

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ- ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθύντρια: Καθηγήτρια Μαρία Παπαχατζή-Καλμαντή

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθυντής : Καθηγητής Δημήτριος Α. Σπαντίδος

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΟΥ
ΡΕΤΙΝΟΒΛΑΣΤΩΜΑΤΟΣ Rb-1 ΚΑΙ ΤΟΥ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ
ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ Kip1/p27 ΣΕ ΚΑΚΟΗΘΕΙΕΣ
ΤΗΣ ΠΑΙΔΙΚΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μαρκάκη Ερασμία-Αθηνά

Παιδίατρος

**Επιβλέπουσα: Μαρία Παπαχατζή-Καλμαντή
Καθηγήτρια Παιδιατρικής**

Ηράκλειο 2003

Στους γονείς μου
Στις κόρες και στον σύζυγό μου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περιεχόμενα	I-IV
Βιογραφικό σημείωμα	V-XIV
Ευχαριστίες	XV-XVI
Συντομογραφίες	XVII
Εισαγωγικά	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο	
ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	
1.1 Ενδείξεις για τη συμμετοχή γενετικών παραγόντων στον καρκίνο	3
1.2 Η καρκινική εξαλλαγή των κυττάρων σαν αποτέλεσμα γενετικών αλλοιώσεων	4
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο	
ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	
2.1 Ο καρκίνος είναι υπερμεταλλακτικός φαινότυπος	6
2.2 Η μοριακή συνέπεια της μεταλλαγής	7
2.3 Η πολυσταδιακή διαδικασία της καρκινικής εξαλλαγής	8

2.4	Γονίδια που εμπλέκονται στην καρκινογένεση.	9
2.4.1	Ογκογονίδια	11
2.4.2	Μηχανισμοί δράσης ογκογονιδίων	13
2.4.3	Μέθοδοι ταυτοποίησης ογκογονιδίων	14
2.4.5	Μηχανισμοί ενεργοποίησης πρωτοογκογονιδίων	16
2.4.6	Λειτουργική κατάταξη πρωτοογκογονιδίων	16
2.5	Ογκοκατασταλτικά γονίδια	20
2.5.1	Πειραματικά δεδομένα για την ύπαρξη ογκοκατασταλτικών γονιδίων	20
2.5.2	Καταστολή της κακοήθειας με κυτταρική σύντηξη	21
2.5.3	Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια στους οικογενείς καρκίνους : το μοντέλο του ρετινοβλαστώματος.	22
2.5.4	Διερεύνηση και ταυτοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων.	24
2.5.5	Μηχανισμός απώλειας της ετεροζυγωτίας	26
2.5.6	Μηχανισμοί αδρανοποίησης ογκοκατασταλτικών γονιδίων	28
2.5.7	Λειτουργία των ογκοκατασταλτικών γονιδίων	29
2.5.8	Χαρακτηρισμός υποψήφιων ογκοκατασταλτικών γονιδίων	31
2.5.9	Πρότυπα όγκων στους οποίους μόνο η απώλεια της ετεροζυγωτίας δεν επαρκεί για την ανάπτυξη τους	34

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΓΟΝΙΔΙΑ Rb-1 ΚΑΙ Kip1/p27

3.1	Κυτταρικός κύκλος	35
3.2.1	Κυκλίνες-κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες CDK (Cyclin-Dependent Kinase)	37
3.2.2	Λειτουργικός ρόλος των D /CDK	39
3.3	Το γονίδιο ευαισθησίας του ρετινοβλαστώματος Rb-1	42

3.4	Αναστολείς των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών	46
3.5.1	Ο αναστολέας του κυτταρικού κύκλου p27/Kip1	49
3.5.2	Ο p27 είναι σημαντικός αρνητικός ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου	51
3.5.3	Πειραματικά δεδομένα για το ρόλο του Kip1/p27	52
3.6	Συνεργική δράση των γονιδίων	54
	ΣΚΟΠΟΣ	58
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο	
	ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	60
	ΥΛΙΚΟ	60
	ΜΕΘΟΔΟΣ	
4.2	Τεχνική εκχύλισης DNA	73
4.3	Τεχνική καθαρισμού του εκχυλισμένου DNA (IsoQuick)	74
4.4	Η αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση	75
4.4.1	Τα βασικά συστατικά της αντίδρασης PCR που εφαρμόστηκε	78
4.4.2	Υπόστρωμα DNA	78
4.4.3	Θερμοάντοχη DNA πολυμεράση	78
4.4.4	Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs)	79
4.4.5	Εκκινητές (primers)	82
4.4.6	Αλληλουχία εξονίων Rb-1, 20-24 και primers	82
4.4.7	Αλληλουχία γονιδίου Kip1/p27	84
4.4.8	Ρυθμιστικά διαλύματα	85
4.4.9	Φραγμός εξάτμισης	85
4.4.10	Συνθήκες αντιδράσεων PCR	86
4.4.11	Προβλήματα της μεθόδου	88
4.5	Ηλεκτροφόρηση ενισχυμένων με PCR αλληλουχιών DNA	89

4.5.1	Ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων σε γέλη αγαρόζης	90
4.5.2	Ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων σε γέλη πολυακρυλαμιδίου	91
4.6	Χρώση γέλης πολυακρυλαμιδίου με νιτρικό άργυρο.	92
4.7	Ταυτοποίηση μεταλλαγμένων δειγμάτων: Ανάλυση Πολυμορφισμού Μονόκλωνης Αλυσίδας και Ανάλυση Ετεροδιμερών	93
4.8	Υλικά και εταιρείες προέλευσης	98
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο		
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ		
5.1	Συχνότητα μεταλλαγών	100
5.2	Συσχέτιση των μεταλλαγών με τη σταδιοποίηση της νόσου	102
5.3	Συσχέτιση μεταλλαγών Rb-1 με γνωστούς προγνωστικούς παράγοντες	105
5.4	Συσχέτιση μεταλλαγών με πορεία – έκβαση νόσου	107
5.5	Συνύπαρξη μεταλλαγών Kip 1 και Rb-1	110
5.6	Συνολικός πίνακας μεταλλαγών	111
5.7	Αντιπροσωπευτική φωτογραφία ανάλυσης προϊόντων PCR	113
5.8	Αντιπροσωπευτική φωτογραφία SSCP-HETERODOUBLEX	119
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο		
ΣΥΖΗΤΗΣΗ –ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ		120
ΠΕΡΙΛΗΨΗ		134
SYMMARY		136
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ		138

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Επώνυμο: Μαρκάκη Ερασμία –Αθηνά του Μιχαήλ
Ειδικότητα: Παιδίατρος
Διεύθυνση κατοικίας : Στεργιογιάννη 45
Ηράκλειο Κρήτης,
τηλ 2810263580
Τόπος γέννησης : Αθήνα
Οικογενειακή κατάσταση : Έγγαμος, μητέρα δυο κοριτσιών
Απασχόληση σήμερα: Επιμελήτρια Β΄ Παιδιατρικής Κλινικής
Αιματολογίας-Ογκολογίας, ΠαΓΝΗ
Ημερομηνία άδειας άσκησης επαγγέλματος : 15-5-1990
Ημερομηνία λήψης τίτλου ειδικότητας: 5-2-1997

ΣΠΟΥΔΕΣ-ΠΡΟΫΠΗΡΕΣΙΑ ΑΠΟ ΤΗ ΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΤΥΧΙΟΥ

- Εισαγωγή στη Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών -1983 Πανελλήνιες Εισαγωγικές εξετάσεις, ημερομηνία λήψης πτυχίου: 9-5-1990, λίαν καλώς 7.81.
- Υπηρεσία υπαίθρου: αγροτικός ιατρός στο Π.Ι. Μελιδονίου, Επαρχίας Μυλοποτάμου, Ρέθυμνο Κρήτης από 21-6-1990 μέχρι 16-10-1991
- Ειδικευόμενη Παιδιατρικής Κλινικής του Γενικού Περιφερειακού Νοσοκομείου Ηρακλείου "Βενιζέλειο -Πανάειο" από 17-10-1991 ως 4-10-1994
- Ειδικευόμενη Παιδιατρικής Κλινικής του Γενικού Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου ΠΕΠΑΓΝΗ από 19-10-1994 ως 19-9-1996
- Επιστημονικός συνεργάτης της Παιδιατρικής Κλινικής Αιματολογίας-Ογκολογίας ΠΕΠΑΓΝΗ από 1-3-1997 ως 25-9-1999
- Παιδίατρος, Επιμελήτρια Α΄ στο Κέντρο Υγείας Ανωγείων / Ρεθύμνου από 25-9-1997 ως 20-9-1999

- Παιδίατρος, Επιμελήτρια Β΄ στη Παιδιατρική Κλινική Αιματολογίας-Ογκολογίας, ΠαΓΝΗ από 20-9-1999 ως σήμερα.

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΜΕ ΔΙΑΛΕΞΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- 1. Διάλεξη με θέμα :** “Κλινική εικόνα ιστοκυττάρωσης από κύτταρα **Langerhans** ” 7ο Μετεκπαιδευτικό Συνέδριο Κλινική Ογκολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης, Ηράκλειο 1999
- 2. Διάλεξη με θέμα :** “Ιστοκυττάρωση από κύτταρα **Langerhans** ” 10^ο Παγκρήτιο Πανεπιστημιακό Παιδιατρικό Συμπόσιο, Ηράκλειο 2000
- 3. Διάλεξη με θέμα :** “Η επίδραση της μη ionίζουσας ακτινοβολίας στην υγεία των παιδιών” 11^ο Παγκρήτιο Πανεπιστημιακό Παιδιατρικό Συμπόσιο, Ηράκλειο 2000
- 4. Διάλεξη με θέμα:** “Ιογενείς λοιμώξεις σε ανοσοκαταστολή ” 9ο Μετεκπαιδευτικό Συνέδριο Κλινική Ογκολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης, Ηράκλειο 2001
- 5. Διάλεξη με θέμα:** “Τραχηλική λεμφαδενοπάθεια – νεότερα δεδομένα ” 12^ο Παγκρήτιο Πανεπιστημιακό Παιδιατρικό Συμπόσιο, Ηράκλειο 2002

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- 1.Έλλειψη βιοτινιδάσης, δυο περιπτώσεις με διαφορετική κλινική συμπτωματολογία.**
Καρασταμάτης Σ, Μαρκάκη Ε-Α, Μηχαηλίδου Ε, Κατσαράκης Ι, Βλαχάκη Γ, Ξυπάκη Μ, Sewell C, Γιανακοπούλου Χ, Ευαγγελίου Α, Μιχελογιάννης Ι, Μαρτιμιανάκης Κ, Σμπυράκης Σ. **399AA: 32^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο 1994**
- 2. Δυσγερμίνωμα ωοθηκών (περιγραφή περίπτωσης)**
Καμπουράκης Α, Μαρκάκη Ε-Α, Στειακάκη Ε, Χαρίσης Γ, Στεφανάκη Κ, Μπολωνάκη Ε, Μαμαλάκη Ε, Λυδάκη Ε, Καλμαντή α) **411AA : 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μαιευτικής- Γυναικολογίας 1997** β) **16 AA: 35^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο 1997**

3. Επίπεδα διαλυτού υποδοχέα τρανσφερίνης (sTFR) σε παιδιά με αναιμία

Δημητρίου Ε, Στειακάκη Ε, Μαρκάκη Ε-Α, Δαηλάτου Β, Μπολωνάκη Ε, Στεφανάκη Σ, Γιανακοπούλου Χ, Ματσούκα Χ, Καλμαντή α) **94 ΕΑ** :9^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο 1998 β) **203 ΕΑ**: 9^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο 1998 γ) **48 ΑΑ**: 37^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο 1999

4. Μεταλλάξεις στα εξόνια 20,21,22 του γονιδίου Rb-1 σε παιδιά με οξεία λευχαιμία και νευροβλάστωμα. Μαρκάκη Ε-Α, Τσοπανομίχαλου Μ, Δημητρίου Ε, Σπαντίδος Δ, Καλμαντή Μ

α) 35 ΕΑ: 8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας 1999 Επιλεγμένες εργασίες για βράβευση β) **106 ΕΑ** :37^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο 1999

5. Μελέτη του επιπολασμού της ηπατίτιδας Α στη περιοχή ευθύνης του Κ.Υ. Ανωγείων Μαρκάκη Ε-Α, Εργαζάκη Μ, Οικονόμου Ε, Μαρκογιανάκης Χ, Σπαντίδος Δ, Καλμαντή Μ **153 ΑΑ: 9^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο 1998**

6. Οροεπιδημιολογική μελέτη της ηπατίτιδας C στον παιδικό πληθυσμό του Μυλοποτάμου Μαρκάκη Ε-Α, Εργαζάκη Μ, Τσοπανομίχαλου Μ, Στειακάκη Ε, Οικονόμου Ε, Σπαντίδος Δ, Καλμαντή Μ **94 ΑΑ : 9^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο 1998**

7. Δείκτης διαμόλυνσης με HAV σε ορεινή περιοχή της Κρήτης Μαρκάκη Ε-Α, Σπαντίδος Δ, Τσοπανομίχαλου Μ, Οικονόμου Ε, Μαλλιαράκης Ν, Δερμιτζάκη Α, Καλμαντή Μ **149 ΑΑ: 37^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο 1999**

8. Ο επιπολασμός της ηπατίτιδας C στη περιοχή ευθύνης του Κ.Υ. Ανωγείων Μαρκάκη Ε-Α, Σπαντίδος Δ, Τσοπανομίχαλου Μ, Οικονόμου Ε, Σταματάκη Μ, Κριτσωτάκη - Σαριδάκη Κ, Καλμαντή Μ **141 ΑΑ:37^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο 1999**

9. Ιογενές αιμοφαγοκυτταρικό σύνδρομο σχετιζόμενο με ιό Epstein –Barr. Μανιαδάκη Η, Στειακάκη Ε, Μπικουβαράκης Σ, Καμπουράκης Α, Μαρκάκη Ε-Α, Σαιτάκης Ε, Καλμαντή Μ α) **146 ΕΑ : 38^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο 2000 β) **434 ΕΑ** :10^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο 2000**

10. Οστική πυκνότητα σε παιδιά με οξεία λευχαιμία.

Μανιαδάκη Η, Στειακάκη Ε, Μαρκάκη Ε-Α, Μελεσσανάκη Μ, Γιανούση Ε, Καμπουράκης Α, Καλμαντή Μ α) **341 ΑΑ** :38^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο 2000 β) **429 ΕΑ** 10^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο 2000

- 11. Συσχέτιση χορήγησης ανασυνδυασμένου εμβολίου για την ηπατίτιδα Β και αιματολογικών επιπλοκών.** Μαρκάκη Ε-Α, Στειακάκη Ε, Καλμαντή Μ
α) **343 ΑΑ** 38^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο 2000 β) **427 ΕΑ** :10^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο 2000
- 12. Συγγενής δυσερυθροποιητική αναιμία τύπου ΙΙ (CDA ΙΙ)**
Μελεσσανάκη Μ, Στειακάκη Ε, Ρεπαπίνου Ζ, Πρεμέτης Α, Σταμουλακάτου Α, Μαρκάκη Ε-Α, Καλμαντή Μ α) **351 ΑΑ** :38^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο β) **425 ΕΑ** :10^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο 2000
- 13. Επίκτητοι αναστολείς του παράγοντα πήξης ΧΙ μετά από θεραπεία για ΟΛΛ**
Βοργιά Π, Στειακάκη Ε, Σφυριδάκη Α, Μαρκάκη Ε-Α, Γιανούση Ε, Καλμαντή Μ
α) **355 ΑΑ** :38^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο 2000 β) **433 ΕΑ**: 10^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο 2000
- 14. Κατάσταση εμβολιασμού του παιδικού πληθυσμού στην περιοχή ευθύνης του Κέντρου Υγείας Ανωγείων.** Μαρκάκη Ε-Α, Καλμαντή Μ α) **364ΕΑ** : 38^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο 2000 β) **426 ΕΑ** : 10^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο 2000
- 15. Εκδηλώσεις νευροβλαστώματος σε παιδιά <2 χρόνων.** Τσαπάκη Ε, Στειακάκη Ε, Καμπουράκης Α, Μαρκάκη Ε-Α, Παπαγεωργίου Μ, Παρασχάκης Ε, Καλμαντή Μ α) **428 ΑΑ** : 10^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο 2000 β) **83 ΑΑ** : 39^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο 2001
- 16. Ανίχνευση αντίστασης στην πρωτεΐνη C-APC resistance**
Κατζηλάκης Ν, Στειακάκη Ε, Σφυριδάκη Α, Τσαπάκη Ε, Μαρκάκη Ε-Α, Καμπουράκης Α, Καλμαντή Μ α) **431 ΕΑ**: 10^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο 2000 β) **61 : ΑΑ 83 ΑΑ** : 39^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο 2001
- 17. Ο ρόλος του αριθμού των CD34⁺ κυττάρων στο περιφερικό αίμα κατά τη συλλογή αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων περιφερικού αίματος (PBSC) σε παιδιά με νεοπλασία** Στειακάκη Ε, Λυδάκη Ε, Μαρτιμιανάκη Γ, Περδικογιάννη Χ, Δημητρίου Ε, Κατσανούλας Κ, Μαυρουδής Δ, Μαρκάκη Ε-Α, Καντιδάκη Ε, Καλμαντή Μ **20 ΕΑ** :39^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο 2001
- 18. Εκπαιδευτικό πρόγραμμα υποστήριξης παιδιών με κακοήθεια κατά τη διάρκεια της νοσηλείας τους** Φοβάκης Η, Καπελάκη Ο, Στειακάκη Ε,

Δημητρίου Ε, Περδικογιάννη Χ, Παπαδάκη Α, Μαρκάκη Ε-Α, Καλμαντή Μ 23
ΕΑ : 39^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο 2001

19. Όγκοι εγκεφάλου στον παιδικό πληθυσμό της Κρήτης.

Μάρακα Σ, Μαρκάκη Ε-Α, Μουρατίδου Ε, Καμπουράκης Α, Στειακάκη Ε,
Μανιαδάκη Η, Σεμερτζάκης Δ, Καλμαντή Μ 27 ΕΑ :39^ο Πανελλήνιο
Παιδιατρικό Συνέδριο 2001

**20. Προληπτική χορήγηση ουροκινάσης σε παιδιά με νεοπλασία και
κεντρικό φλεβικό καθετήρα** Γερμανάκης Ι, Χρηστίδου Α, Σφυριδάκη Α,
Τσέτης Δ, Στειακάκη Ε, Καμπουράκης Α, Μαρκάκη Ε-Α, Μανιαδάκη Η,
Παρθενάκης Φ, Βάρδας Π, Χαρίσης Γ, Καλμαντή Μ 58 ΑΑ: 39^ο Πανελλήνιο
Παιδιατρικό Συνέδριο 2001

**21. Θρομβοπενική πορφύρα στα παιδιά. Ανασκόπηση μιας δεκαετίας
(1990-2000)** Μουρατίδου Ε, Μαρκάκη Ε-Α, Στειακάκη Ε, Καμπουράκης Α,
Μανιαδάκη Η, Μάρακα Σ, Καλμαντή Μ 59 ΑΑ : 39^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό
Συνέδριο 2001

22. Σπάνια περίπτωση νόσου εξ'ονύχων γαλής

Τσαπάκη Ε, Μαρκάκη Ε-Α, Καμπουράκης Α, Στειακάκη Ε, Μουρατίδου Ε,
Καλμαντή Μ 90 RT :39^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο 2001

23. Αιματολογική δυσκρασία σε χορήγηση φαινοβαρβιτάλης

Σεμερτζάκης Δ, Παρασκάκης Ε, Στειακάκη Ε, Μαρκάκη Ε-Α, Καμπουράκης
Α, Καλμαντή Μ 91RT: 39^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο 2001

**24. G-CSF μόρια προσκόλλησης και επαναπολλαπλασιαστική ικανότητα
των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων στην παθογένεια της χρόνιας
καλοήθους ουδετεροπενίας των παιδιών** Περδικογιάννη Χ, Δημητρίου Ε,
Στειακάκη Ε, Μαρκάκη Ε-Α, Καλμαντή Μ 48 ΕΑ: 40^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό
Συνέδριο 2002, ΕΑ: 11^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο 2002

**25. Χαρακτηρισμός και έκπτυξη AC133⁺ κυττάρων αίματος ομφαλίου
λώρου**

Δημητρίου Ε, Βοριά Π, Περδικογιάννη Χ, Στειακάκη Ε, Μαρκάκη Ε-Α,
Κουμαντάκης Ε, Παππά Κ, Καλμαντή Μ 51 ΕΑ: 40^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό
Συνέδριο 2002, 41 ΕΑ: 13^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο 2002, ΕΑ: 11^ο
Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο 2002

- 26. Μικροβιαιμία σε παιδιά με αιματολογικές κακοήθειες και συμπαγείς όγκους.** Δανηλάτου Β, Γαλανάκης Ε, Χρηστίδου Α, Μαρκάκη Ε-Α, Στειακάκη Ε, Καλμαντή Μ **81AA** : 13^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο 2002
- 27. Προγνωστική αξία ποσοτικών αιμοκαλλιιεργειών σε παιδιά με κεντρικούς φλεβικούς καθετήρες** Γερμανάκης Ι, Στειακάκη Ε, Γαλανάκης Ε, Χρηστίδου Α, Μαρκάκη Ε-Α, Δημητρίου Ε, Τσελέντης Ι, Καλμαντή Μ **103 AA**: 40^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο 2002, **EA**: 11^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο 2002 Δανηλάτου Β, Γαλανάκης Ε, Χρηστίδου Α, Μαρκάκη Ε-Α, Στειακάκη Ε, Καλμαντή Μ
- 28. Κλινικά και απεικονιστικά ευρήματα σε παιδιά με νευρονομάτωση τύπου Ι.** Καμπουράκης Α, Ηλίας Α, Μανταδάκης Ε, Μαρκάκη Ε-Α, Ζαμπετάκης Γ, Δανηλάτου Β, Καλμαντή Μ **EA**: 11^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο 2002
- 29.Οξεία λευχαιμία στα παιδιά, Παιδιατρική Κλινική Αιματολογίας/Ογκολογίας, Παν/μίου Κρήτης, 1991-2001** Μαρκάκη Ε-Α, Στειακάκη Ε, Δανηλάτου Β, Κατζηλάκης Ν, Δημητρίου Ε, Καμπουράκης Α, Βλαχονικολής Ι, Καλμαντή Μ **EA**: 11^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο 2002
- 30. Θεραπευτική αντιμετώπιση λείσμανίασης με λιποσωμική αμφοτερικίνη Β.** Ηλίας Α, Μαρκάκη Ε-Α, Στειακάκη Ε, Μανταδάκης Ε, Καμπουράκης Α, Καλμαντή Μ **EA**: 11^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο 2002
- 31. Αναπλαστικό λέμφωμα παιδί με τραχηλική λεμφαδενοπάθεια.** Μανταδάκης Ε, Ηλίας Α, Δανηλάτου Β, Μαρκάκη Ε-Α, Καλμαντή Μ **AA**: 11^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο 2002
- 32. Απεικονιστικά ευρήματα στην ιστοκυττάρωση κυττάρων Langerhans.** Φράγγος Κ, Εργαζάκης Ν, Παπακωνσταντίνου Ο, Μαρκάκη Ε-Α, Καλμαντή Μ, Γκουρτσογιάννης Ν. **EA**: XIII Πανελλήνιο Ακτινολογικό Συνέδριο 2002

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Mutations of Rb-1 gene in children with leukemia and neuroblastoma

Markaki EA, Tsopanomichalou M, Dimitriou E, Spandidos DA, Kalmanti M.

a) 4th Cong EHA, Hematologica Vol. 84, **PO -0349**, 82, 1999, b) ECCO 10, EJC **407**, S114, 1999, c) 41st Cong ASH, Blood Vol.94, **4004**, 1999.

2. Acquired FXI inhibitors following ALL treatment Stiakaki E, Sfyridaki C, Vorgia P, Markaki E, Giannoussi E, Kalmanti M. **475 PO 5th** Cong EHA, Hem Journal Vol 1, Supp 1, 2000

3. Detection of resistance to activated protein C (APC-R) in children with malignancy. Stiakaki E, Katzilakis N, Sfyridaki C, Tsapaki E, Markaki E-A, Kalmanti M **631 PO 6th** Cong EHA, Hem Journal Vol 1, Supp 1, 2001

4. Acute myelogenous leukemia with t (8; 21) (q13; q21) abnormality in childhood

Stiakaki E, Vorgia P, Papageorgiou M, Markaki E-A, Kalmanti M **844 PO 6th** Cong EHA, Hem Journal Vol 1, Supp 1, 2001

5. G-CSF adhesion molecules and replating capacity of hemopoietic progenitors in chronic benign neutropenia

Perdikogiani C, Dimitriou E, Stiakaki E, Markaki EA, Kalmanti M.

441 PO 7th Cong EHA, Hem Journal Vol 3, Supp 1, 2002

6. Prognostic value of quantitative blood cultures in children with central venous catheters. Germanakis I, Stiakaki E, Galanakis E,

Christidou A, Markaki E.A., Dimitriou H, Tselentis I, Kalmanti M. **145 PO**

SIOP XXXIV Meeting , Med Ped Oncol vol 39, pp314, 2002.

7. G-CSF, adhesion molecules and replating capacity of hemopoietic progenitor in chronic benign neutropenia of childhood.

Perdikogianni C, Dimitriou H, Stiakaki E, Markaki E.A.,

Kalmanti M. **436 PO** SIOP XXXIV Meeting , Med Ped Oncol vol 39,

pp314, 2002.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

Μαρκάκη Ε.Α. **Φθειρίαση: Ένα παλιό πρόβλημα αναβιώνει.** Παιδιατρική Βορείου Ελλάδας 1999;11:255-260

ΜΟΝΟΓΡΑΦΙΕΣ

1. “Κλινική εικόνα ιστιοκυττάρωσης από κύτταρα Langerhans ” ΜΑΡΚΑΚΗ Ε-Α, Πρακτικά 7ου Μετεκπαιδευτικού Συνεδρίου Κλινικής Ογκολογίας, Εξελίξεις στην Ογκολογία του 1999. Εκδότης : Παγκρήτια Ένωση Βιοιατρικής Έρευνας, Ηράκλειο Κρήτης 2000.
2. “Ιστιοκυττάρωση από κύτταρα Langerhans ” ΜΑΡΚΑΚΗ Ε-Α, Πρακτικά 10^ο Παγκρήτιου Πανεπιστημιακού Παιδιατρικού Συμποσίου,
3. ‘Η επίδραση της μη ιονίζουσας ακτινοβολίας στην υγεία των παιδιών’ ΜΑΡΚΑΚΗ Ε-Α Πρακτικά 11^ο Παγκρήτιου Πανεπιστημιακού Παιδιατρικού Συμποσίου
4. ‘Τραχηλική λεμφαδενοπάθεια – νεότερα δεδομένα ” ΜΑΡΚΑΚΗ Ε-Α Πρακτικά 12^ο Παγκρήτιου Πανεπιστημιακού Παιδιατρικού Συμποσίου
5. “Ιογενείς λοιμώξεις σε ανοσοκαταστολή” ΜΑΡΚΑΚΗ Ε-Α Πρακτικά 9ου Μετεκπαιδευτικού Συνεδρίου Κλινικής Ογκολογίας, Εξελίξεις στην Ογκολογία του 2000. Εκδότης : Παγκρήτια Ένωση Βιοιατρικής Έρευνας, Ηράκλειο Κρήτης 2001.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. Soluble transferrin receptor levels and soluble transferrin receptor/log ferritin index in the evaluation of erythropoietic status in childhood infections and malignancy. H Dimitriou, E Stiakaki, E-A Markaki, I Bolonaki, Ch Giannakopoulou and M Kalmanti. Acta Paediatr 2000; 89: 1169-73.
2. Mutations of retinoblastoma gene (Rb-1) as a prognostic factor in children with acute leukemia and neuroblastoma. E-A Markaki, M Tsopanomichalou, H Dimitriou, E Stiakaki, C Perdikoyanni, D Spandidos, M Kalmanti. Pediatr Hematol Oncol 2001; 18: 101-110.
3. Management of childhood diseases during the Byzantine period: III- Respiratory diseases of childhood I Ramoutsaki, H Dimitriou, E-A Markaki, M Kalmanti. Pediatr Inter 2002; 44: 460-462

4. Management of childhood diseases during the Byzantine period: IV Juvenile diabetes mellitus I Ramoutsaki, H Dimitriou, E-A Markaki, M Kalmanti. *Pediatr Inter* 2002; 44: 463-464

5. Management of childhood diseases during the Byzantine period: V-Hydrocephalus. I Ramoutsaki, H Dimitriou, E-A Markaki, M Kalmanti. *Pediatr Inter* 2002; 44: 465-466

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΜΕΤΑ ΤΗ ΛΗΨΗ ΤΗΣ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑΣ

- Συμμετοχή σε πρόγραμμα κατάρτισης για γιατρούς με θέμα : "Ιατροί Αιματολογικών μονάδων " διάρκειάς 40 ωρών που υλοποίησε το Κ.Ε.Κ. ΠΕΠΑΓΝΗ από 15-12-1997 ως 23-12-1997.
- Επιμορφωτικό Σεμινάριο Πληροφορικής "Windows 95" που πραγματοποιήθηκε από το ΙΤΕ
- Μετεκπαίδευση στην Αιματολογική-Ογκολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου του Άμστερνταμ, Emma Children's Hospital University of Amsterdam, The Netherlands, AMC, με αντικείμενο την αυτόλογη μεταμόσχευση μυελού των οστών, την χρονική περίοδο 16-7-2001 ως 10-8-2001, στα πλαίσια του προγράμματος "Leonardo Da Vinci"

ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΕΡΓΟ

ΜΕΤΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΑ ΜΑΘΗΜΑΤΑ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗΣ ΤΟ ΕΤΟΣ 1997-1998 ΩΣ

ΠΑΙΔΙΑΤΡΟΣ ΤΟΥ Κ.Υ. ΑΝΩΓΕΙΩΝ

ΜΕΤΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΑ ΜΑΘΗΜΑΤΑ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ ΑΠΟ ΤΟ 1998 ΕΩΣ ΣΗΜΕΡΑ

ΔΙΔΑΣΚΑΛΙΑ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΟΥ ΜΑΘΗΜΑΤΟΣ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΤΟΥΣ ΦΟΙΤΗΤΕΣ ΤΟΥ 9^{ΟΥ} ΕΞΑΜΗΝΟΥ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ τα έτη 2000, 2001, 2002

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΤΗΝ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΤΩΝ ΦΟΙΤΗΤΩΝ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΤΟΥΣ ΑΣΚΗΣΗ ΣΤΗΝ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ

**ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΣΤΗ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ – ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ ΑΠΟ ΤΟ 1999
ΕΩΣ ΣΗΜΕΡΑ**

**ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΤΗΝ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΤΩΝ ΕΙΔΙΚΕΥΟΜΕΝΩΝ ΤΗΣ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ –ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ ΜΕ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΕΣ ΔΙΑΛΕΞΕΙΣ ΑΠΟ ΤΟ 1999 ΕΩΣ ΣΗΜΕΡΑ**

**ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΚΑΙ ΕΠΙΜΕΛΕΙΑ ΣΤΗ ΕΚΔΟΣΗ ΤΩΝ ΠΡΑΚΤΙΚΩΝ ΤΗΣ
ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΕΤΟΥΣ 1995,1996**

ΟΡΓΑΝΩΤΙΚΟ ΕΡΓΟ

Μέλος της Οργανωτικής Επιτροπής του 12^{ου} Παγκρήτιου Πανεπιστημιακού
Παιδιατρικού Συμποσίου του Τομέα Μητέρας - Παιδιού Πανεπιστημίου Κρήτης.

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΤΑΙΡΕΙΕΣ

1. Ελληνική Παιδιατρική Εταιρεία
2. Παγκρήτια Παιδιατρική Εταιρεία
3. Ελληνική Αιματολογική Εταιρεία

ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ

Α΄ ΒΡΑΒΕΙΟ ΚΑΛΥΤΕΡΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ «Χωρέμιο Έπαθλο» 38^ο Πανελλήνιο
Παιδιατρικό Συνέδριο 2000 με θέμα «Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο ευαισθησίας
του ρετινοβλαστώματος Rb-1 σαν προγνωστικός δείκτης στα κακοήθη
νοσήματα της παιδικής ηλικίας »

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής, δε νιώθω σαν υποχρέωση μου να απευθύνω ευχαριστίες. Αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω την ευγνωμοσύνη σε όλους τους συντελεστές αυτής της προσπάθειας.

Ευχαριστώ την επιβλέπουσα Καθηγήτρια κ. Μ. Καλμαντή όχι μόνο για τις πολύτιμες επιστημονικές οδηγίες της και τη συνεχή ηθική υποστήριξη της, αλλά και για το χάρισμα της να κάνει «expansion» στις ικανότητες μου, ώστε να ολοκληρωθεί αυτή η διατριβή. Την ευχαριστώ για τη γενναιόδωρη ευκαιρία που μου πρόσφερε να κάνω την προσωπική μου υπέρβαση. Νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Σπαντίδο τόσο για τις επιστημονικές γνώσεις που μου μετέδωσε αλλά και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθώς πρόθυμα με συμπεριέλαβε στους μεταπτυχιακούς του φοιτητές. Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στους Καθηγητές κ.κ Γ. Δελίδη, Σ. Σμπυράκη και Δ. Μαυρουδή καθώς και στις Επίκουρες Καθηγήτριες κ.κ. Ε. Δημητρίου και Ε. Στειακάκη για τις πολύτιμες υποδείξεις τους.

Για την συνεργασία και τη φιλία τους θα ήθελα να ευχαριστήσω τους διδάκτορες Μαρία Τσοπανομίχαλου κατ' εξοχήν, Γιώργο Σουρβίνο, Δέσποινα Δοκιανάκη, Γιάννη Γλαράκη, Αλέξανδρο Ζαφειρόπουλο και τους υποψήφιους διδάκτορες, με ιδιαίτερη μνεία στον Δημήτρη Αρβανίτη, την Ιωάννα Διαλυνά, Γιάννα Σούφλα, τον Νίκο Σουλιτζή και Δημήτρη Πανουτσόπουλο.

Ένα, ακόμη και μεγάλο, ευχαριστώ στον σύζυγο μου το θεωρώ λίγο για να εκφράσει την ευγνωμοσύνη μου για την συμπαράσταση του σε ολόκληρη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής μου. Θερμά ευχαριστώ τις κόρες μου γιατί στις στιγμές που η κούραση ξεπερνούσε τις αντοχές μου, η αγάπη και η γλυκιά τους αθωότητα με επανέφερε στη χαρά που έχει η καθημερινότητα.

Ευχαριστώ οφείλω σε όλα τα καρκινοπαθή παιδιά, το υλικό της διατριβής, που μου έμαθαν την αξία του αγώνα, τη χαρά να ξεπερνώ τον εαυτό μου και να αντιμετωπίζω

τη ζωή μου με οδηγό το «μηδέν άγαν». Στα καρκινοπαθή παιδιά που ωρίμασαν μέσα από τον πόνο και την αγωνία του θανάτου, εύχομαι να αγωνιστούν-όπως αυτά πολύ καλά γνωρίζουν- για μια ισότιμη διεκδίκηση της ζωής τους.

Σας ευχαριστώ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ (ABBREVIATIONS)

ΟΛΛ: Οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία

ΟΜΛ: Οξεία μυελογενής λευχαιμία

ΜΜΟ: Μεταμόσχευση μυελού των οστών

ΧΜΘ: χημειοθεραπεία

RCR: Polymerase chain reaction

CD: Cluster Differentiation

DNA: Deoxyribonucleic acid

RNA: Ribonucleic acid

SSCP: Single – Strand Conformation Polymorphism Analysis

(Ανάλυση Πολυμορφισμού Μονόκλωνης Αλυσίδας)

HR: Heteroduplex Analysis (Ανάλυση Ετεροδιμερών)

LR: Low Risk (χαμηλού κινδύνου)

MR: Median risk (ενδιαμέσου κινδύνου)

LR: High Risk (ψηλού κινδύνου)

TGFβ: Transforming growth factor β

LOH : Loss of heterozigosity

Εισαγωγικά

Στις αναπτυγμένες χώρες 1 στα 600 παιδιά ηλικίας μικρότερης των 15 ετών αναπτύσσει καρκίνο, ενώ οι μισές από τις παιδιατρικές κακοήθειες διαγιγνώσκονται τα πέντε πρώτα χρόνια της ζωής (Gurney 1995). Στο σύνολο των νεοπλασιών για όλες τις ηλικίες, οι κακοήθειες της παιδικής ηλικίας αφορούν ποσοστό μικρότερο από 1% και αποτελούν τη δεύτερη αιτία θανάτου στα παιδιά ηλικίας μεγαλύτερης του έτους. Η λευχαιμία αποτελεί τη συχνότερη κακοήθεια και ευθύνεται για το 35-40% των καρκίνων της παιδικής ηλικίας συνολικά (Birch 1999), ενώ ο κίνδυνος για κάθε παιδί είναι 1/2000 (Greaves 2002). Η συχνότητα της ανέρχεται σε 3,5 - 4 νέες περιπτώσεις ανά 100.000 παιδιά, με συχνότερη ηλικία εμφάνισης τα πέντε πρώτα χρόνια ζωής (Pui 1995). Προέρχεται από τον κακοήγη μετασχηματισμό ενός προγονικού κυττάρου της μυελικής ή της λεμφικής σειράς, που διαταράσσει τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση) (Greaves 1993, LoCoco1995, Chessells 2000). Αποτέλεσμα είναι η δημιουργία μονοκλωνικού πληθυσμού που προκαλεί έκπτωση της λειτουργίας του μυελού και κλινική συμπτωματολογία και μοιραία έκβαση αν αφεθεί χωρίς θεραπεία. Αν και έχουν ενοχοποιηθεί διάφοροι περιβαλλοντικοί, γενετικοί - κληρονομικοί, λοιμογόνοι και επαγγελματικοί παράγοντες (Sandler 1997, Wiemels 1999, Seversson 1999, Taub 2002) ωστόσο η αιτιολογία της λευχαιμίας παραμένει άγνωστη.

Η λευχαιμία της παιδικής ηλικίας κατατάσσεται σε προγνωστικές ομάδες με βάση τον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων, την ηλικία, το φύλο, τον ανοσοφαινότυπο, τις χρωμοσωμικές ανωμαλίες, την ηπατοσπληνομεγαλία και λεμφαδενοπάθεια, την

προσβολή του ΚΝΣ ή μη και την ανταπόκριση στη θεραπεία η οποία αποτελεί τον κυριότερο προγνωστικό παράγοντα της λευχαιμίας (Friedmann 2000).

Παρά την πρόοδο στην ταξινόμηση και θεραπεία της νόσου τα τελευταία χρόνια, υπάρχουν μορφές λευχαιμίας εξ αρχής ανθεκτικές στην θεραπεία ή που στη συνέχεια υποτροπιάζουν. Αυτό σημαίνει ότι και άλλοι παράγοντες, εκτός των γνωστών, παίζουν ρόλο στην αρχική ανταπόκριση και περαιτέρω πρόγνωση. Η διαλεύκανση της δράσης των γονιδίων των εμπλεκόμενων στη λευχαιμογένεση, αποτελούν βασική προϋπόθεση για την κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν τη δημιουργία και την εξέλιξη της λευχαιμίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

1.1 Ενδείξεις για τη συμμετοχή γενετικών παραγόντων στον καρκίνο

Γνωστά μονογονιδιακά νοσήματα και χρωμοσωμικά σύνδρομα τα οποία εμφανίζουν προδιάθεση για καρκίνο είναι η νευροινωμάτωση τύπου I που σχετίζεται με τα γλοιώματα, το σ.Beckwith-Wiedemann μενεφροβλάστωμα, ηπατοβλάστωμα, ραβδομυοσάρκωμα και όγκους από τα επινεφρίδια (Wiedemann 1983), τα σύνδρομα με εύθραυστο DNA η αναιμία Fanconi, το σ. Bloom και η αταξία-τηλεγγειεκτασία, με την οξεία λευχαιμία (Vanasse 1999), οι συγγενείς ανοσοανεπάρκειες με την οξεία λευχαιμία (Filipovich 1994), η τρισωμία 21 (σ. Down) (Pui 1993) και η τρισωμία 13 (σ.Patau) με την οξεία λευχαιμία, η τρισωμία 18 (σ. Edwards) με τον καρκίνο των νεφρών και το σ.Klinefelter με την οξεία λευχαιμία, τον καρκίνο του μαστού και το σεμίνωμα των όρχεων (Miller 1967). Δεν έχει διευκρινιστεί εάν τα νοσήματα αυτά προδιαθέτουν στην ανάπτυξη κακοήθειας ή εάν τόσο αυτά, όσο και οι κακοήθεις όγκοι που αναπτύσσονται είναι αποτέλεσμα της ίδιας γενετικής διαταραχής (Bishop 1987).

Οι επιδημιολογικές παρατηρήσεις αποτέλεσαν τη βάση της ερευνητικής δραστηριότητας που ακολούθησε. Ισχυρές ενδείξεις για τη συμμετοχή γενετικών παραγόντων στην ανάπτυξη των νεοπλασιών, προέκυψαν και από τις μελέτες σε μονοωογενείς διδύμους όπου το υγιές μονοωογενές δίδυμο παρουσιάζει αυξημένο

κίνδυνο ανάπτυξης λευχαιμίας (1στα 5) σε σύγκριση με το διωγενές δίδυμο (1 στα 800) (Groves 1986).

1.2 Η καρκινική εξαλλαγή των κυττάρων σαν αποτέλεσμα γενετικών αλλοιώσεων

Ένα σημαντικό ερώτημα στην κατανόηση της μετάβασης από το φυσιολογικό στον νεοπλασματικό φαινότυπο είναι αν το γεγονός αυτό αντανakλά μια αλλαγή στο γενετικό υλικό ενός κυττάρου, ή αν ο καρκίνος είναι αποτέλεσμα της αλλαγής στο εξωτερικό περιβάλλον στην οποία αντιδρά το κύτταρο. Στη πρώτη περίπτωση θα αναμένονταν όλα τα κύτταρα ενός όγκου να έχουν κοινά γενετικά χαρακτηριστικά του αρχικού μετασχηματισμένου κυττάρου, δηλαδή να είναι "μονοκλωνικά". Στη δεύτερη περίπτωση, δυνητικά πολλά κύτταρα θα αντιδρούσαν ταυτόχρονα στο εξωτερικό ερέθισμα και έτσι ο καρκίνος θα ήταν πολυκλωνικός. Η διαπίστωση ότι οι περισσότερες κακοήθειες χαρακτηρίζονται από κλωνικότητα, και ότι συνεπώς ο καρκίνος είναι κληρονομικός σε κυτταρικό επίπεδο, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι οι αλλαγές στην αλληλουχία του DNA μεμονομένων κυττάρων είναι υπεύθυνες για την κακοήθη εξαλλαγή αυτών των κυττάρων. Οι κυτταρογενετικές αναλύσεις καρκινικών κυττάρων αποτέλεσαν τη βασική μέθοδο για την απόδειξη της κλωνικότητας.

Αρχικά διαπιστώθηκε ότι τα χρωμοσώματα των καρκινικών κυττάρων είχαν συχνές ανωμαλίες στο σχήμα, στο μέγεθος και στον αριθμό, αναφορικά με τα φυσιολογικά κύτταρα του ίδιου ατόμου. Παράλληλα, πειραματικά δεδομένα τεκμηρίωσαν τη μοριακή βάση του καρκίνου ως ενός φαινοτύπου που αντιστοιχεί σε συγκεκριμένα χρωμοσώματα και μπορεί να μεταβιβαστεί με τη μεταφορά των χρωμοσωμάτων αυτών. Μελέτες σε καλλιέργειες κυττάρων απέδειξαν ότι τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων μπορούν να μεταβιβαστούν

σε φυσιολογικά κύτταρα με τη μεταφορά ενός μόνο χρωμοσώματος που είχε απομονωθεί από καρκινικά κύτταρα (Spandidos 1986).

Βασικό χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων είναι ότι διαιρούνται διαρκώς, δίνοντας νέα καρκινικά κύτταρα και ποτέ κάποιο φυσιολογικό. Οι ανωμαλίες που ωθούν ένα κύτταρο να γίνει καρκινικό κληρονομούνται σταθερά συνεπώς θα πρέπει να έχουν γενετική βάση. Ο καρκίνος είναι γενετική νόσος αφού για την ανάπτυξη του ευθύνονται αλλοιώσεις του κυτταρικού DNA. Οι αλλοιώσεις αυτές σε κυτταρικό επίπεδο, διαταράσσουν την ισορροπία των διαφόρων ρυθμιστικών μηχανισμών που ευθύνονται για το φυσιολογικό κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση, προκαλώντας ανεξέλεγκτη ανάπτυξη κάποιων κυτταρικών πληθυσμών εις βάρος των υπολοίπων. Η γενετική προέλευση των νεοπλασμάτων δεν αφορά μόνο τις κληρονομικές τους μορφές, όπου οι αλλοιώσεις του DNA εντοπίζονται στα κύτταρα της γενετικής σειράς και φυσικά κληρονομούνται, αλλά και τις σποραδικές μορφές τους, όπου οι αλλοιώσεις του γενετικού κώδικα αφορούν, κύρια, τα σωματικά κύτταρα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

Η ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

2.1 Ο καρκίνος είναι υπερμεταλλακτικός φαινότυπος

Ο ενδογενής ρυθμός τυχαίας μεταλλαξιογένεσης στα φυσιολογικά κύτταρα, που ανέρχονται σε 10^{14} είναι 10^{-6} μεταλλάξεις /ζεύγος βάσεων /κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Υπολογίζοντας το συνολικό αριθμό των κυτταρικών διαιρέσεων κατά τη διάρκεια του μέσου όρου ζωής του ανθρώπου υπολογίζεται ότι ο τυχαίος ρυθμός μεταλλαγών θα προκαλούσε το πολύ 2-3 μεταλλαγές στο φυσιολογικό κύτταρο (Loeb 1991). Το δεδομένο αυτό δεν επαρκεί για να ερμηνεύσει τον ασύγκριτα υψηλότερο αριθμό μεταλλαγών οι οποίες συσσωρεύονται στο DNA των καρκινικών κυττάρων (Chu 1988). Οι τελευταίες είναι δυνατό να είναι ακόμα περισσότερες, αφού η χρησιμοποιούμενη σήμερα μεθοδολογία έχει επινοηθεί για την ανίχνευση συγκεκριμένων γενετικών αλλοιώσεων όπως χρωμοσωμικές ανωμαλίες, ελλείψεις, αντικαταστάσεις βάσεων, ενώ μικρές τυχαίες μεταλλαγές συνήθως διαφεύγουν. Οι μεταλλάξεις αυτές σε μη κωδικοποιούσες περιοχές του DNA είναι εκείνες που αντικατοπτρίζουν το πραγματικό ποσοστό μεταλλαξιογένεσης, αφού η δημιουργία τους δεν επάγεται και η επιβίωση τους στον κυτταρικό πληθυσμό δεν επιλέγεται λόγω της έλλειψης λειτουργικότητας. Η παρουσία πολλαπλών μεταλλαγών στα καρκινικά κύτταρα, οδήγησε στην υπόθεση ότι ο καρκίνος αντιστοιχεί σε *υπερμεταλλαξικό φαινότυπο* (hypermutative

phenotype) (Loeb 1994). Για να γίνει ένα κύτταρο καρκινικό απαιτούνται 5-6 μεταλλαγές και η θεωρητική πιθανότητα να συμβεί αυτό αν ο ρυθμός μεταλλαξιγένεσης, είναι σταθερός, είναι 10^{-22} . Όμως στη πράξη ο καρκίνος είναι μια σχετικά συχνή νόσος και αυτό γιατί υπάρχουν μεταλλαγές που ευοδώνουν τον πολλαπλασιασμό και άλλες που ευοδώνουν τη συχνότητα των μεταλλαγών (Strachh 1996).

2.2 Η μοριακή συνέπεια της μεταλλαγής

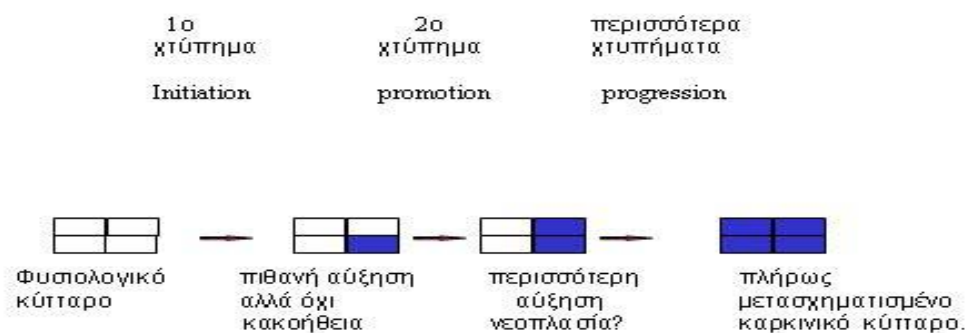
Αν η μεταλλαγή συμβεί σε μια περιοχή που κωδικοποιεί και αλλάξει η αλληλουχία των τριών βάσεων του κωδικόνιου, θα κωδικοποιεί διαφορετικό αμινοξύ, (*παρερμηνεύσιμη μεταλλαγή, missense mutation*) και η πρωτεΐνη που θα συντεθεί θα είναι δομικά διαφορετική. Αν η αλλαγή του αμινοξέος συμβεί σε μια λειτουργικά σημαντική περιοχή, ή διαφοροποιήσει τη δομή ή τη σταθερότητα της πρωτεΐνης, το αποτέλεσμα είναι η τροποποίηση στη λειτουργία της. Αν όμως η αντικατάσταση μιας βάσης δημιουργήσει κωδικόνιο που κωδικοποιεί για το ίδιο αμινοξύ (π.χ $AGG \rightarrow CGG \rightarrow$ αργινίνη) πρόκειται για σιωπηλή μεταλλαγή (*silent mutation*), χωρίς καμία επίπτωση.

Μια ιδιαίτερα καταστροφική σημειακή μεταλλαγή είναι εκείνη που μετατρέπει ένα φυσιολογικό κωδικόνιο σε κωδικόνιο λήξης πρώιμα. Αυτή είναι γνωστή ως *ανερμηνεύσιμη μεταλλαγή (nonsense mutation)*.

Αν η ένθεση ή η έλλειψη ενός μικρού αριθμού νουκλεοτιδίων σε μια περιοχή που κωδικοποιεί δεν είναι πολλαπλάσιο του 3, τότε θα αλλάξει το πλαίσιο ανάγνωσης της μετάφρασης μετά από το σημείο αυτό. Τέτοιες μεταλλαγές ονομάζονται *μετατοπίσεις του πλαισίου ανάγνωσης*. Η παραγόμενη πρωτεΐνη είτε θα έχει ελάχιστη ομοιότητα με τη φυσιολογική είτε θα αποδομείται γρήγορα, πριν να ολοκληρώσει την λειτουργική της δράση (Griffiths 1996).

2.3 Η πολυσταδιακή διαδικασία της καρκινικής εξαλλαγής

Η καρκινική εξαλλαγή ενός κυττάρου είναι μια πολύπλοκη και πολυσταδιακή διαδικασία στην οποία περισσότερα του ενός γενετικά (genetics events, π.χ μετάλλαξη) και επιγενετικά γεγονότα (epigenetics events, π.χ υπομεθυλίωση, ή η ακετυλίωση στις ιστόνες) απαιτούνται για τη μετάβαση από την κατάσταση φυσιολογικού ελέγχου της κυτταρικής συμπεριφοράς, σε μια κατάσταση όπου ο έλεγχος αυτός έχει χαθεί (Vogelstein and Kinzler 1993) (σχήμα 1).



Σχήμα 1: Ο καρκίνος είναι μια πολυσταδιακή διαδικασία. Τουλάχιστον δυο γενετικά γεγονότα φαίνεται να είναι απαραίτητα για να μετασχηματίσουν ένα φυσιολογικό κύτταρο σε καρκινικό τα «χτυπήματα» μπορεί να είναι : 1) ενεργοποίηση ογκογονιδίων 2) αδρανοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων 3) περιβαλλοντικές επιδράσεις 4) άλλα (άγνωστα)

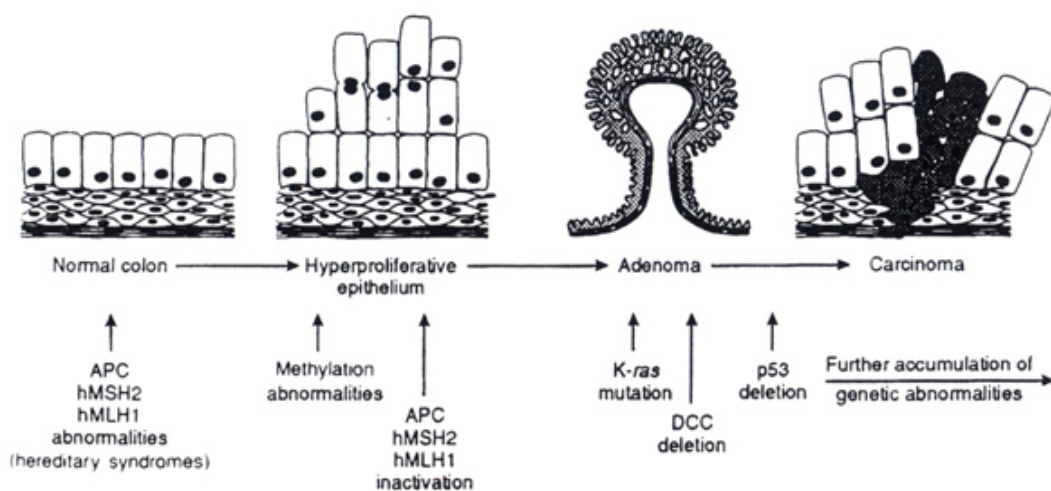
Οι πρώτες παρατηρήσεις που οδήγησαν στην υπόθεση των «πολλαπλών χτυπημάτων» (“multiple hits”) προήλθαν από το προοδευτικά ψηλότερο ποσοστό καρκίνου προϊούσης της ηλικίας. Τα «χτυπήματα» αυτά θα μπορούσαν να αντιπροσωπεύουν προσβολές σε ξεχωριστά κύτταρα, όμως επειδή ο κάθε όγκος προκύπτει από ένα προγονικό κύτταρο (κλωνική αύξηση), είναι πιο πιθανό να αντιπροσωπεύουν διαδοχικές μεταλλαγές σε γονίδια ενός και μόνο κυττάρου και των κυτταρικών απογόνων του (Fearon 1990). Σύμφωνα με αυτή την άποψη, οι

όγκοι αναπτύσσονται με μια κλωνική εξελικτική διαδικασία κατευθυνόμενη από μεταλλαγές. Η πρώτη μεταλλαγή έχει ως αποτέλεσμα τον επιλεγμένο πολλαπλασιασμό των κυτταρικών απογόνων ενός και μόνο κυττάρου. Στη συνέχεια ένα από τα κύτταρα αυτά αποκτά μια δεύτερη μεταλλαγή, επιτρέποντας πιθανόν την ανάπτυξη ενός μικρού καλοήθους όγκου. Κάποιο από τα κύτταρα του καλοήθους όγκου μπορεί να υποστεί και μια τρίτη μεταλλαγή, να πολλαπλασιαστεί εις βάρος των άλλων κυττάρων του όγκου και να σχηματίσει μια πιο εξελιγμένη μορφή του όγκου. Ο όγκος αυτός θα αποτελείται από κύτταρα που έχουν υποστεί και τις τρεις μεταλλαγές. Τελικά, κάποια κλωνικά κύτταρα θα συγκεντρώσουν ένα ικανοποιητικό αριθμό γενετικών αλλοιώσεων που επιτρέπει τη διήθηση στους γύρω ιστούς και την πρόκληση μετάστασης σε άλλα όργανα (Vogelstein 1988) σχήμα . Έχει αποδειχθεί ότι τα κακοήθη κύτταρα ενός όγκου φέρουν το ίδιο σύνολο μεταλλαγών που βρίσκονται και στις καλοήθεις περιοχές του ίδιου όγκου, αλλά με την προσθήκη τουλάχιστον μιας επιπλέον μεταλλαγής, η οποία απουσιάζει από τα πρόδρομα καλοήθη κύτταρα (Shibata 1993). Στη διατύπωση αυτής της υπόθεσης οδήγησαν επιδημιολογικές και κλινικές παρατηρήσεις. Για παράδειγμα ασθενείς που έχουν εκτεθεί σε ακτινοβολία, αναπτύσσουν όγκους που εμφανίζονται μετά από μεγάλα χρονικά διαστήματα (Evans 1993).

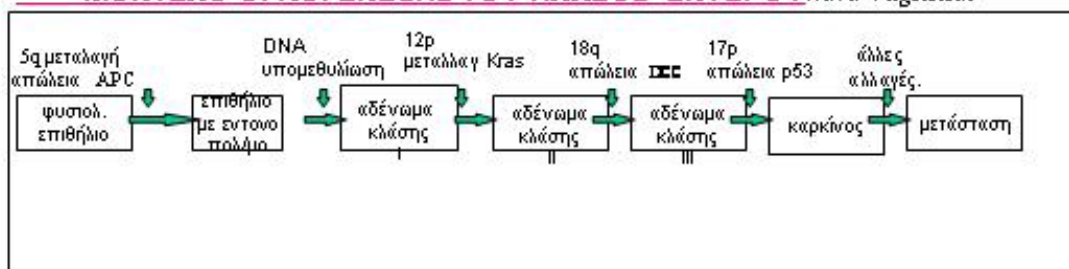
2.4 Γονίδια που εμπλέκονται στην καρκινογένεση.

Η έρευνα της τελευταίας 25ετίας αποκάλυψε ότι στον καρκίνο διαταράσσεται η φυσιολογική έκφραση ή η λειτουργία γονιδίων που ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση του κυττάρου. Τα γονίδια αυτά κατατάσσονται σε δυο βασικές κατηγορίες, τα ογκογονίδια (oncogenes) (Friend 1988) και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια (tumor suppressor genes) ή αντιογκογονίδια ή γονίδια ευαισθησίας στον καρκίνο (Weinberg 1988, Marshall

1991). Πρόσφατα ταυτοποιήθηκε μια τρίτη κατηγορία γονιδίων τα οποία δε σχετίζονται με τον έλεγχο της αύξησης και της διαφοροποίησης του κυττάρου, αλλά συμμετέχουν στην καρκινογένεση. Πρόκειται για τα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA ή μεταλλακτικά γονίδια (mismatch repair genes) (Modrich 1994).



ΜΟΝΤΕΛΟ ΟΓΚΟΓΕΝΕΣΗΣ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ κατά Vogelstein



Σχήμα 2 : Η εξέλιξη από το φυσιολογικό επιθηλιακό κύτταρο στο μεταστατικό κύτταρο στον καρκίνο του παχέος εντέρου διαδραματίζεται σε στάδια. Τα περισσότερα απ'αυτά ταστάδια σχετίζονται με την απώλεια ογκοκατασταλτικών γονιδίων η / και την ενεργοποίηση ογκογονιδίων. Η ανάπτυξη του καρκίνου του παχέος εντέρου είναι μια πολυσταδιακή διαδικασία στην οποία εμπλέκονται η αδρανοποίηση τουλάχιστον 3 ογκοκατασταλτικών γονιδίων (APC, DCC, MCC) και η ενεργοποίηση τουλάχιστον ενός ογκογονιδίου (K-as) (Vogelstein 1988, τροποποιημένο).

2.4.1 Ογκογονίδια

Τα ογκογονίδια ταυτοποιήθηκαν μετά τη διαπίστωση ότι η ογκογενετική ικανότητα πολλών RNA ιών (ρετροϊών) οφείλεται σε συγκεκριμένα γονίδια. Ενώ οι ρετροϊοί είναι μια σπάνια αιτία καρκίνου στον άνθρωπο, η μελέτη της βιολογίας τους σε άλλους οργανισμούς συνέβαλε στην κατανόηση της γενετικής του καρκίνου. Στις πρωτοποριακές μελέτες του Peyton Rous στα πτηνά κλωνοποιήθηκε το γονίδιο v-src από τον ιό του σαρκώματος Rous, ο οποίος προκαλεί σάρκωμα στα πτηνά (Rous 1979). Ανακαλύφθηκε ότι το DNA των πτηνών εμπεριέχει ένα γονίδιο συγγενικό με το v-src και ότι παρόμοιες αλληλουχίες αναγνωρίζονται στο DNA άλλων σπονδυλωτών (Stehelin 1976, Spector 1978). Η μελέτη ανθρωπίνων όγκων έδειξε ότι επίσης περιείχαν γονίδια αντίστοιχα με ιικά γονίδια ρετροϊών.

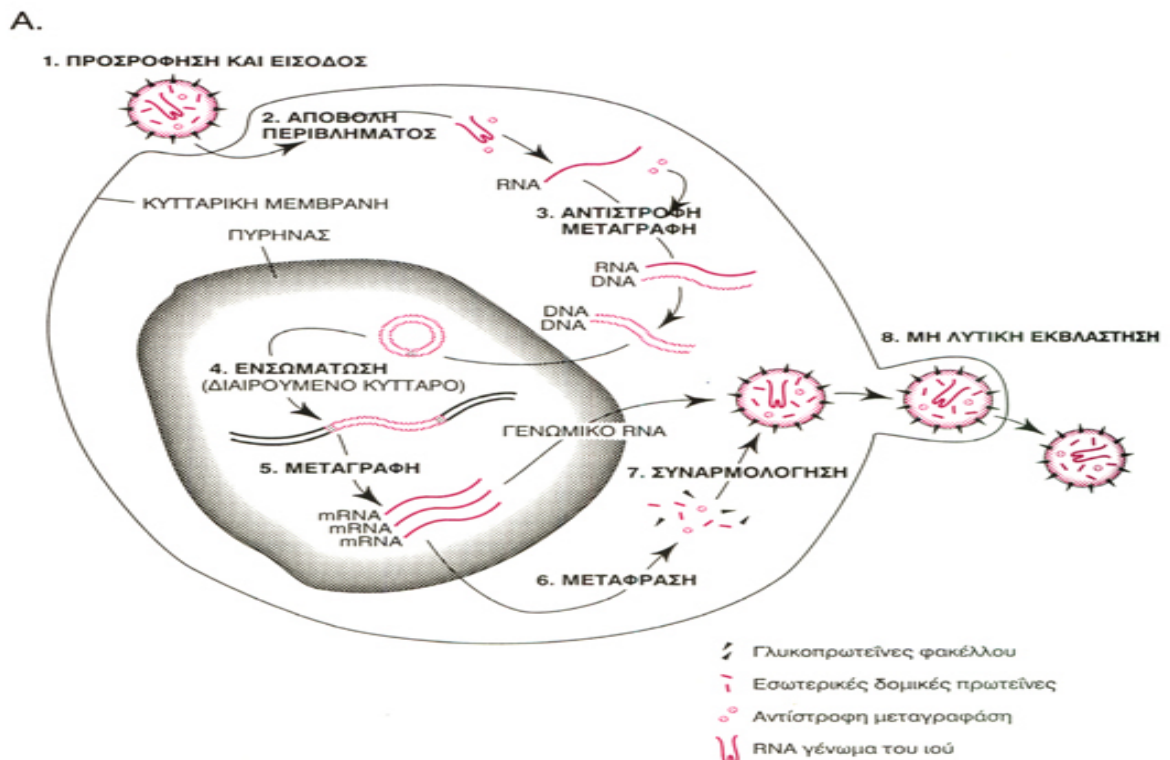
Τα γονίδια των ρετροϊών που μπορούν να μετασχηματίσουν φυσιολογικά κύτταρα σε καρκινικά, έχουν στο γονιδίωμα τους αλληλουχίες με υψηλή ομολογία με κυτταρικά γονίδια, από τα οποία και προήλθαν με γενετικό ανασυνδυασμό (Lang 1994).

Στους ρετροϊούς μπορεί να βρεθεί και ένα τέταρτο γονίδιο, εκτός από τα τρία γονίδια gag, pol, env που περιέχει, το οποίο δεν είναι στην καταγωγή του ιικό αλλά έχει αποσπαστεί από γενωμικό DNA (ανθρώπινης ή ζωικής προέλευσης), με μια διαδικασία που ονομάζεται *μεταγωγή (transduction)*. Εάν η αλληλουχία DNA που έχει αποσπαστεί περιέχει ένα φυσιολογικό γονίδιο που προάγει την αύξηση (*πρωτο-ογκογονίδιο*) και ο ρετροϊός ενεργοποιεί αυτό το γονίδιο χρησιμοποιώντας τους ισχυρούς του υποκινητές, η επόμενη μόλυνση άλλων κυττάρων με αυτόν το ιό θα τα μετασχηματίσει σε δυνητικά καρκινικά κύτταρα (Angel 1991) (σχήμα 3).

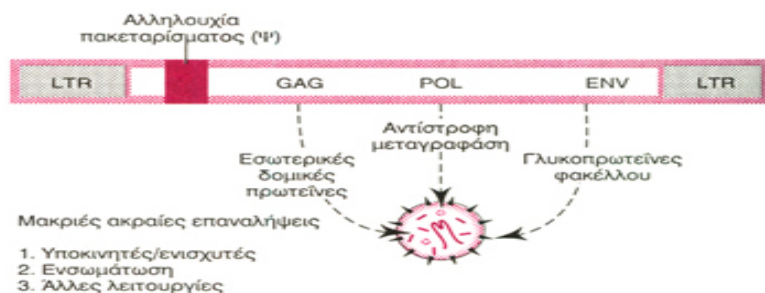
Χρησιμοποιώντας το μοριακό υβριδισμό ανακαλύφθηκαν περισσότεροι από 30 ρετροϊοί που προκαλούν μετασχηματισμό (Bishop 1987). Τα γονίδια τους που προκαλούσαν τον μετασχηματισμό ονομάστηκαν συμβατικά χρησιμοποιώντας

συντομογραφία τριών γραμμάτων από το όνομα του ιού στον οποίο είχαν αρχικά ανακαλυφθεί. Έτσι π.χ. τα γονίδια μετασχηματισμού των ιών του Kirsten και του Harvey που προκαλούν σάρκωμα στους αρουραίους ονομάστηκαν K-ras (rat sarcoma virus, Kirsten strain) και R-ras (rat sarcoma virus, Harvey strain) αντίστοιχα κ.λ.π.

Τα πρωτοογκογονίδια είναι φυσιολογικά γονίδια που ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυτάρων. Έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερα από 75 (Rabbits 1994). Πρωτοογκογονίδια έχουν βρεθεί σε όλους τους πολυκυττάριους οργανισμούς.



B.



Σχήμα 3 : Α. Κύκλος ζωής ενός ρετροϊού. **Β.** Απεικόνιση του γενώματος ενός ρετροϊού (Angel 1991, τροποποιημένο).

2.4.2 Μηχανισμοί δράσης ογκογονιδίων

Υπάρχουν τρεις βασικοί μηχανισμοί με τους οποίους δρουν. Ο πρώτος είναι η φωσφορυλίωση πρωτεϊνών σε περιοχές σερίνης, θρεονίνης και τυροσίνης (Hunter 1985). Οι πρωτεΐνες των πρωτοογκογονιδίων με αυτή τη δράση μεταφέρουν φωσφορικές ομάδες από το ATP στην πλάγια αλυσίδα των περιοχών αυτών. Η φωσφορυλίωση εξυπηρετεί δυο βασικούς μηχανισμούς στη μετάδοση ενός σήματος. Αφ' ενός αλλάζει τη διαμόρφωση της πρωτεΐνης ενεργοποιώντας την σε δράση κινάσης της τυροσίνης. Αφ' ετέρου, η φωσφορυλίωση της τυροσίνης δημιουργεί κενές θέσεις πρόσδεσης που κινητοποιούν πρωτεΐνες στόχους, τις οποίες η ενεργοποιημένη κινάση μπορεί να φωσφορυλιώσει. Ως εκ τούτου η φωσφορυλίωση ευοδώνει την μετάβαση σημάτων, με τη δημιουργία συμπλεγμάτων μορίων που τα μεταφέρουν μέσα στο κύτταρο στις θέσεις που πρέπει να δράσουν.

Ο δεύτερος μηχανισμός με τον οποίο ενεργούν τα πρωτοογκογονίδια για να μεταφέρουν μηνύματα σχετίζεται με τις GTPασες (Boume 1987, Boume 1990). Τέτοια συμπεριφορά έχουν οι πρωτεΐνες που παράγονται από τα γονίδια της οικογένειας *ras*. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας *ras* λειτουργούν σα μοριακοί διακόπτες που ανοίγουν και κλείνουν μέσω ενός ρυθμισμένου κύκλου GDP/GTP. Οι πρωτεΐνες *ras* έχουν παρομοιαστεί με ενδιάμεσα κλειδιά σε οδούς μεταγωγής σήματος από τις κινάσες τυροσίνης προς τις κινάσες σερίνης και θρεονίνης.

Ο τρίτος μηχανισμός με τον οποίο δρουν τα πρωτοογκογονίδια αναφέρεται σε πρωτεΐνες που εντοπίζονται στον πυρήνα. Πρόκειται για μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι επάγουν την πρωτεϊνική σύνδεση, διεγείροντας το DNA του πυρήνα να παράγει αγγελιοφόρο mRNA (Treisman 1994).

Κάποια «γεγονότα» έχουν ως αποτέλεσμα την συνεχή ενεργοποίηση των πρωτοογκογονιδίων και την απώλεια του ελέγχου τους, τη μετατροπή τους δηλαδή

σε ογκογονίδια. Συνεπώς, ογκογονίδια είναι ενεργοποιημένα πρωτοογκογονίδια που συνεχίζουν να δρουν στη κυτταρική ανάπτυξη ανεξέλεγκτα και μπορούν να προκαλέσουν εξαλλαγή κυττάρων *in vitro*. Πειραματικά δεδομένα επιβεβαιώνουν ότι τα ογκογονίδια συμπεριφέρονται ως επικρατούντα γονίδια δηλ. μεταλλαγή στο ένα αλληλόμορφο είναι αρκετή για να δημιουργήσει καρκινικό φαινότυπο. Παρ όλα αυτά, εκτός από λίγες εξαιρέσεων (όπως το γονίδιο RET), τα ογκογονίδια δε κληρονομούνται και συνεισφέρουν στην παθογένεια του καρκίνου με σωματικές μεταλλάξεις στα κύτταρα των οργάνων στόχων.

2.4.3 Μέθοδοι ταυτοποίησης ογκογονιδίων

Αν και είχαν εντοπιστεί ρετροϊοί που προκαλούσαν καρκίνο στον άνθρωπο, δεν ήταν σαφής ο τρόπος με τον οποίο τα γονίδια που περιέχονταν στους ρετροϊούς μπορούσαν να σχετίζονται με την παθογένεια του καρκίνου. Για την εντόπιση μετασχηματισμένων γονιδίων από DNA ή RNA ογκογόνους ιούς, αρχικά χρησιμοποιήθηκε η τεχνική προσδιορισμού διαμόλυνσης DNA (DNA transfection assay) (Graham 1973, Shih 1981).

Μόνο το 20% των όγκων που περιείχαν ογκογονίδια ταυτοποιήθηκε με αυτό τον τρόπο, και περίπου το ¼ από αυτά ανήκαν στην οικογένεια *ras*. Με τη μέθοδο μελέτης ομολογίας με ρετροϊούς Π.χ σε μετασχηματισμένα γονίδια από ανθρώπινους όγκους ουροδόχου κύστη και πνεύμονα, αποδείχθηκε η ομολογία των *ras* γονιδίων με τα γονίδια τα οποία είχαν πρόσφατα ταυτοποιηθεί στους ιούς του σαρκώματος Harvey και Kirsten (Parada 1982). Ένα τρίτο γονίδιο από την οικογένεια *ras* αρχικά ταυτοποιήθηκε σε κύτταρα νευροβλαστώματος και χαρακτηρίστηκε N-*ras* (Perucho 1981). Υπάρχει σαφής εκλεκτικότητα όσον αφορά ποια ομολογία *ras* ενεργοποιείται σε κάθε τύπο ανθρώπινου καρκίνου. Περίπου το

50% των καρκίνων του παχέος εντέρου, το 95% των παγκρεατικών καρκίνων και το 30% των αδενοκαρκινωμάτων του πνεύμονα έχουν μεταλλάξεις στο K-ras και σπάνια στα H-ras και N-ras(Bos 1990). Παρομοίως το 25% των οξειών λευχαιμιών έχουν μεταλλάξεις στα N- ras, στα K-ras και H-ras (Kalmanti 1992).

Για την ανίχνευση πρωτογονιδίων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική υβριδισμού που βασίστηκε στην παρατήρηση ότι μερικά ογκογονίδια εντοπίζονταν στη περιοχή των σημείων αναδιάταξης των χρωματοσωμάτων μετά από μεταθέσεις και τη δημιουργία χιμαιρικών γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες σύντηξης (fusion protein). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το χρωμόσωμα Φιλαδέλφειας (Ph) το οποίο προκύπτει από τη μετάθεση του χρωμοσώματος 9 στο χρωμόσωμα 22, t(9;22)(q34;q11) και αφορά το 95% των ασθενών με ΧΜΛ (De Klein 1982, Cooper 1996, Rabbits 1999).

Η γονιδιακή ενίσχυση, δηλαδή τα πολλαπλά αντίγραφα ενός πρωτοογκογονιδίου που ανιχνεύονται με τεχνικές υβριδισμού, αποτελούν εναλλακτική μέθοδο ταυτοποίησης των πρωτοογκογονιδίων (Collins & Groudine 1982). Συνολικά για την ταυτοποίηση ογκογονιδίων έχουν χρησιμοποιηθεί 5 διαφορετικές μέθοδοι (Narayanan 1992) (Πίνακας 1).

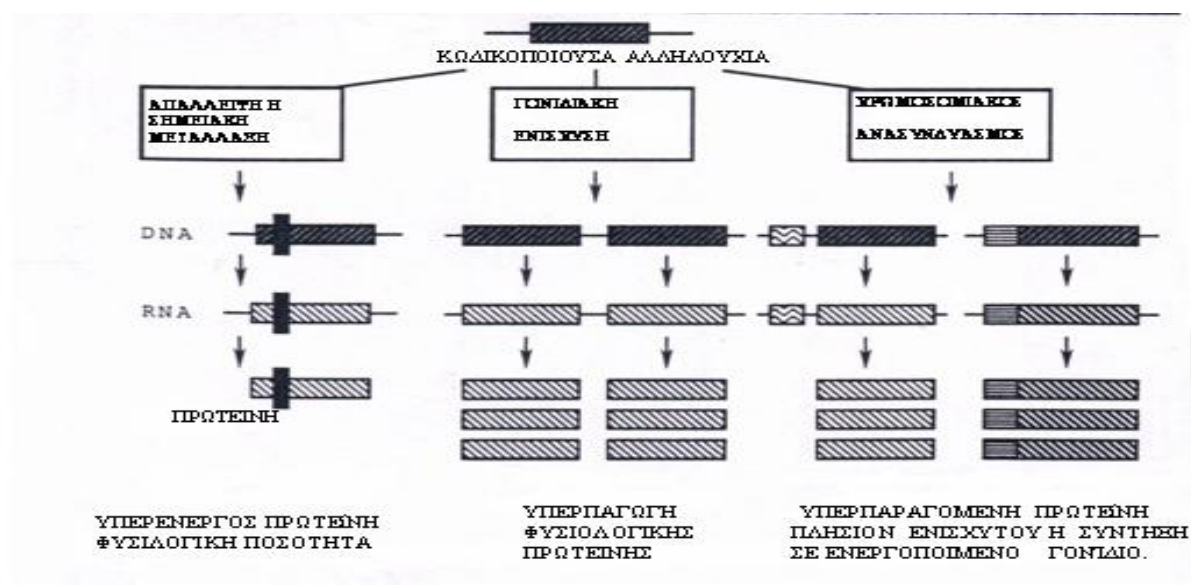
Πίνακας 1 : Μέθοδοι ταυτοποίησης ογκογονιδίων σε ανθρώπινους όγκους αντιπροσωπευτικά ταυτοποιημένα ογκογονίδια

Μέθοδοι	αντιπροσωπευτικά ταυτοποιημένα ογκογονίδια
προσδιορισμός με επιμόλυνση	ras, myc, mas, trk, met
χρωμοσωμική μετάθεση	abl, bcl1, bcl2, myc
ομολογία με ρετροιούς	K -ras, H- ras, src
ενίσχυση	erb2, L-myc, N-myc
μεταλλαγή ένθεσης	evi1, lnt1

2.4.5 Μηχανισμοί ενεργοποίησης πρωτοογκογονιδίων

Τα φυσιολογικά πρωτοογκογονίδια μπορούν να ενεργοποιηθούν σε ογκογονίδια με τους παρακάτω μηχανισμούς (Bishop 1991) (σχήμα).

- 1) Σημειακή μεταλλαγή - απάλειψη
- 2) Γονιδιακή ενίσχυση
- 3) Χρωμοσωμική μετάθεση (Cory 1986)
- 4) Μόλυνση με ρετροϊούς που μετασχηματίζουν κύτταρα με διαδικασία γνωστή ως μετάλλαξη ένθεσης (σχήμα 4).

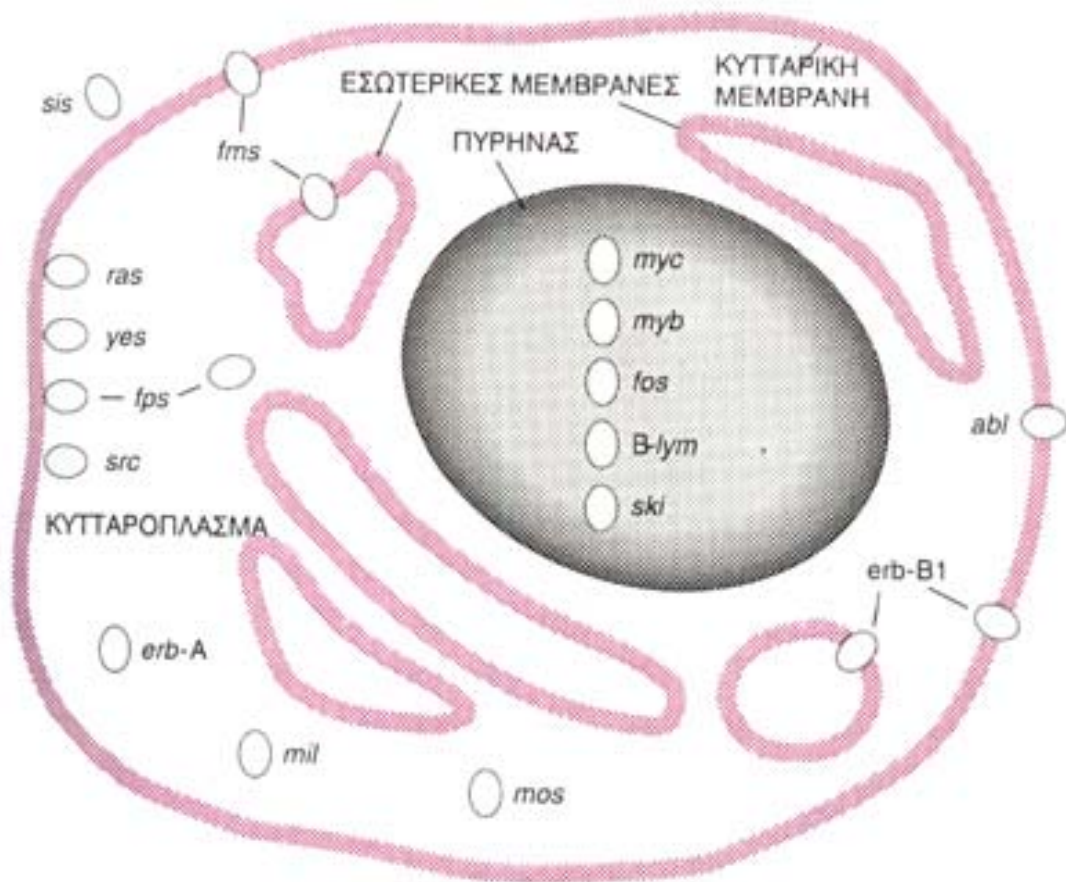


Σχήμα 4 : Μηχανισμοί ενεργοποίησης πρωτοογκογονιδίων

2.4.6 Λειτουργική κατάταξη πρωτοογκογονιδίων

Ανάλογα με τη βιολογική δράση των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν τα πρωτοογκογονίδια και την εντόπιση τους στο κύτταρο, μπορούν να καταταγούν

στις εξής κατηγορίες: 1) αυξητικοί παράγοντες (growth factors), 2) υποδοχείς αυξητικών παραγόντων (growth factors receptors), 3) μεταγωγείς σήματος (signal transducers) και 4) μεταγραφικοί παράγοντες (transcription factors (Hunter 1991) (σχήμα 5).



Σχήμα 5: αναπαράσταση εντόπισης πρωτοογκονιδίων

Κακοήθειες έχουν συσχετιστεί με συγκεκριμένα ογκογονίδια (Πίνακας 2)

Πίνακας 2: Αντιπροσωπευτικά πρωτο-ογκογονίδια, μηχανισμός αλλοίωσης τους και συμμετοχή τους σε ανθρώπινα νεοπλάσματα (Bishop 1991)

πρωτο-ογκογονίδια	Νεοπλάσματα	Γενετική αλλοίωση
abl (BCR/ABL)	χρόνια μυελογενής λευχαιμία	μετατόπιση
erbB-1	ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα γλοιοβλάστωμα, καρκίνωμα μαστού	γονιδιακή επέκταση
erbB-2	αδενοκαρκίνωμα ωοθηκών, μαστού, στομάχου	γονιδιακή επέκταση
gip	καρκίνος ωοθηκών, ενδοκρινών αδένων	σημειακές μεταλλαγές
gsp	αδένωμα της υπόφυσης, καρκίνωμα του θυρεοειδούς	σημειακές μεταλλαγές
myc	λέμφωμα Burkitt καρκίνωμα του πνεύμονα, μαστού και τραχήλου μήτρας	μετατόπιση γονιδιακή επέκταση
L-myc	μικροκυτταρικό του πνεύμονα	γονιδιακή επέκταση
N-myc	νευροβλάστωμα μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα	γονιδιακή επέκταση
H-ras	καρκίνωμα του ουροποιογεννητικού καρκίνωμα θυρεοειδούς, μελάνωμα	σημειακές μεταλλαγές
K-ras	καρκίνωμα του παχέος εντέρου, πνεύμονα, παγκρέατος, μελάνωμα	σημειακές μεταλλαγές
N-ras	οξεία μυελογενής και οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία καρκίνωμα θυρεοειδούς και μελάνωμα	σημειακές μεταλλαγές ανασυνδυασμός
ret	καρκίνωμα θυρεοειδούς	ανασυνδυασμός
ros	αστροκύττωμα	
K-sam	καρκίνωμα του στομάχου	γονιδιακή επέκταση

Πίνακας 2 (συνέχεια) : Αντιπροσωπευτικά πρωτο-ογκογονίδια, μηχανισμός αλλοίωσης τους και συμμετοχή τους σε ανθρώπινα νεοπλάσματα (Bishop 1991)

πρωτο-ογκογονίδια	Νεοπλάσματα	Γενετική αλλοίωση
sis	αστροκύττωμα	άγνωστη
src	καρκίνωμα παχέος εντέρου	άγνωστη
trk	καρκίνωμα θυρεοειδούς	ανασυνδυασμός
EGRF	καρκίνωμα από πλακώδη κύτταρα	γονιδιακή επέκταση
K-sam	καρκίνωμα του στομάχου	γονιδιακή επέκταση
sis	αστροκύττωμα	άγνωστη
src	καρκίνωμα παχέος εντέρου	άγνωστη
trk	καρκίνωμα θυρεοειδούς	ανασυνδυασμός
EGRF	καρκίνωμα από πλακώδη κύτταρα	γονιδιακή επέκταστ
Dbl	λέμφωμα από B κύτταρα	ανασυνδυασμός
ost	οστεοσάρκωμα	άγνωστη

2.5 Ογκοκατασταλτικά γονίδια

2.5.1 Πειραματικά δεδομένα για την ύπαρξη ογκοκατασταλτικών γονιδίων

Μια δεύτερη ομάδα γονιδίων η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση, είναι τα ογκοκατασταλτικά γονίδια. Αυτά καθορίστηκαν σαν γονίδια τα οποία εμπλέκονται στον έλεγχο του ανώμαλου κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η απώλεια ή η αδρανοποίηση τους σχετίζεται με την ανάπτυξη κακοήθειας. Παρά την πολλαπλή ονοματολογία τους στις πρώτες βιβλιογραφικές αναφορές, επικράτησαν τελικά σαν ογκοκατασταλτικά γονίδια (tumor suppressor genes) (Bishop 1991). Αποτελούν μια ευρεία ομάδα γονιδίων που συμπεριφέρονται στην καρκινογένεση με τρόπο υπολειπόμενο. Δηλαδή, για να αναπτύξουν την ογκογόνο δράση τους πρέπει να ενέχεται η λειτουργική αδρανοποίηση και των δύο αλληλόμορφων γονιδίων τους (Knudson 1986, Lasco 1991).

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια ήταν πολύ δυσκολότερο να ταυτοποιηθούν σε σύγκριση με τα ογκογονίδια: Η εισαγωγή ενός ογκογονιδίου σε καλλιέργεια φυσιολογικών κυττάρων, οδηγούσε σε σαφώς αναγνωρίσιμα μετασχηματισμένα κύτταρα. Αντίθετα, η ταυτοποίηση μεταλλαγής που δεν οδηγεί σε μετασχηματισμό, σε υπόστρωμα μετασχηματισμένων κυττάρων, ήταν πειραματικά δύσκολη (Klinger 1982, Stanbridge 1982).

Την υπόθεση ότι στο νεοπλασματικό μετασχηματισμό πιθανά εμπλέκονται γονίδια των οποίων τα προϊόντα ρυθμίζουν αρνητικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό υποστήριξαν: α) η καταστολή της κακοήθειας σε υβρίδια σωματικών κυττάρων (Weissman 1987, Trent 1990) β) οι παρατηρήσεις σε οικογενείς καρκίνους (Knudson 1971) και γ) η σταθερή απώλεια χρωμοσωμιακών περιοχών - απώλεια της ετεροζυγωτίας στα κύτταρα του όγκου (Cavanee 1984).

2.5.2 Καταστολή της κακοήθειας με κυτταρική σύντηξη

Το 1969 οι Epherussi και συν, σε πειράματα κυτταρικής σύντηξης έδειξαν ότι ο μετασχηματισμένος φαινότυπος είναι δυνατό να διορθωθεί *in vitro* με τη σύντηξη του μετασχηματισμένου κυττάρου με φυσιολογικό κύτταρο. Πολύ αργότερα οι Harris και συν το 1988 κατόρθωσαν να αποδείξουν ότι η ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων όγκου ποντικού σε συγγενικά ζώα μπορούσε να κατασταλεί όταν τα καρκινικά κύτταρα συντήκονταν με φυσιολογικά. Διατύπωσαν την υπόθεση ότι ο καρκίνος είναι υπολειπόμενη διαταραχή που θα μπορούσε να αναχαιτιστεί.

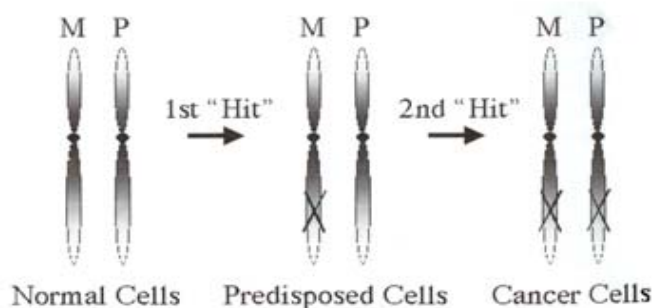
Για να επιβεβαιωθεί αυτή η υπόθεση μετεμφυτεύτηκαν συγκεκριμένα χρωμοσώματα σε καρκινικά κύτταρα, με αποτέλεσμα να καταστέλλονται οι ογκογόνες ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων (Weissman 1987). Με ανάλογα πειράματα βρέθηκε π.χ ότι το χρωμόσωμα 4 του ανθρώπου μπορούσε να καταστείλει την κακοήθεια (Evans 1982). Τα υβρίδια εκείνα τα οποία αφενός χαρακτηρίζονταν από απώλεια συγκεκριμένων χρωμοσωμάτων και αφετέρου από την ικανότητα τους να επάγουν όγκους σε πειραματόζωα, οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι τα συγκεκριμένα χρωμοσώματα φέρουν ογκοκατασταλτικά γονίδια. Αντίθετα, η επαναφορά των χρωμοσωμάτων αυτών στα υβρίδια συνοδεύονταν από μείωση του καρκινικού φαινοτύπου, γεγονός που επίσης αποδείκνυε και ότι τα γονίδια αυτά θα πρέπει να συμπεριφέρονται γενετικά με τρόπο υπολειπόμενο (Saxon 1986, Shimizu 1990).

2.5.3 Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια στους οικογενείς καρκίνους : το μοντέλο του ρετινοβλαστώματος

Η δεύτερη ένδειξη για την ύπαρξη των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, προέρχεται από μελέτες σε κληρονομικούς καρκίνους, καρκίνους δηλαδή με συνήθως αυτοσωματική επικρατούσα κληρονομικότητα και τάση προσβολής σε νεαρότερες ηλικίες, σε σύγκριση με τους σποραδικούς.

Πρότυπο των μελετών για τους κληρονομικούς καρκίνους αποτέλεσε το ρετινοβλάστωμα. Προσβάλλει τον αμφιβληστροειδή και αποτελεί τον πιο συχνό οφθαλμικό όγκο της παιδικής ηλικίας. Το 1964 ο Francois ανέφερε ότι η επίπτωση του ποικίλει από 1/34000 έως 1/14.000 παιδιά, με ολοένα αυξανόμενη συχνότητα τις τελευταίες δεκαετίες, χωρίς σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε φύλα και φυλές (Francois 1964), όπως επιβεβαιώθηκε και από μεταγενέστερες μελέτες (Mahoney 1990). Το 1971 ο Knudson σε επιδημιολογική μελέτη για το ρετινοβλάστωμα διαπίστωσε ότι οι περισσότερες περιπτώσεις της νόσου (60%) ήταν σποραδικές με ετερόπλευρη εμφάνιση του όγκου. Υπήρχαν όμως και οι οικογενείς μορφές - κληρονομικές (40%) όπου φαινόταν ότι η νόσος κληρονομείται με αυτόσωμο επικρατούντα χαρακτήρα. Σε αυτές τις περιπτώσεις η νόσος εκδηλώνονταν σε μικρότερη ηλικία, ήταν πολυεστιακή, αμφοτερόπλευρη σε ποσοστό 25% και ετερόπλευρη σε ποσοστό 15%. (Knudson 1971). Μελετώντας το γενεαλογικό δένδρο των κληρονομικών μορφών διατύπωσε την υπόθεση των «δύο χτυπημάτων» ("two hit theory"). Δυο μεταλλακτικά γεγονότα είναι απαραίτητα για να εκδηλωθεί το ρετινοβλάστωμα. Θεώρησε ότι στην οικογενή μορφή της νόσου το πρώτο «χτύπημα» είναι μια μεταλλαγή στο γαμετικό κύτταρο, πατρικό ή μητρικό, βρίσκεται σε όλα τα κύτταρα του οργανισμού και κληρονομείται. Παρ' όλα αυτά απενεργοποίηση του ενός μόνο αλληλόμορφου γονιδίου είναι ανεπαρκής για την

ανάπτυξη κακοήθειας. Ένα δεύτερο «χτύπημα», που αφορά μεταλλαγή του εναπομείναντος αλληλόμορφου στο σωματικό κύτταρο (ρετινοβλάστη), είναι αναγκαίο για να εκδηλωθεί η νόσος (σχήμα 6).



Σχήμα 6: Θεωρία των «δύο χτυπημάτων»(Knudson 1971,τροποποιημένο)

Δεδομένου του μεγάλου αριθμού των ρετινοβλαστών στο μάτι ($>10^7$) οι οποίες είναι σε κίνδυνο, επειδή ήδη όλες κατά τη γέννηση του πάσχοντος έχουν μια μεταλλαγή, ένα δεύτερο «κτύπημα» θα συμβεί αρκετά συχνότερα και θα προκαλέσει όγκους στον ένα τουλάχιστον οφθαλμό, συνηθέστερα όμως και στους δύο. Στη σποραδική μορφή της νόσου και οι δυο μεταλλαγές είναι σωματικές και αφορούν το ίδιο κύτταρο. Η πιθανότητα να συμβούν δυο μεταλλαγές στο ίδιο υγιές ως εκείνη την ώρα σωματικό κύτταρο (ρετινοβλάστη) είναι πολύ μικρή, γι αυτό η σποραδική μορφή της νόσου είναι μονοεστιακή και ετερόπλευρη (Hethcote 1978, Knudson 1978). Το 1993 επιβεβαιώθηκε η υπόθεση του Knudson και κλωνοποιήθηκε το υπεύθυνο γονίδιο για το ρετινοβλάστωμα, το Rb-1 από τρεις ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες (Friend 1986, Lee 1987, Fung 1987).

Η σημασία της υπόθεσης του Knudson είναι διπλή. Αφενός μεν υπέδειξε τους μηχανισμούς μέσα από τους οποίους κληρονομούμενες και επίκτητες γενετικές βλάβες συνδυαζόμενες μπορούν να καταλήξουν σε κακοήθεια, αφετέρου πρότεινε

την ιδέα της υπολειπόμενης γενετικής βλάβης στον καρκίνο, θέτοντας για πρώτη φορά τη θεωρητική βάση των πειραμάτων που ακολούθησαν.

2.5.4 Διερεύνηση και ταυτοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων.

Αρχικά για την εντόπιση χρωμοσωμικών περιοχών που περιείχαν ογκοκατασταλτικά γονίδια χρησιμοποιήθηκαν κυτταρογενετικές μελέτες, που ανίχνευαν τις δομικές ανωμαλίες των χρωμοσωμάτων στους ασθενείς με καρκίνο. Κατά αυτόν τον τρόπο εντοπίστηκαν χρωμοσωμικές μεταθέσεις ή απαλείψεις, οι οποίες υποδείκνυαν την ευρύτερη περιοχή στην οποία εντοπιζόνταν ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο. Ήδη το 1963 ο Lele KP και οι συν περιέγραψαν περίπτωση ρετινοβλαστώματος με έλλειψη στο χρωμόσωμα 13 (Lele 1963). Αργότερα, διαπιστώθηκε ότι οι ασθενείς με ρετινοβλάστωμα εμφάνιζαν στα κύτταρα του περιφερικού αίματος ενδιάμεσες απαλείψεις της περιοχής q14 του χρωμοσώματος 13, σε ποσοστό > 5% (Francke 1976) και σε λιγότερο από μια δεκαετία ο Ward P και οι συν εντόπισαν το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος Rb-1 στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 13, στην ζώνη 13q14 με ανάλυση σύνδεσης με το γονίδιο του ενζύμου D που εδράζεται επίσης στο 13q14 (Ward 1984).

Η μελέτη ενός ασθενούς με κληρονομικό καρκίνο και η ταυτοποίηση της σταθερής έλλειψης από τα κύτταρα του μιας συγκεκριμένης χρωμοσωμικής περιοχής, δεν αποτελεί απόδειξη ότι σε αυτή τη περιοχή υπάρχει ογκοκατασταλτικό γονίδιο το οποίο μεταβιβάζεται με τους κανόνες κληρονομικότητας του Mendel. Σε αυτές τις περιπτώσεις είναι αναγκαία η ανάλυση ανασυνδυασμού (linkage analysis), για να αποδειχθεί ότι στις περιπτώσεις που κληρονομείται ένας φαινότυπος, γενετικοί δείκτες μεταφέρονται από την υποψήφια γονιδιακή περιοχή, σε μεγάλο αριθμό συγγενών διαδοχικών γενεών μιας οικογένειας, με κληρονομούμενη μορφή

καρκίνου. Αν και η ανάλυση γενετικής σύνδεσης μπορεί να εντοπίσει με μεγαλύτερη ακρίβεια την θέση ενός ύποπτου γονιδίου, η ταυτοποίηση και η χαρτογράφηση του γονιδίου απαιτεί κλωνοποίηση του γονιδίου και λεπτομερή ανάλυση των μεταλλάξεων του. Πρόσφατο παράδειγμα της διαδικασίας αυτής αποτελεί η ανακάλυψη του γονιδίου που είναι υπεύθυνο για τον κληρονομικό καρκίνο του μαστού BrCa1 (Hall 1990).

Πολύ χρήσιμη και διαδεδομένη προσέγγιση στην ανακάλυψη ογκοκατασταλτικών γονιδίων αποτελεί η *μελέτη απώλειας της ετεροζυγωτίας (loss of heterozigocity ή LOH)*.

Κυτταρογενετικές αναλύσεις ρετινοβλαστώματος απέδειξαν ότι στην ανάπτυξη αυτού του όγκου σημαντική θέση κατέχει η χρωμοσωμική περιοχή 13q14 (Yunis 1978) η οποία συχνά σε βιοψίες όγκων υφίσταται απαλείψεις (Sparkes 1980, Balaban 1982). Σε αυτή την περιοχή πιθανολογήθηκε ότι εδράζεται το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος. Στη συνέχεια, βρέθηκε με γενετικές αναλύσεις σύνδεσης ότι το γονίδιο εκείνο που ευθύνεται για το ρετινοβλάστωμα, βρίσκεται συνδεδεμένο με το γονίδιο της εστεράσης D, το γονίδιο του οποίου είχε πρόσφατα χαρτογραφηθεί στην περιοχή 13q14 (Sparkes 1983). Μελετώντας το πολυμορφικό ένζυμο εστεράση D, (Ward 1984) σε ασθενείς με σποραδικό ρετινοβλάστωμα, διαπιστώθηκε ότι όλοι οι ασθενείς είχαν κατά 50% μειωμένα επίπεδα του ενζύμου τόσο στα κύτταρα του όγκου, όσο και στο αίμα τους. Οι ασθενείς όμως με κληρονομικό ρετινοβλάστωμα δεν είχαν καμιά δράση του ενζύμου εστεράση D στα κύτταρα του όγκου και παρουσίαζαν επίσης δραστικότητα ενζύμου στο αίμα μειωμένη κατά 50%. Θεωρήθηκε λοιπόν ότι α) το γονίδιο της εστεράσης D βρίσκεται κοντά στο γονίδιο που όταν δεν εκφράζεται προκαλεί ρετινοβλάστωμα, γι αυτό και ονομάστηκε γονίδιο ευαισθησίας για το ρετινοβλάστωμα, Rb-1 (Sparkes 1983), β) ενώ αναμένονταν οι

ασθενείς με κληρονομική μορφή (αυτοί δηλ που έφεραν ήδη μια μεταλλαγή στο γαμετοκύτταρο) να είναι ετεροζυγώτες (εξ ορισμού δεν ήταν ομοζυγώτες) για τους γενετικούς δείκτες της περιοχής αυτής, αποδείχθηκε ότι οι κληρονομικές μορφές τη νόσου δεν είχαν ποτέ ετερόζυγο φαινότυπο στους γενετικούς δείκτες της περιοχής αυτής. Αυτό οδήγησε στη διατύπωση του «δεύτερου χτυπήματος» για την επαγωγή του όγκου, που προκαλούσε την αδρανοποίηση του εναπομείναντος φυσιολογικού αλληλόμορφου, ήταν η απώλεια της ετεροζυγωτίας. Πράγματι, γενετικές αναλύσεις με πολυμορφισμό μήκους περιοριστικών θραυσμάτων και υβριδισμό κατά Southern, έδειξαν ότι η απώλεια της ετεροζυγωτίας αποτελεί σταθερό και χαρακτηριστικό γνώρισμα όχι μόνο του γονιδίου του ρετινοβλαστώματος, αλλά όλων των ογκοκατασταλτικών γονιδίων (Cavanee 1984).

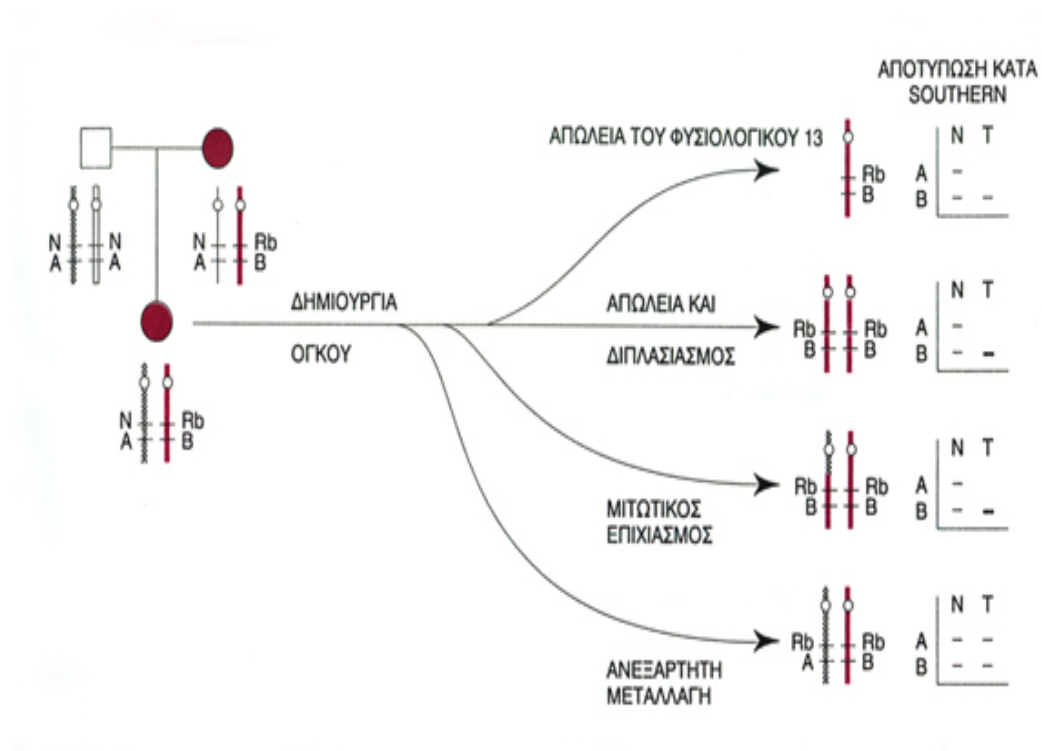
2.5.5 Μηχανισμός απώλειας της ετεροζυγωτίας

Όσον αφορά τον μοριακό μηχανισμό της απώλειας της ετεροζυγωτίας έχουν διατυπωθεί διάφορα μοντέλα τα οποία ερμηνεύουν το φαινόμενο αυτό (Cavanee 1983) (σχήμα 7).

- 1) *Μη σύνδεση*, που οδηγεί σε απώλεια ολόκληρου του χρωμοσώματος . Ανιχνεύεται σαν απώλεια του ενός αλληλόμορφου χωρίς αύξηση της έντασης του εναπομένου.
- 2) *De novo ενδιάμεση απώλεια* που ακολουθείται από διπλασιασμό του χρωμοσώματος στην περιοχή αυτή στο εναπομένον αλληλόμορφο.
- 3) *Μιτωτικός ανασυνδυασμός*, κατά τον οποίο συμβαίνει μια ανταλλαγή μεταξύ των ομόλογων χρωμοσωμάτων κατά τη διάρκεια της μείωσης που οδηγεί σε απώλεια εκείνων των τμημάτων περιφερικότερα του σημείου της χιασμοτυπίας
- 4) *Ανεξάρτητη μεταλλαγή*, στο φυσιολογικό χρωμόσωμα.

Η μελέτη απώλειας της ετεροζυγωτίας σε συνδυασμό με το πρότυπο των γενετικών δεικτών των γονέων του ασθενούς με κληρονομικό ρετινοβλάστωμα, έδειξαν πως το χρωμόσωμα εκείνο που υφίσταται την απώλεια είναι αυτό που προέρχεται από το γονέα που δεν είναι υπεύθυνος για την κληρονομικότητα του ρετινοβλαστώματος (Cavanee 1985). Χρησιμοποιώντας γενετικούς δείκτες που εντοπίζονται στην περιοχή που εδράζεται το ογκοκατασταλτικό γονίδιο, ανιχνεύεται η ύπαρξη απώλειας της ετεροζυγωτίας. Με τη μελέτη της απώλειας της ετεροζυγωτίας αφενός υποδεικνύεται η θέση νέων υποψήφιων ογκοκατασταλτικών γονιδίων και αφετέρου, αν αυτά είναι ήδη χαρακτηρισμένα, εκτιμάται ο βαθμός συμμετοχής των γονιδίων αυτών στην συγκεκριμένη νόσο.

Η διερεύνηση του τρόπου δράσης του πρώτου ογκοκατασταλτικού γονιδίου, του γονιδίου ευαισθησίας για το ρετινοβλάστωμα Rb-1, οδήγησε στην αναζήτηση και άλλων ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Με την προαναφερθείσα μεθοδολογία αποκαλύφθηκε η θέση αρκετών ογκοκατασταλτικών γονιδίων σε όλο το ανθρώπινο γονιδίωμα με το χαρακτηριστικό ότι η απώλεια της ετεροζυγωτίας περιορίζεται σε συγκεκριμένη - περιορισμένη χρωμοσωμική περιοχή. Ενδιαφέρον αποτελεί και το γεγονός ότι ο μοριακός μηχανισμός που ευθύνεται για την απώλεια της ετεροζυγωτίας σε κάθε περίπτωση δεν παρουσιάζει τυχαία κατανομή αλλά ανάλογα με τη χρωμοσωμική περιοχή που υφίσταται την απώλεια και το τύπο του όγκου, είναι συγκεκριμένος. Για την περίπτωση του ρετινοβλαστώματος είναι η απώλεια του χρωμοσώματος 13 συνοδευόμενη από διπλασιασμό (James 1989, Mulligan 1990, Oshimura 1985, Hansen 1987).



Σχήμα 7: Μηχανισμοί απώλειας της ετεροζυγωτίας και δημιουργίας ρετινοβλαστώματος σε ένα άτομο με οικογενές ρετινοβλάστωμα. Αριστερά απεικονίζεται το γενεαλογικό δένδρο ενός προσβεβλημένου θήλεος που έχει κληρονομήσει το ελαττωματικό Rb γονίδιο από την προσβεβλημένη μητέρα της. Τα τέσσερα χρωμοσώματα των δύο γονέων παριστάνονται έτσι ώστε να διακρίνεται η προέλευση τους. Ακριβώς κάτω από το γενετικό τόπο του ρετινοβλαστώματος υπάρχει ένας πολυμορφικός δείκτης για αυτή την οικογένεια. Η πάσχουσα κόρη είναι AB ως προς τον πολυμορφικό δείκτη, όπως και η μητέρα της, ενώ ο πατέρας είναι AA. Στο χρωμόσωμα που φέρει το ελαττωματικό γονίδιο εντοπίζεται ο δείκτης B. Ο όγκος δημιουργείται όταν το φυσιολογικό αλληλόμορφο (N) του γονιδίου που η πάσχουσα κληρονόμησε από τον πατέρα της αδρανοποιηθεί. Στα δεξιά φαίνονται οι τέσσερις μηχανισμοί που μπορεί να συμβεί αυτό: 1) απώλεια του φυσιολογικού 13 2) απώλεια και διπλασιασμός 3) μιτωτικός ανασυνδυασμός 4) σημειακή μετάλλαξη ή απάλειψη (Cavanee et al 1984)

2.5.6 Μηχανισμοί αδρανοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων

Όπως τα πρωτοογκογονίδια, ενεργοποιούνται σε ογκογονίδια έτσι και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια αδρανοποιούνται με:

- 1) σημειακή μετάλλαξη
- 2) απάλειψη
- 3) χρωμοσωμική μετάθεση

Στην αδρανοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων δεν παρατηρείται ο μηχανισμός μόλυνσης με ρετροϊό αλλά οι μηχανισμοί:

4) υπομεθυλίωσης της CpG περιοχής του ογκοκατασταλτικού γονιδίου

5) ακετυλίωσης στις ιστόνες, κυρίως της H₄

2.5.7 Λειτουργία των ογκοκατασταλτικών γονιδίων

Με την προαναφερθείσα μεθοδολογία έχουν ταυτοποιηθεί και κλωνοποιηθεί 12 ογκοκατασταλτικά γονίδια (πίνακας 3) και τουλάχιστον αλλά 7 έχουν προταθεί (πίνακας 4), χωρίς να έχει διευκρινιστεί πλήρως η λειτουργία όλων των αποδεδειγμένα ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Είναι βέβαια γνωστό ότι δρουν σε διάφορες θέσεις μέσα στο κύτταρο και με διαφορετικούς τρόπους. Μερικά από αυτά φαίνεται να ανταγωνίζονται άμεσα ή έμμεσα την λειτουργία πρωτοογκογονιδίων όσο αφορά την ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Τα πιο αντιπροσωπευτικά ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι:

Το γονίδιο p53 εντοπίζεται στο 17p13 και κωδικοποιεί για μια πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη η οποία είναι μεταγραφικός παράγοντας, προσδένεται δηλ στο DNA και ενεργοποιεί τη μεταγραφή ορισμένων γονιδίων (Guinn 1997). Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη έχει δυο διαφορετικούς ρόλους. Όταν προκληθεί βλάβη στο DNA, η p53 αυξάνεται αναστέλλοντας τον κυτταρικό κύκλο στη G₁ φάση, έως η βλάβη να επιδιορθωθεί, αναστέλλοντας την αντιγραφή του DNA με αποτέλεσμα το κύτταρο να μην εισέρχεται στη S φάση με βλάβη στο DNA (Culotta 1993). Εάν αυτό το σημείο ελέγχου αποτύχει ή αν το κύτταρο διαιρείται ανεξέλεγκτα, η p53 οδηγεί το κύτταρο σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση). Η αποπτωτική δράση του p53 φαίνεται να τελείται μέσω ενεργοποίησης του αποπτωτικού γονιδίου BAX (Miyashita 1995). Τη δράση του p53 ανταγωνίζεται το γονίδιο "επιβίωσης" Bcl-2, το οποίο εκφράζεται έντονα κατά την εμβρυογένεση, ενώ μετά τη γέννηση εκφράζεται μόνο σε αρχέγονα κύτταρα, όπως τα πολυδύναμα κύτταρα του αιμοποιητικού (Kalmanti & Dimitriou 1998). Για το πρωταρχικό του ρόλο στη

διατήρηση της πιστότητας του DNA, το p53 έχει χαρακτηριστεί «φύλακας του γονιδιώματος» (Levine 1997).

Έχουν καταγράψει περισσότερο από 3400 διαφορετικές μεταλλάξεις του p53 στη βάση δεδομένων EMBL. Οι μεταλλάξεις αυτές λειτουργικά, είτε αυξάνουν το χρόνο ημίσειας ζωής της πρωτεΐνης p53, είτε αναστέλλουν την ενεργοποίηση της μεταγραφής συγκεκριμένων γονιδίων από την πρωτεΐνη (Maklin 1993).

Το γονίδιο APC, (adenomatous polyposis coli) που εντοπίζεται στο 5q21 ενέχεται στην ανάπτυξη της πολλαπλής οικογενούς πολυποδίασης (Caspari 1994). Το γονίδιο DCC (deleted in colorectal carcinoma), εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 18 και το γονίδιο MCC (mutated in colorectal cancer), που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 5, σχετίζονται επίσης με το σποραδικό καρκίνο του παχέος εντέρου (Fearon, Vogelstein 1990).

Τα γονίδια WT1 και WT2 (Wilm's Tumor) εντοπίζονται στο 11p13 και 11p15 αντίστοιχα, σχετίζονται με το νεφροβλάστωμα (Rahman 1996).

Το γονίδιο BrCa1 (breast cancer 1) εντοπίζεται στο 17q21. Το 60% των γυναικών που κληρονομούν ένα μεταλλαγμένο BrCa1 εμφανίζουν καρκίνο μαστού ως την ηλικία των 50 ετών (Easton 1995).

Τα περισσότερα ογκοκατασταλτικά γονίδια εκφράζονται σε παρόμοια επίπεδα σε όλους τους ιστούς. Αυτό δυσκολεύει την ερμηνεία της παρατήρησης, ότι σε ανθρώπους με κληρονομούμενη βλάβη του αλληλόμορφου ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου, εμφανίζεται ένα περιορισμένο είδος όγκων. Παράδειγμα, οι ασθενείς που έχουν κληρονομήσει μετάλλαξη στο Rb-1, αναπτύσσουν μια περιορισμένη σειρά όγκων, όπως ρετινοβλάστωμα στην παιδική ηλικία, οστεοσάρκωμα ή σαρκώματα μαλακών μορίων.

Στο πίνακα 3 αναφέρονται μερικά ογκοκατασταλτικά γονίδια όπως επίσης τα νεοπλάσματα και τα σύνδρομα που σχετίζονται με αυτά.

2.5.8 Χαρακτηρισμός υποψήφιων ογκοκατασταλτικών γονιδίων

Η ανίχνευση ογκοκατασταλτικών γονιδίων είναι δύσκολη διαδικασία. Μέχρι τώρα έχει βρεθεί ένας αριθμός πιθανών ογκοκατασταλτικών γονιδίων που συχνά είναι στόχος της απώλειας της ετεροζυγωτίας, όμως δεν έχει βρεθεί συσχέτιση τους με συγκεκριμένο είδος όγκων. Κάποια από αυτά εκφράζονται σε πολύ χαμηλό επίπεδο ή απουσιάζουν σε μερικούς όγκους, ενώ άλλα δείχνουν να καταστέλλουν την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων *in vivo*. Τέλος, για να καταλήξει κάποιος στο συμπέρασμα ότι ένα γονίδιο είναι ή όχι, ογκοκατασταλτικό, πρέπει να αποκλείσει το ενδεχόμενο ότι η αλλοιωμένη έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου είναι αποτέλεσμα των τροποποιημένων ιδιοτήτων των καρκινικών κυττάρων. Στον πίνακα 4 αναφέρονται υποψήφια ογκοκατασταλτικά γονίδια και πιθανά νεοπλάσματα με τα οποία σχετίζονται.

Πίνακας 3 : Ογκοκατασταλτικά γονίδια και σχετιζόμενα σύνδρομα και νεοπλασμάτα

Γονίδιο	Σύνδρομο	Συχνότερο νεόπλασμα
Rb-1	οικογεν ρετινοβλάστωμα	ρετινοβλάστωμα, οστεοσάρκωμα προστάτη, ουρ. κύστη, πάγκρεας, στομάχου, οισοφάγου
p53	Li- Fraumeni	50% σε όλους τους τύπους καρκίνων εγκεφάλου, λέμφωμα, μαστού, σάρκωμα κ.α
p16/INK4	κληρονομικό μελάνωμα	μελάνωμα, καρκίνος παγκρέατος
p14(p19)	οικογενές μελάνωμα ;	15% σε διάφορους όγκους
APC	οικογενής αδενωμάτωσης πολυποδίαση, σ. Gardner	αδενωμάτωσης πολύποδες, καρκίνος παχέος εντέρου
NF-1	νευρονωμάτωση τύπου1	αμαρτώματα, γλοιώματα, νευρινώματα, νευροβλάστωμα
NF-2	νευρονωμάτωση τύπου 2	σβανώματα, μηνιγγιώματα
BRCA 1	κληρονομικός καρκίνος μαστού και ωθηκών	μαστού, ωθηκών
BRCA 2	καρκίνος μαστού(♀,♂)	
VHL	σ.Von-Hippel Lindau	φαιοχρωμοκύττωμα, όγκοι νεφρού, αιμαγγειωβλάστωμα
WT-1	σ WARG	νεφροβλάστωμα
MEN-1	κληρονομική πολλαπλή ενδοκρινική νεοπλασία I	αδένωμα παραθυρεοειδούς και υπόφυσης, ενδοκρινικοί όγκοι παγκρέατος.
TSC1, 2	οζώδης σκλήρυνση	άγνωστοι

Πίνακας 4: Υποψήφια ογκοκατασταλτικά γονίδια και πιθανά συσχετιζόμενα σύνδρομα και νεοπλάσματα

Γονίδιο	σύνδρομο	συχνότερο νεόπλασμα
DPC4	νεανικής οικογ. πολύ/σης	παγκρέατος, παχέος εντέρου, και άλλα
E- καντερίνη		στομάχου, μαστού, ενδομητρίου, ωοθηκών
α- κατενίνη		προστάτη, πνεύμονα
DCC		παχέος εντέρου, εγκεφάλου νευροβλάστωμα
PTEN/MMCA1	σ. Cowden	μαστού, θυρεοειδούς γλοίωμα, προστάτη
TGF-βII R		παχέος εντέρου
Περιοχή 9q22-31	σ Gorlin	μη μελανωτικός καρκίνος του δέρματος, μυελοβλάστωμα

2.5.9. Πρότυπα όγκων στους οποίους μόνο η απώλεια της ετεροζυγωτίας δεν επαρκεί για την ανάπτυξη τους

Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα καρκίνου στον οποίο δεν μπορεί να γίνει πιστή εφαρμογή του πρότυπου για την απώλεια της ετεροζυγωτίας, είναι ο όγκος Wilms (νεφροβλάστωμα) που προσβάλλει αποκλειστικά παιδιά.

Μελέτες απώλειας της ετεροζυγωτίας σε συνδυασμό με γενετική ανάλυση σύνδεσης, έδειξαν ότι η ανάπτυξη της νόσου σχετίζεται με έλλειψη στη χρωμοσωμική περιοχή 11p13 (Francke 1979) και 11p15 (Koufos 1989). Τα δεδομένα αυτά βρίσκονται σε απόλυτη αρμονία με το μοντέλο των «δυσχτυπημάτων» για τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, που στην προκειμένη περίπτωση θα έπρεπε να εντοπίζονται στις προαναφερθείσες χρωμοσωμικές περιοχές. Δεδομένα όμως που περιέπλεκαν την υπόθεση αυτή, προέκυψαν με την παρατήρηση ότι η εφαρμογή του μοντέλου αυτού προβλέπει την αδρανοποίηση, με ίσες πιθανότητες, τόσο του μητρικού όσο και του πατρικού αλληλομόρφου, στους όγκους του Wilms το αλληλόμορφο που συνήθως χάνονταν ήταν αυτό που κληρονομούνταν από τη μητέρα (Huff 1990). Έπειτα από περαιτέρω μελέτες η ερμηνεία που δόθηκε ήταν αυτή της *γονιδιακής εντύπωσης* (genomic imprinting) (Sapienza 1989). Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, ένα γονίδιο το οποίο δεν εντοπίζεται – και κατά συνέπεια δεν εμφανίζει γενετική σύνδεση – στο βραχίονα 11p, επηρεάζει την έκφραση του ενός από τα δυο αλληλόμορφα του γονιδίου στον 11p βραχίονα, με αποτέλεσμα να εκφράζονται εκλεκτικά (Scrabble 1989). Προκύπτει λοιπόν, ότι στους μοριακούς μηχανισμούς της καρκινογένεσης εμπλέκονται και άλλοι που περιπλέκουν τα φαινόμενα. καθώς, όπως στη συγκεκριμένη περίπτωση συσχετίζονται και με την επίδραση του άλλου γονέα μέσω φαινομένων *γονιδιακής εντύπωσης*.

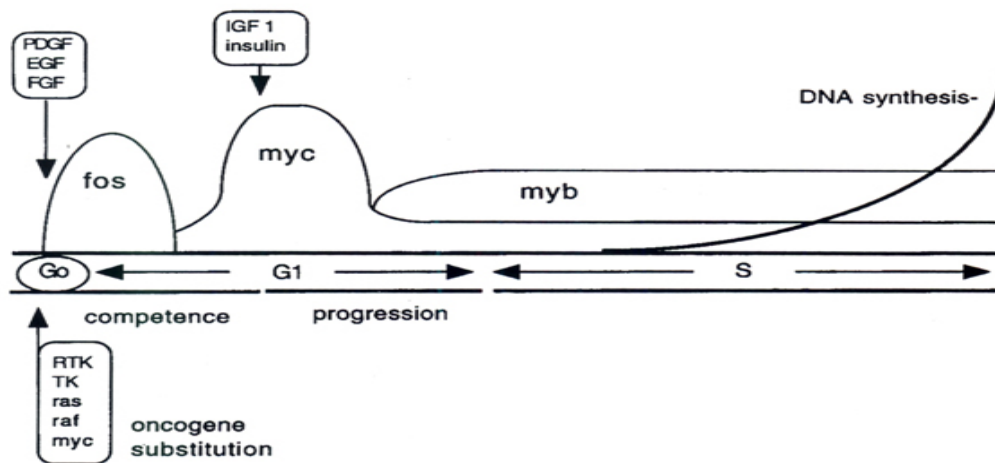
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΓΟΝΙΔΙΑ Rb-1 ΚΑΙ Kip1/p27

3.1 Κυτταρικός κύκλος

Σε ανταπόκριση στο εξωτερικό περιβάλλον και στις εσωτερικές του απαιτήσεις, το κύτταρο θα πολλαπλασιαστεί, θα υποστεί απόπτωση ή θα παραμείνει διαφοροποιημένο (νευρικά κύτταρα) (Hunter 1993). Η διαδικασία της κυτταρικής αναπαραγωγής, δηλ η χρονική περίοδος μεταξύ του τέλους της μιας κυτταρικής διαίρεσης μέχρι το τέλος της επόμενης κυτταρικής διαίρεσης, καλείται *κυτταρικός κύκλος*, ο οποίος διαιρείται σε τέσσερις φάσεις: φάση S (συνθετική), φάση M (μίτωση), φάση G₁ και G₂ και φάση ηρεμίας G₀, όπου τα κύτταρα βρίσκονται και σε μια «εναλλακτική» κατάσταση πολύ χαμηλού μεταβολισμού (Hartwell 1989).

Η απόφαση αν θα εγκαταλείψουν την G₀ και θα προχωρήσουν σε πολλαπλασιασμό, εξαρτάται από την ισορροπία ανάμεσα σε μιτογόνα ή ανασταλτικά μηνύματα. Παρουσία των παραγόντων PDGF, FGF ή EGF ή ενεργοποίηση των ογκογονιδίων *ras*, *myc*, *raf*, οδηγούν το κύτταρο στη φάση G₁ (Elledge 1996) (σχήμα 8).



Σχήμα 8: Αναπαράσταση της συνδυασμένης δράσης δυο συμπληρωματικών γονιδίων για τη επαγωγή της σύνθεσης του DNA. Μια πρόσκαιρη αύξηση του c-fos και του c-myc συμβαίνει μετά τη δράση των PDGF, FGF, EGF, ή μετά από κατεργασία κυττάρων με εστέρα φορβόλης. Τα κύτταρα χρειάζονται ινσουλίνη ή αυξητικό παράγοντα ινσουλίνης 1 για να εξελιχθούν στον κυτταρικό κύκλο. Αρκετά ογκογονίδια μπορούν να αντικαταστήσουν την ανάγκη για τους ανωτέρω αυξητικούς παράγοντες. PDGF: αυξητικός παράγοντας που προέρχεται από αιμοπετάλια, EGF: επιδερμικός αυξητικός παράγοντας, FGF: αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών, IGF: αυξητικός παράγοντας ινσουλίνης (Park 2002).

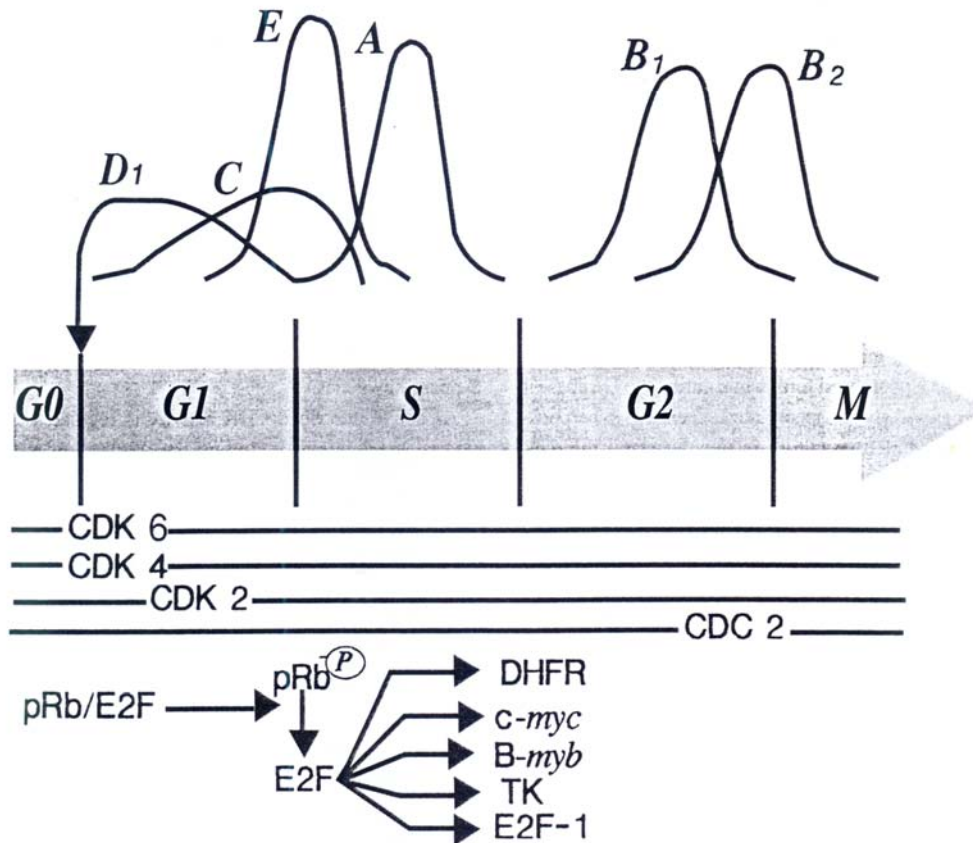
Της διαδικασίας εξόδου του κυττάρου από τη φάση G_1 , προηγείται ένας κεντρικός μηχανισμός που ονομάστηκε σημείο περιορισμού (restriction point), ή σημείο R, το ανάλογο σημείο START στη μαγιά. Το σημείο περιορισμού θεωρείται ότι βρίσκεται κατά το μέσο προς τέλος της φάσης G_1 , και είναι το πρώτο «σημείο ελέγχου» στη σωστή λειτουργία του κυτταρικού κύκλου (Russell 1998). Το σημείο R είναι η στιγμή του κύκλου όπου αφ' ότου το κύτταρο την περάσει δεν υπακούει πλέον στα προαναφερθέντα αυξητικά ερεθίσματα, αλλά ούτε και σε ανασταλτικά όπως ο TGFβ, γίνεται δηλαδή ανεξάρτητο μιτογόνων. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν απολέσει αυτό το σημείο ελέγχου (Hartwell 1994).

3.2.1 Κυκλίνες-κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες CDK (Cyclin-Dependent Kinase)

Η μετάβαση του κυτταρικού κύκλου από τη μια φάση του κύκλου στην επόμενη, ρυθμίζεται πλέον από τις κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες CDK (Cyclin-Dependent Kinase). Οι CDKs είναι ετεροδιμερή ένζυμα που αποτελούνται από μια ρυθμιστική και μια ενζυμική υποομάδα : η μικρότερη υποομάδα με την ενζυμική δραστηριότητα είναι μια *κινάση* που φωσφορυλιώνει ορισμένες σερίνες και θρεονίνες πρωτεϊνών. Η άλλη υποομάδα είναι μια *κυκλίνη*, που συντίθεται περιοδικά στη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (και από εκεί προέρχεται η ονομασία της). Η σύνθεση της κυκλίνης αρχίζει στην αρχή της φάσης G₁. Ο ρυθμός σύνθεσης της καθορίζεται τόσο από τη καθορισμένη μεταγραφή του γονιδίου που την κωδικοποιεί, όσο και από την ελεγχόμενη πρωτεόλυση μέσω των πρωτεασών. Αυξάνεται, καθώς εξελίσσεται ο κύκλος, για να διακοπεί η σύνθεση της προς το τέλος της μίτωσης. Η κινάση είναι ενεργός όταν είναι συνδεδεμένη με την αντίστοιχη κυκλίνη, γι αυτό ονομάζεται *CDK (Cyclin-Dependent Kinase) κυκλινοεξαρτώμενη κινάση*. Η συγκέντρωση της κινάσης παραμένει σταθερή καθ όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, αλλά η δραστηριότητα του συμπλόκου κυκλίνη-CDK εξαρτάται από τη συγκέντρωση της κυκλίνης και από μια σειρά φωσφορυλιώσεων.

Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί 13 κυκλίνες στον άνθρωπο, διαφορετικές για την κάθε φάση του κυτταρικού κύκλου (σχήμα 9) (Ragione 1996). Ταξινομούνται στις κυκλίνες της φάσης G₁ και στις κυκλίνες της μίτωσης. Οι κυκλίνες C, D₁₋₄ και η E₁₋₂, F και G σχετίζονται με τη φάση G₁ φάση. Οι κυκλίνες A σχετίζονται με την όψιμη G₁ και την S φάση και οι κυκλίνες B₁₋₃ σχετίζονται με τη G₂/M. Όλες περιέχουν την ίδια ομόλογη περιοχή 100 αμινοξέων που ονομάζεται «*κουτί κυκλίνης*» (cyclin box), το οποίο είναι η περιοχή σύνδεσης της κυκλίνης με την αντίστοιχη CDK. Οι κυκλίνες της φάσης G₁, είναι βραχύβιες (χρόνος ημίσειας ζωής 20 min). Αποδομούνται από

μια πρωτεΐνη που ονομάζεται PEST, όταν ολοκληρώσουν τη δράση τους. Οι μιτωτικές κυκλίνες έχουν μακρύτερο χρόνο ζωής και αποδομούνται από τις πρωτεϊνάσες, πριν την είσοδο στη μίτωση.



Σχήμα 9: Αναπαράσταση της δράσης των κυκλινών, κυκλινοεξαρτημένων κινασών στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Η φωσφορυλίωση της pRb από τις CDK4/6 κατά τη G₁φάση, οδηγεί σε απελευθέρωση και ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα E2F, ο οποίος στη συνέχεια ενεργοποιεί τη μεταγραφή διαφόρων γονιδίων ώστε να είναι εφικτή η εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου στη S φάση (Ragione 1996).

Οι πρωτογενείς G₁ κυκλίνες της ομάδας D (D₁, D₂, D₃, D₄) και η E, συνδέονται με τις κινάσες CDK4/6. Η σύνθεσή τους ρυθμίζεται από μιτογόνους παράγοντες. Η δράση τους ασκείται στο μέσο της φάσης G₁, διαρκεί όσο εξακολουθεί η ύπαρξη

μιτογόνων, ενώ απόσυρση των τελευταίων οδηγεί σε διακοπή της σύνθεσης τους και αποδόμηση από την πρωτεΐνη PEST. Απώλεια της λειτουργίας της κινάσης εξαρτώμενης από τη D₁, πριν τη φάση G₁, δεν επιτρέπει στο κύτταρο να εισέλθει στη S φάση. Η απώλεια της, αργότερα στο κυτταρικό κύκλο δεν έχει επίπτωση (Baldin 1993).

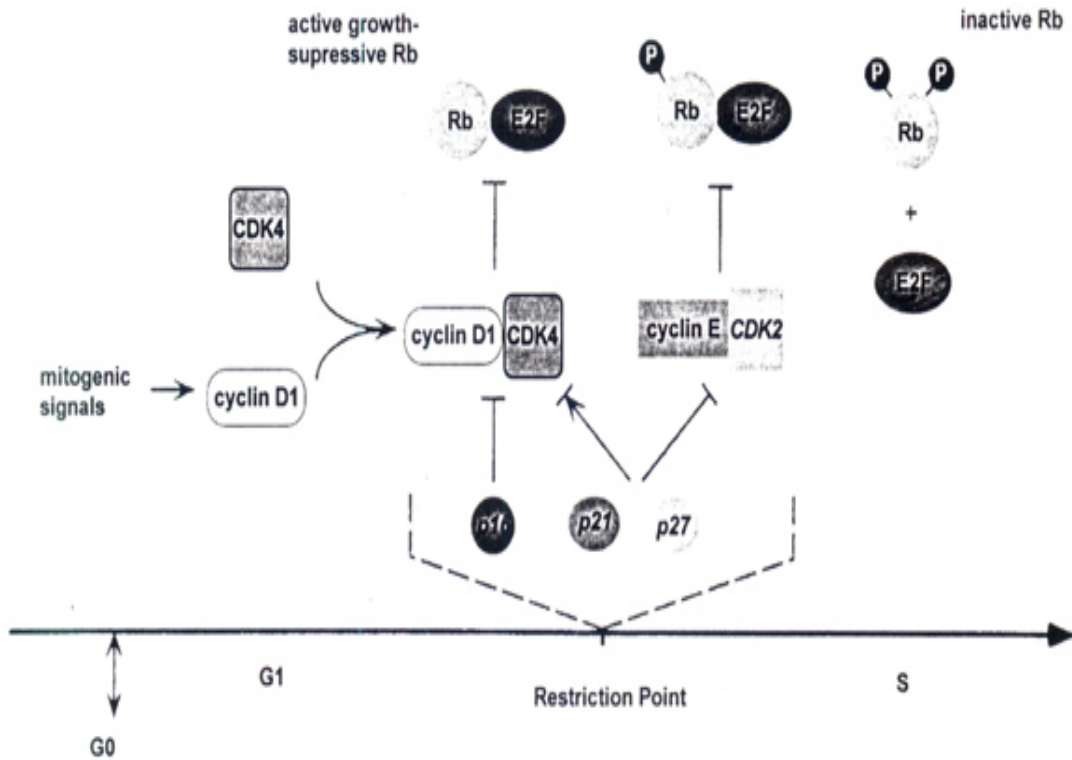
Έχουν ταυτοποιηθεί 8 ανθρώπινες CDKs. Οι CDKs είναι ενεργές όταν είναι σε σύμπλοκο με τις αντίστοιχες κυκλίνες και φωσφορυλιθούν - αποφωσφορυλιθούν σε ειδικές θέσεις των κινασών (Morgan 1995).

3.2.2 Λειτουργικός ρόλος των D /CDK

Στόχος των κινασών αυτών είναι η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης του ογκοκατασταλτικού γονιδίου Rb, της pRb. Ένας τόσο ευαίσθητος και πολύπλοκος μηχανισμός, όπως αυτός του κυτταρικού κύκλου, πέρα από τη νομοτελειακή ρύθμισή του από τις CDKs, έχει ανάγκη από υψηλή επίβλεψη και από σημεία ελέγχου που εγγυώνται ότι μια συγκεκριμένη διαδικασία έχει ολοκληρωθεί σωστά πριν ξεκινήσει μια νέα. Έχουν αναπτυχθεί μηχανισμοί οι οποίοι σταματούν τον κυτταρικό κύκλο όταν αυτός υποστεί βλάβη, έως ότου αυτή αναιρεθεί. Ο σημαντικότερος αυτών των μηχανισμών ασκείται από το γονίδιο p53, όπως προαναφέρθηκε, το οποίο προκαλεί αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη G₁ φάση, όταν παρουσιαστεί βλάβη στο DNA (Lane 1992). Η πρωτεΐνη p53 έχει πολύ μικρό χρόνο ημίσειας ζωής (20 min) και δεν ανιχνεύεται στα φυσιολογικά κύτταρα. Συσσωρεύεται στα κύτταρα των οποίων το DNA έχει υποστεί βλάβη, και ενεργοποιεί το γονίδιο WAF 1, που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p21, η οποία είναι αναστολέας των κυκλινών - CDKs, (D/CDK4, E/CDK2 και A/CDK2) (Deng 1995). Αυτό εμποδίζει τη φωσφορυλίωση της pRb, δεν απελευθερώνεται ο μεταγραφικός παράγοντας E2F ο

ο οποίος επάγει τη μεταγραφή γονιδίων που απαιτούνται για τη σύνθεση του DNA ώστε το κύτταρο να μη μπορεί να περάσει στη S φάση και παραμένει στη G₁. Παράλληλα, το γονίδιο p53 δρώντας απευθείας στην περιοχή επαγωγής του γονιδίου Rb, αυξάνει τα επίπεδα της παραγόμενης πρωτεΐνης pRb, επιτείνοντας την αναστολή του κύκλου. Καθώς το κύτταρο παραμένει στη G₁ φάση έχει τον απαιτούμενο χρόνο ώστε να επιδιορθώσει τη βλάβη στο DNA. Εάν αυτό συμβεί, η p53 αποδομείται άμεσα, αναστέλλεται η παραγωγή της p21, απελευθερώνονται οι κυκλίνες- CDKs που φωσφορυλιώνουν τη pRb, και ο κυτταρικός κύκλος εξελίσσεται στη S φάση. Εάν όμως η βλάβη στο DNA δεν είναι εφικτό να διορθωθεί, η p53 οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση.

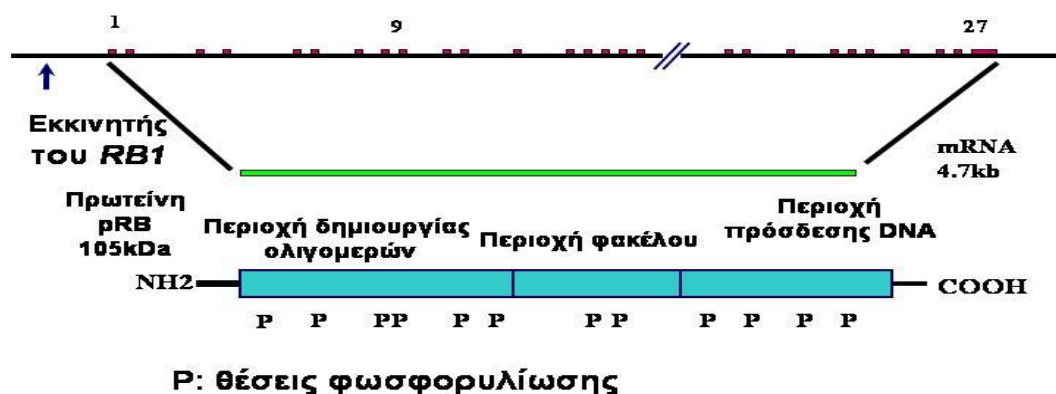
Τα παραπάνω συνοψίζονται περιγραφικά στο παρακάτω σχήμα 10 και καθιστούν σαφές ότι τόσο ο ρόλος του Rb-1 όσο και των κυκλινών D και E στον κυτταρικό κύκλο είναι αναντικατάστατος.



Σχήμα 10: Απεικόνιση ρυθμιστικών δικτύων που ευθύνονται για την εξέλιξη της G1 Φάσης και δρουν ταυτόχρονα στο σημείο περιορισμού (R). Μιτογόνα μηνύματα οδηγούν στη σύνθεση της κυκλίνης D1. Οι αναστολείς των CDKs p21 και p27 παίζουν ρόλο και στη συνάθροιση και στην τροποποίηση της ενεργότητας των συμπλεγμάτων κυκλίνης-D1- CDK4. Οι κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες D1 και E ρυθμίζουν αρνητικά την κατασταλτική αυξητική δράση του Rb-1. Φωσφορυλίωση του Rb-1 οδηγεί σε απελευθέρωση του E2F που προάγει την έκφραση γονιδίων απαραίτητων για την είσοδο στη S φάση. (Ewen 2000).

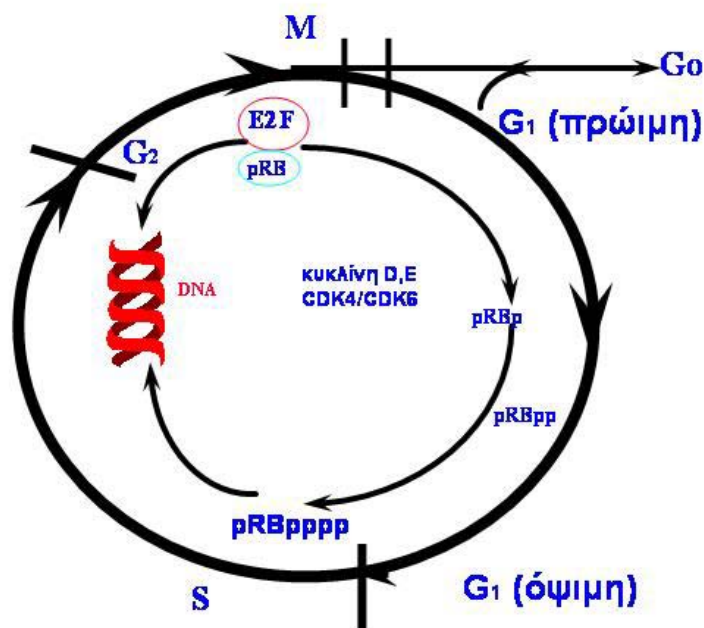
3.3 Το γονίδιο ευαισθησίας του ρετινοβλαστώματος Rb-1

Οι μελέτες συσχέτισης ογκογονιδίων και καρκίνου άρχισαν στα μέσα της δεκαετίας του 1970, αλλά μόλις το 1986 ταυτοποιήθηκε το πρώτο ογκοκατασταλτικό γονίδιο, το γονίδιο ευαισθησίας για το ρετινοβλάστωμα, Rb-1 σε κληρονομικό ρετινοβλάστωμα, στο οποίο οφείλει και το όνομα του (Friend 1986). Η ταυτοποίηση του ερμήνευσε τη μοριακή βάση του κληρονομικού ρετινοβλαστώματος με τον μηχανισμό της αδρανοποίησης και των δυο αλληλομόρφων του γονιδίου (Goodbout 1983). Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι το γονίδιο αυτό εδράζεται στο χρωμόσωμα 13q14, αποτελείται από 27 εξόνια που καταλαμβάνουν 180 Kb στο ανθρώπινο γονιδίωμα (Lee 1987). Το μεταγραφικό του mRNA 4,8 Kb εκφράζεται σε όλους τους ιστούς (Goodrich and Lee 1993), κωδικοποιεί για μια πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη με ικανότητα πρόσδεσης στο DNA (Lee 1987), μοριακού βάρους στη φωσφορυλιωμένης της μορφή 105 KD, που συμβολίζεται p105. Αποτελείται από 928 αμινοξέα με 12 θέσεις φωσφορυλίωσης σερίνης-θρεονίνης (Burke 1992) (σχήμα 11).



Σχήμα 11 : Διαγραμματική αναπαράσταση του γονιδίου του Rb-1

Η pRb, η πρωτεΐνη του Rb-1, είναι πρωτεΐνη-κλειδί που ρυθμίζει τη μετάβαση των φυσιολογικών κυττάρων από την G₁ στην S φάση του κυτταρικού κύκλου (Goodrich 1991). Η ρύθμιση αυτή επιτυγχάνεται μέσω ρυθμίσεων του επιπέδου φωσφορυλίωσης της. Το κύτταρο δε διαιρείται αφού η πρωτεΐνη Rb-1 είναι αδρανής όσο είναι υποφωσφορυλιωμένη (DeCario 1989) δεσμεύοντας σε σύμπλοκο το σπουδαιότερο μεταγραφικό παράγοντα E2F (σχήμα 12). In vivo και in vitro μελέτες έχουν αποδείξει ότι η pRb φωσφορυλιώνεται κυρίως από τις κυκλίνες D₁CDK_{4/6} και τις E/CDK₂ (Hinds 1992, Pines 1995). Με τη φωσφορυλίωση της pRb, απελευθερώνει ο E2F, η απελευθέρωση του οποίου απαιτείται για την ενεργοποίηση γονιδίων, για τη μετάβαση των φυσιολογικών κυττάρων από την G₁ στη S φάση του κυτταρικού κύκλου.



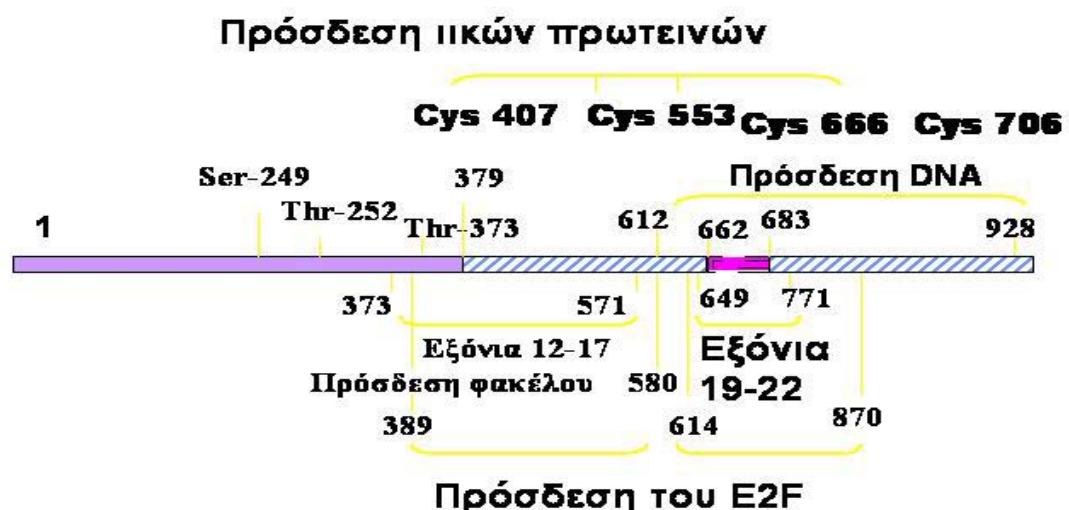
Σχήμα 12: Διαγραμματική αναπαράσταση φωσφορυλίωσης της pRb κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου

Ο μεταγραφικός παράγοντας E2F προσδένεται σε συγκεκριμένη αλληλουχία του DNA και ενεργοποιεί τα πρωτοογκογονίδια *c-myc*, *fos*, *cdc-2* και την DNA πολυμεράση για να αρχίσει η αντιγραφή (Chellapan 1991). Παράλληλα και η υπερφωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη *pppp-rRb* προσδένεται σε καθορισμένη αλληλουχία του DNA και ενεργοποιεί την RNA πολυμεράση ώστε να αρχίσει η μεταγραφή. Η *pRb* αποφωσφορυλιώνεται καθώς το κύτταρο περνά από τη G_2/M στη G_0/G_1 φάση (Sen 1993). Η *pRb* αδρανοποιείται από πρωτεΐνες ορισμένων ογκογόνων ιών. Οι ογκοπρωτεΐνες των ιών SV40 (T αντιγόνο) (De Caprio 1988), του αδενιοϊού (EIA) (Whyte 1988), και του παπιλώματος HPV-16 (E7) (Dyson 1989), μπορούν να προσδεθούν εκλεκτικά στην *pRb*, απελευθερώνοντας τον E2F, ο οποίος στη συνέχεια οδηγεί σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό τα προσβεβλημένα κύτταρα (Ludlow 1989) (σχήμα 13).

Η *pRb* εκτός από τον καθοριστικό ρόλο της στον πολλαπλασιασμό των αιμοποιητικών κυττάρων, συμμετέχει και στη διαφοροποίηση και καταστέλλει την απόπτωση (Haas-Kogan 1995). Ποντίκια *Rb*^{-/-} πεθαίνουν τη 13^η ημέρα της κύησης, παρουσιάζουν αναστολή της ωρίμανσης των ερυθροβλαστών και των νευρικών κυττάρων και εκτεταμένη απόπτωση (Lee 1992, Clarke 1992). Φυσικά, δεν είναι γνωστό εάν ζούσαν αυτά τα ποντίκια, στη συνέχεια αν θα ανέπτυσσαν λευχαιμία. Ένα κύτταρο με ελαττωματική *pRb* διαθέτει ένα πλεονέκτημα αύξησης, και δεν μπορεί να διαφοροποιηθεί ή να υποστεί απόπτωση. Συνεχίζει να διαιρείται ακατάλληλα, συμβάλλοντας στον κακοήγη μετασχηματισμό. Έτσι, ένα κακόηθες κύτταρο το οποίο αποκτά και *Rb-1* μεταλλαγή θα έχει μια επιπρόσθετη δυνατότητα αύξησης, η οποία το οδηγήσει σε περισσότερο επιθετική νόσο (Hansen 1988).

Το γονίδιο *Rb-1* εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα του ανθρώπινου σώματος, και στα αιμοποιητικά κύτταρα (Furukawa 1990). Αδρανοποιείται, με απαλείψεις

(deletions), ανασυνδυασμούς (rearrangements), κατά κύριο λόγο με μεταλλαγές (mutations) (Reissmann 1989). Οι μεταλλαγές ενώ θεωρητικά μπορούν να συμβούν στα περισσότερα εξόνια, σε ποσοστό 90% παρατηρούνται στα εξόνια 20-24 (Horowitz 1989, Yandell 1989, Mori 1990). Η σπουδαιότητα των μεταλλαγών στα συγκεκριμένα εξόνια ερμηνεύεται από το γεγονός ότι τα εξόνια αυτά κωδικοποιούν το τμήμα εκείνο της πρωτεΐνης το οποίο αφενός συνδέεται με τον E2F, αφ' ετέρου προσδένεται στο DNA. Μεταλλαγές συνεπώς στο τμήμα αυτό του γονιδίου οδηγούν πιθανά σε τροποποιημένη λειτουργικά πρωτεΐνη (Horowitz 1990). Μελέτες σε ενήλικες με συμπαγείς όγκους όπως οστεοσάρκωμα (Cance 1990), μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (Harbour 1988), καρκίνος του μαστού (Pietilainen 1995), της ουροδόχου κύστης (Presti 1991) του προστάτη (Bookstein 1990), καθώς και στα λεμφώματα (Ginsberg 1991), έχει δείξει ότι η αδρανοποίηση του γονιδίου Rb-1 σχετίζεται με κακή πρόγνωση.



Σχήμα13: Οργάνωση της πρωτεΐνης του Rb-1

Παράλληλα, η εισαγωγή φυσιολογικού Rb-1 γονιδίου σε νεοπλασματικά κύτταρα που αποδεδειγμένα παρουσιάζουν ανωμαλίες σε αυτό, καταστέλλει τον νεοπλασματικό φαινότυπο των κυττάρων (Huang 1988). Έχουν αναφερθεί οικογενείς περιπτώσεις λευχαιμίας σε οικογένειες με οστεοσάρκωμα και ρετινιβλάστωμα, υποδηλώνοντας τον πιθανό ρόλο του Rb-1 στην έναρξη κάποιων λευχαιμιών (Hansel 1990).

Όσον αφορά τις αιματολογικές κακοήθειες ενηλίκων, οι απαλείψεις ή οι αναδιατάξεις αφορούν το 20-30% στις ΟΜΛ (Ahuja 1991, Chen 1990), στις ΟΛΛ (Chen 1990, Ginsberg 1991) και στις ΧΜΛ στη βλαστική κρίση. Οι απαλείψεις του Rb-1 είναι συχνότερες στις ΧΜΛ (Towatari 1991), αφού η απώλεια της περιοχής 13q14 (όπου εντοπίζεται το γονίδιο) αποτελεί ένα από τα συχνότερα κυταρογενετικά ευρήματα στις ΧΜΛ (Kay 1993). Οι μελέτες που αφορούν την έκφραση της πρωτεΐνης p105 στις μυελογενείς λευχαιμίες ενηλίκων, αναφέρουν ότι σε ποσοστό 30-40% η ελάττωση ή η απουσία έκφρασης pRb μπορεί να αποτελέσει ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα (Kornblau 1992, Tang 1992, Weide 1993), ενώ τα ποσοστά για τις de novo ΟΛΛ των ενηλίκων- χωρίς κυταρογενετικές ανωμαλίες στην 13q14- είναι υψηλότερα, 50-64% (Tsai 1996, Hangaishi 1996) και αποδίδονται σε σημειακές μεταλλαγές του γονιδίου που κωδικοποιούν τη σύνθεση ελαττωματικής pRb η οποία είτε αποδομείται γρήγορα είτε έχει μειωμένη έκφραση (Sakai 1991). Σε όλους τους ασθενείς η πρόγνωση ήταν δυσμενέστερη.

3.4 Αναστολείς των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών

Σήμερα γνωρίζουμε ότι ο έλεγχος των κυκλινών και των CDKs διασφαλίζεται μέσω μιας ομάδας ανασταλτικών πρωτεϊνών, των *αναστολέων των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών*, *CDKIs*. Υπάρχουν 7 διαφορετικές CDKIs στα ανθρώπινα κύτταρα, οι οποίες ταξινομούνται σε δυο κύριες ομάδες. Η ομάδα INK4 περιλαμβάνει τους p16

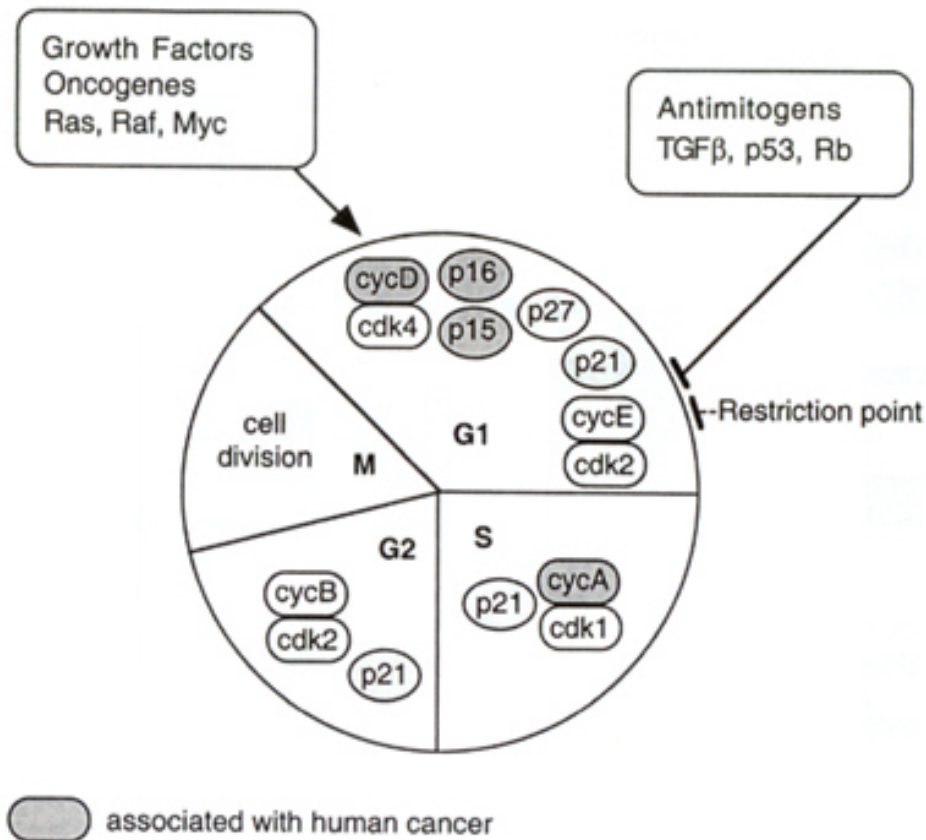
^{INK4a} (Serrano1993), ^{p15^{INK4b}}(Hannon and Beach 1994), ^{p18^{INK4c}}(Guan 1994) και ^{p19^{INK4d}}(Hirai 1995), οι οποίες αναστέλλουν τις CDK4 και CDK6 (σχήμα 14).

Η ομάδα Cip/Kip περιλαμβάνει τους αναστολείς ^{p21^{Waf1}} (Harper 1993), ^{p27^{Kip1}}(Toyoshima and Hunter 1994) και ^{p57^{Kip2}} (Lee 1995). Αυτοί συνδέονται εκλεκτικά με τις CDKs της G1/S φάσης. Η δεύτερη ομάδα αναστολέων περιλαμβάνει τους p15, p16, p18 και p19.

Ο *p16/MTS1/INK4A/CDKN2* κωδικοποιείται από το MTS1 ογκοκατασταλτικό γονίδιο, που εδράζεται στο 9p21(Serrano 1993). Αναστέλλει τις CDK4 και CDK6, εμποδίζοντας τελικά τις κινάσες αυτές να φωσφορυλιώσουν την pRb, ώστε να παραμένει συνδεδεμένη με το μεταγραφικό παράγοντα E2F. Μεταβολές στο p16 έχουν διαπιστωθεί σε πολλούς τύπους καρκίνων (μελάνωμα, καρκίνο του οισοφάγου, γλοιώματα, κ.λ.π) (Hassussian 1994, Mori 1994, He 1994, Okamoto 1994).

Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον *p15/MTS2/INK4B*, είναι το MTS2, το οποίο εδράζεται δίπλα στο γονίδιο MTS1, στο 9p21 και επίσης αναστέλλει τις CDK4 και CDK6.

Το γονίδιο που κωδικοποιεί το *p21, Waf1/Cip1/Sdi1/Cap20*, εδράζεται στο 6p21.1 και αναστέλλει τις E/CDK2, A/CDK2 και D/CDK4 (Hong 1993). Η έκφραση του p21 επάγεται από το p53 (El Deity 1993). Το μεταλλαγμένο p53 δεν μπορεί να ρυθμίσει το p21 ώστε να αναστείλει τις προαναφερθείσες κικλυνοεξαρτώμενες κινάσες, γεγονός σημαντικό, δεδομένης της μεγάλης συχνότητας των μεταλλάξεων στο p53. Με τα μέχρι σήμερα δεδομένα, δεν έχουν ανιχνευθεί μεταλλαγές του p21 σε κακοήθειες, τόσο ποντίκια που στερούνται p21 αναπτύσσονται φυσιολογικά αλλά είναι προβληματικά στον έλεγχο της εξέλιξης της G₁ φάσης (Deng 1995).



Σχήμα 14: Συνοπτική απεικόνιση κυκλινών, κυκλινοεξαρτώμενων κινασών και αναστολέων κυκλινοεξαρτώμενων κινασών ως προς τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Συνδυαστικές αλληλεπιδράσεις των κυκλινών και των CDKs κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Η εξέλιξη από τη G_0 στη G_1 απαιτεί τη συνεχόμενη δράση αυξητικών παραγόντων. Αυτή η απαίτηση μπορεί να αντικατασταθεί από ογκογονίδια όπως το *ras*, το *myc*, το *raf* και κινάσες τυροσίνης. Η εξέλιξη της G_1 μπορεί να διακοπεί από τη δράση αντιμιτογόνων παραγόντων (όπως ο $TGF\beta$, το $p53$ και το Rb). Απαιτεί επίσης το σύμπλεγμα των κυκλινών D και E και τους CDKs για την εξέλιξη κατά τη G_1 φάση και την είσοδο στη φάση S. Οι κυκλίνες A και B δημιουργούν συμπλέγματα με τους CDK2 κατά τον κυτταρικό κύκλο και σχετίζονται με την εξέλιξη από τη G_2 στη φάση M. Στην εικόνα απεικονίζονται με ανοιχτό γκρι χρώμα οι κυκλίνες που βρίσκονται επηρεασμένες στον καρκίνο (Park 1998).

3.5.1 Ο αναστολέας του κυτταρικού κύκλου Kip1/ p27

Η παρατήρηση ότι ο αντιμιτογόνος παράγοντας TGFβ και η επαφή δυο κυττάρων εμποδίζουν την ενεργοποίηση του συμπλέγματος E/CDK2 κατά τη διάρκεια της G₁ φάσης του κυτταρικού κύκλου (Koff 1991), οδήγησε στην ταυτοποίηση της p27, ενός από τους κυριότερους αναστολείς των CDKs (Polyak 1994). Η p27 είναι μια θερμικά σταθερή πρωτεΐνη, μοριακού βάρους 27KD. Κωδικοποιείται από το γονίδιο Kip1, το οποίο αποτελείται από 594 νουκλεοτίδια και εδράζεται στο χρωμόσωμα 12 στην περιοχή 12p13. Το Kip1 αποτελείται από 2 εξόνια και δυο ιντρόνια, ένα ανάμεσα στην κωδικοποιούσα περιοχή και το άλλο μετά το κωδικόνιο τερματισμού (Bullrich 1995).

Η p27 συνδέεται ισχυρά με τις E/CDK2 και D/CDK4 με στοιχειομετρικό τρόπο και αναστέλλοντας τη δράση τους εμποδίζει την εξέλιξη από τη G₁ στη S φάση του κυτταρικού κύκλου (Polyak 1994). Κύτταρα που στερούνται την p27, συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται, παρ' όλη την απουσία αυξητικών παραγόντων (Coats 1996). Αντιθέτως, τα υψηλά επίπεδα της p27 αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Toyoshima 1994). Σε συνθήκες stress, όπως έλλειψη αυξητικών παραγόντων ή σε φλεγμονώδεις καταστάσεις, η p27 αναστέλλει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, βασικό για την επιβίωση των κυττάρων (Ophascharoensuk 1998).

Ποντίκια με ομόζυγη έλλειψη του Kip1 (Kip1 -/-) είναι βιώσιμα, αλλά αναπτύσσονται με διπλάσιο ρυθμό συγκρινόμενα με τα ποντίκια ελέγχου. Εκδηλώνουν σύνδρομο πολλαπλής υπερπλασίας οργάνων, κυρίως του θύμου, του σπλήνα, των επινεφριδίων και των γονάδων, καθώς και αυξημένη συχνότητα όγκων στην υπόφυση (Fero 1996). Επιπροσθέτως, παρουσιάζουν στείρωση λόγω ανοσορρηκτικού κύκλου αλλά και αδυναμίας εμφύτευσης του εμβρύου (Kiyokawa 1996). Ποντίκια με ετερόζυγη έλλειψη του Kip1 (Kip1 +/-) έχουν ενδιάμεσο μέγεθος.

Αυτή η παρατήρηση φανερώνει ότι η ποσότητα της p27 είναι σημαντικός παράγοντας στη ρύθμιση του αριθμού των κυττάρων αλλά και στη διαφοροποίηση που σχετίζεται με την αναστολή του κυτταρικού κύκλου (Tong 1998).

Η p27 παίζει καθοριστικό ρόλο στη απόφαση (switch) ανάμεσα στον πολλαπλασιασμό ή στη διαφοροποίηση των αρχέγονων κυττάρων σε πολλές κυτταρικές σειρές (Hengst and Reed 1996). Η απουσία της p27 σχετίζεται με φτωχή διαφοροποίηση σε πολλές κακοήθειες. Σε μελέτες καρκίνου του μαστού (Catzavelos 1997), του πνεύμονα (Esposito 1997) και του εντέρου (Loda 1997), τα χαμηλά επίπεδα της p27 συσχετίστηκαν με προχωρημένο στάδιο της νόσου (Fredersdorff 1997). Η μειωμένη έκφραση της p27 έχει αποδειχθεί ότι είναι ισχυρότερα κακός προγνωστικός δείκτης σε σχέση με τον ιστολογικό τύπο ή τις μεταβολές της p53 στο καρκίνο του μαστού (Porter 1997), της ουροδόχου κύστης (Sgambato 1999) και των ωοθηκών (Newcomb 1999). Η αδρανοποίηση του ενός και μόνο αλληλομόρφου του Kip1 προκαλεί μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης p27 επαρκή για να προδιαθέσει σε καρκινογένεση (Fero 1998). Ενδιαφέρουσα παρατήρηση αποτελεί η διαπιστωμένη προοδευτική απώλεια της p27 από φυσιολογικούς ιστούς, σε καλοήθεις και κακοήθεις όγκους (Lloyd 1999, Masciullo 1999), καθιστώντας το ρόλο της σημαντικό στην εξέλιξη ποικίλων κακοηθειών.

Πολλαπλές μελέτες αναφέρουν την p27 ως ισχυρό προγνωστικό παράγοντα σε συμπαγείς όγκους όπως στον καρκίνο του εντέρου (Loda 1997), του στομάχου (Yasui 1997), του οισοφάγου (Anayama 1998) του μαστού (Porter 1997), του πνεύμονα (Esposito 1997) και του προστάτη (Cote 1998). Στις αιματολογικές κακοήθειες των ενηλίκων τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης της p27 σχετίζονται με κακή πρόγνωση στα λεμφώματα, Hodgkin (Erlason 1998) και μη Hodgkin (Moller 1999)

και στις Β σειράς ΧΛΜ (Vrhovac 1998), καθώς και στις ΟΛΛ και ΟΜΛ των ενηλίκων (Kabayashi 1994, Pietenpol 1995, Yokozawa 2000).

3.5.2 Η p27 είναι σημαντικός αρνητικός ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου

Σύμφωνα με πρόσφατες θεωρίες, η p27 είναι ο μόνος CDKI ο οποίος συντονίζει την είσοδο από το εξωκυττάριο περιβάλλον γνωστών αντιμιτογόνων παραγόντων και λειτουργεί σαν διακόπτης για το πέρασμα από το σημείο START (Cousts 1996), είτε για την εξέλιξη στην S φάση είτε για την έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο. Αποτελεί δηλαδή ένα βασικό συνδετικό κρίκο του κυττάρου με τους εξωκυττάριους ρυθμιστές, μιτογόνα και αντιμιτογόνα (Cheng 1998).

Τα επίπεδα αλλά και η δραστικότητα της p27 μειώνονται από τον σημαντικότερο αντιμιτογόνο παράγοντα, τον αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού β, TGFβ (transforming growth factor) (Moses 1997). In vivo χορήγηση TGFβ, προκαλεί αύξηση της έκφρασης της p15 η οποία συνδέεται στο σύμπλεγμα κυκλίνη D/CDK4 απελευθερώνοντας την p27, που συνδεόμενη με την κυκλίνη E/CDK2 την αδρανοποιεί. Το κύτταρο παραμένει στη G₁ φάση, αφού η φωσφορυλίωση της pRb στη S φάση πραγματοποιείται από την κυκλίνη E/CDK2 (Ewen 1993) (σχήμα 13).

Στα μακροφάγα που έχουν διεγερθεί με παράγοντα σχηματισμού αποικιών, μπορεί να ανασταλεί ο πολλαπλασιασμός τους, όταν εκτεθούν σε cAMP, λόγω αύξησης των επιπέδων της p27 (Sherr 1994, Kato 1994).

Πολλαπλασιαζόμενα Τ λεμφοκύτταρα λόγω διέγερσης τους από IL-2, χαρακτηρίζονται από χαμηλά επίπεδα p27. Όταν όμως προστεθεί ραπαμυκίνη, ένα αντιμιτογόνο φάρμακο, τα επίπεδα της p27 αυξάνονται (Nourse 1994, Zhang 2000). Στα φυσιολογικά λεμφοκύτταρα που βρίσκονται σε φάση ηρεμίας, τα επίπεδα

της p27 είναι υψηλά, αντίθετα τα πολλαπλασιαζόμενα λεμφοκύτταρα, εκφράζουν χαμηλά ή μη ανιχνεύσιμα επίπεδα p27 (Croix 1996, Sanchez-Beato 1997).

Η p27 συμμετέχει στη επαγωγή της απόπτωσης (Bani 1995, Wang 1997). Το γονίδιο Kip1 προκαλεί απόπτωση σε πολλές κυτταρικές σειρές μετά από γονιδιακή μεταφορά του μέσω αδενοϊού (Schreiber 1999). Απόπτωση όμως δεν πραγματοποιείται σε κύτταρα που στερούνται pRb, παρατήρηση για την οποία δεν υπάρχει προς το παρόν ερμηνεία. Η μοριακή βάση της αποπτωτικής δράσης της p27 παραμένει άγνωστη. Σε πειραματικό μοντέλο σε κύτταρα μελανώματος αυτό επιτυγχάνεται μέσω της μειωμένης έκφρασης του myc (D'Angelo 2001). Στη μελέτη των Eymir και συν, αναφέρεται ότι η p27 προκαλεί αντοχή στη χημειοθεραπεία εμποδίζοντας την απόπτωση μέσω της προοδευτικής απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c και της ενεργοποίησης του προκαψιδίου-3 στα λευχαιμικά κύτταρα (Eymir 1999). Τελικά, η p27 συντονίζει τον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση με τρόπο ώστε να προστατέψει τα κύτταρα από εξωτερικές προσβολές οι οποίες θα μπορούσαν να προκαλέσουν υπερβολικό κυτταρικό πολλαπλασιασμό ή απόπτωση (Craig 1997).

3.5.3 Πειραματικά δεδομένα για το ρόλο του Kip1/p27

Αναφέρθηκε ότι τα ογκοκατασταλτικά γονίδια κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες οι οποίες αναστέλλουν το μετασχηματισμό των κυττάρων. Η αδρανοποίηση τους, λόγω χρωμοσωμικής απώλειας ή/και μεταλλαγής θεωρείται απαραίτητη για την προώθηση μέσω ποικίλων σταδίων της καρκινογένεσης. Γνωρίζοντας το ανασταλτικό αποτέλεσμα ταυτοποιημένων ογκοκατασταλτικών γονιδίων στην κυτταρική διαίρεση, είναι λογικό να θεωρηθεί ότι αυτά τα σημαντικά γονίδια πιθανά δρουν ως ογκοκατασταλτικά. Οι αναστολείς των κυκλινοεξαρτωμένων κινασών είναι υποψήφιοι

για μια τέτοια υπόθεση. Η υπόθεση ότι το Kip1 είναι ογκοκατασταλτικό γονίδιο βασίστηκε σε τρεις παρατηρήσεις:

- 1) συμπεριφέρεται βιοχημικά ως αναστολέας του κυτταρικού κύκλου (Polyak 1994, Toyoshima 1994).
- 2) Η έκφραση του στα λευκά αιμοσφαίρια ρυθμίζει αρνητικά τη μετάβαση από την ηρεμία στον πολλαπλασιασμό (Fitro 1994).
- 3) Εδράζεται σε χρωμοσωμική περιοχή η οποία έχει συχνά υποστεί απάλειψη σε λευχαιμίες (Kabayashi 1994). Συγκεκριμένα, χρωμοσωμικές απαλείψεις ή μη ισοζυγισμένες μεταθέσεις που αφορούν την 12p13 ζώνη (όπου εδράζεται το Kip1 γονίδιο), ανιχνεύονται συχνά τόσο στις λεμφοβλαστικές όσο και στις μυελογενείς λευχαιμίες (Chan 1992).

Σύμφωνα με την υπόθεση των «δύο χτυπημάτων» του Knudson (Knudson 1971), για να είναι ένα τέτοιο γονίδιο υποψήφιο για ογκοκατασταλτικό θα πρέπει να είναι διπλά «τροποποιημένο» στα κύτταρα του όγκου: το ένα αλληλόμορφο να έχει απαλειφθεί με απώλεια της ετεροζυγωτίας (LOH) που αφορά τόσο τα κύτταρα του όγκου, όσο και όλα τα σωματικά κύτταρα του ασθενούς και το εναπομείναν αλληλόμορφο να έχει αδρανοποιηθεί με μετάλλαξη μόνο στα κύτταρα του όγκου. Ενώ τα σωματικά κύτταρα των ατόμων με LOH εκφράζουν το 50% της p27 και η λειτουργία τους παραμένει φυσιολογική, στα κύτταρα του όγκου δεν εκφράζεται καθόλου p27.

Οι Pietenpol J και συν και οι Bullrich F και συν (Pietenpol 1995, Bullrich 1995), δεν ανίχνευσαν μεταλλαγές του Kip1 μελετώντας μια μεγάλη ποικιλία συμπαγών όγκων. Οι Castaneda και συν και οι Kawamata N και συν, σε μελέτες με Southern blot ασθενών με συμπαγείς όγκους που είχαν απώλεια της ετεροζυγωτίας στο 12p, δεν διαπίστωσαν ταυτόχρονα και μετάλλαξη του Kip1 (Castaneda 1995). Οι

Kawamata N και συν, σε μελέτες λευχαιμιών ενηλίκων διαπίστωσαν ότι το ένα αλληλόμορφο Kip1 είχε απαλειφθεί σε ποσοστό 5%, το άλλο όμως αλληλόμορφο παρέμενε λειτουργικό (Kawamata 1999). Σύμφωνα με τις μελέτες αυτές φαίνεται πως ο Kip1/p27 δεν είναι συχνός στόχος μεταλλαγών που προδιαθέτουν σε καρκίνο και με πιθανόν όχι τυπική ογκοκατασταλτική δράση.

Αντίθετα, η μελέτη των Stegmairer K και συν σε ΟΛΛ παιδιών, αναφέρει απώλεια της ετεροζυγωτίας (LOH) στο 12p σε ποσοστό μέχρι 33%, ευρήματα που υποδεικνύουν ότι ο Kip1 θα μπορούσε να είναι ογκοκατασταλτικό γονίδιο (Stegmairer 1996).

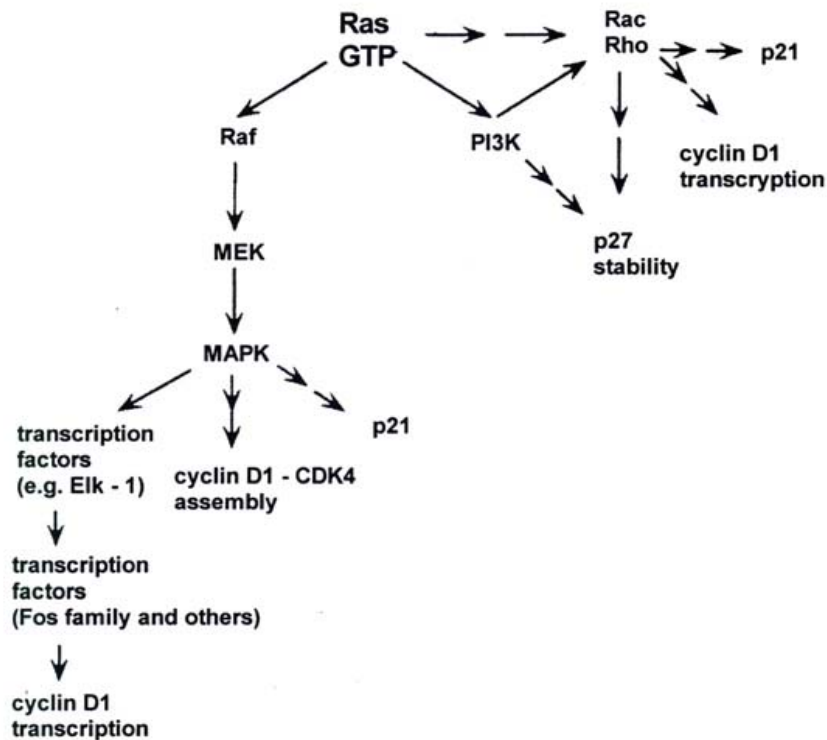
Επειδή η p27 δρα ως αναστολέας των κυκλινοεξαρτωμένων κινασών της G_1 φάσης ακόμη και μικρές μεταβολές στα επίπεδα της μπορούν να έχουν καθοριστική επιρροή στην εξέλιξη του κύκλου (Kato 1994).

Απώλεια του ενός αλληλόμορφου του Kip1, είτε με απάλειψη είτε με μεταλλαγή, προκαλεί μειωμένα επίπεδα p27 στα κύτταρα. Η μείωση αυτή πιθανά τροποποιεί τη στοιχειομετρική σχέση της p27 με τις άλλες συνιστώσες των κυκλινών-κυκλινοεξαρτωμένων κινασών της G_1 , με αποτέλεσμα μειωμένη ικανότητα ανασταλτικής δράσης σε αυτές. Τα χαμηλά επίπεδα της p27 προσδίδουν στο κύτταρο μια αυξητική δυνατότητα. Η αδρανοποίηση όμως και του άλλου, λειτουργικού ως τότε αλληλόμορφου, επιτρέπει στο κύτταρο ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό.

3.6 Συνεργική δράση των γονιδίων

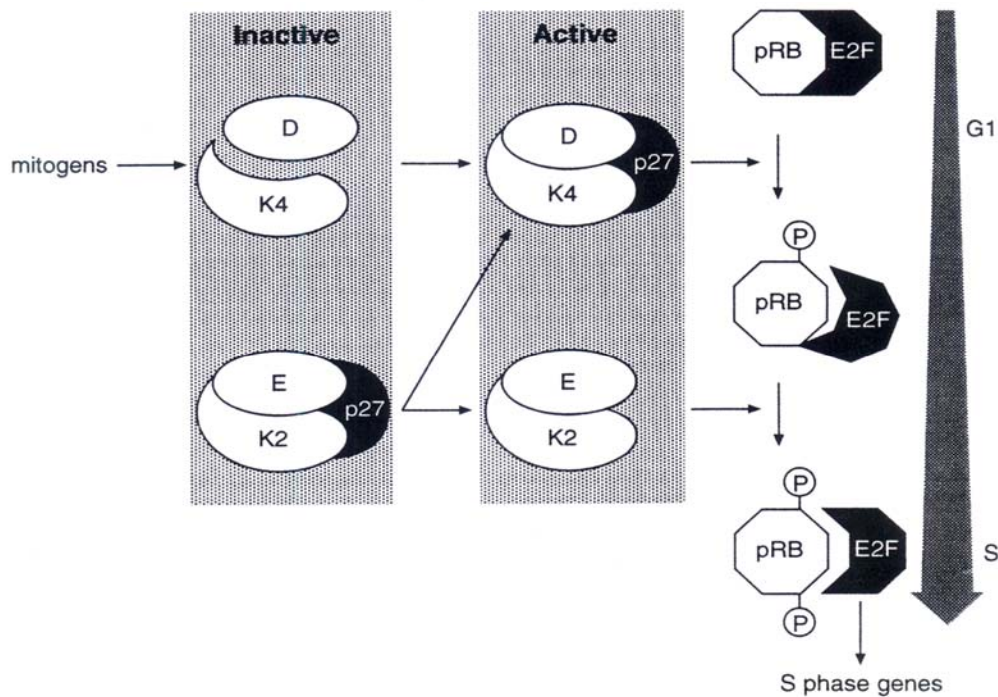
Τα επίπεδα στις κυκλίνες-CDK ρυθμίζονται εν μέρει από τους αναστολείς τους CDKIs. Καθοριστικό ρόλο ασκούν οι οδοί μεταγωγείς σημάτων μέσω του ras. Συνοπτικά, ο καταρράκτης ras/raf/MEK/MARK οδηγεί στην επαγωγή και

ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων που εμπλέκονται στη σύνθεση της κυκλίνης D₁. Οι εξαρτώμενες από το Rac οδοί επηρεάζουν επίσης τη σύνθεση της κυκλίνης D₁. Η οδός μέσω του Rho προάγει την αποδόμηση της p27 κατά την εξέλιξη της G₁ φάσης (Weber 1997). Τα επίπεδα της p27 είναι αυξημένα όταν τα κύτταρα βρίσκονται σε φάση ηρεμίας, ενώ ταυτόχρονα τα επίπεδα της p21 (της πρωτεΐνης του ras) είναι πολύ χαμηλά και αυξάνονται μετά από ερεθίσματα μιτογόνων (Hengest 1994). Αύξηση των επιπέδων της ras μέσω της οδού Rho προκαλεί καταστολή της p27. Οι πρωτεΐνες των ras (p21) ρυθμίζουν τη μετάπτωση από τη G₀ στη G₁ φάση ανεξάρτητα από την pRb, ενώ ρυθμίζουν το πέρασμα από τη G₁ προς την S φάση μέσω της αύξησης της κυκλίνης D₁ (Ewen 2000) (σχήμα 15).



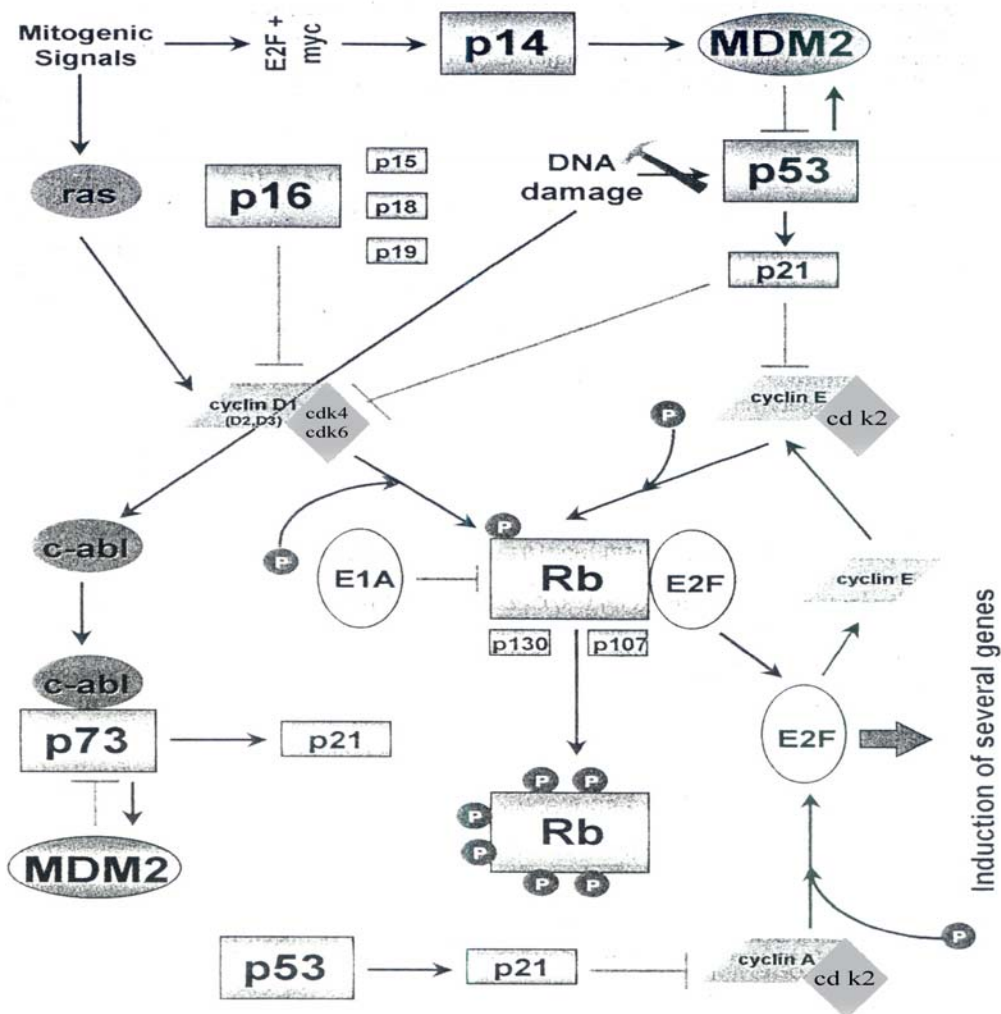
Σχήμα 15 : αναπαράσταση των οδών μεταγωγής σημάτων μέσω ras και των τρόπων που λειτουργούν στον μηχανισμό του κυτταρικού κύκλου. Ο καταρράκτης Raf/MEK/MARK οδηγεί στην επαγωγή και ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων που εμπλέκονται στη σύνθεση της κυκλίνης D₁. Οι οδοί Rac και Rho δρουν μαζί μειώνοντας την ενεργότητα της p27 με άγνωστο μηχανισμό (Ewen 2000).

Η p27 προάγει το σχηματισμό συμπλόκου της κυκλίνης D₁, της οποίας η δράση ελέγχεται από το μονοπάτι ras/raf/MEK/MARK, όπως προαναφέρθηκε, με την κινάση CDK4 και το ενεργό πλέον σύμπλοκο D1/CDK4 αρχίζει τη φωσφορυλίωση της υποφωσφορυλιωμένης και ανενεργού pRb. Καθώς ο αριθμός των μορίων D1/CDK4 αυξάνεται, η p27 μετακινείται από το σύμπλοκο κυκλίνη E/CDK2, το οποίο αδρανοποιεί. Η κυκλίνη E/CDK2 απελευθερωμένη από την αναστολή μέσω p27, συμπληρώνει την φωσφορυλίωση της pRb καθώς εξελίσσεται ο κυτταρικός κύκλος προς τη φάση S, απελευθερώνοντας τον δεσμευμένο E2F, ο οποίος ενεργοποιεί γονίδια απαραίτητα για την εξέλιξη της S φάσης (σχήμα 16).



Σχήμα 16: Συνεργική δράση pRb και p27(Moller 1999).

Ο E2F με παλίνδρομη ρύθμιση (μέσω του myc) ελέγχει τη μεταγραφή της p14, αναστέλλει ή επάγει μέσω του MDM2 την έκφραση του p53. Με τροποποίηση στη μεταγραφή, δεδομένου ότι το γονίδιο p16 έχει κοινά δυο εξόνια με το p14, κωδικοποιείται παράλληλα και η πρωτεΐνη p16, η οποία αναστέλλει τη D₁/CDK4. Σε βλάβη του DNA η p53 μέσω της p21 αναστέλλει επίσης τη D₁/CDK4 (σχήμα 17).



Σχήμα 17: αναπαράσταση αλληλεπιδράσεων κυκλινοεξαρτημένων αναστολέων, της πρωτεΐνης του ρετινοβλασώματος και της p53 (Schmid 2001).

ΣΚΟΠΟΣ

Οι μελέτες που αφορούν μεταλλαγές του Rb-1 και του Kip1 είναι λίγες, αναφέρονται κυρίως στις χρόνιες λεμφοβλαστικές λευχαιμίες και αφορούν αποκλειστικά ενήλικες. Από αυτές προκύπτει ότι η ελαττωμένη έκφραση της pRb σχετίζεται με κακή πρόγνωση τόσο στις λεμφοβλαστικές όσο και στις μυελογενείς, ενώ της p27 μόνο με τις μυελογενείς λευχαιμίες. Όσο αφορά τις λευχαιμίες της παιδικής ηλικίας, δεν υπάρχουν πληροφορίες για το ρόλο της αδρανοποίησης του Rb-1 και του Kip1 και την πιθανή προγνωστική αξία τους. Στην οξεία λευχαιμία των παιδιών ένα ποσοστό ασθενών έχει έκβαση μη συμβατή με την αρχική πρόγνωση. Δεν είναι γνωστός/οί ο/οι παράγοντας-ες που διαφοροποιεί-ούν την ανταπόκριση στη θεραπεία και την έκβαση της νόσου σε λευχαιμίες με τους ίδιους αρχικά προγνωστικούς παράγοντες, ώστε λευχαιμία ίδιας ομάδας κινδύνου με μια άλλη, να μην επιτυγχάνει ύφεση ή να υποτροπιάζει. Πιθανά πρόκειται για γενετικό παράγοντα ο οποίος συμμετέχει στην διαδικασία της λευχαιμογένεσης, είτε στην έναρξη (initiation) ή την εξέλιξη (promotion, progression) της νόσου. Θεωρώντας υποψήφια τα γονίδια Rb-1 και Kip1 μελετήθηκε :

1) η συχνότητα των μεταλλαγών των γονιδίων ευαισθησίας για το ρετινοβάστωμα Rb-1 και ενός από τους σημαντικότερους αναστολείς των κυκλινοεξαρτημένων κινασών Kip1/p27 στις οξείες λευχαιμίες των παιδιών (Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία, ΟΛΛ και Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία, ΟΜΛ) καθώς και από τους συμπαγείς όγκους το νευροβλάστωμα.

2) η σχέση των μεταλλαγών αυτών με την αιτία-έναρξη ή την εξέλιξη-έκβαση της νόσου.

3) η συσχέτιση των μεταλλαγών με το στάδιο αλλά και την έκβαση της νόσου, η πιθανή σχέση αυτών με άλλους γνωστούς προγνωστικούς παράγοντες αλλά κυρίως

η αξιολόγηση τους σαν ανεξάρτητους προγνωστικούς δείκτες και τη δυνατότητα να συνεισφέρουν όχι μόνο στην τροποποίηση της θεραπείας αλλά ακόμη και στην εξατομίκευση της.

4) η δυνατότητα αξιοποίησης τους στην ανίχνευση της ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου.

Επιλέχθηκε η μελέτη των οξειών λευχαιμιών γιατί αποτελούν τη συχνότερη κακοήθεια της παιδικής ηλικίας. Από τους συμπαγείς όγκους επιλέχθηκε το νευροβλάστωμα, επειδή είναι όγκος που μπορεί να διηθήσει το μυελό (στο στάδιο IV με διήθηση μυελού). Έγινε προσπάθεια συσχέτισης των σταδίων του νευροβλαστώματος με την παρουσία ή μη μεταλλαγών.

Για τη μελέτη των ανωτέρω χρησιμοποιήθηκαν επιχρίσματα μυελού από οξείες λευχαιμίες παιδιών και νευροβλαστώματα. Για την ενίσχυση των προαναφερθέντων εξονίων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση (PCR), ενώ για την ανίχνευση των μεταλλαγών χρησιμοποιήθηκε η τεχνική Ανάλυσης Πολυμορφισμού Μονόκλωνης Αλυσίδας (SSCP: Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis) και η Ανάλυση Ετεροδιμερών (Heteroduplex Analysis).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΥΛΙΚΟ

Μελετήθηκαν στην πρωτοδιάγνωση 51 παιδιά ηλικίας 3 μηνών - 16 ετών (μέση ηλικία 7,8 έτη) με οξεία λευχαιμία και 9 παιδιά με νευροβλάστωμα, ηλικίας 4μηνών - 4 ετών, τα οποία διαγνώστηκαν, έλαβαν θεραπεία και παρακολουθούνται συστηματικά στην Παιδιατρική Κλινική Αιματολογίας/Ογκολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου, την χρονική περίοδο 1992-2001.

Το υλικό αποτέλεσαν επιχρίσματα παρακέντησης μυελού με χρώση May Grunwald – Giemsa της περιόδου 1992-1999 από 30 περιπτώσεις από τις οποίες 26 λευχαιμίες (18 Οξείες Λεμφοβλαστικές - ΟΛΛ και 8 Οξείες Μυελογενείς - ΟΜΛ) και 4 νευροβλαστώματα και κύτταρα μυελού μετά από διαχωρισμό επίσης από 30 περιπτώσεις από τις οποίες 25 λευχαιμίες (18 Οξείες Λεμφοβλαστικές - ΟΛΛ και 8 Οξείες Μυελογενείς - ΟΜΛ) και 5 νευροβλαστώματα από το 1997 έως και το 2001. Η μελέτη υποβλήθηκε και εγκρίθηκε από την Επιτροπή Μεταπτυχιακών Σπουδών του Πανεπιστημίου Κρήτης και επιχορηγήθηκε εν μέρει, κατόπιν έγκρισης του πρωτοκόλλου από την Ιατρική Υπηρεσία του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου - ΠαΓΝΗ.

Συνολικά μελετήθηκαν 51 οξείες λευχαιμίες (34 αγόρια και 17 κορίτσια) από τις οποίες οι 39 ήταν ΟΛΛ και οι 12 ΟΜΛ (Πίνακας 5).

Η ταυτοποίηση των λευχαιμιών βασίστηκε σε ειδικές χρώσεις (PAS μυελουπεροξειδάση, όξινη φωσφατάση, μη ειδικές εστεράσες) και στην

κυτταρομετρία ροής. Η ταξινόμηση των λευχαιμιών έγινε σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά FAB.

Στην ομάδα των παιδιών με ΟΛΛ, 28 ήταν αγόρια και 11 ήταν κορίτσια, με κατ'εξοχήν κατανομή ηλικίας 1-9 ετών (Πίνακας 6). Με βάση τον ανοσοφαινότυπο, το 89% των περιπτώσεων της μελέτης ήταν ΟΛΛ Β σειράς (94% cALLA +) και το 11% Τ σειράς (Πίνακας10). Με βάση το πρωτόκολλο θεραπείας BFM-ALL, 12 ασθενείς ανήκαν στην ομάδα χαμηλού κινδύνου (SR), ποσοστό 31%, 16 ασθενείς ανήκαν στην ομάδα ενδιάμεσου κινδύνου (MR), ποσοστό 41% και 11 ασθενείς ανήκαν στην ομάδα υψηλού κινδύνου (HR), ποσοστό 28% (Πίνακας11). Τρεις ασθενείς που αρχικά είχαν θεωρηθεί ενδιάμεσου κινδύνου, στην πορεία χαρακτηρίστηκαν υψηλού κινδύνου λόγω της εξέλιξης της νόσου τους.

Οι ασθενείς έλαβαν θεραπεία με βάση τα πρωτόκολλα BFM-90, 95 και MSKCC NY II. Ύφεση την 30-33^η ημέρα θεραπείας επιτεύχθηκε σε ποσοστό 89%. Σε όλα τα περιστατικά στέλλονταν στην πρωτοδιάγνωση έλεγχος χρωμοσωμάτων μυελού. Κυτταρογενετικές ανωμαλίες διαπιστώθηκαν σε ποσοστό 13% (Πίνακας 9). Υποτροπή υπό θεραπεία παρουσίασε το 2% ενώ υποτροπή μετά το τέλος της θεραπείας το 5%. Σε πλήρη ύφεση βρίσκεται το 92%, μακράς διάρκειας επιβίωση-ίαση (3-11έτη) απολαμβάνει το 42% των μελετηθέντων παιδιών με ΟΛΛ (Πίνακας 12).

Η ομάδα της ΟΜΛ περιελάμβανε 7 κορίτσια και 5 αγόρια. Το 75% ήταν περιστατικά de novo μυελογενούς λευχαιμίας και το 25% δευτεροπαθούς (Πίνακας13).

Οι 47/51 περιπτώσεις οξείες λευχαιμίες αφορούν παιδιά που γεννήθηκαν και μεγάλωσαν στην Κρήτη, ενώ 4 ασθενείς παραπέμφθηκαν από παιδιατρικά Νοσοκομεία εκτός Κρήτης. Οι 24 περιπτώσεις αφορούσαν κατοίκους του νομού

Ηρακλείου, οι 7 κατοίκους του νομού Ρεθύμνου, οι 6 του νομού Χανίων και οι 10 του νομού Λασιθίου (Πίνακας 8). Όσον αφορά την εποχιακή κατανομή των λευχαιμιών, οι περισσότερες λευχαιμίες διαγνώστηκαν τους φθινοπωρινούς μήνες (Πίνακας 7). Συνολικά τα χαρακτηριστικά των λευχαιμιών της μελέτης καταγράφονται στον πίνακα 15.

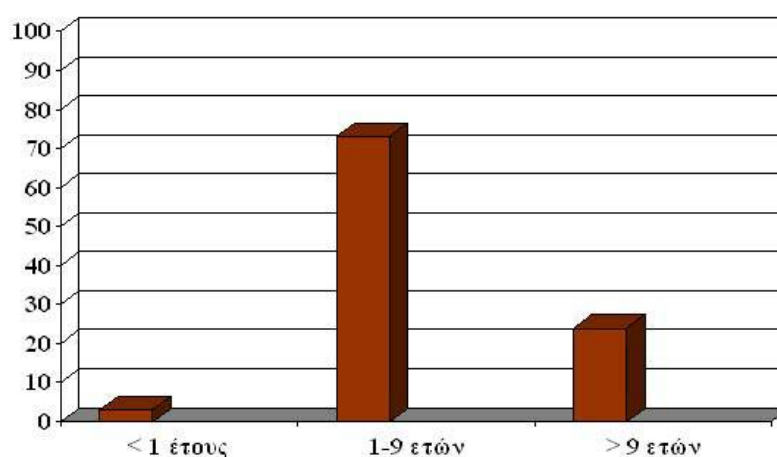
Η ομάδα του νευροβλαστώματος περιελάμβανε 9 ασθενείς, 6 αγόρια και 3 κορίτσια, ηλικίας 3 μηνών ως 3 ετών. Τέσσερις ασθενείς είχαν νόσο σταδίου IV (2 με διήθηση μυελού), τρεις είχαν νόσο σταδίου IV – S, ένας ασθενής είχε νόσο σταδίου III και ένας νόσο σταδίου II (Πίνακας 14). Από την ομάδα των 9 νευροβλαστωμάτων, ένα παιδί σταδίου IV με διήθηση μυελού έχει καταλήξει. Τα άλλα 8 παιδιά έχουν ολοκληρώσει θεραπεία και είναι ελεύθερα νόσου 2-9 έτη.

Οξείες Λευχαιμίες της μελέτης

ΣΥΝΟΛΟ	51
ΟΔΛ	39
ΟΜΔ	12
Άρρενες	33
Θήλεα	18
Μέση ηλικία	6.9 έτη (3μ.-18 ετών)

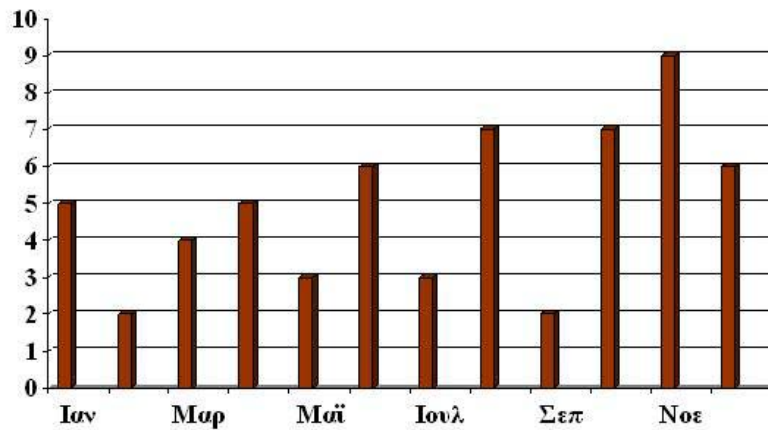
Πίνακας 5

ΟΔΛ - Κατανομή ηλικίας στην πρωτοδιάγνωση



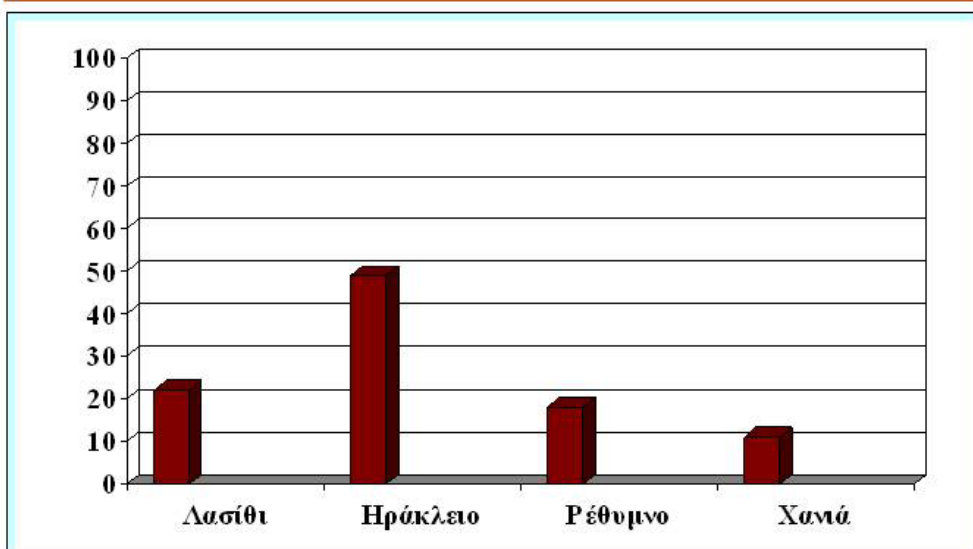
Πίνακας 6

ΟΛΛ - Εποχιακή κατανομή



Πίνακας 7

ΟΛΛ - Κατανομή προέλευσης στους νομούς της Κρήτης (n=47)



Πίνακας 8

Καρυότυπος

Φυσιολογικός καρυότυπος	87%
Κυτταρογενετικές ανωμαλίες	13%

Πίνακας 9

ΟΛΛ - Ανοσοφαινότυπος

ΟΛΛ Β-σειράς	89%
<i>cALLA (CD10) +</i>	94%
ΟΛΛ Τ-σειράς	11%

Πίνακας 10

ΟΛΛ- Ομάδες κινδύνου

Σταθερού κινδύνου	31%
Ενδιάμεσου κινδύνου	41%
Υψηλού κινδύνου	28%

Πίνακας 11

ΟΛΛ - Έκβαση

Υποτροπή υπό θεραπεία	2%
Υποτροπή μετά το τέλος της θεραπείας	5%
Πλήρης ύφεση	92%
Μακράς διάρκειας επιβίωση - ίαση (3 έτη- 11 έτη) (n=20)	42%

Πίνακας 12

Πίνακας 13

Οξεία μυελογενής λευχαιμία (ΟΜΛ)

Σύνολο	12
De novo <ul style="list-style-type: none">• 3 παιδιά- μακράς διάρκειας ύφεση (2-συμβατική ΧΜΘ, 1-ΜΜΟ)• 1 παιδί με 4η υποτροπή μετά ΜΜΟ	9/12 (75%)
Θάνατοι 5 παιδιά (τα 2 ήταν βρέφη) με ανθεκτική νόσο και υποτροπές	5/9
Δευτεροπαθής <ul style="list-style-type: none">• Σύνδρομο <i>Kostmann</i>• Οστεοσάρκωμα• Λέμφωμα	3/12 (25%)
Θάνατοι	2/3

Ασθενείς με νευροβλάστωμα					
Στάδιο νόσου	I	II	III	IV	IV-S
αριθμός ασθενών		1	1	4 (διήθηση μυελού 2)	3

Πίνακας 14

Πίνακας 15: Κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών (I)

α/α Ηλικία Φύλο Κατοικία	Κλινική εικόνα	Αντικείμε ευρήματα	Αιματολογικοί παράμετροι	Διάγνωση Ανοσοφαι- νότυπος	Ομάδα κινδύνου	καρυότυπο	Επίτευξη ύφεσης 33η ημέρα	έκβαση
No1 ΣΔ 2.5 ♂ Λασιθι	πυρετός εκχυμώ- σεις καταβολή ανορεξία	Ήπαρ + Σπλήνα - Λεμφαδ+	Λευκά 5600/μl Βλάστες 61% Hb 8.1gr/dl ΑΜΠ 31000/μl	B-ΟΛΛ CD ₁₀ 94% L ₁	αρχικά MR BFM ALL - II Υποτροπή →HR	46XY	(+) 2μην. από το τέλος της ΧΜΘ→υποτ ΚΝΣ,μυελο →ΜΜΟ→	Υποτροπή ΚΝΣ→ΧΜΘ ΥΦΕΣΗ ΠΥ 10μ εκτός θεραπείας
No 3 ΜΓ 5.5 ♂ Ηράκλειο	Οστικά άλγη καταβολή ανορεξία	Ήπαρ+3 Σπλήνα+5 Λεμφαδ+	Λευκά100000/μl Βλάστες 93% Hb 12.8 gr/dl ΑΜΠ 189000/μl	B-ΟΛΛ CD ₁₀ 95% Pre-B L ₁	αρχικά MR BFM ALL- II → υποτροπή ΚΝΣ →HR	46XY	ALL REZ BFM-96 →3ο κύκλο maintenance →	ΚΝΣ υποτρο ↓ θάνατος
No 4 ΣΝ 13 ♂ Ηράκλειο	Οστικά άλγη καταβολή ανορεξία	Ήπαρ + Σπλήνα - Λεμφαδ -	Λευκά5000/μl Βλάστες 15% Hb 9.9gr/dl ΑΜΠ 234000/μl	B-ΟΛΛ CD ₁₀ 86% L ₁	MR BFM ALL- 90	46XY	(+)	ΠΥ 55μ εκτός θεραπείας
No 5 ΣΜ 4 ♂ Λασιθι	Πυρετός καταβολή ανορεξία	Ήπαρ - Σπλήνας - Λεμφαδ -	Λευκά 5200/μl Βλάστες 83% Hb 6.73 gr/dl ΑΜ 233000/μl	B-ΟΛΛ CD ₁₀ 86% L ₁	MR BFM ALL-86	46XY	(+)	ΠΥ 50μ Εκτός θεραπείας
No 6 ΚΚ 11 ♀ Λασιθι	Υπερτρο- φία ούλων	Ήπαρ +4 σπλήνα+2 Λεμφαδ +	Λευκά 70000/μl Βλάστες 90% Hb 11 gr/dl ΑΜΠ 63000/μl	ΟΜΛ M ₄	HR BFM AML-93	46XX t(10;11,13) q21;q23;q32	(+)	ΠΥ 60μ εκτός θεραπείας
No 7 ΑΕ 9 ♂ Ρέθυμνο	Τραχηλι- κή λεμφαδε- νίτιδα	Ήπαρ + σπλήνα + Λεμφαδ +	Λευκά 13800/ μl Βλάστες Hb 14.5 gr/dl ΑΜΠ 361000/ μl	T-ΟΛΛ CD ₂ CD ₃ CD ₅ CD ₇	HR MSKNY II	46XY	(+)	ΠΥ 50μ εκτός θεραπείας
No 8 Α θήλυ 3μ ♀ Ρέθυμνο	Πυρετό λοίμωξη αναπ/ού	Ήπαρ +5 Σπλήνα - Λεμφαδ -	Λευκά132000/μl Βλάστες 88% Hb 10 gr/dl ΑΜΠ 159000/μl	ΟΜΛ M ₄	HR BFM AML-93	46XX 11q ⁻ mar90%	(+) ΜΜΟ	9 μήνες μετά ΜΜΟ →υποτρο- πή→(-)υφεσ →θάνατος
No 9 ΜΑ 10 ♀ Λασιθι	εκχυμώ- σεις καταβολή ανορεξία	Ήπαρ +8 σπλήνα+2 λεμφαδ +2	Λευκά 2200/μl Βλάστες Hb 5.6 gr/dl ΑΜΠ 20000/μl	B-ΟΛΛ CD ₁₀ 77% L ₁	MR BFM ALL-II	46XY	(-)	ΠΥ 10ετη εκτός θεραπείας
No 10 Φ 12 ♀ Ηράκλειο		ήπαρ σπλήνα λεμφαδ	Λευκά Hb ΑΜΠ	ΟΜΛ	HR BFM AML-86		(-)	θάνατος στο induction
No 11 Ζ 12 ♀ Ηράκλειο		ήπαρ σπλήνα λεμφαδ	Λευκά<20000/μl Hb ΑΜΠ	B-ΟΛΛ	BFM ALL-86		(+)	Θάνατος στο induction από τοξικότητα

Πίνακας 15: Κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών(συνέχεια II)

α/α Ηλικία Φύλο Κατοικία	Κλινική εικόνα	Αντικειμε- εγρήματα	Αιματολογικοί παράμετροι	Διάγνωση Ανοσοφαι- νότυπος	Ομάδα κινδύνου	καρυότυπο	Επίτευξη ύφεσης 33η ημέρα	έκβαση
No 12 ΠΓ 13 ♂ Ηράκλειο	Τραχηλι- κή λεμφαδε- νίτιδα	Ήπαρ +4 Σπλήνα+3 Λεμφαδ +	λευκά27500/μl βλάστες 30% Hb 12 gr/dl ΑΜΠ317000/μl	T-OΛΛ CD ₂ CD ₃ CD ₅ CD ₇	HR MSKNY II	46XY	(+)	ΠΥ 6ετη εκτός θεραπείας
No 13 BE 4 ♀ Λασιθι	Οστικά άλγη καταβολή ανορεξία πυρετός	Ήπαρ+2 Σπλήνα - Λεμφαδ -	Λευκά 4400/μl Βλάστες 69% Hb 6.9 gr/dl ΑΜΠ 23000/μl	B-OΛΛ CD ₁₀ 67% L ₁	SR BFM ALL-I	46XX	(+)	ΠΥ 7έτη εκτός θεραπείας
No 14 Σ 7 ♂ Χανιά	πυρετός εκχυμώ- σεις	ήπαρ σπλήνα λεμφαδ	λευκά βλάστες Hb ΑΜΠ	ΟΜΛ	HR BFM AML-86		(-)	Θάνατος στο induction
No 15 ΔΕ 2.5 ♂ Ηράκλειο	εκχυμώ- σεις καταβολή ανορεξία	Ήπαρ+2 Σπλήνα- Λεμφαδ+	Λευκά 9300/μl Βλάστες 26% Hb 7.7 gr/dl ΑΜΠ1 25000/μl	B-OΛΛ CD ₁₀ 70% L ₁	MR ALL BFM -II	46XY t(8;22)	(+)	ΠΥ 6ετη εκτός θεραπείας
No 16 T 10 ♀ Χανιά	καταβολή ανορεξία πυρετός υπερτρο- ούλων	ήπαρ σπλήνα λεμφαδ	Λευκά βλάστες Hb ΑΜΠ	ΟΜΛ	HR BFM AML-93		(-)	Θάνατος στο induction
No 17 NI 9 ♂ Ηράκλειο	Οστικά άλγη καταβολή ανορεξία πυρετός	ήπαρ +4 σπλήνα+6 λεμφαδ +	λευκά 42000/μl βλάστες 40% Hb 6.8 gr/dl ΑΜΠ 95000/μl	B-OΛΛ CD ₁₀ 67% L ₁	Αρχικά MR BFM ALL-I 10η λόγω CD ₂₀ + HR MSKNY II	46XY	(+)	ΠΥ 7έτη εκτός θεραπείας
No 18 XA 16 ♂ Ηράκλειο	Οστικά άλγη καταβολή	ήπαρ +2 σπλήνα+2 λεμφαδ +	λευκά 3800/μl βλάστες 20% Hb 12. 5 gr/dl ΑΜΠ105000/μl	B-OΛΛ CD ₁₀ 92% L ₂	HR MSKNY II	46XY	(+)	ΠΥ 8 έτη εκτός θεραπείας
No 19 ΑΔ 14 ♀ Ηράκλειο	Οστικά άλγη καταβολή ανορεξία πυρετός υπερτρο- ούλων	ήπαρ +3 σπλήνα + λεμφαδ -	λευκά 23000/μl βλάστες 65% Hb 10. 9 gr/dl ΑΜΠ 37000/μl	ΟΜΛ M ₁	HR BFM AML-93	46XY t(8;21) (q13;q21)	(+)	ΠΥ 7έτη εκτός θεραπείας
No 20 ΣΣ 7 ♂ Ηράκλειο	εκχυμώ- σεις καταβολή ανορεξία	ήπαρ+6 σπλήνα+8 λεμφαδ+	λευκά 3600/μl βλάστες 51% Hb 7.7 gr/dl ΑΜΠ 73000/μl	B-OΛΛ CD ₁₀ 55% L ₁	Αρχικά MR ALL - BFM 85 ύφεση (-) 33η →HR MSKNY II	46XY	(-)	ΠΥ 8έτη εκτός θεραπείας
No 21 M 7 ♂ Χανιά	πυρετός υπερτρο- ούλων	ήπαρ+5 σπλήνα+ λεμφαδ+	Λευκά βλάστες Hb ΑΜΠ	ΟΜΛ	HR BFM AML-93	46XY	(-)	Θάνατος στο Induction

Πίνακας 15: Κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών (συνέχεια III)

Ηλικία Φύλο κατοικία	Κλινική εικόνα	Αντικειμενι- ευρήματα	Αιματολογικοί παράμετροι	Διάγνωση Ανοσοφαι- νότυπος	Ομάδα κινδύνου	καρυότυπο	Επίτευξη ύφεσης 33η ημέρα	έκβαση
No 23 ΚΠ 6.5 ♂ Ηράκλειο	καταβολή ανορεξία πυρετός	Ήπαρ +4 Σπλήνα +6 Λεμφαδ +	Λευκά 5300/μl Βλάστες 16% Hb 6.7 gr/dl ΑΜΠ 130000/μl	B-ΟΛΛ CD ₁₀ 79% L1	Αρχικά MR ALL- BFM I ύφεση (-) 33η →HR MSKNY II	46XY	(-)	ΠΥ 7έτη εκτός θεραπείας
No 24 ΜΓ 2.5 ♀ Ηράκλειο	Πυρετό λοίμωξη αναπ/ού	Ήπαρ+4 Σπλήνα+2 Λεμφαδ+	Λευκά 47200/μl Βλάστες 87% Hb 6.5 gr/dl ΑΜΠ 24000/μl	B-ΟΛΛ CD ₁₀ 94% L1	MR ALL BFM -II	46XY	(+)	ΠΥ 6 έτη εκτός θεραπείας
No 25 ΚΜ 3 ♀ Χανιά	Πυρετό λοίμωξη αναπ/ού	Ήπαρ +3 Σπλήνα - Λεμφαδ+	Λευκά 20200/μl Βλάστες 80% Hb 6.8gr/dl ΑΜΠ 11000/μl	B-ΟΛΛ CD ₁₀ 98% L1	MR ALL BFM -83	46XY	(+)	ΠΥ 6 έτη εκτός θεραπείας
No 26 6 ♂ Αγγλία	πυρετός εκχυμώ- εις	Ήπαρ - Σπλήνα +2 Λεμφαδ+	Λευκά 9300/μl Βλάστες 26% Hb 5.7 gr/dl ΑΜΠ 25000/μl	B-ΟΛΛ CD ₁₀ 71% L1	MR	46XY	;	Μετάβαση στη Αγγλία για θεραπεία
No 27 ΓΑ 14 ♀	πυρετός εκχυμώ- εις	Ήπαρ +6 Σπλήνα +5 Λεμφαδ +	Λευκά 3800/μl Βλάστες 90% Hb 4.1 gr/dl ΑΜΠ 11000/μl	ΟΜΛ M ₁	HR δευτεροπαθή οστεοσάρκω- μα/θεραπεία ετοποσιδή BFM AML-93	46XX	(-)	Θάνατος στο Induction
No 28 ΔΧ Ιεράπετρα	εκχυμώ- εις ωχρότητα ανορεξία καταβολή	Ήπαρ +3 Σπλήνα +3 Λεμφαδ +	Λευκά 70000/μl βλάστες 80% Hb 6.8gr/dl ΑΜΠ 11000/μl	B-ΟΛΛ CD ₁₀ 80% L1	MR ALL BFM -95	46XY	(+)	ΠΥ 2 έτη εκτός θεραπείας
No 29 ΓΛ 4.5 ♂ Ηράκλειο	καταβολή ανορεξία πυρετός	Ήπαρ - Σπλήνα +2 Λεμφαδ +	Λευκά 9900/μl βλάστες 45% Hb 7.5gr/dl ΑΜΠ 127000/μl	B-ΟΛΛ CD ₁₀ 86% L1	SR ALL BFM -95	46XY	(+)	ΠΥ 2 έτη εκτός θεραπείας λευκοεγκε- φαλοπαθεια
No 30 ΧΜ 8 ♂ Ηράκλειο	τραχηλι- κή λεμφαδ/δα πυρετός	ήπαρ σπλήνα λεμφαδ	Λευκά 13600/μl βλάστες 80% Hb 10.9 gr/dl ΑΜΠ 76000/μl	B-ΟΛΛ CD ₁₀ 86% L1	MR ALL BFM -95	46XY	(+)	ΠΥ 4 έτη εκτός θεραπείας
No 31 ΦΑ 8.5 ♂ Αθήνα	ωχρότητα δερματ λοίμωξη γενικ λεμφαδε νοπαθεια	Ήπαρ +4 Σπλήνα +6 Λεμφαδ +	Λευκά 70000/μl βλάστες 77% Hb 5.2 gr/dl ΑΜΠ 73000/μl	ΟΜΛ	HR BFM AML-93	46XY	(+)	3 ^η υποτροπή ↓ (Memorial hospital) ΜΜΟ→ 4 ^η υποτροπή ΧΜΘ
No 32 ΑΓ 2.5 ♂ παρατομ πή από Αλβανία	εκχυμώ- εις ρινορραγ ωχρότητα ανορεξία καταβολή	Ήπαρ - Σπλήνα - Λεμφαδ -	Λευκά 9200/μl βλάστες 75% Hb 6.8gr/dl ΑΜΠ 47000/μl	B-ΟΛΛ CD ₁₀ 76% L1	SR ALL BFM -95	46XY	(+)	ΠΥ 2 έτη εκτός θεραπείας

Πίνακας 15: Κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών (συνέχεια IV)

Ηλικία Φύλο κατοικία	Κλινική εικόνα	Αντικειμενι ευρήματα	Αιματολογικοί παράμετροι	Διάγνωση Ανοσοφαι- νότυπος	Ομάδα κινδύνου	καρούτυπο	Επίτευξη ύφεσης 33η ημέρα	έκβαση
No 33 ΚΕ 5 ♂ Ιεράπετρα	ωχρότητα καταβολή	Ήπαρ+2 Σπλήνα+3 Λεμφαδ+	Λευκά 26800/μλ Βλάστες 96% Hb 5.2 gr/dl ΑΜΠ 34000/μλ	B-ΟΛΛ CD ₁₀ 94% L1	MR ALL BFM -II	46XY	(+)	ΠΥ 1 έτος εκτός θεραπείας
No 34 ΑΣ 9 ♂ Ηράκλειο	διόγκωση άλγος ΔΕ γόνατος	Ήπαρ+2 Σπλήνα+2 Λεμφαδ+	Λευκά 1000/μλ Βλάστες 87% Hb 6.5 gr/dl ΑΜΠ 24000/μλ	B-ΟΛΛ CD ₁₀ 53% L1-L2	MR ALL BFM -95	46XY	(+)	ΠΥ 11ο κύκλο maintenance
No 35 ΛΙ 3 ♂ Ηράκλειο	πυρετό κοιλιακό άλγος	Ήπαρ +1 Σπλήνα +4 Λεμφαδ+	Λευκά 69500/μλ Βλάστες 83% Hb 6.2 gr/dl ΑΜΠ 48700/μλ	B-ΟΛΛ CD ₁₀ 91% L1	MR ALL BFM -95	46XY	(+)	ΠΥ 10ο κύκλο maintenance
No 36 ΚΕ 4 ♂ Ηράκλειο	Πυρετό λοίμωξη αναπ/ού	Ήπαρ - Σπλήνα +2 Λεμφαδ+	Λευκά 91500/μλ Βλάστες 70% Hb 8.9 gr/dl ΑΜΠ 190000/μλ	ΟΜΛ	HR BFM AML-98	46XY	(+)	ΠΥ 2έτη εκτός θεραπείας
No 37 ΣΚ 4.5 ♂ Ηράκλειο	ωχρότητα ανορεξία καταβολή αρθραλγ	Ήπαρ +2 Σπλήνα +2 Λεμφαδ +	Λευκά 7400/μλ Βλάστες 14% Hb 8.5 gr/dl ΑΜΠ 311000/μλ	B-ΟΛΛ CD ₁₀ 93% L2	SR ALL BFM -95	46XY	(+)	ΠΥ 10ο κύκλο maintenance
No 38 ΣΠ 3 ♀ Ηράκλειο	αναμία ανορεξία καταβολή	Ήπαρ +4 Σπλήνα - Λεμφαδ +	Λευκά 7400/μλ βλάστες 7% Hb 8.5gr/dl ΑΜΠ 311000/μλ	B-ΟΛΛ CD ₁₀ 92% L1	SR ALL BFM -95	46XY	(+)	ΠΥ 9ο κύκλο maintenance
No 39 ΑΝ 5.5 ♂ Ηράκλειο	καταβολή ανορεξία πυρετός	Ήπαρ+4 Σπλήνα + Λεμφαδ +	Λευκά 6500/μλ βλάστες 90% Hb 7.2gr/dl ΑΜΠ 76000/μλ	ΟΜΛ	HR δευτεροπαθή σ.Kostmann BFM AML-98	46XX	(+)	ΜΜΟ ΠΥ 2έτη εκτός θεραπείας
No 41 ΠΣ 2 ♂ παρα/μπή από Θες/νικη	τραχιλι- κή λεμφαδ/δα πυρετός	Ήπαρ +2 Σπλήνα +4 Λεμφαδ +	Λευκά 216000/μλ βλάστες 80% Hb 7.5 gr/dl ΑΜΠ 60000/μλ	T-ΟΛΛ CD ₅ 98% CD ₇ 96%	HR BFM AML-95	46XY	(+)	ΠΥ 10ο κύκλο maintenance
No 42 ΔΕ 3.5 ♂ Ηράκλειο	υμενίτιδα ισχίου	Ήπαρ +2 Σπλήνα +2 Λεμφαδ -	Λευκά 9100/μλ βλάστες 4% Hb 8.7 gr/dl ΑΜΠ 336000/μλ	B-ΟΛΛ CD ₁₀ 68% L1	SR ALL BFM -95	46XY	(+)	ΠΥ 11ο κύκλο maintenance
No 43 ΞΝ 3.5 ♂ Ρέθυμνο	εκχυμώ- εις ρινορραγ ωχρότητα ανορεξία καταβολή	Ήπαρ +2 Σπλήνα - Λεμφαδ +	Λευκά 5000/μλ βλάστες 52% Hb 5.5gr/dl ΑΜΠ 37000/μλ	B-ΟΛΛ CD ₁₀ 81% L1	SR ALL BFM -95	46XY	(+)	ΠΥ 9ο κύκλο maintenance

Πίνακας15: Κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών (συνέχεια V)

Ηλικία Φύλο κατοικία	Κλινική εικόνα	Αντικειμενι ευρήματα	Αιματολογικοί παράμετροι	Διάγνωση Ανοσοφαι- νότυπος	Ομάδα κινδύνου	καρούτυπο	Επίτευξη ύφεσης 33η ημέρα	έκβαση
No 44 ΛΜ 16 ♂ Ρέθυμνο	άτονο έλκος κνήμης	Ήπαρ +6 Σπλήνα +6 Λεμφαδ -	Λευκά 12300/μl Βλάστες 46% Hb 8.5 gr/dl ΑΜΠ 16000/μl	B-ΟΛΛ CD ₁₀ 89% L1	MR ALL BFM -95	46XY	(-)	θάνατος στο induction
No 45 ΚΤ 13 ♂ Ηράκλειο	ρινορρα για πυρετός	ήπαρ+2 Σπλήνα+5 Λεμφαδ+	Λευκά 44800/μl Βλάστες 46% Hb 7.4 gr/dl ΑΜΠ 148000/μl	B-ΟΛΛ CD ₁₀ 88% L1	MR ALL BFM -95	46XY	(+)	ΠΥ 4ο κύκλο maintenance
No 46 ΘΣ 4.5 ♀ Ηράκλειο	ωχρότητα ανορεξία καταβολή	ήπαρ +5 σπλήνα +9 Λεμφαδ +	Λευκά 36400/μl Βλάστες 88% Hb 5.6 gr/dl ΑΜΠ 18000/μl	B-ΟΛΛ CD ₁₀ 89% L1	MR ALL BFM -95	46XX	(+)	ΠΥ 5 μήνες εκτός θεραπείας
No 47 ΜΑ 4 ♂ Ιεράπετρα	τραχηλική λεμφ/δα	ήπαρ +2 σπλήνα - Λεμφαδ+	Λευκά 2600/μl Βλάστες 68% Hb 7.5 gr/dl ΑΜΠ 25000/μl	B-ΟΛΛ CD ₁₀ 84% L1	SR ALL BFM -95	46XY	(+)	ΠΥ 3ο κύκλο maintenance
No 49 Μ άρρεν 12 μην Ηράκλειο	Πυρετό λοίμωξη αναπ/ού διάχυτη ενδογγ πήξη	ήπαρ +4 σπλήνα +3 Λεμφαδ +	Λευκά178000/μl Βλάστες 87% Hb 8.7 gr/dl ΑΜΠ 48000/μl	ΟΜΛ	HR BFM AML-98	46XY	(+)	θάνατος στο induction
No 50 ΛΑ 4 ♀ Χανιά	τραχηλική λεμφ/δα	ήπαρ +5 σπλήνα +5 Λεμφαδ +	Λευκά48900/μl βλάστες 94% Hb 8.5gr/dl ΑΜΠ 38000/μl	B-ΟΛΛ CD ₁₀ 95% L1	MR ALL BFM -95	46XX	(+)	ΠΥ 4ο κύκλο maintenance
No 51 ΒΔ 11 ♂ Ρέθυμνο	καταβολή ανορεξία οστικά άλγη	ήπαρ +3 σπλήνα - λεμφαδ +	λευκά 4500/μl βλάστες 25% Hb 8.3 gr/dl ΑΜΠ 150000/μl	B-ΟΛΛ CD ₁₀ 55% L1	MR ALL BFM -95	46XY	(+)	ΠΥ 4ο κύκλο maintenance
No 52 ΜΠ 8 ♂ Αλβανία	γενικευμ λεμφαδ/α καταβολή ανορεξία πυρετός	ήπαρ +4 σπλήνα +3 λεμφαδ +	λευκά 4500/μl βλάστες 25% Hb 8.3 gr/dl ΑΜΠ 150000/μl	B-ΟΛΛ CD ₁₀ 76% L1	MR ALL BFM -95	46XY	(+)	ΠΥ 4ο κύκλο maintenance
No 53 ΖΓ 5.5 ♀ Ηράκλειο	πυρετός οστικά άλγη	Ήπαρ +2 Σπλήνα +1 Λεμφαδ +	λευκά 2300/μl βλάστες 28% Hb 9.1 gr/dl ΑΜΠ 137000/μl	B-ΟΛΛ CD ₁₀ 72% L1	SR ALL BFM -95	46XY	(+)	ΠΥ 4ο κύκλο maintenance
No 54 ΔΜ 5.5 ♀ Ηράκλειο	ανορεξία καταβολή πυρετός	Ήπαρ +5 Σπλήνα +5 Λεμφαδ +	λευκά 130000/μl βλάστες 88% Hb 9.6gr/dl ΑΜΠ 26000/μl	B-ΟΛΛ CD ₁₀ 81% L1	SR ALL BFM -95	46XY	(+)	ΠΥ 3ο κύκλο maintenance

ΜΕΘΟΔΟΣ

4.2 Τεχνική εκχύλισης DNA

Για κάθε δείγμα επιλέγονται τρεις αντικειμενοφόροι πλάκες με επίχρισμα μυελού των οστών, κατά προτίμηση μετά από χρώση, ώστε να μπορεί να εκτιμηθεί η κυτταροβρίθεια του μυελού και να αποκλειστεί η χρησιμοποίηση τεχνικά αραιού μυελού με μεγάλη πρόσμιξη αίματος. Με χειρουργική λεπίδα αποξύνεται το τμήμα αυτό από την αντικειμενοφόρο πλάκα που μακροσκοπικά με την βοήθεια της χρώσης Giemsa διακρίνεται ότι φέρει μυελό (βαθύ μπλε χρώμα). Με αυτό τον τρόπο διασφαλίζεται αδρά ότι τα δείγματα που μελετώνται αφορούν μυελό χωρίς πρόσμιξη περιφερικού αίματος. Το υλικό μεταφέρεται προσεκτικά σε αριθμημένο και αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου erpendorf 1.5ml. Αλλάζοντας γάντια, λεπίδα και πεδίο, για να αποφευχθεί η επιμόλυνση του DNA μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων, επαναλαμβάνεται η διαδικασία για όλα τα δείγματα.

Ο ιστός (μυελός των οστών) ομογενοποιείται με 500μl Reagent B (διάλυμα λύσης που περιέχει 60 mM EDTA, 400 mM Tris- HCL, 150 mM NaCl και 1% SDS). Στη συνέχεια ο ομογενοποιημένος ιστός επωάζεται σε θερμοκρασία 60⁰ C για 24h αφού προστεθεί πρωτεΐνάση K σε τελική συγκέντρωση 100μg/ml. Ακολουθεί εκχύλιση του DNA με ίσο όγκο φαινόλης-χλωροφόρμιου(1:1), που αποσκοπεί ταυτόχρονα και στη απενεργοποίηση της πρωτεΐνάσης K. Γίνεται ισχυρή ανάδευση (vortex) και φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 15min σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο συλλέγεται σε νέο σωληνάριο τύπου erpendorf και η διαδικασία εκχύλισης φαινόλης/χλωροφόρμιου επαναλαμβάνεται όσες φορές απαιτείται ώστε το υπερκείμενο να είναι διαυγές. Στην υδατική φάση που παραμένει προστίθεται 1/20 του όγκου NaCl 5 mM και 2-2.5X του όγκου απόλυτη ψυχρή (-20⁰ C) αιθανόλη για την κατακρήμνιση του DNA. Το DNA επανακτάται σαν ίζημα από

τους -20°C που έχει διατηρηθεί για τουλάχιστον 12-16h, με φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm στους 4°C για 15min. Η υπερκείμενη φάση απομακρύνεται και το ίζημα εκπλύεται με ψυχρή αιθανόλη 70% για την απομάκρυνση των αλάτων και αφήνεται να στεγνώσει.

Επαναδιαλύεται με 30-50 μl δισαπεσταγμένου - αποστειρωμένου νερού και φυλάσσεται αρχικά για ένα 24ωρο σε θερμοκρασία 4°C . Εν συνεχεία φυλάσσεται στους -20°C επ' άπειρο. Η ποσότητα και η καθαρότητα του DNA μπορεί να υπολογιστεί με φωτομέτρηση στα 260-280nm. Αδρός ποσοτικός προσδιορισμός, για επιβεβαίωση ότι εκχυλίστηκε το DNA, μπορεί να γίνει με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αραρόζης (Sambrook 1989).

4.3 Τεχνική καθαρισμού του εκχυλισμένου DNA (IsoQuick)

Το IsoQuick είναι έτοιμη συσκευασία (Kit) το οποίο με τα κατάλληλα Reagent 1,2,3 χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό εκχυλισμένου DNA. Η τεχνική IsoQuick εξασφαλίζει την αδρανοποίηση των νουκλεασών (DNAάσες και RNAάσες) που περιέχονται σε DNA από δείγματα αρχείου που δεν έχουν διατηρηθεί στους -20°C , εξασφαλίζοντας επιπλέον και τη σταθερότητα του.

10μl DNA αναμειγνύονται με 190 μl απεσταγμένου και δις απιονισμένου νερού. Προστίθενται 500 μl από το Reagent 2 του Kit του IsoQuick και ακολουθεί ανάδευση (Vortex), προσθήκη 400 μl από το Reagent 3, ανάδευση και επώαση στους 65°C για 10 min. Ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές για 5 min. Η υπερκείμενη υδατική φάση μεταφέρεται σε νέο erpendorf και προστίθενται 500 μl Reagent 2, ανάδευση για 10 min και φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές για 5 min. Η υπερκείμενη υδατική φάση μεταφέρεται ξανά σε νέο erpendorf και προστίθεται Reagent 4 σε όγκο ίσο με το 1/10 του όγκου της καθώς και 400 μl

ισοπροπρανολόλης, αναδεύονται ελαφρώς και αφήνονται τουλάχιστον 12 ώρες στους -20°C για να κατακρημνιστεί το DNA. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές για 10min και μεταφορά της υπερκείμενης υδατικής φάσης σε νέο errendorf. Η υπερκείμενη φάση απομακρύνεται και το ίζημα εκπλύεται με 1000 μl ψυχρή αιθανόλη 70% για την απομάκρυνση των αλάτων, και ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές για 5 min. Απομακρύνεται όλη η υδατική φάση και αφήνεται το σχηματισμένο ίζημα στο errendorf να στεγνώσει. Το ανακτημένο DNA επαναδιαλύεται με 30-50 μl δισαπτεσταγμένου - αποστειρωμένου νερού και φυλάσσεται αρχικά για ένα 24ωρο σε θερμοκρασία 4°C . Εν συνεχεία μπορεί να διατηρηθεί στους -20°C επ'άόριστο.

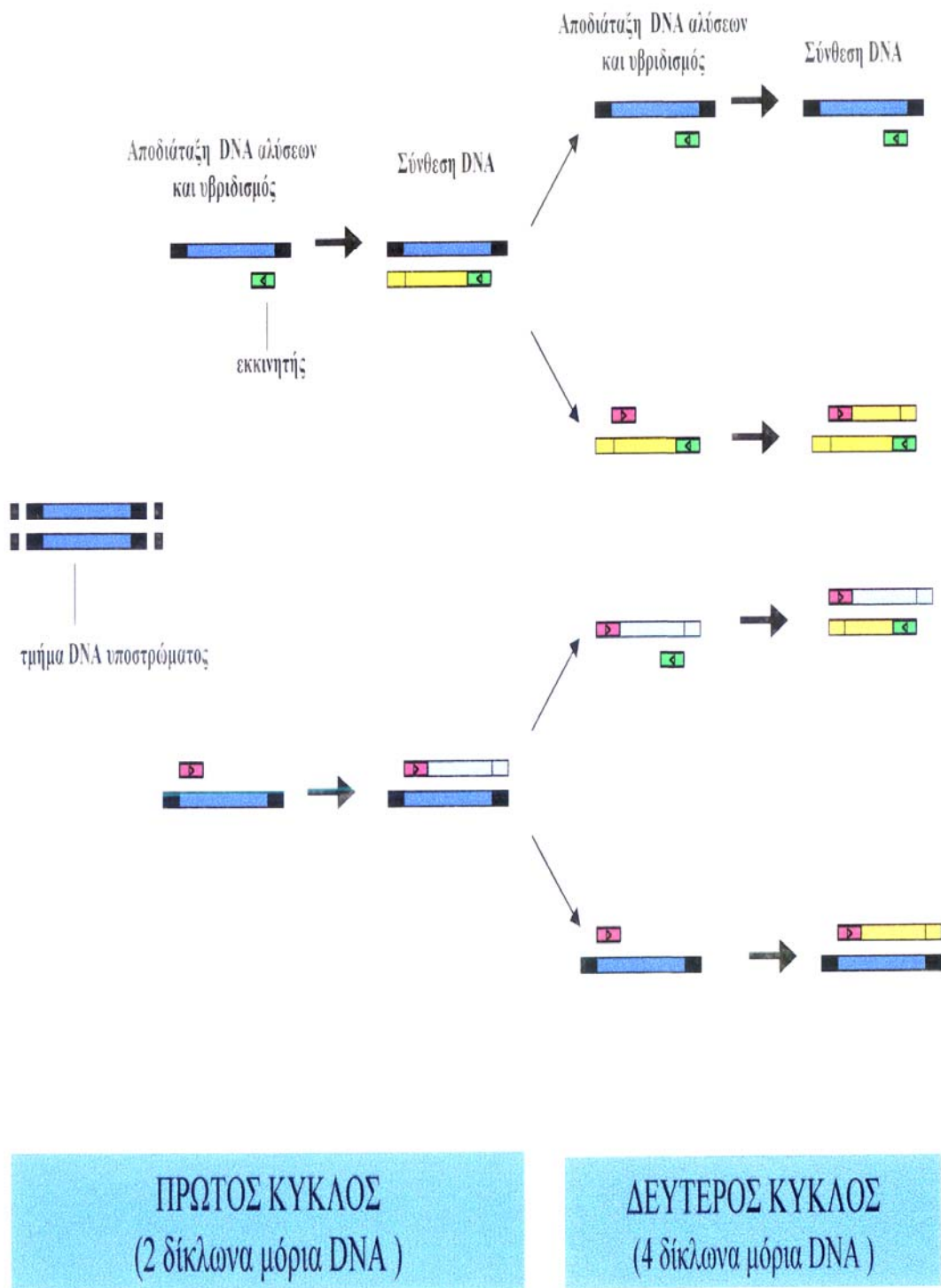
4.4 Η αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση (polymerase chain reaction, PCR)

Μελετήθηκαν τα εξόνια 20, 21, 22, 23 και 24 του γονιδίου ευαισθησίας για το ρετινοβλάστωμα, Rb-1 και τα εξόνια 1 και 2 του γονιδίου Kip1 με τη μέθοδο της *αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση (polymerase chain reaction, PCR)*.

Επιλέχθηκε η μέθοδος της PCR για τη μελέτη των προαναφερθέντων εξονίων γιατί χαρακτηρίζεται από ευαισθησία, ειδικότητα και ταχύτητα (Kawasaki 1990, Larrick 1992). Επίσης η τεχνική αυτή εκτός από το ότι απαιτεί ελάχιστη ποσότητα αρχικού υλικού, το DNA δεν είναι απαραίτητο να έχει την υψηλή καθαρότητα και ακεραιότητα που απαιτείται για άλλες τεχνικές ανάλυσης νουκλεϊνικών οξέων (όπως Southern blot και in situ υβριδισμός). Μοναδική προϋπόθεση είναι να υπάρχει τουλάχιστον ένα ακέραιο τμήμα DNA το οποίο να περιέχει την αλληλουχία που πρόκειται να ενισχυθεί.

Τα τρία στάδια της αντίδραση PCR που εφαρμόστηκε είναι α) η αποδιάταξη του υποστρώματος DNA (*template denaturation*) σε υψηλή θερμοκρασία στους 94°C β)

ο υβριδισμός των εκκινητών σε θερμοκρασία 50-53⁰C και γ) η σύνθεση του DNA με επιμήκυνση των υβριδισμένων εκκινητών (*primer extension*) σε θερμοκρασία 72⁰C και για 1 min που καταλύεται από την θερμοανθεκτική Taq DNA πολυμεράση που με την παρουσία περίσσειας dNTPs αντιγράφει το μονόκλωνο DNA με κατεύθυνση 5'→3' αρχίζοντας πάντα με την τοποθέτηση ενός νουκλεοτιδίου στη θέση 3' της δίκλωνης περιοχής του DNA του εκάστοτε εξονίου που χρησιμοποιείται σαν υπόστρωμα. Στο τέλος κάθε κύκλου το προϊόν επιμήκυνσης του κάθε εκκινητή αποτελεί υπόστρωμα για τον άλλο εκκινητή, στον επόμενο κύκλο, που ξαναρχίζει με την αποδιάταξη του DNA και επανάληψη των σταδίων β και γ με αποτέλεσμα την εκθετική αύξηση της ποσότητας της αλληλουχίας DNA του εξονίου που ενισχύουμε (σχήμα 18). Η απόδοση της ενίσχυσης που έχουμε επιτύχει μπορεί να εκτιμηθεί με την ακόλουθη εξίσωση : $N = n(1+e)^c$ όπου N η τελική ποσότητα του προϊόντος, n η αρχική ποσότητα του υποστρώματος, e η απόδοση της αντίδρασης και c ο αριθμός των κύκλων PCR. Όταν η συγκέντρωση του προϊόντος ξεπεράσει την 10⁻⁷M, τότε παύει η παραγωγή νέων αλυσίδων και η αντίδραση μας μπαίνει σε φάση κορεσμού. Στη παρούσα μελέτη όλα τα εξόνια ενισχύθηκαν με συνολικά 40 κύκλους.



Σχήμα 18 :Διαγραμματική αναπαράσταση της PCR.

4.4.1 Τα βασικά συστατικά της αντίδρασης PCR που εφαρμόστηκε

Στην παρούσα μελέτη ο τελικός όγκος της αντίδραση PCR ήταν 25 μl και πραγματοποιήθηκε σε σωληνάριο erpendorf. Χρησιμοποιήθηκαν: υπόστρωμα (template) DNA από το υλικό, ένζυμο DNA θερμοανθεκτική πολυμεράση, δεσοξυριβοτριφωσφορικά νουκλεοτίδια dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) που παρέχουν την ενέργεια για την αντίδραση, ολιγονουκλεοτίδια εκκινητές (primers) καθώς ρυθμιστικά διαλύματα. Κατ'εξοχήν τα πειράματα έγιναν σε θερμικό κυκλοποιητή PerkinElmer.

4.4.2 Υπόστρωμα DNA

Ως πηγή DNA χρησιμοποιήθηκαν επιχρίσματα μυελού των οστών παιδιών με οξεία λευχαιμία και νευροβλάστωμα τα οποία ελήφθησαν στα πλαίσια της διάγνωσης και της σταδιοποίησης της νόσου (ίδη υλικό). Επειδή τα επιχρίσματα είχαν διατηρηθεί σε θερμοκρασία δωματίου, κυρίως τα παλαιότερα δείγματα, δημιουργήθηκαν προβλήματα λόγω της διάσπασης του γενωμικού DNA και της παρουσίας πολλών αναστολέων (νουκλεασών), που καθιστούσαν δυσχερέστατη την ενίσχυση των επιλεγμένων εξονίων. Γι' αυτό χρειάστηκε τα δείγματα DNA να «καθαριστούν» με την διαδικασία IsoQuick που προαναφέρθηκε.

4.4.3 Θερμοάντοχη DNA πολυμεράση

Η Taq DNA πολυμεράση καταλύει την προσθήκη νουκλεοτιδίων με κατεύθυνση 5'→3'. Η σύνθεση του DNA γίνεται πάντα με κατεύθυνση 5'→3' από το 5' α-φωσφόρο του τριφωσφορικού δεοξυνουκλεοτιδίου προς την 3'τελική υδροξυλική ομάδα της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας. Ανάλογα με τη δομή της αλληλουχίας του εξονίου που ενισχύουμε, η Taq πολυμεράση έχει δράση περίπου 150/νουκλεοτίδια/sec/μόριο ενζύμου και βέλτιστη θερμοκρασία δράσης T^o opt 75-80°C. Η Taq πολυμεράση δεν έχει ικανότητα σύνθεσης DNA σε θερμοκρασίες πάνω

από 90°C, το ένζυμο όμως παραμένει σταθερό σε αυτές τις θερμοκρασίες. Η χρησιμοποίηση της Taq πολυμεράσης επιτρέπει την αυτοματοποίηση της αντίδρασης σε θερμικό κυκλοποιητή που μεταβάλλει τη θερμοκρασία βάσει προγραμματισμού (thermal cycler). Επίσης αυξάνει την ειδικότητα και την απόδοση της αντίδρασης επειδή χρησιμοποιούνται υψηλότερες θερμοκρασίες στα στάδια σύνθεσης εκκινιτή-υποστρώματος και σύνθεσης DNA. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε αποκλειστικά Taq πολυμεράση.

4.4.4 Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs)

Κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού χρησιμοποιήθηκαν υψηλής καθαρότητας dNTPs, σε συγκέντρωση που κυμαίνεται από 100-200μΜ. Σε μικρότερες συγκεντρώσεις (10-100μΜ) η πολυμεράση παρουσίαζε μεγαλύτερη πιστότητα, ωστόσο η βέλτιστη συγκέντρωση των dNTPs εξαρτήθηκε και από την συγκέντρωση του MgCl₂ και των εκκινητών, το μήκος του προς ενίσχυση τμήματος, τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης καθώς και από το πόσο αυστηρές συνθήκες ενίσχυσης έχουμε επιλέξει (reaction strigency).

4.4.5 Εκκινητές (primers)

Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν οι primes Zandecki και συν 1995 (Zandecki 1995), οι οποίοι διαπιστώθηκε ότι δεν είχαν απόλυτη αλληλουχία με τα εξόνια που επρόκειτο να ενισχυθούν και εγκαταλείφθηκαν.

Για το σωστό σχεδιασμό των νέων εκκινητών ελήφθησαν υπόψη τα εξής : οι τέσσερις βάσεις να βρίσκονται σε αναλογία μεταξύ τους ώστε να μη δημιουργούνται δευτεροταγείς δομές και τα ζεύγη των ολιγονουκλεοτιδίων να παρουσιάζουν την ελάχιστη δυνατότητα σύζευξης μεταξύ τους, κυρίως στο 3'άκρο, για να μη δημιουργούν μεταξύ τους διμερή.

Η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών που εφαρμόστηκε στην αντίδραση PCR υπολογίστηκε από τα αντίστοιχα T_m των ολιγονουκλεοτιδίων τα οποία δεν μπορούν να διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Το T_m υπολογίζεται από πολύπλοκες εξισώσεις που λαμβάνουν υπόψη την αναλογία βάσεων, το μέγεθος του εκκινητή και διάφορες άλλες θερμοδυναμικές παραμέτρους. Η πιο απλή εξίσωση είναι η ακόλουθη : (αριθμός των βάσεων A+T) $\times 2^{\circ} C$ + (αριθμό των βάσεων G+C) $\times 4^{\circ} C$. Σε κάθε νέο ζεύγος εκκινητών κρίθηκε απαραίτητη η βελτιστοποίηση της θερμοκρασίας υβριδισμού που συχνά διέφερε από την υπολογιζόμενη (Suggs1981). Για το εξόνιο 20 η θερμοκρασία υβριδισμού ήταν $51^{\circ}C$, για το εξόνιο 21 $50^{\circ}C$, για το εξόνιο 22 $52^{\circ}C$, για το εξόνιο 23 $50^{\circ}C$, για το εξόνιο 24 $52^{\circ}C$ και για τα εξόνια 1,2 του Kip1 $51^{\circ}C$. Οι πρότυπες αλληλουχίες των πέντε εξονίων του Rb-1 και των δυο εξονίων του γονιδίου Kip1 που ενισχύθηκαν, αποκτήθηκαν μέσω Internet με διαδικασία anonymous ftp, από τη διεθνή βάση αλληλουχιών GenBank-EMBL. Ο αριθμός πρόσβασης (accession No) για τις αλληλουχίες των εξονίων του Rb-1 είναι L11910 και για το Kip1 είναι L11916. Οι εκκινητές των εξονίων του Rb-1 συντέθηκαν στο ΙΤΕ, εργαστήριο μικροχημείας.

Εκκινητές (ιδε αλληλουχία βάσεων και εκκινητών)

Εξόνιο 20 Rb-1 PCR προϊόν 350 bp

Αριθμός σχεδιασμού 731 s 5' TTCTCTGGGGGAAAGAAAAGAGTGG 3'

Αριθμός σχεδιασμού 732 a 5' AGTTAACAAGTAAGTAGGGAGGAGA 3'

Εξόνιο 21 Rb-1 PCR προϊόν 518 bp

Αριθμός σχεδιασμού 733 s 5' GACTTTCAAACCTGAGTTCAGTATGG 3'

Αριθμός σχεδιασμού 734 a 5' ACAAATACCTGCTTATTACAGGGAT 3'

Εξόνιο 22 Rb-1 PCR προϊόν 363 bp

Αριθμός σχεδιασμού 735 s 5' GCAGCTATAATCCAAGCCTAAGAAG 3'

Αριθμός σχεδιασμού 736 a 5' GTTTTGGTGGACCATTACATTAGA 3'

Εξόνιο 23 Rb-1 PCR προϊόν 251 bp

Αριθμός σχεδιασμού 737 s 5' TCTAATGTAATGGGTCCACCAAAA 3'

Αριθμός σχεδιασμού 738 a 5' TCCCTAAGAGAAAACACAC 3'

Εξόνιο 24 Rb-1 PCR προϊόν 550 bp

Αριθμός σχεδιασμού 739 s 5' TAAACTAAGAGACTAGGTGAGTAT 3'

Αριθμός σχεδιασμού 740 a 5' GAGATTTGGGTGAGAAAAAATCTC 3'

Εξόνιο 1,2 Kip1 PCR προϊόν 228 bp

Εμπορική ονομασία primer CDK1b p27: shgc2536 ή erh13754

5' GGATAAGTGAAATGGATACTACATC 3'

5' AAAAAGAGGGGAAAACCTATTCTAC 3'

4.4.6 Αλληλουχία εξονίων Rb-1 20-24 και primers

```

5'>1 . . . . .
154921 cgcccccaa gtatacagag atgcctgggt ccgcagcggg ggcttgggog gctgcagctg
154981 cactggggag ggtgggactc ctacctgctc cccagcccag agagcacagg gatgcctggg
155041 tccgcagcgg tggcttgggc ggctgcagaa gcaactggga gctcctgtcc caactcgaa
155101 ggggocgggt tcctgcttgt ccccgctcc cccgggcttc ctggagcgtg ccgccccatc
155161 cagcctctc tctgcagca ggtgtgatgt acatacaaaa gtagtgtgtt gttgcctact
155221 gcagacacat ttctggata ttttcaggac atttaagaag gccagtaacc aggtcatgta
155281 gcattctctg agtgtgtata tatatgggg ggtggggagg ttgattgag tgtctgtgca
155341 tgcgatatata cttctagtgc catatccact tggagctctt tgaaagacag taaaaggta
155401 tgttctcca tgataatctt ttctctgatt ttattcaagt aagaattatg ctgagcttta
155461 caggcatatt gtcagatatt atccttaggt tagagcagtg gtttcaaag tgcgttccc
155521 aaccagcaga atccacatca cctgaaatt gtagaatga gaattctggg gctccagcct
155581 agacctgctc aatcagaaac tcttaagata gggccctcaa aacctgttt taacaacct
155641 ccagctaagt ctgatgtatg ctaaagtta agaccactga gataaattgt tagctttaa
155701 aatttcaaat tacctcatgc aagtcgtga aagagatata taaaaggctt ttatatgata
155761 tttaaagtag atgaaggaaa attcaatttt atggattcct tttgccaat tttgatttt
155821 cagtagtatt tttataaac taaataaatt acatattgca gtcattttac atataggtaa
155881 tctacaagtt taccatttt caacagagta tgttccattg gtattttata gagaattgtg
155941 tggtttaatt ttttaggat tggaaaaatt catagacact ggcaattata taatttaaaa
156001 aatgattat tcctctttaa tattgatagt gggaaatgacc agtgggtgagt gattattaat
156061 agaattgaaa caaacctat tgggtttgtc taattttaca gtgtcttatg accttctc
156121 cactacttcc cacctctgcc ccaatttcat gccataatag ttaattcagc aagtatcatt
156181 ctgccttata tgtacctaga aatgtgctaa cacaaggaat caattatttt taaggaaaat
156241 agtggtagaa aaatcttaa catcaccact aaagaactta ttcatgtaac caaacaccac
156301 ctgttcccc aaacacctat tttttaaaa aactcatgcc tacataatga agcctccata
156361 aaaactcaaa aggacctggg tctgggagct tctggatatt tgcccaactg gaggttctg
156421 gagaatagca tgcctgggga gggcaaggaa aatccatgcc ccttctcaca tgccttggcc
156481 tctgcatttc ttcatctgta tcccttgtaa tatgcctcat aataaaccag taaacatgtT
156541 TCTCTGGGGG AAAGAAAAGA GTGGtagaaa agaggttctt gttaaaatgc tacttaacag
156601 cattataatt agagcaattt catgatttga aaaaaatcta cttgtaattc aaaatgaaca
156661 gtaaaaatga ctaatttttc ttattccac agtgtatcgg ctagcctatc tccggctaaa
156721 tacactttgt gaacgccttc tgtctgagca cccagaatta gaacatatca tctggaccct
156781 tttccagcac accctgcaga atgagtatga actcatgaga gacaggcatt tggaccaagt
156841 aagaaaatca agcaacttcc cttcTCTCCT CCCTACTTAC TTGTAACTg atttctttot
156901 ttctttcttt ctttctttct ttctttcttt ctttctttct ttctttcttt tctttctttt
156961 ctttctttct ttctttcttt ttttttttt tgagatagag tctcactctg ttaccagggc
157021 tggagtgcag tggogcaatc toggctcact gcaacctccg cctcccaggt caagtgatc

```

E
=
O
N
I
O

2
0

160381 tgaaacattt tcacacctgg ctttttaag tgctagtatt acaaaattaa ctgattctac
 160441 tttcaacttt tctgggaaac atttaagga caagagccaa agttagggtta atttacaac
 160501 caggatgatca gtctggata attgagcctt ggtgatttgc attttgttct ttaaacacac
 160561 tttgggttaa acacttcatg ta**GACTTTCA** **AACTGAGCTC** **AGTATGG**aaa gaaataactc
 160621 tgtagattaa acctttcttt tttgaggcta aaagaaagaa aatggatttt ttaagaaca
 160681 aaaccatgta ataaaattct gactactttt acatcaattt atttactaga **ttatgatgtg**
160741 ttccatgtat ggcatatgca aagtgaagaa tatagacott aaattcaaaa tcattgtaac
160801 agcatacaag gatcttctct atgctgttca ggaggtaggt aattttccat agtaagtttt
 160861 tttgataaat ccatatccat aacataacat aggtaattca tttgatctca ttatttcatt
 160921 aatgagatca tatattctgt ctgaccttat tatgtaaatt cacaaataaa aacttttata
 160981 ttatttattt gtaacttaa tagaattgga aagataaggg taattatgaa attaccata
 161041 ttcatagttt tttataaagt taataaataa tatttt**ATCC** **CTGTAATAAG** **CAGGTATTTG**
161101 Taataaactt gacatgagtc atagaacatt agatattctt tgaagttatt ttattactt
 161161 tataggaaaa gccagtataa atgcagcctt gcaaatcaat aatacaaatg ttcagtataa
 161221 acacattttg tgtttccggt ttaccttccc tttagagaaa tagtagtagt aaaatatact
 161281 tggatgaca catttcatat tgtctgtgg aaagtgagtt ggggggtatt ttcccattt
 161341 attattggag ttttcaaaag taatacaaac caagtcattt ttgtttgtat gtttgaagtt
 161401 attttctaaa ttcaatcatt ttaattgtat atatcagagg catctgatat aacctctgtg
 161461 tttttcccta aaatttgagt gaaatctaac tatcactaaa atatagtgtt ttactaaat
 161521 gtctacttct tgcaattgca taatgtatac tgaaccctt atagattggg ggggataccg
 161581 ggaggtacag gccagagaat gtagtccaaa tattgggtgga taatattatt ggctttcgtt
 161641 cagctctggc cctttgatcc ccatcatgct ttccattcta ccagtctatc tactctctct
 161701 ttcccagctc atatactctt ctcttcttgg atggccagct ctccatctg ctgctgctg
 161761 gctatttctc tcaatcattc tgtgacattt cactctctaga aga**GCAGCTA** **TAATCCAAGC**
161821 CTAAGAAGta attttattta ttattattt tttcctttat aatatgtgtt tcttaccagt
 161881 caaaaagtat tataaactat tagaaaagaa aatctaaagg tagaaatttt aaaattcatt
 161941 taacaagtaa attttacttt tttttttttt tttttttttt tactgttctt cctcagacat
162001 tcaaacgtgt tttgatcaaa gaagaggagt atgattctat tatagtatcc tataactcgg
162061 tcttcatgca gagactgaaa acaaatattt tgcagtatgc ttccaccagg gtaggtcaaa
 162121 agtatocttt gattgaaaa a**TCTAATGTA** **ATGGGTCCAC** **CAAAAC**atta aataaataat
 162181 ctactttttt gtttttgctc tagccccccta ccttgtcacc aatacctcac attcctogaa
162241 gcccttacia gtttcttagt tcacccttac ggattcctgg agggaacatc tatatttcac
162301 ccctgaagag tocatataaa atttcagaag gtctgccaac accaacaata atgactccaa
162361 gatcaagggt tgtgttttct ctttagggaa gtagtaaaga atgagagggg gattattttg
 162421 atccaagaat aaaaaatata aagcattctt catttcaaat aagctagact cttgaaactc
 162481 tatttgctta ttttaagtaac ataataagaa ta**ggggggcg** **gggtgaagaa** aatcta**TTTA**
162541 CGACTTAAGC AACGCAAGAT Ggcogaatag gaacagctcc ggtctacagc tcccagcgtg
 162601 aggcgacgca gaagacgggt gatttctgca ttccatctg aggtacoggg ttcactcac
 162661 tagggagtgc cagacagtgg gcgcaggcca gtgtgtgtgc gcaccgtgtg cgagccgaag
 162721 caggcgagc gattgcctca cctgggaagc gcaaggggtc agggagtcc ctttccgagt
 162781 caaagaaagg ggtgacggac gcacctggaa aatcgggtca ctcccaccog aatattgcac
 162841 ttttcagacc ggcttaagaa acggcgcacc acgagactat atcccacacc tggctcagag
 162901 ggtcctacgc ccacggaate tctgtgattg ctagcacagc agtctgtgat caaactgcaa
 162961 ggccgagcgt aggcctgggg aggggcgccc gccattgcc aggettgtt aggtaaacaa
 163021 agcagccggg aagctogaac tgggtggagc ccaccacagc tcaaggaggc ctgctctgct

E
E
O
N
I
O
2
1

E
E
O
N
I
O
2
2

E
E
O
N
I
O
2
3

169501 actatatgaa aatgtatact taggtagttt tttttaatag tgataattag tccatattat
169561 ggtgataatg atggctactt gctgacccct agtgaaataa attctgtggt ggtattcttc
169621 agcaaaaacg tcacattctg aacatcctaa ctaataaatc attgaccagg cattaggaga
169681 gcatcttaac actctaccca gtacatttag gtactctggt taatcaaata ttatatgtag
169741 agtgatggcc acttatcaag gaattggagg gcaaaaaaat ctctatattc actagttcca
169801 tgttcatggt ttcaaactct tgtogagtca tgtcaggcta atgatgttct tcagctttat
169861 tataaagaac ataaattata tggttcaaat aaagacagac taataaagat ttctgactct
169921 atgatatatg ataaatagcc tttactatat caatatagat gctaattaga attctgatta
169981 ttacttaata ttctaagttt tttccaata taacttgaat tttaaatgag aaaatatgaa
170041 agaaatttga taacttacc attgatttat gaagaactaa gtaggggtaa ccttgaaact
170101 tgcctttgcc ctccctaaat atgggcaatg gcagaatatg ttcttgaga cctataactt
170161 ttgcttTAAA ACTAAGAGAC TAGGTGAGTA Tatgattaga ogggcactgt tagaataatt
170221 cccaaatgaa tatagtttgt cagtgttct agggtagagg taacctttaa ttgggtatc
170281 ctaatagtcc agaatgatgt atttatgctc atctctgcaa aattgtatat ggtttttat
170341 tactaattgg tatttcatct taacttgaca gaatcttagt atcaattggt gaatcattgg
170401 ggggtgagtat ttcttttcta tgaatataa tagtatgcat tgtaagtata aaagaaatta
170461 aagctttcta taatttgaat ttccaatgc agttattcaa acacctcacc caggcatatt
170521 gcatagaatt ttatgagata tatatatctc agatttactt tcaaatcaag ttaatctca
170581 aatcactact ctaattggtg aacttcaaaa cttttctaaa tatccacttg agattatata
170641 atacatatat acatttgtgt atatacatc atataatcgt gagctgtttt tgctcacaac
170701 atttctatca ccaaagtgtg GAGATTTTT TCTCACCCAA ATCTA ttctt caactctctg
170761 gtgttctaca attcaattca attctgacac taattacca gagtcagcat cagactccac
170821 aggttcaagg gctcagtcac acaaaaatgg tctcactgca gacaccagtc acaagtgtca
170881 ggtcccagg ctacaccaca cttcogtctg acttgaatac gaagtgggg ggttcogata
170941 gtgcctcttc cttacagttt gatccactgc cagaactact cacaaaactc tggaaaatat
171001 tctacttact attatcagtt catcataaaa gatataaatg aacagccaga tgaagaata

E
=
O
N
I
O
2
4

4.4.7 Αλληλουχία γονιδίου Kip1/p27

Εξόνιο 1, 158 κωδικόνια, 474 κωδικοποιόντα ζεύγη βάσεων

5'- GCGGGTCGTGCAGACCCGGGAGGAAGATGTCAAACGTGCGAGTGTCTbp21
AACGGGAGCCCTAGCCTGGAGCGGATGGACGCCAGGCAGGCGGATCACbp69
CCCAAGCCCTCGGCCTGCAGGAACCTCTTCGGCCCCGGTGGACCACGAAbp117
GAGTTACCCGGGACTTGGAGAAGCACTGCAGAGACATGGAAGAGGCGbp165
AGCCAGCGCAAGTGAATTTTCGATTTTCAGAATCACAAACCCCTAGAGbp213
GGCAAGTACGAGTGGCAAGAGGTGGAGAAGGGCAGCTTGCCCGAGTTCbp309
TACTACAGACCCCGCGGCCCCCAAAGGTGCCTGCAAGGTGCCGGCGbp357
CAGGAGAGCCAGGATGGCAGCGGGAGCCGCCCGCGGCCTTTAATTbp405
GGGGCTCCGGCTAACTCTGAGGACACGCATTTGGTGGACCCAAGACTbp453
GATCCGTCCGACAGCCAGACGGGGTTAGCGGAGCAATGCGCAGGAATAbp475
AGGAAGCGACCTGCAACCGACGgtaatgcccttccaacctagaat ιντρόνιο
Gtgtttggggccttcagacctcagatacctgatctactggtgatg ιντρόνιο
gcaaattaaagcttatgggg-3' ιντρόνιο

Εξόνιο 2, 40 κωδικόνια, 120 κωδικοποιόντα ζεύγη βάσεων

5'- gggttttctaccctgactatggggccaactctgagccattgt ιντρόνιο
ttttataataaagattgtgtgtcttttaaaaattcccctgcgct ιντρόνιο

tagATTCTTCTACTCAAAACAAAGAGCCAACAGAACAGAAGAAAATGbp520
TCAGACGGTCCCAAAATGCCGTTCTGTGGAGCAGACGCCCAAGAbp568
AGCCTGGCCTCAGAAGACGTCAAACGTAAACAGCTCGgtgggtgacbp594
actaaaggagcagcactggaacccggggccttcagacctcagatac ιντρόνιο
ctgatctactggtgctggcaaattaaagcttatgggg - 3' ιντρόνιο

4.4.8 Ρυθμιστικά διαλύματα

Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη (PCR buffer) περιλάμβανε τα εξής : Tris – HCl σε τελική συγκέντρωση 10mM και pH 8.4 , 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂ , 0.01% ζελατίνη, 0.01% NP40 και 0.01% Tween 20. Τα μη ιονικά απορρυπαντικά μπορούν να αντικατασταθούν από 0.1% Triton –X 100, ενώ είναι δυνατόν να διαφέρει και η συγκέντρωση αλάτων.

Βασικό ρυθμιστικό διάλυμα είναι το MgCl₂. Τα ιόντα Mg⁺² δημιουργούν ένα διαλυτό σύμπλεγμα με τα dNTPs, το οποίο είναι απαραίτητο για την ενσωμάτωση των δευτέρων στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα του DNA, ενώ συγχρόνως τα ιόντα είναι απαραίτητα για την ενεργότητα της πολυμεράσης. Τα ιόντα Mg⁺² αυξάνουν επίσης το T_m του δίκλωνου μορίου καθώς και του συμπλέγματος του εκκινητή με την αλληλουχία στόχο. Διαπιστώθηκε ότι όταν οι συγκεντρώσεις των ιόντων Mg⁺⁺ ήταν μικρότερες της βέλτιστης ελάττωναν την απόδοση της αντίδρασης ενώ οι μεγαλύτερες ελάττωναν την ειδικότητα και προκαλούσαν την δημιουργία μη ειδικών προϊόντων. Η συγκέντρωση του MgCl₂ στο τελικό διάλυμα της αντίδρασης κυμαινόταν από 2-2.5 mM.

4.4.9 Φραγμός εξάτμισης

Λόγω των υψηλών θερμοκρασιών που αναπτύσσονται στην αντίδραση, απαιτείται ένα στρώμα μεταλλικού ελαίου (mineral oil) ώστε να παρεμποδίζεται η εξάτμιση. Στους θερμικούς κυκλοποιητές νέας τεχνολογίας, όπου το άνω κάλυμμα είναι θερμαινόμενο, η χρήση ελαίου δεν είναι απαραίτητη. Στη παρούσα μελέτη σχεδόν αποκλειστικά χρησιμοποιήθηκε θερμικός κυκλοποιητής με θερμαινόμενο καπάκι και αποφεύχθηκε η χρήση μεταλλικού ελαίου που καθιστούσε δυσχερότερη την SSCP ανάλυση που ακολουθούσε.

4.4.10 Συνθήκες αντιδράσεων PCR

0.3-2μl του εκχυλισμένου DNA από κάθε δείγμα υφίσταται ενζυμική ενίσχυση σε τελικό όγκο αντίδρασης 25μl. Η αντίδραση περιλαμβάνει 3μl ρυθμιστικού διαλύματος της πολυμεράσης, 150-200μM από κάθε dNTP, 0.3-0.5 μM από κάθε εκκινητή και 1-2U πολυμεράση. Το μίγμα αρχικά επωάζεται για 2.5 min στους 94⁰C και ακολουθούν 10 κύκλοι προενίσχυσης (*nested PCR*) και 30 κύκλοι ενίσχυσης με τις ακόλουθες συνθήκες:

Για την ενίσχυση του εξονίου 20 του γονιδίου Rb-1 και την ανίχνευση μεταλλάγων σε αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές 731 και 732. Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν οι εξής: 94⁰C για 30sec, 53⁰C για 35sec και 72⁰C για 35sec για 10 κύκλους. Εν συνεχεία 92⁰C για 30sec, 50⁰C για 35sec και 72⁰C για 50sec για άλλους 30 κύκλους. 3 μl από κάθε PCR προϊόν αναλύεται σε γέλη αгарόζης και εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία, ώστε να πιστοποιηθεί η ενίσχυση της προς έλεγχο περιοχής των 350bp.

Για την ενίσχυση του εξονίου 21 του γονιδίου Rb-1 και την ανίχνευση μεταλλαγών σε αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές 733 και 734. Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν οι εξής: 94⁰C για 35sec, 50⁰C για 35sec και 72⁰C για 45 sec για 10 κύκλους. Εν συνεχεία 92⁰C για 35sec, 48⁰C για 35sec και 72⁰C για 70sec+2s/c για άλλους 30 κύκλους. 3 μl από κάθε PCR προϊόν αναλύεται σε γέλη αгарόζης και εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία, ώστε να πιστοποιηθεί η ενίσχυση της προς έλεγχο περιοχής των 518bp.

Για την ενίσχυση του εξονίου 22 του γονιδίου Rb-1 και την ανίχνευση μεταλλαγών σε αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές 735 και 736. Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν οι εξής: 94⁰C για 35sec, 52⁰C για 35sec και 72⁰C για 40sec για 10 κύκλους. Εν συνεχεία 92⁰C για 35sec, 50⁰C για 35sec και 72⁰C 50sec+1s/c για άλλους 30

κύκλους. 3 μl από κάθε PCR προϊόν αναλύεται σε γέλη αγαρόζης και εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία, ώστε να πιστοποιηθεί η ενίσχυση της προς έλεγχο περιοχής των 363bp.

Για την ενίσχυση του εξονίου 23 του γονιδίου Rb-1 και την ανίχνευση μεταλλαγών σε αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινήτες 737 και 738. Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν οι εξής: 94⁰C για 20sec, 52⁰C για 20sec και 72⁰C για 30 sec για 10 κύκλους. Εν συνεχεία 92⁰C για 20sec, 52⁰C για 25sec και 72⁰C για 35 sec για άλλους 30 κύκλους. 3μl από κάθε PCR προϊόν αναλύεται σε γέλη αγαρόζης και εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία, ώστε να πιστοποιηθεί η ενίσχυση της προς έλεγχο περιοχής των 251bp.

Για την ενίσχυση του εξονίου 24 του γονιδίου Rb-1 και την ανίχνευση μεταλλαγών σε αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινήτες 739 και 740. Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν οι εξής: 94⁰C για 35sec, 50⁰C για 35sec και 72⁰C για 50 sec για 10 κύκλους. Εν συνεχεία 92⁰C για 35sec, 48⁰C για 35sec και 72⁰C για 70sec+2s/c για άλλους 30 κύκλους. 3 μl από κάθε PCR προϊόν αναλύεται σε γέλη αγαρόζης και εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία, ώστε να πιστοποιηθεί η ενίσχυση της προς έλεγχο περιοχής των 550bp.

Για την ενίσχυση του γονιδίου Kip1 και την ανίχνευση μεταλλαγών σε αυτό χρησιμοποιήθηκε ο εκκινήτης shgc2536. Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν οι εξής: 94⁰C για 30sec, 51⁰C για 30sec και 72⁰C για 35 sec για 10 κύκλους. Εν συνεχεία 92⁰C για 30sec, 48⁰C για 30sec και 72⁰C για 45sec για άλλους 30 κύκλους. 3 μl από κάθε PCR προϊόν αναλύεται σε γέλη αγαρόζης και εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία, ώστε να πιστοποιηθεί η ενίσχυση της προς έλεγχο περιοχής των 228bp.

Η εφαρμογή της προενισχυόμενης (nested) PCR, θεωρήθηκε επιβεβλημένη λόγω της παρουσίας των πολλαπλών αναστολέων στα δείγματα, οι οποίοι καθιστούσαν αδύνατη την ενίσχυση των δειγμάτων με την απλή PCR.

4.4.11 Προβλήματα της μεθόδου

Το μεγαλύτερο πρόβλημα που παρουσιάζεται στην αντίδραση PCR είναι η επιμόλυνση των δειγμάτων που συνήθως οφείλεται σε προϊόντα προηγούμενων αντιδράσεων PCR (δηλαδή DNA που έχει πολλαπλασιαστεί με αντίδραση PCR). Στις περιπτώσεις αυτές ακόμη και απειροελάχιστο ποσό πολλαπλασιασμένου προϊόντος προηγούμενης αντίδρασης μπορεί να αποτελέσει το κυρίως υπόστρωμα δίνοντας ψευδώς θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα. Η μεταφορά γίνεται μέσω επιμολυσμένων πιπेटών και προλαμβάνεται: α) χρησιμοποιώντας πιπέτες αποκλειστικής χρήσης για PCR, και όχι τις ίδιες πιπέτες με αυτές που χρησιμοποιούνται κατά την εκχύλιση του DNA. Οι πιπέτες πριν χρησιμοποιηθούν για την αντίδραση πρέπει να εκτίθενται σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) για 15 min β) πρέπει να υπάρχει ειδικός χώρος στο εργαστήριο στον οποίο πραγματοποιείται η PCR αντίδραση (PCR room). Η διασφάλιση ότι το PCR προϊόν που έχει ενισχυθεί προέρχεται από το ελεγχόμενο δείγμα και ότι δεν πρόκειται για ενίσχυση γενωμικού DNA από μόλυνση, εξασφαλίζεται με την χρήση σε κάθε αντίδραση «τυφλών» σωληναρίων ('blank'), δηλαδή σωληναρίων που περιέχουν μόνο το προετοιμαζόμενο διάλυμα (premix) της αντίδρασης χωρίς να έχει προστεθεί DNA. Αν υπάρχει μόλυνση, θα εμφανιστεί ζώνη μοριακού βάρους ίδιου με των ενισχυμένων δειγμάτων. Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκαν όλες οι προαναφερόμενες προϋποθέσεις και χρησιμοποιήθηκαν δύο «τυφλά» σωληνάρια σε κάθε αντίδραση.

Ένα δεύτερο πρόβλημα είναι η ποιότητα των θερμικών κυκλοποιητών. Η θερμαινόμενη επιφάνεια του κυκλοποιητή όπου τοποθετούνται τα σωληνάρια πρέπει να εξασφαλίζει την ίδια θερμοκρασία σε όλα τα σωληνάρια της αντίδρασης. Επίσης ο κυκλοποιητής θα πρέπει να έχει τη δυνατότητα να μεταβάλλει τη θερμοκρασία μεταξύ των τριών σταδίων της αντίδρασης με σχετικά γρήγορο ρυθμό. Ο ρυθμός που ανεβαίνει η θερμοκρασία θα πρέπει να είναι 1-2⁰C/sec και ο ρυθμός που κατεβαίνει 1⁰C/sec. Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε θερμικός κυκλοποιητής της νεότερης τεχνολογίας (PerkinElmer 2400), ώστε να αποφευχθούν τα προαναφερόμενα προβλήματα.

4.5 Ηλεκτροφόρηση ενισχυμένων με PCR αλληλουχιών DNA

Το DNA ηλεκτροφορείται σε γέλη αγαρόζης ή ακρυλαμιδίου. Η επιλογή της συγκεκριμένης γέλης εξαρτάται από το μέγεθος του DNA που πρόκειται να ηλεκτροφορηθεί και από την διακριτική ικανότητα που επιθυμούμε να επιτευχθεί. Συνήθως, όσο μεγαλύτερα είναι τα DNA τμήματα καθώς και όσο μεγαλύτερες είναι οι διαφορές μεγέθους των τμημάτων που πρόκειται να διαχωριστούν, τόσο καταλληλότερη είναι η γέλη αγαρόζης. Αντίθετα, για μικρότερα τμήματα DNA και για μικρές διαφορές μεγέθους ανάμεσά τους, επιλέγεται η γέλη ακρυλαμιδίου. Στην παρούσα μελέτη για τη διαπίστωση της ενίσχυσης των δειγμάτων με τη PCR χρησιμοποιήθηκε η γέλη αγαρόζης, ενώ για τη μελέτη της SCCP ανάλυσης όπου οι διαφορές μεγέθους φυσιολογικού γονιδίου και μεταλλαγμένου είναι μικρές, χρησιμοποιήθηκε η γέλη ακρυλαμιδίου.

4.5.1 Ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων σε γέλη αγαρόζης

Η γέλη αγαρόζης παρασκευάζεται με τη διάλυση της αγαρόζης (σε μορφή σκόνης) σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0.5X και θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων περίπου 5min. Το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει έως περίπου τους 60⁰ C και προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) σε τελική συγκέντρωση 0.5μg/ml. Το βρωμιούχο αιθίδιο έχει την ιδιότητα να συνδέεται στις αλυσίδες του DNA και να φθορίζει παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Μετά από ανακίνηση, το μίγμα τοποθετείται στην ειδική συσκευή με την κατάλληλη «κτένα» δημιουργώντας υποδοχές («πηγάδια») για κάθε δείγμα. Όταν στερεοποιηθεί η αγαρόζη, εμβαπτίζεται σε διάλυμα TBE 0.5X και τα δείγματα τοποθετούνται στα «πηγάδια» αφού αναμιχθούν με 1/10 του όγκου τους από διάλυμα φόρτωσης (loading buffer) που περιέχει χρωστικές με συγκεκριμένη ηλεκτροφορητική δυνατότητα ώστε να είναι εύκολη η παρακολούθηση της πορείας των δειγμάτων. Ταυτόχρονα σε ένα «πηγάδι» φορτώνεται κατάλληλος δείκτης μοριακών βαρών για να είναι δυνατή η άμεση σύγκριση με το μοριακό βάρος που έχουν οι ζώνες των δειγμάτων που έχουν ενισχυθεί με την PCR. Στη γέλη εφαρμόζεται τάση 90-120V για όση ώρα απαιτείται για τον καλό διαχωρισμό των ζωνών.

- Διάλυμα TBE: 10.8gr/l Tris, 5.5gr/l βορικό οξύ, 0.002M EDTA.
- Διάλυμα φόρτωσης : 0.25%w/v μπλε της βρωμοφαινόλης, 0.25%w/v κυανό του ξυλένιου, 25%v /v φικόλη σε 1X TBE.

4.5.2 Ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων σε γέλη πολυακρυλαμιδίου

Η γέλη πολυακρυλαμιδίου προκύπτει από τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου και του Bis- ακρυλαμιδίου, παρουσία ελευθέρων ριζών με τη βοήθεια καταλύτη. Συνήθως ως δότης ελευθέρων ριζών χρησιμοποιείται το υπερθειικό αμμώνιο (ammonium persulfate, APS) και ως καταλύτης η τετραμεθυλ-αιθυλεν- διαμίνη (TEMED).

Το διάλυμα του πολυακρυλαμιδίου διατηρείται έτοιμο προς χρήση σε συγκέντρωση 20%w/v. Η αναλογία του είναι 19:1 μείγμα ακρυλαμιδίου:bis ακρυλαμιδίου. Αφού τα συστατικά διαλυθούν σε απεσταγμένο νερό, το διάλυμα φιλτράρεται σε φίλτρο με διάμετρο πόρου 0.45μm, απεαerώνεται και αποθηκεύεται στο σκοτάδι (Sambrook 1989).

Για την παρασκευή γέλης πολυακρυλαμιδίου 8% όγκου 50ml προστίθενται τα εξής: 10 ml από διάλυμα πολυακρυλαμιδίου από το stock 20%, 8 ml 5X TBE και 22 ml H₂O. Σε ποσότητα περίπου 5 ml από το παραπάνω και προστίθενται 35μl TEMED και 150μl APS. Ανακινούμε και μεταφέρουμε γρήγορα στην ειδική συσκευή το μίγμα ώστε να στεγανοποιήσουμε το κάτω τμήμα της. Αυτό το πρώτο μίγμα στερεοποιείται σε 1-3min. Στην συνέχεια προσθέτουμε 40μl TEMED και 200μl APS προσεκτικά πάνω από το ήδη στερεοποιημένο μίγμα-βάση. Αυτό το δεύτερο μίγμα απαιτεί περίπου 30 min για να στερεοποιηθεί. Στη κορυφή τοποθετούμε «κτένα» ώστε να σχηματιστούν «πηγάδια» για το φόρτωμα των δειγμάτων. Στη γέλη εφαρμόζεται τάση 200V ώστε τα δείγματα να εισέλθουν ομοιόμορφα και εν συνεχεία αυξάνουμε την τάση ως και 300V, για όση ώρα απαιτείται για τον καλό διαχωρισμό των ζωνών.

4.6 Χρώση γέλης πολυακρυλαμιδίου με νιτρικό άργυρο.

Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται όταν το DNA έχει ηλεκτροφορηθεί σε γέλη ακρυλαμιδίου. Χαρακτηρίζεται από τη μεγάλη ευαισθησία της για την οποία επιλέγεται, αντικαθιστώντας την έως σήμερα χρησιμοποιούμενη τεχνική με ραδιενέργεια. Μειονέκτημα της είναι ότι εκτός από το δίκλωνο DNA χρωματίζεται επίσης και το μονόκλωνο DNA, το RNA και οι πρωτεΐνες, δεδομένο που προϋποθέτει για την εφαρμογή της την ύπαρξη ιδιαίτερα καθαρού και ειδικού DNA.

Η χρώση της γέλης ακρυλαμιδίου γίνεται με διαδοχικές εμβαπτίσεις της σε ειδικά διαλύματα που σκοπό έχουν τη μονιμοποίηση του DNA στη γέλη, την ενσωμάτωση της χρωστικής-αργύρου και τη διακοπή της αντίδρασης- χρώσης.

Πιο συγκεκριμένα, τοποθετούμε τη γέλη σε μονιμοποιητικό διάλυμα για 15-20 min με συνεχή ανάδευση. Στο διάλυμα αυτό είναι δυνατόν να διατηρηθεί η γέλη για περισσότερο από ένα 24ωρο. Στη συνέχεια, την εμβαπτίζουμε σε διάλυμα χρώσης νιτρικού αργύρου για 10-15 min. Ο νιτρικός άργυρος είναι φωτοευαίσθητος και γι' αυτό η ανάδευση πραγματοποιείται με καλυμμένη την συσκευή ανάδευσης. Στο τέλος της χρώσης το διάλυμα εκπλύεται με απιονισμένο H₂O και η γέλη τοποθετείται σε διάλυμα εμφάνισης για 3-20 min. Ακολούθως η αντίδραση εμφάνισης εξουδετερώνεται με έκπλυση με διάλυμα ανθρακικού νατρίου. Στο διάλυμα αυτό η χρωσμένη γέλη μπορεί να διατηρηθεί ως τη φωτογράφησή της (Sambrook et al 1989).

- Διάλυμα μονιμοποίησης (fixer) : 900ml απιονισμένο H₂O, 100ml αιθανόλη 10% v/v και 40ml CH₃COOH 0.5% v/v.
- Διάλυμα χρώσης νιτρικού αργύρου: AgNO₃ 0.1% v/v σε 1lt απιονισμένο H₂O.
- Διάλυμα εμφάνισης: 150ml NaOH 0.5N και 400ml φορμαλδεΐδης 0.15% v/v σε 1lt απιονισμένο H₂O .

- Διάλυμα εξουδετέρωσης: 3.75gr Na₂CO₃ 0.75% v/v σε 1lt απιονισμένο H₂O.

4.7 Ταυτοποίηση μεταλλαγμένων δειγμάτων: Ανάλυση Πολυμορφισμού Μονόκλωνης Αλυσίδας (SSCP: Single – Strand Conformation Polymorphism Analysis) και Ανάλυση Ετεροδιμερών (Heteroduplex Analysis)

Για την ανίχνευση μεταλλαγών χρησιμοποιήθηκε η τεχνική SSCP . Πρόκειται για μια ανάλυση η οποία στηρίζεται στην ιδιότητα του DNA μονής αλυσίδας να λαμβάνει τρισδιάστατη μορφή κατά την ηλεκτροφόρηση (Makino1992). Σύμφωνα με αυτή τη τεχνική, η αλληλουχία που ερευνάται για μεταλλαγή ενισχύεται με PCR, και διαχωρίζεται με ηλεκτροφόρηση σε πορώδες μέσο χωρίς αποδιατακτικό. Η μεταλλαγή συνήθως προκαλεί διαφορετική κινητικότητα στη στερεομορφή του DNA κατά την ηλεκτροφόρηση και με τον τρόπο αυτό ανιχνεύεται. Ο λόγος για αυτή την διαταραχή της κινητικότητας θεωρείται ότι είναι οι στερεοδομικές αλλαγές που προκαλεί η μεταλλαγή στην απλή αλυσίδα του μεταλλαγμένου DNA.

Η τεχνική SSCP μόνη ή σε συνδυασμό με την ανάλυση ετεροδιμερών (HA) είναι μια από τις πιο διαδεδομένες και πρακτικές προσεγγίσεις για την ανίχνευση μεταλλαγών. Τα κύρια πλεονεκτήματα της τεχνικής είναι η ταχεία πραγματοποίησή της και το γεγονός ότι μπορεί να εφαρμοστεί με την χρήση εξοπλισμού που είναι διαθέσιμος στα περισσότερα εργαστήρια μοριακής βιολογίας. Η μέθοδος είναι πολύ ευαίσθητη και μπορούν να διακριθούν μεταξύ τους πολλές διαφορετικές μεταλλαγές στο ίδιο τμήμα και στην ίδια γέλη ηλεκτροφόρησης. Οι τεχνικές SSCP και HA μπορούν να πραγματοποιηθούν στο ίδιο πήκτωμα ηλεκτροφόρησης αφού, μετά την αποδιάταξη του δείγματος, πριν από το φόρτωμα των «πηγαδιών», συχνά παρατηρείται ο επανασχηματισμός ενός σημαντικού ποσοστού διπλών αλυσίδων DNA. Το δίκλωνο αυτό DNA εμφανίζεται σε μια κατώτερη θέση από τα προϊόντα

των απλών αλυσίδων στην ηλεκτροφόρηση του SSCP. Από την στιγμή που τα ετεροδιμερή μπορούν να διακριθούν από τα ομοδιμερή, η εμφάνιση των ετεροδιμερών στο πήκτωμα ηλεκτροφόρησης του SSCP μπορεί να παρέχει περισσότερες πληροφορίες για την παρουσία πολυμορφισμού.

Η στερεοδομή, δηλαδή η τεταρτοταγής δομή της απλής αλυσίδας του DNA καθορίζεται από τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις, οι οποίες μπορεί να μεταβληθούν με βάση τις φυσικές συνθήκες, όπως η θερμοκρασία και το ιονισμένο περιβάλλον. Έτσι, ο διαχωρισμός του μεταλλαγμένου DNA με την μέθοδο SSCP ποικίλει ανάλογα με τις συνθήκες της ηλεκτροφόρησης. Αν και έχουν αρχίσει να δημιουργούνται εμπειρικοί κανόνες για το βέλτιστο διαχωρισμό των διαφόρων αλληλουχιών, δεν είναι ακόμα προβλέψιμο εάν μια συγκεκριμένη μετάλλαξη μπορεί να ανιχνευτεί κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Παρ' όλα αυτά, η ευαισθησία της PCR - SSCP θεωρείται υψηλή όταν η αλληλουχία είναι μικρή. Δεν υπάρχει θεωρητική επιβεβαίωση ότι η ευαισθησία της μεθόδου είναι 100%. Συνεπώς, η μη εμφάνιση μιας νέας ζώνης, δεν αποκλείει την παρουσία της μεταλλαγής.

Οι μεταλλαγές που ανιχνεύονται με τη μέθοδο PCR - SSCP δεν περιορίζονται σε προκαθορισμένες θέσεις στο τμήμα DNA που έχουν ενισχυθεί με PCR. Άλλες μοριακοί μέθοδοι δηλαδή μέθοδοι σάρωσης, όπως ονομάζονται, είναι οι: DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), ανάλυση ετεροδιμερών και η ανάλυση αποκοπής κακοσυζευγμένων βάσεων (mismatch cleavage analyses). Μεταξύ αυτών των τεχνικών, η SSCP είναι η απλούστερη. Παρουσιάζει το πλεονέκτημα της ανίχνευσης και απομόνωσης των μεταλλαγμένων τμημάτων που αποτελούν ένα μικρό τμήμα στην ελεγχόμενη αλληλουχία και του χαρακτηρισμού τους με τη μέθοδο νουκλεοτιδικής ταυτοποίησης (sequencing) μετά την ενίσχυσή τους.

Η τεχνική SSCP έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση άγνωστων μεταλλαγών σχετιζόμενων με ασθένειες. Χαρακτηριστικά παράδειγμα η ανίχνευση ογκογονιδίων σε καρκινικούς ιστούς (Dean 1990), η ανίχνευση μεταλλαγών σε γονίδια που σχετίζονται με κληρονομικές νόσους σε φορείς ή ασθενείς με ενεργή νόσο (Kozlowski 1996), με σκοπό να αποδειχθεί ότι αυτά τα γονίδια είναι πράγματι υπεύθυνα. Η μέθοδος αυτή μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί προκειμένου να αποδειχθεί η παρουσία ή η απουσία ανιχνεύσιμων μεταλλαγών, όπως π.χ. έλεγχος εάν ένα παιδί είναι φορέας ενός μεταλλαγμένου αλληλομόρφου που έχει εντοπιστεί στο γονιδίωμα των γονέων.

Τυπικά, το αυτοραδιόγραμμα του ίδιου μοριακού είδους (π.χ. κλωνοποιημένο DNA, ομόζυγες θέσεις) μπορεί να δώσει το πολύ δύο ζώνες, κάθε μια από τις οποίες αντιστοιχεί στις διαχωρισμένες αλυσίδες. Μόνο μια ζώνη μπορεί να παρατηρηθεί στη περίπτωση που οι δύο αλυσίδες δεν έχουν διαχωριστεί.

Για την ανάλυση SSCP- HA : 5μl από κάθε PCR προϊόν αναμειγνύεται με 5μl αποδιατακτικού διαλύματος (NaOH 10mM, 2μM EDTA, 95% φορμαμίδη, 0.05% κυανό της βρωμοφαινόλη και 0,05% κυανό του ξυλένιου). Ακολουθεί αποδιάταξη του DNA με επώαση στους 94⁰C για 5min, και απότομη ψύξη τους στους 0⁰C (τοποθέτηση των erpendorfs στον πάγο). Στη συνέχεια 2-5μl από το κάθε προϊόν ηλεκτροφορείται σε γέλη πολυακρυλαμιδίου 10% (37.5/1 acrylamide/bisacrylamide) σε θερμοκρασία 4⁰C για 2000-6000Vh ανάλογα με το μέγεθος του PCR προϊόντος. Ακολουθεί χρώση με την μέθοδο του νιτρικού αργύρου. Για την ετεροδίκλωνη ανάλυση (Heteroduplex) τα PCR προϊόντα αποδιάσσονται στους 94⁰ C για 5 min και στη συνέχεια αφήνονται να επανέλθουν στη θερμοκρασία περιβάλλοντος. 2-5μl από το κάθε προϊόν ηλεκτροφορούνται σε γέλη πολυακρυλαμιδίου 10% (37.5/1 acrylamide/bisacrylamide) σε θερμοκρασία δωματίου για 1000-3000Vh ανάλογα με

το μέγεθος του PCR προϊόντος, και ακολουθεί χρώση με την μέθοδο του νιτρικού αργύρου. Οι αποδιατεταγμένες (απλές) αλυσίδες του DNA διαχωρίζονται στο πήκτωμα και οι μεταβολές στην αλληλουχία του DNA μεταξύ των εκκινητών εμφανίζονται ως τμήματα με διαφορετική κινητικότητα εξαιτίας της διαφορετικής αναδίπλωσης της απλής αλυσίδας. Οι συνθήκες της ηλεκτροφόρησης μπορεί να επηρεαστούν με την αλλαγή της θερμοκρασίας, το βαθμό της διασταυρούμενης σύνδεσης στο μέσο της γέλης ή με την εισαγωγή γλυκερόλης ή σουκρόζης (από λάθος στο buffer της ηλεκτροφόρησης).

Το προϊόν του εξονίου 21 και 23 λόγω του μεγέθους τους για να μπορέσει να υποστεί SSCP ανάλυση (μη εφικτή όταν το DNA είναι μεγαλύτερο από 450 bp), υποβάλλονται σε πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα NdeI, στους 37° C για μια νύχτα, δίνοντας δύο υποπροϊόντα 180/338 bp.

Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων ενός SSCP απαιτεί κάποια εμπειρία. Δείγματα ελέγχου με γνωστές μεταλλαγές μπορεί να βοηθήσουν στην ανάλυση. Ένα ποσοστό διπλής έλικας DNA επανασχηματίζεται κατά την αποδιάταξη, γεγονός το οποίο προκαλεί την επανεμφάνιση ζωνών στο κάτω μέρος της γέλης. Ετεροδιμερή διπλής αλυσίδας που σχηματίζονται όταν μια μεταλλαγμένη και μια φυσιολογικού τύπου αλυσίδα επανασυνδέονται, μπορούν να βοηθήσουν στην ανάδειξη των αλλαγών στην αλληλουχία. Αυτά τα ετεροδιμερή εντοπίζονται ακριβώς πάνω από τις διπλές αλυσίδες DNA. Παρότι τα ετεροδιμερή είναι πιο επικρατή στη περίπτωση ενθέσεων ή ελλείψεων, μπορούν να εμφανιστούν και σε ορισμένες σημειακές μεταλλαγές. Αν και αναμένεται ότι οι δύο αλυσίδες θα κινηθούν με διαφορετική ταχύτητα στη γέλη, αυτό δεν συμβαίνει πάντα. Παρομοίως, σε ένα ετεροζυγώτη, δε διαχωρίζονται πάντα και οι τέσσερις αλυσίδες. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι ένα μεταλλαγμένο δείγμα πρέπει να δίνει ένα καθαρά διαφορετικό πρότυπο από ένα δείγμα άγριου

τύπου (wild type). Επιπρόσθετα, ένας ετεροζυγώτης θα πρέπει να επιδεικνύει την ίδια περίπου ένταση και στις τέσσερις ζώνες.

Περιστασιακά, οι ψευδείς ζώνες του PCR εμφανίζονται και περιπλέκουν την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Εάν μια ζώνη εμφανίζεται μόνο σε δείγματα που έχουν ενισχυθεί περισσότερο από τα άλλα, είναι πιο πιθανό να είναι μια ψευδής ζώνη. Σε δείγματα που ενισχύονται πολύ ή που έχουν τοποθετηθεί στη γέλη σε μεγάλη ποσότητα, μπορεί να κάνουν την εμφάνιση τους εναλλακτικές στερεοδομές. Αυτές μπορεί να είναι το αποτέλεσμα σχηματισμών που έχουν μερικά διαχωριστεί. Αραίωση των δειγμάτων θα μετατρέψει τις διπλές αλυσίδες του DNA σε απλές και θα απομακρύνει μερικές από αυτές τις επιπρόσθετες ζώνες. Η 100% επιβεβαίωση μιας πιθανής μεταλλαγής που υποδεικνύεται από το SSCP προέρχεται από την νουκλεοτιδική ταυτοποίηση (sequencing).

4.8 Υλικά και εταιρείες προέλευσης

1.2 - διυδροξυ-αιθενο-δισ-ακρυλαμίδιο (Bis –acrylamide) - BDH

Αγαρόζη (agarose) – Life Technologies (Cibco BRL)

Melting Αγαρόζη– Life Technologies (Cibco BRL)

Αιθανόλη (ethanol)- BDH

Αιθυλο-διαμινο-τετραοξικό οξύ (EDTA) – BDH

Ακρυλαμίδιο (acrylamide) – BDH

Ανθρακικό νάτριο – Sigma

Βορικό οξύ(borid acid) – BDH

Βρωμιούχο αιθίδιο (ethidium bromide) – Sigma

Γλυκερόλη (glycerol) – Life Technologies (Cibco BRL)

Διαιθυλ-πυροσταφυλικό οξύ – BDH

Διμεθυλσουλφοξείδιο – BDH

Δεσοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs)– Boehringer Mannheim, New England Biolabs

DNA δείκτες μοριακού βάρους:

123 Kb DNA Ladder – Life Technologies (Cibco BRL)

Ένζυμο περιορισμού (restriction enzymes) NdeI – New England Biolabs

Θειικό αμμώνιο(ammonium sulphate) –Fluka

Ισοπροπανόλη – BDH

Κιτρικό νάτριο – BDH

Κυανούν της βρωμοφαινόλης(bromophenol blue) – Sigma

Κυανούν του ξυλένιου (xylene blue) – Sigma

Μεμβράνες διαπίδυσης πόρων διαμέτρου 0.22 μm και 0.45 μm –Millipore

Νιτρικός άργυρος – Sigma

Οξικό αμμώνιο – Sigma

Οξικό κάλιο – Sigma

Οξικό νάτριο - Sigma

Οξικό οξύ – BDH

Πρωτεΐνάση K – Sigma

SDS (Sodium dodecyl sulphate) – Sigma

Taq πολυμεράση – Cibco BRL

TEMED – Sigma

Tris base – BDH

TRITON X –100 - Sigma

Tween 20- Sigma

Υδροξείδιο του νατρίου – BDH

Υδροχλωρικό οξύ– BDH

Υπερθειικό αμμώνιο (ammonium persulphate) – Life Technologies Cibco BRL

Υπεροξείδιο του υδρογόνου – BDH

Φαινόλη – BDH

Φορμαλδεΰδη – BDH

Φορμαμίδιο – BDH

Χλωριούχο μαγνήσιο – Sigma

Χλωριούχο νάτριο – Sigma

Χλωροφόρμιο – Fluka

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5°

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 Συχνότητα μεταλλαγών

Συνολικά όσον αφορά το γονίδιο Rb-1 ανιχνεύθηκαν μεταλλαγές στο 41% των περιπτώσεων οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας (15/39), στο 67% των περιπτώσεων οξείας μυελογενούς λευχαιμίας (8/12) και στο 22% των περιπτώσεων νευροβλαστώματος (2/9) (Πίνακας 16).

Πίνακας 16 : Ποσοστό μεταλλαγών Rb-1 στις ΟΛΛ, ΟΜΛ και νευροβλάστωμα

	ΟΛΛ	ΟΜΛ	Νευροβλάστωμα
Ποσοστό	15/39	8/12	2/9
μεταλλαγών RB-1	41%	67%	22%

Στους ασθενείς με ΟΛΛ αλλοιωμένο πρότυπο διαμόρφωσης του Rb-1 παρατηρήθηκε σε τρεις ασθενείς στο εξόνιο 20 (7.6%), σε τρεις ασθενείς στο εξόνιο 21 (7.6%), σε 6 ασθενείς στο εξόνιο 22 (15 %), σε ένα ασθενή στο εξόνιο 23 (2.5%) και σε δύο ασθενείς στο εξόνιο 24 (2.5 %).

Στις περιπτώσεις ΟΜΛ αλλοιωμένο πρότυπο διαμόρφωσης του Rb-1 ανιχνεύθηκε σε δύο ασθενείς στο εξόνιο 21 (16%), σε τρεις ασθενείς στο εξόνιο 22 (25%), σε 2 ασθενείς στο εξόνιο 23 (16%) και σε δύο ασθενείς στο εξόνιο 24 (2.5 %).

Σε δύο παιδιά με νευροβλάστωμα ανιχνεύθηκε μεταλλαγή στο εξόνιο 22 του Rb-1 (Πίνακας 17).

Πίνακας 17 : Μεταλλαγές του Rb-1 στις ΟΛΛ, ΟΜΛ και το νευροβλάστωμα

Εξόνια	ΟΛΛ	ΟΜΛ	Νευροβλάστωμα
20	3/39 (7,6%)	-	-
21	3/39 (7,6%)	2/12 (16%)	-
22	6/39 (15%)	3/12 (25%)	2/9 (22%)
23	1/39 (2,5%)	2/12 (16%)	-
24	2/39 (5,1%)	1/12 (8%)	-

Αναφορικά με το γονίδιο Kip1 συνολικά ανιχνεύθηκαν 2 μεταλλαγές στις οξείες λεμφοβλαστικές λευχαιμίες (2/39), ποσοστό 5% και 3 μεταλλαγές στις οξείες μυελογενείς (3/12), ποσοστό 25% και καμία στα νευροβλαστώματα (Πίνακας 18).

Πίνακας 18: Ποσοστό μεταλλαγών Kip1 στις ΟΛΛ, ΟΜΛ και το νευροβλάστωμα

	ΟΛΛ	ΟΜΛ	Νευροβλάστωμα
ποσοστό	2/39	3/12	0/9
μεταλλαγών Kip1	5%	25%	0%

Αλλοιωμένο πρότυπο διαμόρφωσης του Kip1 ανιχνεύθηκε σε 2/4 T-ΟΛΛ της μελέτης και σε 3/12 ΟΜΛ (Πίνακας 19).

Πίνακας 19 : Μεταλλαγές του Kip1 στις T-ΟΛΛ, ΟΜΛ και το νευροβλάστωμα

Kip1/p27	T- ΟΛΛ	ΟΜΛ	Νευροβλάστωμα
εξόνια 1, 2	2/4 (50%)	3/12 (25%)	0/9 (0%)

Συνολικά ανιχνεύτηκαν 17 μεταλλαγές στα γονίδια Rb-1 και Kip1 στις ΟΛΛ και αφορούσαν: 1/12 στις σταθερού κινδύνου (SR), 6/14 στις ενδιάμεσου κινδύνου (MR), και 10/11 στις υψηλού κινδύνου (HR) (Πίνακας 20).

Πίνακας 20 : Κατάταξη ΟΛΛ σε ομάδες κινδύνου - συνύπαρξη μεταλλαγών

Σταθερού κινδύνου SR (n=12)		Ενδιάμεσου κινδύνου MR (n=16)		Υψηλού κινδύνου HR (n= 11)	
α/α	μεταλλαγής	α/α	μεταλλαγή	α/α	μεταλλαγή
No 13	(+) Rb-1	No 4	(-)	No 1	(+) Rb-1
No 26	(-)	No 5	(-)	No 3	(+) Rb-1
No 29	(-)	No 9	(-)	No 7	(+) Rb-1 (+) Kip1
No 32	(-)	No 15	(-)		
No 37	(-)	No 22	(-)		
No 38	(-)	No 24	(+) Rb-1	No 11	(+) Rb-1
No 42	(-)	No 25	(-)	No 12	(+) Rb-1 (+) Kip1
No 43	(-)	No 28	(-)	No 17	(+) Rb-1
No 48	(-)	No 33	(+) Rb-1	No 18	(-)
No 52	(-)	No 34	(-)	No 20	(-)
No 53	(-)	No 35	(+) Rb-1	No 23	(+) Rb-1
		No 44	(-)	No 41	(+) Rb-1
		No 45	(+) Rb-1	No 51	(-)
		No 47	(+) Rb-1		
		No 50	(+) Rb-1		
		No 51	(-)		

5.2 Συσχέτιση των μεταλλαγών με τη σταδιοποίηση της νόσου

Στις περιπτώσεις ΟΛΛ οι μεταλλαγές του Rb-1 αφορούσαν κυρίως περιπτώσεις υψηλού κινδύνου (HR). Αναλυτικότερα, μεταλλαγή του Rb-1 είχαν οχτώ από τις έντεκα περιπτώσεις ΟΛΛ της ομάδας υψηλού κινδύνου (HR). Μεταλλαγή του Rb-1

ανιχνεύτηκε σε οχτώ από τις έντεκα περιπτώσεις ΟΛΛ της ομάδας υψηλού κινδύνου (HR). Οι ασθενείς αυτοί ήταν : α) αγόρι 2.5 ετών το οποίο αρχικά είχε θεωρηθεί MR και το οποίο 3 μήνες μετά την ολοκλήρωση της ΧΜΘ υποτροπίασε στο ΚΝΣ και στο μυελό, υποβλήθηκε σε ΜΜΟ από ιστοσυμβατό αδερφό αλλά 15 μήνες μετά την μεταμόσχευση υποτροπίασε στο ΚΝΣ, έλαβε ΧΜΘ και βρίσκεται 9 μήνες εκτός θεραπείας, β) αγόρι 5.5 ετών το οποίο αρχικά είχε θεωρηθεί MR, στο τρίτο κύκλο της maintenance παρουσίασε την πρώτη υποτροπή στο ΚΝΣ, και ενώ βρισκόταν σε ΧΜΘ παρουσίασε 2^η υποτροπή στο ΚΝΣ και κατέληξε, γ) αγόρι 6.5 ετών το οποίο αρχικά είχε θεωρηθεί MR, στο οποίο δεν επιτεύχθηκε ύφεση την 33^η ημέρα και χρειάστηκε εντατικοποίηση του πρωτοκόλλου για να επιτευχθεί ύφεση, δ) κορίτσι 12 ετών το οποίο κατέληξε πρώιμα τις πρώτες μέρες της θεραπείας, πριν επιτευχθεί ύφεση, ε) τρία αγόρια με Τ-ΟΛΛ, τα δυο βρίσκονται έξι και τρία χρόνια αντίστοιχα εκτός ΧΜΘ και το τρίτο στο 5^ο κύκλο maintenance και στ) ένα κορίτσι 2 ετών στο 4^ο κύκλο maintenance.

Μόνο σε μια ΟΛΛ σταθερού κινδύνου (SR) ανιχνεύθηκε μεταλλαγή του Rb-1. Στην ομάδα ΟΛΛ ενδιάμεσου κινδύνου (MR) ανιχνεύθηκαν έξι μεταλλαγές του Rb-1. Δεδομένου ότι οι περιπτώσεις ΟΜΛ θεωρούνται λευχαιμίες υψηλού κινδύνου, οι οχτώ ανιχνευθείσες μεταλλαγές του Rb-1 στις ΟΜΛ κατατάσσονται στις μεταλλαγές λευχαιμιών υψηλού κινδύνου (Πίνακας 21).

Πίνακας 21 : Συσχέτιση μεταλλαγών Rb-1 με ομάδα κινδύνου

Οξείες Λευχαιμίες (μεταλλαγές)	Σταθερού Κινδύνου (SR)	Ενδιάμεσου Κινδύνου (MR)	Υψηλού Κινδύνου (HR)
ΟΛΛ (15)	1	6	8
ΟΜΛ (8)			8

() : αριθμός μεταλλαγών

Στις περιπτώσεις νευροβλαστώματος οι μεταλλαγές του Rb-1 ανιχνεύθηκαν στα δυο παιδιά σταδίου IV με διήθηση μυελού (Πίνακας 22).

Πίνακας 22 : Νευροβλάστωμα : Στάδιο νόσου- μεταλλαγές στο Rb-1

μεταλλαγές	στάδιο I	στάδιο II	στάδιο III	στάδιο IV	στάδιο IV-S
Rb-1		1	1	2(2+) διήθηση μυελού	3
Rb-1				2 χωρίς διήθηση μυελού	

(+) : αριθμός δειγμάτων με μεταλλαγή στο Rb-1

Μεταλλαγές του Kip1/p27 δεν ανιχνεύτηκαν σε Β-ΟΛΛ. Ανιχνεύτηκαν δυο μεταλλαγές του Kip1 σε Τ-ΟΛΛ και τρεις σε ΟΜΛ (Πίνακας 23).

Πίνακας 23 : Συσχέτιση μεταλλαγών Kip1/ p27 και ομάδας κινδύνου

Οξείες Λευχαιμίες (μεταλλαγές)	Σταθερού Κινδύνου (SR)	Ενδιαμέσου Κινδύνου (MR)	Υψηλού Κινδύνου (HR)
ΟΛΛ (2)	-	-	2
ΟΜΛ (3)	-	-	3

Σε καμία περίπτωση νευροβλαστώματος δεν ανιχνεύθηκε μεταλλαγή του Kip1/p27 (Πίνακας 24)

Πίνακας 24: Νευροβλάστωμα : Στάδιο νόσου- μεταλλαγές στο Kip1/p27

μεταλλαγές	Στάδιο I	Στάδιο II	Στάδιο III	Στάδιο IV	Στάδιο IV-S
Kip1/p27		1(-)	1(-)	2(-) διήθηση μυελού	3(-)
Kip1/p27				2(-) χωρίς διήθηση μυελού	

(-):χωρίς μεταλλαγή στο Kip1/p27

5.3 Συσχέτιση μεταλλαγών Rb-1 με γνωστούς προγνωστικούς παράγοντες στην ΟΛΛ

Αιματολογικές παράμετροι

Έγινε συσχέτιση των μεταλλαγών με τον αριθμό των λευκών, των βλαστών στο περιφερικό αίμα, της αιμοσφαιρίνης και των αιμοπεταλίων. Συσχέτιση βρέθηκε με τον αριθμό των λευκών της διάγνωσης. Στις ΟΛΛ ενδιαμέσου κινδύνου σε ποσοστό μεγαλύτερο από 90% οι μεταλλαγές στο Rb-1 ανιχνεύονται στις λευχαιμίες με αριθμό λευκών >20.000/μl. Στις ΟΛΛ ενδιαμέσου κινδύνου με φυσιολογικό αριθμό λευκών στο περιφερικό αίμα δεν ανιχνεύτηκαν μεταλλαγές (Πίνακας 25) .

Πίνακας 25 : ΟΛΛ MR και συσχέτιση αριθμού λευκών - μεταλλαγών Rb-1

α/α ασθενούς	αριθμός λευκών	μεταλλαγές
No 4	5000/μl	(-)
No 5	5200/μl	(-)
No 9	2200/μl	(-)
No 15	9300/μl	(-)
No 24	47200/μl	(+)
No 25	20200/μl	(-)
No 28	70000/μl	(-)
No 33	26800/μl	(+)
No 34	1000/μl	(-)
No 35	62500/μl	(+)
No 44	12300/μl	(-)
No 45	44800/μl	(+)
No 46	36400/μl	(+)
No 50	44900/μl	(+)
No 51	2500/μl	(-)

Με τις λοιπές αιματολογικές παραμέτρους (αιμοσφαιρίνη, αιμοπετάλια, αριθμός βλαστών στο περιφερικό αίμα στη διάγνωση) δε διαπιστώθηκε συσχέτιση τους με μεταλλαγές στο Rb-1 (Πίνακας 26).

Πίνακας 26 : Συσχέτιση μεταλλαγών Rb-1 με αιματολογικές παραμέτρους

	Μεταλλαγές	Λευκά/βλάστες	Hb	ΑΜΠ
Εξόνιο 20	*No 23 ♂ HR	5300/μl (16%)	6,7 gr/dl	160000/ μl
	No 24 ♀ MR	47200/μl (87%)	6,5 gr/dl	24000/ μl
	No 45 ♀ MR	44800/μl (46%)	7,4 gr/dl	148000/ μl
Εξόνιο 21	No 35 ♂ MR	69500/μl (83%)	6,2 gr/dl	48000/ μl
	No 41 ♂ T-ΟΛΛ HR	216000/μl (76%)	7,5 gr/dl	60000/ μl
	No 50 ♀ MR	489000/μl (94%)	6,9 gr/dl	38000/ μl
Εξόνιο 22	No 1 ♂ HR	56000/μl (61%)	8,1 gr/dl	11000/ μl
	No 3 ♂ HR	100000/μl (93%)	12,8 gr/dl	182000/ μl
	**No 11 ♂ HR			
	No 12 ♂ T-ΟΛΛ HR	27500/μl (30%)	12 gr/dl	317000/ μl
	No 13 ♀ SR	4400/μl (94%)	6,9 gr/dl	33000/ μl
	No 46 ♀ MR	36400/μl (88%)	5,6 gr/dl	18000/ μl
Εξόνιο 23	No 33 ♂ MR	26800/μl (96 %)	5,2 gr/dl	34000/μl
Εξόνιο 24	No 7 ♂ T-ΟΛΛ HR	13800/μl (2%)	14,5 gr/dl	361000/μl
	No17 ♂ HR	42000/μl (42%)	6,8 gr/dl	95000/ μl

*Μη υφεση 33^η ημέρα→HR

**MR, αρ. λευκών <20.000,θάνατος στο induction από τοξικότητα

Ανοσοφαινότυπος

Από τις 15 περιπτώσεις στις οποίες ανιχνεύθηκαν μεταλλαγές στο Rb-1, και οι 12 που αφορούσαν λευχαιμία Β σειράς ΟΛΛ ήταν cALLA+. Αν και ο αριθμός των T-ΟΛΛ είναι μικρός για να γίνει στατιστική ανάλυση, ωστόσο οι τρεις από τις τέσσερις T-ΟΛΛ της μελέτης είχαν μεταλλαγή στο Rb-1. Μεταλλαγές στο Kip1 αφορούν μόνο T-ΟΛΛ.

Ηλικία-φύλο-κατοικία

Δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση των μεταλλαγών με την ηλικία ή το φύλο ούτε της συχνότητας των μεταλλαγών με το τόπο διαμονής του ασθενούς.

5.4 Συσχέτιση μεταλλαγών με πορεία-έκβαση νόσου

Στην ομάδα της ΟΛΛ μια περίπτωση ΟΛΛ σταθερού κινδύνου και έξι ΟΛΛ ενδιάμεσου κινδύνου με μεταλλαγή στο Rb-1 δεν παρουσίασαν υποτροπή και απολαμβάνουν μακράς διάρκειας πλήρη ύφεση. Σε τρεις ΟΛΛ υψηλού κινδύνου δεν επιτεύχθηκε ύφεση. Στις δυο δεν επιτεύχθηκε ύφεση την 33^η ημέρα, αλλά στη συνέχεια με εντατικοποίηση της θεραπείας, ωστόσο όμως ο ένας ασθενής κατέληξε. Στη τρίτη περίπτωση ΟΛΛ όμως δεν επιτεύχθηκε καθόλου ύφεση και η ασθενής κατέληξε.

Οι τέσσερις από τις δώδεκα περιπτώσεις ΟΜΛ που δεν είχαν μεταλλαγή στο Rb-1 απολαμβάνουν πλήρη ύφεση 3 έως 7 χρόνια από τη διάγνωση. Και οι οχτώ ΟΜΛ με μεταλλαγές στο Rb-1 έχουν καταλήξει (Πίνακας 27).

Πίνακας 27 : Συσχέτιση μεταλλαγών Rb-1 με πορεία-έκβαση νόσου

Στάδιο νόσου	Διάγνωση	Υποτροπή	Μη ύφεση 33^η ημέρα θεραπείας ή ποτέ	Θάνατος
Σταθερού Κινδύνου (SR)	12(1+)	-	-	-
Ενδιαμέσου Κινδύνου (MR)	16(6+)	-	-	-
Υψηλού Κινδύνου (HR)	23(16+)			
	11ΟΛΛ(8+)	2(2+)	3(3+)	2(2+)
	12ΟΜΛ(8+)	2(2+)	6(6+)	7(7+)

(+) ο αριθμός των ασθενών με μεταλλαγή

Στις περιπτώσεις νευροβλαστώματος οι μεταλλαγές του Rb-1 ανιχνεύτηκαν στα δυο παιδιά που είχαν διήθηση μυελού, από τα οποία το ένα έχει καταλήξει ενώ το άλλο απολαμβάνει πλήρη ύφεση 2 χρόνια μετά το τέλος της θεραπείας.

Οι μεταλλαγές στο Kip1 αφορούσαν δυο T-ΟΛΛ. Οι τρεις από τις δώδεκα ΟΜΛ με μεταλλαγή στο Kip1 αφορούσαν α) ένα βρέφος 12 μηνών το οποίο κατέληξε όταν υποτροπίασε 9 μήνες μετά τη ΜΜΟ, β) μια δευτεροπαθή ΟΜΛ μετά από οστεοσάρκωμα στην οποία δεν επιτεύχθηκε ύφεση και γ) ένα έφηβο που κατέληξε ένα χρόνο μετά από την απλοταυτόσιμη ΜΜΟ στην οποία υποβλήθηκε κατά την 3^η υποτροπή (Πίνακας 28).

Πίνακας 28 : Συσχέτιση μεταλλαγών Kip1 με πορεία-έκβαση νόσου

Στάδιο νόσου	Διάγνωση	Υποτροπή	Μη ύφεση	Θάνατος
Σταθερού κινδύνου	12(0+)	-	-	-
Ενδιαμέσου κινδύνου	16(0+)	-	-	-
Υψηλού κινδύνου	23(5+) 11ΟΛΛ(2+) 12ΟΜΛ(3+)	- 2(2+)	- 1(1+)	- 3(3+)

(+) ο αριθμός των ασθενών με μεταλλαγή

Το εξόνιο 22 του Rb-1 φαίνεται να αποτελεί την «θερμή περιοχή» (hot spot) του γονιδίου, αφού εκεί παρατηρούνται οι περισσότερες μεταλλαγές και αυτές σε ασθενείς με τη δυσμενέστερη πρόγνωση. Τα υπόλοιπα εξόνια έχουν ισάριθμες μεταλλαγές (Πίνακας 29).

Πίνακας 29 : Αριθμός μεταλλαγών σε κάθε εξόνιο Rb-1

	εξόνιο 20	εξόνιο 21	εξόνιο 22	εξόνιο 23	εξόνιο 24
Αριθμός μεταλλαγών	3	5	11	3	3

Το αλλοιωμένο πρότυπο που ανιχνεύτηκε με την SSCP ανάλυση αφορά τον ίδιο τύπο μεταλλαγής για το κάθε εξόνιο.

5.5 Συνύπαρξη μεταλλαγών Kip 1 και Rb-1

Ταυτόχρονη ανίχνευση μεταλλαγών στο Kip 1 και Rb-1 παρατηρήθηκε σε τρεις περιπτώσεις ΟΜΛ και στις δυο Τ-ΟΛΛ. Και οι τρεις ασθενείς με ΟΜΛ οι οποίοι έχουν ήδη καταλήξει έφεραν μεταλλαγές στο εξόνιο 22. Οι δυο ασθενείς με Τ-ΟΛΛ απολαμβάνουν μακρά επιβίωση (Πίνακας 30).

Πίνακας 30 : Συνύπαρξη μεταλλαγών Kip1/p27 και Rb-1

	εξόνιο 20	εξόνιο 21	εξόνιο 22	εξόνιο 23	εξόνιο 24
Kip1	(-)	(-)	No 8: ΟΜΛ, Θ No 27: ΟΜΛ, Θ No 31: ΟΜΛ, Θ No 12: Τ-ΟΛΛ	(-)	No 7: Τ-ΟΛΛ

Πίνακας 31 : ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΟΙ ΜΕΤΑΛΛΑΓΕΣ ΤΟΥ Rb-1 ΚΑΙ ΤΟΥ Kip1/p27

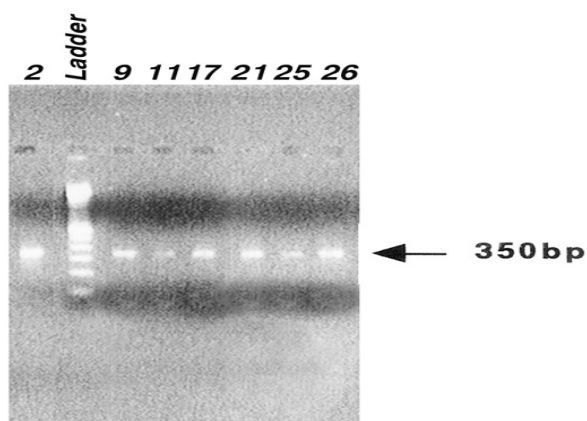
α/α ασθενούς	νόσος	στάδιο κινδύνου	εξόνιο 2	Εξόνιο2	εξόνιο2 ³	εξόνιο2 ³	εξόνιο2 ⁴	Kip1p27
No 1 ΣΔ	ΟΛΛ	HR			+			
No 3 ΜΓ	ΟΛΛ	HR			+			
No 4 ΣΝ	ΟΛΛ	MR						
No 5 ΣΜ	ΟΛΛ	MR						
No 6 ΚΚ	ΟΛΛ	HR						
No 7 ΑΕ	Τ-ΟΛΛ	HR					+	+
No 8 ΑΘ	ΟΜΛ	HR						+
No 9 ΜΑ	ΟΛΛ	MR						
No 10 Φ	ΟΜΛ	HR						
No 11 Ζ	ΟΛΛ	HR			+			
No 12 ΠΓ	Τ-ΟΛΛ	HR			+			+
No 13 ΒΕ	ΟΛΛ	SR			+			
No 14 Σ	ΟΜΛ	HR						
No 15 Δ	ΟΛΛ							
No 16 Τ	ΟΜΛ	HR						
No 17ΝΙ	Τ-ΟΛΛ	HR					+	
No 18 ΧΑ	ΟΛΛ	HR						
No 19 ΑΔ	ΟΜΛ	HR						
No 20 ΣΣ	ΟΛΛ	MR						
No 21 Δ								
No 22 Μ	ΟΜΛ	MR						
No 23 ΚΠ	ΟΛΛ	MR	+					
No 24 ΜΓ	ΟΛΛ	MR	+					
No 25 ΚΜ	ΟΛΛ	MR						
No 26 Η	ΟΛΛ							
No 27ΓΑ	ΟΜΛ	HR			+			+
No 28 ΔΧ	ΟΛΛ	HR						

Πίνακας 31 : ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΜΕΤΑΛΛΑΓΕΣ ΤΟΥ Rb-1 ΚΑΙ ΤΟΥ Kip1/p27
(συνέχεια)

α/α ασθενούς	νόσος	στάδιο κινδύνου	εξόνιο 20	εξόνιο 21	εξόνιο22	εξόνιο23	εξόνιο24	Kip1/p27
No 29 ΓΛ	ΟΛΛ	SR						
No 30 ΧΜ	ΟΛΛ	SR						
No 31 ΦΑ	ΟΜΛ	HR						+
No 32 ΑΓ	ΟΛΛ	SR						
No 33 Κ	ΟΛΛ	MR				+		
No 34 ΑΣ	ΟΛΛ	MR						
No 35 ΛΙ	ΟΛΛ	MR		+				
No 36 ΚΕ	ΟΜΛ	HR						
No 37 ΣΚ	ΟΛΛ	SR						
No 38 ΣΒ	ΟΛΛ	SR						
No 39 ΑΝ	ΟΜΛ	HR						
No 41 ΠΣ	Τ-ΟΛΛ	HR		+				
No 42 ΔΜ	ΟΛΛ	SR						
No 43 ΞΔ	ΟΛΛ	SR						
No 44 ΛΜ	ΟΛΛ	MR						
No 45 ΚΤ	ΟΛΛ	MR	+					
No 47 ΘΑ	ΟΛΛ	MR			+			
No 48 ΜΑ	ΟΛΛ	SR						
No 49 Μ	ΟΜΛ	HR						
No 50 ΛΑ	ΟΛΛ	MR		+				
No 51 ΒΔ	ΟΛΛ	MR						
No 52 ΜΠ	ΟΛΛ	SR						
No 53 ΖΓ	ΟΛΛ	SR						
No 54 ΔΜ	ΟΛΛ	MR						

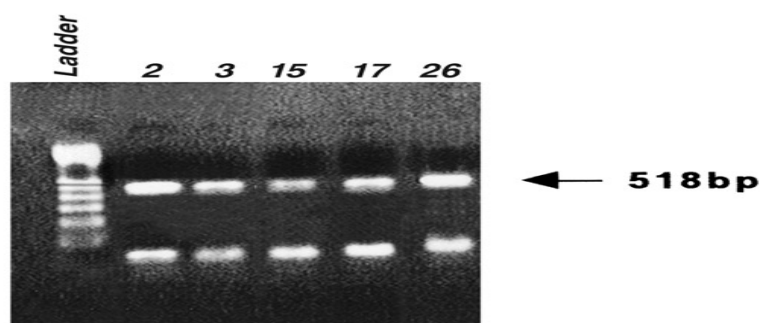
5.7 Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες ανάλυσης προϊόντων PCR

Exon 20



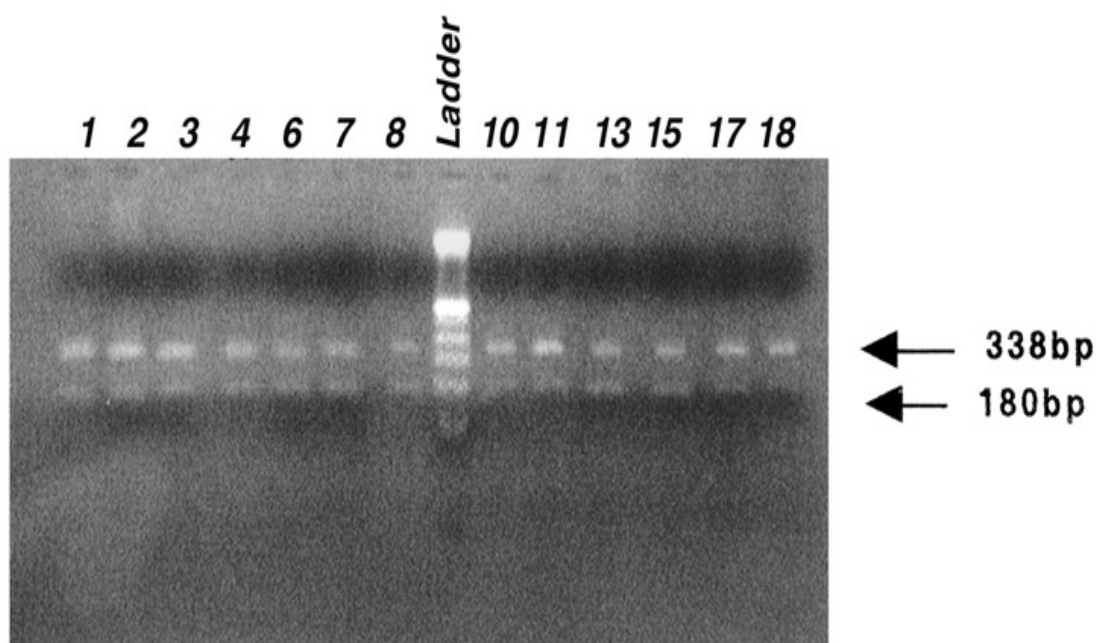
Φωτογραφία 1: Αντιπροσωπευτική φωτογραφία ανάλυσης προϊόντων PCR του εξονίου 20 του Rb-1 σε γέλη αγαρόζης με χρήση βρωμιούχου αιθιδίου. Το βέλος αντιστοιχεί στη θέση των 350 ζευγών βάσεων των προϊόντων PCR. Lader 123bp, δηλ κάθε ζώνη του αντιστοιχεί σε 123 ζεύγη βάσεων.

Exon 21



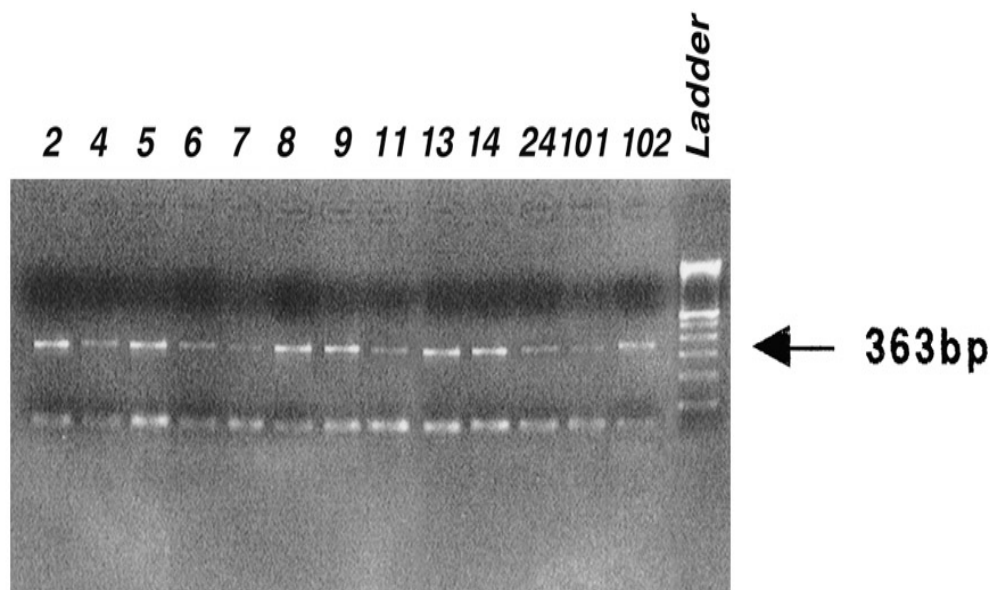
Φωτογραφία 2: Αντιπροσωπευτική φωτογραφία ανάλυσης προϊόντων PCR του εξονίου 21 του Rb-1 σε γέλη αγαρόζης με χρήση βρωμιούχου αιθιδίου. Το βέλος αντιστοιχεί στη θέση των 518 ζευγών βάσεων των προϊόντων PCR. Lader 123bp. Η ενίσχυση του εξονίου 21 αποδείχθηκε δυσκολότερη από τα άλλα εξόνια, λόγω του μεγέθους του και του πιθανού κατακερματισμού που υφίσταται το DNA που δεν έχει συντηρηθεί κατάλληλα.

EXON 21 Digest with Nde I



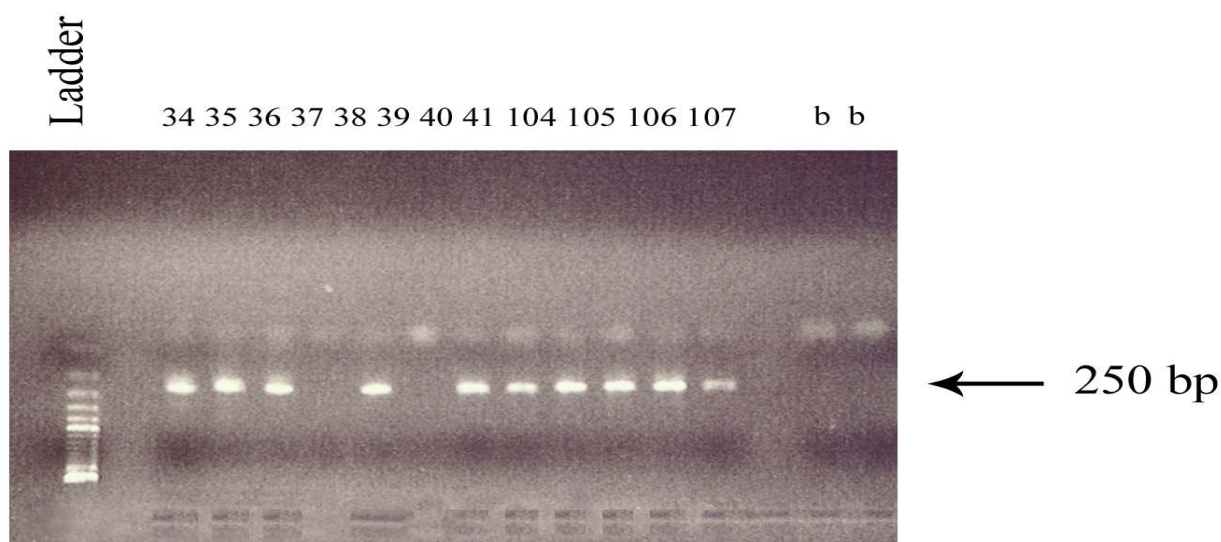
Φωτογραφία 3: Αντιπροσωπευτική φωτογραφία ανάλυσης προϊόντων PCR του εξονίου 21 του Rb-1 σε γέλη αγαρόζης με χρήση βρωμιούχου αιθιδίου, κατόπιν πέψης τους με το περιοριστικό ένζυμο NdeI. Τα βέλη αντιστοιχεί στη θέση των 338 και 180 ζευγών βάσεων των δυο υποπροϊόντων της πέψης . Lader 123bp.

Exon 22



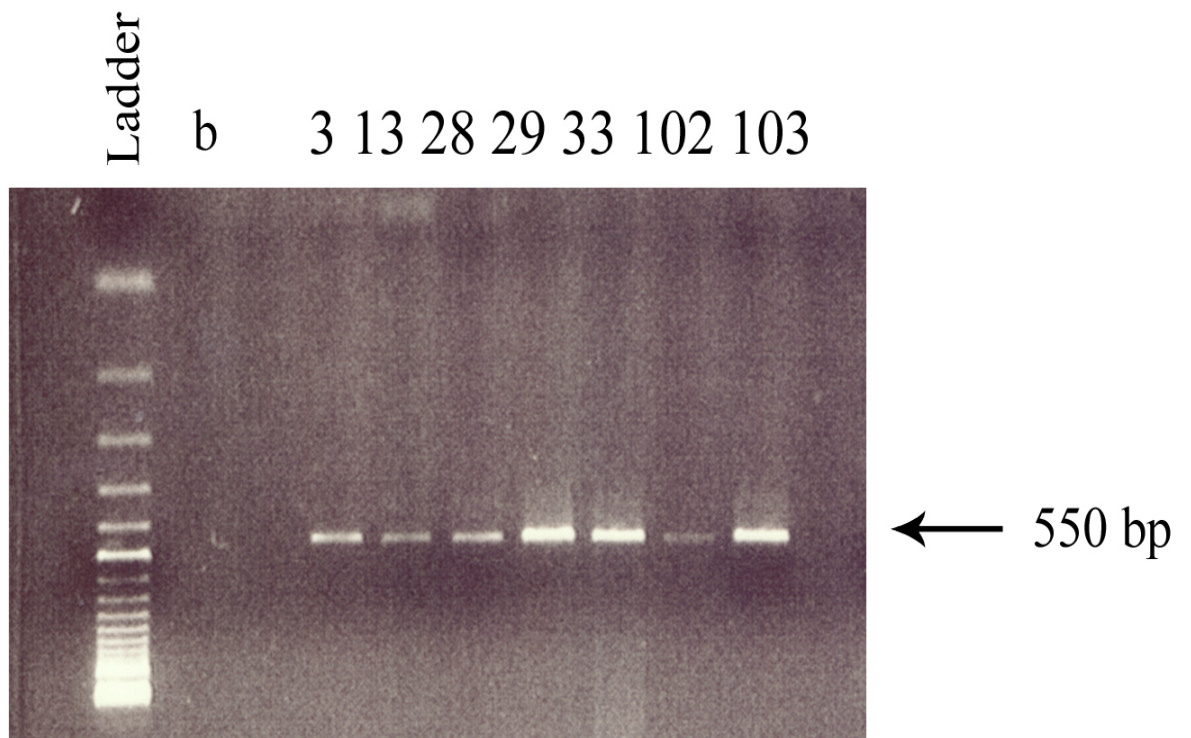
Φωτογραφία 4: Αντιπροσωπευτική φωτογραφία ανάλυσης προϊόντων PCR του εξονίου 22 του Rb-1 σε γέλη αγαρόζης με χρήση βρωμιούχου αιθιδίου. Το βέλος αντιστοιχεί στη θέση των 363 ζευγών βάσεων των προϊόντων PCR. Lader 123bp.

EXON 23



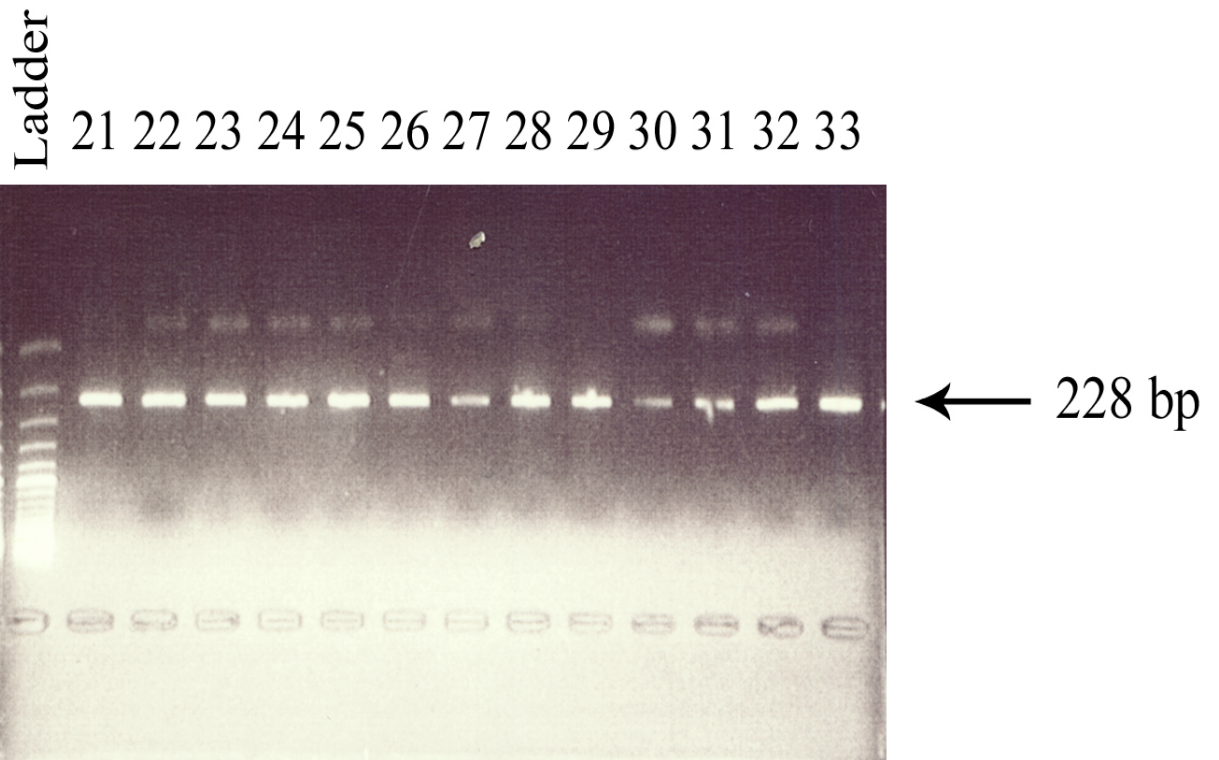
Φωτογραφία 5: Αντιπροσωπευτική φωτογραφία ανάλυσης προϊόντων PCR του εξονίου 23 του Rb-1 σε γέλη αгарόζης με χρήση βρωμιούχου αιθιδίου. Το βέλος αντιστοιχεί στη θέση των 250 ζευγών βάσεων των προϊόντων PCR. Οι στήλες b, b αντιστοιχούν τα δύο «τυφλά» (blank) δείγματα. Στα δείγματα αυτά δεν έχει προστεθεί DNA και λειτουργούν σαν δείκτες καθαρότητας του διαλύματος (premix) που χρησιμοποιήθηκε στην προετοιμασία της PCR αντίδρασης (με σκοπό την διαπίστωση ύπαρξης μόλυνσης δηλαδή παρουσίας γενωμικού DNA από μολυσμένες πιπέτες, γάντια, κ.λ.π.) . Στις στήλες 34 έως 107 αντιστοιχούν δείγματα που έχουν ενισχυθεί με την PCR αντίδραση. Τα δύο κενά «πηγάδια» που βρίσκονται μετά την στήλη 107, έχουν παραμείνει κενά ώστε να αποφευχθεί η πιθανότητα PCR προϊόν να διαφύγει στο πηγάδι του τυφλού, δημιουργώντας ζώνη κατά την ηλεκτροφόρηση η οποία θα εκληφθεί τελικά σα μόλυνση. Τα δείγματα 37 και 39 δεν έχουν ενισχυθεί. Lader 123bp.

EXON 24



Φωτογραφία 6: Αντιπροσωπευτική φωτογραφία ανάλυσης προϊόντων PCR του εξονίου 24 του Rb-1 σε γέλη αгарόζης με χρήση βρωμιούχου αιθιδίου. Το βέλος αντιστοιχεί στη θέση των 550 ζευγών βάσεων των προϊόντων PCR. Lader 123bp.

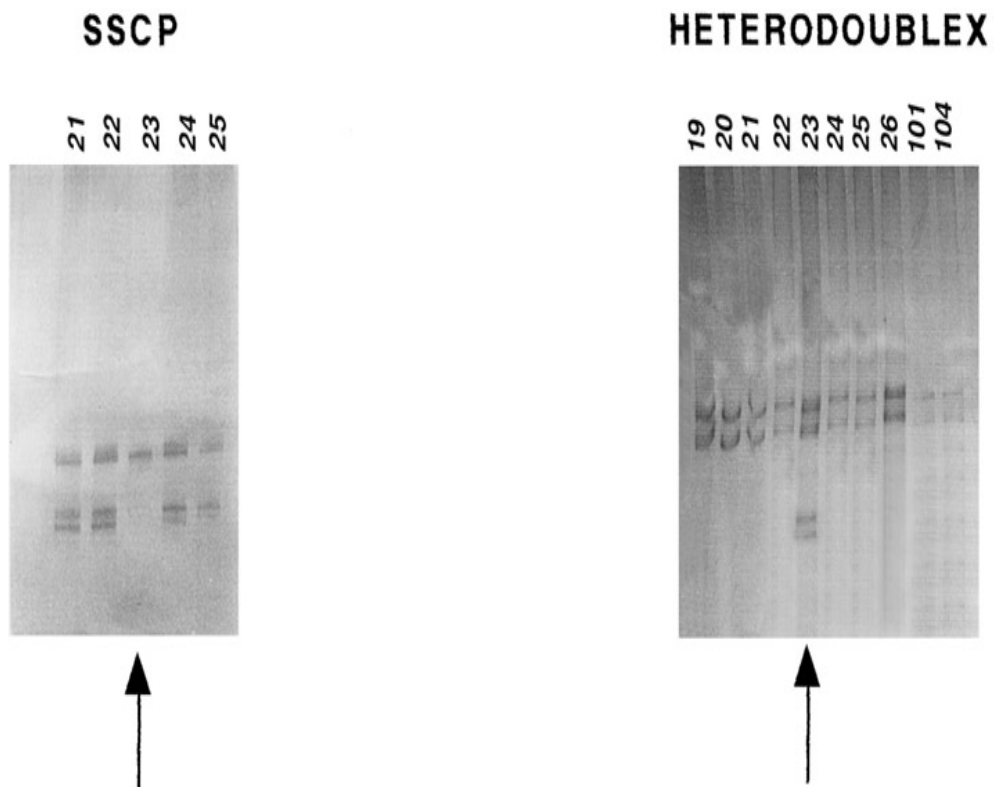
Γονίδιο p27/kip1



Φωτογραφία 7: Αντιπροσωπευτική φωτογραφία ανάλυσης προϊόντων PCR του γονιδίου Kip1/p27 σε γέλη αгарόζης με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου. Το βέλος αντιστοιχεί στην θέση των 228 ζευγών βάσεων των προϊόντων του PCR

5.8 Αντιπροσωπευτική φωτογραφία SSCP- HETERODOUBLEX

SSCP - HETERODOUBLEX



Φωτογραφία 8: Αντιπροσωπευτική φωτογραφία ανάλυσης πολυμορφισμού μονόκλωνης αλυσίδας (SSCP) και ετεροδιμερών (Heteroduplex Analysis). Οι αλυσίδες του DNA που έχουν αποδιαταχθεί, υβριδίζουν με αλλοιωμένο πρότυπο (δείγμα 23) γεγονός που είναι εμφανές κατά την ηλεκτροφόρηση σε γέλη πολυακρυλαμιδίου μετά από χρώση με νιτρικό άργυρο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η φυσιολογική αιμοποίηση χαρακτηρίζεται από την ισορροπία ανάμεσα στην αυτόαναγέννηση, τη διαφοροποίηση και τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Διαταραχή σε αυτή την ισορροπία οδηγεί στη λευχαιμογένεση, η οποία θεωρείται μια πολυσταδιακή διαδικασία που καταλήγει στη δημιουργία αιμοποιητικού παθολογικού κλώνου ο οποίος έχει χάσει την ικανότητα να ελέγχει την αύξηση, μέσω ενεργοποίησης ογκογονιδίων η/και αδρανοποίησης ογκοκατασταλτικών γονιδίων (Cline 1994). Τα γονίδια Rb-1 και Kip1/p27 κατέχουν κύρια θέση μεταξύ των ογκοκατασταλτικών γονιδίων των οποίων οι μεταλλαγές μπορεί να ενέχονται στην καρκινογένεση και ειδικότερα στη λευχαιμογένεση.

Στην παρούσα μελέτη έγινε συσχέτιση της ανίχνευσης των μεταλλαγών του ογκοκατασταλτικού γονιδίου Rb-1 και του Kip1/p27 σε οξείες λευχαιμίες (οξείες λεμφοβλαστικές ΟΛΛ και οξείες μυελογενείς ΟΜΛ)της παιδικής ηλικίας και στο νευροβλάστωμα, αντιπροσωπευτικό από τους συμπαγείς όγκους που διηθούν μυελό. Ειδικότερα μελετήθηκαν τα εξόνια 20 έως και 24 του Rb-1 τα οποία συγκεντρώνουν το μεγαλύτερο ποσοστό μεταλλαγών στις διάφορες κακοήθειες (Horowitz 1989). Αυτά τα εξόνια κωδικοποιούν το τμήμα της πρωτεΐνης που όταν φωσφορυλιωθεί προσδένεται στο DNA και ενεργοποιεί την RNA πολυμεράση για να αρχίσει η μεταγραφή και στην ανενεργό-υποφωσφορυλιωμένη μορφή της δεσμεύει ένα από τους σημαντικότερους μεταγραφικούς παράγοντες, τον E2F. Μεταλλαγές στα εξόνια αυτά οδηγούν στη σύνθεση πρωτεΐνης η οποία παρουσιάζει διαταραχές όχι μόνο στη φωσφορυλίωση αλλά και στην πυρηνική της πρόσδεση (Jamal 1996).

Επίσης, στους ίδιους ασθενείς μελετήθηκαν οι μεταλλαγές του μοναδικού αναστολέα του κυτταρικού κύκλου p27 ο οποίος μπορεί να ανταποκριθεί σε εξωκυττάρια αντιμιτογόνα ερεθίσματά και να αναστείλει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου στη G₁ φάση.

Σκοπός της μελέτη ήταν η συσχέτιση των μεταλλαγών με την πρόγνωση καθώς και η δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν σαν ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες για την κατάταξη σε ομάδες κινδύνου και ανάλογη τροποποίηση ή εντατικοποίηση της θεραπείας των ασθενών σε κακοήθειες της παιδικής ηλικίας.

Με την τεχνική του PCR-SSCP που εφαρμόστηκε στο εργαστήριο Ιολογίας και στο ερευνητικό Εργαστήριο της Παιδιατρικής Κλινικής Αιματολογίας – Ογκολογίας έγινε εφικτή η συσχέτιση των μεταλλαγών των παραπάνω γονιδίων με τα προγνωστικά χαρακτηριστικά 51 οξείων λευχαιμιών (39 λεμφοβλαστικών και 12 μυελογενών) και με τα στάδια της νόσου σε 9 ασθενείς με νευροβλάστωμα.

Τα ευρήματα της μελέτης μας έδειξαν ότι συνολικά ανιχνεύεται μεταλλαγή του Rb1 σε ποσοστό 41% στις περιπτώσεις οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας που μελετήθηκαν. Το αντίστοιχο ποσοστό στις οξείες μυελογενείς είναι 67% και 22% στα νευροβλαστώματα. Μελέτες με Southern blot υβριδισμό αναφέρουν δομικές ανωμαλίες στο Rb-1 σε ποσοστό περίπου 20-30% στις μυελογενείς και στις T-σειράς λεμφοβλαστικές λευχαιμίες ενηλίκων και σε 20-40% στις λευχαιμικές σειρές (Chen 1990, Hansen 1990, Ahuja 1991, Ginsberg 1991, Tang 1992, Kornblau 1994). Να τονιστεί ότι η Southern blot ανάλυση η οποία χρησιμοποιήθηκε στις προαναφερόμενες μελέτες, είναι χρήσιμη στην ανίχνευση αναδιατάξεων των γονιδίων, αλλά ανεπαρκεί στην ανίχνευση σημειακών μεταλλαγών και απαλείψεων στο γονίδιο Rb-1 (Ahuja 1992). Δεδομένου ότι οι περισσότερες ανωμαλίες του γονιδίου Rb-1 οφείλονται σε σημειακές μεταλλαγές (Lodmann 1994), απαιτούνται

περισσότερο ευαίσθητες τεχνικές όπως η RCR (Weatherall 1991), η οποία χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα μελέτη. Αναλύσεις όμως της πρωτεΐνης pRb με τεχνική ανοσοαποτύπωσης (immunoblotting) των Tsai και συν (Tsai 1996) και των Hangaishi και συν (Hangaishi 1996) σε ΟΛΛ ενηλίκων, αναφέρουν απουσία έκφρασης της πρωτεΐνης σε ποσοστό 50-64%, η οποία οφείλονταν σε σημειακές μεταλλαγές.

Μεταλλαγή του Rb-1 παρατηρήθηκε σε μια μόνο περίπτωση ΟΛΛ σταθερού κινδύνου. Με δεδομένο την παραμονή της ασθενούς σε μακράς διάρκειας ύφεση, η ερμηνεία που μπορεί να δοθεί είναι ότι: α) πρόκειται για σιωπηλή μεταλλαγή (silent mutation) στην οποία η αντικατάσταση μιας βάσης από μία άλλη, δημιουργεί το ίδιο κωδικόνιο (π.χ AGG→CGG→αργινίνη) χωρίς φυσικά καμία συνέπεια στη σύνθεση και τη λειτουργία της πρωτεΐνης ή έστω β) μεταλλαγή που επιτρέπει τη μερική λειτουργία της πρωτεΐνης (leaky mutation).

Στις περιπτώσεις ΟΛΛ ενδιάμεσου κινδύνου μεταλλαγές του Rb-1 ανιχνεύτηκαν στο 90% των περιπτώσεων οι οποίες στην πρωτοδιάγνωση είχαν αριθμό λευκών μεγαλύτερο από 20.000/μl. Πιθανώς λοιπόν η αναστολή της αντιπολλαπλασιαστικής δράσης του Rb-1 λόγω της μεταλλαγής να συμβάλει στο παρατηρούμενο μεγαλύτερο λευχαιμικό φορτίο των ασθενών αυτών.

Είναι αξιοσημείωτο επίσης ότι σε όλες τις περιπτώσεις ΟΛΛ οι οποίες κατά τη διάγνωση είχαν χαρακτηριστεί σαν ενδιάμεσου κινδύνου και στη πορεία είτε επήλθε γρήγορα υποτροπή είτε δεν επιτεύχθηκε ύφεση, ανιχνεύτηκαν μεταλλαγές του Rb-1. Στη μοναδική σύμφωνα με τις γνώσεις μας μελέτη η οποία αφορά ΟΛΛ παιδιών των Sauerbrey και συν, αναφέρεται ότι ασθενείς με χαμηλή έκφραση της pRb έχουν μικρότερη πιθανότητα να παραμείνουν στην πρώτη ύφεση και σημαντικά υψηλότερο ποσοστό να καταλήξουν από την νόσο. Επιπλέον, ασθενείς

που υποτροπίασαν είχαν σημαντικά μειωμένη έκφραση πρωτεΐνης σε σχέση με την αρχική τους τιμή και προτείνουν ότι η μελέτη της έκφρασης της πρωτεΐνης αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα (Sauerbrey 1996).

Αν και ο αριθμός των T-ΟΛΛ της μελέτης είναι μικρός, στο 75% των T-ΟΛΛ ανιχνεύτηκε μεταλλαγή του Rb-1. Στη μελέτη των Hatta Y και συν (Hatta 1997) που περιελάμβανε T-ΟΛΛ ενηλίκων, ανιχνεύθηκε με τεχνική PCR-SSCP μικρότερο ποσοστό μεταλλαγών του Rb-1 συγκριτικά με τα ευρήματα της μελέτης μας.

Στις οξείες μυελογενείς λευχαιμίες οι μεταλλαγές του Rb-1 ανιχνεύθηκαν σε ποσοστό 67%. Όλες αφορούσαν περιπτώσεις με δυσμενείς προγνωστικούς παράγοντες στην πρωτοδιάγνωση. Σε επτά περιπτώσεις (72%) δεν επιτεύχθηκε ύφεση και οι ασθενείς έχουν καταλήξει, ενώ η όγδοη ΟΜΛ με μεταλλαγή (No 31) παρουσίασε 4^η υποτροπή, αμέσως μετά την απλοταυτόσιμη ΜΜΟ στην οποία υποβλήθηκε και επίσης κατέληξε ένα χρόνο μετά την ΜΜΟ. Οι μεταλλαγές δεν φάνηκε να συσχετίζονται με συγκεκριμένη μορφολογία της μυελογενούς, όπως προκύπτει και από τη βιβλιογραφία (Kornblau 1994). Κοινό χαρακτηριστικό τους ήταν η μη επίτευξη ύφεσης την 14^η ημέρα θεραπείας. *Μόνο οι τέσσερις από τις δώδεκα (33%) ΟΜΛ που δεν είχαν μεταλλαγή στο Rb-1 είχαν καλή πορεία-έκβαση.*

Σε μελέτες ΟΜΛ ενηλίκων των Tang και συν καθώς και Kornblau και συν, σε ποσοστό 28% και 30% αντίστοιχα οι ασθενείς με μειωμένη έκφραση της pRb λόγω μεταλλαγών, είχαν χειρότερη πρόγνωση συγκριτικά με ασθενείς με φυσιολογικά επίπεδα (Tang 1992, Kornblau 1994). Οι Kornblau και συν στις δυο μεγαλύτερες μελέτες της βιβλιογραφίας σε ΟΜΛ ενηλίκων αναφέρουν ότι ασθενείς με μειωμένη ή απουσία έκφρασης της pRb, είχαν σημαντικά μικρότερο ποσοστό ύφεσης και επιβίωσης σε σχέση με τους ασθενείς με φυσιολογική έκφραση της πρωτεΐνης

(Kornblau 1992,1994), και προτείνουν ότι η έκφραση της pRb μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης (Kornblau 1995).

Το μεγαλύτερο ποσοστό μεταλλαγών στις ΟΜΛ συγκριτικά με τις ΟΛΛ της μελέτης μας, συμφωνεί με τη μελέτη των Tang και συν σε οξείες λευχαιμίες ενηλίκων (Tang 1992). Η ελαττωματική pRb πιθανά διαδραματίζει ρόλο στην παθογένεση της ΟΜΛ, κυρίως στην εξέλιξη (progression) παρά στην έναρξη (initiation) της νόσου. Στη μελέτη των Towatari και συν, ασθενείς με ΧΜΛ στη βλαστική κρίση είχαν μειωμένη έκφραση της pRb σε αντίθεση με τη φυσιολογική στη χρόνια φάση της νόσου (Towatari 1991). Επιπρόσθετα, οι Preudhomme και συν αναλύοντας ασθενείς με μυελοδυσπλασία, διαπίστωσαν φυσιολογική έκφραση πρωτεΐνης, ενώ όταν αργότερα ανέπτυξαν ΟΜΛ, η έκφραση της πρωτεΐνης ήταν ελαττωματική (Preudhomme 1994). Επίσης, στη μελέτη των Jamal και συν (Jamal et al 1996) ασθενείς με ΟΜΛ με φυσιολογική pRb στην πρωτοδιάγνωση οι οποίοι στην πορεία δεν ανταποκρίνονταν στη θεραπεία, παρουσίαζαν σημαντικά μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης, υποδηλώνοντας ότι είχαν συμβεί «αλλαγές» στη συμπεριφορά των λευχαιμικών κυττάρων που αφορούσαν το Rb-1 γονίδιο. Εκτός από αυτές τις αναφορές, στην προγενέστερη επιδημιολογική μελέτη των Draper και συν (Draper 1986), στην οποία 882 ασθενείς με ρετινοβλάστωμα παρακολουθήθηκαν επί 15ετίας, μόνο ένας αναφέρεται ότι ανέπτυξε οξεία μη λεμφοβλαστική λευχαιμία. Φαίνεται λοιπόν ότι η αδρανοποίηση του Rb-1 είναι ένα όψιμο γεγονός στη λευχαιμογένεση η οποία συμβάλει σε περισσότερο επιθετική νόσο. Για να ενέχονται οι μεταλλαγές του Rb-1 στην διαδικασία έναρξης της λευχαιμογένεσης (initiation) θα έπρεπε το ποσοστό τους να ήταν πολύ μεγαλύτερο από αυτό που ανιχνεύτηκε. Ένα κύτταρο με ελαττωματική pRb δεν μπορεί να διαφοροποιηθεί ή να υποστεί απόπτωση. Συνεχίζει να διαιρείται ακατάλληλα,

συμβάλλοντας στον ήδη κακοήθη μετασχηματισμό. Το λευχαιμικό κύτταρο το οποίο αποκτά και Rb-1 μεταλλαγή θα έχει μια επιπρόσθετη δυνατότητα αύξησης, η οποία το οδηγεί σε περισσότερο επιθετική νόσο (Hensen 1988), παράλληλα το καθιστά ευάλωτο σε άλλα γενετικά η επιγενετικά γεγονότα (Burne 1991, Kay 1993).

Σε ποσοστό μεγαλύτερο του 90% των οξειών λευχαιμιών, οι μεταλλαγές αφορούσαν ασθενείς με αρχικά δυσμενείς προγνωστικούς παράγοντες ή μετέπειτα δυσμενή πορεία. Όλα τα παιδιά που υποτροπίασαν ή στα οποία καθυστέρησε η επίτευξη της ύφεσης αλλά και αυτά που έχουν καταλήξει έφεραν μεταλλαγές. Άρα από τα δεδομένα αυτά φαίνεται ότι ανίχνευση μεταλλαγής στις περιπτώσεις ΟΛΛ τις καθιστά υψηλού κινδύνου, δεδομένο που συσχετίζει τις μεταλλαγές με δυσμενή πρόγνωση.

Η αναλογία της λευχαιμίας στα αγόρια σε σχέση με τα κορίτσια είναι 2:1. Οι μεταλλαγές που παρατηρήθηκαν στην παρούσα μελέτη διατήρησαν την ίδια αναλογία ανάμεσα στα δύο φύλα. Συνεπώς, οι μεταλλαγές του Rb-1 δε φαίνεται να έχουν συσχέτιση με το φύλο.

Η μέση ηλικία των περιστατικών με μεταλλαγή ήταν 6.3 έτη (εύρος 3μην-16 ετών). Αν ληφθεί υπόψη ότι η ηλικία μεγαλύτερη των 9 χρόνων αποτελεί δυσμενή προγνωστικό δείκτη, θεωρούμε ότι η ανίχνευση μεταλλαγής σε ηλικίες μικρότερες των 9 χρόνων μπορεί να κατατάξει τη νόσο σε ομάδα μεγαλύτερου κινδύνου αφού φαίνεται η παραπάνω μεταλλαγή να αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα.

Είναι γνωστό ότι το Rb-1 είναι ογκοκατασταλτικό γονίδιο και η προδιάθεση για κακοήθεια μεταβιβάζεται με επικρατούντα χαρακτήρα. Για να εκδηλωθεί όμως η κακοήθεια απαιτείται επιπρόσθετα η αδρανοποίηση και του εναπομείναντος αλληλομόρφου, το οποίο εξασφαλίζει το 50% της λειτουργικότητας της πρωτεΐνης

και δεν επιτρέπει την εκδήλωση του νεοπλασματικού φαινοτύπου. Θεωρούμε ότι στις περιπτώσεις που ανιχνεύθηκαν οι μεταλλαγές ο λευχαιμικός φαινότυπος εκδηλώθηκε λόγω της προϋπάρχουσας ήδη απώλειας της ετεροζυγωτίας. Αποδίδεται δε στην απώλεια της ετεροζυγωτίας και όχι σε απάλειψη της ζώνης 13q14 όπου εδράζεται το Rb-1 γιατί η ζώνη 13q14 είναι μεγάλη χρωμοσωμική περιοχή και πιθανή απώλεια της θα ήταν ανιχνεύσιμη με τη συνηθισμένη κυτταρογενετική ανάλυση του καρυότυπου. Σε καμιά όμως από τις περιπτώσεις λευχαιμίας που μελετήθηκαν δεν ανιχνεύθηκαν κυτταρογενετικές ανωμαλίες στη ζώνη 13q14.

Η παρουσία μεταλλαγών στα κύτταρα που τη φέρουν τα θέτει στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Είναι όμως γνωστό ότι τα κύρια χημειοθεραπευτικά στη θεραπεία εφόδου της λευχαιμίας δρουν στη G₁ φάση με εξαίρεση την κυτοσίνη-αραβινοσίδη (Pui 1994). Είναι λοιπόν πιθανόν, η μη επίτευξη ύφεσης στις λευχαιμίες όπου διαπιστώθηκε μεταλλαγή, να οφείλεται και σε αυτό το λόγο υποδηλώνοντας ίσως τη χρησιμότητα της προσθήκης φαρμάκων στη θεραπεία εφόδου με δράση στην S φάση για επίτευξη ύφεσης. Ενισχυτικό σε αυτή την υπόθεση είναι η παρατήρηση ότι το 75% των λευχαιμιών με T ανοσοφαινότυπο παρουσίαζε μεταλλαγή στο Rb-1. Στις λευχαιμίες αυτές εφαρμόστηκαν πρωτόκολλα με πολλαπλές δόσεις κυτοσίνης-αραβινοσίδης στη θεραπεία εφόδου και όλοι οι ασθενείς βρίσκονται σε μακράς διάρκειας ύφεση.

Με το ίδιο σκεπτικό θα μπορούσε να προταθεί η χορήγηση μονοκλωνικών αντισωμάτων κατά της μεταλλαγμένης pRb με παράλληλη χορήγηση παράγοντα που να μιμείται τη δράση της φυσιολογικής pRb (Bookstein 1990). Εναλλακτική θεραπευτική προσπέλαση στις λευχαιμίες με μεταλλαγή του Rb-1 αποτελεί η εισαγωγή λειτουργικά φυσιολογικού Rb-1 γονιδίου το οποίο θα αναστείλει τον

κυτταρικό πολλαπλασιασμό, όπως ήδη έχει χρησιμοποιηθεί προγενέστερα σε διάφορες καρκινικές σειρές (Huang 1988).

Στις περιπτώσεις συμπαγών όγκων και ειδικότερα στο νευροβλάστωμα που μελετήθηκε, είναι ιδιαίτερα σημαντικό το εύρημα της ανίχνευσης μεταλλαγών του Rb-1 σε όλες τις περιπτώσεις νευροβλαστώματος σταδίου IV με εντόπιση στο μυελό των οστών. Το δεδομένο αυτό συσχετίζει την παραπάνω μεταλλαγή με προχωρημένο στάδιο νόσου και σαφώς χειρότερη πρόγνωση.

Τόσο στις λεμφοβλαστικές και στις μυελογενείς όσο και στα νευροβλαστώματα, οι μεταλλαγές αφορούσαν συχνότερα το εξόνιο 22 και ήταν αυτές που σχετίζονταν με τη χειρότερη πρόγνωση. Το εξόνιο 22 μπορεί να θεωρηθεί «hot spot» του γονιδίου Rb-1. Με αυτό συμφωνούν και οι μελέτες των Horowitz και συν (Horowitz 1989) όπου επίσης παρατηρούνται οι περισσότερες μεταλλαγές και αυτές με τη δυσμενέστερη πρόγνωση. Κατά κύριο λόγο το εξόνιο 22 κωδικοποιεί το τμήμα της πρωτεΐνης το οποίο προσδένεται στο DNA. Μεταλλαγές συνεπώς στο εξόνιο αυτό δημιουργούν τροποποιημένη λειτουργικά πρωτεΐνη με διαταραχή στη πυρηνική πρόσδεση.

Στους ασθενείς που εμφανίζουν τις μεταλλαγές φαίνεται βάσει της SSCP ανάλυσης ότι αυτές έχουν συμβεί στην ίδια αλληλουχία αφού εμφανίζουν το ίδιο αλλοιωμένο πρότυπο στο 95% των περιπτώσεων. Αυτό σημαίνει ότι η συγκεκριμένη μεταλλαγή επαναλαμβάνεται σε καθορισμένες συνθήκες. Πιθανά λοιπόν να χρησιμοποιηθεί είτε σαν προγνωστικός δείκτης όπως δείχνουν οι περιπτώσεις λευχαιμίας υψηλού κινδύνου και νευροβλαστώματος με διήθηση μυελού, είτε σα μοριακός δείκτης για ανίχνευση ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου.

Ένα κύτταρο με ελαττωματική pRb διαθέτει ένα πλεονέκτημα αύξησης, και δεν μπορεί να διαφοροποιηθεί ή να υποστεί απόπτωση. Συνεχίζει να διαιρείται

ακατάλληλα, συμβάλλοντας στον κακοήθη μετασχηματισμό. Έτσι, ένα κακόηθες κύτταρο το οποίο αποκτά και Rb-1 μεταλλαγή θα έχει μια επιπρόσθετη δυνατότητα αύξησης, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε περισσότερο επιθετική νόσο.

Παρά το ότι δεν υπάρχουν αναφορές στη βιβλιογραφία ημίζυγης απάλειψης ογκοκατασταλτικού γονιδίου το οποίο να εμπλέκεται στην καρκινογένεση έχει αποδειχτεί ότι η αδρανοποίηση του ενός μόνο αλληλομόρφου Kip1 οδηγεί σε μείωση της p27 ικανή να προδιαθέσει σε καρκίνο (Fero 1980).

Στην παρούσα μελέτη ανιχνεύτηκαν μεταλλαγές του Kip1/p27 σε ποσοστό 25% των ΟΜΛ οι οποίες κατέληξαν λόγω ανθεκτικής νόσου. Το εύρημα αυτό ενισχύεται από μελέτες που αφορούν ΟΜΛ ενηλίκων στις οποίες η επιβίωση σε όσους έφεραν χαμηλά επίπεδα έκφρασης p27 ήταν σαφώς μικρότερη (Yokozawa 2000) συγκριτικά με ασθενείς που είχαν ψηλά επίπεδα έκφρασης p27.

Αξίζει να σημειωθεί ότι σχεδόν οι μισές (45%) έφεραν ταυτόχρονα και μεταλλαγές στο Rb-1 και ειδικά στο εξόνιο 22. Με αυτά τα δεδομένα μπορεί να υποστηριχθεί ότι η συνδυασμένη απώλεια των δύο αντιπολλαπλασιαστικών γονιδίων ευθύνεται για την χειρότερη πρόγνωση (Moller 2000).

Όσον αφορά τη συχνότητα των μεταλλάγων του Kip1 στις ΟΜΛ της μελέτης, αυτές αφορούν αποκλειστικά τις οξείες λεμφοβλαστικές λευχαιμίες με Τ ανοσοφαινότυπο. Παρά το γεγονός ότι ο αριθμός των Τ- λευχαιμιών είναι μικρός αναλογικά, η ανίχνευση στο 50% των περιπτώσεων του Kip1/p27 υποδεικνύει ότι αυτή η μεταλλαγή απαντάται στις Τ λευχαιμίες στο υλικό των παιδιών που μελετήθηκε. Το εύρημα συμφωνεί με μελέτες κυρίως σε ενήλικες ασθενείς (Hatta 1997, Kabayashi 1994, Pietenpol 1995, Stagmaier 1996), όπου στους μελετηθέντες ασθενείς υπήρχε και απώλεια στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος

12, στο οποίο εδράζεται το Kip1. Οι μεταλλαγές του Kip1/p27 ανιχνεύονται αποκλειστικά σε ΟΛΛ με T ανοσοφαινότυπο στους ενήλικες, σε ποσοστό 5-25%. Επειδή από την καρυοτυπική ανάλυση και στις 51 λευχαιμίες που μελετήθηκαν δεν διαπιστώθηκαν ανωμαλίες στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 12, οι περιπτώσεις θεωρήθηκαν ομοζυγώτες ως προς το Kip1/p27 και με το δεδομένο ότι η εντόπιση του Kip1/p27 στη ζώνη 12 p13 θεωρείται μεγάλη περιοχή που η έλλειψή της μπορεί να αποκαλύπτει μόνο με κυτταρογενετική ανάλυση χωρίς να απαιτείται ανάλυση Southern blot. Επομένως το μεγαλύτερο ποσοστό μεταλλαγών στην παρούσα μελέτη συγκριτικά με της βιβλιογραφίας πιθανά ερμηνεύεται από το δεδομένο ότι σε όλες τις περιπτώσεις οξείας λευχαιμίας που μελετήθηκαν υπήρχαν και τα δυο αλληλόμορφα του Kip1, σε αντίθεση με τις προαναφερόμενες μελέτες με το έλλειμμα στο 12p13, αφού έτσι ουσιαστικά ελέγχονταν η παρουσία μεταλλαγών σε οξείες λευχαιμίες που διέθεταν ένα μόνο αλληλόμορφο Kip1.

Οι ενήλικες με ΟΛΛ με μεταλλαγή στο Kip 1 έχουν δυσμενέστερη πρόγνωση (Vrthonac 1998, Yokozava 2000). Βέβαια, όλες οι T-ΟΛΛ, θεωρούνται λευχαιμίες υψηλού κινδύνου. Πιθανά ένας από τους παράγοντες που καθιστούν τις T-ΟΛΛ υψηλού κινδύνου να είναι και η μεταλλαγή στο Kip1.

Η αδρανοποίηση του ενός αλληλομόρφου Kip1 λόγω μεταλλαγής, προκαλεί μείωση των επιπέδων της p27. Ακόμη όμως και ελάχιστη μείωση της έκφρασης του αναστολέα των CDKs, p27, μπορεί να επηρεάσει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, επειδή η δραστηριότητα αυτής της πρωτεΐνης είναι εν μέρει μειωμένη συγκρινόμενη με τα επίπεδα έκφρασης των άλλων ρυθμιστών της G₁-S φάσης. Η μείωση της p27 παρέχει στα λευχαιμικά κύτταρα δυνατότητες αύξησης ενώ τα καθιστά ανθεκτικά στην απόπτωση (Eymir1999) με αποτέλεσμα ο λευχαιμικός

κλώνος να είναι ανθεκτικός στα χημειοθεραπευτικά (Croix1996) και να απαιτείται η εντατικοποίηση της θεραπείας.

Όσον αφορά το νευροβλάστωμα δεν ανιχνεύτηκε μεταλλαγή του Kip1 στα επιχρίσματα μυελού στις περιπτώσεις νευροβλαστώματος που μελετήθηκαν, ανεξάρτητα σταδίου νόσου, εύρημα που συμφωνεί με ανάλογη μελέτη στη οποία επίσης περιλαμβάνονται όλα τα στάδια του νευροβλαστώματος (Kawamata 1996). Δεδομένου ότι το νευροβλάστωμα ανήκει στους συμπαγείς όγκους, αυτή η παρατήρηση βρίσκεται σε συμφωνία με τη σπανιότητα ανίχνευσης μεταλλαγών του Kip1 σε ποικίλης προέλευσης συμπαγείς όγκους (Kawamata 1995, Ponce-Castaneda 1995).

Συμπερασματικά από τα αποτελέσματά μας στις μεταλλαγές του Kip1 προκύπτει ότι η p27 μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης στις ΟΜΛ, ομάδα λευχαιμιών στην οποία δεν υπάρχουν πολλοί διαθέσιμοι προγνωστικοί δείκτες. Επίσης μπορεί να αποτελεί έναν εξαιρετικά καλό δείκτη υπολειπόμενης νόσου, ιδιαίτερα σε εκείνες τις λευχαιμίες όπου δεν ανιχνεύονται χρωμοσωμικές ανωμαλίες.

Στην παρούσα μελέτη αποδείχθηκε ότι η παρουσία μεταλλαγμένου Rb-1 γονιδίου σε περιπτώσεις ΟΛΛ της παιδικής ηλικίας μπορεί να χαρακτηρίσει τη νόσο σαν αυξημένου κινδύνου, ανεξάρτητα από άλλους παράγοντες, προτείνοντας την τροποποίηση-εντατικοποίηση της θεραπείας εφόδου αφού οι περισσότεροι ασθενείς δεν επιτυγχάνουν ύφεση ή υποτροπιάζουν. Επίσης, η ανίχνευση μεταλλαγής μπορεί να αποτελέσει δείκτη υπολειπόμενης νόσου, ιδιαίτερα στις μυελογενείς λευχαιμίες με φυσιολογικό καρυότυπο. Οι μεταλλαγές στο Rb-1 ενέχονται και σε συμπαγείς όγκους που διηθούν το μυελό των οστών, όπως

διαπιστώθηκε στην παρούσα μελέτη στις περιπτώσεις νευροβλαστώματος σταδίου IV, καθιστώντας τον όγκο πιο επιθετικό.

Με τα δεδομένα αυτά προτείνεται η μελέτη των γονιδίων Rb-1 και Kip1/p27 σε όλο το φάσμα των κακοηθειών της παιδικής ηλικίας, ιδιαίτερα αυτών με εντόπιση ή συμμετοχή στο αιμοποιητικό σύστημα, με στόχο τον καθορισμό τους σαν ανεξάρτητων προγνωστικών παραγόντων αλλά και τροποποίησης – εντατικοποίησης της θεραπείας, σαν δείκτες υπολειπόμενης νόσου στις λευχαιμίες αλλά και σαν δείκτες επιθετικότητας της νόσου σε συμπαγείς όγκους των παιδιών.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Το 41% των παιδικών ΟΛΛ και το 75% των παιδικών ΟΜΛ έχει μεταλλαγή στο Rb-1.
2. Η μεταλλαγή αυτή ανιχνεύτηκε στο 90% των ΟΛΛ ενδιάμεσου κινδύνου με αριθμό λευκών >20.000κκχ.
3. Μεταλλαγή του Rb-1 ανιχνεύτηκε σε ποσοστό 90% των περιπτώσεων λευχαιμιών (ΟΛΛ,ΟΜΛ) υψηλού κινδύνου. Στο 100% των ασθενών στους οποίους δε επιτεύχθηκε ύφεση, υποτροπίασαν ή κατέληξαν ανιχνεύθηκε μεταλλαγή του Rb-1
4. Η παρουσία της μεταλλαγής Rb-1 στη λευχαιμία πιθανόν να ευθύνεται για μη επίτευξη ύφεσης στις περιπτώσεις εκείνες που αρχικά κατατάσσονται ενδιάμεσου κινδύνου.
5. Στην ομάδα των ΟΜΛ οι μεταλλαγές του Rb-1 ανιχνεύτηκαν σε αυτές με δυσμενείς προγνωστικούς παράγοντες. Μόνο οι τέσσερις από τις δώδεκα ΟΜΛ(33%) που δεν είχαν μεταλλαγή ούτε στο Rb-1 ούτε στο Kip1 είχαν καλή πορεία-έκβαση.
6. Η ανίχνευση της μεταλλαγής Rb-1 σε ηλικία < 9ετών και η συσχέτιση της με δυσμενή πορεία-πρόγνωση την αναδεικνύει σε ανεξάρτητο δυσμενή προγνωστικό δείκτη
7. Η μεταλλαγή του Rb-1 γονιδίου στις περιπτώσεις νευροβλαστώματος ανιχνεύθηκε μόνο σε εκείνες σταδίου IV με εντόπιση στο μυελό.
8. Το αλλοιωμένο πρότυπο που ανιχνεύτηκε με την SSCP ανάλυση αφορά τον ίδιο τύπο μεταλλαγής για το κάθε εξόνιο. Το εξόνιο 22 φαίνεται να αποτελεί την «θερμή περιοχή» (hot spot) του γονιδίου, αφού εκεί παρατηρούνται οι περισσότερες μεταλλάξεις και αυτές με τη δυσμενέστερη πρόγνωση.

9. Στην ομάδα της ΟΛΛ σε καμία Β-σειράς ΟΛΛ δεν ανιχνεύτηκε μεταλλαγή του Kip1/p27. Οι μεταλλαγές στο Kip1/p27 ανιχνεύτηκαν αποκλειστικά στις λευχαιμίες των παιδιών με Τ ανοσοφαινότυπο, σε ποσοστό 50%.
10. Η μεταλλαγή Kip1/p27 ανιχνεύτηκε στο 25% των ΟΜΛ, στην πλειονότητα των περιπτώσεων σε συνδυασμό με τη RB-1.
11. Σε καμία περίπτωση νευροβλαστώματος δεν ανιχνεύτηκε μεταλλαγή Kip1/p27, ανεξάρτητα από το στάδιο της νόσου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου κυβερνάται από μια οικογένεια κινασών, τις εξαρτώμενες από τις κινάσες κυκλίνες και τους αναστολείς τους. Ο Kip1/ p27 αποτελεί τον σημαντικότερο αναστολέα των κυκλινοεξαρτωμένων κινασών, ρυθμίζοντας την εξέλιξη από την G1 στην S φάση, αναστέλλοντας τις CDKs, μέσω εξωκυττάρων αντιμιτογόνων. Εδράζεται στο 12p13, αποτελείται από δύο εξόνια και κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη 27Kd, την p27. Σπάνια περιγράφονται μεταλλάξεις του σε συμπαγείς όγκους, έχουν ωστόσο αναφερθεί μεταλλάξεις σε αιματολογικές κακοήθειες.

Το γονίδιο ευαισθησίας του ρετινοβλαστώματος Rb-1, είναι το πρώτο ογκοκατασταλτικό γονίδιο που ταυτοποιήθηκε, εδράζεται στο χρωμόσωμα 13q14 και αποτελείται από 27 εξόνια. Κωδικοποιεί για μια πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη 110 Kb η οποία δρα σαν ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου αναστέλλοντας την μετάβαση των φυσιολογικών κυττάρων από την G0/G1 στην S φάση της διαίρεσης του κυτταρικού κύκλου. Εκφράζεται φυσιολογικά στα αιμοποιητικά κύτταρα. Αδρανοποιείται συνηθέστερα με μεταλλάξεις, οι οποίες ανιχνεύονται κυρίως (90%) στα εξόνια 20-24. Στις οξείες λευχαιμίες του ενήλικα έχουν αναφερθεί συχνά μεταλλάξεις του Rb-1 γονιδίου, αλλά τα βιβλιογραφικά δεδομένα για τις οξείες λευχαιμίες των παιδιών είναι περιορισμένα.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η αποτύπωση της συχνότητας των μεταλλαγών των γονιδίων Rb-1 και Kip1/p27 σε παιδιά που πάσχουν από λευχαιμία και νευροβλάστωμα και η δυνατότητα χρησιμοποίησής τους σαν προγνωστικούς δείκτες στις λευχαιμίες αλλά και σαν δείκτες επιθετικότητας της νόσου σε συμπαγείς κακοήθειες των παιδιών. Μελετήθηκαν επιχρίσματα μυελού 51 παιδιών με οξεία λευχαιμία στην πρωτοδιάγνωση (39 ΟΛΛ, 12 ΟΜΛ) και 9 επιχρίσματα μυελού παιδιών με νευροβλάστωμα. Τα εξόνια 20, 21, 22, 23, 24 του Rb-1 και τα δυο εξόνια του Kip1 ενισχύθηκαν με την χρήση της τεχνικής της αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράσης (PCR), δίνοντας προϊόντα 350bp, 518bp, 363bp, 250bp, 550bp και 228 bp αντίστοιχα. Για την ανίχνευση μεταλλαγών εφαρμόστηκε η μέθοδος ανάλυσης στερεοδιαμόρφωσης πολυμορφισμού μονής αλυσίδας (SSCP) και ετεροδίκλωνης ανάλυσης (heterodoublex).

Στις ΟΛΛ αλλοιωμένο πρότυπο διαμόρφωσης του Rb-1 παρατηρήθηκε σε τρεις ασθενείς στο εξόνιο 20 (7.6%), σε τρεις ασθενείς στο εξόνιο 21 (7.6%), σε 6 ασθενείς στο εξόνιο 22 (15 %), σε ένα ασθενή στο εξόνιο 23 (2.5%) και σε δύο ασθενείς στο εξόνιο 24 (2.5 %). Στις ΟΜΛ αλλοιωμένο πρότυπο διαμόρφωσης του Rb-1 ανιχνεύθηκε σε δύο ασθενείς στο εξόνιο 21 (16%), σε τρεις ασθενείς στο εξόνιο 22 (25%), σε 2 ασθενείς στο εξόνιο 23 (16%), και σε δύο ασθενείς στο εξόνιο 24 (2.5 %). Αλλοιωμένο πρότυπο διαμόρφωσης του Kip1 διαπιστώθηκε σε δυο (από τις τέσσερις) Τ-ΟΛΛ της μελέτης και σε τρεις (από τις δώδεκα) ΟΜΛ. Σε δύο παιδιά με νευροβλάστωμα ανιχνεύθηκε μεταλλαγή στο εξόνιο 22 του Rb-1 αλλά σε καμία περίπτωση νευροβλαστώματος δεν ανιχνεύθηκε μεταλλαγή του Kip1.

Συμπερασματικά: Το 41% των παιδικών ΟΛΛ και το 75% των παιδικών ΟΜΛ έχει μεταλλαγή στο Rb-1. Οι μεταλλαγές στο Kip1 αφορούν αποκλειστικά ΟΛΛ με Τ-ανοσοφαινότυπο σε ποσοστό 50%, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για τις ΟΜΛ είναι 25%. Στις περιπτώσεις νευροβλαστώματος οι μεταλλαγές του Rb-1 ανιχνεύτηκαν στα παιδιά που είχαν διήθηση μυελού. Στις ΟΛΛ οι μεταλλαγές του Rb-1 αφορούν περιπτώσεις υψηλού κινδύνου (HR). Στο 90% ήταν λευχαιμίες με δυσμενή κλινική πορεία (καθυστέρηση επίτευξης ύφεσης, υποτροπής η θανάτου). Η μεμονωμένη μεταλλαγή του Rb-1 σε ΟΛΛ σταθερού κινδύνου (SR) υποδηλώνει μερική έκφραση της πρωτεΐνης. Η ανίχνευση μεταλλαγών του Rb-1 στις ΟΛΛ ενδιάμεσου κινδύνου (MR) στο 90% των περιπτώσεων που παρατηρήθηκε επρόκειτο για ΟΛΛ με αριθμό λευκών μεγαλύτερο από 20.000/μl. Το 33% των περιπτώσεων ΟΜΛ που δεν ανιχνεύθηκαν μεταλλαγές ούτε στο Rb-1 ούτε στο Kip1 είχαν καλή πορεία-έκβαση. Το αλλοιωμένο πρότυπο που ανιχνεύτηκε με την SSCP ανάλυση αφορά τον ίδιο τύπο μετάλλαξης για το κάθε εξόνιο, με το εξόνιο 22 να αποτελεί την «θερμή περιοχή» (hot spot) του γονιδίου

Με βάση τα παραπάνω ευρήματα οι μεταλλαγές του Rb-1 γονιδίου προτείνονται σαν ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης στις λευχαιμίες της παιδικής ηλικίας. Όσον αφορά τους συμπαγείς όγκους, η ανίχνευση των μεταλλαγών του Rb-1 σχετίζεται με προχωρημένο στάδιο νόσου και ιδιαίτερα με εντόπιση στο μυελό των οστών.

Mutational analysis of the retinoblastoma susceptibility gene and the cell cycle inhibitor Kip1/p27 in pediatric malignancies

Markaki Erasmia – Athina MD

Thesis

SYMMARY

Cancer is considered as a genetic disease that is developed when alterations to molecular pathways which control cell cycle happen. Rb-1 is a tumor suppressor gene encoding for a nuclear phosphoprotein acting as a cell cycle regulator, normally expressed in hematopoietic cells and more often inactivated by point mutations with predominance for exons 20-24. The p27/Kip1 is one of the main cyclin dependent kinase inhibitors. The aim of this study was to correlate the retinoblastoma-1 (Rb-1) and p27/Kip1 gene mutations with the prognosis and progression of childhood acute leukemia and neuroblastoma. Bone marrow slides from 51 children with leukemia (39 acute lymphoblastic leukemia [ALL] and 12 acute myeloid leukemia [AML]) and 9 children with neuroblastoma were studied. Exons 20, 21, 22, 23 and 24 were amplified using the polymerase chain reaction technique. Single strand conformational polymorphism (SSCP) and heterodoublex analysis were performed to detect mutations.

Forty one percent of ALL cases and seventy five percent of AML patients had altered conformation in Rb-1 gene. Mutations in Kip1 gene had 50% of T-ALL patients and 25% of AML patients. Half of the children with stage IV neuroblastoma with bone marrow infiltration were found to express altered conformation in exon 22 of Rb-1 gene while none in Kip1. None of the B-ALL had detectable mutations. Ninety percent of high-risk acute leukemias cases exhibited Rb-1 gene mutations. All our cases which did not achieved remission or relapsed, exhibited Rb-1 gene

mutations. Rb-1 mutations expressed in the unique standard risk ALL suggest silent or leaky mutation while 90% of ALL cases of median risk with Rb-1 mutations showed more than 20.000 / μ l WBC at the onset of the disease. Only thirty three percent of AML that were all the cases with no detectable mutations in either Rb-1 or Kip1, are long-term survivors. The SSCP and heterodoublex analysis showed the same altered conformation for each exon in all cases studied while exon 22 has been considered as the "hot spot" of the Rb-1 gene.

Based upon our results the Rb-1 gene mutations alone or in combination with Kip1/p27 can be used as an independent prognostic factor in acute leukemias in childhood while the mutations of Rb-1 gene only is a finding occurring in advanced stage with bone marrow involvement neuroblastoma.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ahuja B**, Jat P, Foti A, Bar-Eli M, Cline MJ. Abnormalities of the retinoblastoma gene in the pathogenesis of acute leukemia. *Blood* 1991;78: 3259-3268.
- Anayama T**, Furihata M, Ishikawa T, Ohtsuki Y, Ogoshi S. Positive correlation between p27Kip1 expression and progression of human esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 1998;79:439-443.
- Balaban G**, Gilbert F, Nicols W, Meadows AT and Shields J. Abnormalities of chromosome 13 in retinoblastoma from individuals with normal constitutional karyotypes. *Cancer Gen Cyt* 1982;6 :213-221.
- Baldin V**, Lukas J, Macrote MJ, Pagano M, Draeta G. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev* 1993;7:812-821.
- Bani MR**, Rak J, Florens VA, Ben-David y, Kerbel RS. Overexpression of p27^{kip1} is associated with enhanced survival under three-dimensional growth conditions during melanoma progression, *Proc Am Assoc Cancer Res* 1997;38:496-502.
- Barbacid M**. Ras genes. *Annu Rev Biochem* 1987; 56: 779-783.
- Birch J**. Genes and cancer. *Arch Dis Child* , 1999: 80: 1-3.
- Bishop JM**. The molecular genetics of cancer. *Science* 1987;235: 305-310.
- Bishop JM**. Cancer: the rise of the genetic paradigm. *Genes Dev* 1995;9:1309-1315.
- Bishop JM**. Cellular Oncogenes and retroviruses. *Ann Rev Biochem* 1983; 52: 301-354.
- Bishop JM**. Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 1991;64: 235-248.
- Bookstein R**, Shew JY, Chen PL, Scully P, Lee WH. Suppression of tumorigenicity of human prostate carcinoma cells by replacing a mutated RB gene. *Science* 1990;247:712-715.

Bos JL. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1990;50: 1352-1360.

Bourne HR. Discovery of a new oncogene in pituitary tumors. *Nature* 1987;330: 517-518.

Bourne HR, Sanders DA and McCormick F. The GTPase superfamily : a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 1990; 348: 125- 132.

Bourne HR. Suppression with a difference. *Nature* 1991;353:696-697.

Bullrich F, MacLachlan TK, Sang N, Druet T, Veronese ML, Allen SL, Chiorazzi N, Koff A, Huebner K, Croce CM, Giordano A. Chromosomal mapping of members of the cdc2 family of protein kinase, cdk3, cdk6, PISSLRE, and PITALRE and a cdk inhibitor p27^{kip1}, to regions involved in human cancer. *Cancer Res* 1995; 55:1199-1205.

Burke L, Bybee A, Thomas NSB. The retinoblastoma protein is partially phosphorylated during early G1 in cycling cells but not in cells arrested with alpha-interferon. *Oncogene* 1992; 7: 783-788.

Cance WG, Brennan MF, Dudas ME, Huang CM, Cordon CC. Altered expression of the retinoblastoma gene product in human sarcomas. *N Engl J Med* 1990;323:1457-1462.

Caspari R, Friedl W, Mandl M. Familial adenomatoc polyposis: mutation at codon 1309 and early onset of colon cancer. *Lancet* 1994;343 : 629-637.

Catzavelos C, Bhattacharya N, Ung YC, Wilson JA, Roncari L, Sandhu C, Shaw P, Yeger H, Morava Protzner I, Kapusta L, Franssen E, Pritchard KI, Slingerland JM. Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27 protein: prognostic implications in primary breast cancer. *Nature Med* 1997; 3:227-230.

Cavenee WK, Dryja TP, Phillips RA, Benedict WF, Godbout R, Gallie BL, Murphree AL, Strong LC, White RL. Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* 1983; 305: 779-784.

Cavenee WK, Leach R, Mohandas T, Pearson P, White R. Isolation and regional localization of DNA segments revealing polymorphic loci from human chromosome 13. *Am J Hum Genet* 1984; 36: 10-24.

Cavenee WK, Hansen MF, Nordenskjold M, Kock E, Maumenee I, Squire J, Phillips RA, Gallie BL. Genetic origin of mutations predisposing to retinoblastoma. *Science* 1985;228:501-503.

Chan FKM, Zhang J, Cheng L, Shapino DN, Winoto A. Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16INK4. *Mol Cell Biol* 1995;15:2682-2688.

Chan LC, Kwong YL, Liu HW, Lee CP, Lee KW, Chan AY. Deletion 12p in de novo acute myeloid leukemia. An association with early progenitor cell. *Cancer Genet Cytogenet* 1992;62:47-49.

Chellapan S, Hiebert S, Mudryi M, Horowitz J, Nevins J. The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* 1991;65:1053-1061.

Cheng M, Sexl V, Sherr CJ, Rousell MF. Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p27^{kip1} regulated by mitogen-activated protein kinase (MEK1). *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:1092-1096.

Chessells J. Recent advances in management of acute leukemia. *Arch Dis Child* 2000;82:438-442.

Chen YC, Chen RJ, Yes SH, Tien WF, Wang CH, Tang JL, Hong RL. Deletion of the human retinoblastoma gene in primary leukemia. *Blood* 1990; 2060-2069.

Chu EHY, Boehnke M, Hanash SM, Kuick RD, Lamb BJ, Neel JV. Estimation of the mutation rates based on the analysis of polypeptide constituents of cultured human lymphoblastoid cells. *Genetics* 1988;119: 693-703.

Clarke A, Maandag ER, van Roon M, van der Lugt NM, van der Valk M, Hooper M, Berns A, te Riele H. Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development. *Nature* 1992;359:328-330.

Cline MJ. The molecular basis of leukemia. *N Engl J Med* 1994;330:328-336.

Coats S, Flanagan WM, Nourse J, Roberts JM. Requirement of p27^{Kip1} for restriction point control of fibroblast cell cycle. *Science* 1996;272:877-880.

Collins S, Groudine M. Amplification of endogenous myc-related DNA sequences in a human myeloid leukemia cell line. *Nature* 1982;298:679-683.

Cooper CS. Translocations in solid tumor. *Curr Opin Genet Dev* 1996;6:71-79.

Cory S. Activation of cellular oncogenes in hematopoietic cells by chromosome translocation. *Adv Cancer Res* 1986; 47: 189-234.

Cote RJ, Shi Y, Grodhen S, Feng A, Cordon-Card C, Skinner D, Lieskovosky G. Association of p27Kip1 levels with recurrence and survival in patients with stage C prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:916-920.

Craig C, Westo R, Kim M, Orhi E, Li Z. A recombinant adenovirus p27^{Kip1} induces cell cycle arrest and loss of cyclin Cdk activity in human breast cancer cells. *Oncogenes* 1997;14:2283-2289.

Croix BS, Florenes VA, Rak JW, Flanagan M, Bhattacharya N. Impact of the cyclin-dependant kinase inhibitor p27^{Kip1} on resistance of tumor cells to anticancer agents. *Nat Med* 1996;2:1204 -1210.

Culotta E, Koshland D. p53 sweeps though cancer research. *Science* 1993; 262: 1953-1957.

De Caprio J, Lundlow J, Lynch D, Furukawa Y, Griffin J, Piwnica P, Worms H, Huang C, Livingston DM. The product of the retinoblastoma susceptibility gene has properties of a cell cycle regulatory element. *Cell* 1989 ; 58:1085-1095.

De Caprio J, Lundlow J, Figge J, Shew JY, Huang C, Lee WH, Marsillio e, Paucha E, Livingston DM. SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* 1988;54: 275-283.

De Klein A, Van Kessel AG, Grosveld G, Bartram CR, Hagemeijer A, Bootsma D, Spurr NK, Heisterkamp N, Groffen J, Stephenson JR. Cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukemia. *Nature* 1982;300:765-768.

Dean M, White MB, Amos J, Gerrard B, Stewart C, Khaw KT, Leppet M. Multiple mutations in high conserved residues are found in mildly affected cystic fibrosis patients. *Cell* 1990;61:863-870.

Deng C, Zhang P, Harper JW, Elledge SJ, Leder P. Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 1995;82:675-684.

Draper GJ, Sanders BM, Kingston JE. Second primary neoplasms in patients with retinoblastoma. *British Journal of Cancer* 1986;53:661-671.

Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papiloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science (Washington DC)*1989;243:934-937.

Easton D, Ford D, Bishop D et al. Breast and Ovarian cancer incidence in BRCA1 mutation carriers. *Am J Hum Genet* 1995; 56 :265-270.

El-Deiry W, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer W, Kinzler KW, Vogelstein B. Waf1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993; 75: 815-825.

Elledge SJ. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 1996;274:1664-1667.

Ephrussi B, Davidson RL, Weiss MC, Harris H, Klein G. Malignancy of somatic cell hybrids. *Nature* 1969;224:1314-1316.

Erlason M, Portin C, Linderholm B, Lindh J, Roos G, Landberg G. Expression of cyclin E and the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in malignant lymphoma – prognostic implications. *Blood* 1998;92: 770-777.

Esposito V, Baldi A, De Luca A, Groger AM, Loda M, Giordano GG, Caputi M, Baldi F, Pagano M, Giordano A. Prognostic role of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1997;57: 3381-3385.

Evans EP, Burtenshaw MD, Brown BB, Hennion R, Harris H. The analysis of malignancy by cell fusion IX Re-examination and clarification of the cytogenetic problem. *J Cell Sci* 1982 ;56:113-130.

Evans HJ. Molecular genetic aspects of human cancers : the 1993 Frank Rose lecture. *Br J Cancer* 1993; 68: 1051-1060.

Ewen M, Sluss K, Sherr CJ, Livingston M, Matsushime H, Kato JY, Livingston DM. Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell* 1993;73:487-492.

Ewen ME. Relationship between ras pathways and cell cycle control. *Prog Cell Cycle Res* 2000;4:1-17.

Eymin B, Haugg M, Droin N, Sordet O, Dimanche-Boitrel M-T, Solary E. p27^{Kip1} induce drug resistance by preventing apoptosis upstream of cytochrome c

release and procaspase-3 activation in leukemic cells. *Oncogenes* 1999;18:1411-1418.

Farber S, Diamond LK, Mercer RD, Sylvester RF, Wolff JA. Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-Aminopteroyl-glutamic acid (aminopterin). *New Engl J Med*, 1948 ;238: 787.

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-767.

Fero ML, Randel E, Gurley KE, Roberts JM, Kemp CJ. The murine gene p27^{Kip1} is haplo-insufficient for tumor suppression. *Nature* 1998;396:177-180.

Fero ML, Rivkin M, Tasch M, Porter P, Caraw CE. A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis and female sterility in p27^{Kip1}-deficient mice. *Cell* 1996;85:733-744.

Filipovich AH, Mathur A, Kamat D, et al. Lymphoproliferative disorders and other tumors complicating immunodeficiencies. *Immunodeficiency* 1994; 5: 91-103

Firpo EJ, Koff A, Solomon MJ, Roberts J. Inactivation of Cdk2 inhibitor during interleukin 2-induced proliferation of human T lymphocytes. *Mol Cell Biol* 1994;14: 4889-4901.

Francke U, Holmes LB, Atkins L and Riccardi VM. Aniridia-Wilm's tumor association: evidence for specific deletion of 11p13. *Cytogenet Cell Genet* 1979;24: 185-192.

Francke U. Retinoblastoma and chromosome 13. *Cytogenet Cell Genet* 1976; 16: 131-134.

Fredersdorf S, Burns J, Milne AM, Packham G, Fallis L. High level expression of p27^{Kip1} and cyclin D1 in some human breast cancer cells. Inverse correlation

between the expression of p27^{Kip1} and degree of malignancy in human breast and colorectal cancers. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:6380-6385.

Friedmann A, Weinstein J. The role of prognostic features in the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. Oncolog 2000; 5:321.

Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, Dryja TP. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. Nature 1986;323: 643-646.

Friend SH, Dryja TP, Weinberg RA. Oncogenes and tumor-suppressing genes. N Engl J Med 1988;318:618-623.

Fung YKT et al .Structural evidence for the authenticity of the human retinoblastoma gene. Science1987; 236:1657-1661.

Furukawa Y, de Caprio J, Freedman A, Kanakura N, Nakamura M, Ernst TJ, Livingston DM, Griffin DJ. Expression and state of phosphorylation of the retinoblastoma susceptibility gene product in cycling and noncycling human hematopoietic cells. Proc Natl Acad Sci USA 1990;87:2770-2774.

Ginsberg A, Raffeld M, Cossman J. Inactivation of the retinoblastoma gene in human lymphoid neoplasms. Blood 1991;77:833-842.

Goodbout R, Dryja T, Squire J, Gallie B, Phillips R. Somatic inactivation of genes on chromosome 13 is a common event in retinoblastoma. Nature 1983;304:451-453.

Goodrich DW, Wang NP, Qian YW, Eva YH, Lee P, Lee WH. The retinoblastoma gene product regulates progression through the G1 phase of the cell cycle. Cell 1991;67:293-302.

Goodrich DW and Lee WH. Molecular characterization of the retinoblastoma susceptibility gene. Biochemica and Biophysica Acta 1993;1155:43-61.

Graham FL, Van der Eb AJ. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *J Virol* 1973; 52: 456-462.

Greaves M. Childhood leukemia. *BMJ* 2002: 324:283-287.

Greaves M. A natural history for pediatric acute leukemia. *Blood* 1993, 82: 1043-1051.

Griffiths A. Mechanisms of genetic change I: gene mutation :An introduction to genetic analysis. W.H. Freeman and Company, 1996 (5th edit).

Groves FD, Linet MS, Devesa SS. Epidemiology of leukemia, in *Leukemia*, 6th ed, edited by ES Henderson, TA Lister, MF Greaves, pp145-159. Saunders, New York. 1986.

Guan KL, Jenkins CW, Li Y. Growth suppression by p18 , a p16^{INK4A}/INK4/MTS1- and p14^{INK4B}/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlate with wild-type pRb function. *Genes Dev* 1994;8:2939-2942.

Gurney JG, Severson RK, Davis S, Robison LL. Incidence of cancer in children in United States. Sex-race-, and 1-year age specific rates by histologic type. *Cancer* 1995;75:2186-2191.

Haas-Kogan D, Kogan S, Levi D, Dazin P, T Ang A, Fung Y, Israel M. Inhibition of apoptosis by the retinoblastoma gene product. *EMBO Journal* 1995;14:461-472.

Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, King MC. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 1990;250:1684-1689.

Hangaishi A, Ogawa S, Imamura N, Miyawaki S, Miura Y, Uike N, Shimazaki C, Emi N, Ueda R, Hirai H. Inactivation of multiple tumor-suppressor genes involved in

negative regulation of the cell cycle MTS1/P16INK4A/CDKN2, MTS2/p15/INK4B, p53 and Rb genes in primary lymphoid malignancies. *Blood* 1996;87:4949-4958.

Hannon GJ, Beach D: p15^{INK4B} is a potential effector of Tgf-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 1994;371:672-674.

Hansen MF, Cavenee WK. Genetics of cancer predisposition. *Cancer Res* 1987;47: 5518-5527.

Hansen MF, Cavenee WK. Retinoblastoma and the progression of tumor genetics. *Trend Genet* 1988;4:125-128.

Hansen MF, Morgan R, Sandberg A, Cavenee W. Structural alteration at the putative retinoblastoma locus in some human leukemias and preleukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1990;49:15-24.

Hensel H, Hsieh CL, Gazdar AF, Johnson BE. Altered structure and expression of the human retinoblastoma susceptibility gene in small cell lung cancer. *Cancer Res* 1990;50:3067-3072.

Harbour JW, Lai SL, Whang-Reng J, Gazdar AF, Minna JD, Kaye FJ. Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC. *Science* 1988;241:353-357.

Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21CDK-interacting proteins Cip 1 is a potent inhibitor of G1 cyclin – dependent kinases. *Cell* 1993;805-807.

Harris H. The analysis of malignancy by cell fusion: the position in 1988. *Cancer Res* 1988;48: 3302-3306.

Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* 1994; 266: 1821-1828.

Hatta Y, Yamada Y, Tomonaga M, Koeffler HP. Extensive analysis of the retinoblastoma gene in adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL). *Leukemia* 1997; 11:984-989.

Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* 1994;266: 1821-1824.

Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 1989;246:629-631.

He J, Allen JR, Collins VP, Allalunis-Turner MJ, Godbout R, Day RS, James CD. CDK4 amplification is an alternative mechanism to p16 gene homozygous deletion in glioma cell lines. *Cancer Res* 1994;54: 5804-5807.

Hengst L, Reed SI. Translational control of p27^{Kip1} accumulation during the cell cycle. *Science* 1996;271:1861-1864.

Hethcote HW, Knudson AGJR. Model for the incidence of embryonal cancers: Applications to retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 2453-2461.

Hinds P, Mitnacht S, Dulic V, Arnold A, Reed S, Weinberg R. Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclin. *Cell* 1992;70:993-997.

Hirai H, Roussel MF, Kato JY, Ashmun RA, Sherr CJ. Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol Cell Biol* 1995;15: 2672-2676.

Hirrama T, Koeffler HP. Role of the cyclin-dependent kinase inhibitor in the development of cancer. *Blood* 1995;86:841-854.

Horowitz JM, Yandell DW, Pak SH, Canning S, Whyte P, Buchkovich KJ, Harlow E, Weinberg RA, Dryja TP. Point mutational inactivation of the retinoblastoma antioncogene. *Science* 1989;243:937-940.

Horowitz JM, Park SH, Bogenmann E, Cheng JC, Yandell DW, Kaye FJ, Minna JD, Dryja TP, Weinberg RA. Frequent inactivation of the retinoblastoma anti-oncogene is restricted to a subset of human tumor cells. *Proc Natl Sci USA* 1990;87:1990.

Huang HJ, Yee JK, Shew JY, Chen PL, Bookstein R, Friedmann T, Lee EY, Lee WH. Suppression of the neoplastic phenotype by replacement of the Rb gene in human cancer cells. *Science* 1988;242:1563-1566.

Hunter T and Cooper JA. Protein - tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem* 1985; 54: 897-930.

Hunter T. Braking the cycle. *Cell* 1993;75:839-841.

Hunter T. Cooperation between oncogenes. *Cell* 1991;64: 249-70

Hussussian CJ, Stuewing JP, Goldstein AM, Higgins PAT, Ally DS, Sheahan MD, Clark WH, Jr. Tucker MA and Dracopoli NC. Germline p16 mutations in familiar melanoma. *Nat Genet* 1994;8:15-21.

Jamal R, Gale R, Thomas S, Wheathey K, Linch D. The retinoblastoma gene (rb1) in acute myeloid leukemia: analysis of gene rearrangements, protein expression and comparison of disease outcome. *British J Haem* 1996;94:342-351.

Jamal R, Gale RE, Shaun N, Thomas B, Wheatley K, Linch DC. The Retinoblastoma gene (Rb-1) in acute myeloid leukemia: analysis of gene rearrangements protein expression and comparison of disease outcome. *Brit J Haem* 1996; 94:342-351.

Jamal R. The Retinoblastoma Gene in Myeloid Leukemia. *Hematology*1996;1:43-51

James CD, Carlbom E, Nordenskjold M, Collins VP, Cavenee WK. Mitotic recombination of chromosome 17 in astrocytomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2858-2862.

Jen J, Harper JW, Bigner SH, Bigner DD, Papadopoulos N, Markowitz S, Wilson JKV, Kinzler KW, Vogelstein B. Deletion of p16 and p15 genes in brain tumors. *Cancer Res* 1994;54: 6353-6358.

Kalmanti M, Kalmantis TH, Vassilaki M, Galanopoulos A, Grenzeliadis D, Spandidos DA. The expression of the ras p21 oncoprotein in the bone marrow smears of children with acute leukemia. *Anticancer Res* 1992; 12:2177-2180.

Kalmanti M, Dimitriou H. Bcl-2 expression in childhood leukemia. Could it be used as a prognostic factor *Ped Hem Onc* 1998;15:105-107.

Kato J, Matsuoka M, Polyak K, Massague J, Sherr CJ. Cyclic AMP-induced G₁ phase arrest mediated by an inhibitor (p27^{kip1}) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell* 1994; 79: 487-496.

Kawamata N, Morosetti R, Miller CW, Park D, Spirin KS, Nakamaki T, Takeuchi S, Hatta Y, Simpson J, Wilczynski S, Lee YY, Bartram C, Koeffler P. Molecular analysis of the cyclin-dependent kinase inhibitor gene p27/Kip1 in human malignancies. *Cancer Res* 1995; 55: 2266-2269.

Kawamata N, Seriu T, Koeffler P, Bartram C. Molecular analysis of the cyclin-dependent kinase inhibitor family: p16(CDKN2/MTS1/INK4A), p18(INK4C) and p27(Kip1) genes in neuroblastomas. *Cancer* 1996; 77:570-575.

Kawasaki E and Erlich H. Polymerase chain reaction and analysis of cancer cell markers. *J Natl Cancer Inst* 1990;82:806-807.

Kay NE, Suen R, Ranheim E, Peterson LC. Conformation of Rb gene defects in B-CLL clones and evidence for variable predominance of the Rb defective cells within the CLL clone. *British J Haem* 1993, 84:257-264.

Kersey J. Fifty years of studies of the biology and therapy of childhood leukemia. *Blood* 1997; 90: 4243.

Kiyokawa H, Kineman RD, Manova-Todorova KO, Soares VC, Hoffman ES. Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27^{Kip1}. *Cell* 1996;85:721-732.

Klinger HP. Suppression of tumorigenicity. *Cytogenet Cell Genet* 1982;32:68-75.

Knudson AGJR. Mutations and cancer: Statistical study of retinoblastomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971;68: 820-823.

Knudson AGJR. Hereditary cancer, oncogenes and antioncogenes. *Cancer Res.*1985; 45: 1437.

Knudson AGJR. Genetics of human cancer. *Annu Rev Genet* 1986;20: 231- 235.

Knudson AGJR. Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993;90:10914-10921.

Kobayashi H, Montgomery KT, Bohlander SK, Adra CN, Lim BL, Kucherlapati RS, Donis-Keller H, Holt MS, Le Beau MM, Rowley JD. Fluorescence in situ hybridization mapping of translocations and deletion involving the short arm of human chromosome 12 in malignant hematologic disease. *Blood* 1994;84:3473-3479.

Koff A, Ohtsuki M, Polyak K, Roberts J, Massague J. Negative regulation of G1 in mammalian cells: Inhibition of cyclin E-dependent kinase by TGF –beta. *Science* 1993; 260:536-539.

Koufos A, Grundy P, Morgan K, Aleck KA, Hardo T, Lampikin BC, Kalbakji A, Cavenee WK. Familiar Wiedemann–Beckwith syndrome and a second Wilm’s tumor locus both map to 11p15.5. *Am J Hum Genet* 1989;44:711-719.

Kornblau SM, Xu HJ, Del Giglio A, Hu SX. Clinical implications of decreased retinoblastoma protein expression in acute myelogenous leukemia. *Cancer Res* 1992;52:4587-4590.

Kornblau SM, Xu HJ, Zhang W, Hu S, Beran M, Smith TL, Hester J, Estey E, Benedict WF, Deisseroth A. Levels of retinoblastoma protein expression in newly diagnosed acute myelogenous leukemia. *Blood* 1994;84:256-261.

Kornblau SM, Xu HJ, Hu SX, Estey E, Benedict WF, Deisseroth A. Low and maximally phosphorylated levels of the retinoblastoma protein confer poor prognosis at diagnosis in newly diagnosed acute myelogenous leukemia: A prospective study. *Blood* 1995;86, Suppl 1, 599a.

Kozlowski P, Sobczak K, Napierala M, Wozniak M, Czarny J, Wlodzimierz J, Kryzosiak J. PCR-SSCP-HDX analysis of pooled DNA for more rapid detection of germline mutations in large genes. The BRCA1 example, *Nucleic Acids Res* 1996;24:1177-1178.

Lammie GA, Peters G. Chromosome 11q13 abnormalities in human cancer. *Cancer Cells (Cold Spring Harbor)* 1991;3:413-420.

Lane DP. Cancer p53, guardian of the genome. *Nature* 1992;358:15-16

Lang M, Treinies I, Duesberg PH, Kurth R and Cichutek K. Development of transforming function during transduction of proto-ras genes into Harvey sarcoma virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 654-658.

Larric JW. Message amplification phenotyping (MAPPING)- principles, practice and potential. *Trends Biotechnol* 1992;10:146-152.

Lasco D, Cavenee W, Nordenskjold M. Loss of constitutional heterozygosity in human cancer. *Annu Rev Genet* 1991;25: 281-314

Latchman DS. Eukaryotic transcription factors. *Biochem J* 1990; 270: 281-285.

Lee WH, Bookstein R, Hong F, Young L, Shew J, Lee EYHP. Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification and sequence. *Science* 1987;235:1394-1399.

- Lee M**, Reynisdottir I, Massague J. Cloning of p57kip2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev* 1995;9:639-649.
- Lele KP**, Penrose LS, Stallard HB. Chromosome deletion in a case of retinoblastoma. *Am J Hum Genet* 1963; 27: 171-175.
- Levine AJ**. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997;88: 323-331.
- Lloyd RV**, Jin L, Quian X, Kulig E. Aberrant p27^{Kip1} expression in endocrine and other tumors. *Am J Pathol* 1997;150:401-407.
- LoCoco F** and Saglio G. Single or multiple origin of hemopoietic tumors: the contribution of clonality studies. *Leukemia* 1995;9:1586-1589.
- Loda M**, Cukor B, Tam SW, Lavin P, Fiorentino M, Draetta GF, Jessup JM, Pagano M. Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nature Med* 1997; 3:231-234.
- Loeb LA**. Mutor phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res* 1991 ; 51 : 3075-3079.
- Ludlow J**, DeCaprio J, Huang C, Lee WH, Paucha E, Livingston D. SV40 large T antigen binds preferentially an underphosphorylated member of the retinoblastoma susceptibility gene product family. *Cell* 1989;56:57-65.
- Lodmann DR**, Brandt B, Hopping W, Passarge E, Horsthemke B. Distinct RB-1 gene mutations with low penetrance in hereditary retinoblastoma. *Hum Genet* 1994;94:349-354.
- Lui C-H**, Crist W. Biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr* 1994;124:491-499.

- Lui C-H.** Childhood leukemias. *New Engl J Med* 1995;332:1618-1626
- Luscher B,** Eisenman RN. New light on myc and myb. Part II. *Genes Dev* 1990; 4: 2235-2241.
- Mahoney MC,** Burnett WS, Majerovics A, Tanenbaum H. The epidemiology of ophthalmic malignancies in New York State. *Ophthalmology* 1990; 97: 1143-1158.
- Makino R,** Yazyu H, Kishimoto Y, Sekiya T, Hayashi K. F-SSCP fluorescence-based polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) analysis. *PCR Methods* 1992; Appl 2 :10-13.
- Maklin D.** The Li-Fraumeni syndrome. *Principles and Practice of Oncology*,1993;7:1-12.
- Mardlin P,** Chessells JM. Childhood leukemia : the medical cost of cure. *Hosp Med* 2001;62: 200-204.
- Marshall C.** Tumor suppressor genes. *Cell* 1991; 64:313.
- Masciullo V,** Sgambato A, Pacilio C, Pucci B, Ferradina G. Frequent loss of expression of the cyclin-dependant kinase inhibitor p27 in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 1999;59:3790-3794.
- Miller RW.** Persons with exceptionally high risk of leukemia. *Cancer Res* 1967; 27: 2420-2427.
- Modrich P.** Mismatch repair, genetic stability and cancer. *Science* 1994; 266: 1959-1960.
- Moller M.** p27 in cell cycle control and cancer. *Leuk Lymph* 2000;39:19-27.
- Morgan D.** Principles of cdk regulation. *Nature* 1995;374:131-135.
- Mori N,** Yokota J, Akiyama T, Semeshima Y. Variable mutations of the RB gene in small cell lung carcinoma. *Oncogene* 1990;5:1713-1717.

Mori T, Miura K, Aoki T, Nishihira T, Mori S, Nakamura Y. Frequent somatic mutations of the MTS1/CDK4 (multiple tumor suppressor/cyclin-dependent kinase 4 inhibitor) gene in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1994;54: 3396-3397.

Moroseti R, Kawamata N, Gombart AF, Miller CW, Hatta Y. Alteration of p27^{Kip1} gene in non-Hodgkin's lymphomas and adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* 1995;86:1924-1930.

Mulligan KM, Matlashewski GJ, Scoble HJ, Cavenee WK. Mechanisms of p53 loss in human sarcomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:5863-5867.

Nakayama K, Ishida N, Shirane M, Inomata A, Inoue T. Mice lacking p27^{Kip1} display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia and pituitary tumors. *Cell* 1996;85:707-720.

Narayanan S. Overview of principles and current uses of DNA probes in clinical and laboratory medicine. *Ann Clin Lab Sci* 1992; 22:353-376.

Neubauer A, Richiero K, Huhn D. Alteration of the Retinoblastoma Susceptibility Gene in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Leuk Lymph* 1995;18: 399-404

Newcomb EW, Sosnow M, Demopoulos RI, Zeleniuch-Jacquotte A, Sorich J, Speyer JL. Expression of the cell cycle inhibitor p27^{Kip1} is a new prognostic marker associated with survival in epithelial ovarian tumors. *Am J Pathol* 1999;154:119-125.

Nourse J, Firpo E, Flanagan W, Coats S, Polyak K, Lee MH, Massague J, Crabtree G, Roberts J. Interleukin -2- mediated elimination of the p27 cyclin- dependent-kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature* 1994;372:570-573.

Okamoto A, Demetrick DJ, Spillare EA, Hagiwara K, Hussain SP, Bennett WP, Forrester K, Gerwin B, Serrano M, Beach DH, Harris CC. Mutations and altered

expression of p16^{INK4} in human cancer. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:11045-11049.

Oshimura M, Gilmer T, Barrett JC. Nonrandom loss of chromosome 15 in Syrian hamster tumors induced by v-Ha-ras plus v-myc oncogenes. Nature 1985;316:636-639.

Paggi MG, de Fabritiis P, Bonetto F, Amadio L, Santrelli G, Spadea A, Gentile FP, Floridi A, Felsani A. The retinoblastoma gene product in acute myeloid leukemia: a possible involvement in promyelocytic leukemia. Cancer Res 1995;55:4552-4556.

Parada LP, Tabin CJ, Shih C, Weinberg RA. Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. Nature 1982; 297: 477-479.

Park M. Oncogenes. In Vogelstein B and Kinzler WK :The genetic basis of human cancer. McGraw-Hill, New York, second edition 2002.

Perucho M, Goldfarb MP, Shimizu K, Lama C, Pogh J, Wigler M. Human –tumor derived cell lines contain common and different transforming genes. Cell 1981; 27: 467- 471.

Pietenpol JA, Bohlander S, Kato Y, Papadopoulos N, Liu B, Friedman C, Trask BJ, Roberts JM, Kinzler KW, Rowley JD and Vogelstein B. Assignment of the human p27^{kip1} gene to 12p13 and its analysis in leukemias. Cancer Res 1995; 55:1206-1210.

Pines J. Cyclins, CDKs and cancer. Semin Cancer Biol 1995;6:63-72.

Pietilainen T, Lipponen P, Aaltomaa S, Eskelinen M, Kosma VM, Syrjanen K. Expression of retinoblastoma gene protein in breast cancer as related to established prognostic factors and survival. Eur J Cancer Part A: General Topics 1995;31:329-333.

Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, Koff A. A p27^{kip1}, a cyclin-cdk inhibitor, links transforming growth factor- β and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 1994; 8:9-22.

Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massague J. Cloning of p27^{kip1}, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 1994; 78:59-66.

Ponce-Castaneda MV, Lee MH, Latres E, Polyak K, Lacombe L, Montgomery K, Mathew S, Krauter K, Sheinfeld J, Massague J, Cordon-Cardo C. P27^{Kip1}: chromosomal mapping to 12p12-12p13.1 and absence of mutations in human tumors. *Cancer Res* 1995; 55:1211-1214.

Porter PL, Melone KE, Heagerty PJ, Alexander GM, Gatti LA, Firpo EJ, Daling JR, Roberts JM. Expression of cell-cycle regulators p27Kip1 and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients. *Nature Med* 1997;3: 222-225.

Presti JJ, Reuter VE, Galan T, Fair WR, Cordonn CC. Molecular genetic alterations in superficial and locally advanced human bladder cancer. *Cancer Res* 1991;51: 5405-5409.

Preudhomme C, Vachee A, Lepelley P, Vanrumbeke E, Zandecki M, Quesnel B, Cosson A, Fenaux P. Inactivation of the retinoblastoma gene appears very uncommon in myelodysplastic syndromes. *British J Haem* 1994;87: 61-67.

Pui C-H, Raimondi SC, Borowitz MJ. Immunophenotypes and karyotypes of leukemic cells in children with Down syndrome and acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1993; 11: 1361-1370.

Pui C-H. Childhood leukemia. *N Engl J Med* 1995;332:1618-1629.

Rabbitts TH. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 1994; 372:143-149.

Rabbitts TH. Perspective: Chromosomal translocations can affect genes controlling gene expression and differentiation. Why are these functions targeted. *J Pathol* 1999;187:39-43.

Rabbitts TH. Translocations, master genes and differences between the origins of acute and chronic leukemias. *Cell* 1991; 67:641-644.

Ragione FD and Lolascon A. Inactivation of cyclin –dependent kinase inhibitor genes and development of human acute leukemias. *Leuk Lymph* 1996;25:23-35.

Rahman J. Evidence for a familiar Wilms' tumor gene (WT1) on chromosome 17q12-q21. *Nature Genet* 1996; 13: 461-463.

Riehm H, Gardner H, Henze G, Kornhuber B, Lampert F, Niethammer D et al. Results and significance of six randomized trials in four consecutive ALL – BFM studies. *Haematol Blood Transfus*, 1990 ; 33 : 439.

Rous P. A transmissible avian neoplasm. (Sarcoma of the common fowl). *J Exp Med* 1979; 50:738-753.

Russell P. Checkpoints on the road to mitosis. *Trends Biochem Sci* 1998;32:399-405.

Sakai T, Ohtani N, McGreen T, Robbins P, Dryja T. Oncogenic germ-line mutations in Spl and ATF sites in the human retinoblastoma gene. *Nature* 1991; 353: 83-86.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning*. Ed 2, pp11.20-11.58. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

Sanchez-Beato M, Saez AI, Martinez-Montero JC, Mateo MS, Sanchez-Verde L. Cycling-dependant kinase inhibitor p27^{Kip1} in lymphoid tissue : p27^{Kip1} expression is inversely proportional to the proliferative index. *Am J Pathol* 1997;151:151-160.

Sandler RM, Ross JA. Epidemiology of acute leukemia in children and adults. *Semin Oncol* 1997; 24: 3-16.

Sapienza C. Genome imprinting and dominance modification. *Ann NY Acad Sci* 1989;564: 24-48.

Saxon PJ, Srivatsan ES, Stanbridge EJ. Introduction of human chromosome 11 via microcell transfer controls tumorigenic expression of HeLa cells. *Embo J* 1986;5:3461-3466.

Schreiber M, Muller WJ, Singh G, Graham FL. Comparison of the effectiveness of adenovirus vectors expressing cyclin kinase inhibitors p16^{INK4A}, p18^{INK4B}, p19^{INK4C}, p21^{WAF/CIP1}, p27^{Kip1} in inducing cell cycle arrest, apoptosis and inhibition of tumorigenicity. *Oncogene* 1999;18:1663-1676.

Scrabble H, Cavenee W, Ghavimi F, Lovell M, Morgan K, Sapienza C. A model for embryonal rhabdomyosarcoma tumorigenesis that involves genome imprinting. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86: 7480-7484.

Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature (Lond)* 1993; 366:704-707.

Seversson RK, Ross JA. The causes of acute leukemia. *Curr Opin Oncol* 1999;11: 20-24.

Sgambato A, Migaldi M, Faraglia B, Garagnani L, Romano G. Loss of p27^{Kip1} expression correlates with tumor grade and with reduced disease free survival in primary superficial bladder cancers. *Cancer Res* 1999;59:3245-3250.

Sherr CJ. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 1994;79:551-555.

Sherr CJ. The ins and out of Rb: coupling gene expression to the cell cycle clock. *Trends Cell Biol* 1994;4:15-23.

Shibata D, Schaeffer J, Li ZH, Capella G, Perucho M. Genetic heterogeneity of the c-K-ras locus in colorectal adenomas but not in adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 1058-1063.

Shimizu M, Yokota J, Mori N, Shuin T, Shinoda M, Terada M, Oshimura M. Introduction of normal chromosome 3p modulates the tumorigenicity of a human renal cell carcinoma cell line YCR. *Oncogene* 1990;5:185-194.

Shih C, Weinberg RA. Isolation of a transforming sequence from a human bladder carcinoma cell line. *Cell* 1982;29:161-165.

Solomon E, Borrow J, Goddard AD. Chromosome aberrations and cancer. *Science* 1991;254 :1153-1160.

Spandidos D, Anderson M: Oncogenes and tumor-suppressor genes: Their involvement in cancer. *J Pathol* 1989;157:1.

Spandidos DA. A unified theory for the development of cancer. *Biosci Rep* 1986;6: 691-708.

Sparkes RS, Murphree AL, Lingua RW, Sparkes MC, Field LL, Funderburk SJ, Benedict WF. Gene for hereditary retinoblastoma assigned to human chromosome 13 by linkage analysis to esterase D. *Science* 1983; 219: 971-974.

Sparkes RS, Sparkes MC, Wilson MG, Towner JW, Benedict WF, Murphree AL, Yunis JJ. Regional assignment of genes for esterase D and retinoblastoma to chromosome band 13q14. *Science* 1980; 208: 1042-1045.

Spector DH, Varmus HE and Bishop JM. Nucleotide sequences related to the transforming gene of avian sarcoma virus are present in DNA of uninfected vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 4102-4106.

Stanbridge EJ, Der CJ, Doersen CJ, Nishimi RY, Peehl DM, Weisman BE, Wilkinson JE. Human cell hybrids : analysis of transformation and tumorigenicity. Science 1982;215:252-256.

Stegmaier K, Pendse S, Barker G, Bray-Ward P, Ward D, Montgomery K, Krauter K, Reynolds C, Sklar J, Donnelly M, Bohlander S, Rowley J, Sallan S, Gilliland G, Golub T. Frequent loss of heterozygosity at the TEL gene locus in acute lymphoblastic leukemia of childhood. Blood 1995; 86: 38-44.

Stenhelin D, Varmus HE, Bishop JM and Vogt PK. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. Nature 1976; 260: 170-173.

Suggs K, Wallace RB, Hirose T, Kawashima EH, Itakura K. Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: Isolation of cloned cDNA sequences for β 2-microglobulin. Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78: 6613- 6615.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T(eds): Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York ,1989.

Tang JL, Yeh SH, Chen PJ, Lin MT, Tien HF, Chang Y. Inactivation of the retinoblastoma gene in acute myelogenous leukemia. British J Haem 1992;82:502-507.

Taub JW, Konrad MA, Ge Y, Naber JM, Scott JS, Motherly LH. High frequency of leukemia clones in newborn screening blood samples of children with B- precursor acute lymphoblastic leukemia. Blood 2002; 99: 2992-2996

Tong W, Kiyokawa H, SoosTJ, Park MS, Soares VC. The absence of p27^{Kip1}, an inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases uncouple differentiation and growth arrest during the granulose \rightarrow luteal transition. Cell Growth Differ 1998;9;787-794.

Towatari M, Adachi K, Kato H, Saito H. Absence of the human retinoblastoma gene product in the megacaryoblastic crisis of chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1991;78:2178-2181.

Toyoshima H, Hunter T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 1994; 78:67-74.

Treisman R. Ternary complex factors: Growth factor regulated transcriptional activators. *Curr Opin Genet Dev* 1994;4:96-102.

Trent JM, Stanbridge EJ, McBride HL, Meese EU, Casey G, Araujo DE, Witkowski CM, Nagle RB. Tumorigenicity in human melanoma cell lines controlled by introduction of human chromosome 6. *Science* 1990;247:568-571.

Tsai T, Davalath S, Rankin C, Radich JP, Head D, Appelbaum RF, Botl DH. Tumor suppressor gene alteration in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). Analysis of retinoblastoma (Rb) and p53 gene expression in lymphoblasts of patients with de novo, relapsed, or refractory ALL treated in Southwest Oncology Group studies. *Leukemia* 1996;10:1901-1910.

Vanasse GJ, Concannon P, Willerford DM. Regulated genomic instability and neoplasia in the lymphoid lineage. *Blood* 1999; 94: 3997-4006.

Vogel F. Genetics of retinoblastoma. *Hum Genet* 1979; 52:1-54

Vogelstein B and Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 1993; 9: 138 -141.

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM and Bos JL. Genetic alterations during colorectal – tumor development. *N Engl J Med* 1988; 319: 525-532.

Vrhovac R, Delmer A, Tang R, Marie JP, Zittoun R, Ajhenbaum Cymbalista F. Prognostic significance of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in chronic B-cell lymphocytic leukemia. *Blood* 1998; 91:4694-4700.

Wang Z, Gorospe M, Huang Y, Holbrook NJ. p27^{Kip1} overexpression causes apoptotic death of mammalian cells. *Oncogenes* 1997;15:2991-2997.

Ward P, Packman S, Loughman W, Sparkes M, Sparkes RS, McMahon A, Gregory T, Albin A. Location of the retinoblastoma susceptibility gene(s) and the human esterase D locus. *J Med Genet* 1984; 21: 92-97.

Weatherall DJ. The new genetics and clinical practice. 3rd edit. Oxford University Press, 1991.

Weide R, Parviz B, Pfluger KH, Havamann K. Altered expression of the human retinoblastoma gene in monocytic leukemias. *British J Haem* 1993;83:428-432.

Weinberg RA. Finding the anti-oncogenes. *Scientific American* 1988; 259: 44-52.

Weinberg RA. Oncogenes, anti-oncogenes and the molecular basis of multistep carcinogenesis. *Cancer Res* 1989; 49: 3713-3721.

Weissman BE, Saxon PJ, Pasquale SR, Jones GR, Geiser AG, Stanbridge EJ. Introduction of a normal human chromosome 11 into a Wilms' tumor cell line controls its tumorigenic expression. *Science* 1987;236:175-180.

Whyte P, Buchkovich KJ, Horowitz JM, Friend SH, Raybuck M, Weinberg RA, Harlow E. Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* 1988;334:124-129.

Wiedemann HR. Tumors and hemihypertrophy associated with Wiedemann-Beckwith syndrome. *Eur J Pediatr* 1983; 141: 129-135.

Wiemels JL, Cazzaniga G, Daniotti M. Prenatal origin of acute lymphoblastic leukemia in children. *Lancet* 1999; 354: 1499-1503.

Xiong Y, Hannon GJ, Zahng H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature (Lond.)* 1993; 366:701-704.

Yandell DW, Se D, Campbell TA. Oncogenic point mutation in the human retinoblastoma gene : their amplification to genetic counseling. *N Engl J Med* 1989;321:1689-1695.

Yasui W, Kudo Y, Semba S, Yokozaki H, Tahara E. Reduced expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 is associated with advanced stage and invasiveness of gastric carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 1997; 88:625629.

Yokozava T, Towatari M, Lida I, Takeyama K, Tanimoto M, Kiyoi H, Motoji T, Asou N, Saito K, Takeuchi M, Kobayashi Y, Miyawaki S, Kodera Y, Ohno R, Saito H, Naoe T. Prognostic significance of the cell cycle inhibitor p27 in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2000;14:28-33.

Yunis J and Ramsay N. Retinoblastoma and subband deletion of chromosome 13. *Am J Dis Child* 1978;132 :161-163.

Zandecki M, Facon T, Preudhomme C, Vanrumbeke, Vachee A, Quesnel B, Lai JL, Cosson A, Fenaux P. The Retinoblastoma Gene (RB1) Status in Multiple Myeloma: A Report on 35 Cases. *Leuk Lymph* 1995;18: 497-503