



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΚΡΗΤΗΣ
UNIVERSITY
OF CRETE



Πανεπιστήμιο Κρήτης
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
Αιματολογίας – Ογκολογίας Παιδιών και Εφήβων
Ακαδημαϊκό Έτος 2020 - 2021**

Διπλωματική Εργασία

**Μελέτη των πολυμορφισμών της κασπάσης 8
(CASP8) και 10 (CASP10) στην Οξεία
Λεμφοβλαστική Λευχαιμία παιδιών και εφήβων**

Λούρου Μαριλένα – Βιολόγος

Ηράκλειο, Φεβρουάριος 2021

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ – ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΑΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΕΦΗΒΩΝ

ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΟ ΕΤΟΣ 2020 – 2021

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη των γενετικών πολυμορφισμών της κασπάσης-8
(*CASP8*) και -10
(*CASP10*) στην Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία παιδιών και
εφήβων**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

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

© 2021

Λούρου Μαριλένα – Βιολόγος (Α.Μ. 1150011)

ALL RIGHTS RESERVED

Ευχαριστίες

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

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους συνεργάτες μου της Κλινικής Αιματολογίας – Ογκολογίας Παίδων του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου και των εργαστηρίων για την συμβολή τους στην εκπόνηση της πτυχιακής μου εργασίας. Ιδιαίτερα ευχαριστώ την Καθηγήτρια κ. Στειακάκη Ευτυχία για την επιμέλεια του θέματος, την συνολική καθοδήγηση και την συγγραφή της εργασίας. Θέλω να ευχαριστήσω τον κ. Γουλιέλμο Γεώργιο, Καθηγητή (Γενετικής - Μοριακής Γενετικής του Ανθρώπου με έμφαση στην Παθολογία) και τον κ. Ποντίκογλου Χαράλαμπο (Αναπληρωτή Καθηγητής Αιματολογίας) για την καθοδήγηση κατά την εκπόνηση της εργασίας. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Ζερβού Μαρία (Βιολόγο M.Sc-Ph.D, μέλος ΕΔΙΠ) για την πολύτιμη βοήθειά της. Και μεγάλη ευγνωμοσύνη οφείλω στην Αμπαζόγλου Ευαγγελία - Δήμητρα για τη συνεργασία τόσο στο πειραματικό μέρος, όσο και στο θεωρητικό μέρος της διπλωματικής εργασίας. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την οικογένεια μου και τους φίλους μου για την συμπαράστασή τους στις δύσκολες στιγμές κατά τη διάρκεια αυτής της διπλωματικής εργασίας.

Περιεχόμενα

Περίληψη

Abstract

Συντομογραφίες

Εισαγωγή

1. Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία
2. Απόπτωση
3. Κασπάσες
4. Γενετικοί πολυμορφισμοί
5. Πολυμορφισμοί στην Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία
6. Πολυμορφισμοί στις κασπάσες 8 και 10
7. α) Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης
β) Ένζυμα Ένζυμα περιορισμού
γ) Πήκτωμα αγαρόζης

Σκοπός

Ασθενείς και μέθοδοι

1. Απομόνωση γενωμικού DNA από περιφερικό αίμα (I)
2. Απομόνωση γενωμικού DNA από περιφερικό αίμα (II)
3. Ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος γενωμικού DNA
4. Κασπάση 8 rs1045485
5. Κασπάση 10 rs13006529
6. Στατιστική ανάλυση

Αποτελέσματα

1. Ο ρόλος του πολυμορφισμού rs1045485 του γονιδίου *Caspase 8* στην ΟΛΛ
2. Ο ρόλος του πολυμορφισμού rs13006529 του γονιδίου *Caspase 10* στην ΟΛΛ

Συζήτηση

Συμπεράσματα

Χρηματοδότηση

Βιβλιογραφία

Περίληψη

Τίτλος εργασίας: Μελέτη των πολυμορφισμών της κασπάσης 8 (CASP8) και 10 (CASP10) στην Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία παιδιών και εφήβων

Λούρου Μαριλένα

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

1. Στειακάκη Ευτυχία (Επιβλέπων)

2. Γουλιέλμος Γεώργιος

3. Ποντίκογλου Χαράλαμπος

Ημερομηνία: Φεβρουάριος 2021

Η Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία είναι η πιο συχνή νεοπλασματική νόσος στα παιδιά και χαρακτηρίζεται από τον πολλαπλασιασμό ανώριμων λεμφικών κυττάρων (λεμφοβλαστών), τα οποία αντικαθιστούν τα φυσιολογικά στοιχεία του μυελού των οστών. Έχουν γίνει πολύ μεγάλα άλματα στην αντιμετώπιση και στην πρόγνωση της ΟΛΛ στα παιδιά τα τελευταία 50 χρόνια, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα τη βελτίωση των ποσοστών επιτυχούς θεραπείας από 10% στο 90%. Παραμένει όμως σημαντική αιτία νοσηρότητας και θνητότητας, λόγω ανθεκτικής νόσου ή υποτροπής. Την τελευταία δεκαετία έχει σημειωθεί μεγάλη πρόοδος στην κατανόηση της βιολογίας της ΟΛΛ και της γενετικής βάσης της λευχαιμογένεσης και ανταπόκρισης στη θεραπεία. Η νόσος χαρακτηρίζεται από κλινική και βιολογική ετερογένεια, η οποία οφείλεται στις ποικίλες γενετικές αλλαγές.

Η απόπτωση ορίζεται ως ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος χωρίς φλεγμονώδη αντίδραση. Υπάρχουν δύο οδοί απόπτωσης, η ενδογενής (μιτοχονδριακή) και η εξωγενής (κυτταροπλασματική), οι οποίες δρουν συνεργικά ώστε τα μη αποτελεσματικά κύτταρα να απομακρύνονται από τον οργανισμό. Στο λέμφωμα, στη λευχαιμία και σε συμπαγείς όγκους μπορεί να εμπλέκεται είτε το ενδογενές είτε το εξωγενές μονοπάτι της απόπτωσης, αλλά και η απορρύθμιση της έκφρασης ή λειτουργίας μονοπατιών ανταγωνιστών ενεργοποίησης των κασπασών. Διαταραχές στους μηχανισμούς του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου παίζουν σημαντικό ρόλο στη παθογένεια και εξέλιξη των αιματολογικών νεοπλασιών. Οι κασπάσες είναι μία οικογένεια πρωτεασών κυστεΐνης, οι λειτουργίες των οποίων είναι έντονα συνδεδεμένες με τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Πολυμορφισμοί στα γονίδια της απόπτωσης μπορεί να συμβάλουν στον κίνδυνο για νόσο και πιο συγκεκριμένα, έχει ταυτοποιηθεί η ισχυρή σύνδεση μεταξύ γενετικής ποικιλομορφίας και ευαισθησίας για εμφάνιση ΟΛΛ. Οι πολυμορφισμοί των γονιδίων των κασπασών μπορεί να εμπλέκονται σε διάφορους τύπους καρκίνου

και ενώ κάποιες μεταλλαγές σε κασπάσες που μειώνουν της αποπτωτική ιδιότητα μπορεί να παίζουν προστατευτικό ρόλο στον όγκο, ίσως να έχουν πιο ισχυρή αντικαρκινική δράση μέσω μείωσης της απόπτωσης στα διηθημένα λεμφοκύτταρα του όγκου. Η κασπάση 8 παίζει σημαντικό ρόλο στην απόπτωση και αρκετές μελέτες έχουν γίνει για να προσδιορίσουν τη σχέση μεταξύ των πολυμορφισμών στο γονίδιο της κασπάσης 8 (CASP8) και διαφόρων τύπων καρκίνου. Η κασπάση 10 είναι η μοναδική κασπάση που μοιράζεται ομόλογες αλληλουχίες ενισχυτή θανάτου με την κασπάση 8 και σωματικές μεταλλαγές στην κασπάση 10 έχουν παρατηρηθεί σε πολλούς τύπους καρκίνου.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η συχνότητα εμφάνισης του πολυμορφισμού rs1045485 στο εξώνιο 10 του γονιδίου της κασπάσης 8 και rs13006529 στο εξώνιο 10 του γονιδίου της κασπάσης 10 σε παιδιά και εφήβους με Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία σε σύγκριση με υγιή άτομα.

Την ομάδα των ασθενών αποτέλεσαν 50 παιδιά και έφηβοι με ΟΛΛ και τα υπόλοιπα 100 άτομα αφορούν την ομάδα ελέγχου. Απομονώθηκε γενωμικό DNA από τα δείγματα των δύο ομάδων και οι υπό μελέτη γενετικοί τόποι πολλαπλασιάστηκαν με τη μέθοδο της Αλυσιδωτής αντίδρασης της Πολυμεράσης (PCR). Στη συνέχεια, το προϊόν της PCR επώαστηκε με την κατάλληλη για τον κάθε γενετικό τόπο περιοριστική ενδονουκλεάση.

Μετά από στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψε συσχέτιση του αλληλομόρφου G του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού (SNP) rs1045485 της κασπάσης 8 με την ΟΛΛ ($p = 0.0002$). Για τον πολυμορφισμό rs13006529 της κασπάσης 10 βρέθηκε επίσης συσχέτιση με τη νόσο τόσο σε επίπεδο γονοτύπων, και συγκεκριμένα του γονοτύπου AT ($p = 0.011$) και του γονοτύπου TT ($p = 0.048$), όσο και σε επίπεδο του αλληλομόρφου T ($p < 0.0001$). Επομένως, η παρούσα μελέτη έδειξε ότι τόσο ο πολυμορφισμός rs1045485 της κασπάσης 8 όσο και ο πολυμορφισμός rs13006529 της κασπάσης 10 συσχετίζονται με τη νόσο σε επίπεδο γονοτύπων ή αλληλομόρφων. Η περαιτέρω μελέτη αυτών των πολυμορφισμών στην ΟΛΛ παιδιών και εφήβων θα είχε μεγάλο ενδιαφέρον, ώστε να φανεί αν αυτοί συσχετίζονται με την ανάπτυξη της νόσου στον ελληνικό πληθυσμό.

Λέξεις κλειδιά: Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία, πολυμορφισμοί, κασπάση 8, κασπάση 10

Abstract

Title: Caspase 8 (CASP8) and 10 (CASP10) polymorphisms in children and adolescents with Acute Lymphoblastic Leukemia

By: Lourou Marilena

Three Member Evaluating Committee

1. (Supervisor) Stiakaki Eftichia

2. Goulielmos George

3. Pontikoglou Charalampos

Date: February 2021

Acute Lymphoblastic Leukemia is the most common pediatric malignancy and is characterized by the proliferation of immature lymphocytes (lymphoblasts), which replace the normal elements of the bone marrow. There have been great leaps in the management and prognosis of childhood ALL over the last 50 years, which has resulted in improved treatment rates from 10% to 90%, but still remains a major cause of morbidity and mortality, because of disease relapse. Much progress has been made the last decade in understanding the biology of ALL and the genetic basis of leukemogenesis and response to treatment. The disease is characterized by clinical and biological heterogeneity, which is due to various genetic changes.

Apoptosis is defined as programmed cell death without inflammatory response. There are two pathways of apoptosis, internal (mitochondrial) and external (cytoplasmic), which act collaboratively to remove ineffective cells from the organism. In lymphoma, leukemia and solid tumors, either the internal or external pathway of apoptosis may be involved, as well as the deregulation of expression or function of caspase antagonist's pathways. Alterations in the mechanisms of programmed cell death play an important role in pathogenesis and progression of hematological neoplasms. Caspases are a family of cysteine proteases whose functions are strongly associated with programmed cell death. Polymorphisms in apoptosis genes may contribute to the risk of disease and, more specifically, the strong link between genetic diversity and susceptibility to ALL has been identified. Polymorphisms in caspase genes may be involved in various types of cancer, and while some caspase mutations that reduce apoptotic activity may play a protective role in the tumor, they may have a stronger anticancer response by reducing apoptosis of tumor lymphocytes. Caspase 8 plays an important role in apoptosis and several studies have been performed to identify the relationship between polymorphisms in the

caspase 8 gene (*CASP8*) and different types of cancer. Caspase 10 is the only caspase that shares homologous death – effector domains with caspase 8 and somatic mutations in caspase 10 have been observed in many cancers.

The purpose of the present research was to investigate the incidence of rs1045485 polymorphism in exon 10 of the caspase 8 gene and rs13006529 in exon 10 of the caspase 10 gene in children and adolescents with Acute Lymphoblastic Leukemia compared with healthy individuals.

The patient group consisted of 50 children and adolescents with ALL and 100 individuals composed the control group. Genomic DNA was isolated from the samples of both groups and both genetic loci were amplified by the Polymerase Chain Reaction method. The PCR products were then incubated with the appropriate restriction enzyme.

Statistical analysis showed a correlation between G allele of caspase 8 rs1045485 SNP and ALL ($p = 0.0002$). Caspase 10 rs13006529 polymorphism was also found to be associated with the disease, more specifically the AT genotype ($p = 0.011$) and the TT genotype ($p=0.048$), but also with allele T ($p < 0.0001$). Therefore, the present study showed that caspase 8 rs1045485 polymorphism and caspase 10 rs13006529 polymorphism are related to the disease at the level of genotypes or alleles. Further study of these polymorphisms in children and adolescents with ALL would be of great interest, in order to see if their existence is related to the development of the disease in Greek population.

Key words: Acute Lymphoblastic Leukemia, polymorphisms, caspase 8, caspase 10

Συντομογραφίες

ΟΛΛ: Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία

B – ΟΛΛ: Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία Β κυτταρικής σειράς

T – ΟΛΛ: Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία T κυτταρικής σειράς

ΚΝΣ: κεντρικό νευρικό σύστημα

MRD: minimal residual disease (ελάχιστη υπολειπόμενη νόσος)

TNF: tumor necrosis factor (παράγοντες νέκρωσης όγκου)

SCF: stem cell factor (παράγοντας βλαστοκυττάρων)

SNP: single nucleotide polymorphism (πολυμορφισμός μονού νουκλεοτιδίου)

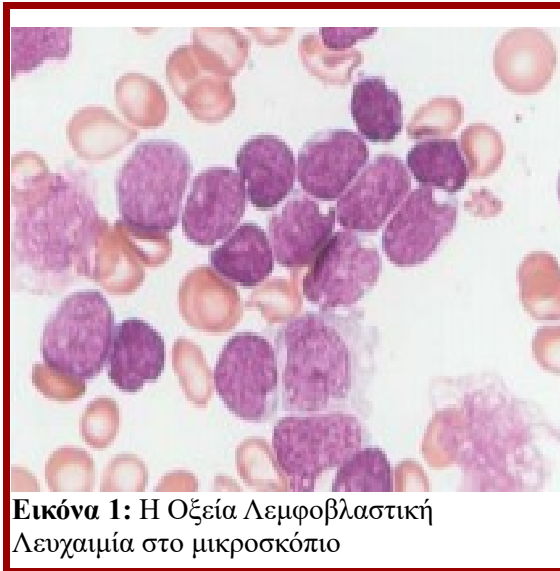
RFLP: restriction fragment length polymorphism (πολυμορφισμός μήκους τμημάτων περιορισμού)

PCR: polymerase chain reaction (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης)

Εισαγωγή

1. Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία

Η Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία είναι ένα επιθετικό είδος νεοπλασίας και ο πιο κοινός τύπος καρκίνου (νεοπλασίας/κακοήθων νοσημάτων) στα παιδιά (32% ομοίως στα παιδιά κάτω των 15 ετών ⁽¹⁾ και 27% κάτω των 20 ετών) Η πενταετής επιβίωση ελεύθερης νόσου ξεπερνάει το 80%, ενώ η συνολική επιβίωση είναι άνω του 90%, όμως κάποια από τα παιδιά αυτά θα υποτροπιάσουν. ^(2, 4) Είναι μία κλωνική νόσος που χαρακτηρίζεται από τον πολλαπλασιασμό ανώριμων λεμφικών κυττάρων (λεμφοβλαστών), τα οποία αντικαθιστούν τα φυσιολογικά στοιχεία του μυελού των οστών (Εικόνα 1). ^(3, 5, 6, 7, 8, 9) Η ΟΛΛ διακρίνεται σε Β κυτταρικής σειράς (85%) και Τ κυτταρικής σειράς (15%), η οποία είναι πιο σπάνια, αλλά και στις δύο περιπτώσεις υπάρχουν πολλοί υπότυποι που καθορίζονται από



Εικόνα 1: Η Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία στο μικροσκόπιο

δομικές ή αριθμητικές χρωμοσωμικές αλλαγές (ανευλοειδία, χρωμοσωμικές αναδιατάξεις), μεταλλαγές στην αλληλουχία του DNA και αλλαγές στον αριθμό αντιγράφων DNA. Η ταυτοποίηση του υπότυπου είναι σημαντική για τη διάγνωση, ταξινόμηση σε ομάδα κινδύνου και κάποιες φορές για τη στοχευμένη θεραπεία. Η Β-ΟΛΛ χωρίζεται σε πρόιμη προ-Β ΟΛΛ (ο πιο συχνός τύπος, 57–65%), προ-Β-ΟΛΛ (πιο συχνή στα βρέφη), μεταβατική προ-Β-ΟΛΛ (2-3% των παιδιών με ΟΛΛ) και Β-ΟΛΛ των ώριμων κυττάρων (1-2% των παιδιών με ΟΛΛ). Η Τ-ΟΛΛ είναι πιο συχνή σε μεγαλύτερες ηλικίες,

έχει υψηλότερα λευκά στη διάγνωση και εξωμυελική νόσο (λεμφαδενοπάθεια, ηπατοσπληνομεγαλία, νόσο στο ΚΝΣ και πρόσθια μαζα του μεσοθωρακίου στο θύμο).^(7, 10, 11, 12)

Η μέγιστη επίπτωση είναι στην ηλικία των 2 έως 5 ετών. Η πιθανότητα για λευχαιμία είναι μεγαλύτερη από το αναμενόμενο σε οικογένειες με άτομα που έχουν νοσήσει από την ασθένεια και αδέρφια παιδιών με λευχαιμία (συμπεριλαμβανομένου της ΟΛΛ) έχουν περίπου 2 με 4 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να εξελίξουν τη νόσο.⁽¹³⁾ Συνήθη συμπτώματα της νόσου είναι ο πυρετός, η αιμορραγία, η ωχρότητα, οι εκχυμώσεις, οι πετέχειες, , οστικά άλγοι, η κόπωση, η ηπατοσπληνομεγαλία, η αναιμία/θρομβοπενία/ουδετεροπενία (αποτυχία φυσιολογικής αιμοποίησης), η λεμδαδενοπάθεια και η ανορεξία.^(5, 7, 13, 14) Προγνωστικούς παράγοντες αποτελούν η ηλικία (όσο μεγαλύτερη ηλικία και βρέφη: κακή πρόγνωση), το φύλο, η φυλή, ο αριθμός λευκών στη διάγνωση (μεγαλύτερες τιμές οδηγούν σε

κακή πρόγνωση), τα επίπεδα ανοσοσφαιρίνης, ο αριθμός αιμοπεταλίων, ο ανοσοφαινότυπος, οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες, τα κυτταρογενετικά χαρακτηριστικά, ο βαθμός οργανομεγαλίας και λεμφαδενοπάθειας, η παρουσία μάζας μεσοθωρακίου, η συμμετοχή του ΚΝΣ, η ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία, και η κυτταρική σειρά.^(7, 11, 13, 14, 15) Η θεραπεία του ασθενούς θα καθοριστεί από την ηλικία, τον αριθμό των λευκών στη διάγνωση και τον ανοσοφαινότυπο, τα οποία ταξινομούν τον ασθενή σε Τ-ΟΛΛ, βρεφική, Β-ΟΛΛ πολύ υψηλού κινδύνου, Β-ΟΛΛ υψηλού κινδύνου, Β-ΟΛΛ ενδιάμεσου κινδύνου και Β-ΟΛΛ χαμηλού κινδύνου.⁽¹⁵⁾ Έχουν γίνει πολύ μεγάλα άλματα στην αντιμετώπιση και στην πρόγνωση της ΟΛΛ στα παιδιά τα τελευταία 50 χρόνια, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα τη βελτίωση των ποσοστών επιτυχούς θεραπείας από 10% στο 90%, αλλά παραμένει σημαντική αιτία νοσηρότητας και θνητότητας και μέρος των ασθενών θα υποτροπιάσει.^(10, 12, 14, 15, 16) Η επιβίωση μειώνεται όσο αυξάνεται η ηλικία.^(3, 9)

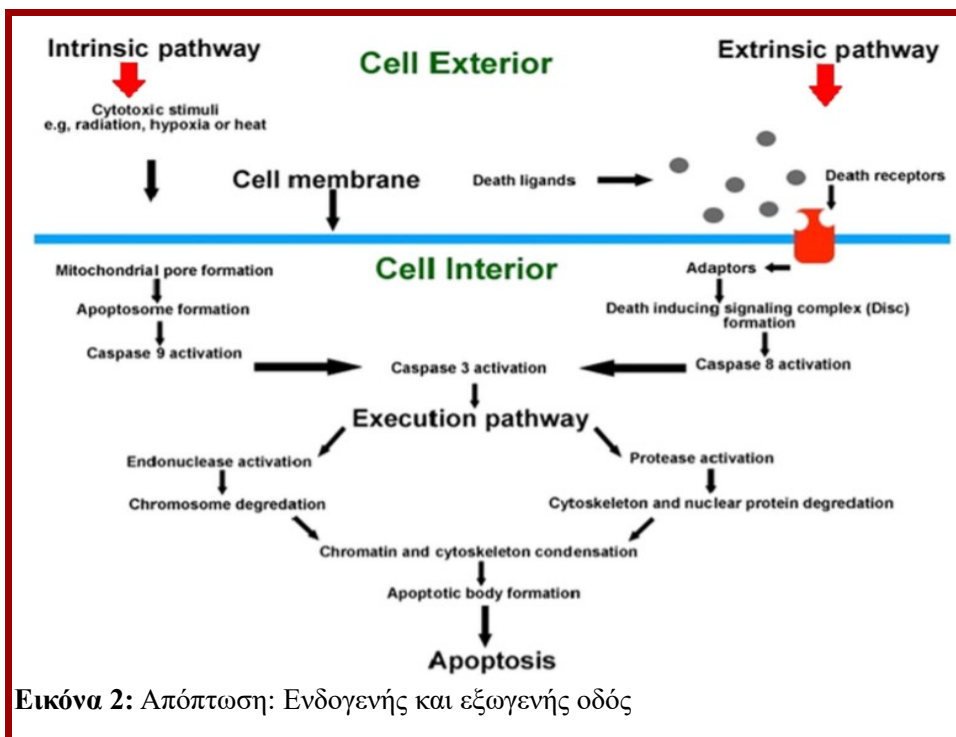
Την τελευταία δεκαετία έχει σημειωθεί μεγάλη πρόοδος στην κατανόηση της βιολογίας της ΟΛΛ και στη γενετική βάση της λευχαιμογένεσης και ανταπόκρισης στη θεραπεία.⁽¹⁴⁾ Η νόσος χαρακτηρίζεται από κλινική και βιολογική ετερογένεια, η οποία οφείλεται στις ποικίλες γενετικές αλλαγές.⁽¹⁶⁾ Παρακολουθώντας την ετερογένεια της βιολογίας της νόσου και την ελάχιστη υπολειπόμενη νόσο (MRD) η θεραπεία άρχισε να καθορίζεται από τον κίνδυνο για υποτροπή, ώστε να αυξηθεί η θεραπεία και να μειωθεί η τοξικότητα.⁽¹²⁾ Η MRD (παρουσία νόσου σε ασθενή που βρίσκεται σε πλήρη ύφεση) έχει γίνει το πρότυπο μέτρο αξιολόγησης για τη πρόγνωση όσον αφορά την ανταπόκριση στη θεραπεία.⁽¹¹⁾ Η Β και η Τ ΟΛΛ περιλαμβάνουν πολλούς υποτύπους με ανακατανομές στο DNA και μεταλλαγές στην αλληλουχία του DNA που διαταράσσουν τη λεμφική εξέλιξη, τους υποδοχείς κυτοκινών, τη σηματοδοτική οδό κινασών και Ras, την ογκοκατασταλτική δυνατότητα και τη τροποποίηση χρωματίνης.⁽¹⁰⁾ Συγκεκριμένα γενετικά σύνδρομα συνδέονται με αυξημένη ευαισθησία για λευχαιμία (σύνδρομο Down, νευροϊνωμάτωση τύπου I, αταξία, σύνδρομο Bloom, σύνδρομο Shwachman, αναιμία Fanconi, ιστιοκύττωση Langerhans).⁽⁸⁾ Οι βλάστες συνήθως έχουν γενετικές ανωμαλίες που παρέχουν πληροφορίες για την παθογένεια και επηρεάζουν τη πρόγνωση. Το 1/3 των ασθενών με ΟΛΛ έχουν αυξημένο αριθμό χρωμοσωμάτων (υπερδιπλοειδία), ο οποίος σχετίζεται με αυξημένη απόπτωση και ευαισθησία σε ποικίλους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. Ευνοϊκή πρόγνωση έχουν ασθενείς με τρισωμία 4, 10 και 17 ή γενετικές τροποποιήσεις στο ETV6-RUNX1.^(14, 15) Αρκετοί γενετικοί παράγοντες και πολυμορφικές παραλλαγές σε διάφορα γονίδια (ARID5B, CEBPE, GATA3, IKZF1) συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΟΛΛ. Επίσης κακή πρόγνωση έχουν ασθενείς με υποδιπλοειδία (λιγότερα από 44 χρωμοσώματα), αναδιατάξεις MLL και CRLF2, BCR-ABL και Ph-like ΟΛΛ.⁽¹⁴⁾ Άλλες γενετικές τροποποιήσεις που συνδέονται με την ΟΛΛ είναι μετατοπίσεις στο MYC και αλλαγές στο σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K-AKT-PTEN.⁽⁷⁾ Σπάνιες

μεταλλάξεις στα PAX5 και ETV6 και κάποιοι περιβαλλοντικοί παράγοντες (ακτινοβολία, συγκεκριμένα χημικά) σχετίζονται με την ΟΛΛ.⁽¹⁴⁾ Η Τ-ΟΛΛ γενετικά έχει μεγάλη ετερογένεια, με χρωμοσωμικές ανωμαλίες να υπάρχουν σχεδόν σε όλους τους ασθενείς. Πολύ συχνά εντοπίζονται μεταλλάξεις ενεργοποίησης στο NOTCH1 ή απώλειας λειτουργίας στο FBXW7.⁽¹¹⁾

Πλέον η διαχείριση της ΟΛΛ στα παιδιά αποτελεί παράδειγμα της επιτυχούς ενσωμάτωσης της βιολογίας στη λήψη θεραπευτικών αποφάσεων, καθώς και στην κατανόηση της παθογένειας της νόσου.⁽¹²⁾ Ο ακριβής και ολοκληρωμένος προσδιορισμός των γενετικών διαταραχών στην ΟΛΛ είναι σημαντικός για τη διάγνωση, την ταξινόμηση σε ομάδες κινδύνου, την εφαρμογή στοχευμένης θεραπείας και την παρακολούθηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία.⁽¹⁰⁾

2. Απόπτωση

Η απόπτωση ορίστηκε το 1972 από τους Kerr, Wyllie και Currie ως ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος χωρίς φλεγμονώδη αντίδραση. Χαρακτηρίζεται από μορφολογικές αλλαγές στη δομή των κυττάρων και από ενζυμοεξαρτώμενες βιοχημικές διεργασίες. Στον κυτταρικό κύκλο η απόπτωση δρα ως μέτρο ασφαλείας που διασφαλίζει την πιστότητα και ποιότητα του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Είναι μία διαδικασία που εκτελείται με λογική και με σκοπό να θυσιαστούν κάποια κύτταρα (με εκτεταμένα γενετικά λάθη ή με κυτταρικές ζημιές) ώστε να επωφεληθεί ο οργανισμός. Επίσης, είναι πολύ σημαντική για το ανοσοποιητικό σύστημα καθώς συντηρεί την ομοιόστασή του. Η κατανόηση της περιπλοκότητας της απόπτωσης είναι σημαντική και όσον αφορά την ίδια τη διαδικασία, αλλά και



Εικόνα 2: Απόπτωση: Ενδογενής και εξωγενής οδός

για πιθανές θεραπείες ασθενειών, καθώς αποτυχία στη ρύθμιση της μπορεί να οδηγήσει σε πολλές ασθένειες.^(17, 18) Η απόπτωση αποτελείται από 3 διακριτές φάσεις, την έναρξη, τη δέσμευση και την εκτέλεση.⁽¹⁹⁾ Υπάρχουν δύο οδοί απόπτωσης, η ενδογενής (μιτοχονδριακή) και η εξωγενής (κυτταροπλασματική), οι

οποίες δρουν συνεργικά ώστε τα μη αποτελεσματικά κύτταρα να απομακρύνονται από τον οργανισμό (Εικόνα 2). Τα σήματα θανάτου μεταδίδονται μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών που οδηγούν στην ενεργοποίηση των κασπασών (Cysteine Aspartyl – specific Proteases: Caspases), οι οποίες είναι ενδοκυτταρικές πρωτεάσες κυστεΐνης που ενεργοποιούν τον εαυτό τους και η μία την άλλη και είναι υπεύθυνες για την εκτέλεση των εντολών και την καταστροφή των κυττάρων. Η ενδογενής οδός ενεργοποιείται από το κύτταρο, και πιο συγκεκριμένα από τα μιτοχόνδρια με απελευθέρωση κυτοχρώματος-c που προκαλεί ενεργοποίηση του αποπτοσώματος, όταν εντοπίσει πρόβλημα μέσω ενδοκυτταρικών αισθητήρων. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 είναι κεντρικοί ρυθμιστές της ενδογενούς οδού, καθώς αποτρέπουν ή προκαλούν αλλαγές στη διαπερατότητα της μεμβράνης του μιτοχονδρίου ώστε να απελευθερωθεί το κυτόχρωμα-c και άλλες αποπτωτικές πρωτεΐνες. Η εξωγενής οδός αναφέρεται σε ενεργοποίηση της απόπτωσης μετά από αλληλεπίδραση μεταξύ ενός κυττάρου του ανοσοποιητικού συστήματος και ενός προβληματικού κυττάρου, με μεσολάβηση υποδοχέων θανάτου που μεταφέρουν τα σήματα θανάτου από το εξωτερικό του κυττάρου στο εσωτερικό. Τέτοιοι υποδοχείς είναι οι υποδοχείς παραγόντων νέκρωσης όγκου (TNFR-1, TNFR-2) που ενεργοποιούνται από την πρόσδεση του TNF και του Fas. Στο τέλος η ενεργή κασπάση 8, και κάποιες φορές και η κασπάση 10, προκαλεί την εκτέλεση της φάσης του κυτταρικού θανάτου παράγοντας την ενεργή κασπάση 3, η οποία είναι υπεύθυνη για την τελική εκτέλεση της αποδόμησης ποικίλων ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών.^(15, 17, 18) Σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό κύκλο παίζει το p53, το οποίο είναι ένας πολύ καλά μελετημένος ογκοκατασταλτικός παράγοντας, του οποίου τα επίπεδα ανεβαίνουν όταν το κύτταρο βρεθεί σε στρες (π.χ. χημειοθεραπεία) και προκαλεί απόπτωση σε συγκεκριμένα κύτταρα.^(15, 17)

Η απόπτωση είναι μία πολύ συντηρημένη και αυστηρά ρυθμισμένη διεργασία, η οποία παίζει απαραίτητο και αναντικατάστατο ρόλο σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις (αναπτυξιακά προβλήματα, αυτοάνοσα νοσήματα, καρκίνος) και αποτελεί σημαντικό στόχο για τη θεραπεία του καρκίνου.^(17, 20) Η χημειοθεραπεία και η ακτινοβολία πυροδοτούν την απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα, επομένως λάθη στην απόπτωση μπορούν να προκαλέσουν χημειοαντίσταση ή αντίσταση στην ακτινοβολία, άρα η κατανόηση των βιοχημικών μονοπατιών της απόπτωσης μπορεί να οδηγήσει στην ταξινόμηση των όγκων βάση της ανταπόκρισης στα θεραπευτικά σχήματα. Στο λέμφωμα, στη λευχαιμία και σε συμπαγείς όγκους μπορεί να εμπλέκεται είτε η ενδογενής είτε η εξωγενής οδός της απόπτωσης, αλλά και η απορύθμιση της έκφρασης ή λειτουργίας μονοπατιών ανταγωνιστών ενεργοποίησης των κασπασών. Αλλοιώσεις στους μηχανισμούς του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου παίζουν σημαντικό ρόλο στη παθογένεια και εξέλιξη των αιματολογικών νεοπλασιών, καθώς επιτρέπουν στα νεοπλασματικά κύτταρα να επιβιώσουν παραπάνω από τον προβλεπόμενο τους χρόνο ζωής και αποτρέπουν την ανάγκη για εξωγενείς παράγοντες επιβίωσης. Επίσης, η απόπτωση

συμπληρώνει την ενεργοποίηση πρωτο-ογκογονιδίων και αντίστροφα ογκοπρωτεΐνες που οδηγούν σε κυτταρική διαίρεση μπορούν να πυροδοτήσουν την απόπτωση. Διαταραχές στα αποπτωτικά μονοπάτια μπορούν να οδηγήσουν σε αντίσταση στο ανοσοποιητικό σύστημα, καθώς τα T κύτταρα και τα NK για να επιτεθούν σωστά σε ένα όγκο πρέπει η απόπτωση να λειτουργεί σωστά.⁽¹⁵⁾ Ένας πιθανός μηχανισμός εξέλιξης της ΟΛΛ είναι μεταλλάξεις που αποτρέπουν την απόπτωση, όπως για παράδειγμα μεταλλάξεις που οδηγούν σε αυξημένη έκφραση του Bcl-2 σε λευχαιμικούς βλάστες με αποτέλεσμα τη φτωχή πρόγνωση σε ασθενείς με ΟΛΛ.⁽¹³⁾ Απορρύθμιση της ενεργοποίησης των κασπασών μπορεί να οδηγήσει σε ογκογένεση, αυτοανοσία και μολυσματικές ασθένειες.⁽²¹⁾ Τέλος, προ-αποπτωτικά γονίδια μπορούν να δράσουν ως ογκοκατασταλτικοί παράγοντες, ενώ ογκογονίδια μπορεί να αποκτήσουν αντιαποπτωτικές λειτουργίες, και απώλεια της λειτουργίας τους δεν είναι απαραίτητο ότι θα οδηγήσει σε δημιουργία όγκου λόγω δυσλειτουργίας της απόπτωσης που οφείλεται σε ανεπαρκή ενεργοποίηση της κασπάσης.⁽²²⁾

3. Κασπάσες

Οι κασπάσες είναι μία διατηρημένη οικογένεια πρωτεασών κυστεΐνης, των οποίων οι λειτουργίες είναι έντονα συνδεδεμένες με τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Η πρωτεόλυση προκαλεί μεγάλες αλλαγές στη μορφολογία του κυττάρου, όπως φούσκωμα της κυτταρικής μεμβράνης, σπάσιμο του DNA και σχηματισμό αποπτωτικών κυστιδίων.^(21, 23) Χωρίζονται σε 2 ομάδες βάσει της ομοιότητας τους στην αλληλουχία και των βιολογικών λειτουργιών. Η ομάδα I αποτελεί τις φλεγμονώδεις κασπάσες (1, 4 και 5) και η ομάδα II είναι οι κασπάσες απόπτωσης (2, 3, 6, 7, 8, 9 και 10). Σε αυτό το διαχωρισμό όμως μπορεί να μην φαίνεται ξεκάθαρα κάποια εξειδικευμένη κυτταρική λειτουργία μίας κασπάσης (π.χ. Κασπάση 12 και 14) και δεν είναι ξεκάθαρη η τοποθέτηση των κασπασών 2 και 6.^(22, 23) Οι

| Protease | Other names | Recognition sequence | Functions in apoptosis |
|----------|-----------------------|----------------------|---|
| Casp-1 | ICE | YVAD | Cleavage of pro-interleukin, involved in death receptor-mediated apoptosis |
| Casp-2 | ICE-1 | | Initiator or effector |
| Casp-3 | CPP32, Yama, apopain | DEVD | Effector |
| Casp-4 | ICErel-II, TX, TCH-2 | | Cleavage of pro-interleukin |
| Casp-5 | ICErel-III, TY | | Cleavage of pro-interleukin |
| Casp-6 | Mch2 | VEID | Effector |
| Casp-7 | Mch3, ICE-LAP3, CMH-1 | | Effector |
| Casp-8 | FLICE, MACH, Mch5 | | Initiator of death receptor-mediated apoptosis |
| Casp-9 | ICE-LAP6, Mch6 | | Initiator |
| Casp-10 | Mch4 | | Initiator of death receptor-mediated apoptosis |
| Casp-11 | ICH3 | | Cleavage of pro-interleukin; initiator of death receptor-mediated apoptosis |
| Casp-12 | | | Initiator in ER-mediated apoptosis |
| Casp-13 | | | Also known as ERICE, functions unknown [33,34] |
| Casp-14 | | | Filaggrin proteolysis and UV protection [35] |
| Casp-15 | | | Unknown |

Εικόνα 3: Οι κασπάσες στα θηλαστικά

κασπάσες της ομάδας II χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τις κασπάσες έναρξης (κασπάσες 2, 8, 9 και 10) που μόλις εντοπίσουν πρόβλημα στο κύτταρο ενεργοποιούνται από τις ανενεργές προκασπάσες και ενεργοποιούν τη δεύτερη κατηγορία κασπασών, τις εκτελεστικές κασπάσες (κασπάσες 3, 6 και 7).^{(17, 18,}

²⁴⁾ Όσον αφορά τις υπόλοιπες κασπάσες, οι 1,4 και 5 συμμετέχουν στη φλεγμονή και η 14 στην τελική διαφοροποίηση των επιδερμικών κερατινοκυττάρων⁽²⁴⁾ (Εικόνα 3).

Στο μιτοχondριακό μονοπάτι το p53 και BCL2 ενεργοποιούν την κασπάση 9 και απελευθερώνεται το κυτόχρωμα c από τα μιτοχόνδρια. Στο κυτταροπλασματικό μονοπάτι συμμετέχουν το FAS ligand, κασπάση 8 και κασπάση 10. Η ενεργοποίηση των δύο αυτών οδών ενεργοποιεί μία κοινή αλληλουχία αντιδράσεων που περιλαμβάνει τις κασπάσες 3 και 7, που θεωρείται η φάση της εκτέλεσης της απόπτωσης.⁽²⁵⁾ Η κασπάση 8 πυροδοτεί την κυτταροπλασματική οδό της απόπτωσης απαντώντας στην ενεργοποίηση των παραγόντων θανάτου (FAS, TRAIL-R, TNF-R) και χαμηλά επίπεδα έκφρασης ή απώλεια λειτουργίας της προ-κασπάσης 8 συνδέονται με καρκινογένεση.⁽²⁶⁾ Όλα τα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα εκφράζουν υποδοχείς κυτοχρώματος c και μελέτες δείχνουν ότι ο συνδέτης του κυτοχρώματος c (παράγοντας βλαστοκυττάρων, SCF) αποτρέπει το θάνατο των προγονικών κυττάρων, καθώς παρεμποδίζει την ενεργοποίηση των κασπασών 3 και 8. Αυτό δείχνει ότι η κασπάση 8 ρυθμίζει συγκεκριμένα στάδια της αιμοποίησης, ανεξάρτητα από τον πολύ σημαντικό της ρόλο στην έναρξη και ρύθμιση της εξωγενούς οδού της απόπτωσης.⁽²⁷⁾ Η κασπάση 10 είναι ομόλογο της κασπάσης 8 και ρυθμίζει αρνητικά τον κυτταρικό θάνατο που μεσολαβεί η κασπάση 8 μειώνοντας την ενεργοποίησή της.⁽²⁸⁾

4. Γενετικοί Πολυμορφισμοί

Οι πολυμορφισμοί είναι ένας από τους πιο κοινούς λόγους γενετικής ποικιλομορφίας στον άνθρωπο και μπορεί να συμβεί σε διάφορα τμήματα του γενετικού υλικού, όπως εκκινητές γονιδίων, εξώνια, ιντρόνια και 3' μη μεταφραζόμενες περιοχές.⁽²⁹⁾ Αναφέρονται στην ύπαρξη πολλών αλληλόμορφων σε ένα γενετικό τόπο, χωρίς όμως κάποιο από αυτά να ξεχωρίζει ως το μοναδικό αλληλόμορφο όταν σε έναν πληθυσμό υπάρχουν πολλαπλά λειτουργικά αλληλόμορφα. Κάθε τύπος για τον οποίο υπάρχουν πολλαπλά αλληλόμορφα σε σταθερές συχνότητες μέσα στον πληθυσμό είναι εξ ορισμού πολυμορφικός, και συνήθως πολυμορφικό θεωρείται ένα αλληλόμορφο εάν απαντάται στον πληθυσμό σε συχνότητα μεγαλύτερη από 1%. Χαρακτηριστικά παραδείγματα γενετικού τύπου με πολλαπλά αλληλόμορφα άγριου τύπου είναι οι ομάδες αίματος και το σύμπλοκο ιστοσυμβατότητας στον άνθρωπο. Στα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα αλλοιώνεται η λειτουργία της παραγόμενης πρωτεΐνης του αντίστοιχου γενετικού τόπου και άρα μεταβάλλεται ο φαινότυπος. Διαφορετικές παραλλαγές ενός αλληλόμορφου άγριου τύπου μπορεί να διακριθούν μεταξύ τους από διαφορές στην αλληλουχία τους,

χωρίς να επηρεάζουν τη λειτουργικότητα του αλληλομόρφου και άρα να μην υπάρχουν φαινοτυπικές αλλαγές. Ένας πολυμορφισμός μπορεί να παρατηρηθεί σε επίπεδο φαινοτύπου, αν επηρεάζει μία γονιδιακή λειτουργία, αν επηρεάζει μια θέση-στόχο ενός ενζύμου περιορισμού και σε επίπεδο αλληλουχίας, με απευθείας ανάλυση του DNA.⁽³⁰⁾ Διακρίνονται σε τρία είδη, στους μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs), στις βραχείες διαδοχικές επαναλήψεις (Short Tandem Repeats, STRs) και στις ποικίλου αριθμού διαδοχικές επαναλήψεις (Variable Number of Tandem Repeats, VNTRs).⁽³¹⁾

Οι SNPs αναφέρονται σε αλληλόμορφα που διαφέρουν σε ένα μόνο νουκλεοτίδιο και είναι αποτέλεσμα μεταλλάξεων που έγιναν χιλιάδες χρόνια πριν και κληρονομούνται σταθερά από γενιά σε γενιά. Η συχνότητα τέτοιων αλλαγών στο ανθρώπινο γονιδίωμα είναι περίπου μία ανά 1330 βάσεις και κάθε άνθρωπος χαρακτηρίζεται από ένα μοναδικό πρότυπο SNP. Ευθύνεται για το 90-95% της ποικιλομορφίας του ανθρώπινου DNA και αποτελεί τη συνηθέστερη μορφή πολυμορφισμού. Επομένως η μεγάλη τους συχνότητα στο γονιδίωμα τα καθιστά κατάλληλα για γενετικές αναλύσεις και είναι πολύ χρήσιμα για γενετική χαρτογράφηση, καθώς διευκολύνεται ο χαρακτηρισμός νέων γονιδίων μέσω χαρτογράφησης τους ανάμεσα σε δύο κοντινές θέσεις SNPs. Επιπλέον, είναι πολύ σημαντικοί για την ανάλυση πολύπλοκων γενετικών ασθενειών και πολλοί από αυτούς χρησιμοποιούνται ως δείκτες DNA και είναι χρήσιμοι στην κατασκευή γενετικών χαρτών υψηλής ακρίβειας.^(30, 31) Οι πολυμορφισμοί αυτοί μπορούν να προσδιοριστούν με απευθείας σύγκριση αλληλουχιών, με φασματοσκοπία μάζας ή με βιοχημικές μεθόδους που ανιχνεύουν διαφορές στις πολυμορφικές θέσεις μίας συγκεκριμένης περιοχής.⁽³⁰⁾

Ένα μικρό ποσοστό των SNPs επηρεάζει θέσεις περιορισμού είτε δημιουργώντας νέες είτε απαλείφοντας κάποιες που ήδη υπάρχουν.⁽³²⁾ Οι πολυμορφισμοί μήκους τμημάτων περιορισμού (RFLPs, Restriction Fragment Length Polymorphisms) αναφέρονται σε διαφορές ανάμεσα στους χάρτες περιορισμού, δηλαδή οι διαφορές σε ομόλογες αλληλουχίες DNA που μπορούν να ανιχνευτούν με την παρουσία τμημάτων διαφορετικού μήκους μετά από πέψη των δειγμάτων DNA με την κατάλληλη περιοριστική ενδονουκλεάση. Επομένως όταν η θέση-στόχος του περιοριστικού ενζύμου υπάρχει στο γονιδίωμα ενός ατόμου και απουσιάζει από το γονιδίωμα ενός άλλου, τότε η επιπλέον θέση πέψης του πρώτου ατόμου θα δημιουργήσει δύο τμήματα που αντιστοιχούν σε ένα τμήμα στο δεύτερο γονιδίωμα. Οι πολυμορφισμοί σε θέσεις περιορισμού ανιχνεύονται ανεξάρτητα από το αν η μεταβολή της αλληλουχίας επηρεάζει ή όχι τον φαινότυπο, αν και η περίπτωση να επηρεάζεται ο φαινότυπος είναι αρκετά σπάνια, καθώς οι περισσότεροι αφορούν αλλαγές που δεν έχουν σχέση με την παραγωγή πρωτεϊνών, αλλά με ρυθμιστικές και μη κωδικές περιοχές.⁽³⁰⁾

5. Γενετικοί πολυμορφισμοί στην Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία

Το αιμοποιητικό σύστημα είναι ευαίσθητο στην απορρύθμιση της απόπτωσης, καθώς χρειάζεται ισορροπία μεταξύ πολλαπλασιασμού και απόπτωσης. Στις αιματολογικές ασθένειες συχνά απορυθμίζεται η απόπτωση, λόγω απορρύθμισης προ- και αντι-αποπτωτικών γονιδίων που οδηγούν σε αντίσταση στην απόπτωση που κορυφώνεται με συσσώρευση μυελικών κυττάρων και ανάπτυξη νεοπλασιών. Πολυμορφισμοί (SNPs) γονιδίων της απόπτωσης μπορεί να συμβάλουν στον κίνδυνο για ασθένεια.⁽³³⁾ Μελέτες σε SNPs δείχνουν ότι σε παιδιά με ΟΛΛ δεν προκαλείται αστάθεια στο γενετικό υλικό. Όμως, η διερεύνηση των κληρονομούμενων γενετικών ποικιλομορφιών μπορούν να προσφέρουν την ευκαιρία να τροποποιηθούν τα θεραπευτικά σχήματα για να μειωθεί η τοξικότητα χωρίς να έχει επιπτώσεις στην αποτελεσματικότητα. Επιπλέον, έχει ταυτοποιηθεί η ισχυρή σύνδεση μεταξύ γενετικής ποικιλομορφίας και ευαισθησίας για ανάπτυξη ΟΛΛ και πολλοί από αυτούς τους πολυμορφισμούς είναι σε γονίδια στόχους που οδηγούν σε λευχαιμογένεση.⁽¹²⁾ Επίσης, ο κίνδυνος τοξικότητας ίσως αυξάνεται λόγω της ύπαρξης πολυμορφισμών που εμπλέκονται στη φαρμακοκινητική μυελοκατασταλτικών αντιλευχαιμικών παραγόντων προκαλώντας ασυνήθιστα υψηλή συστηματική έκθεση σε ενεργό φάρμακο και πολυμορφισμών σε γονίδια των οποίων τα παράγωγα εμπλέκονται στην ανοσία από παθογόνα.⁽¹⁵⁾ Η αποτελεσματικότητα της απόπτωσης σε έναν οργανισμό μπορεί να είναι συνέπεια πολυμορφισμών σε γονίδια που ρυθμίζουν ή εκτελούν την απόπτωση. Ανάλυση αυτών των πολυμορφισμών μπορεί να βοηθήσει στην αναγνώριση ασθενών με καρκίνο και κακή πρόγνωση και να δοθεί η ανάλογη θεραπεία. Οι πολυμορφισμοί σε γονίδια κασπάσων μπορεί να εμπλέκονται σε διάφορους τύπους καρκίνου και ενώ κάποιες μεταλλάξεις σε κασπάσες που μειώνουν της αποπτωτική ιδιότητα μπορεί να παίζουν προστατευτικό ρόλο στον όγκο, ίσως να έχουν πιο ισχυρή αντικαρκινική δράση μειώνοντας την απόπτωση σε διηθημένα λεμφοκύτταρα του όγκου.⁽²²⁾

6. Γενετικοί πολυμορφισμοί στις κασπάσες -8 και -10

Ο ρόλος των κασπάσων στην απόπτωση τις καθιστά κατάλληλες για ογκοκατασταλτικούς παράγοντες. Αρκετές αναφορές περιγράφουν τη αποσιώπηση του γονιδίου της κασπάσης 8 ή τη μεθυλίωση του εκκινητή του κυρίως σε όγκους στα παιδιά.⁽²²⁾ Η κασπάση 8 παίζει σημαντικό ρόλο στην απόπτωση και αρκετές μελέτες έχουν γίνει για να ταυτοποιήσουν τη σχέση μεταξύ των πολυμορφισμών στο γονίδιο της κασπάσης 8 (*CASP8*) και διαφόρων τύπων καρκίνου, αλλά τα ευρήματα είναι ακόμα υπό συζήτηση. Μεταλλαγμένη κασπάση 8 έχει βρεθεί σε διάφορους τύπους καρκίνου και οι πολυμορφισμοί της εμπλέκονται στην παθογένεση του καρκίνου. Ο πολυμορφισμός rs1045485 στο εξώνιο 10 της κασπάσης 8 (270 G→C, Asp/His) δεν επηρεάζει την έκφραση του mRNA και έχει συνδεθεί με

μειωμένο κίνδυνο για καρκινογένεση στους Καυκάσιους, αλλά και ειδικότερα στον καρκίνο του μαστού.^(24, 29, 33) Η κασπάση 10 μπορεί να λειτουργεί ανεξάρτητα από την κασπάση 8, αλλά δεν είναι ικανή να αντικαταστήσει πλήρως την κασπάση 8.⁽²²⁾ Η κασπάση 10 είναι η μοναδική κασπάση που μοιράζεται ομόλογες αλληλουχίες τελεστή θανάτου με την κασπάση 8, άρα μάλλον η κασπάση 10 αλληλεπιδρά επίσης με υποδοχείς θανάτου. Σωματικές μεταλλάξεις στην κασπάση 10 έχουν παρατηρηθεί σε πολλούς καρκίνους. Ο πολυμορφισμός rs13006529 στο εξόνιο 10 της κασπάσης 10 (522 A → T, Ile/Leu) ίσως αυξάνει τον κίνδυνο για καρκίνο, και ειδικά για καρκίνο του μαστού.^(33, 34)

7. α) Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reaction) είναι μία τεχνική η οποία ανακαλύφθηκε από τον Kary Mullis και καθιστά δυνατή την γρήγορη «αकुτταρική μοριακή κλωνοποίηση» συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA, των οποίων οι παράπλευρες αλληλουχίες είναι γνωστές, κάνοντας πολύ γρήγορη και επιλεκτική αντιγραφή αλληλουχιών DNA σε πολλά εκατομμύρια αντίγραφα με τη βοήθεια της θερμοανθεκτικής και καθαρής απομονωμένης DNA πολυμεράσης και των συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων DNA. Η χρήση της είναι πολύ συχνή σε διαδικασίες κλωνοποίησης γονιδίων, αλληλούχισης DNA, μεταλλαξογένεσης, εντοπισμού μεταλλάξεων, γονοτύπισης, διάγνωσης γενετικών ασθενειών και ιογενών λοιμώξεων, καθώς και στην ιατροδικαστική για την ταυτοποίηση ατόμων μέσω βιολογικού υλικού, όπως το αίμα, το σπέρμα και ο σίελος. Χρησιμοποιείται επίσης στην ανίχνευση καρκίνου σε πρώιμα στάδια και στην παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της χημειοθεραπείας για τον καρκίνο, αλλά και για εντοπισμό λευχαιμιών που προκύπτουν από χρωμοσωματικές ανακατατάξεις ή ακόμα και για τον καθορισμό του βιολογικού πατέρα σε αμφισβητούμενες περιπτώσεις. Τέλος προϊόντα PCR μπορούν να αποτελέσουν πηγή κατανόησης εξελικτικών σχέσεων μεταξύ οργανισμών εντοπίζοντας DNA μικροοργανισμών που δεν έχουν απομονωθεί ή αρχαίων μορίων DNA που έχουν μείνει ανέπαφα για χιλιάδες χρόνια. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην επανάληψη (25 έως 35 φορές) ενός κύκλου, που αποτελείται από τρία στάδια, και το αποτέλεσμά του είναι ο διπλασιασμός των αντιγράφων DNA και άρα ο συνολικός τους αριθμός να αυξάνεται εκθετικά όσο προχωράει η αντίδραση. Δηλαδή ξεκινώντας από ένα μόριο δίκλωνου DNA, πραγματοποιώντας n επαναλήψεις του κύκλου των αντιδράσεων, θα παραχθούν 2^n αντίγραφα. Τα τρία στάδια του κύκλου αποτελούνται από: α) αποδιάταξη του δίκλωνου DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί (θερμοκρασία $>90^\circ\text{C}$), β) πρόσδεση πάνω σε κάθε κλώνο του DNA ειδικών ολιγονουκλεοτιδικών αλληλουχιών που χρησιμεύουν ως εκκινήτες της αντιγραφής (primers, 20 έως 25 νουκλεοτίδια) και γ) αντιγραφή κάθε αλυσίδας του δίκλωνου μορίου (θερμοκρασία $55\text{--}70^\circ\text{C}$) με τη βοήθεια της DNA Taq πολυμεράσης, η οποία προέρχεται από το θερμόφιλο βακτήριο που ζει στις

θερμές πηγές *Thermus aquaticus*. Για να πραγματοποιηθεί μία τέτοια αντίδραση χρειάζεται την προσθήκη των παρακάτω υλικών: η αλληλουχία-στόχος που θα πολλαπλασιαστεί, ένα ζεύγος εκκινητών που μπορούν να υβριδοποιηθούν με τις παράπλευρες αλληλουχίες του στόχου, τέσσερις τριφωσφορικοί δεοξυριβονουκλεοζίτες (dNTPs: dATP, dTTP, dCTP, dGTP) και θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση. Η PCR είναι πολύ ευαίσθητη τεχνική και μπορεί να εντοπίσει ακόμα και ένα μόνο μόριο μέσα σε ένα δείγμα και να το πολλαπλασιάσει και επίσης μπορεί να ανιχνεύσει μόρια RNA, τα οποία αφού πρώτα μεταγραφούν σε DNA με την αντίστροφη μεταγραφάση, μετά να πολλαπλασιαστούν. Επιπλέον η θερμοανθεκτικότητα της πολυμεράσης επιτρέπει στην αντίδραση να μπορεί να πραγματοποιηθεί σε κλειστό δοχείο χωρίς να χρειάζεται να προστεθούν αντιδραστήρια μετά τον πρώτο κύκλο και οι εκκινητές δεν χρειάζεται να είναι απόλυτα ταιριαστοί με τις παράπλευρες αλληλουχίες, καθώς έτσι μπορούν να αναζητηθούν τροποποιήσεις του ίδιου γονιδιακού θέματος, όπως οι οικογένειες γονιδίων.^(35, 36)

β) Ένζυμα περιορισμού

Τα ένζυμα περιορισμού ή περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που απομονώθηκαν από διάφορους προκαρυωτικούς οργανισμούς, κυρίως βακτήρια, και τους προστατεύουν από εισβολή ξένου DNA και έχουν ως ιδιότητα να κόβουν το DNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες (θέσεις περιορισμού). Καθοριστική για την ανακάλυψή τους ήταν η συμβολή των Werner Arber, Dan Nathans και Hamilton Smith, που βραβεύτηκαν με βραβείο Νόμπελ το 1978. Υπάρχουν δυο κύριες ομάδες ενζύμων περιορισμού, τα ένζυμα που δημιουργούν κολλώδη μονόκλωνα άκρα (sticky ends) και τα ένζυμα που δημιουργούν μη κολλώδη δίκλωνα άκρα (blunt ends). Πολλές από τις διαδικασίες που χρησιμοποιούνται στη μοριακή βιολογία και στη γενετική μηχανική βασίζονται στα ένζυμα περιορισμού, όπως η κλωνοποίηση DNA, η ανίχνευση πολυμορφισμών, η κατασκευή βιβλιοθηκών DNA, η μελέτη επιγενετικών αλλαγών, η επεξεργασία, το αποτύπωμα αλλά και η χαρτογράφηση του DNA είναι μερικές από τις σημαντικότερες.^(37, 38)

γ) Πήκτωμα αγαρόζης

Για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του DNA που απομονώνεται μέσα από κάποια πειραματική διαδικασία χρησιμοποιείται η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης, η οποία είναι μία μέθοδος με μεγάλη διαχωριστική ικανότητα με αποτέλεσμα να μπορούν να ανιχνευτούν μικρές διαφορές μεταξύ μορίων DNA. Η ηλεκτροφόρηση είναι μια μέθοδος που βασίζεται στο ότι τα περισσότερα μακρομόρια όπως το DNA, το RNA και οι πρωτεΐνες, μπορούν να διαχωριστούν ανάλογα με το μέγεθός τους επειδή είναι ηλεκτρικά φορτισμένα. Έτσι, όταν βρεθούν σε ηλεκτρικό πεδίο, κινούνται με ταχύτητα που εξαρτάται από τον λόγο του ηλεκτρικού φορτίου προς την μάζα τους. Το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο, λόγω των φωσφορικών του ομάδων, και άρα κινείται προς τον θετικό πόλο κατά την

διάρκεια της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή.⁽³⁷⁾ Για τον διαχωρισμό σχετικά μεγάλων νουκλεϊκών οξέων, χρησιμοποιείται η πηκτή αγαρόζης, η οποία είναι ένας φυτικός πολυσακχαρίτης που προέρχεται από θαλάσσια φύκη, και φέρει στο εσωτερικό της πόρους των οποίων το μέγεθος εξαρτάται από την συγκέντρωση της αγαρόζης. Όσο πιο μικρή η συγκέντρωση της αγαρόζης τόσο μεγαλύτερο είναι το μέγεθος των πόρων του σχηματιζόμενου πλέγματος, και αντίστοιχα όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση αγαρόζης τόσο μικρότεροι οι πόροι.⁽³⁹⁾ Κατάλληλες τεχνικές επιτρέπουν την οπτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων με ειδικές χρώσεις και στη συνέχεια παρατήρηση σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας ή με αυτοραδιογραφία.⁽⁴⁰⁾

Σκοπός

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι συχνότητες τόσο σε επίπεδο γονοτύπων όσο και αλληλομόρφων του rs1045485 SNP που εδράζεται στο εξώνιο 10 του γονιδίου της κασπάσης 8, καθώς και του rs13006529 του γονιδίου της κασπάσης 10, το οποίο βρίσκεται στο εξώνιο 10, σε παιδιά και εφήβους με ΟΛΛ σε σύγκριση με υγιή άτομα. Σκοπός της μελέτης είναι να βρεθεί αν η εμφάνιση κάποιου αλληλομόρφου ή γονότυπου των δύο αυτών γενετικών τόπων συσχετίζεται με την εκδήλωση της νόσου.

Ασθενείς και Μέθοδοι

Οι διαδικασίες για την πραγματοποίηση της έρευνας διεξήχθησαν σε σύνολο 150 ατόμων. Τα 50 από αυτά τα άτομα ήταν παιδιά που διαγνώστηκαν με Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία στην Κλινική Αιματολογίας – Ογκολογίας Παίδων του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου, ηλικίας 1,5 έως 17,5 ετών και αναλογία φύλου 1:1. Την ομάδα ελέγχου αποτέλεσαν 100 παιδιά και έφηβοι χωρίς νεοπλασματικό νόσημα από το αρχείο του εργαστηρίου Βιολογίας Αιματολογικών νόσων και Καρκίνου στα Παιδιά της Σχολής Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Για τη πραγματοποίηση των πειραμάτων έγινε απομόνωση γενωμικού DNA από περιφερικό αίμα, με το PureLink Genomic DNA Mini Kit της εταιρίας Invitrogen by Thermo Fisher Scientific για τα δείγματα της ομάδας των ασθενών και με το DNA Purification Kit της εταιρίας Promega: Wizard Genomic για τα δείγματα της ομάδας ελέγχου. Πιο συγκεκριμένα:

1. Απομόνωση γενωμικού DNA από περιφερικό αίμα (I) (PureLink Genomic DNA Mini Kit της εταιρίας Invitrogen by Thermo Fisher Scientific): Αφού αναδευτεί καλά το αίμα, 200 μl αυτού τοποθετούνται σε eppendorf των 1,5 ml και προστίθενται 20 μl Proteinase K και 20 μl RNAase A. Μετά από ήπια ανάδευση το δείγμα επωάζεται για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Προστίθενται 200 μl Lysis binding buffer και γίνεται ανάδευση με Vortex για 5 έως 10 δευτερόλεπτα για να

ομογενοποιηθεί το δείγμα. Ακολουθεί επώαση 10 λεπτών στους 55 °C, όπου θα επιτευχθεί η διάλυση των πρωτεϊνών, και έπειτα θα προστεθούν 200 µl καθαρής αιθανόλης (>96%) και το δείγμα αναδεύεται καλά με Vortex για 5 έως 10 δευτερόλεπτα. Το δείγμα μεταφέρεται σε μία κολόνα που βρίσκεται μέσα στο collection tube και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στα 10000 RCF (ή g). Απορρίπτεται το collection tube και η κολόνα τοποθετείται σε νέο collection tube. Προστίθενται 500 µl Wash buffer 1 στην κολόνα και γίνεται φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα 10000 RCF (ή g). Το collection tube απορρίπτεται ξανά και η κολόνα τοποθετείται σε νέο collection tube. Προστίθενται 500 µl Wash buffer 2 στην κολόνα και γίνεται φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στα 16000 RCF (ή g). Το collection tube απορρίπτεται ξανά και η κολόνα τοποθετείται σε αποστειρωμένο eppendorf. Στην κολόνα προστίθενται 50 µl elution buffer, το δείγμα επωάζεται για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στα 16000 RCF (ή g). Απορρίπτεται η κολόνα και το δείγμα το οποίο έχει συλλεχθεί στο eppendorf φυλάσσεται έως μερικά χρόνια στους -20 °C, ενώ για μακροχρόνια φύλαξη στους -80 °C.

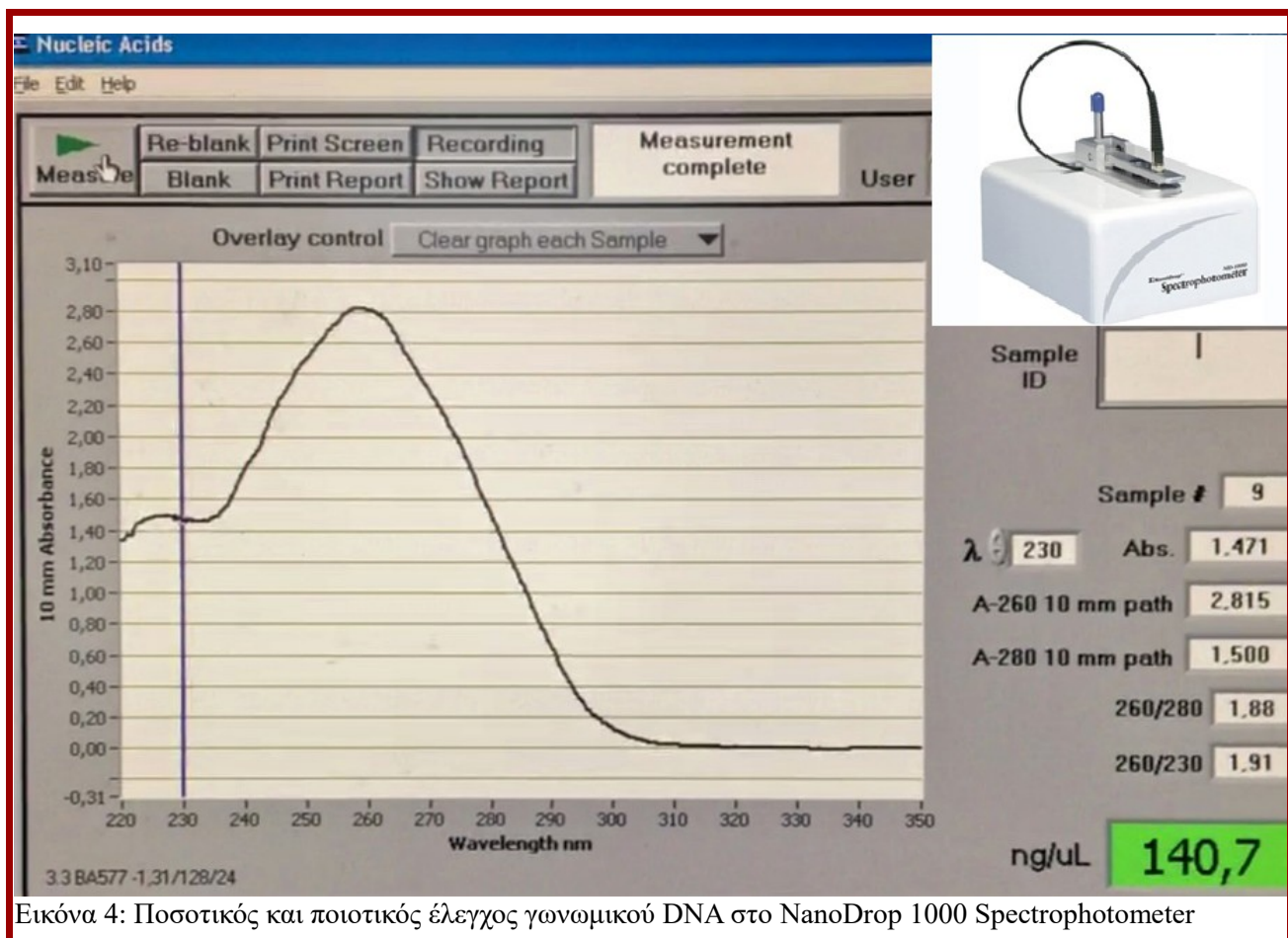
2. Απομόνωση γενωμικού DNA από περιφερικό αίμα (II) (DNA Purification Kit της εταιρίας Promega: Wizard Genomic): Αφού αναδευτεί καλά το αίμα, 300 µl αυτού τοποθετούνται σε eppendorf των 1,5 ml που περιέχει 900 µl Cell Lysis Solution. Το δείγμα ανακινείται ήπια με το χέρι 5 με 6 φορές και επωάζεται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Κατά τη διάρκεια της επώασης το δείγμα ανακινείται ήπια με το χέρι ανά 3 με 5 λεπτά. Η διαδικασία αυτή οδηγεί στην λύση των ερυθροκυττάρων. Έπειτα γίνεται φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα 14000 RCF (ή g) σε θερμοκρασία δωματίου και αναρροφάται το περισσότερο υπερκείμενο (1000 µl περίπου). Η πελέτα αποτελείται από τα λευκά κύτταρα τα οποία έχουν πυρήνα και άρα DNA. Το δείγμα ανακινείται με Vortex σε δυνατή ταχύτητα για περίπου 15 δευτερόλεπτα, μέχρι να επαναδιαλυθεί η πελέτα και άρα να αρχίσουν να λύνονται τα κύτταρα. Έπειτα προστίθενται 300 µl Nuclei Lysis Solution και το δείγμα αναδεύεται καλά με πιπέτα μέχρι να εμφανιστεί μία άσπρη πελέτα και συνεχίζεται έως ότου διαλυθεί αυτή η πελέτα. Όταν η πελέτα διαλυθεί πλήρως, τα κύτταρα έχουν λυθεί, οπότε διακόπτεται η ανάδευση για να μην προκληθεί τμήση του DNA. Στο διάλυμα αυτό εισάγονται 1,5 µl RNAase solution και μετά από ήπια ανακίνηση – με το χέρι - 4 με 5 φορές το δείγμα επωάζεται για 15 λεπτά στους 37 °C. Με το πέρας των 15 λεπτών το δείγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για άλλα 5 λεπτά να κρυώσει. Στη συνέχεια προστίθενται στο δείγμα 100 µl Protein Precipitation Solution και αναδεύεται για 20 δευτερόλεπτα στην υψηλότερη ταχύτητα του Vortex. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στα 16000 RCF (ή g) σε θερμοκρασία δωματίου. Η σκουρόχρωμη πελέτα που προκύπτει είναι οι πρωτεΐνες. Σε νέο eppendorf που περιέχει 300 µl ισοπροπανόλη εισάγεται το υπερκείμενο που προέκυψε από την φυγοκέντρηση, το οποίο περιέχει το DNA, προσέχοντας να μην πειραχτεί καθόλου η πελέτα ώστε να μην παρασυρθούν

πρωτεΐνες στο διάλυμα και χαλάσει η καθαρότητα του DNA. Ανακινώντας ήπια με το χέρι εμφανίζεται μία άσπρη αιωρούμενη πελέτα που αποτελεί το DNA. Το διάλυμα αυτό φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στα 16000 RCF (ή g) σε θερμοκρασία δωματίου και το υπερκείμενο που προκύπτει πετιέται. Έπειτα προστίθενται 300 μl αιθανόλης 70%, η οποία εισάγεται ήπια στο erpendorf για να μην ξεκολλήσει η πελέτα από τον πάτο και υπάρξει στο μέλλον κίνδυνος να αναρροφηθεί μαζί με το υπερκείμενο. Ακολουθεί και πάλι φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα 16000 RCF (ή g) σε θερμοκρασία δωματίου και όλο το υπερκείμενο αναρροφάται πολύ προσεκτικά γιατί υπάρχει περίπτωση η πελέτα να έχει γίνει διάφανη και να μη φαίνεται. Το δείγμα αφήνεται να στεγνώσει για 15 περίπου λεπτά, ίσως και παραπάνω αν χρειαστεί, με ανοιχτό καπάκι σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθενται 100 μl DNA Rehydration Solution και ανακινείται ήπια χτυπώντας με το δάχτυλο το erpendorf για να ξεκολλήσει η πελέτα από τον πάτο. Για να είναι έτοιμο για χρήση το DNA πρέπει να φυλαχτεί για μία νύχτα σε θερμοκρασία 4 °C για να διαλυθεί η πελέτα. Για φύλαξη του DNA έως μερικά χρόνια μπορεί να τοποθετηθεί στους -20 °C, ενώ για μακροχρόνια φύλαξη στους -80 °C.

3. Ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος γενωμικού DNA

Για τον ποσοτικό και ποιοτικό έλεγχο του DNA τα δείγματα μετρήθηκαν σε NanoDrop, το οποίο είναι μία συσκευή που μπορεί να μετρήσει συγκεντρώσεις DNA, RNA και πρωτεϊνών σε δείγματα 1-2 μl. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer της εταιρίας Thermo Fisher Scientific. Για τη μέτρηση του δείγματος αρχικά επιλέγεται το κατάλληλο πρόγραμμα στον ηλεκτρονικό υπολογιστή (ND100) και γίνεται επιλογή του προς μέτρηση προϊόντος, δηλαδή Nucleid Acid. Προστίθενται στον αισθητήρα του μηχανήματος 1,5 μl elution buffer ή DNA rehydration solution, ανάλογα με το δείγμα προς μέτρηση. Κλείνεται η κεφαλή της συσκευής και 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 μετά από κάποια δευτερόλεπτα, εμφανίζεται το αποτέλεσμα. Το δείγμα χαρακτηρίζεται από την συγκέντρωση DNA ανά μl, την καθαρότητα ως προς τα άλατα (260nm/230nm) και την καθαρότητα ως προς τις πρωτεΐνες (260nm/280nm) (Εικόνα 4). Μετά από την μέτρηση κάθε δείγματος πρέπει η κεφαλή να καθαρίζεται απαλά με απορροφητικό χαρτί. Τα δείγματα όση ώρα διαρκεί η διαδικασία πρέπει να συντηρούνται σε πάγο, καθώς το DNA είναι ευαίσθητο και μπορεί να επέλθει αποδιάταξη. Με το πέρας της διαδικασίας προστίθενται στον αισθητήρα 1,5 μl ενέσιμου νερού και το πρόγραμμα στον υπολογιστή κλείνεται μέχρι την επόμενη χρήση.

Από το γενωμικό DNA, με τη μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (PCR), θα πολλαπλασιαστούν οι υπό μελέτη γενετικοί τόποι.



Εικόνα 4: Ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος γονωμικού DNA στο NanoDrop 1000 Spectrophotometer

4. Κασπάση 8 rs1045485 (CASP8, εξόνιο 10)

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε με το Taq PCR Core Kit της εταιρίας Qiagen σε τελικό όγκο 25 μl που περιείχε 2.5 μl γενωμικού DNA (<1 μg), 5μl 10x CoralLoad Buffer, 0.5 μl Taq DNA polymerase, 0.5 μl τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), 1.25 μl forward primer 250 ng/μl, 1.25 μl reverse primer 250 ng/μl και 14 μl ενέσιμο νερό.

Οι εκκινητές (primers) ήταν της εταιρίας Eurofins Genomics και οι αλληλουχίες τους ήταν οι εξής:

CASP8 forward: 5' CAT TTT GAG ATC AAG CCC CAC 3'

CASP8 reverse: 5' CCC TTG TCT CCA TGG GAG AGG A 3' ⁽²⁵⁾

Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν:

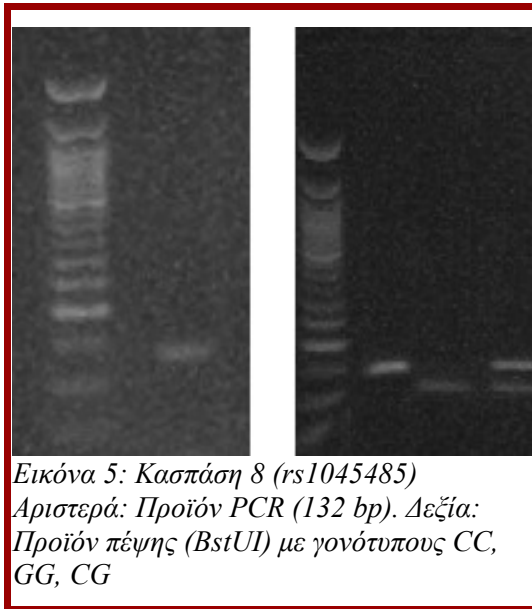
3 λεπτά στους 94 °C (στάδιο αποδιάταξης)

30 κύκλοι: 1 λεπτό στους 94 °C, 1 λεπτό στους 65°C, 1 λεπτό στους 72 °C

10 λεπτά στους 72 °C (στάδιο τελικής επιμήκυνσης)

Το προϊόν της αντίδρασης αναμένεται να έχει μέγεθος 132 ζεύγη βάσεων. Και για επιβεβαίωση ύπαρξης του σωστού προϊόντος, μετά το τέλος της PCR, τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε gel αγαρόζης 2%, το οποίο περιέχει σε όγκο 150 ml, 3 gr αγαρόζη, 15 μl SYBR safe DNA gel stain της

εταιρείας invitrogen και 150 ml TBE 1x. Οι μπάντες του DNA εμφανίζονται φωτίζοντας το gel με υπεριώδη ακτινοβολία (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Κασπάση 8 (rs1045485)
Αριστερά: Προϊόν PCR (132 bp). Δεξιά:
Προϊόν πέψης (BstUI) με γονότυπους CC,
GG, CG

Στη συνέχεια 8 μl από το προϊόν της PCR θα επωαστούν με 2.5 units *BstUI* της εταιρείας New England BioLabs, 2 μl buffer του ενζύμου και 9 μl ενέσιμου νερού για 3 ώρες στους 60 °C. Με αυτή τη διαδικασία το ένζυμο θα κόψει το προϊόν της PCR σε όσα δείγματα έχουν τον πολυμορφισμό. Τα αποτελέσματα της πέψης εμφανίστηκαν μετά από ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε gel αγαρόζης 3% (150 ml TBE 1x, 15 μl SYBR safe DNA gel stain, 4.5 gr αγαρόζη) και έκθεση του gel σε υπεριώδη ακτινοβολία. Η εμφάνιση μίας μπάντας στο gel υποδηλώνει άγριο τύπο (αλληλόμορφο C) σε ομοζυγωτία, δηλαδή έλλειψη της θέσης κοπής του περιοριστικού ενζύμου (132 ζεύγη βάσεων). Οι δύο μπάντες

δείχνουν την ύπαρξη της θέσης κοπής (αλληλόμορφο G) και άρα του πολυμορφισμού σε ομοζυγωτία (112 και 20 ζεύγη βάσεων), ενώ οι τρεις μπάντες είναι τα ετερόζυγα άτομα (Εικόνα 5).

5. Κασπάση 10 rs13006529 (CASP10, εξώνιο 10)

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε με το Taq PCR Core Kit της εταιρείας Qiagen σε τελικό όγκο 25 μl που περιείχε 2.5 μl γενωμικού DNA (<1 μg), 5μl 10x CoralLoad Buffer, 0.5 μl Taq DNA polymerase, 0.5 μl τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), 1.25 μl forward primer 250 ng/μl, 1.25 μl reverse primer 250 ng/μl, 13.5 μl ενέσιμο νερό και 0.5 μl MgCl₂.

Οι εκκινητές (primers) ήταν της εταιρείας Eurofins Genomics και οι αλληλουχίες τους ήταν οι εξής:

CASP10 forward: 5' GAG TGG ACA AAC AGG GAA CAA A 3'

CASP10 reverse: 5' AGA ACC AAC AAA AAC TCT CTG CAA TA 3' ⁽²⁵⁾

Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν:

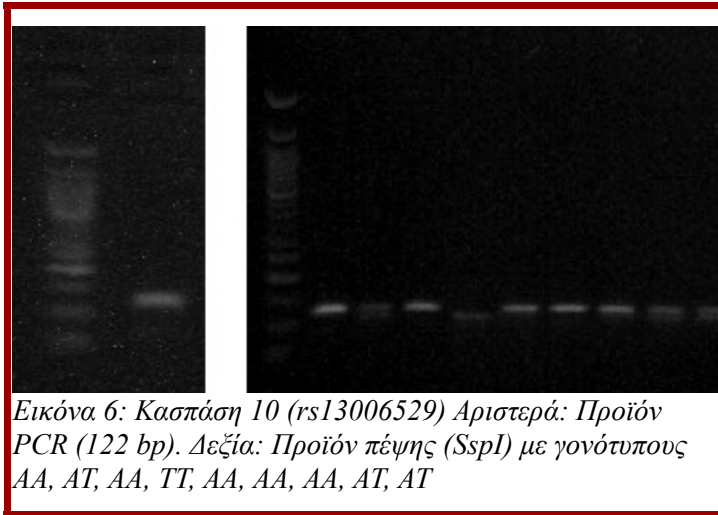
3 λεπτά στους 94 °C (στάδιο αποδιάταξης)

30 κύκλοι: 1 λεπτό στους 94 °C, 1 λεπτό στους 65°C, 1 λεπτό στους 72 °C

10 λεπτά στους 72 °C (στάδιο τελικής επιμήκυνσης)

Το προϊόν της αντίδρασης αναμένεται να έχει μέγεθος 122 ζεύγη βάσεων. Και για επιβεβαίωση ύπαρξης του σωστού προϊόντος, μετά το τέλος της PCR, τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε gel αγαρόζης 2%, το οποίο περιέχει σε όγκο 150 ml, 3 gr αγαρόζη, 15 μl SYBR safe DNA gel stain της εταιρείας invitrogen και 150 ml TBE 1x. Οι μπάντες του DNA εμφανίζονται φωτίζοντας το gel με

υπεριώδη ακτινοβολία (Εικόνα 6)



Στη συνέχεια 8 μl από το προϊόν της PCR θα επωαστούν με 2.5 units *SspI* της εταιρείας New England BioLabs, 2 μl buffer του ενζύμου και 9 μl ενέσιμου νερού για 3 ώρες στους 37 °C. Με αυτή τη διαδικασία το ένζυμο θα κόψει το προϊόν της PCR σε όσα δείγματα έχουν τον πολυμορφισμό. Τα αποτελέσματα της πέψης εμφανίστηκαν μετά από ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε gel αγαρόζης 3% (150 ml TBE 1x, 15 μl SYBR

safe DNA gel stain, 4.5 gr αγαρόζη) και έκθεση του gel σε υπεριώδη ακτινοβολία. Η εμφάνιση μίας μπάντας στο gel υποδηλώνει άγριο τύπο (αλληλόμορφο A) σε ομοζυγωτία, δηλαδή έλλειψη της θέσης κοπής του περιοριστικού ενζύμου (122 ζεύγη βάσεων). Οι δύο μπάντες δείχνουν την ύπαρξη της θέσης κοπής (αλληλόμορφο T) και άρα του πολυμορφισμού σε ομοζυγωτία (97 και 25 ζεύγη βάσεων), ενώ οι τρεις μπάντες είναι τα ετερόζυγα άτομα (Εικόνα 6).

6. Στατιστική ανάλυση

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 (χ^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.

Αποτελέσματα

1. Ο ρόλος του πολυμορφισμού rs1045485 του γονιδίου Caspase 8 στην ΟΛΛ

Στην περίπτωση του rs1045485 SNP του γονιδίου Caspase 8, στην ομάδα των ασθενών τα ποσοστά εμφάνισης των γονοτύπων CC, CG και GG ήταν 12%, 84% και 4% αντίστοιχα, ενώ τα ποσοστά των αλληλομόρφων C και G ήταν 54% και 46%. Ομοίως, στην ομάδα ελέγχου οι γονότυποι CC, CG και GG εμφανίστηκαν κατά 53%, 45% και 2% αντίστοιχα και τα αλληλόμορφα C και G κατά 75,5% και 24,5%.

Μετά από στατιστική ανάλυση βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τη συχνότητα του αλληλόμορφου G, μεταξύ ασθενών και μαρτύρων ($p = 0,0002$, OR = 0.381, 95% 0.229-0.633) (Πίνακας 1). Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητα των γονοτύπων GG και CG μεταξύ ασθενών και μαρτύρων ($p = 0,075$, OR = 0.113, CI 95% 0.013-0.957 και $p=1$, OR=0.933, CI 95% 0.126-6.931, αντίστοιχα).

| Genotypes | PATIENTS N=50 | CONTROLS N=100 | p-value | OR (95% CI) |
|-----------|------------------|-------------------|------------|---------------------|
| CC | 6 | 53 | | |
| CG | 42 | 45 | $p=1$ | 0.933 (0.126-6.931) |
| GG | 2 | 2 | $p=0.075$ | 0.113 (0.013-0.957) |
| Alleles | N=100 | N=200 | | |
| C | 54 | 151 | | |
| G | 46 | 49 | $p=0.0002$ | 0.381 (0.229-0.633) |

Πίνακας 1: Οι συχνότητες γονοτύπων και αλληλομόρφων του πολυμορφισμού rs1045485 του γονιδίου της κασπάσης 8 σε 50 ασθενείς με ΟΛΛ και 100 μάρτυρες

2. Ο ρόλος του πολυμορφισμού rs13006529 του γονιδίου Caspase 10 στην ΟΛΛ

Στην περίπτωση του rs13006529 SNP του γονιδίου Caspase 10, στην ομάδα των ασθενών τα ποσοστά εμφάνισης των γονοτύπων AA, AT και TT ήταν 28%, 54% και 18% αντίστοιχα, ενώ τα ποσοστά των αλληλομόρφων A και T ήταν 55% και 45%. Ομοίως, στην ομάδα ελέγχου οι γονότυποι AA, AT και TT εμφανίστηκαν κατά 72%, 12% και 16% αντίστοιχα και τα αλληλόμορφα A και T κατά 78% και 22%.

Από τη στατιστική ανάλυση αποκαλύφθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τη συχνότητα του αλληλόμορφου T, το οποίο έχει τον πολυμορφισμό, μεταξύ ασθενών και μαρτύρων ($p<0.0001$, OR = 0.345, CI 95% 0.205-0.578) (Πίνακας 2). Επιπλέον, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά και σε επίπεδο γονοτύπων, και πιο συγκεκριμένα στη συχνότητα των γονοτύπων TT και AT μεταξύ

ασθενών και μαρτύρων ($p = 0,048$, $OR = 0.346$, $CI\ 95\% 0.127-0.937$ και $p=0.011$, $OR=4$, $CI\ 95\% 1.382-11.380$, αντίστοιχα), δηλαδή στους γονοτύπους που περιέχουν το αλληλόμορφο με τον πολυμορφισμό.

| Genotypes | PATIENTS N=50 | CONTROLS N=100 | p-value | OR (95% CI) |
|------------------|--------------------------|---------------------------|----------------|---------------------|
| AA | 14 | 72 | | |
| AT | 27 | 12 | $p=0.011$ | 4 (1.382-11.380) |
| TT | 9 | 16 | $p=0.048$ | 0.346 (0.127-0.937) |
| Alleles | N=100 | N=200 | | |
| A | 55 | 156 | | |
| T | 45 | 44 | $p<0.0001$ | 0.345 (0.205-0.578) |

Πίνακας 2: Οι συχνότητες γονοτύπων και αλληλομόρφων του πολυμορφισμού rs13006529 του γονιδίου της κασπάσης 10 σε 50 ασθενείς με ΟΑΛ και 100 μάρτυρες

Συζήτηση

Η ΟΛΛ χαρακτηρίζεται από κλινική και βιολογική ετερογένεια, η οποία οφείλεται στις ποικίλες γενετικές αλλαγές.⁽¹⁶⁾ Ο ακριβής και ολοκληρωμένος προσδιορισμός των γενετικών διαταραχών στην ΟΛΛ είναι σημαντικός για τη διάγνωση, την ταξινόμηση σε ομάδες κινδύνου, την εφαρμογή στοχευμένης θεραπείας και την παρακολούθηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία.⁽¹⁰⁾ Η διερεύνηση των κληρονομούμενων γενετικών ποικιλομορφιών μπορούν να προσφέρουν την ευκαιρία να τροποποιηθούν τα θεραπευτικά σχήματα για να μειωθεί η τοξικότητα χωρίς να επηρεαστεί η αποτελεσματικότητα. Επιπλέον, έχει ταυτοποιηθεί η ισχυρή σύνδεση μεταξύ γενετικής ποικιλομορφίας και ευαισθησίας για ΟΛΛ και πολλοί από αυτούς τους πολυμορφισμούς είναι σε γονίδια στόχους που οδηγούν σε λευχαιμογένεση.⁽¹²⁾

Η απόπτωση είναι ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος και η κατανόηση της είναι σημαντική για πιθανές θεραπείες ασθενειών, καθώς αποτυχία στη ρύθμιση της μπορεί να οδηγήσει σε πολλές ασθένειες.^(17, 18) Παίζει πολύ σημαντικό ρόλο σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις (αναπτυξιακά προβλήματα, αυτοάνοσα νοσήματα, καρκίνος) και αποτελεί σημαντικό στόχο για τη θεραπεία του καρκίνου.^(17, 20) Αλλοιώσεις στους μηχανισμούς του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου παίζουν σημαντικό ρόλο στη παθογένεια και εξέλιξη των αιματολογικών νεοπλασιών.⁽¹⁵⁾ Πολυμορφισμοί στα γονίδια της απόπτωσης μπορεί να συμβάλουν στον αυξημένο κίνδυνο για την εμφάνιση της ασθένειας.⁽³³⁾ Η αποτελεσματικότητα της απόπτωσης σε έναν οργανισμό μπορεί να είναι συνέπεια πολυμορφισμών σε γονίδια που ρυθμίζουν ή εκτελούν την απόπτωση. Ανάλυση αυτών των πολυμορφισμών μπορεί να βοηθήσει στην αναγνώριση ασθενών με καρκίνο και κακή πρόγνωση και να δοθεί η ανάλογη θεραπεία.⁽²²⁾

Οι κασπάσες είναι μία συντηρημένη οικογένεια πρωτεασών κυστεΐνης, των οποίων οι λειτουργίες είναι έντονα συνδεδεμένες με τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο.^(21, 23) Η κασπάση 8 ρυθμίζει συγκεκριμένα στάδια της αιμοποίησης, ανεξάρτητα από τον πολύ σημαντικό της ρόλο στην έναρξη και ρύθμιση της εξωγενούς οδού της απόπτωσης.⁽²⁷⁾ Η κασπάση 10 είναι ομόλογο της κασπάσης 8 και ρυθμίζει αρνητικά τον κυτταρικό θάνατο που μεσολαβεί η κασπάση 8 μειώνοντας την ενεργοποίησή της.⁽²⁸⁾ Οι πολυμορφισμοί σε γονίδια κασπασών μπορεί να εμπλέκονται σε διάφορους τύπους καρκίνου και ενώ κάποιες μεταλλάξεις σε κασπάσες που μειώνουν της αποπτωτική ιδιότητα μπορεί να παίζουν προστατευτικό ρόλο στον όγκο, ίσως να έχουν πιο ισχυρή αντικαρκινική ανταπόκριση μειώνοντας την απόπτωση διηθημένα λεμφοκύτταρα του όγκου.⁽²²⁾

Η κασπάση 8 παίζει σημαντικό ρόλο στην απόπτωση και αρκετές μελέτες έχουν γίνει για να

ταυτοποιήσουν τη σχέση μεταξύ των πολυμορφισμών στο γονίδιο της κασπάσης 8 (CASP8) και διαφόρων τύπων καρκίνου, αλλά τα ευρήματα είναι ακόμα υπό συζήτηση. Μεταλλαγμένη κασπάση 8 έχει βρεθεί σε διάφορους τύπους καρκίνου και οι πολυμορφισμοί της εμπλέκονται στην παθογένεση του καρκίνου. Ο πολυμορφισμός rs1045485 στο εξόνιο 10 της κασπάσης 8 (270 G→C, Asp/His) δεν επηρεάζει την έκφραση του mRNA (η διαμόρφωση της αγρίου τύπου και της πρωτεΐνης που φέρει το μεταλλαγμένο αλληλομορφο είναι παρόμοια με αμελητέα απόκλιση στο σημείο του πολυμορφισμού), αλλά μπορεί να παίζει ρόλο στην ενεργοποίηση της προ-κασπάσης 8 ή στην αλληλεπίδραση της κασπάσης 8 με στοιχεία που σχηματίζουν το σύμπλοκο σηματοδότησης θανάτου.

Η γενετική ποικιλομορφία της κασπάσης 8 φαίνεται να συνδέεται με τον κίνδυνο για ποικίλα είδη καρκίνου, ^(45, 50) πράγμα το οποίο ενισχύει τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, όπου το αλληλόμορφο με το πολυμορφισμό έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους ασθενείς και την ομάδα ελέγχου, με το αλληλόμορφο να εμφανίζεται πιο συχνά στους ασθενείς. Δεν είναι σαφής ο ρόλος του αλληλομόρφου, καθώς η στατιστική ανάλυση έδειξε μεν συσχέτιση με τη νόσο, αλλά απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση για να συμπεράνει κάποιος αν το αλληλόμορφο δρα προστατευτικά ή αυξάνει τον κίνδυνο για ΟΛΛ. Ο πολυμορφισμός rs1045485 έχει συνδεθεί ισχυρά με μειωμένο κίνδυνο για καρκινογένεση στους Καυκάσιους, αλλά και ειδικότερα στον καρκίνο του μαστού. ^(24, 29, 33, 41, 42, 43, 44) Η σχέση του πολυμορφισμού rs1045485 της κασπάσης 8 με τον καρκίνο του μαστού δεν αφορά τους πληθυσμούς όλου του πλανήτη, αλλά κυρίως κάποιες Ευρωπαϊκές χώρες (Καυκάσιους πληθυσμούς), όπου φαίνεται να μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Ενώ, στην Αυστραλία, Φινλανδία, Ισπανία, Σουηδία και ΗΠΑ δεν υπήρξε συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού και της νόσου. ⁽⁴⁵⁾ Στους Κινέζους και στους Αφροαμερικάνους δεν βρέθηκε ο πολυμορφισμός. Συνολικά αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι μάλλον η ύπαρξη του πολυμορφισμού σχετίζεται με περιβαλλοντικούς παράγοντες. Έχει συσχετιστεί με χειρότερη συνολική επιβίωση σε ασθενείς με νευροβλάστωμα με ενίσχυση του MYCN, με τον καρκίνο του οισοφάγου σε πληθυσμούς μικτής καταγωγής στη Νότια Αφρική, με μειωμένο κίνδυνο σε καρκίνους που συνδέονται με τα οιστρογόνα και αυξημένο κίνδυνο για όγκο στον εγκέφαλο. ^(42, 46) Τα αποτελέσματα δεν δείχνουν συσχέτιση σε μαύρους πληθυσμούς της Νότιας Αφρικής οπότε και πάλι φαίνεται ότι μάλλον επηρεάζουν και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες. ⁽⁴⁶⁾ Επιπλέον, το πολυμορφικό αλληλόμορφο έχει συνδεθεί με μειωμένο κίνδυνο για επιθετικό καρκίνο του προστάτη σε Αμερικάνικο πληθυσμό, αλλά όχι με λιγότερο επιθετικές μορφές της νόσου, ίσως επειδή η κασπάση 8 αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα ανδρογόνων και αναστέλλει την έκφραση γονιδίων που εξαρτώνται από τους υποδοχείς ανδρογόνων. Η επιρροή του πολυμορφισμού στον καρκίνο του μαστού και του προστάτη ενισχύει την υπόθεση ότι η κασπάση 8 μπορεί να επηρεάσει τον κίνδυνο λόγω της αλληλεπίδρασής της με τις ορμονικές οδούς. ⁽⁴⁷⁾ Ο

rs1045485 δεν φαίνεται να επηρεάζει τον κίνδυνο για καρκίνο του παχέος εντέρου σε πληθυσμό του Ηνωμένου Βασιλείου, αλλά μειώνει τον κίνδυνο για δερματικό μελάνωμα σε μη Ισπανικό λευκό πληθυσμό και για Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία σε πληθυσμούς της Ισπανίας. ^(48, 49, 50)

Η κασπάση 10 μπορεί να λειτουργεί ανεξάρτητα από την κασπάση 8, αλλά δεν είναι ικανή να αντικαταστήσει πλήρως την κασπάση 8.⁽²²⁾ Η κασπάση 10 είναι η μοναδική κασπάση που μοιράζεται ομόλογες αλληλουχίες ενισχυτή θανάτου με την κασπάση 8, άρα μάλλον αλληλεπιδρά επίσης με υποδοχείς θανάτου. Σωματικές μεταλλαγές στην κασπάση 10 έχουν παρατηρηθεί σε πολλούς καρκίνους. Ο πολυμορφισμός rs13006529 στο εξόνιο 10 της κασπάσης 10 (522 A → T, Ile/Leu) ίσως αυξάνει τον κίνδυνο για καρκίνο, και ειδικά για καρκίνο του μαστού, αλλά δεν φαίνεται να συνδέεται με τον κίνδυνο για δερματικό μελάνωμα σε μη Ισπανικούς λευκούς πληθυσμούς ^(33, 34, 49, 51) Η βιβλιογραφία αναφέρεται σε πιθανή σύνδεση του πολυμορφισμού με τον καρκίνο και φαίνεται να επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας, όπου το αλληλόμορφο με το πολυμορφισμό έδειξε ισχυρή σύνδεση με την ΟΛΛ και το αλληλόμορφο να εμφανίζεται πιο συχνά στους ασθενείς. Επιπλέον, οι γονότυποι που έχουν το πολυμορφικό αλληλόμορφο εμφάνισαν συσχέτιση με τη νόσο και είναι πιο συχνόι στους ασθενείς. Όμως, δεν είναι σαφής ο ρόλος του αλληλομόρφου, καθώς η στατιστική ανάλυση έδειξε μεν συσχέτιση με τη νόσο, αλλά απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση για να συμπεράνει κάποιος αν το αλληλόμορφο δρα προστατευτικά ή αυξάνει τον κίνδυνο για ΟΛΛ. Ο μηχανισμός δράσης του imatinib (ειδικός αναστολέας τυροσίνης, που αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη και προκαλεί απόπτωση στην Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία) περιλαμβάνει απόπτωση με μεσολάβηση του FAS, συνεπώς αλλαγές στην απόπτωση μπορεί να προκαλέσουν αλλαγές στην απόκριση ή ανθεκτικότητα στο imatinib. Ο πολυμορφισμός rs13006529 έχει αναλυθεί σε σχέση με τα αποτελέσματα της θεραπείας με imatinib σε Κορεάτικους πληθυσμούς και φαίνεται να μειώνει τον κίνδυνο για αποτυχία της θεραπείας. Επίσης, ασθενείς με τον πολυμορφισμό έχουν μεγαλύτερη συνολική επιβίωση. ⁽⁵¹⁾

Συμπεράσματα

Η παρούσα μελέτη, που πραγματοποιήθηκε σε 50 παιδιά και εφήβους με ΟΛΛ, έδειξε ότι ο πολυμορφισμός rs1045485 της κασπάσης 8 και ο πολυμορφισμός rs13006529 της κασπάσης 10 συσχετίζονται με τη νόσο σε επίπεδο γονοτύπων ή/και αλληλομόρφων. Αποτελεί την πρώτη έρευνα στην Ελλάδα που εξέτασε τους παραπάνω πολυμορφισμούς στην ΟΛΛ παιδιών και εφήβων. Επιπλέον, οι πολυμορφισμοί αυτοί δεν έχουν μελετηθεί σε ασθένειες παιδιών και εφήβων, το οποίο θα είχε ενδιαφέρον να μελετηθεί, ώστε να φανεί η πιθανή επίδραση του πολυμορφισμού και σε άλλες ασθένειες της παιδικής ηλικίας. Τα ευρήματα της έρευνας αυτής έχουν μεγάλο ενδιαφέρον, αλλά χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών. Παρόλο που το βιολογικό υλικό προς μελέτη είναι σχετικά περιορισμένο στα παιδιά, οι προσπάθειες για περαιτέρω μελέτη αυτών των πολυμορφισμών στην ΟΛΛ παιδιών και εφήβων θα είχε μεγάλο ενδιαφέρον, ώστε να φανεί αν η ύπαρξή τους σχετίζεται με τον αυξημένο κίνδυνο για νόσο ή αν δρουν προστατευτικά στον πληθυσμό της Ελλάδας.

Χρηματοδότηση

Οι πόροι για τη διεξαγωγή της έρευνας προέκυψαν από τη χρηματοδότηση που έχει λάβει το ΠΜΣ “Αιματολογίας – Ογκολογίας Παιδιών και Εφήβων”.

Βιβλιογραφία

1. Belson M, Kingsley B and Holmes A: Risk factors for acute leukemia in children: a review. *Environ Health Perspect.* 2007; 115: 138-145. DOI: 10.1289/ehp.9023
2. Dai Qingkai, Zhang Ge, Yang Hui, Wang Yuefang, Ye Lei, Peng Luyun et al. Clinical features and outcome of pediatric acute lymphoblastic leukemia with low peripheral blood blast cell count at diagnosis. *Medicine.* 2021; 100 (4). DOI: 10.1097/MD.00000000000024518.
3. Shafat Manar S, Gnaneswaran Bruno, Bowles Kristian M, Rushworth Stuart A. The bone marrow microenvironment - Home of the leukemic blasts. *Blood reviews.* 2017; 31 (5): 277–286. DOI: 10.1016/j.blre.2017.03.004.
4. Pui CH: Precision medicine in acute lymphoblastic leukemia. *Frontiers of Medicine.* 2020; 14: 689-700. DOI: 10.1007/s11684-020-0759-8
5. <https://emedicine.medscape.com/article/207631-overview>
6. Philip A. Pizzo, David G. Poplack. *Principles and Practice of Pediatric Oncology* (2015) Chapter 7
7. Nathan David G, Oski Frank A, Orkin Stuart H. *Nathan and Oski's hematology and oncology of infancy and childhood* (2015) Chapter 50
8. Nathan David G, Oski Frank A, Orkin Stuart H. *Nathan and Oski's hematology and oncology of infancy and childhood* (2015) Chapter 40
9. Vairy Stephanie, Tran Thai Hoa. IKZF1 alterations in acute lymphoblastic leukemia: The good, the bad and the ugly. *Blood reviews.* 2020; 44: 100677. DOI: 10.1016/j.blre.2020.100677.
10. Iacobucci Iaria, Mullighan Charles G. Genetic Basis of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of clinical oncology.* 2017; 35 (9): 975–983. DOI: 10.1200/JCO.2016.70.7836.
11. Malard Florent, Mohty Mohamad. Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet.* 2020; 395 (10230): 1146–1162. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)33018-1.
12. Bhojwani Deepa, Yang Jun J, Pui Ching-Hon. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric clinics of North America.* 2015; 62 (1): 47–60. DOI: 10.1016/j.pcl.2014.09.004.
13. Philip A. Pizzo, David G. Poplack. *Principles and Practice of Pediatric Oncology* (2015) Chapter 19
14. Hunger Stephen P, Mullighan Charles G. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *The New England journal of medicine.* 2015; 373 (16): 1541–1552. DOI: 10.1056/NEJMra1400972.

15. Carroll William L, Bhojwani Deepa, Min Dong-Joon, Raetz Elizabeth, Relling Mary, Davies Stella et al. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. American Society of Hematology. Education Program 2003: 102–131. DOI: 10.1182/asheducation-2003.1.102.
16. Stanulla Martin, Cavé H el ene, Moorman Anthony V. IKZF1 deletions in pediatric acute lymphoblastic leukemia: still a poor prognostic marker? *Blood*. 2020; 135 (4): 252–260. DOI: 10.1182/blood.2019000813.
17. Xu Xuebo, Lai Yueyang, Hua Zi-Chun. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience reports*. 2019; 39 (1). DOI: 10.1042/BSR20180992.
18. D'Arcy Mark S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell biology international*. 2019; 43 (6): 582–592. DOI: 10.1002/cbin.11137.
19. Valentin Rebecca, Grabow Stephanie, Davids Matthew S. The rise of apoptosis: targeting apoptosis in hematologic malignancies. *Blood*. 2018; 132 (12): 1248–1264. DOI: 10.1182/blood-2018-02-791350.
20. Yuan Na, Song Lin, Zhang Suping, Lin Weiwei, Cao Yan, Xu Fei et al. Bafilomycin A1 targets both autophagy and apoptosis pathways in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2015; 100 (3): 345–356. DOI: 10.3324/haematol.2014.113324.
21. Van Opdenbosch Nina;, Lamkanfi Mohamed. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease. *Immunity*. 2019; 50 (6): 1352–1364. DOI: 10.1016/j.immuni.2019.05.020.
22. Olsson M, Zhivotovsky B. Caspases and cancer. *Cell death and differentiation*. 2011; 18 (9): 1441–1449. DOI: 10.1038/cdd.2011.30.
23. Julien Olivier, Wells James A. Caspases and their substrates. *Cell death and differentiation*. 2017; 24 (8): 1380–1389. DOI: 10.1038/cdd.2017.44.
24. Zhang Y. J, Zhong X. P, Chen Y, Liu S. R, Wu G, Liu Y. F. Association between CASP-8 gene polymorphisms and cancer risk in some Asian population based on a HuGE review and meta-analysis. *Genetics and molecular research*. 2013; 12 (4): 6466–6476. DOI: 10.4238/2013.February.28.3.
25. Tabebi Mouna, Khabou Bodour, Boukadi Hanen, Ben Hamad Mariam, Ben Rhouma Bochra, Tounsi Slim et al. Association study of apoptosis gene polymorphisms in mitochondrial diabetes: A potential role in the pathogenicity of MD. *Gene* 2018; 639: 18–26. DOI: 10.1016/j.gene.2017.09.063.
26. Mandal Ranadip, Barr on Joan Compte, Kostova Izabela, Becker Sven, Strebhardt Klaus. Caspase-8: The double-edged sword. *Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer*. 2020; 1873 (2): 188357. DOI: 10.1016/j.bbcan.2020.188357.

27. Tummers Bart, Green Douglas R. Caspase-8: regulating life and death. *Immunological reviews* 2017; 277 (1): 76–89. DOI: 10.1111/imr.12541.
28. Horn Sebastian, Hughes Michelle A, Schilling Ramon, Sticht Carsten, Tenev Tencho, Ploesser Michaela et al. Caspase-10 Negatively Regulates Caspase-8-Mediated Cell Death, Switching the Response to CD95L in Favor of NF-κB Activation and Cell Survival. *Cell reports*. 2017; 19 (4): 785–797. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.04.010.
29. Hashemi Mohammad, Aftabi Sajjad, Moazeni-Roodi Abdolkarim, Sarani Hosna, Wiechec Emilia, Ghavami Saeid. Association of CASP8 polymorphisms and cancer susceptibility: A meta-analysis. *European journal of pharmacology*. 2020; 881: 173201. DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.173201.
30. Lewin Benjamin. Απόδοση στα ελληνικά: Αποστολίδης Απ, Αρσενάκης Μ, Γεωργάτος Σπ, et al. *Genes VIII*, Τόμος 1, Κεφάλαιο 3
31. Brodeur Garrett M. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nature reviews Cancer*. 2003; 3 (3): 203–216. DOI: 10.1038/nrc1014.
32. Peter J. Russell, «Εφαρμογές της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA», Βιβλίο «iGenetics : Μια μεντελική προσέγγιση», Έτος Έκδοσης: 2009, Κεφάλαιο 17
33. Azevedo Ana P, Silva Susana N, Reichert Alice, Lima Fernando, Júnior Esmeraldina, Rueff José. The Role of Caspase Genes Polymorphisms in Genetic Susceptibility to Philadelphia-Negative Myeloproliferative Neoplasms in a Portuguese Population. *Pathology oncology research*. 2019; 25 (3): 961–969. DOI: 10.1007/s12253-018-0411-y.
34. Yan S, Li Y. Z, Zhu J. W, Liu C. L, Wang P, Liu Y. L. Role of CASP-10 gene polymorphisms in cancer susceptibility: a HuGE review and meta-analysis. *Genetics and molecular research*. 2012; 11 (4): 3998–4007. DOI: 10.4238/2012.November.26.1.
35. Berg M. Jeremy, Tymoczko L. John, Stryer Lubert. Απόδοση στα ελληνικά: Αλετράς Αλέξης, Βαλκανά Θεώνη, Δραΐνας Διονύσιος, et al. *Βιοχημεία*, Τόμος 1, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Κεφάλαιο 6
36. Green Michael R, Sambrook Joseph. Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor protocols*. 2019 (6). DOI: 10.1101/pdb.top095109.
37. Peter J. Russell, «Η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA». Βιβλίο «iGenetics : Μια μεντελική προσέγγιση», Έτος Έκδοσης: 2009. Κεφάλαιο 16
38. Di Felice Francesca, Micheli Gioacchino, Camilloni Giorgio. Restriction enzymes and their use in molecular biology: An overview. *J Biosci*. 2019; 44 (2). DOI: 10.1007/s12038-019-9856-8.
39. Lee Pei Yun, Costumbrado John, Hsu Chih-Yuan, Kim Yong Hoon. Agarose gel electrophoresis

for the separation of DNA fragments. *Journal of visualized experiments*. 2012; (62). DOI: 10.3791/3923.

40. James D. Watson, Jan A. Witkowski, Richard M. Myers, Amy A. Caudy, «Βασικά εργαλεία της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA». Βιβλίο «ΑΝΑΣΥΝΔΙΑΣΜΕΝΟ DNA: ΓΟΝΙΔΙΑ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΑ – ΜΙΑ ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ», Έτος Έκδοσης: 2007. Κεφάλαιο 4
41. Vahednia Elham, Shandiz Fatemeh Homaei, Bagherabad Matineh Barati, Moezzi Atefeh, Afzaljavan Fahimeh, Tajbakhsh Amir et al. The Impact of CASP8 rs10931936 and rs1045485 Polymorphisms as well as the Haplotypes on Breast Cancer Risk: A Case-Control Study. *Clinical breast cancer*. 2019; 19(5): 563-577. DOI: 10.1016/j.clbc.2019.02.011.
42. Rihani Ali, Wilde Bram de, Zeka Fjoralba, Laureys Geneviève, Francotte Nadine, Tonini Gian Paolo et al. CASP8 SNP D302H (rs1045485) is associated with worse survival in MYCN-amplified neuroblastoma patients. *PloS one*. 2014; 9 (12). DOI: 10.1371/journal.pone.0114696.
43. Yang Yaohua, Shu Xiang, Shu Xiao-Ou, Bolla Manjeet K, Kweon Sun-Seog, Cai Qiuyin et al. Re-evaluating genetic variants identified in candidate gene studies of breast cancer risk using data from nearly 280,000 women of Asian and European ancestry. *EbioMedicine*. 2019; 48: 203–211. DOI: 10.1016/j.ebiom.2019.09.006.
44. Srivastava Kshitij, Srivastava Anvesha, Mittal Balraj. Caspase-8 polymorphisms and risk of gallbladder cancer in a northern Indian population. *Molecular carcinogenesis*. 2010; 49 (7): 684–692. DOI: 10.1002/mc.20641.
45. Zhang Yinliang, Li Wei, Hong, Yi Wu Guoying, He Kan, Liu Dahai. A systematic analysis of the association studies between CASP8 D302H polymorphisms and breast cancer risk. *Journal of genetics*. 2014; 96 (2): 283–289. DOI: 10.1007/s12041-017-0774-y.
46. Bye Hannah, Prescott Natalie J, Matejic Marco, Rose Elizabeth, Lewis Cathryn M, Parker M. Iqbal, Mathew Christopher G. Population-specific genetic associations with oesophageal squamous cell carcinoma in South Africa. *Carcinogenesis*. 2011; 32 (12): 1855–1861. DOI: 10.1093/carcin/bgr211.
47. Lubahn Jessica, Berndt Sonja I, Jin Carol H, Klim Aleksandra, Luly Jason, Wu William S. et al. Association of CASP8 D302H polymorphism with reduced risk of aggressive prostate carcinoma. *The Prostate*. 2010; 70 (6): 646–653. DOI: 10.1002/pros.21098.

48. Pittman A. M, Broderick P, Sullivan K, Fielding S, Webb E, Penegar S. et al. CASP8 variants D302H and -652 6N ins/del do not influence the risk of colorectal cancer in the United Kingdom population. *British journal of cancer*. 2008; 98 (8): 1434–1436. DOI: 10.1038/sj.bjc.6604314.
49. Li Chunying, Zhao Hui, Hu Zhibin, Liu Zhensheng, Wang Li-E, Gershenwald Jeffrey E. et al. Genetic variants and haplotypes of the caspase-8 and caspase-10 genes contribute to susceptibility to cutaneous melanoma. *Human mutation*. 2008; 29 (12): 1443–1451. DOI: 10.1002/humu.20803.
50. Enjuanes Anna, Benavente Yolanda, Bosch Francesc, Martín-Guerrero Idoia, Colomer Dolors, Pérez-Alvarez Susana et al. Genetic variants in apoptosis and immunoregulation-related genes are associated with risk of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer research*. 2008; 68 (24): 10178–10186. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2221.
51. Zheng Qiaoli, Cao Jiang, Hamad Nada, Kim Hyeoung-Joon, Moon Joon Ho, Sohn Sang Kyun et al. Single nucleotide polymorphisms in apoptosis pathway are associated with response to imatinib therapy in chronic myeloid leukemia. *Journal of translational medicine*. 2016; 14: 82. DOI: 10.1186/s12967-016-0837-5.