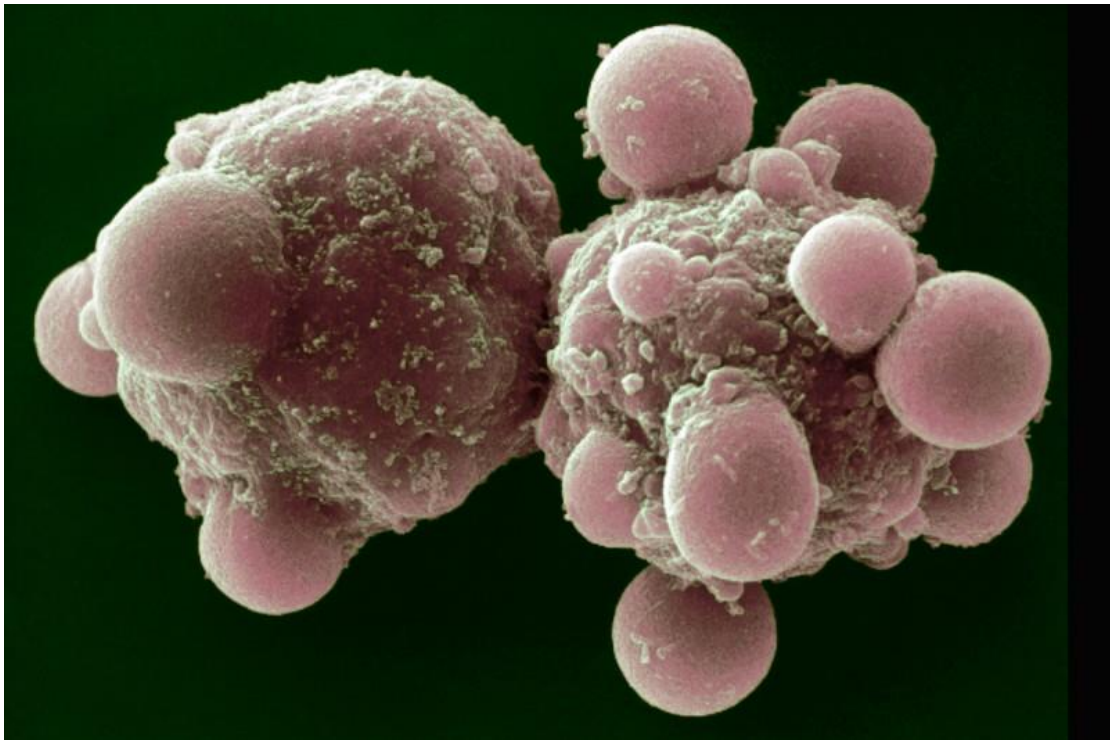


**Μελέτη της μεθυλίωσης του DNA γονιδίων σχετιζόμενων με
την απόπτωση σε λευχαιμικούς βλάστες ασθενών με
Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία.**



Ανδρέας Κάτσενος

Στο δάσκαλό μου Βαγγέλη.

Περίληψη

Η απόπτωση αποτελεί την κυριότερη μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου στους πολυκύτταρους οργανισμούς. Παίζει σημαντικό ρόλο στην φυσιολογική ανάπτυξη και ομοιόσταση των ιστών αλλά και στην ανοσία. Διαταραχή της, μπορεί να οδηγήσει σε παθολογικές καταστάσεις συμπεριλαμβανομένων των αυτοάνοσων νοσημάτων και του καρκίνου. Επίσης σχετίζεται με μολυσματικές αλλά και νευροεκφυλιστικές διαταραχές ¹.

Η μοριακά προγραμματισμένη αυτή μορφή κυτταρικού θανάτου απαιτείται, ώστε να απομακρυνθούν από τον οργανισμό μολυσμένα, κατεστραμμένα ή ανεπιθύμητα κύτταρα ².

Η ενεργοποίησή της μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε μέσω τα εμπλοκής των υποδοχέων θανάτου οι οποίοι ανήκουν στην οικογένεια των παραγόντων νέκρωσης του όγκου (Tumor Necrosis Factor) οι οποίοι βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων (εξωκυττάριο μονοπάτι), είτε μέσω του ενδοκυττάριου μονοπατιού, όπου ποικίλα ενδοκυττάρια σήματα, επιδρούν στην πρωτεΐνη BCL-2 η οποία ελέγχει τη διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου. Και τα δύο μονοπάτια οδηγούν στην καταστροφή του κυττάρου, επιτελούμενη από πρωτεάσες που ονομάζονται κασπάσες ².

Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί τα τελευταία χρόνια, έχουν δείξει ότι τα λευχαιμικά κύτταρα, παρουσιάζουν σχεδόν καθολικά, ανωμαλίες στο ένα ή και στα δύο αποπτωτικά μονοπάτια, προσδίδοντας σε αυτά το πλεονέκτημα της επιβίωσης σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα, καθώς ανθίστανται στην απόπτωση ³.

Οι επιγενετικές αλλαγές φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην αιτιολογία των νεοπλασιών. Οι αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA στους εκκινητές των γονιδίων επιδρούν στην έκφραση των γονιδίων αυτών. Στοιχεία της βιβλιογραφίας δείχνουν ότι η μεθυλίωση επηρεάζει τα γονίδια που σχετίζονται με την απόπτωση, δίνοντας στα καρκινικά κύτταρα τη δυνατότητα να ανθίσταντε σε αυτή ⁴.

1. Εισαγωγή

1.1 Καρκίνος

Εν αντιθέσει προς τη φυσική ή τα μαθηματικά, η βιολογία είναι ίσως η μόνη θετική επιστήμη η οποία δεν «αγαπά» τα δόγματα και τις οικουμενικές αλήθειες. Φυσικά αυτό δεν είναι τυχαίο: η μεταβλητή ρευστότητα του φαινομένου της ζωής που ρυθμίζεται από πολλές άγνωστες παραμέτρους, είναι τέτοια που έχει υπαγορεύσει στους βιολόγους τη στάση τους απέναντι σε αυτή. Παρ' όλα αυτά, για δεκαετίες οι φοιτητές βιολογίας διδάσκονταν το κεντρικό, δόγμα της επιστήμης τους. Σύμφωνα με αυτό, η ροή της πληροφορίας μέσα στο κύτταρο έχει την εξής κατεύθυνση: από το DNA, περνά στο RNA και από εκεί στις πρωτεΐνες. Με άλλα λόγια, τα γονίδια τα οποία είναι κομμάτια DNA, περιέχουν την πληροφορία για τη δημιουργία των πρωτεϊνών την οποία μεταβιβάζουν μέσω του RNA (και ειδικότερα στο mRNA). Τα μόρια αυτά συμμετέχουν σε πολλές διαδικασίες είτε φυσιολογικές είτε μη φυσιολογικές. Μια τέτοια μη φυσιολογική διαδικασία αποτελεί ο καρκίνος ⁵.

Περίπου ο ένας στους πέντε άνδρες και γυναίκες παγκοσμίως θα εμφανίσει κάποιον καρκίνο στη διάρκεια της ζωής του, ενώ ο ένας στους οκτώ άνδρες και η μία στις 11 γυναίκες θα πεθάνουν από αυτόν. Ο καρκίνος παραμένει βασική αιτία θανάτου σε κάθε χώρα του κόσμου, ενώ για πρώτη φορά ο καρκίνος του μαστού είναι πια η συχνότερα διαγνωσμένη μορφή της νόσου, «εκθρονίζοντας» τον καρκίνο των πνευμόνων, ο οποίος, πάντως, παραμένει η αιτία των περισσότερων θανάτων.

Αυτά προκύπτουν από την «Παγκόσμια Στατιστική Καρκίνου 2020», που έδωσαν στη δημοσιότητα από κοινού η Διεθνής Υπηρεσία Έρευνας για τον Καρκίνο (IARC) και η Αμερικανική Εταιρεία Καρκίνου, με αφορμή τη σημερινή Παγκόσμια Ημέρα κατά του Καρκίνου.

Το 2020 διαγνώστηκαν 19,3 εκατομμύρια νέα περιστατικά καρκίνου διεθνώς και υπήρξαν σχεδόν δέκα εκατομμύρια θάνατοι. Πρώτος σε αριθμό νέων διαγνώσεων κατά το προηγούμενο έτος ήταν ο καρκίνος του μαστού με περίπου 2,3 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις (ποσοστό 11,7% των συνολικών καρκίνων) και ακολούθησαν ο καρκίνος των πνευμόνων (11,4%), του παχέος εντέρου (10%), του προστάτη (7,3%) και του στομάχου (5,6%).

Ο καρκίνος των πνευμόνων παραμένει η Νο 1 αιτία θανάτου από καρκίνο, με περίπου 1,8 εκατομμύρια θύματα πέφυσι ή ποσοστό 18% των συνολικών θανάτων από καρκίνο. Ακολουθούν σε θανάτους ο καρκίνος του εντέρου (9,4%), του ήπατος (8,3%), του στομάχου (7,7%) και του μαστού (6,9%). Περίπου τα δύο τρίτα των θανάτων από καρκίνο των πνευμόνων σχετίζονται με το κάπνισμα, συνεπώς θα μπορούσαν να αποφευχθούν σε μεγάλο βαθμό ⁶.

Η προέλευση της λέξης Καρκίνος, αποδίδεται στον Έλληνα ιατρό Ιπποκράτη, που έμεινε στην ιστορία ως «πατέρας της ιατρικής» ⁷.

Ο όρος «καρκίνος» δεν αποδίδεται σε μία και μόνη ασθένεια, αλλά σε μια ομάδα ασθενειών που χαρακτηρίζονται από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα στο σώμα μας, τα οποία αυξάνονται, διαιρούνται και πεθαίνουν με έναν αυστηρά ελεγχόμενο τρόπο, τα καρκινικά κύτταρα διαφέρουν διότι συνεχίζουν να διαιρούνται ανεξέλεγκτα. Ο καρκίνος είναι πρακτικά η αποτυχία ρύθμισης της ανάπτυξης ενός ιστού. Για να μετατραπεί ένα φυσιολογικό κύτταρο σε καρκινικό πρέπει να λάβουν χώρα μία ή περισσότερες μεταλλάξεις σε γονίδια. Τα γονίδια αυτά χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, στα ογκογονίδια, που προωθούν την ανάπτυξη του ιστού, και στα ογκοκατασταλτικά γονίδια, που είναι υπεύθυνα για τη διακοπή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Συνήθως για την εμφάνιση ενός καρκίνου απαιτούνται μεταλλάξεις σε πολλά γονίδια. Οι μεταλλάξεις αυτές μπορεί να οφείλονται σε λάθη που συμβαίνουν κατά τη μίτωση, όπως η απώλεια ή ο διπλασιασμός της περιοχής ενός χρωμοσώματος. Επίσης, μια άλλη πιθανή χρωμοσωμική ανωμαλία είναι η μετάθεση, όταν δυο χρωμοσώματα συντήκονται (δημιουργία χρωμοσώματος Philadelphia στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία, t(9;22)(q34;q11)) καθώς και απορύθμιση του μηχανισμού της απόπτωσης. Διάφοροι ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν τις παραπάνω λειτουργίες προκαλώντας τα ανάλογα αποτελέσματα.

Ο εμπλουτισμός των γνώσεών μας γύρω από τη ρύθμιση και την απορύθμιση της εν λόγω ισορροπίας, θα μας επιτρέψει να αναπτύξουμε νέες προγνωστικές, διαγνωστικές και θεραπευτικές προσεγγίσεις και να βελτιώσουμε τις παλαιότερες, με στόχο την αντιμετώπιση της νόσου ^{8,9}

1.2 Λευχαιμία

Η Λευχαιμία ετυμολογικά φαίνεται να προέρχεται από τις Ελληνικές λέξεις λευκός και αίμα. Αυτό ήρθε να επιβεβαιωθεί περί το 1839 από τον Γάλλο βακτηριολόγο Άλφρεντ Φρανσουά Ντονέ, ο οποίος παρατηρώντας στο μικροσκόπιο το δείγμα αίματος μίας σαραντατετράχρονης γυναίκας, ανέφερε ότι η περίσσεια των λευκών αιμοσφαιρίων που έβλεπε έμοιαζε με ύλη, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι επρόκειτο για μία νέα ασθένεια την οποία με βάση τα ευρήματα και τη μικροσκοπική παρατήρηση, χαρακτήρισε ως ``Λευχαιμία``¹⁰. Ως λευχαιμία λοιπόν, ορίζουμε μία ομάδα νεοπλασιών του αίματος που χαρακτηρίζεται από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων τα οποία σχετίζονται με την παραγωγή κυττάρων του αίματος. Γενικά, οι ανθρώπινες λευχαιμίες, πιστεύεται ότι παρουσιάζουν κλωνικό χαρακτήρα, επηρεάζοντας ένα μόνο βλαστικό κύτταρο και το οποίο στη συνέχεια πολλαπλασιάζεται ανεξέλεγκτα, αντικαθιστώντας τα φυσιολογικά αιμοποιητικά κύτταρα στο μυελό των οστών¹¹. Εναλλακτικά, αναφέρεται ως το σύνολο των ασθενειών που επηρεάζουν το αίμα, το μυελό των οστών και το λεμφικό σύστημα¹².

- **Οξεία μυελογενής λευχαιμία**

Η Οξεία μυελογενής λευχαιμία (ΟΜΛ), είναι ένας τύπος καρκίνου των κυττάρων της λευκής σειράς, που χαρακτηρίζεται από ραγδαία ανάπτυξη νεοπλασματικών βλαστών που συσσωρεύονται στο μυελό των οστών και εμποδίζουν την φυσιολογική αιμοποίηση. Επιπλέον κύρια χαρακτηριστικά της αποτελούν η διήθηση του μυελού των οστών, τού αίματος αλλά και άλλων ιστών, από πολλαπλασιαστικά, κλωνικά μη διαφοροποιημένα ή και κακώς διαφοροποιημένα αιμοποιητικά κύτταρα¹².

Η ΟΜΛ είναι η πιο κοινή οξεία λευχαιμία που προσβάλλει ενήλικες, και η συχνότητά της αυξάνεται με την ηλικία. Παρόλο που η ΟΜΛ είναι σχετικά σπάνια ασθένεια, υπεύθυνη περίπου για το 1.2% θανάτων στις ΗΠΑ, η συχνότητα εμφάνισής της αυξάνεται με την αύξηση της ηλικίας του πληθυσμού. Όπως και στην οξεία λεμφογενή λευχαιμία, η ΟΜΛ εξελίσσεται ραγδαία και τυπικά είναι θανατηφόρος μέσα σε διάστημα λίγων βδομάδων ή μηνών, αν δεν αντιμετωπιστεί. Το 2021

υπολογίζεται ότι θα υπάρξουν 61090 νέες περιπτώσεις διάγνωσης ΟΜΛ στις Η.Π.Α με τις 23660 από αυτές να είναι θανατηφόρες ^{13,14}.

Παρότι η συγκεκριμένη ασθένεια θεωρούνταν ανίατη πριν από περίπου 50 χρόνια, σήμερα θεωρείται ιάσιμη στο 35 με 40% των ασθενών ηλικίας 60 ετών και κάτω, ενώ στους μεγαλύτερης ηλικίας ασθενείς (άνω των 60 ετών) σε ποσοστό 5 με 15% περίπου. Τέλος σε ασθενείς οι οποίοι δεν μπορούν να λάβουν χημειοθεραπεία η μέση επιβίωση φτάνει έως τους 10 μήνες ¹⁵.

Ενώ η κυτταρογενετική ετερογένεια της ασθένειας έχει αναγνωριστεί εδώ και περίπου 30 χρόνια, η τεράστια μοριακή ετερογένεια είναι όλο και πιο εμφανείς τα τελευταία 15 χρόνια.

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας η ΟΜΛ έχει πολλούς υποτύπους, στους οποίους η θεραπεία και η πρόγνωση διαφέρουν ¹⁶.

Πίνακας 1: Οι κυριότεροι τύποι ΟΜΛ σύμφωνα με τον ΠΟΥ

Ονομασία	Περιγραφή
ΟΜΛ με χαρακτηριστικές γενετικές ανωμαλίες	• ΟΜΛ με μετάθεση μεταξύ των χρωμοσωμάτων 8 και 21[t(8;21)] • ΟΜΛ με αναστροφή στο χρωμόσωμα 16 [inv(16)] • ΟΜΛ με μετάθεση των χρωμοσωμάτων 15 και 17 [t(15;17)]
ΟΜΛ με μυελοδυσπλαστικές αλλαγές	Αυτή η κατηγορία περιλαμβάνει ασθενείς που είχαν μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο (ΜΔΣ) ή μυελοϋπερπλαστική νόσο που εξελίχθηκε σε ΟΜΛ. Η κατηγορία αυτή παρουσιάζεται συνηθέστερα σε ηλικιωμένους ασθενείς και έχει συνήθως χειρότερη πρόγνωση.
ΟΜΛ θεραπειοσυσχετιζόμενη	Περιλαμβάνει ασθενείς που είχαν προηγούμενη χημειοθεραπεία είτε/και ακτινοθεραπεία και κατόπιν ανέπτυξαν

	ΟΜΛ ή ΜΔΣ. Χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένες χρωμοσωμικές ανωμαλίες και συχνά έχουν κακή πρόγνωση.
ΟΜΛ χωρίς ιδιαίτερα κριτήρια	Περιλαμβάνει όλους τους τύπους ΟΜΛ που δεν συμπεριλαμβάνονται στις παραπάνω κατηγορίες.

1.3 Απόπτωση

Κατά τη διάρκεια της ζωής των πολυκύτταρων οργανισμών, παρατηρείται ισορροπία ανάμεσα στον κυτταρικό θάνατο και την κυτταρική ανανέωση. Στην πολύπλοκη διαδικασία της ανάπτυξης δεν εμπλέκονται μονάχα ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση αλλά και ο κυτταρικός θάνατος. Αν και ο κυτταρικός θάνατος μπορεί να προκληθεί από τυχαίους τραυματισμούς ή από την έκθεση σε τοξικές χημικές ουσίες, οι περισσότεροι κυτταρικοί θάνατοι στους πολυκύτταρους οργανισμούς συμβαίνουν μέσω μιας διαδικασίας αποπτωτικού, μοριακά ελεγχόμενου (προγραμματισμένου) κυτταρικού θανάτου. Η διαδικασία αυτή είναι μεγάλης σημασίας τόσο για την εμβρυϊκή ανάπτυξη όσο και για τη διατήρηση της ομοιοστασίας των ιστών των ενήλικων οργανισμών ¹⁷.

Στους ενήλικους οργανισμούς, ο κυτταρικός θάνατος πρέπει να εξισορροπείται από την κυτταρική ανανέωση. Διάφορες ασθένειες συνδέονται με ανωμαλίες του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται ο καρκίνος, τα αυτοάνοσα νοσήματα και οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως οι νόσοι του Parkinson και του Alzheimer ¹.

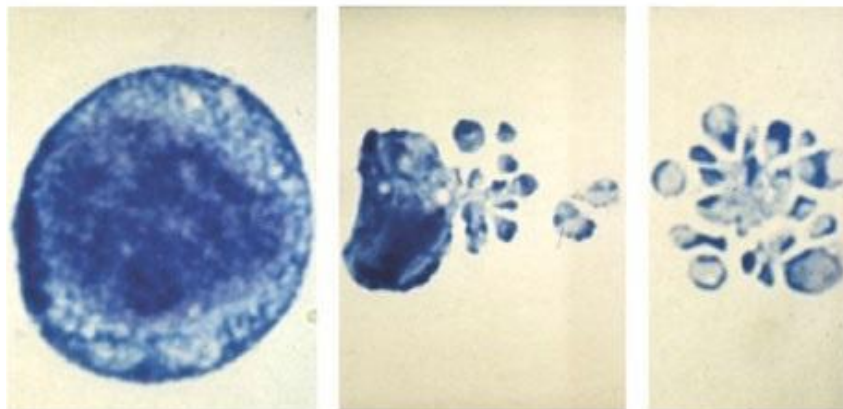
Για κάθε κύτταρο υπάρχει η ζωή αλλά και ο θάνατος. Υπάρχουν δύο δρόμοι μέσω των οποίων ένα κύτταρο οδηγείται στο θάνατο α) ο δρόμος του βίαιου θανάτου, όπως επί παραδείγματι ο τραυματισμός, η μόλυνση, η έκθεση σε χημικές τοξικές ουσίες και είναι γνωστός ως νέκρωση και β) μέσω των οδών επαγωγής των μηχανισμών αυτοκαταστροφής που είναι γνωστοί ως προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος.

Σε αντίθεση με τον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από τυχαία γεγονότα, όπως είναι ο οξύς τραυματισμός που οδηγεί στη νέκρωση ιστών (necrosis), ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος είναι μια ενεργή διαδικασία, η οποία συνήθως

εξελίσσεται με μία χαρακτηριστική σειρά κυτταρικών μεταβολών που είναι γνωστή ως απόπτωση και περιγράφηκε αρχικά το 1972 ¹⁸.

Τα κύτταρα που πεθαίνουν από απόπτωση υφίστανται τις ακόλουθες χαρακτηριστικές αλλαγές:

- Χάνουν την επαφή τους με τα γειτονικά κύτταρα και φαίνεται να συρρικνώνονται σε σχέση με τα υπόλοιπα κύτταρα του ιστού.
- Η χρωματίνη αποικοδομείται και συσπειρώνεται.
- Ο πυρήνας κομματιάζεται σε διακριτά σωμάτια (καρυόρηξη)
- Το DNA κομματιάζεται από ειδικές ενδονουκλεάσες.
- Αναπτύσσουν φυσαλίδες στην επιφάνειά τους.
- Η πυρηνική μεμβράνη αποδιοργανώνεται λόγω της πρωτεόλυσης των λαμινών.
- Η φωσφατιδυλοσερίνη που κανονικά βρίσκεται στην εσωτερική λιπιδική στοιβάδα της πλασματικής μεμβράνης του κυττάρου, μεταναστεύει στην εξωτερική λιπιδική στοιβάδα όπου και δεσμεύεται με υποδοχείς των μακροφάγων, με αποτέλεσμα την ενσωμάτωσή τους (κυτταροφαγία) από τα μακροφάγα.
- Τα μιτοχόνδρια καταστρέφονται και ελευθερώνεται το κυττόχρωμα C.
- Τα φαγοκύτταρα εκκρίνουν κυτταροκίνες που αναστέλλουν τη φλεγμονή.
- Το κύτταρο διασπάται σε κομμάτια που περιβάλλονται από μεμβράνη, τα αποπτωτικά σωμάτια. Τα αποπτωτικά σωμάτια περιλαμβάνουν τμήματα του πυρήνα και των οργανιδίων και προσλαμβάνονται με κυτταροφαγία από τα γειτονικά κύτταρα και τα μακροφάγα, και καταλήγουν στα λυοσώματά τους. Έτσι δεν απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους ώστε να προκαλέσουν απόκριση φλεγμονής, όπως τα νεκρωτικά κύτταρα και να βλάψουν πιθανώς τα παρακείμενα κύτταρα ¹⁹.



Εικόνα 1: Αποπτωτικό κύτταρο.

1.3.1 Πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην απόπτωση

Αρκετές μεμβρανικές και κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες συμμετέχουν στη διεργασία της απόπτωσης. Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες είναι προφανώς υποδοχείς και σκοπό έχουν τη μεταγωγή των εξωτερικών ερεθισμάτων στο εσωτερικό του κυττάρου. Οι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες από την άλλη μεριά, σκοπό έχουν τη συνέχιση και ολοκλήρωση της διεργασίας της απόπτωσης. Οι κυριότερες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην απόπτωση είναι οι εξής:

- **Κασπάσες - πρωτεΐνες εκτελεστές της απόπτωσης**
- **Υποδοχείς θανάτου και προσδέτες**
- **Πρωτεΐνες ρυθμιστές της απόπτωσης**
- **Οικογένεια Bcl-2:** Μερικά μέλη της οικογένειας (Bcl-2, Bcl-XL), εμποδίζουν την απόπτωση μη επιτρέποντας την απελευθέρωση του κυττοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια και επομένως την ενεργοποίηση των κασπασών. Γι' αυτό και ονομάζονται αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες. Άλλα μέλη (Bax, Bak, Bad, Bid κλπ) πάλι, επάγουν την ενεργοποίηση των κασπασών και επομένως την απόπτωση, γι' αυτό και ονομάζονται προαποπτωτικές πρωτεΐνες.

- **Οικογένεια IAP:** Οι πρωτεΐνες αυτές δεσμεύονται στις προκασπάσες και στις κασπάσες παρεμποδίζοντας την ενεργοποίησή τους και κατά συνέπεια την απόπτωση.

Οι περισσότερες από τις πρωτεΐνες που προαναφέρθηκαν, φέρουν στην πρωτοταγή δομή τους περιοχές που σκοπό έχουν την αλληλεπίδραση όλων εκείνων των πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για την έναρξη και ολοκλήρωση της απόπτωσης. Για παράδειγμα τα μέλη της οικογένειας Bcl-2, έχουν συντηρημένες περιοχές (BH περιοχή) που δεσμεύουν άλλες πρωτεΐνες της ίδιας οικογένειας ²⁰.

Πολλές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στα μονοπάτια μεταγωγής μηνυμάτων κυτταρικού θανάτου, έχουν περιοχές θανάτου (death domain DD), όπως οι υποδοχείς θανάτου Fas και διάφορα μόρια- συνδετήρες, όπως FADD, που συνδέονται με άλλες πρωτεΐνες της διεργασίας της απόπτωσης, όπως π.χ με τις προκασπάσες ^{21,22}.

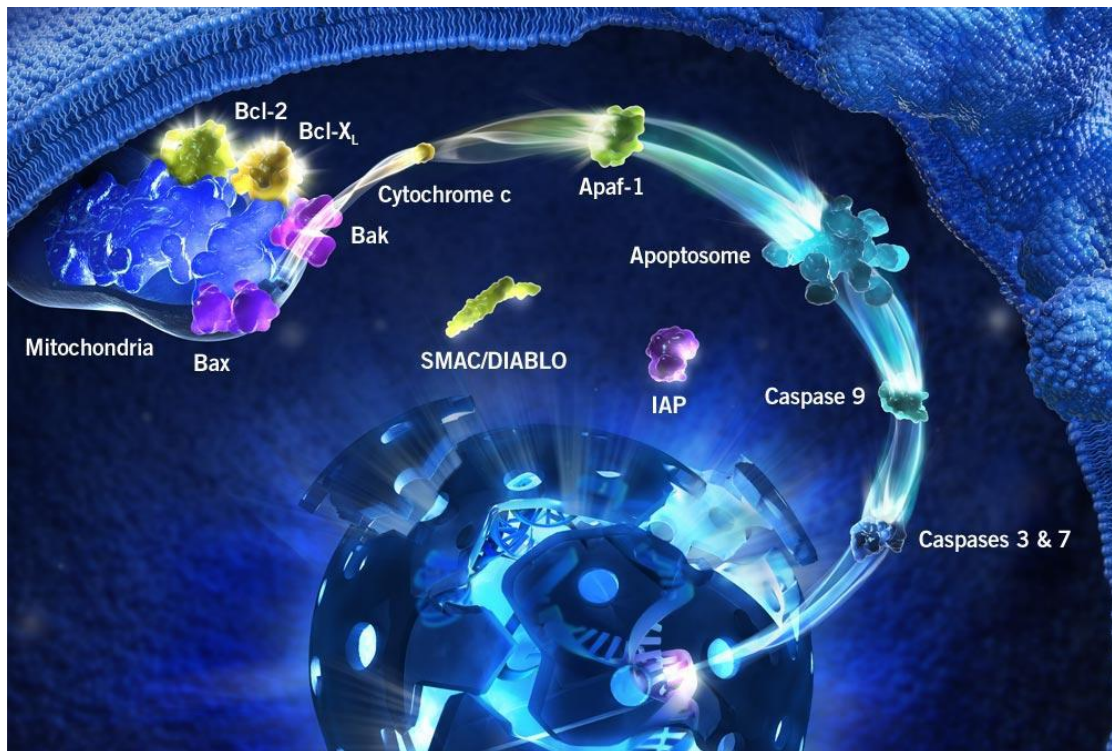
1.4.2 Μηχανισμοί απόπτωσης

Η μοριακή βάση της απόπτωσης μελετήθηκε αρχικά στο νηματώδη σκώληκα *Caenorhabditis elegans*. Κατά την ανάπτυξη του σκώληκα παράγονται 1090 κύτταρα από τα οποία 131 σωματικά κύτταρα εξαλείφονται με τη διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Διαπιστώθηκε ότι τρία γονίδια είναι υπεύθυνα για την απόπτωση. Δύο από αυτά, τα Ced-3 και Ced-4, είναι απαραίτητα για τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, ενώ το τρίτο γονίδιο, το Ced-9, λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής της απόπτωσης. Μετά από λίγο χρονικό διάστημα ανακαλύφθηκε και η ομόλογη προς την Ced-3 οικογένεια γονιδίων στα θηλαστικά, που κωδικοποιούν τις λεγόμενες κασπάσες ²³.

Μέχρι στιγμής έχουν τεκμηριωθεί δυο μηχανισμοί μέσω των οποίων ένα κύτταρο μεταπίπτει σε αποπτωτικό: **α)** ο πρώτος, σηματοδοτείται από μηνύματα που προέρχονται από το εσωτερικό του κυττάρου και **β)** ο δεύτερος σηματοδοτείται από τους ενεργοποιητές θανάτου που δεσμεύονται σε ειδικούς υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας, όπως ο TNF-α, η λεμφοτοξίνη και ο Fas. Το μιτοχονδριακό μονοπάτι και το μονοπάτι των υποδοχέων θανάτου έχουν κοινό χαρακτηριστικό την ενεργοποίηση των κασπασών. Οι κασπάσες υδrolύουν όλα τα δομικά και λειτουργικά στοιχεία του κυττάρου.

- **Ενδογενή μηνύματα. Το μιτοχονδριακό μονοπάτι.**

Τα μιτοχόνδρια είναι οι κύριοι συντελεστές του εσωτερικού μονοπατιού κυτταρικού αποπτωτικού θανάτου. Στα φυσιολογικά κύτταρα η πρωτεΐνη Bcl-2 παρεμποδίζει την εκροή του κυττοχρώματος C που στην συνέχεια ενεργοποιεί τον καταρράκτη των κασπασών που καταλήγει στην ενεργοποίηση της εκτελεστικής κασπάσης 3 που επιφέρει σχάσεις πρωτεϊνών και DNA με τελικό αποτέλεσμα την απόπτωση.



Εικόνα 2: Το ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης

- **Εξωτερικά μηνύματα. Το μονοπάτι των υποδοχών θανάτου.**

Τα κύτταρα εκφράζουν τουλάχιστον έξι διαφορετικά μόρια στην επιφάνειά τους, που λειτουργούν ως υποδοχείς θανάτου. Οι υποδοχείς αυτοί δεσμεύουν γενικά πρωτεΐνες που εκφράζονται στην επιφάνεια άλλων κυττάρων. Η αλληλεπίδρασή τους μπορεί να ενεργοποιήσει το μονοπάτι που οδηγεί στο θάνατο. Οι καλύτερα χαρακτηρισμένοι υποδοχείς θανάτου είναι ο TNFR και ο Fas, των κυττάρων-στόχων, που δεσμεύονται στους αντίστοιχους συνδέτες τους TNF α και FasL. Σημειώνεται ότι και ο Fas, είναι μέλος της οικογένειας των υποδοχών TNF. Η δέσμευση στους υποδοχείς των ενεργοποιητών θανάτου επάγει τη μεταγωγή ενός μηνύματος στο κυτταρόπλασμα,

μέσω μιας πρωτεΐνης σύνδεσης, γνωστή και ως FADD, που οδηγεί στην ενεργοποίηση των κασπασών 8 και 10. Η κασπάση 8 όπως και η κασπάση 10 ξεκινούν καταρράκτες αντιδράσεων που τελικά οδηγούν στην απόπτωση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα στην περίπτωση αυτή είναι τα κυτταροτοξικά T κύτταρα, τα οποία όταν αναγνωρίσουν και δεσμευτούν στο στόχο τους παράγουν περισσότερη FasL που δεσμεύεται στη μεμβρανική Fas και οδηγεί το κύτταρο-στόχο σε απόπτωση^{21,22,24}.

1.4.3 Οξεία μυελογενής λευχαιμία και απόπτωση

Μερικά κύτταρα μετασχηματισμένα από ορισμένους ιούς που σχετίζονται με τον καρκίνο, εμπλέκονται σε συγκεκριμένα μονοπάτια για να παρεμποδίσουν την απόπτωση, όπως οι ιοί *papilloma* που εμπλέκονται στην πρόκληση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Ένας από αυτούς παράγει την πρωτεΐνη E6, η οποία δεσμεύεται και απενεργοποιεί την p53 που επάγει την απόπτωση. Επίσης ο ιός *Epstein-Barr* έχει συχετισθεί σε ορισμένα λεμφώματα με αύξηση της έκφρασης της Bcl-2. Οι διεργασίες αυτές καθιστούν το κύτταρο ανθεκτικό στην απόπτωση, με αποτέλεσμα να συνεχίζει τον πολλαπλασιασμό του.

Αλλά και καρκινικά που παράγονται χωρίς τη συμμετοχή των ιών, καταφέρνουν με διάφορους τρόπους να αποφύγουν την απόπτωση όπως α) μερικά λευχαιμικά B κύτταρα και λεμφώματα εκφράζουν υψηλά επίπεδα της Bcl-2 που σχετίζεται με διαμετατόπιση του γονιδίου Bcl-2 σε περιοχή ρυθμιστική (enhancer) για την παραγωγή αντισωμάτων και β) τα κύτταρα του μελανώματος (καρκίνος του δέρματος) αποφεύγουν την απόπτωση αναστέλλοντας την έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί την Araf-1.

Σήμερα υπάρχουν αρκετές ενδείξεις που υποστηρίζουν την άποψη ότι τα παθολογικά κύτταρα στην οξεία μυελογενή λευχαιμία, δεν πολλαπλασιάζονται πιο γρήγορα από τα φυσιολογικά. Πράγματι, η διάρκεια του κύκλου των λευχαιμικών κυττάρων (βλάστες) είναι ανάλογη αυτής των φυσιολογικών. Στην περίπτωση των λεμφικών κακοηθειών, υπερέκφραση της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 λόγω χρωμοσωμικής μετάθεσης προκαλεί διαταραχή των μεταγραφικών παραγόντων και οδηγεί σε κακοήγη εξαλλαγή τα κύτταρα, μετατρέποντάς τα σε καρκινικά. Για άγνωστους μέχρι στιγμής λόγους, η μετατόπιση του Bcl-2 δεν είναι συχνή στην οξεία μυελογενή λευχαιμία. Ωστόσο,

φαίνεται ότι διαταραχή των φυσιολογικών αποπτωτικών μηχανισμών παίζει ρόλο στην εμφάνιση της νόσου. Έχει αναφερθεί για παράδειγμα, ότι η t(8:21) χιμαιρική πρωτεΐνη AML1-ETO ενεργοποιεί μεταγραφικά το γονίδιο Bcl-2 ^{25,26}.

Μια άλλη οικογένεια πρωτεϊνών, οι IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins), φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην επαγωγή της απόπτωσης. Το μικρότερο μέλος της οικογένειας αυτής, που ονομάζεται survivin έχει συγκεντρώσει το ενδιαφέρον των ερευνητών, για το λόγο ότι υπερεκφράζεται στα περισσότερα καρκινικά κύτταρα του ανθρώπου, αλλά δεν ανιχνεύεται σε τελικά διαφοροποιημένους φυσιολογικούς ιστούς ³.

Παρά τις σημαντικές εξελίξεις των τελευταίων ετών στην κατανόηση του γενετικού υπόβαθρου της ΟΜΛ, αλλά και των επιπτώσεων στη βιολογία της νόσου, η θεραπεία δεν έχει αλλάξει δραματικά τις τελευταίες τρεις δεκαετίες. Η αλλογενής μεταμόσχευση αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων αποτελεί ακόμη και σήμερα την καλύτερη εναλλακτική επιλογή για τους ασθενείς η οποία όμως μπορεί να επιτευχθεί μόνο σε μία ομάδα ασθενών. Επίσης, φάρμακα που στοχεύουν στην αποκατάσταση της απόπτωσης φαίνεται να έχουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα ²⁷. Έρευνες έχουν δείξει ότι η απόπτωση απορρυθμίζεται, αλλά τα σηματοδοτικά στοιχεία που εμπλέκονται φαίνεται να διαφέρουν από τον ένα τύπο όγκου στον άλλο. Για παράδειγμα το ογκοκατασταλτικό γονίδιο TP53, αποτελεί το συχνότερα μεταλλαγμένο γονίδιο σε συμπαγείς όγκους, ενώ η γονιδιωματική απενεργοποίησή του αποτελεί λιγότερο συχνή στις αιματολογικές κακοήθειες ²⁸. Οι αλλαγές στο γονίδιο αυτό, συναντώνται περίπου στο 9% των περιπτώσεων ΟΜΛ και σχετίζονται με ξεχωριστά γονιδιακά αλλά και βιολογικά χαρακτηριστικά, όπως η αυξημένη γονιδιακή αστάθεια ή οι αλλαγές στον καρύοτυπο, γεγονότα που οδηγούν σε κακή πρόγνωση για την εξέλιξη της νόσου ²⁹.

Η συχνότητα των μεταλλαγών που παρατηρείται στο προαναφερθέν γονίδιο σε φαίνεται να είναι χαμηλή στη de novo ΟΜΛ. Ωστόσο η λειτουργική απενεργοποίηση του p53 φαίνεται να αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για τον κυτταρικό μετασχηματισμό. Ο μετασχηματισμός φαίνεται να οφείλεται στην απορύσμιση των γονιδίων ρυθμιστών του p53 όπως για παράδειγμα στο MDM2 ο οποίος αποτελεί αναστολέα της μεταγραφής του TP53 ³⁰.

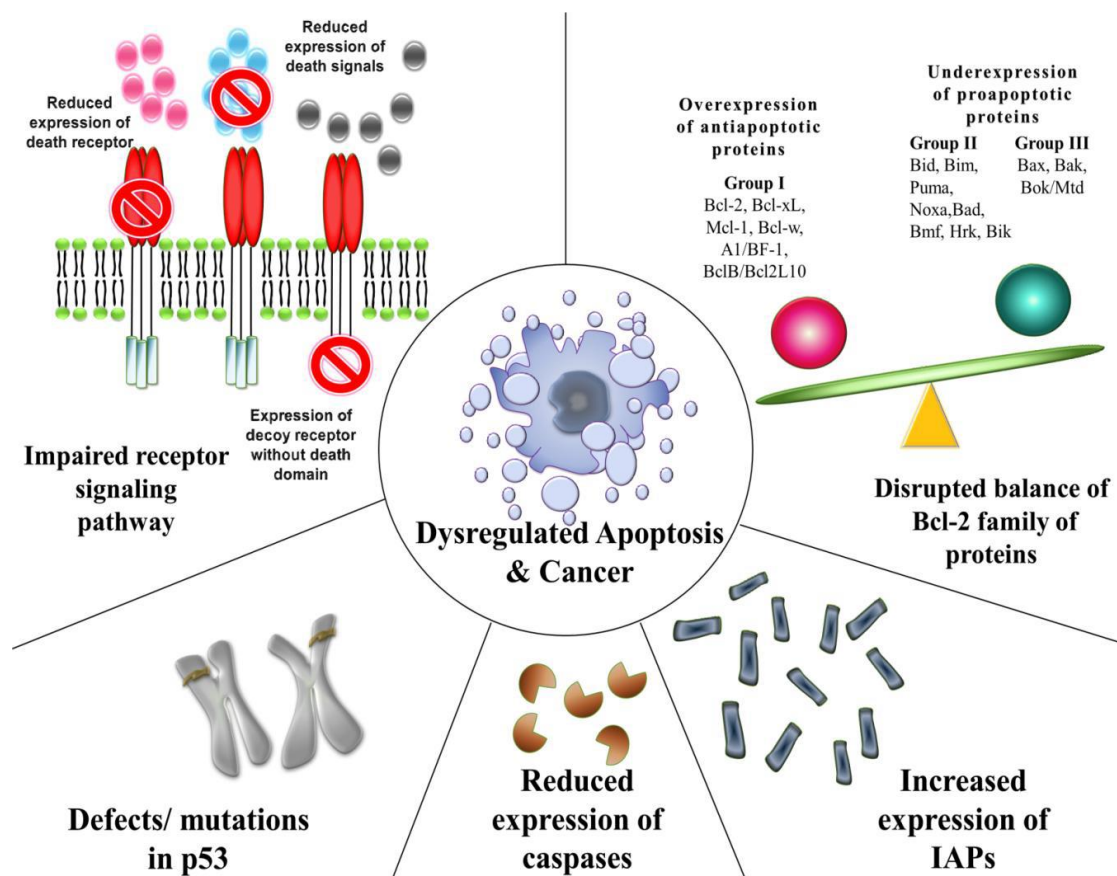
Οι πρωτεΐνες τελεστές, του ενδογενούς μονοπατιού της απόπτωσης φαίνεται να απορρυθμίζονται και αυτοί στην ΟΜΛ αλλά οι γονιδιακές αλλοιώσεις δείχνουν να είναι σπάνιες, γεγονός το οποίο μπορεί να εξηγείται μέσω της επιγενετικής ρύθμισης στην ΟΜΛ που ενδεχομένως να οδηγεί σε απορρύθμιση χωρίς γενετικές αλλοιώσεις.

Έτσι το BCL-2 αλλά και άλλα μέλη της οικογένειας, των πρωτεϊνών BCL-2 έχουν αναφερθεί ότι υπερεκφράζονται στην ΟΜΛ και συσχετίζονται με αντίσταση στη χημειοθεραπεία ³¹⁻³³.

Ο ρόλος του εξωκυττάριου μονοπατιού της απόπτωσης στην ΟΜΛ φαίνεται να είναι λιγότερο σαφής. Ούτε εδώ αναφέρονται επαναλαμβανόμενες γενετικές αλλοιώσεις αλλά τα παθολογικά κύτταρα (λευχαιμικοί βλάστες) χάνουν την έκφραση του FAS (υποδοχέας που οδηγεί στην απόπτωση) κατά τη διάρκεια του μετασχηματισμού από μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο σε ΟΜΛ, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι αυτό μπορεί να οφείλεται στη μεθυλίωση του υποκινητή του FAS, ο οποίος και αποτελεί φαρμακευτικό στόχο της δισεταβίνης η οποία αποτελεί απομεθυλιωτικό παράγοντα ^{34,35}.

Η στόχευση του μηχανισμού απόπτωσης είναι μια πολλά υποσχόμενη θεραπευτική προσέγγιση στο AML. Στις περισσότερες περιπτώσεις, ο στόχος είναι η εξάλειψη των λευχαιμικών κυττάρων με επανενεργοποίηση των οδών του κυτταρικού θανάτου, είτε με άμεση στόχευση αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών όπως εκείνων των οικογενειών Bcl-2 ή IAP, ή με την επανενεργοποίηση της απόκρισης p53.

Τα περισσότερα από τα μόρια που στοχεύουν τις αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες που εισήλθαν σε κλινικές δοκιμές κατέδειξαν την ανοχή τους, τουλάχιστον όταν δοκιμάστηκαν μόνοι τους, και σε ορισμένες περιπτώσεις όταν χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με κυταροτοξικά. Η πλήρης θεραπευτική δράση αυτών των μορίων πιθανότατα θα πραγματοποιηθεί καλύτερα μέσω συνδυασμού με άλλους, κυταροτοξικούς ή στοχευμένους, αντικαρκινικούς παράγοντες. Οι απομεθυλιωτικοί παράγοντες φαίνεται να αποτελούν αποτελεσματικούς παράγοντες καθώς επάγουν την έκφραση των υποδοχέων θανάτου στα λευχαιμικά κύτταρα ²⁷.



Εικόνα 3: Δυσλειτουργίες της απόπτωσης που οδηγούν στον καρκίνο

1.5 Επιγενετική- Μεθυλίωση- Καρκίνος

Η επιγενετική είναι η μελέτη των κληρονομικών αλλαγών στην γονιδιακή έκφραση (ενεργά έναντι αδρανών γονιδίων) που δεν συνεπάγονται αλλαγές στην υποκείμενη αλληλουχία DNA (παρατηρείται δηλαδή αλλαγή στον φαινότυπο χωρίς αλλαγή στον γονότυπο) η οποία με τη σειρά της επηρεάζει τον τρόπο με τον οποίο τα κύτταρα διαβάζουν τα γονίδια ³⁶. Οι επιγενετικές μεταβολές είναι ένα φυσιολογικό φαινόμενο, αλλά μπορεί επίσης να επηρεαστεί από διάφορους παράγοντες, όπως η ηλικία, το περιβάλλον / ο τρόπος ζωής και η ασθένεια. Οι επιγενετικές μεταβολές μπορούν να εκδηλωθούν τόσο συχνά όσο ο τρόπος με τον οποίο τα κύτταρα διαφοροποιούνται ώστε τελικά να καταλήγουν ως κύτταρα του δέρματος, κύτταρα ήπατος, εγκεφαλικά κύτταρα κλπ. Επιπλέον οι επιγενετικές μεταβολές μπορεί να είναι η βασική αιτία επιβλαβών επιδράσεων που δύναται να οδηγήσουν σε ασθένειες όπως ο καρκίνος ³⁶.

Αν και ο μηχανισμός λειτουργίας των επιγενετικών μεταβολών δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητός, τουλάχιστον τρία συστήματα που περιλαμβάνουν τη μεθυλίωση του DNA, την τροποποίηση της ιστόνης και τη μη κωδικοποίηση του RNA (ncRNA) που σχετίζεται με τη γονιδιακή σίγαση έχουν έως σήμερα θεωρηθεί οι τρεις βασικότεροι μηχανισμοί στους οποίους οφείλεται η πρόκληση των επιγενετικών μεταβολών. Νέες και συνεχιζόμενες έρευνες διαρκώς αποκαλύπτουν τον ρόλο των επιγενετικών μεταβολών σε μια ποικιλία ανθρώπινων διαταραχών και θανατηφόρων ασθενειών ³⁷.
(Νέες και συνεχιζόμενες έρευνες διαρκώς αποκαλύπτουν τον ρόλο των επιγενετικών μεταβολών σε μια ποικιλία ανθρώπινων διαταραχών και θανατηφόρων ασθενειών.)

Οι παρεκκλίνουσες επιγενετικές μεταβολές αποτελούν χαρακτηριστικό γνώρισμα σύνθετων πολυπαραγοντικών ασθενειών (συμπεριλαμβανομένων νεοπλασμάτων και κακοηθειών όπως λευχαιμιών, λεμφωμάτων, σαρκωμάτων και καρκίνου του μαστού, του πνεύμονα, του προστάτη, του ήπατος και του παχέος εντέρου). Οι μηχανισμοί επιγενετικών μεταβολών (μεθυλίωση του DNA, έκφραση mRNA και microRNA κ.λπ.) μπορούν να χρησιμεύσουν ως βιοδείκτες για τη διαστρωμάτωση του κινδύνου, την έγκαιρη ανίχνευση και την ταξινόμηση των ασθενειών, καθώς και στόχους για θεραπεία και χημειοπροφύλαξη ³⁸.

Το πεδίο της επιγενετικής αναπτύσσεται γρήγορα και μαζί με την κατανόηση ότι τόσο το περιβάλλον όσο και ο ατομικός τρόπος ζωής μπορούν επίσης να

αλληλεπιδράσουν άμεσα με το γονιδίωμα για να επηρεάσουν την επιγενετική αλλαγή. Αυτές οι αλλαγές μπορεί να αντικατοπτρίζονται σε διάφορα στάδια καθ' όλη τη διάρκεια ζωής ενός ατόμου και ακόμη και στις επόμενες γενιές. Για παράδειγμα, οι ανθρώπινες επιδημιολογικές μελέτες έχουν αποδείξει ότι οι προγεννητικοί και πρόωροι μεταγεννητικοί περιβαλλοντικοί παράγοντες επηρεάζουν τον κίνδυνο εμφάνισης διαφόρων χρόνιων ασθενειών και διαταραχών συμπεριφοράς στους ενήλικες ³⁹⁻⁴¹.

Η μεθυλίωση του DNA είναι μια από τις πιο ευρέως μελετημένες και καλά χαρακτηρισμένες επιγενετικές τροποποιήσεις που χρονολογούνται από τις μελέτες που έγιναν από τους Griffith και Mahler το 1969, οι οποίες υποδηλώνουν ότι η μεθυλίωση του DNA μπορεί να είναι σημαντική στη μακροπρόθεσμη λειτουργία της μνήμης.

Άλλες σημαντικές τροποποιήσεις περιλαμβάνουν την αναδιαμόρφωση χρωματίνης, τροποποιήσεις ιστόνης και μη κωδικοποιητικούς μηχανισμούς RNA. Το ανανεωμένο ενδιαφέρον στην επιγενετική οδήγησε σε νέα ευρήματα σχετικά με τη σχέση μεταξύ των επιγενετικών αλλαγών και μιας σειράς διαταραχών που περιλαμβάνουν διάφορους τύπους καρκίνου, διαταραχές που σχετίζονται με τη διανοητική καθυστέρηση, ανοσολογικές διαταραχές, νευροψυχιατρικές διαταραχές και παιδιατρικές διαταραχές ⁴²⁻⁴⁴.

Ο καρκίνος ήταν η πρώτη ανθρώπινη ασθένεια που συνδέθηκε με την επιγενετική. Μελέτες την δεκαετία του 1980 που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας πρωτεύοντες ιστούς ανθρώπινου όγκου, διαπίστωσαν ότι τα γονίδια των καρκινικών κυττάρων του ορθού ήταν ουσιαστικά υπομεθυλιωμένα σε σύγκριση με αυτά των φυσιολογικών ιστών.

Η υπομεθυλίωση του DNA μπορεί να ενεργοποιήσει τα ογκογονίδια και να ξεκινήσει την αστάθεια του χρωμοσώματος ενώ η υπερμεθυλίωση του DNA αρχίζει τη σίγαση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Μια συσσώρευση γενετικών και επιγενετικών σφαλμάτων μπορεί να μετασχηματίσει ένα φυσιολογικό κύτταρο σε ένα επεμβατικό ή μεταστατικό κύτταρο όγκου.

Επιπρόσθετα, τα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA μπορεί να προκαλέσουν μη φυσιολογική έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον καρκίνο. Τα γενικά πρότυπα τροποποίησης ιστόνης επίσης συσχετίζονται με καρκίνους όπως ο καρκίνος του προστάτη, του μαστού και του παγκρέατος. Στη συνέχεια, οι επιγενετικές αλλαγές μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για τη μοριακή διάγνωση του πρώιμου καρκίνου ⁴⁵.

Τα καλύτερα μελετημένα επιγενετικά γεγονότα που διαμορφώνουν το

επιγονιδίωμα ενός κυττάρου είναι η μεθυλίωση του DNA, οι τροποποιήσεις των ιστονών και το κύκλωμα ανατροφοδότησης και προώθησης των microRNA. Συνολικά, αυτές οι διαδικασίες επηρεάζουν τα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης και σταθερότητας μεταγραφής, επηρεάζουν την προσβασιμότητα του DNA και τη συμπύκνωση της χρωματίνης, ρυθμίζουν την ακεραιότητα και τη λειτουργία του γονιδιώματος και διατηρούν την υψηλή πυρηνική οργάνωση με τρόπο που καθορίζει την πιθανότητα ανάπτυξης παθολογίας στα κύτταρα ^{46,47}.

Η μεθυλίωση των κυτοσίνων αναφέρεται στη διαδικασία προσθήκης μιας μεθυλομάδας στη θέση 5' του δακτυλίου της κυτοσίνης και πρωταρχικά στοχεύει τα δινουκλεοτίδια της κυτοσίνης-γουανίνης (CpGs).

Η υπερμεθυλίωση των CpG νησίδων σε έναν υποκινητή συσχετίζεται συνήθως με την καταστολή της γονιδιακής έκφραση.

Η περιοχή μεθυλιωμένου υποκινητή έχει μειωμένη ικανότητα σύνδεσης μεταγραφικών παραγόντων και αυξημένη ικανότητα σύνδεσης μεθυλιωμένων πρωτεϊνών δέσμευσης DNA ακετυλοτρανσφεράσες και μεθυλοτρανσφεράσες ιστονών και συν- καταστολείς ⁴⁸⁻⁵¹.



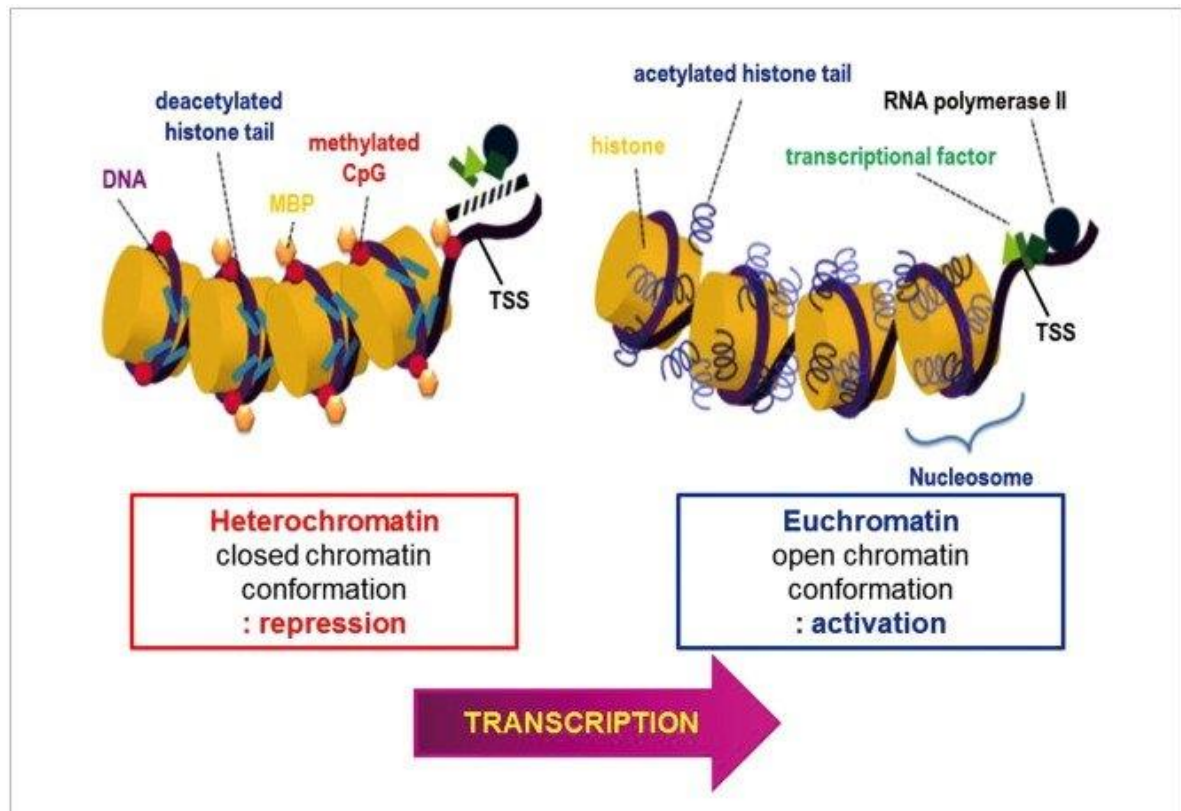
Εικόνα 4: Μεθυλίωση των κυτοσινών.

Η κατάσταση μεθυλίωσης συντηρείται ενεργά από τις δραστηριότητες των DNA μεθυλοτρανσφερασών (DNMTs), συμπεριλαμβανομένης της DNMT1, η οποία διευκολύνει την αντιγραφή του προτύπου μεθυλίωσης DNA μεταξύ γενεών κυττάρων, και DNMT3a και DNMT3b, οι οποίες μεσολαβούν στη de-novo μεθυλίωση.

Ο μηχανισμός που ευθύνεται για την απομεθυλίωση της κυτοσίνης παραμένει ασαφής και μπορεί εν μέρει να είναι αποτέλεσμα μειωμένης πρόσδεσης μεθυλιωμένων πρωτεϊνών δέσμευσης DNA στις ευπαθείς CpGs ή CpG νησίδες (πυκνό σύμπλεγμα CpGs). Έχει προταθεί ότι η απομεθυλίωση της κυτοσίνης συμπεριλαμβάνει τη σύνδεση της MBD2 ή της MBD4 με 5-μεθυλοκυτοσίνη (mC1) ⁵²⁻⁵⁵.

Οι ιστόνες είναι οι βασικότερες πρωτεΐνες που διευκολύνουν τη συσπείρωση του DNA σε νουκλεοσώματα, τα οποία αποτελούν τις βασικές μονάδες οργάνωσης της χρωματίνης. Συγκεκριμένα αμινοξέα στα αμινικά άκρα των ιστονών υποβάλλονται σε μοναδικές μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως ακετυλίωση, μεθυλίωση, φωσφορυλίωση, σουμοϋλίωση και ουβικουιτίνωση υπό την δράση ειδικών ενζύμων, όπως οι ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών (HATs1), οι δεακετυλάσες (HDAC), οι μεθυλοτρανσφεράσες και απομεθυλάσες. Αυτές οι τροποποιήσεις καθορίζουν αν το DNA τυλιγμένο γύρω από τις ιστόνες είναι διαθέσιμο για μεταγραφή και πόσο γρήγορα η μεταγραφή λαμβάνει χώρα. Εκτός από τη ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίου, η τροποποίηση της ιστόνης επηρεάζει άλλα συμβάντα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης που ελέγχουν την αντιγραφή, τον ανασυνδυασμό και την υψηλότερου επιπέδου οργάνωση των χρωμοσωμάτων ⁵⁶⁻⁵⁸.

Σε κυτταρικό επίπεδο, οι τροποποιήσεις ιστονών χρησιμεύουν για τη μετάδοση εξωκυτταρικών σημάτων σε γενωμικά συμβάντα μέσω αλλοιώσεων της δομής της χρωματίνης. Συνολικά, η τροποποίηση της ιστόνης συμβαδίζει με τη μεθυλίωση του DNA για να ρυθμίζει τις οξείες και επίμονες μεταβολές των μεταγραφικών προγραμμάτων μέσω της αναδιοργάνωσης της δομής της χρωματίνης ^{55,59,60}.



Εικόνα 5: Επίδραση της μεθυλίωσης στις ιστόνες.

1.6 Θεραπευτικές προσεγγίσεις στην ΟΜΛ.

Τα τελευταία χρόνια το θεραπευτικό οπλοστάσιο για την αντιμετώπιση της ΟΜΛ έχει επεκταθεί ταχύτατα, λόγω της καλύτερης κατανόησης του γενετικού υπόβαθρου της ασθένειας καθώς και των μηχανισμών αντίστασης στη θεραπεία. Ωστόσο η φαρμακευτική αντοχή παραμένει σημαντικό πρόβλημα το οποίο οι ερευνητές καλούνται να ξεπεράσουν ώστε να αντιμετωπιστεί το σύνολο των υποκλώνων της νόσου.

Η βασική και μεταφραστική έρευνα, τα τελευταία 10 με 15 χρόνια έχουν βελτιώσει σημαντικά την κατανόησή μας για την παθοβιολογία και τη γενετική ποικιλομορφία της ΟΜΛ. Αυτή η προσπάθεια οδήγησε στην ανακάλυψη αλλά και στην έγκριση από τον FDA πολλά υποσχόμενων θεραπειών για την ΟΜΛ ⁶¹.

Κατά τη δεκαετία του 1970 αναπτύχθηκε ένα θεραπευτικό σχήμα για τη θεραπεία της ασθένειας, το οποίο στηριζόταν στη χορήγηση κυταραβίνης και μίας

ανθρακυκλίνης⁶¹. Η θεραπεία αυτή χρησιμοποιείται ακόμη και σήμερα ως θεραπεία εφόδου στην ΟΜΛ. Το σχήμα χορήγησης είναι: συνεχόμενη χορήγηση της κυταραβίνης για 7 ημέρες και από την πρώτη μέχρι την τρίτη ημέρα χορήγηση μιας ανθρακυκλίνης η οποία μπορεί να είναι η δαουνορομπικίνη ή η ιδαρουβικίνη⁶².

Τα τελευταία χρόνια, έχουν αναπτυχθεί φάρμακα που στοχεύουν συγκεκριμένα σημεία των καρκινικών κυττάρων. Τα φάρμακα αυτά λοιπόν, λειτουργούν είτε διαφορετικά από την τυπική χημειοθεραπεία είτε υποβοηθώντας τη⁶¹.

Τέτοια φάρμακα είναι: **οι αναστολείς FLT3**. Σε ορισμένους ασθενείς παρουσιάζεται μετάλλαξη στο γονίδιο FLT-3 (fms-like tyrosine kinase 3) το οποίο είναι ένα γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί έναν υποδοχέα τυροσινικής κινάσης τάξης III, το οποίο παίζει ρόλο στην αιμοποίηση και ο οποίος σε παθολογικές καταστάσεις όπως η ΟΜΛ υπερεκφράζεται προοθώντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση και αναστέλοντας την διαφοροποίηση. Οι αναστολείς αυτοί δρουν πάνω στον υποδοχέα αυτόν, μπλοκάροντάς τον όπως και άλλες πρωτεΐνες των καρκινικών κυττάρων, αναστέλοντας την κυτταρική ανάπτυξη.

Αναστολείς IDH (isocitrate dehydrogenase): Τα IDH1 και IDH2 είναι ένζυμα τα οποία παίζουν ρόλο στον κύκλο του Krebs κατά την αποκαρβοξυλίωση του ισοκιτρικού σε α-κετογλουταρικό (α-KG). Οι μεταλλάξεις μεταβάλλουν τη λειτουργία των διμερών IDH, με αποτέλεσμα αυξημένες συγκεντρώσεις 2-υδροξυγλουταρικού, οι οποίες, με τη σειρά τους, παρεμβαίνουν στην επιγενετική ρύθμιση της αιμοποιητικής διαφοροποίησης μέσω ανταγωνιστικής αναστολής των εξαρτώμενων από α-KG ενζυματικών δραστηριοτήτων, σταματώντας την ωρίμανση των αιμοποιητικών κυττάρων κατά τον τρόπο που πρέπει. Οι αναστολείς αυτοί λοιπόν, οδηγούν τα λευχαιμικά κύτταρα σε σωστή διαφοροποίηση, γι' αυτό το λόγο αναφέρονται και ως παράγοντες διαφοροποίησης.

BCL-2 inhibitors: Η πρωτεΐνη BCL-2 κωδικοποιείται από το ομόνυμο γονίδιο, και αποτελεί την κωρονίδα των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών και η οποία βρίσκεται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Στην ΟΜΛ παρουσιάζει υπερέκφραση βοηθώντας στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων. Οι εκλεκτικοί αναστολείς της πρωτεΐνης αυτής φαίνεται να παρουσιάζουν προαποπτωτικές και αντινεοπλασματικές ιδιότητες προσθέτοντας ακόμη ένα όπλο στην φαρέτρα των γιατρών για την αντιμετώπιση της ασθένειας. Κατά τη χορήγηση, ο αναστολέας, συνδέεται και αναστέλλει τη δραστηριότητα του Bcl-2. Αυτό φαίνεται να αποκαθιστά τις αποπτωτικές διεργασίες στα καρκινικά κύτταρα.⁶¹

Headghog pathway inhibitors: Το μονοπάτι headgehog παίζει σημαντικό ρόλο στην οργανογένεση. Εσφαλμένη ενεργοποίηση του μονοπατιού μπορεί να προκαλέσει αναπτυξιακές ανωμαλίες και καρκίνο. Στην ΟΜΛ οι αναστολείς στοχεύουν πρωτεΐνες του μονοπατιού αυτού με στόχο τον περιορισμό της εξέλιξης της νόσου και την πρόληψη της υποτροπής μετά τη θεραπεία.⁶³

2. Σκοπός

Τα ερωτήματα που θέτει η παγκόσμια ερευνητική κοινότητα αλλά και οι ανάγκες για καινοτόμες θεραπείες για τις αιματολογικές νεοπλασίες, και πιο συγκεκριμένα για την ΟΜΛ, αποτελούν έμπνευση για τους εκάστοτε ερευνητές.

Για την αντιμετώπιση της ασθένειας χρησιμοποιούνται υπομεθυλιωτικοί παράγοντες από ετών στην ΟΜΛ και πρόσφατα γίνεται συνδυασμός με φάρμακα που δρουν μέσω της απόπτωσης.

Στην προκειμένη περίπτωση το ερευνητικό ερώτημα το οποίο μας απασχολεί είναι πώς τα γονίδια που σχετίζονται με την απόπτωση, μεθυλιώνονται, σε ποιο βαθμό αλλά και ποιο το συνολικό αποτέλεσμα της μεταμεταφραστικής αυτής διαδικασίας σε ένα μικρό δείγμα ασθενών πριν λάβουν θεραπεία, μελετώντας ταυτόχρονα τα ποσοστά μεθυλίωσης 22 σχετικών με την απόπτωση γονιδίων (προαποπτωτικά-αντιαποπτωτικά).

Απαραίτητη κρίνεται η συνέχιση της έρευνας, σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών, καθώς η παρούσα μελέτη αποτελεί ένα pilot study για επερχόμενες μελέτες, αλλά και τη συσχέτιση με άλλες κλινικές παραμέτρους, όπως το πώς επηρεάζεται η έκφραση των συγκεκριμένων γονιδίων μετά από τη θεραπεία των ασθενών.

3. Πειραματικό μέρος

Πραγματοποιήσαμε τις ακόλουθες πειραματικές μεθόδους σε μονοπύρρηνα κύτταρα μυελού των οστών ή περιφερικό αίμα (σε περιπτώσεις που η διήθηση ξεπερνά το 90%) ασθενών με ΟΜΛ της Αιματολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, οι οποίοι είχαν δώσει συγκατάθεση δωρεάς του βιολογικού υλικού στο Κέντρο Βιοτράπεζας Καρκίνου του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Τα δείγματα βρίσκονταν αποθηκευμένα σε υγρό άζωτο (-196°C), ενώ χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα, στα οποία προχωρήσαμε άμεσα στην επεξεργασία τους, αμέσως δηλαδή μετά τη λήψη του υλικού. Επεξεργαστήκαμε 8 δείγματα ασθενών με ΟΜΛ (σε πέντε ασθενείς η επιλογή CD34+ κυττάρων έγινε σε αποθηκευμένα μονοπύρρηνα κύτταρα σε υγρό άζωτο και σε τρεις η επιλογή έγινε σε μονοπύρρηνα που απομονώσαμε την ίδια μέρα). Για τους δύο υγιείς μάρτυρες η απομόνωση μονοπύρρηνων περιφερικού αίματος έγινε την ίδια μέρα.

Πίνακας 2: Πίνακας πληροφοριών ασθενών και controls.

Ασθενείς	Φύλο	Ηλικία διάγνωσης	Karyotype	Ιστός
Δ2	Άρρεν	51	47XY+8	Μ.Ο
Δ3	Θήλυ	83	46XY	Π.Α
Δ5	Άρρεν	67	46XY, t(3,12)(q26:p13)	Μ.Ο
Δ6	Άρρεν	38	46XY	Μ.Ο
Δ7	Άρρεν	79	47XY+21	Μ.Ο
Δ8	Άρρεν	83	46XY	Μ.Ο
Δ10	Θήλυ	31	46XX, inv(3)(q21q26), 46, idem, del(7)(q22)	Π.Α
Δ11	Θήλυ	55	46XY	Π.Α
Δ12	Θήλυ	72	46XY	Μ.Ο
Control 1	Θήλυ	38	-	Π.Α
Control 2	Άρρεν	24	-	Π.Α

Τα υλικά καθώς και οι διαδικασίες που ακολουθήθηκαν, θα διαχωριστούν σε τέσσερα μέρη: α) την απομόνωση, αποθήκευση καθώς και το ξεπάγωμα των μονοπύρηνων κυττάρων από το υγρό άζωτο, β) μαγνητικό διαχωρισμό CD34⁺ κυττάρων γ) την απομόνωση miRNA, large RNA, DNA και πρωτεϊνών, PCR arrays.

3.1 Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων (πρωτόκολλο φικόλης)

I) Εργαστηριακός εξοπλισμός- Υλικά

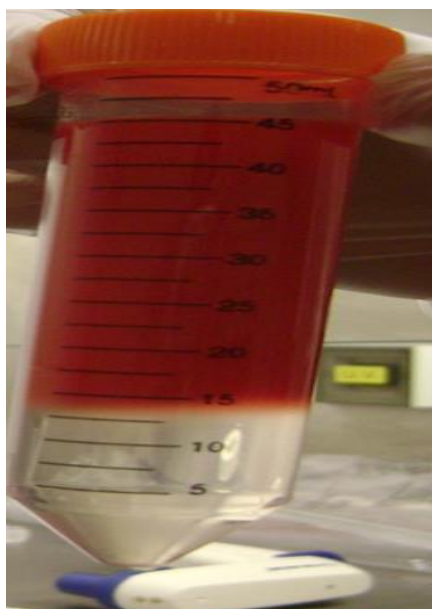
- Θάλαμος νηματικής ροής (microflow biological cabinet safety)
- Σωλήνες φυγοκέντρωσης των 50ml (falcon, Corning 50 centrifuge tube)
- Ficoll-Histopaque (Sigma), πυκνότητας 1,077 gr/ml
- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS (Phosphate Buffered Saline- Gibco pH 2,7)
- Πιπέτα Pasteur
- Ηλεκτρικός αναρροφητήρας πιπετών
- Πιπέτες 10ml και 20ml
- Φυγόκεντρος 5702 R centrifuge (Eppendorf)
- FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco)
- Υδατόλουτρο (memmert)
- Cryovials TruCool (biocision)
- RPMI/DMSO (Gibco/Sigma)
- Θήκη (Cool Cell, BioCision LLC)
- Δοχείο αποθήκευσης αζώτου, αέριας φάσης

Η απομόνωση των μονοπύρηνων κυττάρων πραγματοποιήθηκε εντός 24 ωρών από τη στιγμή της δειγματοληψίας. Υπάρχει βέβαια πάντα η πιθανότητα το δείγμα να μην είναι κατάλληλο για την απομόνωση των κυττάρων γεγονός το οποίο μπορεί να οφείλεται στο ότι το αίμα ή ο μυελός να έχουν πήγμα, είτε λόγω αιμόλυσης ή πιθανά και από την ίδια τη διαδικασία της δειγματοληψίας. Η συλλογή των δειγμάτων αίματος ή μυελού έγινε σε σωληνάκια συλλογής αίματος που περιέχουν αντιπηκτικό (EDTA), ενώ όλη η διαδικασία πραγματοποιήθηκε με μεγάλη προσοχή, ώστε να αποφευχθούν πιθανές μολύνσεις (και των δειγμάτων αλλά και του προσωπικού).

Όλα τα αντιδραστήρια, τα διαλύματα καθώς και οι πιπέτες και τα σωληνάρια φυγοκέντρησης ήταν αποστειρωμένα. Επιπλέον, όλες οι διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν εντός του θαλάμου νηματικής ροής, ο οποίος προσφέρει ασηπτικές συνθήκες και ένα αποστειρωμένο και ασφαλές περιβάλλον.

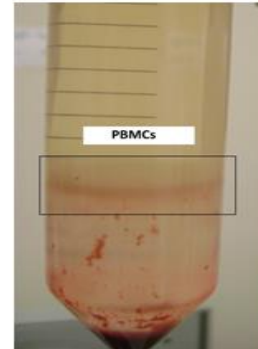
II) Εκτέλεση

1. Σε σωλήνα φυγοκέντρησης των 50ml (falcon), προσθέτουμε 15ml Ficoll-Histopaque.
2. Σε δεύτερο falcon των 50ml προσθέτουμε το δείγμα μας (περιφερικό αίμα ή μυελός) και συμπληρώνουμε με ρυθμιστικό διάλυμα PBS μέχρι τα 30ml. Το PBS είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με σύσταση 154mM NHCl , 1,54mM KH_4PO_4 , 2,7 Na_2HPO_4 , και έχει την ιδιότητα να κρατά το διάλυμα ισοτονικό έτσι ώστε να προφυλάσσονται τα κύτταρα από τη λύση λόγω διαφοράς στην ωσμωτική πίεση.
3. Μεταφέρουμε με προσοχή το δείγμα μας με το ρυθμιστικό διάλυμα, στον αρχικό σωλήνα που περιέχει τη φικόλη, με τη βοήθεια της πιπέτας Pasteur. Ο σωλήνας μας πρέπει να βρίσκεται υπό κλίση, ώστε να αποφύγουμε την ανάμειξη των δύο υγρών (η φικόλη είναι τοξική για τα κύτταρα).



Εικόνα 6: Οι δύο φάσεις που δημιουργούνται πριν τη φυγοκέντρηση (στο πάνω μέρος το δείγμα και στο κάτω λόγω μεγαλύτερης πυκνότητας η φικόλη).

4. Φυγοκεντρούμε στα 1600rpm για 30min σε θερμοκρασία δωματίου, χωρίς φρένο, προκειμένου να πετύχουμε βαθμιαία στρωματοποίηση βάσει πυκνότητας.
5. Απομακρύνουμε με προσοχή το falcon από τη φυγόκεντρο (στο σημείο αυτό είναι ορατές πλέον οι στοιβάδες που δημιουργούνται)

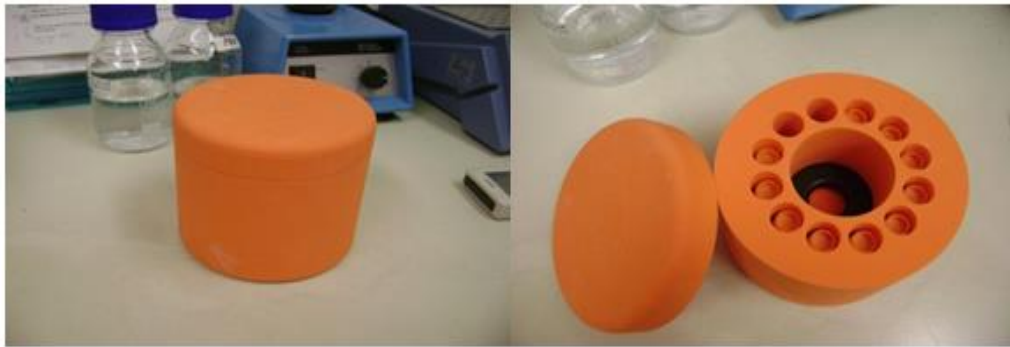


Εικόνα 7: : Στρωματοποίηση του δείγματος μετά από ήπια φυγοκέντρηση (στην εικόνα ξεχωρίζουν τα μονοπύρηνα).

6. Με τη βοήθεια της πιπέτας Pasteur μεταφέρουμε τη στοιβάδα των μονοπύρηνων σε ένα καινούριο falcon και ξεκινάμε τις πλύσεις, προκειμένου να απομακρύνουμε ό,τι υπόλοιπο σε ερυθροκύτταρα και αιμοπετάλια έχουν απομείνει.
7. Προσθέτουμε 30ml PBS και ανακινούμε προσεκτικά, με το χέρι.
8. Φυγοκεντρούμε στα 1.600rpm για 10min, με φρένο (πρώτη πλύση).
9. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και στο ίζημα προσθέτουμε 10ml PBS. Αναδεύουμε με το χέρι, μέχρι να διαλυθεί το ίζημα (δεύτερη πλύση).
10. Φυγοκεντρούμε στα 1.400rpm για 5min, με φρένο.
11. Αφαιρούμε όλο το υπερκείμενο και επαναδιαλυτοποιούμε το ίζημα σε 400μL θρεπτικό υλικό FBS), που φυλάσσεται στους -20°C (έχει προηγηθεί η απενεργοποίηση του στους 56°C σε υδατόλουτρο). Αναμιγνύουμε μερικές φορές με την πιπέτα.
12. Μοιράζουμε το δείγμα εισάγοντας από 200μl σε δυο cryovials (ειδικά σωληνάρια τύπου eppendorff, σχεδιασμένα να αντέχουν σε χαμηλές θερμοκρασίες της τάξης των -196°C), τα οποία είναι ήδη τοποθετημένα στον πάγο και προσθέτουμε σταγόνα-σταγόνα 800μL διαλύματος RPMI/DMSO

(700μl RPMI, 100μl DMSO) στο κάθε ένα. . Αναμιγνύουμε απαλά με την πιπέτα (το DMSO είναι ένα διάλυμα που προστατεύει τα κύτταρα μας σε χαμηλές θερμοκρασίες, για την αποφυγή δημιουργίας κρυστάλλων στο εσωτερικό τους. Έχει ισχυρή κυτταροτοξική δράση, γι' αυτό όταν προσθέτουμε το DMSO στα κύτταρα, θα πρέπει να βρίσκονται στον πάγο για να μην καταστραφούν).

13. Τα δείγματα αποθηκεύονται προσωρινά, για λίγα 24ωρα στους -80°C . Τοποθετούνται στη θήκη Cool Cell, η οποία έχει την ικανότητα να μειώνει τη θερμοκρασία κατά $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Με αυτό το τρόπο αποφεύγεται η γρήγορη πτώση της θερμοκρασίας στα δείγματα, με αποτέλεσμα να προφυλάσσονται τα κύτταρα από θερμικό σοκ κατά την απότομη πτώση της θερμοκρασίας.



Εικόνα 8: Θήκη που μειώνει τη θερμοκρασία σταδιακά προκειμένου να αποφύγουμε το θερμικό σοκ.

14. Τα δείγματα μεταφέρονται από τους -80°C στο υγρό άζωτο (-196°C), όπου και φυλάσσονται για απεριόριστο χρονικό διάστημα.

3.1.1 Ξεπάγωμα κυττάρων

Το ξεπάγωμα των κυττάρων τα οποία βρίσκονται αποθηκευμένα στο υγρό άζωτο (-196°C) αποτελεί μία πολύ ευαίσθητη διαδικασία την οποία πραγματοποιούμε με λεπτούς χειρισμούς. Τέτοιοι χειρισμοί είναι απαραίτητοι ώστε να αποφύγουμε το θάνατο των κυττάρων αυτών, τα οποία είναι πολύ ευαίσθητα και ένα λάθος μπορεί να αποβεί μοιραίο γι' αυτά.

I) Εργαστηριακός εξοπλισμός-Υλικά

- Υδατόλουτρο memmert
- Σωλήνες φυγοκέντρησης των 15ml (falcon, Corning 15 centrifuge tube)
- Ηλεκτρικός αναρροφητήρας πιπετών
- Πιπέτα 10ml
- Πιπέτα 1000μl
- RPMI (Gibco)
- PBS (Gibco, pH 2,7)

II) Εκτέλεση

1. Σε προθερμασμένο στους 37°C υδατόλουτρο, τοποθετούμε για δύο με τρία περίπου λεπτά τα cryovials, έως ότου ξεπαγώσει μέρος των κυττάρων (δεν πρέπει να ξεπαγώσει ολόκληρη η μάζα των κυττάρων καθώς το DMSO που περιέχεται είναι κυτταροτοξικό).
2. Μεταφέρουμε 1ml από το κάθε cryovial σε δυο σωληνάκια φυγοκέντρησης των 15ml (falcon) και σε κάθε ένα από αυτά προσθέτουμε 10ml προθερμασμένο RPMI.
3. Φυγοκεντρούμε στα 200g για 10min.
4. Απορρίπτουμε το RPMI και κρατάμε μόνο το pellet των μονοπύρηνων κυττάρων.
5. Αραιώνουμε το pellet σε τελικό όγκο 1ml PBS.

6. Μεταφέρουμε το pellet από τα δύο falcon που χρησιμοποιήσαμε νωρίτερα σε ένα νέο falcon των 15ml.
7. Πιπετάρουμε ώστε να διαλυθούν τα συσσωματώματα.

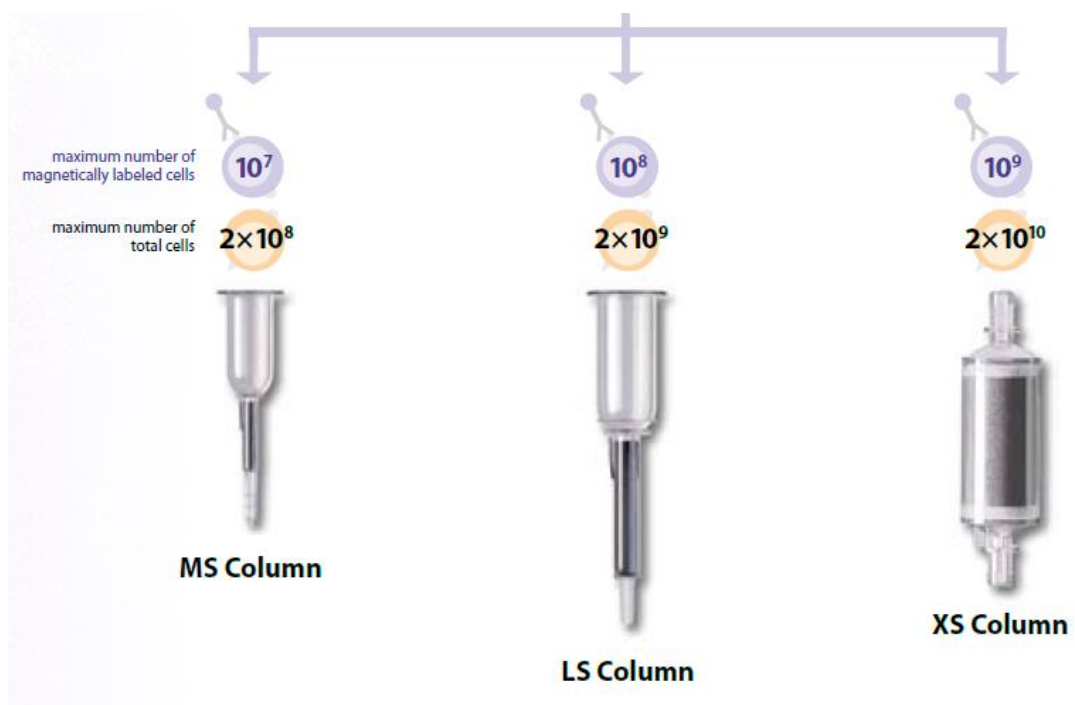
3.2 Απομόνωση CD34⁺ κυττάρων με τη μέθοδο των Magnetic beads

Για την απομόνωση των CD34⁺ κυττάρων χρησιμοποιήσαμε τη μεθοδολογία των magnetic beads της εταιρείας MACS Miltenyi Biotec. Στην εικόνα φαίνεται η συσκευή στην οποία πραγματοποιήθηκε όλη η διαδικασία. Διακρίνονται δύο βάσεις στήριξης των στηλών, η mini separation unit (πράσινο χρώμα) και η midi separation unit (μωβ χρώμα), (Miltenyi biotec) οι οποίες στηρίζονται σε έναν ισχυρό μαγνήτη που δημιουργεί μαγνητικό πεδίο. Η διαφορά ανάμεσα στις δύο στήλες έγκειται στην ποσότητα των κυττάρων που υπάρχουν στο δείγμα (πράσινη για μεγάλο αριθμό κυττάρων, μωβ για μικρό αριθμό κυττάρων). Ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων επιλέγουμε και τις στήλες που θα χρησιμοποιηθούν στα πειράματα. Η επιλογή της στήλης, γίνεται με κριτήριο τον αριθμό των κυττάρων που εμπεριέχονται στο διάλυμα του δείγματος. Καθώς το διάλυμα με τα κύτταρα διέρχεται από τη στήλη (μετά από την επώαση με το αντίσωμα), τα κύτταρα στα οποία έχει προσδεθεί το αντίσωμα με τα σφαιρίδια συγκρατούνται λόγω του μαγνητικού πεδίου στη στήλη, ενώ τα μη σημασμένα εξέρχονται της στήλης.

Η διαδικασία που ακολουθήσαμε για τα CD34⁺ είναι τύπου θετικής επιλογής (positive selection), όπου σημαίνεται μαγνητικά μόνο ένας συγκεκριμένος κυτταρικός τύπος. Κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού, τα σημασμένα κύτταρα συγκρατούνται εντός της στήλης, ενώ τα μη σημασμένα εξέρχονται αυτής.



Εικόνα 9: Μαγνητικός διαχωριστής και βάσεις στήριξης στήλων.



Εικόνα 10: Το μέγεθος της στήλης που χρησιμοποιούμε ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων.

Αφού ολοκληρώσουμε τη διαδικασία του ξεπαγώματος των κυττάρων, ακολουθεί η μαγνητική σήμανσή τους και ο μαγνητικός διαχωρισμός.

I) Εργαστηριακός εξοπλισμός- Υλικά

- Φυγόκεντρος 5702 R centrifuge (Eppendorf)
- Σωλήνες φυγοκέντρωσης των 15ml (falcon, Corning 15 centrifuge tube)
- Buffer PBS/EDTA/BSA
- FcR Blocking Reagent
- Αντίσωμα CD34
- Στήλη διαχωρισμού (MS, LS ή XS ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων)
- Μαγνητικός διαχωριστής

II) Εκτέλεση

α) Μαγνητική σήμανση κυττάρων:

Αφού ολοκληρώσουμε το ξεπάγωμα,

1. Φυγοκεντρούμε στα 300g για 10min, σε θερμοκρασία δωματίου, χωρίς φρένο.
2. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε το ίζημα σε 600μL buffer PBS/EDTA/BSA.
3. Προσθέτουμε 200μl FcR Blocking Reagent (μπλοκάρει τη μη ειδική σύνδεση) και 200μl του αντισώματος CD34.
4. Αναδεύουμε καλά και αφήνουμε το δείγμα στο ψυγείο, στους 4°C για 30min.
5. Ξεπλένουμε τα κύτταρα προσθέτοντας 1ml διαλύματος PBS/EDTA/BSA και φυγοκεντρούμε στα 300g για 10min, χωρίς φρένο
6. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναδιαλυτοποιούμε το ίζημα σε 500μl διαλύματος PBS/EDTA/BSA

β) Μαγνητικός διαχωρισμός

1. Τοποθετούμε τη στήλη στη βάση (separation unit) που βρίσκεται επάνω στο μαγνήτη της ειδικής συσκευής.

2. Προετοιμάζουμε τη στήλη προσθέτοντας 500μl PBS για τη μικρή στήλη (MS) και 3ml για τη μεγαλύτερη στήλη (LS). Στη συνέχεια απορρίπτουμε την ποσότητα που χρειάστηκε για την εφύγρανση της στήλης.
3. Κατά τη διάρκεια της όλης διαδικασίας δεν αφήνουμε ΠΟΤΕ τη στήλη να στεγνώσει δεν προσθέτουμε ΠΟΤΕ περίσσεια υγρού εάν η στήλη είναι ήδη γεμάτη.
4. Εισάγουμε το δείγμα στη στήλη. Τα κύτταρα που έχουν σημανθεί με το αντίσωμα έχουν προσκολληθεί μέσα στη στήλη από τα μαγνητικά σφαιρίδια, λόγω του μαγνητικού πεδίου. Όσα κύτταρα δε σημανθήκαν, εκλούονται και συλλέγονται ως εκλούόμενα (eluted cells).
5. Συνεχίζουμε με 3 ξεπλύματα της στήλης. Ανάλογα με το είδος της στήλης που έχουμε χρησιμοποιήσει, εισάγουμε και την κατάλληλη ποσότητα διαλύματος PBS/EDTA/BSA.

MS: 3x500μl

LS: 3x3ml

6. Κάθε φορά, μετά από κάθε ξέπλυμα, συλλέγουμε σε καθαρά αποστειρωμένα eppendorfs τα κύτταρα που εκλούονται.
7. Αφαιρούμε τη στήλη από το μαγνητικό πεδίο και προσθέτουμε ποσότητα διαλύματος PBS/EDTA/BSA σε αυτήν.

MS: 1ml

LS: 5ml

8. Με τη βοήθεια ενός εμβόλου που εφαρμόζει αεροστεγώς στη στήλη, ασκούμε πίεση και μεταφέρουμε το δείγμα σε ένα καινούργιο αποστειρωμένο eppendorf. Αυτό το δείγμα περιέχει τα σημασμένα κύτταρα που επιθυμούμε (selected cells).

Όταν η παραπάνω διαδικασία ολοκληρωθεί μπορούμε να προχωρήσουμε στην απομόνωση miRNA, large RNA, DNA και πρωτεϊνών.

3.3 Απομόνωση miRNA, large RNA, DNA και πρωτεϊνών

Για να πραγματοποιήσουμε την απομόνωση των μακρομορίων, κάναμε χρήση και συνδυάσαμε δύο kit απομόνωσης διότι δεν ήταν δυνατόν να γίνει απομόνωση με τη χρήση ενός μόνο kit, εφόσον δεν υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμα.

I) Εργαστηριακός εξοπλισμός- Υλικά

- DNA, RNA and protein purification (NucleoSpin miRNA) kit
 - ML buffer
 - rDNase και rDNase buffer
 - MW1
 - MW2
 - RNase free water
- Absolute ethanol (96-100%)
- 50% ethanol
- DNA, RNA and protein purification (NucleoSpin TriPrep) kit
 - DNA wash
 - DNA elute
 - RNase free water
 - PSB-TCEP διάλυμα μετουσίωσης πρωτεϊνών
- Φυγόκεντρος KUBOTA 3500
- Vortex VELP scientific
- Πιπέτες 1000μl, 200μl, 20μl, 2μl
- Filter tips για τις πιπέτες
- Υδατόλουτρο

II) Προετοιμασία

Αρχικά πραγματοποιούμε μία φυγοκέντρωση στα 14000g για να γίνει καθίζηση των CD34⁺ (selected) κυττάρων.

III) Εκτέλεση

- Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και κρατάμε μόνο το ίζημα (pellet) των κυττάρων.
- Στο δείγμα κυττάρων προσθέτουμε 300μl ML buffer (διάλυμα λύσης κυττάρων) και πιπετάρουμε μέχρι να διαλυθεί το ίζημα.
- Επωάζουμε για 5min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Τοποθετούμε τη μωβ στήλη σε collection tube των 2ml (lid).

- Προσθέτουμε ολόκληρο το δείγμα στη μωβ στήλη ώστε να γίνει ομογενοποίηση του δείγματος και καθαρισμός από αδιάλυτα ξένα σώματα.
- Φυγοκεντρούμε για 1min στα 11000g.
- Απορρίπτουμε τη στήλη (κρατάμε το flowthrough) το οποίο είναι 300μl.
- Προσθέτουμε 150μl absolute ethanol στο flowthrough που έχουμε κρατήσει, και κάνουμε vortex για 5sec.
- Επωάζουμε για 5min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Τοποθετούμε τη μπλε στήλη σε collection tube των 2ml (lid)
- Προσθέτουμε το δείγμα ($\approx 450\mu\text{l}$) στη μπλε στήλη και φυγοκεντρούμε για 1min στα 14000g.
- Κρατάμε το flowthrough το οποίο περιέχει τα miRNA και τις πρωτεΐνες (στους 4°C) μέχρι του σημείου που πραγματοποιούμε την πέψη του DNA.
- Κρατάμε όμως και τη μπλε στήλη στην οποία έχουν συγκρατηθεί το DNA και το large RNA.

➤ **DNA elution**

- ❖ Τοποθετούμε τη μπλε στήλη σε ένα νέο collection tube (χωρίς καπάκι)
- ❖ 1st wash: προσθέτουμε 500μl DNA wash και φυγοκεντρούμε για 1min στα 11000g.
- ❖ 2nd wash: (ίδιο collection tube με πριν): προσθέτουμε 500μl DNA wash και φυγοκεντρούμε για 1min στα 11000g.
- ❖ Απορρίπτουμε το flowthrough.
- ❖ Στεγνώνουμε τη μεμβράνη σε θερμοκρασία δωματίου αφήνοντας τη στήλη με ανοιχτό το καπάκι για 3min.
- ❖ Μεταφέρουμε τη στήλη σε νέο collection tube του 1,5ml
- ❖ Προσθέτουμε 100μl DNA elute απευθείας επάνω στη μεμβράνη.
- ❖ Επωάζουμε για 1min σε θερμοκρασία δωματίου με κλειστό το καπάκι.
- ❖ Φυγοκεντρούμε για 1min στα 11000g.

Στο επόμενο βήμα πρέπει να πραγματοποιήσουμε πέψη του εναπομείναντος στη στήλη DNA ώστε να μπορέσουμε να απομονώσουμε το large RNA.

- Αρχικά προετοιμάζουμε το rDNase reaction mix, προσθέτοντας 10μl rDNase και 90μl rDNase buffer.
- Προσθέτουμε 100μl rDNase reaction mixture απευθείας επάνω στη μεμβράνη.
- Επωάζουμε για 15min σε θερμοκρασία δωματίου με κλειστό καπάκι.

Στο flowthrough το οποίο έχουμε κρατήσει και περιέχει τα miRNA και τις πρωτεΐνες:

- Προσθέτουμε 300μl MP buffer.
- Vortex για 5sec.
- Φυγοκεντρούμε για 3min στα 11000g. (Στο στάδιο αυτό δημιουργείται η protein pellet και την οποία κρατάμε στους 4°C μέχρι να την επεξεργαστούμε).
- Τοποθετούμε τη λευκή στήλη σε collection tube των 2ml (lid).
- Μεταφέρουμε ολόκληρη την ποσότητα του υπερκειμένου ($\approx 750\mu\text{l}$) στη λευκή στήλη.
- Φυγοκεντρούμε για 1min στα 11000g.
- Απορρίπτουμε τη λευκή στήλη και κρατάμε το flowthrough, διότι εκεί περιέχονται τα miRNA.
- Προσθέτουμε 800μl MX buffer.
- Vortex για 5sec.
- Τοποθετούμε την πράσινη στήλη σε ένα collection tube των 2ml (χωρίς καπάκι).
- Μεταφέρουμε 725μl από το δείγμα στην πράσινη στήλη (δε χωρά 1500μl η στήλη).
- Φυγοκεντρούμε για 40sec στα 11000g.
- Επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία για τα υπόλοιπα 725μl (με την ίδια στήλη).

Στο σημείο αυτό, αφού έχει ολοκληρωθεί και η πέψη του DNA, συντονίζουμε τα βήματα για την απομόνωση miRNA από την πράσινη στήλη και large RNA από τη μπλε στήλη, εφόσον χρησιμοποιούμε τα ίδια διαλύματα καθώς και τους ίδιους όγκους.

Συντονισμός βημάτων:

- Τοποθετούμε και τις δύο στήλες σε collection tubes των 2ml.
- 1st wash: Προσθέτουμε 600μl MW1 και στις δύο στήλες.

- Απορρίπτουμε το flowthrough.
- 2nd wash: Προσθέτουμε 700μl MW2.
- Απορρίπτουμε το flowthrough.
- 3rd wash: Προσθέτουμε 250μl MW2.
- Φυγοκεντρούμε για 2min στα 11000g.
- Απορρίπτουμε το flowthrough.
- Φυγοκεντρούμε για 2min στα 11000g, ώστε να στεγνώσει εντελώς η μεμβράνη.
- Στο σημείο αυτό γίνεται η έκλουση των miRNA και large RNA. Αφού τοποθετήσουμε τις στήλες σε ένα νέο collection tube του 1,5ml, προσθέτουμε από 30μl RNase free water σε κάθε μία στήλη.
- Επωάζουμε τις στήλες για 1min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Φυγοκεντρούμε για 40sec στα 11000g.
- Αποθηκεύουμε στους -80°C.

Με την παραπάνω διαδικασία, ολοκληρώνουμε την απομόνωση των **DNA**, miRNA και large RNA.

3.4 Αξιολόγηση καθαρότητας και ποσοτικοποίηση των μακρομορίων: Nanodrop™

Τα νουκλεϊκά οξέα και οι πρωτεΐνες χαρακτηρίζονται από μέγιστη τιμή απορρόφησης στα 260 και 280nm αντίστοιχα. Η αναλογία των δύο απορροφήσεων σε ένα δείγμα αποτελεί μέτρο της καθαρότητάς του. Ο λόγος A_{260}/A_{280} όταν είναι κοντά στο 2 δηλώνει την υψηλή καθαρότητα των μορίων, και στην προκειμένη περίπτωση, του miRNA. Σημαντικές αποκλίσεις από το λόγο αυτό, πιθανότατα οφείλονται σε επιμολύνσεις.

Τα δεδομένα, καταγράφονται και επεξεργάζονται από ειδικό λογισμικό μέσω υπολογιστή που είναι συνδεδεμένος με το όργανο.

Όπως αναφέρθηκε, η αναλογία A_{260}/A_{280} δηλώνει την καθαρότητα του δείγματος βασιζόμενη στην απορρόφηση εξαιτίας της παρουσίας νουκλεϊκών οξέων (260nm) και πρωτεϊνών (280nm). Επίσης, μέσω της απορρόφησης στα 260nm και με βάση το νόμο των Beer και Lambert ($A = \epsilon l c$) υπολογίζεται και η συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων στο δείγμα.

3.5 Ταυτόχρονη μελέτη της μεθυλίωσης του DNA (γονίδια απόπτωσης)

Χρησιμοποιήσαμε το πρωτόκολλο EpiTect Methyl II Signature PCR Array for 22 Genes.

Αφού ξεπαγώσαμε το DNA το οποίο είχαμε αποθηκευμένο στους -20°C , ακολούθησε φωτομέτρηση στο nanodrop ώστε να προσδιορίσουμε την καθαρότητα αλλά και την ποσότητα του γενωμικού DNA, καθώς για την πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα σύμφωνα με το πρωτόκολλο είναι απαραίτητη ποσότητα 1μg.

Στη συνέχεια προσθέτουμε το διάλυμα 5x restriction digestion buffer, απαραίτητο για τη δράση των περιοριστικών ενζύμων και στη συνέχεια RNase/DNase free water μέχρι τελικού όγκου 120μl, κάνοντας ένα vortex κι ένα flash spin στη φυγόκεντρο.

Πίνακας 3: Mix αντίδρασης πριν την προσθήκη περιοριστικών ενζύμων.

Component	Volume
Genomic DNA (1μg)	Variable
5x restriction digestion buffer	26μl
RNase/DNase free water	Variable
Final volume	120μl

Στη συνέχεια σε τέσσερα νέα Eppendorf χωρίζουμε από 28μl από το πρώτο mix αντιδράσεων. Τα νέα Eppendorf είναι το M0, το Ms, το Md, και το Msd. Στο πρώτο aliquot M0 δεν προσθέτουμε καθόλου περιοριστικό ένζυμο, μόνο το δείγμα γενωμικού DNA και RNase/DNase free water μέχρι τελικού όγκου 30μl, στο Ms προσθέτουμε το γενωμικό DNA και το methylation specific enzyme και συμπληρώνουμε μέχρι τελικού όγκου 30μl. Το methylation specific enzyme πέπτει το γενετικό υλικό το οποίο δεν έχει μεθυλιωθεί, ακολουθώντας το πρωτόκολλο προσθέτουμε της ίδιες ποσότητες από το methylation depended enzyme στο τρίτο Eppendorf, ένζυμο το οποίο πέπτει το μεθυλιωμένο DNA, ενώ στο τελευταίο Msd προσθέτουμε και τα δύο περιοριστικά ώστε να γίνει διπλή πέψη και του μεθυλιωμένου και του απομεθυλιωμένου γενετικού υλικού, ώστε κατά τη διάρκεια της q-PCR να πάρουμε σήμα φθορισμού μόνο από τους primers κρίνοντας αν δουλεύουν τα περιοριστικά ένζυμα.

Πίνακας 4: Πέψεις με περιοριστικά ένζυμα

Component	M0	Ms	Md	Msd
Reaction mix	28μl	28μl	28μl	28μl
Methylation sensitive enzyme	-	1μl	-	1μl
Methylation depended enzyme	-	-	1μl	1μl
RNase/DNase free water	2μl	1μl	1μl	-
Final volume	30μl	30μl	30μl	30μl

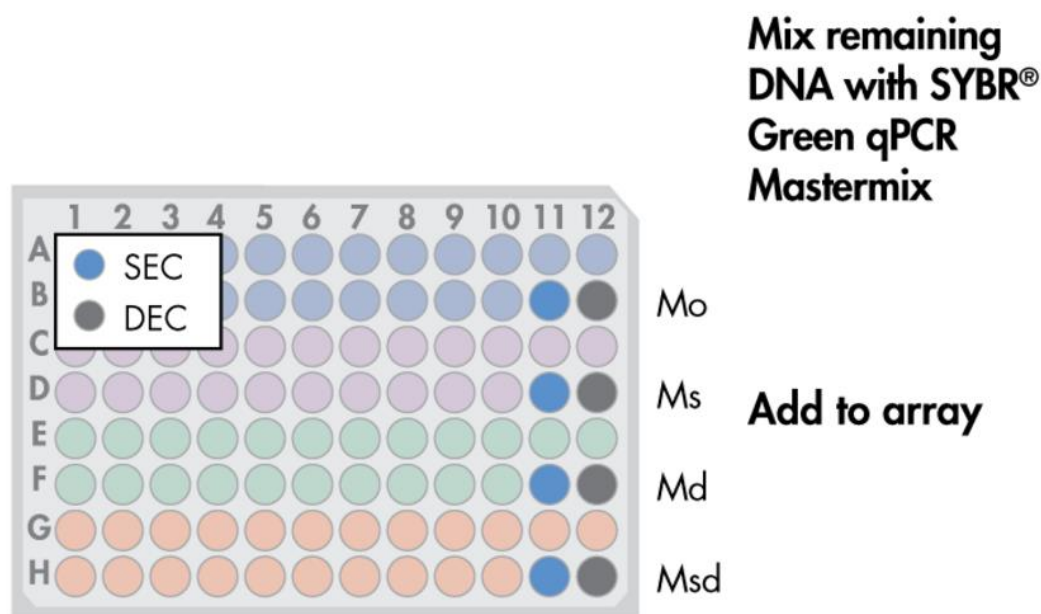
Ακολουθώντας ένα flash spin, επωάζουμε στους 37°C για 6 ώρες, ώστε τα ένζυμα να αρχίσουν να πέπτουν το γενετικό υλικό. Με το πέρας των έξι ωρών, τοποθετούμε τα eppendorf στους 65°C, ώστε να απενεργοποιήσουμε τη δράση τους.

Στη συνέχεια ετοιμάζουμε το PCR mix σε τέσσερα eppendorf ως εξής:

Πίνακας 5: PCR setup

Component	M0	Ms	Md	Msd
PCR master mix	330μl	330μl	330μl	330μl
M0 digest	30μl	-	-	-
Ms digest	-	30μl	-	-
Md digest	-	-	30μl	-
Msd digest	-	-	-	30μl
RNase/DNase free water	300μl	300μl	300μl	300μl
Final Volume	660μl	660μl	660μl	660μl

Μόλις ετοιμάσουμε το mix τοποθετούμε 25μl από το προϊόν κάθε πέψης, ανα δύο σειρές στο plate 96 θέσεων, το οποίο περιέχει μονιμοποιημένους primers για το κάθε γονίδιο που σχετίζεται με την απόπτωση, δηλαδή το mix το οποίο δεν έχει γίνει πέψη με κανένα ένζυμο, τοποθετείται στις σειρές A και B του plate, το προϊόν της πέψης με το methylation specific enzyme στις σειρές C και D, το προϊόν της πέψης με το methylation dependent enzyme σε σειρές E και F ενώ το προϊόν της ταυτόχρονης πέψης στις σειρές G και H.



Εικόνα 11: Τοποθέτηση των προϊόντων των πέψεων στο plate.

Ακόλουθα σφραγίζοντας το plate με διάφανη μεμβράνη, κάνουμε μία φυγονέντρωση το plate στις 2000rpm για 1min. Και τοποθετούμε το plate στη Real Time PCR.

Πίνακας 6: Συνθήκες RT-PCR.

Temperature	Time	Number of cycles
95°C	10min*	1 cycle
99°C	30sec	3 cycles
72°C	1min	
97°C	15sec	40 cycles
72°C	1min ⁺	

* Στο σημείο αυτό ενεργοποιείται η DNA πολυμεράση ώστε να αρχίζει να αντιγράφει τα δείγματα DNA.

⁺ Στο σημείο αυτό η SYBR green αρχίζει να δίνει σήμα φθορισμού και ο αριθμός των κύκλων όπου πήραμε το πρώτο σήμα είναι το cycle threshold το οποίο χρησιμοποιούμε ώστε να λάβουμε τα αποτελέσματά μας.

	Position	UniGene	RefSeq	Symbol	Description
3	A01, C01, E01, G01	Hs.728891	NM_001160	APAF1	Apoptotic peptidase activating factor 1
4	A02, C02, E02, G02	Hs.370254	NM_004322	BAD	BCL2-associated agonist of cell death
5	A03, C03, E03, G03	Hs.624291	NM_004324	BAX	BCL2-associated X protein
6	A04, C04, E04, G04	Hs.469658	NM_006538	BCL2L11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)
7	A05, C05, E05, G05	Hs.486542	NM_014739	BCLAF1	BCL2-associated transcription factor 1
8	A06, C06, E06, G06	Hs.591054	NM_001196	BID	BH3 interacting domain death agonist
9	A07, C07, E07, G07	Hs.475055	NM_001197	BIK	BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)
10	A08, C08, E08, G08	Hs.696238	NM_001166	BIRC2	Baculoviral IAP repeat containing 2
11	A09, C09, E09, G09	Hs.131226	NM_004331	BNIP3L	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like
12	A10, C10, E10, G10	Hs.141125	NM_004346	CASP3	Caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase
13	A11, C11, E11, G11	Hs.329502	NM_001229	CASP9	Caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase
14	A12, C12, E12, G12	Hs.642693	NM_014430	CIDEB	Cell death-inducing DFFA-like effector b
15	B01, D01, F01, H01	Hs.38533	NM_003805	CRADD	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain
16	B02, D02, F02, H02	Hs.380277	NM_004938	DAPK1	Death-associated protein kinase 1
17	B03, D03, F03, H03	Hs.484782	NM_004401	DFFA	DNA fragmentation factor, 45kDa, alpha polypeptide
18	B04, D04, F04, H04	Hs.86131	NM_003824	FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain
19	B05, D05, F05, H05	Hs.80409	NM_001924	GADD45A	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha
20	B06, D06, F06, H06	Hs.87247	NM_003806	HRK	Harakiri, BCL2 interacting protein (contains only BH3 domain)
21	B07, D07, F07, H07	Hs.1116	NM_002342	LTBR	Lymphotoxin beta receptor (TNFR superfamily, member 3)
22	B08, D08, F08, H08	Hs.443577	NM_014452	TNFRSF21	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21
23	B09, D09, F09, H09	Hs.462529	NM_003790	TNFRSF25	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25
24	B10, D10, F10, H10	Hs.654481	NM_000546	TP53	Tumor protein p53
25	B11, D11, F11, H11	N/A	N/A	SEC	Methylation-Sensitive Enzyme Control
26	B12, D12, F12, H12	N/A	N/A	DEC	Methylation-Dependent Enzyme Control

Εικόνα 12: Γονίδια και θέσεις τους πάνω στο plate.

Πίνακας 7: Υπό μελέτη γονίδια και οι λειτουργίες τους.

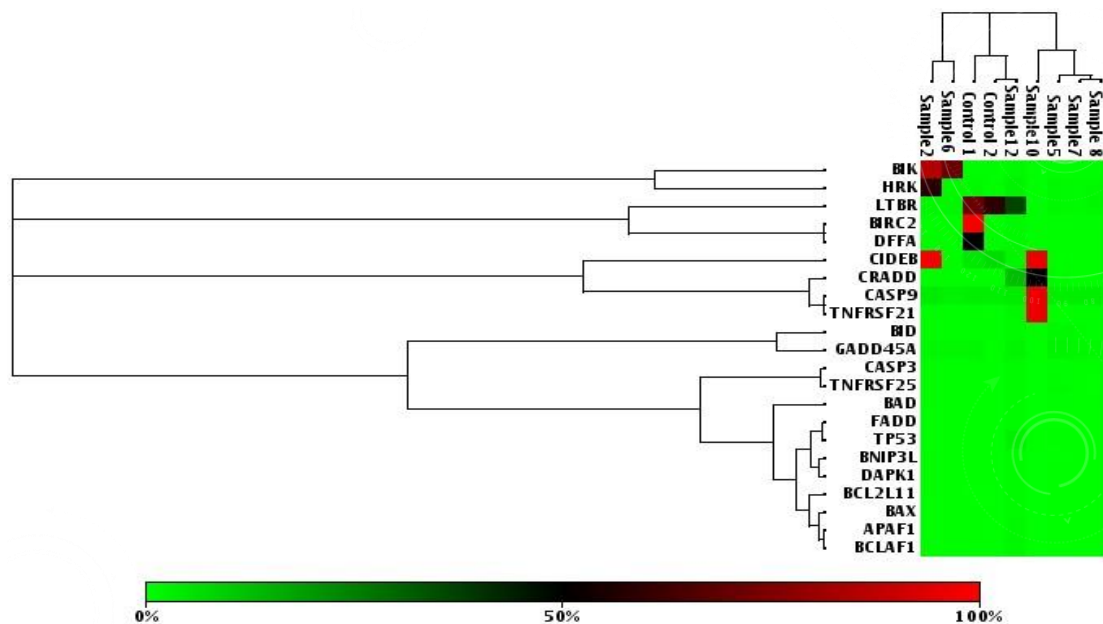
Γονίδια	Λειτουργία
APAF1	Προαποπτωτική
BAD	Προαποπτωτική
BAX	Προαποπτωτική
BCL2L11	Προαποπτωτική
BCLAF1	Προαποπτωτική/Αντιαποπτωτική
BID	Προαποπτωτική/Αντιαποπτωτική
BIK	Προαποπτωτική
BIRC2	Αντιαποπτωτική
BNIP3L	Προαποπτωτική
CASP3	Προαποπτωτική
CASP9	Προαποπτωτική
CIDEB	Προαποπτωτική
CRADD	Προαποπτωτική
DAPK1	Προαποπτωτική
DEFA	Προαποπτωτική
FADD	Προαποπτωτική
GADD45A	Προαποπτωτική
HRK	Προαποπτωτική
LTBR	Προαποπτωτική
TNFRSF21	Προαποπτωτική
TNFRSF25	Προαποπτωτική
TP53	Προαποπτωτική

4. Αποτελέσματα

Το αποτέλεσμα που λαμβάνουμε από την RT-PCR με τη μορφή cycle threshold τα ανεβάζουμε με τη μορφή excel στην ιστοσελίδα της εταιρίας το οποίο κανονικοποιεί τα αποτελέσματά μας με τη μέθοδο $2^{-\Delta\Delta C_t}$ και μας δίνει τα ποσοστά μεθυλίωσης για το κάθε υπό μελέτη γονίδιο, δίνοντάς μας διαφορετικές επιλογές οπτικοποίησης των αποτελεσμάτων μας.

C2		Control 2												
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1	Symbol	Well	Control 2		Sample2		Sample6		Sample7		Control 1		Sample8	
2			UM	M	UM	M	UM	M	UM	M	UM	M	UM	M
6	BAX	A03	99.99%	0.01%	100.00%	0.00%	99.89%	0.11%	99.99%	0.01%	99.98%	0.02%	99.85%	0.15%
7	BCL2L11	A04	100.00%	0.00%	99.99%	0.01%	99.88%	0.12%	99.99%	0.01%	99.96%		99.91%	0.09%
8	BCLAF1	A05	99.99%	0.01%	99.96%	0.04%	99.90%	0.10%	99.96%	0.04%	99.99%	0.01%	99.90%	0.10%
9	BID	A06	99.95%	0.05%	99.87%	0.13%	99.76%	0.24%	99.46%	0.54%	99.82%	0.18%	99.75%	0.25%
10	BIK	A07	99.96%	0.04%	14.46%	85.54%	29.34%	70.66%	99.86%	0.14%	99.83%	0.17%	99.82%	0.18%
11	BIRC2	A08	99.95%	0.05%	99.96%	0.04%	99.90%	0.10%	99.90%	0.10%	0.80%	99.20%	99.96%	0.04%
12	BNIP3L	A09	99.99%	0.01%	99.99%	0.01%	99.99%	0.01%	99.95%	0.05%	99.98%	0.02%	99.86%	0.14%
13	CASP3	A10	99.99%	0.01%	99.93%	0.07%	99.90%	0.10%	99.90%	0.10%	99.98%	0.02%	99.98%	0.02%
14	CASP9	A11	97.55%	2.45%	96.67%	3.33%	97.92%	2.08%	97.12%	2.88%	97.04%	2.96%	97.64%	2.36%
15	CIDEB	A12	93.66%	6.34%	1.47%	98.53%	99.80%	0.20%	99.86%	0.14%	96.01%	3.99%	99.83%	0.17%
16	CRADD	B01	99.94%	0.06%	99.86%	0.14%	99.90%	0.10%	99.99%	0.01%	99.93%	0.07%	99.91%	0.09%
17	DAPK1	B02	99.98%	0.02%	99.94%	0.06%	99.94%	0.06%	99.99%	0.01%	99.94%	0.06%	99.90%	0.10%
18	DFFA	B03	99.93%	0.07%	99.91%	0.09%	99.98%	0.02%	99.98%	0.02%	50.04%	49.96%	99.94%	0.06%
19	FADD	B04	99.99%	0.01%	100.00%	0.00%	99.94%	0.06%	99.98%	0.02%	99.98%	0.02%	99.97%	0.03%
20	GADD45A	B05	99.61%	0.39%	99.08%	0.92%	98.97%	1.03%	98.78%	1.22%	98.72%	1.28%	99.06%	0.94%
21	HRK	B06	99.82%	0.18%	41.76%	58.24%	99.44%	0.56%	99.36%	0.64%	99.21%	0.79%	99.17%	0.83%
22	LTBR	B07	40.44%	59.56%	98.81%	1.19%	98.47%	1.53%	99.47%	0.53%	28.75%	71.25%	98.69%	1.31%
23	TNFRSF21	B08	100.00%	0.00%	99.98%	0.02%	99.99%	0.01%	99.97%	0.03%	99.98%	0.02%	99.94%	0.06%
24	TNFRSF25	B09	99.97%	0.03%	99.99%	0.01%	99.90%	0.10%	99.95%	0.05%	99.96%	0.04%	Failure	Failure
25	TP53	B10	99.96%	0.04%	100.00%	0.00%	99.92%	0.08%	99.99%	0.01%	99.96%	0.04%	99.99%	0.01%
26	SEC	B11	Pass		Pass		Pass		Pass		Pass		Pass	
27	DEC	B12	Pass		Pass		Pass		Pass		Pass		Pass	
28														

Εικόνα 13: Τα αποτελέσματα όπως τα λαμβάνουμε από την ιστοσελίδα της εταιρίας.



Εικόνα 14: Πρότυπο μεθυλίωσης των γονιδίων με τη μορφή heatmap.

Από τα παραπάνω βλέπουμε ότι μόνο συγκεκριμένα γονίδια παρουσιάζουν το αναμενόμενο πρότυπο μεθυλίωσης στους ασθενείς.

Πιο συγκεκριμένα παρατηρούμε ότι στην πλειονότητά τους τα γονίδια στους ασθενείς με ΟΜΛ, παρουσιάζουν ποσοστά μεθυλίωσης από 0 έως και 30%. Μόνο στο δεύτερο δείγμα παρατηρούμε ότι τα προαποπτωτικά HRK και CIDEB αλλά και το αντιαποπτωτικό BIRC2 παρουσιάζουν μεθυλίωση της τάξης του 50-100%, ενώ τέλος στο δέκατο δείγμα έχουμε για τα προαποπτωτικά CIDEB, CRADD, CASP9 και TNFRSF21 ποσοστό μεθυλίωσης έως και 100%.

5. Συμπεράσματα-Συζήτηση

Εργαζόμενος πάνω στο συγκεκριμένο θέμα, που αφορά τη μεθυλίωση του DNA εξαγάγαμε ορισμένα συμπεράσματα σχετικά με τη μεθυλίωση αλλά και μερικά σημαντικά συμπεράσματα που δεν αφορούν την επιγενετική αυτή αλλαγή, αλλά τα δείγματα που φυλάσσονται στο κέντρο Βιοτράπεζας καρκίνου του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Η μέθοδος αποθήκευσης στο υγρό άζωτο που ακολουθεί το κέντρο Βιοτράπεζας καρκίνου, ακολουθώντας τα διεθνή πρότυπα κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας αλλά και της φύλαξης των μονοπύρηνων κυττάρων κρίνεται εκ του αποτελέσματος ιδιαίτερος αποτελεσματική.

Επίσης η μέθοδος επιλογής των CD34+ κυττάρων με τη μέθοδο των μαγνητικών σφαιριδίων φαίνεται να λειτουργεί εξίσου αποτελεσματικά σε «φρέσκα» αλλά και σε κύτταρα που «ξεπαγώσαμε» από το υγρό άζωτο μετά από πολύχρονη φύλαξή τους εκεί.

Δυστυχώς, όσον αφορά τη μεθυλίωση των γονιδίων που σχετίζονται με την απόπτωση δε μπορούμε να έχουμε κάποιο ασφαλές συμπέρασμα καθώς αναμενόμενο θα ήταν στους ασθενείς με ΟΜΛ, τα γονίδια αυτά να παρουσιάζουν αυξημένα ποσοστά μεθυλίωσης, δηλαδή τα γονίδια αυτά να αποσιωπώνται. Αντ' αυτού παρατηρούμε ότι τα ποσοστά μεθυλίωσης είναι αυξημένα μόνο σε συγκεκριμένα δείγματα ασθενών και όχι σε όλους. Έτσι οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι θα πρέπει να υπάρξει μεγαλύτερος αριθμός ασθενών υπό μελέτη ώστε να μπορέσουμε να έχουμε ασφαλέστερο και στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα αλλά και ασφαλέστερο συμπέρασμα σχετικά με το πρότυπο μεθυλίωσης σε ασθενείς με ΟΜΛ.

4. Βιβλιογραφία

1. Strasser, A., Cory, S. & Adams, J. M. Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. *EMBO J.* **30**, 3667–3683 (2011).
2. Willis, S., Day, C. L., Hinds, M. G. & Huang, D. C. S. The Bcl-2-regulated apoptotic pathway. *J. Cell Sci.* **116**, 4053–4056 (2003).
3. Testa, U. & Riccioni, R. Deregulation of apoptosis in acute myeloid leukemia. *Haematologica* **92**, 81–94 (2007).
4. GOPISETTY, G., RAMACHANDRAN, K. & SINGAL, R. DNA methylation and apoptosis. *Mol. Immunol.* **43**, 1729–1740 (2006).
5. David, C. J. & Manley, J. L. Alternative pre-mRNA splicing regulation in cancer: pathways and programs unhinged. *Genes Dev.* **24**, 2343–2364 (2010).
6. Sung, H. *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* caac.21660 (2021) doi:10.3322/caac.21660.
7. Galmarini, C. M. Lessons from Hippocrates: Time to Change the Cancer Paradigm. *Int. J. Chronic Dis.* **2020**, 1–14 (2020).
8. Shipp, M. A. *et al.* International Consensus Conference on High-Dose Therapy With Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Aggressive Non-Hodgkin's Lymphomas: Report of the Jury. *J. Clin. Oncol.* **17**, 423–423 (1999).
9. Georgiadi, E. C., Dionysiou, D. D., Graf, N. & Stamatakis, G. S. Towards in silico oncology: Adapting a four dimensional nephroblastoma treatment model to a clinical trial case based on multi-method sensitivity analysis. *Comput. Biol. Med.* **42**, 1064–1078 (2012).
10. Thomas, X. First contributors in the history of leukemia. *World J. Hematol.* **2**, 62 (2013).
11. Islam, A. The origin and spread of human leukemia. *Med. Hypotheses* **39**, 110–118 (1992).
12. Döhner, H., Weisdorf, D. J. & Bloomfield, C. D. Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **373**, 1136–1152 (2015).
13. Jemal, A., Thomas, A., Murray, T. & Thun, M. Cancer Statistics, 2002. *CA. Cancer J. Clin.* **52**, 23–47 (2002).

14. Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E. & Jemal, A. Cancer Statistics, 2021. *CA. Cancer J. Clin.* **71**, 7–33 (2021).
15. Walter, R. B. & Estey, E. H. Management of older or unfit patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia* **29**, 770–775 (2015).
16. Arber, D. A. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **127**, 2391–2405 (2016).
17. Proskuryakov, S. Y. ., Konoplyannikov, A. G. & Gabai, V. L. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp. Cell Res.* **283**, 1–16 (2003).
18. Wyllie, A. H. Apoptosis: an overview. *Br. Med. Bull.* **53**, 451–465 (1997).
19. The Cell: A Molecular Approach . Seventh Edition. By Geoffrey M. Cooper and Robert E. Hausman. Sunderland (Massachusetts): Sinauer Associates. \$155.95. xxv + 832 p.; ill.; index. ISBN: 978-1-60535-290-9. [A companion website is available.] 2016. *Q. Rev. Biol.* **92**, 202–202 (2017).
20. Papaliagkas, V., Anogianaki, A., Anogianakis, G. & Ilonidis, G. The proteins and the mechanisms of apoptosis: a mini-review of the fundamentals. *Hippokratia* **11**, 108–13 (2007).
21. Yang, J. Prevention of Apoptosis by Bcl-2: Release of Cytochrome c from Mitochondria Blocked. *Science (80-.).* **275**, 1129–1132 (1997).
22. Mamali, I., Tatari, M. N., Micheva, I., Lampropoulou, M. & Marmaras, V. J. Apoptosis in medfly hemocytes is regulated during pupariation through FAK, Src, ERK, PI-3K p85a, and Akt survival signaling. *J. Cell. Biochem.* **101**, 331–347 (2007).
23. Hung, R. W. & Chow, A. W. Apoptosis: Molecular mechanisms, regulation and role in pathogenesis. *Can. J. Infect. Dis.* **8**, 103–9 (1997).
24. D’Arcy, M. S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol. Int.* **43**, 582–592 (2019).
25. Yuan, Y., Kasar, S., Underbayev, C., Prakash, S. & Raveche, E. MicroRNAs in Acute Myeloid Leukemia and Other Blood Disorders. *Leuk. Res. Treatment* **2012**, 1–11 (2012).
26. Wong, R. S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **30**, 87 (2011).
27. Cassier, P. A., Castets, M., Belhabri, A. & Vey, N. Targeting apoptosis in acute myeloid leukaemia. *Br. J. Cancer* **117**, 1089–1098 (2017).

28. Hainaut, P. & Pfeifer, G. P. Somatic TP53 Mutations in the Era of Genome Sequencing. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **6**, a026179 (2016).
29. Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **368**, 2059–2074 (2013).
30. Faderl, S. *et al.* The prognostic significance of p16(INK4a)/p14(ARF) locus deletion and MDM-2 protein expression in adult acute myelogenous leukemia. *Cancer* **89**, 1976–82 (2000).
31. Papaemmanuil, E. *et al.* Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **374**, 2209–2221 (2016).
32. Kornblau, S. M. *et al.* The prognostic impact of BCL2 protein expression in acute myelogenous leukemia varies with cytogenetics. *Clin. Cancer Res.* **5**, 1758–66 (1999).
33. Mehta, S. V., Shukla, S. N. & Vora, H. H. Overexpression of Bcl2 protein predicts chemoresistance in acute myeloid leukemia: Its correlation with FLT3. *Neoplasma* **60**, 666–675 (2014).
34. Ettou, S. *et al.* Epigenetic Control of NF- κ B-Dependent FAS Gene Transcription during Progression of Myelodysplastic Syndromes. *Mol. Cancer Res.* **11**, 724–735 (2013).
35. Karlic, H. *et al.* The role of epigenetics in the regulation of apoptosis in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **90**, 1–16 (2014).
36. Kang, J., Daines, J. R., Warren, A. N. & Cowan, M. L. Epigenetics for the 21st-Century Biology Student. *J. Microbiol. Biol. Educ.* **20**, (2019).
37. Halusková, J. Epigenetic studies in human diseases. *Folia Biol. (Praha)*. **56**, 83–96 (2010).
38. Ogino, S. *et al.* Molecular pathological epidemiology of epigenetics: emerging integrative science to analyze environment, host, and disease. *Mod. Pathol.* **26**, 465–84 (2013).
39. Skinner, M. K. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *EMBO Rep.* **12**, 620–622 (2011).
40. Kelly, J. R., Minuto, C., Cryan, J. F., Clarke, G. & Dinan, T. G. Cross Talk: The Microbiota and Neurodevelopmental Disorders. *Front. Neurosci.* **11**, (2017).
41. Shnorhavorian, M. *et al.* Differential DNA Methylation Regions in Adult

- Human Sperm following Adolescent Chemotherapy: Potential for Epigenetic Inheritance. *PLoS One* **12**, e0170085 (2017).
42. Missirlis, Y. F. Mechanoepigenetics. *Front. Cell Dev. Biol.* **4**, (2016).
 43. Schuebel, K., Gitik, M., Domschke, K. & Goldman, D. Making Sense of Epigenetics. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **19**, pyw058 (2016).
 44. Kim, S. & Kaang, B.-K. Epigenetic regulation and chromatin remodeling in learning and memory. *Exp. Mol. Med.* **49**, e281–e281 (2017).
 45. Esteller, M. Epigenetic changes in cancer. *F1000 Biol. Rep.* **3**, (2011).
 46. Zhang, G. & Pradhan, S. Mammalian epigenetic mechanisms. *IUBMB Life* **66**, 240–256 (2014).
 47. Dabin, J., Fortuny, A. & Polo, S. E. Epigenome Maintenance in Response to DNA Damage. *Mol. Cell* **62**, 712–727 (2016).
 48. Ooi, S. K. T., O'Donnell, A. H. & Bestor, T. H. Mammalian cytosine methylation at a glance. *J. Cell Sci.* **122**, 2787–2791 (2009).
 49. Lan, J., Hua, S., He, X. & Zhang, Y. DNA methyltransferases and methyl-binding proteins of mammals. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **42**, 243–252 (2010).
 50. Bogdanović, O. & Veenstra, G. J. C. DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma* **118**, 549–565 (2009).
 51. Tiwari, V. K. *et al.* PcG Proteins, DNA Methylation, and Gene Repression by Chromatin Looping. *PLoS Biol.* **6**, e306 (2008).
 52. Chen, C.-C., Wang, K.-Y. & Shen, C.-K. J. The Mammalian de Novo DNA Methyltransferases DNMT3A and DNMT3B Are Also DNA 5-Hydroxymethylcytosine Dehydroxymethylases*. *J. Biol. Chem.* **287**, 33116–33121 (2012).
 53. Cheng, X. & Blumenthal, R. M. Mammalian DNA Methyltransferases: A Structural Perspective. *Structure* **16**, 341–350 (2008).
 54. Devailly, G. *et al.* Dynamics of MBD2 deposition across methylated DNA regions during malignant transformation of human mammary epithelial cells. *Nucleic Acids Res.* **43**, 5838–5854 (2015).
 55. Ho, S.-M. *et al.* Environmental Epigenetics and Its Implication on Disease Risk and Health Outcomes. *ILAR J.* **53**, 289–305 (2012).
 56. Chatterjee, C. & Muir, T. W. Chemical Approaches for Studying Histone

- Modifications. *J. Biol. Chem.* **285**, 11045–11050 (2010).
57. Ng, S. S., Yue, W. W., Oppermann, U. & Klose, R. J. Dynamic protein methylation in chromatin biology. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 407–422 (2009).
 58. Fransz, P. & de Jong, H. From nucleosome to chromosome: a dynamic organization of genetic information. *Plant J.* **66**, 4–17 (2011).
 59. Kondo, Y. Epigenetic Cross-Talk between DNA Methylation and Histone Modifications in Human Cancers. *Yonsei Med. J.* **50**, 455 (2009).
 60. Wang, Z. & Willard, H. F. Evidence for sequence biases associated with patterns of histone methylation. *BMC Genomics* **13**, 367 (2012).
 61. Short, N. J. *et al.* Advances in the Treatment of Acute Myeloid Leukemia: New Drugs and New Challenges. *Cancer Discov.* **10**, 506–525 (2020).
 62. Kantarjian, H. *et al.* Acute myeloid leukemia: current progress and future directions. *Blood Cancer J.* **11**, 41 (2021).
 63. Shallis, R. M., Bewersdorf, J. P., Boddu, P. C. & Zeidan, A. M. Hedgehog pathway inhibition as a therapeutic target in acute myeloid leukemia. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **19**, 717–729 (2019).