. Inaba H, Mullighan CG. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2020; 105(11):2524–39.
40. Vrooman LM, Silverman LB. Treatment of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Prognostic Factors and Clinical Advances. *Curr Hematol Malig Rep* 2016; 11(5):385–94.
41. Heikamp EB, Pui C-H. Next-Generation Evaluation and Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Pediatr* 2018; 203:14-24.e2.
42. Panditharatna E, Filbin MG. The growing role of epigenetics in childhood cancers. *Curr Opin Pediatr* 2020; 32(1):67–75.
43. Hartwell LH, Hood L, Goldberg ML, Reynolds AE, Silver LM. Γενετική: Από τα γονίδια στα γονιδιώματα [Κεφάλαιο 11: Ποικιλομορφία Γονιδιωματικής Κλίμακας και Ανάλυση Γνωρισμάτων]. 1η Ελληνική Έκδοση. *Utopia*; 2014.
44. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. *Thompson & Thompson Genetics in Medicine* [Chapter 4: Human Genetic Diversity: Mutation and Polymorphism]. 8th ed. Elsevier; 2016.
45. Russel PJ. *iGenetics: Μια Μεντελική Προσέγγιση* [Κεφάλαιο 17: Εφαρμογές της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA]. 1η Ελληνική Έκδοση. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε.; 2009.
46. Olsson L, Johansson B. Ikaros and leukaemia. *Br J Haematol* 2015; 169(4):479–91.
47. Payne KJ, Dovat S. Ikaros and Tumor Suppression in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Crit Rev Oncog* 2011; 16(1-2):3–12.
48. Stott FJ, Bates S, James MC, McConnell BB, Starborg M, Brookes S et al. The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J* 1998; 17(17):5001–14.
49. Gjerset RA, Bandyopadhyay K. Regulation of p14ARF through subnuclear compartmentalization. *Cell Cycle* 2006; 5(7):686–90.
50. Zhang Y, Sturgis EM, Zafereo ME, Wei Q, Li G. p14ARF genetic polymorphisms and susceptibility to second primary malignancy in patients with index squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 2011; 117(6):1227–35.

51. Weber OH, Samuel T, Rauch P, Funk JO. Human p14ARF-mediated cell cycle arrest strictly depends on intact p53 signaling pathways. *Oncogene* 2002; 21:3207–12.
52. Zhou X, Liao F, Zhang J, Qin Y, Xu H, Ding Z et al. Association of the independent polymorphisms in CDKN2A with susceptibility of acute lymphoblastic leukemia. *Biosci Rep* 2018; 38(3):BSR20180331.
53. Papaemmanuil E, Hosking FJ, Vijayakrishnan J, Price A, Olver B, Sheridan E et al. Loci on 7p12.2, 10q21.2 and 14q11.2 are associated with risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 2009; 41(9):1006–10.
54. Mosaad YM, El-Ziny MA, Darwish A, Al-Harrass M, Abdmabood S, Fawzy IM et al. IKZF1 rs4132601 and rs11978267 Gene Polymorphisms and Acute Lymphoblastic Leukemia: Relation to Disease Susceptibility and Outcome. *J Pediatr Hematol Oncol* 2020; 42(7):420–8.
55. Tayel SI, El-Hefnway SM, Abo El-Fotoh WMM, El-Zayat RS. The Genetic Variants of IKZF1 Gene Linked with the Growing Risk of Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Curr Mol Med* 2019; 19(1):32–9.
56. Gharbi H, Ben Hassine I, Soltani I, Safra I, Ouerhani S, Bel Haj Othmen H et al. Association of genetic variation in IKZF1, ARID5B, CDKN2A, and CEBPE with the risk of acute lymphoblastic leukemia in Tunisian children and their contribution to racial differences in leukemia incidence. *Pediatr Hematol Oncol* 2016; 33(3):157–67.
57. Sherborne AL, Hosking FJ, Prasad RB, Kumar R, Koehler R, Vijayakrishnan J et al. Variation in CDKN2A at 9p21.3 influences childhood acute lymphoblastic leukemia risk. *Nat Genet* 2010; 42(6):492–4.
58. Xu H, Zhang H, Yang W, Yadav R, Morrison AC, Qian M et al. Inherited coding variants at the CDKN2A locus influence susceptibility to acute lymphoblastic leukaemia in children. *Nat Commun* 2015; 6:7553.
59. Marke R, van Leeuwen FN, Scheijen B. The many faces of IKZF1 in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2018; 103(4):565–74.
60. Vairy S, Tran TH. IKZF1 alterations in acute lymphoblastic leukemia: The good, the bad and the ugly. *Blood Rev* 2020; 44:100677.
61. González-Gil C, Ribera J, Ribera JM, Genescà E. The Yin and Yang-Like Clinical Implications of the CDKN2A/ARF/CDKN2B Gene Cluster in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Genes (Basel)* 2021; 12(1):79.
62. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Βιοχημεία [Κεφάλαιο 5: Εξερευνώντας τα γονίδια και τα γονιδιώματα]. 2η αναθεωρημένη έκδοση. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης; 2015
63. Tayel SI, El-Hefnway SM, Abo El-Fotoh WMM, El-Zayat RS. The Genetic Variants of IKZF1 Gene Linked with the Growing Risk of Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Curr Mol Med* 2019; 19(1):32–9.
64. Wujcicka W, Zajac A, Szylo K, Smolarz B, Romanowicz H, Stachowiak G. Association of SNPs in CDKN2A (P14ARF) Tumour Suppressor Gene With Endometrial Cancer in Postmenopausal Women. *In Vivo* 2020; 34(2):943–51.
65. Di Felice F, Micheli G, Camilloni G. Restriction enzymes and their use in molecular biology: An overview. *J Biosci* 2019; 44(2):38.

66. Prasad RB, Hosking FJ, Vijayakrishnan J, Papaemmanuil E, Koehler R, Greaves M et al. Verification of the susceptibility loci on 7p12.2, 10q21.2, and 14q11.2 in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia of childhood. *Blood* 2010; 115(9):1765–7.
67. Mahjoub S, Chayeb V, Zitouni H, Ghali RM, Regaieg H, Almawi WY et al. IKZF1 genetic variants rs4132601 and rs11978267 and acute lymphoblastic leukemia risk in Tunisian children: a case-control study. *BMC Med Genet* 2019; 20(1):159.
68. Pastorczak A, Górnica P, Sherborne A, Hosking F, Trelínska J, Lejman M et al. Role of 657del5 NBN mutation and 7p12.2 (IKZF1), 9p21 (CDKN2A), 10q21.2 (ARID5B) and 14q11.2 (CEBPE) variation and risk of childhood ALL in the Polish population. *Leuk Res* 2011; 35(11):1534–6.
69. Górnica P, Pastorczak A, Zalewska-Szewczyk B, Lejman M, Trelínska J, Chmielewska M et al. Polymorphism in IKZF1 gene affects age at onset of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2014; 55(9):2174–8.
70. Bielska M, Borowiec M, Jesionek-Kupnicka D, Braun M, Bojo M, Pastorczak A et al. Polymorphism in IKZF1 gene affects clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Int J Hematol* 2017; 106(6):794–800.
71. Burmeister T, Bartels G, Gröger D, Trautmann H, Schwartz S, Lenz K et al. Germline variants in IKZF1, ARID5B, and CEBPE as risk factors for adult-onset acute lymphoblastic leukemia: an analysis from the GMALL study group. *Haematologica* 2014; 99(2):e23-5.
72. Li S, Ren L, Fan L, Wang G. IKZF1 rs4132601 polymorphism and acute lymphoblastic leukemia susceptibility: a meta-analysis. *Leuk Lymphoma* 2015; 56(4):978–82.
73. Peyrouze P, Guihard S, Gardel N, Berthon C, Pottier N, Pigneux A et al. Genetic polymorphisms in ARID5B, CEBPE, IKZF1 and CDKN2A in relation with risk of acute lymphoblastic leukaemia in adults: a Group for Research on Adult Acute Lymphoblastic Leukaemia (GRAALL) study. *Br J Haematol* 2012; 159(5):599–602.
74. Lin C-Y, Li M-J, Chang J-G, Liu S-C, Weng T, Wu K-H et al. High-resolution melting analyses for genetic variants in ARID5B and IKZF1 with childhood acute lymphoblastic leukemia susceptibility loci in Taiwan. *Blood Cells Mol Dis* 2014; 52(2-3):140–5.
75. Wang Y, Chen J, Li J, Deng J, Rui Y, Lu Q et al. Association of three polymorphisms in ARID5B, IKZF1 and CEBPE with the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia in a Chinese population. *Gene* 2013; 524(2):203–7.
76. Kreile M, Piekuse L, Rots D, Dobeles Z, Kovalova Z, Lace B. Analysis of possible genetic risk factors contributing to development of childhood acute lymphoblastic leukaemia in the Latvian population. *Arch Med Sci* 2016; 12(3):479–85.
77. Hungate EA, Vora SR, Gamazon ER, Moriyama T, Best T, Hultén I et al. A variant at 9p21.3 functionally implicates CDKN2B in paediatric B-cell

- precursor acute lymphoblastic leukaemia aetiology. *Nat Commun* 2016; 7:10635.
78. Al-Absi B, Razif MFM, Noor SM, Saif-Ali R, Aqlan M, Salem SD et al. Contributions of IKZF1, DDC, CDKN2A, CEBPE, and LMO1 Gene Polymorphisms to Acute Lymphoblastic Leukemia in a Yemeni Population. *Genet Test Mol Biomarkers* 2017; 21(10):592–9.
79. Zhang F, Xu L, Wei Q, Song X, Sturgis EM, Li G. Significance of MDM2 and P14 ARF polymorphisms in susceptibility to differentiated thyroid carcinoma. *Surgery* 2013; 153(5):711–7.
80. Zhang Y, Sturgis EM, Zafereo ME, Wei Q, Li G. p14ARF genetic polymorphisms and susceptibility to second primary malignancy in patients with index squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 2011; 117(6):1227–35.
81. Song X, Sturgis EM, Huang Z, Li X, Li C, Wei Q et al. Potentially functional variants of p14ARF are associated with HPV-positive oropharyngeal cancer patients and survival after definitive chemoradiotherapy. *Carcinogenesis* 2014; 35(1):62–8.