



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ**

**ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΟ ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
«Ο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ»
ΤΜΗΜΑ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

**ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΜΕΣΟΓΧΥΜΑΤΟΓΕΝΩΝ
ΟΓΚΩΝ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΜΕ
ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ**

**ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ Ι. ΚΥΡΙΑΖΟΓΛΟΥ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2010

« Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

**Στους γονείς μου Σοφία και Γιάννη,
στην αδερφή μου Άννα και
στην Μαρίνα .**

Πρόλογος

Ο καρκίνος αν και πολύ παλιά νόσος, εξακολουθεί παρόλη την πρόοδο των ιατροβιολογικών επιστημών, να είναι μια από τις σημαντικότερες ασθένειες της εποχής μας, όχι μόνο από πλευράς νοσηρότητας και θνησιμότητας, αλλά και από ψυχολογικής, κοινωνικής και οικονομικής πλευράς.

Μια μεγάλη προσπάθεια γίνεται διεθνώς, αφενός μεν για να μελετήσει τους μηχανισμούς της ογκογένεσης, αφετέρου δε να ανακαλύψει χρήσιμους για την κλινική διάγνωση και πρόγνωση γενετικούς δείκτες.

Τα σαρκώματα, κακοήθεις όγκοι μεσεγχυματικής προέλευσης και οι αντίστοιχοι καλοήθεις όγκοι, παρουσιάζουν ένα αυξημένο ενδιαφέρον για τον ερευνητή γιατί: 1. οι όγκοι αυτοί παρουσιάζονται κυρίως σε νέους και παιδιά, 2. υπάρχουν ήδη αποτελέσματα της γενετικής έρευνας εξαιρετικά χρήσιμα στην κλινική πρακτική και 3. τα αποτελέσματα όμως αυτά είναι ποσοτικά περιορισμένα, που σημαίνει ότι υπάρχει ένα μεγάλο πεδίο έρευνας πολλά υποσχόμενο.

Για τους λόγους αυτούς θεωρώ την επιλογή του θέματος της διδακτορικής μου διατριβής και την υλοποίησή της εξαιρετικά σημαντική για μένα, γιατί μέσα από αυτή την προσπάθεια αυξήθηκε όχι μόνο η γενικότερη αγάπη μου για τη Γενετική, αλλά ήλθα σε επαφή στην πράξη, με τον εξαιρετικά χρήσιμο και ενδιαφέροντα τομέα της Ιατρικής Γενετικής. Ευχαριστώ επομένως θερμά όσους συνετέλεσαν στην υλοποίηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής:

Πρώτα από όλα, την Καθηγήτρια Παθολογικής ανατομίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κυρία Νίκη Ι. Αγνάντη, για την ανάθεση του θέματος, τις εποικοδομητικές της συμβουλές, που με την επιστημονική γνώση, την ευρυμάθεια, την πλατύτητα σκέψης, που την διακρίνει και την διαρκή στήριξη της σε όλη την διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής υπήρξε για μένα ένα πρότυπο Ακαδημαϊκού Δασκάλου και Ανθρώπου μοναδικό. Ως υπεύθυνη της τριμελούς επιτροπής αυτής της διδακτορικής διατριβής με στήριξε σε κάθε στιγμή όπου τη χρειάστηκα και η άσογη συνεργασία μαζί της ήταν το βασικό στοιχείο της επιτυχούς, ομαλής διεξαγωγής και περάτωσης της διατριβής μου.

Ιδιαίτερα τον Αναπληρωτή Καθηγητή Παθολογικής ανατομίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κύριο Δημήτριο Στεφάνου, για την πολύτιμη βοήθειά του σε κάθε στιγμή που του ζητήθηκε.

Απαραίτητα, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ιατρικής Γενετικής και διευθυντή του τμήματος Γενετικής του Νοσοκομείου ο «Άγιος Σάββας», κύριο Νίκο Πανδή για τη συνεχή παρακολούθηση και καθοδήγηση των πειραματικών εργασιών, αλλά και για την προσωπική του προσπάθεια στην μύηση των γενετικών εννοιών και στη γραπτή απόδοση τους. Οι πολυπληθείς γνώσεις και συμβουλές που μου παρείχε συνετέλεσαν στην εισαγωγή μου στην Ογκολογική Γενετική, αλλά και στη διαμόρφωση της προσωπικότητάς μου ως επιστήμονα και ως ανθρώπου γενικότερα.

Με όλη μου την καρδιά τη Δρ Ελένη Ρίζου και το Δρ Ευθύμιο Δημητριάδη, οι οποίοι με βοήθησαν στο πειραματικό μέρος της διατριβής μου, με δίδαξαν τις τεχνικές της κυτταρογενετικής, της μοριακής κυτταρογενετικής και της μοριακής βιολογίας, υπερβαίνοντας πολλές φορές το ωράριό τους και τις αρμοδιότητές τους για να με καθοδηγήσουν στο έργο μου.

Όλο το προσωπικό του τμήματος Γενετικής του Νοσοκομείου «ο Άγιος Σάββας» και ιδιαίτερα τις τεχνολόγους κυρίες Αλεξάνδρα Παπακώστα, Βαρβάρα Κλαρνέτα και Αιμιλία Φίλη, για οποιαδήποτε βοήθεια μου παρείχαν και οποιαδήποτε απορία μου έλυσαν. Με έκαναν να νιώσω ευχάριστα δημιουργώντας ένα κλίμα άψογης συνεργασίας τόσο από επαγγελματικής πλευράς, όσο και από ανθρώπινης πλευράς, μέσα σε ένα εργασιακό χώρο.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Δ.Σ του Α.Ο.Ν.Α «ο Άγιος Σάββας» και ιδιαίτερα τον διοικητικό Διευθυντή κύριο Ανδρέα Σιγάλα, για την άδεια εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής στο τμήμα Γενετικής του Νοσοκομείου.

Τελευταίοι αλλά όχι έσχατοι, είναι οι δικοί μου άνθρωποι. Ο παππούς μου Γιώργος και οι γιαγιάδες μου Άννα, Βάσω και Ασπασία γιατί πάντα με είχαν στην καρδιά και στο μυαλό τους. Ιδιαίτερα, ευχαριστώ το θείο μου Άγγελο για τη συμβολή του στην εκτύπωση της διατριβής. Οι γονείς μου Γιάννης και Σοφία, η αδερφή μου Άννα και η σύντροφός μου Μαρίνα στάθηκαν όλο το διάστημα δίπλα μου. Με ενθάρρυναν, με στήριξαν και συγχώρεσαν την ιδιαίτερη ψυχολογική φόρτιση που μπορεί να είχα σε στιγμές δύσκολες.

Ειδικότερα, θέλω να ευχαριστήσω τους γονείς μου γιατί σε αυτούς χρωστάω την παιδεία και την πρόοδό μου και τους αφιερώνω αυτή την διατριβή. Ξέρω ότι πάντα ήταν, είναι και θα είναι δίπλα μου και ελπίζω να τους κάνω περήφανους.

Σε όλους τους παραπάνω αναφερόμενους Καθηγητές, συναδέλφους, φίλους και συγγενείς θα ήθελα να εκφράσω τις πιο θερμές μου ευχαριστίες και την ευγνωμοσύνη μου για τη συνδρομή τους.

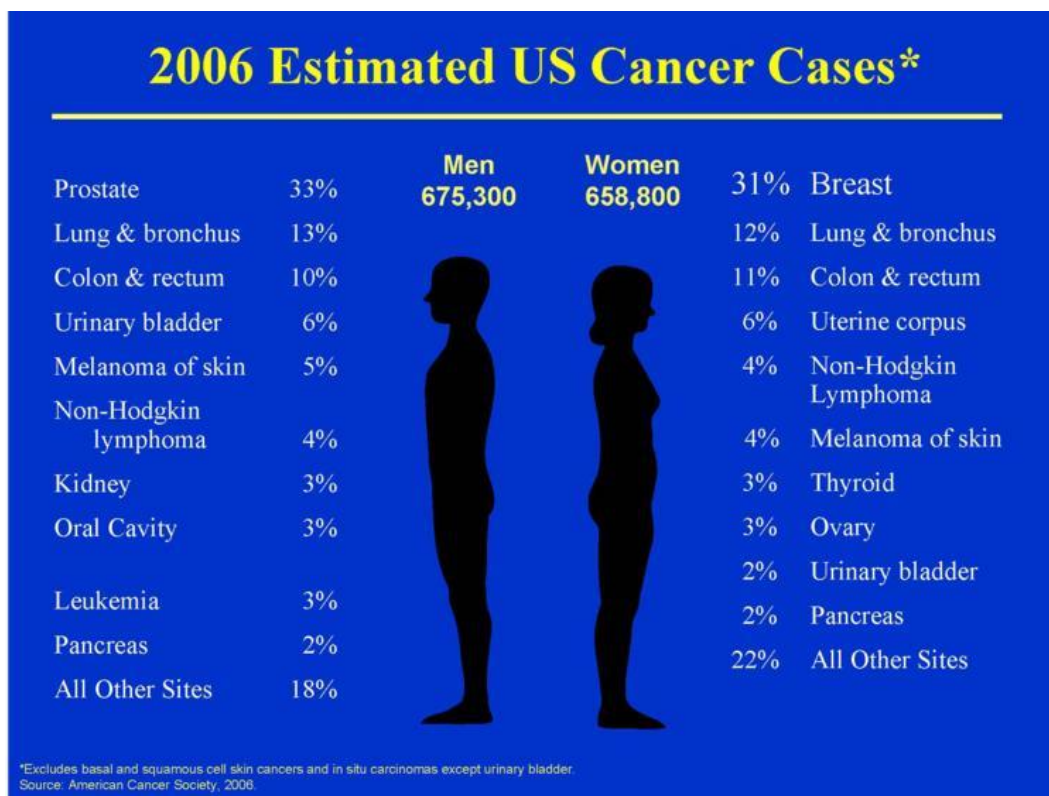
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

	Σελίδα
I. Ο καρκίνος – γενικά στοιχεία	1
II. Καρκίνος γενετική ασθένεια	4
III. Γενετικές ανωμαλίες στον καρκίνο	7
i. Χρωμοσώματα	7
ii. Γονίδια	11
IV. Τεχνικά και μεθοδολογικά προβλήματα των γενετικών προσεγγίσεων	20
V. Μεσεγχυματογενείς όγκοι	23
1. Όγκοι των μαλακών μορίων	25
2. Όγκοι των οστών	46
VI. Συμβολή της Γενετικής στη διάγνωση, πρόγνωση και θεραπεία των μεσεγχυματογενών όγκων. Προοπτικές για το μέλλον.	61
VII. Σκοπός	66
VIII. Υλικά και μέθοδοι	68
1. Υλικό	68
2. Κυτταρογενετική μεθοδολογία	68
3. Μεθοδολογία in situ υβριδισμού (mFISH, mBAND)	72
4. Μεθοδολογία συγκριτικού γενωμικού υβριδισμού (CGH)	74
5. Μοριακή μεθοδολογία	77
IX. Αποτελέσματα	90
X. Συζήτηση	116
XI. Συμπεράσματα	132
XII. Περίληψη ελληνική, αγγλική	134
XIII. Βιβλιογραφία	138

I. Ο καρκίνος – γενικά στοιχεία

Ο καρκίνος είναι μία πολύ παλιά ασθένεια. Ίχνη συμβατά με αυτό που σήμερα ονομάζουμε καρκίνο έχουν βρεθεί σε σκελετούς δεινοσαύρων που έζησαν στο πλανήτη μας σχεδόν πριν 60 εκατομμύρια χρόνια. Περιγραφές καρκίνου παρουσιάζονται σε σχέδια και γραπτά πολλών αρχαίων λαών. Καρκίνοι του σκελετικού συστήματος έχουν βρεθεί σε απομεινάρια από αιγυπτιακές μούμιες. Γραπτά του Ιπποκράτη περιέχουν περιγραφές και υποδείξεις αντιμετώπισης του καρκίνου. Οι επισημάνσεις αυτές είναι φανερό ότι στοιχειοθετούν την άποψη πως ο καρκίνος είναι μια πολύ παλιά ιστορία και οι ιατροί της εποχής γνώριζαν τι σημαίνει καρκίνος καθώς και τις θανατηφόρες συνέπειές του¹.

Κλινικά, ο καρκίνος περιλαμβάνει ένα μεγάλο σύνολο παθήσεων, περισσότερες από 100, οι οποίες ποικίλουν στην ηλικία εμφάνισης, το ρυθμό ανάπτυξης, το στάδιο της κυτταρικής διαφοροποίησης, την διεισδυτικότητα, το μεταστατικό δυναμικό, την πρόγνωση, την δυνατότητα διάγνωσης και την απόκριση στη θεραπεία². Ο καρκίνος μαζί με τα καρδιαγγειακά νοσήματα αποτελούν τις συχνότερες από πλευράς νοσηρότητας και θνησιμότητας ασθένειες στον δυτικό κόσμο. Προσβάλλει περισσότερο από το 1/3 του πληθυσμού, ευθύνεται για το 20% των θανάτων και στις ανεπτυγμένες χώρες απορροφά τουλάχιστον το 10% των συνολικών δαπανών για ιατρική περίθαλψη. Έντεκα εκατομμύρια νέες περιπτώσεις καρκίνου διαγνώστηκαν παγκοσμίως το 2002 και από αυτές το ¼ αφορούσε στην Ευρώπη. Σύμφωνα με το SEER (Surveillance Epidemiology and End Results) υπολογίζεται ότι το 40% των ανδρών και των γυναικών που γεννιούνται σήμερα θα διαγνωσθούν με καρκίνο σε κάποιο σημείο του σώματός τους κατά τη διάρκεια της ζωής τους. Η τεράστια λοιπόν, σημασία αυτής της ασθένειας που καταδεικνύεται από τα παράπανω περιληπτικά στοιχεία, οδηγεί σε μία μεγάλη προσπάθεια πρακτικής και ερευνητικής αντιμετώπισης της διεθνώς. Όμως παρά τις πολλές και αξιόλογες πληροφορίες, που συλλέγονται από χιλιάδες ερευνητικά προγράμματα που διεξάγονται ανά τον κόσμο και οδηγούν σε μια αναμφισβήτητη πρόοδο, ο καρκίνος εξακολουθεί να παραμένει ένα σημαντικό πρόβλημα υγείας. Εκτίμηση που υπογραμμίζεται μεταξύ των άλλων από το γεγονός ότι αποτελεί τη δεύτερη συχνότερη αιτία θανάτου στο σύγχρονο δυτικό κόσμο³.



Εικόνα 1.1: Συχνότητα των επιμέρους καρκίνων ανά όργανο στους άνδρες και τις γυναίκες των Η.Π.Α. το 2006

Ο καρκίνος μπορεί να συμβεί οποιαδήποτε στιγμή, αλλά κυρίως είναι μια πάθηση των μεγάλων σε ηλικία ανθρώπων. Σήμερα, σε ορισμένους καρκίνους η εμφάνισή τους εντοπίζεται σε μικρότερες ηλικίες από ότι στο παρελθόν. Η επίπτωσή του από το 1975 έχει αυξηθεί κατά 25%, όμως την τελευταία δεκαετία έχει παραμείνει σχετικά σταθερή, ενώ σε κάποιους καρκίνους, όπως του στομάχου, του τραχήλου της μήτρας στις γυναίκες και του πνεύμονα στους άνδρες, παρουσιάζει σταδιακή μείωση. Κατά μέσο όρο η διάγνωση των περισσότερων κοινών τύπων καρκίνου έρχεται στην ηλικία των 67 με τάσεις σημαντικής σήμερα μείωσης. Παρόλο που ο καρκίνος είναι σχετικά σπάνιος στα παιδιά, είναι μια από τις βασικές αιτίες θανάτου στις ηλικίες από 1 έως 14. Σε αυτή την ομάδα ηλικιών η λευχαιμία είναι η πιο κοινή αιτία θανάτου, ωστόσο παρατηρούνται και άλλοι καρκίνοι όπως το οστεοσάρκωμα, ο καρκίνος του Wilms και το λέμφωμα³.

Ο καρκίνος δεν είναι μια μόνο μορφή ασθένειας, αλλά αποτελεί την κοινή ονομασία μιας μεγάλης ποικιλίας νόσων, οι οποίες έχουν κοινό χαρακτηριστικό την διαταραχή του πληθυσμιακού ισοζυγίου κάποιου οργάνου ή ιστού του σώματος προς όφελος των νεοπλασματικών κυττάρων, είτε λόγω ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού, είτε λόγω αποπτωτικής απορύθμισης των τελευταίων⁴. Η ανεξέλεγκτη κυτταρική διαίρεση

καταλήγει στη δημιουργία μιας μάζας (όγκος) η οποία μπορεί να έχει καλοήγη ή κακοήγη χαρακτήρα. Ο καλοήγητης χαρακτήρας συνίσταται από την ανάπτυξη ενός νεοπλάσματος, το οποίο περιορίζεται στη θέση δημιουργίας του. Ενώ ο κακοήγητης χαρακτήρας σχετίζεται όχι μόνον με αυτόνομη αύξηση των κυττάρων, αλλά και την ιδιότητα να αποκτούν πρόσθετα νέα χαρακτηριστικά, να μπορούν να εισβάλλουν στους γειτονικούς ιστούς, και να μεταφέρονται σε πιο μακρινές θέσεις (μετάσταση). Μεταξύ των δυο αυτών καταστάσεων (καλοήγητης - κακοήγητης όγκος) είναι δυνατόν να προκύψουν και καλοήγη νεοπλάσματα με χαρακτήρα τοπικά επιθετικό.

Ο όρος καρκίνος είναι καταχρηστικός και απλουστευτικός και χρησιμοποιείται συλλήβδην για όλες τις μορφές κακοήγων νεοπλασμάτων, αν και αυστηρά επιστημονικά αναφέρεται μόνο στους συμπαγείς όγκους και ειδικά εκείνους της επιθηλιακής προέλευσης (καρκινώματα) ⁵. Υπό αυτή τη γενική έννοια μπορούμε να διακρίνουμε τον καρκίνο στις εξής βασικές μορφές: τα σαρκώματα, τα οποία είναι μεσεγχυματικής προελεύσεως νεοπλάσματα, τα καρκινώματα, τα οποία προέρχονται από επιθηλιακό ιστό και τις αιματολογικές κακοήθειες. Οι τελευταίες περιλαμβάνουν νεοπλάσματα του αιμοποιητικού ιστού (πχ λευχαιμίες) και λεμφοειδείς κακοήθειες όπως τα λεμφώματα, τα οποία σχηματίζουν και συμπαγείς όγκους. Πρέπει να τονιστεί ότι για τους συμπαγείς όγκους, δηλαδή σαρκώματα και καρκινώματα, οι γενετικές πληροφορίες είναι περιορισμένες συγκριτικά με τα αιματολογικά νεοπλάσματα⁶. Αυτό οφείλεται κατά κύριο λόγο στην δυνατότητα πρόσβασης στο βιολογικό υλικό που για τους συμπαγείς όγκους είναι πολλές φορές προβληματική.

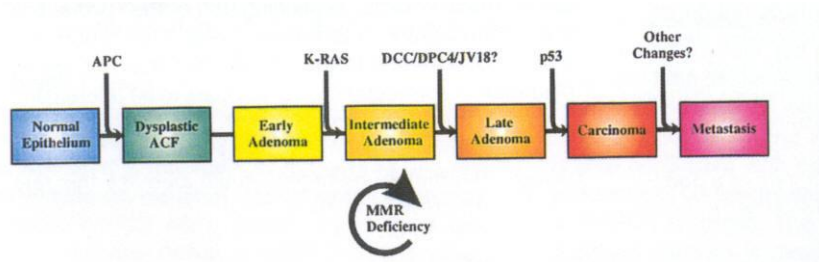
Αν και δεν είναι πλήρως γνωστοί μέχρι σήμερα για κάθε είδος όγκων οι αιτιογόνοι παράγοντες, από τη στιγμή που δεχόμαστε τις μεταλλάξεις ως το λόγο της δημιουργίας και της εξέλιξης του καρκίνου, τα βαθύτερα αίτια του καρκίνου τοποθετούνται στην πρόκληση μεταλλάξεων και αυτή είναι γνωστό από καιρό ότι οφείλεται στις επιδράσεις του περιβάλλοντος. Πολύ γνωστοί για παράδειγμα παράγοντες που προκαλούν τεκμηριωμένα καρκίνο είναι το κάπνισμα για τον καρκίνο του πνεύμονα και η ηλιακή ακτινοβολία για τον καρκίνο του δέρματος. Συνοπτικά, παράγοντες που έχουν αναφερθεί ότι συνδέονται άμεσα ή έμμεσα με τη δημιουργία και ανάπτυξη καρκίνου είναι η ακτινοβολία, ορισμένες χημικές ουσίες και οι ιοί⁷.

II. Καρκίνος γενετική ασθένεια

Έως σήμερα έχουν υπάρξει αρκετές, διαφορετικές μεταξύ τους, προσεγγίσεις για την ασθένεια αυτή, οι οποίες αντανakλούν το επίπεδο της εξέλιξης των γνώσεών μας σχετικά με τη νόσο. Αρχικά, ο καρκίνος θεωρήθηκε μια ασθένεια του ιστού ή του οργάνου στο οποίο εντοπιζόταν, στη συνέχεια μια κυτταρική ασθένεια και σήμερα θεωρείται ως γενετική ασθένεια⁴. Το τελευταίο τεκμηριώνεται από το γεγονός ότι τα κύτταρα όλων των όγκων φέρουν γενετικές ανωμαλίες (μεταλλάξεις). Αυτό δηλαδή που τελικά «πάσχει» είναι το γενετικό υλικό. Σήμερα είναι σαφές ότι οι μεταλλάξεις είναι αυτές που καθορίζουν τη γένεση και την εξέλιξή του. Η παρατήρηση αυτή έχει πλήρως πιστοποιηθεί και σε πειραματικά μοντέλα καρκινογένεσης. Δηλαδή, η τεχνητή πρόκληση μεταλλάξεων σε πειραματόζωα οδήγησε στην καρκινική εξαλλαγή⁸.

Ιστορικά, πρώτος ο παθολογοανατόμος Von Hanseman πρότεινε την άποψη ότι το γενετικό υλικό των καρκινικών κυττάρων σχετίζεται με την καρκινογένεση, όταν παρατήρησε πυρηνικές και μιτωτικές ανωμαλίες σε ιστολογικά παρασκευάσματα όγκων⁹. Το 1914 ο Theodor Boveri διατύπωσε τη **θεωρία της σωματικής μετάλλαξης** του καρκίνου. Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία ο όγκος είναι αποτέλεσμα μιας γενετικής βλάβης την οποία μεταβιβάζει και στα κύτταρα απογόνους του¹⁰. Σήμερα η θεωρία του Boveri έχει πλήρως αποδειχθεί. Οι μεγάλες εξελίξεις στη μοριακή βιολογία και γενετική φώτισαν πολλά σημαντικά ζητήματα της καρκινογένεσης συμβάλλοντας στην αποσαφήνιση των μηχανισμών δημιουργίας των σχετικών φαινομένων. Η βασική κλινική παρατήρηση ότι «ο καρκίνος είναι νόσος πολυσταδιακή και πολυπαραγοντική» έχει όχι μόνο πιστοποιηθεί σε γενετικό επίπεδο, αλλά και ερμηνευθεί¹¹. Πράγματι, σήμερα γνωρίζουμε ότι η διαδικασία της καρκινογένεσης οφείλεται στην σταδιακή διαδοχική συσσώρευση μεταλλάξεων του γενετικού υλικού, η οποία προκαλείται από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Αυτές οι μεταλλάξεις είναι υπεύθυνες για αλλαγές στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και του αποπτωτικού μηχανισμού των καρκινικών κυττάρων¹². Αν και δεν είναι γνωστή η διαδικασία της ογκογένεσης για όλους τους καρκίνους, εν τούτοις για ορισμένους από αυτούς γνωρίζουμε τη σχέση τους με συγκεκριμένες μεταλλάξεις. Ένα τεκμηριωμένο παράδειγμα είναι αυτό της καρκινογένεσης του καρκίνου του παχέος εντέρου. Οι Fearon ER και Vogelstein B πρότειναν πριν από μερικά χρόνια¹³ ένα μοντέλο καρκινογένεσης αυτού του όγκου που τροποποιήθηκε και από άλλους επιστήμονες¹⁴. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, η μετάβαση από το ομαλό επιθήλιο στο αδένωμα και

τελικά στο καρκίνωμα προκαλείται από μια αλληλουχία γενετικών αλλαγών των γονιδίων APC, K-RAS, DCC, P53.



Εικόνα II.1: σχηματική αναπαράσταση των γενετικών αλλαγών που συμβαίνουν στον καρκίνο του παχέος εντέρου

Ο Weinberg και οι συνεργάτες του κατάφεραν να μετατρέψουν ομαλά ανθρώπινα κύτταρα σε καρκινικά μέσα σε καλλιεργητικές φιάλες με συνδυασμό γενετικών αλλαγών^{8, 15}. Αν και τα συστήματα *in vitro* απέχουν από την *in vivo* κατάσταση, αυτό το οποίο πρέπει να υπογραμμιστεί είναι ότι ο καρκίνος είναι πια ξεκαθαρισμένο ότι είναι αποτέλεσμα του συνδυασμού περισσότερων από μιας γενετικών αλλαγών. Η κατανόηση του πολυγονιδιακού χαρακτήρα του καρκίνου, της μακρόχρονης πορείας, η οποία διανύεται και της σχέσης των περιβαλλοντικών παραγόντων (εξωτερικού και εσωτερικού περιβάλλοντος του οργανισμού) φωτίζει τώρα μεταξύ των άλλων και μια ειδική, αλλά ταυτόχρονα σημαντική κατηγορία όγκων, αυτήν του κληρονομούμενου καρκίνου με σημαντικές συνέπειες για την αντιμετώπισή του.

Ο κληρονομούμενος καρκίνος αν και αποτελεί αριθμητικά ένα μικρό ποσοστό του συνόλου του καρκίνου, περίπου 8 – 10%, εντούτοις παρουσιάζει ένα τεράστιο ενδιαφέρον τόσο από θεωρητική πλευρά, όσο και πρακτική υπό την έννοια της λεγόμενης **ασυμπτωματικής διάγνωσης**¹⁶. Αν και το ζήτημα αυτό είναι τεράστιο, δύο τουλάχιστον σημεία είναι πολύ βασικά, τα οποία άλλωστε στην ουσία αποτελούν και την ειδοποιό διαφορά μεταξύ σποραδικού και κληρονομούμενου καρκίνου. Το πρώτο αφορά το αντικείμενο της κληρονομικότητας. Αυτό που κληρονομείται δεν είναι ο καρκίνος, αλλά η προδιάθεση ή ευαισθησία στον καρκίνο και πρέπει να υπογραμμισθεί. Γιατί αυτό που μεταβιβάζεται από γενεά σε γενεά είναι μόνο μια μετάλλαξη σε ένα συγκεκριμένο γονίδιο πχ στο BRCA1 ή 2 στον καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών. Μια μετάλλαξη όμως αναφέρθηκε ότι από μόνη της δεν προκαλεί καρκίνο, αλλά είναι απαραίτητες και άλλες. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι υπάρχει προδιάθεση, υπό την έννοια ότι το γενετικό υλικό είναι ήδη εκ γενετής επιβεβαρημένο και επομένως ο φορέας μιας μετάλλαξης πολύ

συντομότερα, από κάποιον άλλο που εκτίθεται σε παρόμοιους περιβαλλοντικούς παράγοντες μπορεί να αναπτύξει καρκίνο. Ο φορέας λοιπόν, μιας κληρονομούμενης μετάλλαξης είναι ένα πιο ευαίσθητο άτομο για την απόκτηση καρκίνου.

Μια άλλη σημαντική διαφορά του κληρονομικού καρκίνου από τον σποραδικό είναι ότι η πρώτη, η εναρκτήρια μετάλλαξη, εφόσον κληρονομείται, από τα κύτταρα της γεννητικής σειράς μέσω του γονιμοποιημένου ωαρίου, κατά τη διαδικασία της εμβρυογένεσης διαχέεται σε όλο τον οργανισμό και επομένως υπάρχει σε όλα τα κύτταρά του, ενώ στο σποραδικό καρκίνο όλες οι γενετικές βλάβες περιορίζονται στο παρέγχυμα του όγκου¹⁷. Εκτός από την πρακτική πλευρά του ζητήματος, η οποία είναι η διευκόλυνση της γενετικής διάγνωσης από το περιφερικό αίμα μόνο, το σημαντικό είναι ότι ερμηνεύει φαινόμενα τα οποία είχαν μεν παρατηρηθεί, αλλά όχι κατανοηθεί πλήρως, πολύ βασικά εντούτοις για την αντιμετώπιση της νόσου. Ένα τέτοιο φαινόμενο είναι η ύπαρξη ανεξάρτητων όγκων στον ίδιο ασθενή και ύπαρξη μιας ευρύτερης ομάδας όγκων στην οικογένεια ώστε σήμερα να μιλάμε με την αυστηρά επιστημονική γλώσσα για κληρονομούμενα καρκινικά σύνδρομα και όχι για κληρονομούμενο καρκίνο¹⁶. Η ύπαρξη περισσότερων του ενός όγκων στο άτομο ή στην οικογένεια στον κληρονομούμενο καρκίνο οφείλεται ακριβώς στο γεγονός ότι η κληρονομούμενη μετάλλαξη υπάρχει σε όλα τα κύτταρα του οργανισμού και η επιλεκτικότητα της εμφάνισής της ή όχι εξαρτάται αφενός μεν από το σε ποιο ιστό ή όργανο τα γονίδια εκφράζονται, αφετέρου δε από περιβαλλοντικούς παράγοντες.

III. Γενετικές ανωμαλίες στον καρκίνο

Οι γενετικές ανωμαλίες που παρατηρούνται στον καρκίνο εντοπίζονται σε χρωμοσωμικό και σε μοριακό επίπεδο. Η ανακάλυψη και ο χαρακτηρισμός αυτών των ανωμαλιών αποτελεί το μείζονα στόχο της Ογκολογικής Γενετικής. Η σημασία τους είναι ανεκτίμητη καθώς χρησιμοποιούνται πλέον στη διάγνωση, στην πρόγνωση και στην παρακολούθηση πολλών τύπων καρκίνου¹⁸.

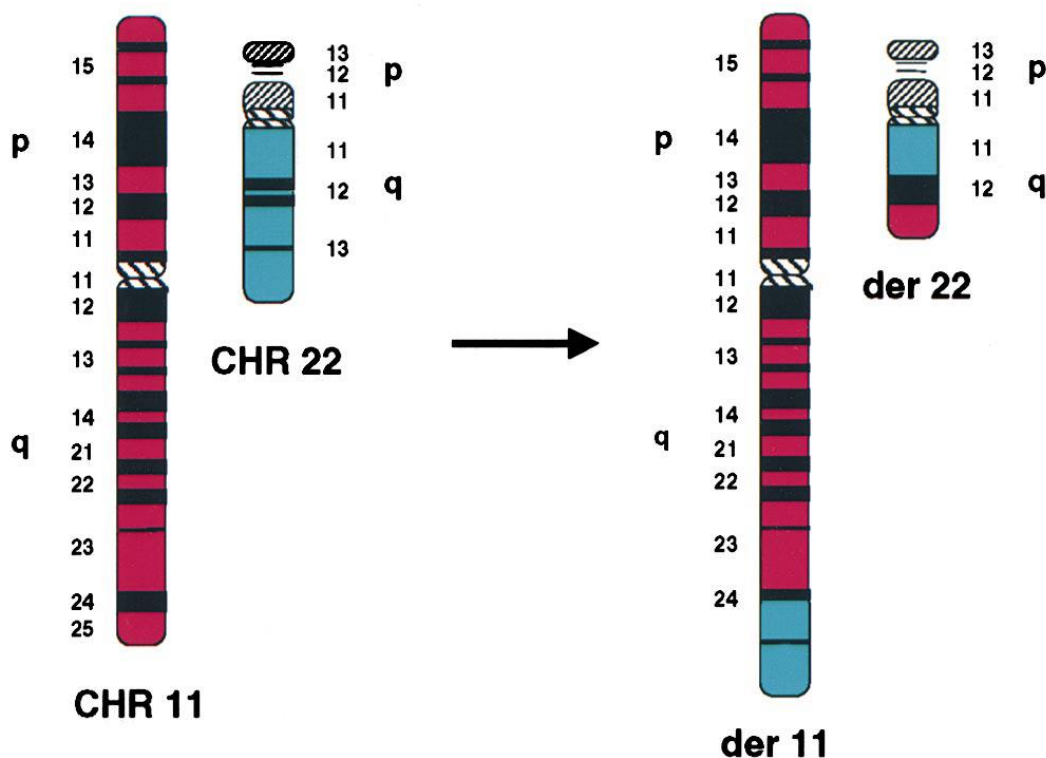
Οι ανωμαλίες των χρωμοσωμάτων έχουν πάντοτε τελικό αποτέλεσμα και την ανωμαλία στα γονίδια, χωρίς όμως να ισχύει το αντίστροφο. Πρέπει να σημειωθεί ότι καρκινογένεση δεν προκαλούν όλες οι βλάβες του γενετικού υλικού. Επειδή, σε τελευταία ανάλυση τον καθοριστικό ρόλο έχουν τα προϊόντα των γονιδίων, δηλαδή οι πρωτεΐνες τις οποίες κωδικοποιούν, σημασία έχουν οι μεταλλάξεις σε περιοχές των γονιδίων τα οποία εκφράζονται. Επομένως, όλες οι μεταλλάξεις δεν έχουν την ίδια σημασία. Μια μετάλλαξη σε ένα εσώνιο (σιωπηλή μετάλλαξη) ή μια μετάλλαξη που δεν οδηγεί σε αλλαγή της πρωτεϊνικής δομής και λειτουργίας (ουδέτερη μετάλλαξη), ουδεμία επίπτωση έχουν στον κυτταρικό φαινότυπο και επομένως δεν είναι παθογόνες⁵. Τις μεταλλάξεις μπορούμε να τις διακρίνουμε σε χρωμοσωμικές και γονιδιακές.

i. Χρωμοσώματα

Οι χρωμοσωμικές μεταλλάξεις διακρίνονται σε:

Αριθμητικές, δηλαδή ύπαρξη επιπλέον χρωμοσωμάτων ή απώλειά τους.

Δομικές, δηλαδή θραύση ενός ή περισσότερων χρωμοσωμάτων σε κάποιο σημείο και την ανακατάταξη, την απώλεια ή και την προσθήκη γενετικού υλικού σε ένα χρωμόσωμα ή τη μετατόπιση γενετικού υλικού από ένα χρωμόσωμα σε ένα άλλο¹⁸.



t(11;22)(q24;q12)

Εικόνα III.1: σχηματική αναπαράσταση της μετάθεσης t(11;22)(q24;q12), η οποία εντοπίζεται στο σάρκωμα Ewing

Στην Ογκολογική Γενετική, όπου οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες εντοπίζονται μόνο στο παρέγχυμα του όγκου είναι αναγκαίο να υπάρξουν πρόσθετες κατηγοριοποιήσεις. Έτσι, οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες που εντοπίζονται διακρίνονται σε κλωνικές και μη κλωνικές. Κλώνος θεωρείται ένας κυτταρικός πληθυσμός που προέρχεται από ένα πρόγονο κύτταρο. Ένας κλώνος δεν είναι και απαραίτητα ομογενής είτε καρυοτυπικά είτε φαινοτυπικά, καθώς μπορεί να έχουν δημιουργηθεί διάφοροι υποκλώνοι κατά την εξέλιξη του όγκου. Κλωνικές θεωρούνται οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες που υπάρχουν τουλάχιστον δυο φορές, ενώ αν πρόκειται για έλλειψη χρωμοσώματος τότε πρέπει να βρεθεί τουλάχιστον τρεις. Στη συνέχεια οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες διακρίνονται σε πρωτογενείς, δευτερογενείς και στον κυτταρογενετικό θόρυβο. Οι πρωτογενείς χρωμοσωμικές ανωμαλίες εντοπίζονται ως οι μοναδικές ανωμαλίες ενός νεοπλάσματος και συχνά σχετίζονται ειδικά με κάποιο συγκεκριμένο τύπο νεοπλάσματος. Είναι οι πρώτες αλλαγές που παρατηρούνται στα καρκινικά κύτταρα και έχουν αιτιακό ρόλο στην ογκογένεση. Οι δευτερογενείς ανωμαλίες βρίσκονται σπάνια έως ποτέ μόνες τους και αναπτύσσονται σε κύτταρα που ήδη έχουν μια πρωτογενή ανωμαλία. Σε προχωρημένα

στάδια της ασθένειας μπορεί να είναι τόσες πολλές που να κυριαρχούν στον καρυότυπο. Ο όρος κυτταρογενετικός θόρυβος, τέλος χρησιμοποιείται για να χαρακτηρίσει εκτεταμένες μη κλωνικές ανωμαλίες¹⁸.

Είναι σημαντικό ότι η σημασία των ανωμαλιών αυτών δεν είναι ακριβώς η ίδια στην Ογκολογική Γενετική και στην Προγεννητική Γενετική, πχ μια έλλειψη ενός αυτοσωμικού χρωμοσώματος είναι σπάνια και δεν είναι συμβατή με τη ζωή στην προγεννητική γενετική. Αντίθετα, αυτό είναι συχνό φαινόμενο στην Ογκολογική Γενετική και επιπρόσθετα δεν σημαίνει το θάνατο των καρκινικών κυττάρων. Υποθέσεις για τη σημασία των αριθμητικών ανωμαλιών στην Ογκολογική Γενετική υπάρχουν, χωρίς όμως να υπάρχει μια σαφής απόδειξη για το ρόλο τους όπως συμβαίνει με πληθώρα δομικών ανωμαλιών. Παρόλα αυτά είναι φανερό ότι η απουσία ενός ή περισσότερων χρωμοσωμάτων έχει ως τελικό αποτέλεσμα την απώλεια ενός σετ γονιδίων που εδράζονται στα αντίστοιχα χρωμοσώματα. Επιπλέον χρωμόσωμα ή χρωμοσώματα έχει ως αποτέλεσμα περισσότερα αντίγραφα του συνόλου των γονιδίων αυτών των χρωμοσωμάτων ¹⁸. Οι ομογενώς χρωσμένες περιοχές (hsrs, homogenously stained regions) είναι περιοχές σε ένα χρωμόσωμα που βάφονται ομοιόμορφα (χωρίς banding), γι' αυτό και έχουν αυτό το όνομα και θεωρείται ότι είναι το χρωμοσωμικό ισοδύναμο της γονιδιακής ενίσχυσης (gene amplification). Επίσης, και οι διπλοί χρωμοσωμικοί κόκκοι (double minutes) αντιπροσωπεύουν τη γονιδιακή ενίσχυση στο χρωμοσωμικό επίπεδο¹⁹. Όσον αφορά τώρα στις δομικές ανωμαλίες, οι ισοζυγισμένες αμοιβαίες μεταθέσεις μεταξύ χρωμοσωμάτων, οι εισχωρήσεις (insertions) ενός τμήματος χρωμοσώματος σε κάποιο άλλο και οι αναστροφές, προκαλούν είτε αλλαγές στη θέση των γονιδίων είτε τη δημιουργία υβριδικών γονιδίων. Στην πρώτη περίπτωση το αποτέλεσμα είναι η μεταφορά ενός γονιδίου σε μια νέα γενετική θέση υπό την ρύθμιση ενός νέου υποκινητή, με τελικό αποτέλεσμα την υπερέκφραση του γονιδίου αυτού, δηλαδή παράγεται μια φυσιολογική πρωτεΐνη αλλά σε αφύσικα μεγάλη ποσότητα. Στη δεύτερη περίπτωση, το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία μιας νέας χιμαιρικής πρωτεΐνης.

Μια χρωμοσωμική ανωμαλία μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση γονιδίων που ενέχονται στην ογκογενετική διαδικασία. Αυτό μπορεί να συμβεί με τους τρόπους που περιγράφονται παρακάτω.

Πίνακας III.1. Περιγραφή και συμβολισμός των συνηθέστερων δομικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών²⁰

Χρωμοσωμική ανωμαλία	Περιγραφή	ISCN 2005
Προσθήκη	Προσθήκη χρωμοσωμικού υλικού άγνωστης προέλευσης	Addition/ (add)
Έλλειψη	Έλλειψη χρωμοσωμικού υλικού είτε εντός είτε στο άκρο του χρωμοσώματος	Deletion/ (del)
Δευτερογενές Χρωμόσωμα	Δομικά ανακαταταγμένο χρωμόσωμα που προκύπτει από αλλαγές εντός ενός χρωμοσώματος ή από μη ισοζυγισμένες ανακατατάξεις όπου ενέχονται δύο ή περισσότερα χρωμοσώματα	Derivative chromosome/ (der)
Δικεντρικό Χρωμόσωμα	Ανώμαλο χρωμόσωμα που έχει δύο κεντρομερίδια	Dicentric chromosome/ (dic)
Διπλοί χρωμοσωμικοί Κόκκοι	Μικροί χρωμοσωμικοί σχηματισμοί, χωρίς Κεντρομερίδιο, που υπάρχουν σε πολλαπλά αντίγραφα	Double minutes/(dmin)
Διπλασιασμός	Διπλασιασμός χρωμοσωμικού τμήματος	Duplication/ (dup)
Ομογενώς χρωσμένα Περιοχή	Ομογενώς χρωσμένα χρωμοσωμικά τμήματα το μέγεθος των οποίων ξεπερνά τη φυσιολογική χρωμοσωμική ζώνη	Homogeneously staining region/ (hsr)
Ισοχρωμόσωμα	Χρωμόσωμα που αποτελείται από δύο ομόλογα πανομοιότυπα μεταξύ τους σκέλη συμμετρικά το ένα του άλλου	Isochromosome/ (i)
Αναστροφή	Περιστροφή ενός χρωμοσωμικού τμήματος κατά 180°	Inversion/(inv)
Εισχώρηση ή Παρεμβολή	Ένα χρωμοσωμικό τμήμα έχει παρεμβληθεί σε μία διαφορετική θέση στο ίδιο ή σε άλλο χρωμόσωμα	Insertion/(ins)

Χρωμόσωμα Δείκτης	Δομικά ανώμαλο χρωμόσωμα που δεν μπορεί να αναγνωριστεί η προέλευση κανενός τμήματός του	Marker chromosome/ (mar)
Δακτυλιοειδές ή Χρωμόσωμα Δακτύλιος	Κυκλικό χρωμόσωμα που έχει προέλθει από σπάσιμο και επανασυγκόλληση δύο χρωμοσωμικών σκελών	Ring chromosome/ (ring)
Μετάθεση	Μεταφορά χρωμοσωμικού υλικού από ένα χρωμόσωμα σε άλλο	Translocation/(t)

ii. Γονίδια

Οι διάφοροι τύποι χρωμοσωμικών ανακατατάξεων που ανιχνεύονται μπορεί να έχουν διαφορετικές παθογενετικές συνέπειες σε μοριακό επίπεδο. Οι γνώσεις της μοριακής βάσης του καρκίνου αναπτύσσονται ραγδαία και ολοένα περισσότερα γονίδια εντοπίζονται που συνδέονται με την καρκινογένεση ή που ενέχονται στην εξέλιξη και καθορίζουν την συμπεριφορά του όγκου. Αν και τα μέχρι σήμερα δεδομένα είναι πιθανόν να οδηγούν σε υπεραπλουστεύσεις, από τις διάφορες κατηγοριοποιήσεις που αναφέρονται στα γονίδια που συνδέονται με τον καρκίνο, η πλέον δόκιμη είναι αυτή που αναφέρεται στα ογκογονίδια, στα ογκοκατασταλτικά και στα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA.

Τα ογκογονίδια είναι φυσιολογικά γονίδια που σχετίζονται με την κυτταρική ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό. Τα περισσότερα ογκογονίδια είναι μεταλλαγμένες μορφές των φυσιολογικών γονιδίων, τα οποία ονομάζονται πρωτοογκογονίδια και περιλαμβάνονται στον έλεγχο του φυσιολογικού κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης. Η ενεργοποίησή τους οφείλεται σε μεταλλάξεις και οδηγεί στην καρκινική εξαλλαγή. Αρκεί μια μετάλλαξη στο ένα από τα αλληλόμορφα για να εκδηλωθεί το φαινόμενο, επομένως η δράση τους σε κυτταρικό επίπεδο είναι επικρατής¹⁸. Τα ογκογονίδια κατηγοριοποιούνται ανάλογα με τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης που κωδικοποιούν και τη θέση τους στο κύτταρο. Έτσι, αναφερόμαστε σε αυξητικούς παράγοντες, υποδοχείς αυξητικών παραγόντων, πρωτεΐνες προσδεμένες σε GTP,

υποδοχείς κινάσης της τυροσίνης (*ABL*, *KIT*), κυτταροπλασματικά ογκογονίδια (*RAS*) , πυρηνικά ογκογονίδια (*FOS*, *JUN*, *ERB-A*) και αποπτωτικά ογκογονίδια.

Ένας σημαντικός μηχανισμός με τον οποίο απορυθμίζονται τα ογκογονίδια είναι η γονιδιακή ενίσχυση (gene amplification), η οποία έχει ως αποτέλεσμα την ύπαρξη πολλαπλών αντιγράφων του συγκεκριμένου γονιδίου και με αυτό τον τρόπο επάγεται η αυξημένη έκφρασή του²¹. Δημιουργείται με διπλασιασμό ή πολλαπλασιασμό συγκεκριμένης χρωμοσωμικής περιοχής ή και ολοκλήρου χρωμοσώματος²². Κατ' αναλογία, τα γονίδια που ευρίσκονται σε αυτή την περιοχή εμφανίζουν πολλαπλά αντίγραφα. Με αυτό τον τρόπο ογκογονίδια (*ERBB2*, *MYC*) καθώς και γονίδια ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου (*CCND1*) εμφανίζονται σε περισσότερα από τα δύο αντίτυπα με αποτέλεσμα την εκτροπή από το φυσιολογικό τους ρόλο και την έναρξη της ογκογένεσης^{23, 24}. Η ποσότητα του DNA που περιέχεται σε περιοχές με γονιδιακή επέκταση κυμαίνεται μεταξύ 0,5-10Mb²⁵. Η ογκογόνος δράση γονιδίων που έχουν υποστεί γονιδιακή επέκταση αποδείχθηκε σε πειράματα με διαγονιδιακά ποντίκια, στα οποία το *ERBB2* γονίδιο βρισκόταν σε πολλαπλά αντίγραφα και προκαλούσε τη δημιουργία καρκίνου του μαστού. Χαρακτηριστικά παραδείγματα γονιδίων των οποίων η γονιδιακή επέκταση σχετίζεται με συγκεκριμένους όγκους είναι το ογκογονίδιο *AKT2* στον καρκίνο των ωοθηκών, το *ERBB2* στον καρκίνο του μαστού²³, το *MYCL1* στο μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα²⁶, το *MYCN* στο νευροβλάστωμα²⁷, το *EGFR* στο γλίομα²⁸ και το *REL* στο Hodgkin λέμφωμα²⁹. Πρέπει να σημειωθεί όμως ότι το ποσοστό των υπερεκφρασμένων γονιδίων σε περιοχές με γονιδιακή ενίσχυση ποικίλει ανάλογα με τον τύπο όγκου που μελετάται, πχ στον καρκίνο του προστάτη η υπερέκφραση γονιδίων σε περιοχές με γονιδιακή ενίσχυση έφτανε το 19%, ενώ στον καρκίνο του μαστού το 62%. Ο Pollack και οι συνεργάτες υπολόγισαν ότι κατά μέσο όρο μια αύξηση των γονιδιακών αντιγράφων κατά 2 φορές αντιστοιχεί σε 1,5 φορά αύξηση στο επίπεδο του mRNA των γονιδίων³⁰. Το φαινόμενο της γονιδιακής ενίσχυσης, το οποίο είναι συχνότερο στους συμπαγείς όγκους, σχετίζεται με κακή πρόγνωση όταν εντοπίζεται σε προχωρημένα στάδια της νόσου. Ειδικότερα για τους όγκους των οστών και των μαλακών μορίων αναφέρεται ότι εμφανίζουν γονιδιακή ενίσχυση 5,8 φορές περισσότερο από τις αιματολογικές κακοήθειες³¹. Επιπλέον, γονιδιακή ενίσχυση έχει παρατηρηθεί και σε περιπτώσεις ανάπτυξης αντοχής των καρκινικών κυττάρων στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Η ενίσχυση των γονιδίων *CAD* και *DHFR* έχει βρεθεί σε πειράματα κυτταρικών σειρών στα οποία αναπτύσσεται αντοχή στη μεθοτρεξάτη.^{32, 33} Ακόμη έχει

αναφερθεί γονιδιακή ενίσχυση του υβριδικού γονιδίου *BCR/ABL* ως μηχανισμού αντοχής στη θεραπεία με ιματινίμη³⁴.

Άλλος μηχανισμός περιλαμβάνει την ύπαρξη σημειακών μεταλλάξεων, οι οποίες σχηματίζουν ανώμαλες πρωτεΐνες που δεν πραγματοποιούν τη φυσιολογική λειτουργία τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ύπαρξη μεταλλάξεων στο γονίδιο *cKIT*³⁵ και στο γονίδιο *Kras*³⁶. Το *cKIT* κωδικοποιεί ένα διαμεμβρανικό υποδοχέα της τυροσινικής κινάσης. Η αυτοφωσφορύλωση του *cKIT* είναι το αρχικό βήμα για την ενδοκυττάρια μεταγωγή του σήματος. Στη συνέχεια, ενεργοποιούνται τα *PI3K*, *MAPK* και *JAK/STAT* μονοπάτια, τα οποία σχετίζονται με αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και μειωμένη απόπτωση. Έτσι, γονιδιακές μεταλλάξεις μπορεί να ενεργοποιήσουν την κινάση αυτή και κατά συνέπεια και αυτά τα μονοπάτια και να προκαλέσουν ογκογένεση. Η ανακάλυψη μεταλλάξεων, αλλά και υπερέκφρασης του *cKIT* γονιδίου υπήρξαν στόχοι για θεραπεία με χρήση αναστολέων όπως η ιματινίμη. Οι όγκοι GIST (γαστροεντερικοί στρωματικοί όγκοι), οι οποίοι εμφανίζουν μεταλλάξεις στο *cKIT* γονίδιο αντιμετωπίζονται θεραπευτικά με ιματινίμη και δείχνουν αύξηση στην επιβίωση³⁵. Κατά την ανάπτυξη αντοχής στην ιματινίμη παρατηρείται η συσσώρευση γονιδιακών μεταλλάξεων στο *cKIT*³⁷.

Πίνακας III.2: τα σημαντικότερα ογκογονίδια

Γονίδιο	Χρωμοσωμική θέση	Λειτουργία
<i>RAS (K-,H-,N-)</i>	12p12, 11p15, 1p13	Σχετιζόμενη με τη μεμβράνη GTPάση
<i>ERBB2</i>	17q12q21	Διαμεμβρανικός υποδοχέας τυροσινικής κινάσης
<i>MYC (C-,N-,L-)</i>	8q24, 2p24, 1p34	Μεταγραφικός παράγοντας
<i>MDM2</i>	12q14q15	Πρωτεΐνη που συνδέεται με το p53
<i>RET</i>	10q11	Διαμεμβρανικός υποδοχέας τυροσινικής κινάσης

<i>MET</i>	7q31	Διαμεμβρανικός υποδοχέας τυροσινικής κινάσης
<i>CCND1</i>	11q13	Ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου
<i>EGFR</i>	7p12	Διαμεμβρανικός υποδοχέας τυροσινικής κινάσης

Χρωμοσωμικές μεταθέσεις που προκαλούν αναδιάταξη των γονιδίων φέρνοντας σε επαφή ένα ογκογονίδιο με τον υποκινητή ενός άλλου γονιδίου (rearranged genes), αποτελούν έναν ακόμη μηχανισμό μεταλλαξογένεσης των ογκογονιδίων. Ο νέος υποκινητής είναι ισχυρός και επάγει την αυξημένη έκφραση του ογκογονιδίου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το *BCL2* γονίδιο στα μη Hodgkin λεμφώματα. Στην ουσία το *BCL2* γονίδιο αναδιατάσσεται εξαιτίας της μετάθεσης t(14;18) και ολόκληρο το γονίδιο *BCL2* τίθεται υπό τη ρύθμιση του υποκινητή του *IGH* γονιδίου³⁸.

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια παρεμποδίζουν την ανώμαλη διαίρεση και τον κακοήγη μετασχηματισμό και προκαλούν καρκινογένεση μόνο όταν διακόπτεται η λειτουργία τους ¹⁸. Τα φυσιολογικά ογκοκατασταλτικά γονίδια φαίνεται να έχουν ρυθμιστικό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στη διαφοροποίηση και σε άλλες βασικές λειτουργίες του κυττάρου. Χαρακτηριστικά παραδείγματα προϊόντων ογκοκατασταλτικών γονιδίων είναι οι *p110* και *p53* που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο, πρωτεΐνες δακτύλων ψευδαργύρου, GTPάσες και πρωτεΐνες που περιλαμβάνονται στις αλληλεπιδράσεις κυτταρικών μεμβρανών. Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι υπολειπόμενα σε κυτταρικό επίπεδο, καθώς μια μόνο μετάλλαξη στο ένα αλληλόμορφο δεν είναι αρκετή για την εκδήλωση του αντίστοιχου φαινοτύπου, σε αντίθεση με τα ογκογονίδια που είναι επικρατή.

Αυτό που αποκαλείται απώλεια της ετεροζυγωτίας (loss of heterozygosity) περιγράφει την μετάλλαξη και στο δεύτερο αλληλίο ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου. Μπορεί να δημιουργηθεί με απώλεια μέρους κάποιου χρωμοσώματος (deletion) ή και ολοκλήρου του χρωμοσώματος καθώς και με μη ισοζυγισμένες μεταθέσεις (unbalanced translocations). Οι περισσότερες ελλείψεις σχετίζονται με την υπόθεση των δυο βημάτων του Knudson³⁹. Κλασικό παράδειγμα αποτελεί η απώλεια του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *RB1* από έλλειψη στη χρωμοσωμική θέση 13q14 στους ασθενείς με ρετινοβλάστωμα. Τα ελλείμματα γενετικού υλικού είναι συχνό φαινόμενο σε οικογενή

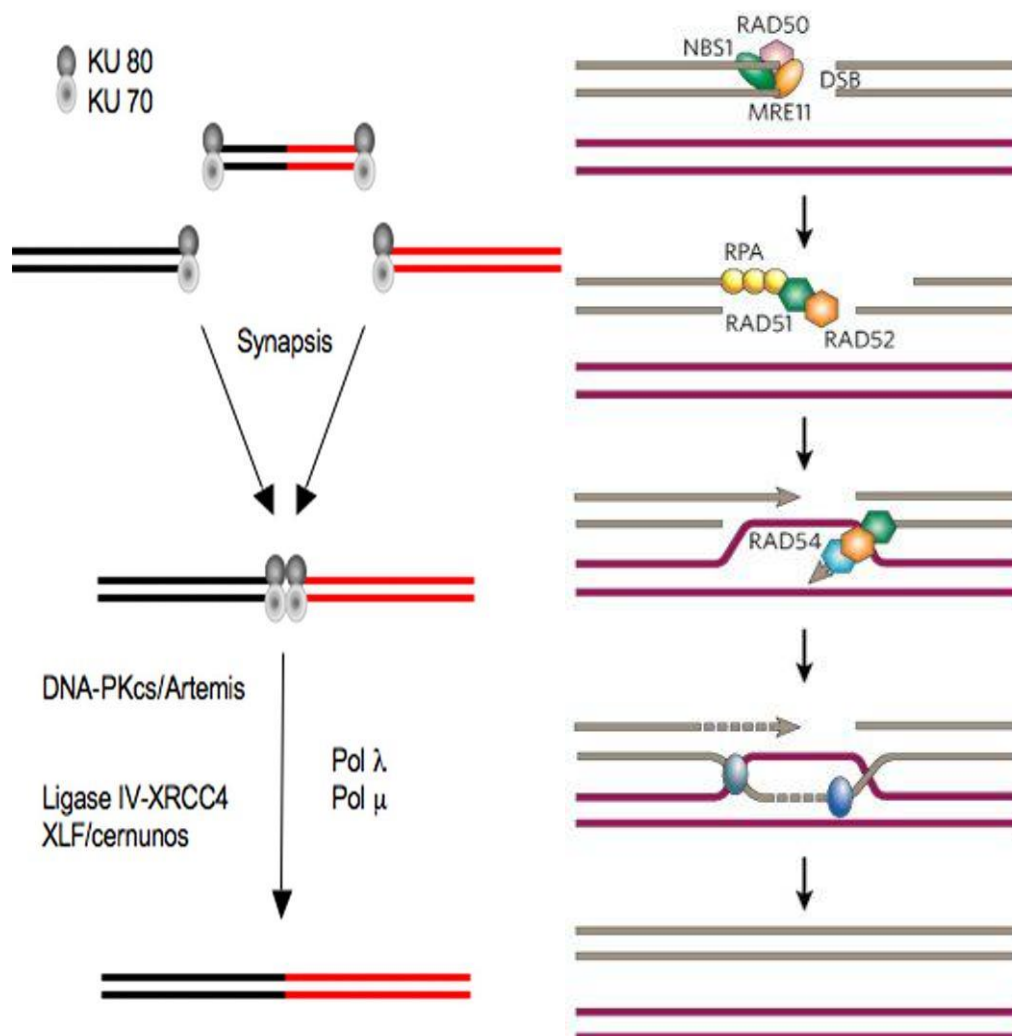
καρκινικά σύνδρομα. Η εντόπιση και η ανακάλυψη απώλειας γενετικού υλικού σε καρκινικά κύτταρα οικογενών συνδρόμων μπορεί να αποκαλύψει γενετικές περιοχές με καινούργια ογκοκατασταλτικά γονίδια.

Πίνακας III.3: τα σημαντικότερα ογκοκατασταλτικά γονίδια

Γονίδιο	Χρωμοσωμική θέση	Λειτουργία
<i>RB1</i>	13q14	Ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου
<i>WT1</i>	11p13	Μεταγραφικός παράγοντας
<i>TP53</i>	17p13	Μεταγραφικός παράγοντας, ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου, απόπτωση
<i>APC</i>	5q21-q22	Μεταγωγή σήματος
<i>VHL</i>	3p26-p25	Μεταγραφικός παράγοντας
<i>MSH2. MLH1</i>	2p16, 3p21	Επιδιόρθωση του DNA
<i>BRCA1</i>	17q12-21	Μεταγραφικός παράγοντας, επιδιόρθωση DNA
<i>BRCA2</i>	13q12	Επιδιόρθωση DNA
<i>NF1</i>	17q11	Αρνητικός ρυθμιστής του Ras
<i>DPC4</i>	18q21	Μονοπάτι μετάδοσης σήματος TGF-β
<i>CDKN2A (p16)</i>	9p21	Αρνητικός ρυθμιστής της κυκλίνης-D
<i>PTEN4</i>	10q2	Φωσφατάση

Ένας άλλος τύπος γονιδίων που μετέχουν στην ανάπτυξη νεοπλασίας είναι τα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA⁴⁰. Η απενεργοποίησή τους οδηγεί στην αδυναμία επιδιόρθωσης των λαθών που συμβαίνουν στη διάρκεια της αντιγραφής και κατ' αυτόν τον τρόπο επιτρέπουν τη συσσώρευση μεταλλάξεων κατά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Έτσι, αυξάνονται οι πιθανότητες ενεργοποίησης κάποιων πρωτοογκογονιδίων ή και απενεργοποίησης κάποιων ογκοκατασταλτικών γονιδίων με αποτέλεσμα την καρκινική εξαλλαγή⁴¹.

Υπάρχουν 5 μηχανισμοί επιδιόρθωσης: NHEJ (non homologous end joining), HR (homologous recombination), MMR (mismatch repair), NER (nucleotide excision repair), BER (base excision repair) σε κάθε ένα από τους οποίους συμμετέχουν πολλά γονίδια που σχηματίζουν μονοπάτια αντιδράσεων⁴²⁻⁴⁷. Η δυσλειτουργία των επιδιορθωτικών γονιδίων έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη σπασιμάτων της διπλής έλικας του DNA (DSBs, double strand breaks) τα οποία αποτελούν προϋπόθεση για το σχηματισμό δομικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών. Οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί NHEJ και HR, που αναλαμβάνουν την επιδιόρθωση αυτών βλαβών έχειδειχθεί ότι τελικά συμμετέχουν στο σχηματισμό μεταθέσεων⁴⁸. Αλληλουχίες όπως τα μεταθετά Alu στοιχεία, παλίνδρομες αλληλουχίες, περιοχές δράσης της τοποϊσομεράσης II, περιοχές υπερευαίσθητες στη δράση της DNase I έχουν εντοπισθεί στα σημεία θραύσης των χρωμοσωμάτων και φαίνεται σε κάποιες περιπτώσεις να συμμετέχουν επίσης, στο σχηματισμό των χρωμοσωμικών μεταθέσεων⁴⁹. Χαρακτηριστικά, για το σάρκωμα Ewing, μελέτες αλληλούχησης στα σημεία θραύσης των δυο χρωμοσωμάτων δεν ανέδειξαν κάποια από τις προαναφερόμενες αλληλουχίες⁵⁰. Έτσι, θεωρείται ότι σε αυτή την περίπτωση, η ανεπιτυχής προσπάθεια επιδιόρθωσης του σπασμένου χρωμοσώματος από κάποιον από τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς είναι υπεύθυνη για τη σχηματιζόμενη χρωμοσωμική ανωμαλία.



Εικόνα III.2: σχηματική αναπαράσταση του NHEJ και του HR μηχανισμών επιδιόρθωσης των διπλών σπασιμάτων της έλικας του DNA (DSBs)

Ακόμη, έχει αναφερθεί ότι η απορρύθμιση της έκφρασής τους οδηγεί σε γενωμική αστάθεια, η οποία είναι απαραίτητη για την ογκογενετική διαδικασία. Σε πειράματα κυτταρικών σειρών, με κύτταρα που είχαν υποστεί γενετική τροποποίηση για τα γονίδια του NHEJ ανιχνεύτηκε μεγάλη γενωμική αστάθεια, περισσότερα DSBs και μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης χρωσωμικών ανωμαλιών σε σύγκριση με τα μη γενετικά τροποποιημένα κύτταρα⁵¹. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι η μείωση της έκφρασης των γονιδίων του NHEJ μηχανισμού σχετίζεται με ευαισθητοποίηση των κυττάρων στην ιονίζουσα ακτινοβολία, υποδεικνύοντας ότι αυτά τα γονίδια μπορεί να αποτελέσουν πιθανούς θεραπευτικούς στόχους⁵². Επιπλέον, έχουν εντοπιστεί πολυμορφισμοί γονιδίων (XPD, XPG), τα οποία ανήκουν στο NER μηχανισμό επιδιόρθωσης, σε ασθενείς με σαρκώματα⁵³. Συνοπτικά, πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει συσχετίσεις των μηχανισμών

επιδιόρθωσης, σε ότι αφορά στην ύπαρξη μεταλλάξεων και πολυμορφισμών στα γονίδια που τους αποτελούν, καθώς και σε ότι αφορά στην έκφραση αυτών των γονιδίων, με την πρόκληση γενωμικής αστάθειας, χρωμοσωμικών ανωμαλιών και εν γένει με την ογκογένεση.

Τέλος, μια πολύ σημαντική κατηγορία γονιδίων στην γενετική του καρκίνου είναι τα χιμαιρικά γονίδια (fusion genes). Αυτά είναι το αποτέλεσμα γενετικών ανακατατάξεων, οι οποίες τις περισσότερες φορές κυτταρογενετικά περιλαμβάνουν ισοζυγισμένες μεταθέσεις (balanced translocations). Τα χιμαιρικά ή υβριδικά γονίδια σχηματίζονται από το 5' άκρο του ενός και το 3' άκρο του δεύτερου γονιδίου που συμμετέχουν σε αυτή την αναδιάταξη. Τις περισσότερες φορές το ένα από τα δυο γονίδια είναι μεταγραφικός παράγοντας. Έτσι, η παραγόμενη χιμαιρική πρωτεΐνη είναι συνήθως ένας μεταγραφικός παράγοντας με μεγαλύτερη έκφραση από την φυσιολογική πρωτεΐνη⁵⁴. Αυτές οι χιμαιρικές πρωτεΐνες ως μεταγραφικοί παράγοντες, που δεσμεύουν το DNA, δρουν απορυθμίζοντας την έκφραση άλλων γονιδίων στο κύτταρο, όπως γονιδίων που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο, την απόπτωση και τη διαφοροποίηση. Ακόμη, αλληλεπιδρούν με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες⁵⁵. Για παράδειγμα η υβριδική πρωτεΐνη του γονιδίου *EWS-ATF1*, αλληλεπιδρά με τον μεταγραφικό παράγοντα *CBP* για να καταστείλει το p53 μονοπάτι⁵⁶. Εκτός όμως από τη μεταγραφική ρύθμιση, μερικές υβριδικές πρωτεΐνες μετέχουν και σε μεταμεταγραφικές διαδικασίες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η *EWS/FLI1* χιμαιρική πρωτεΐνη, η οποία αλληλεπιδρά με παράγοντες μεταμεταγραφικής ωρίμανσης (splicing), ρυθμίζοντας αυτή τη διαδικασία⁵⁷.

Τα υβριδικά γονίδια είναι συχνά ειδικά για συγκεκριμένο τύπο όγκου και χρησιμεύουν ως εργαλεία για τη διάγνωση και την ταυτοποίηση των όγκων και των υποτύπων τους. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι τα σημεία θραύσης σε κάθε γονίδιο πολλές φορές διαφέρουν. Έτσι, δημιουργούνται πολλοί τύποι του ίδιου υβριδικού γονιδίου, οι οποίοι σε μερικές περιπτώσεις σχετίζονται με καλύτερη ή χειρότερη πρόγνωση. Ένα ακόμη σημαντικό στοιχείο είναι ότι κάποια γονίδια (πχ *EWS*, *FUS*) σχηματίζουν χιμαιρικά γονίδια με πληθώρα διαφορετικών «παρτενέρ» γονιδίων, όχι μόνο στον ίδιο τύπο όγκου, αλλά και σε τελείως διαφορετικής ιστοπαθολογικής καταγωγής νεοπλάσματα. Δηλαδή, το ένα από τα δυο γονίδια είναι σταθερό, και συνδέεται με διαφορετικά συνοδά γονίδια, τα οποία όμως πάντα έχουν ομοιότητες σε ότι αφορά στην αλληλουχία, στη δομή και στη λειτουργία τους αλλά και της πρωτεΐνης που κωδικοποιούν⁵⁸.

Η ικανότητα έναρξης καρκινογενετικής διαδικασίας των υβριδικών γονιδίων υπήρξε σημείο επιστημονικής αντιπαράθεσης. Σε πειράματα με καλλιέργειες κυτταρικών σειρών,

αλλά και σε πειράματα με ανασυνδυασμένα ποντίκια αποδείχθηκε η ικανότητα σχηματισμού όγκων και μάλιστα με χαρακτηριστικά παρόμοια με του όγκου στον οποίο συναντώνται⁵⁹.

Τα υβριδικά γονίδια αποτελούν χαρακτηριστικό εύρημα κυρίως αιματολογικών νεοπλασμάτων και σαρκωμάτων, όμως πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι υβριδικά γονίδια υπάρχουν και στα καρκινώματα (πχ καρκίνος προστάτη⁶⁰). Μάλιστα, υπάρχουν ενδείξεις ότι η αναλογία των υβριδικών γονιδίων είναι ίδια περίπου και στα καρκινώματα και στα σαρκώματα και στις αιματολογικές κακοήθειες και ότι απλά στα πρώτα δεν έχουν εντοπιστεί, είτε λόγω πολυπλοκότητας των γενετικών ανακατατάξεων είτε γιατί εντοπίζονται σε υπομικροσκοπικό επίπεδο⁶¹. Θεωρείται ότι οι γενετικοί μηχανισμοί που ενέχονται στην καρκινογένεση είναι κοινοί, παρά τις έως τώρα παρατηρούμενες διαφορές στο γενετικό προφίλ των 3 αυτών κατηγοριών καρκίνου, και ότι απλά μένει να αναδειχθούν.

IV. Τεχνικά και μεθοδολογικά προβλήματα των γενετικών προσεγγίσεων

Οι γενετικές προσεγγίσεις του καρκίνου χρησιμοποιούν διάφορα τεχνικά και μεθοδολογικά εργαλεία⁶². Οι βασικότερες προσεγγίσεις είναι δύο: 1) η κυτταρογενετική ανάλυση και 2) η μοριακή γενετική ανάλυση. Η κυτταρογενετική ανάλυση ανιχνεύει χρωμοσωμικές ανωμαλίες, ενώ η μοριακή γενετική ανάλυση ανωμαλίες του DNA. Η κάθε μία παρουσιάζει μειονεκτήματα και πλεονεκτήματα.⁶³ Η κυτταρογενετική ανάλυση έχει το πλεονέκτημα ότι ανιχνεύει το σύνολο του γενετικού υλικού στο επίπεδο των χρωμοσωμάτων, παρουσιάζει δηλαδή μια καθολική, «πανοραμική» εικόνα όλων των γενετικών ανωμαλιών στο κυτταρικό επίπεδο, όμως δεν μπορεί να ανιχνεύσει υπομικροσκοπικές αλλαγές. Η μοριακή γενετική ανάλυση έχει το πλεονέκτημα ότι ανιχνεύει ανωμαλίες στο υπομικροσκοπικό επίπεδο, δηλαδή ανωμαλίες των γονιδίων και του DNA εν γένει, όμως στην πλειοψηφία των περιπτώσεων εστιάζει σε μια συγκεκριμένη ανωμαλία, αγνοώντας τις άλλες και απαντά ως εκ τούτου θετικά ή αρνητικά σε ένα προεπιλεγμένο ερώτημα πχ. «υπάρχει το υβριδικό γονίδιο *EWS/FLI*;». Βεβαίως υπάρχουν και άλλα ζητήματα όμως τα βασικότερα είναι αυτά που αναφέρθηκαν παραπάνω⁶³.

Πρόέκυψε λοιπόν, η ανάγκη σύνδεσης των δυο επιπέδων οργάνωσης του γενετικού υλικού, δηλαδή των χρωμοσωμάτων και του DNA. Έτσι, αναπτύχθηκαν τεχνικές, οι οποίες συνδυάζουν την πανοραμικότητα της κυτταρογενετικής και τη διεισδυτικότητα της μοριακής γενετικής⁶⁴. Η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε καθιερώθηκε ως μοριακή κυτταρογενετική και βασικά στηρίχθηκε στον φθορισμικό *in situ* υβριδισμό (FISH, fluorescent in situ hybridization).

Η τεχνική του FISH βασίζεται στην ανάπτυξη ειδικών ανιχνευτών του γενετικού υλικού οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι με φθοριοχρώματα. Αυτοί οι ανιχνευτές μπορεί να είναι ειδικοί για μια συγκεκριμένη αλληλουχία (FISH επιλεγμένων στόχων) και έτσι να προκύψουν πληροφορίες σε ερωτήματα που έχουν προεπιλεγεί για την ύπαρξη ή όχι συγκεκριμένων δομικών ή αριθμητικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών. Το πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι η δυνατότητα να εφαρμοστεί σε μεσοφασικούς πυρήνες, σε αντίθεση με την κλασική κυτταρογενετική που απαιτεί την ύπαρξη μεταφάσεων από διπλασιαζόμενα κύτταρα.

Το multi color FISH αποτελεί μια παραλλαγή στην οποία οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στοχεύουν και αναγνωρίζουν ολόκληρα τα χρωμοσώματα⁶⁵. Με τη

βοήθεια των φθοριοχρωμάτων κάθε χρωμόσωμα εμφανίζει ένα διαφορετικό ψευδόχρωμα και έτσι καθίσταται δυνατός ο προσδιορισμός πολύπλοκων χρωμοσωμικών ανακατατάξεων, μη ισοζυγισμένων μεταθέσεων και αταυτοποίητων χρωμοσωμάτων (markers). Η εξέλιξη σε multi color band FISH προσφέρει στους επιστήμονες ακόμη μεγαλύτερη ανάλυση⁶⁶. Οι ανιχνευτές είναι πλέον ειδικοί για συγκεκριμένες περιοχές εντός του ίδιου χρωμοσώματος. Αυτό προσφέρει τη δυνατότητα να χαρακτηριστούν με μεγαλύτερη ακρίβεια τα τμήματα που ενέχονται στις προσδιοριζόμενες χρωμοσωμικές ανακατατάξεις. Ωστόσο, σοβαρό μειονέκτημα αποτελεί η αναγκαιότητα ύπαρξης μεταφασικών χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων που δεν είναι πάντοτε εφικτή^{63, 67}.

Με τη χρήση των τεχνικών του FISH απαντήθηκαν πολύ σημαντικά ερωτήματα που έως πρόσφατα αποτελούσαν σημείο διαφωνίας στην επιστημονική κοινότητα. Έτσι, αποδείχθηκε ότι οι ομογενώς χρωσμένες περιοχές (hsrs) που εντοπίζονταν με την κλασική κυτταρογενετική περιέχουν γονίδια που έχουν υποστεί γονιδιακή επέκταση και σχηματίστηκαν με περίπλοκους συνδυασμούς διπλασιασμών και μεταθέσεων. Αντίστοιχα, και οι διπλοί χρωμοσωμικοί κόκκοι (double minutes) με τη μεθοδολογία του FISH αποδείχθηκε ότι περιέχουν γενωμικό DNA και ενέχονται στην ογκογενετική διεργασία σε ένα καρκινικό κύτταρο, συμμετέχοντας στο εναλλακτικό μονοπάτι επιμήκυνσης των τελομερών⁶⁸.

Η σημασία της μεθοδολογίας του FISH μπορεί να αναδειχθεί από το γεγονός ότι σήμερα αποτελεί αναπόσπαστο εργαλείο στην ογκολογική κλινική πρακτική. Οι ειδικοί ανιχνευτές για το γονίδιο *her2/neu* χρησιμοποιούνται στην καθημερινή κλινική πράξη για την διάγνωση και κατηγοριοποίηση του καρκίνου του μαστού⁶⁹. Ανάλογα παραδείγματα χρήσης ανιχνευτών σημασμένων με φθοριοχρώματα υπάρχουν για τις αιματολογικές κακοήθειες, όπως στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία (+8, *bcr/abl*), την οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία, το πολλαπλούν μυέλωμα, τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα, το μη Hodgkin λέμφωμα αλλά και για συμπαγείς όγκους όπως ο καρκίνος της ουροδόχου κύστεως, του προστάτη και του πνεύμονα.

Η τεχνική του συγκριτικού γενωμικού υβριδισμού (Comparative Genomic Hybridization: CGH) αποκαλύπτει τη συνολική εικόνα ορισμένου είδους γενετικών ανωμαλιών που υπάρχουν σε όλα τα χρωμοσώματα στην *in vivo* κατάσταση^{70, 71}. Και σε αυτή την περίπτωση αναπτύχθηκαν ειδικοί ανιχνευτές σε μικροσυστοιχίες, οι οποίοι προσφέρουν πολύ μεγαλύτερο βαθμό ανάλυσης και συνέβαλαν στη δημιουργία της προηγμένης τεχνικής του array CGH (aCGH). Με την CGH προσέγγιση είναι δυνατόν να εντοπιστεί περίσσεια ή έλλειψη χρωμοσωμικού υλικού, δηλαδή περιγράφονται μη

ισοζυγισμένες ανακατατάξεις⁷². Οι ισοζυγισμένες ανακατατάξεις που δεν οδηγούν δε πλεόνασμα ή έλλειψη χρωμοσωμικού υλικού είναι αδύνατο να περιγραφούν με αυτή την τεχνική. Η αναλυτική διεισδυτικότητα του aCGH είναι τέτοια, που προσφέρει τη δυνατότητα χαρακτηρισμού ελλείψεων και περίσσειας χρωμοσωμικού υλικού που με την κλασική κυτταρογενετική αλλά και με το χρωμοσωμικό CGH διαφεύγουν και δίνουν την εντύπωση των ισοζυγισμένων ανακατατάξεων.

Η CGH προσέγγιση αφενός μεν συνέβαλε στην περαιτέρω πιστοποίηση γενετικών ανακατατάξεων που είχαν ανιχνευθεί με την κυτταρογενετική, αφετέρου δε πρόσθεσε νέα δεδομένα. Έχουν εντοπιστεί περιοχές με γονιδιακή επέκταση ή χρωμοσωμικές ελλείψεις που περιέχουν γονίδια με ιδιαίτερη σημασία για την ογκογενετική διαδικασία διαφόρων ειδών όγκων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η γονιδιακή επέκταση στην χρωμοσωμική περιοχή 20q13 στην οποία περιέχεται το γονίδιο *c-myc*.

Συμπερασματικά, οι τεχνικές της μοριακής κυτταρογενετικής αποτελούν πλέον σπουδαία όπλα στη φαρέτρα των επιστημόνων⁷³. Η μοριακή κυτταρογενετική ως συνθετική μεθοδολογία όχι μόνο επιβεβαίωσε πληροφορίες των προηγούμενων επιπέδων ανάλυσης αλλά πρόσθεσε και νέα αξιοσημείωτα δεδομένα, πολλά από τα οποία αποτελούν πλέον μέρος της καθημερινής ογκολογικής κλινικής πρακτικής.

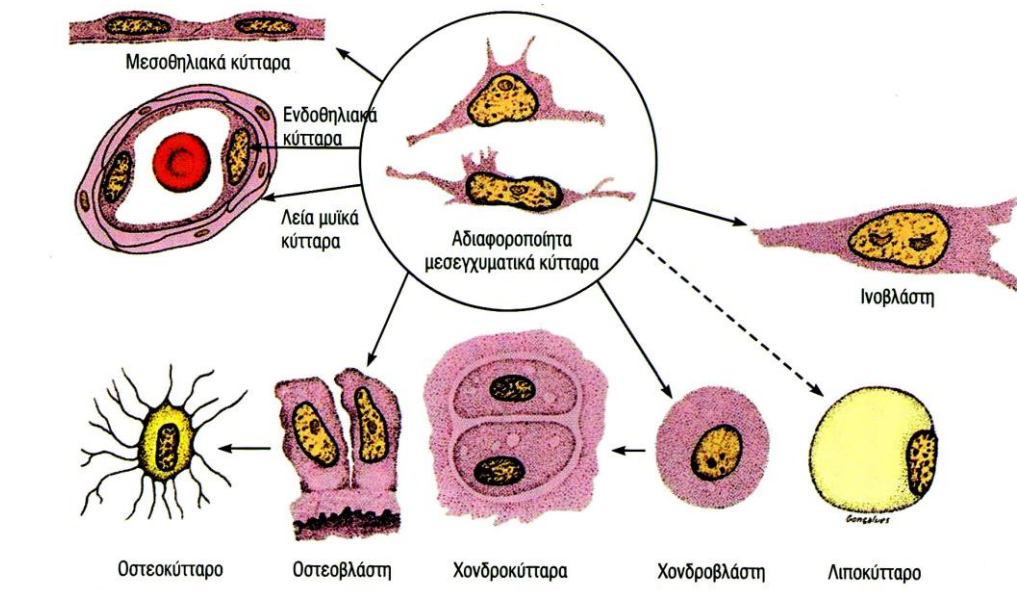
V. Μεσεγγυματογενείς όγκοι

Το μεσέγγυμα αποτελεί έναν εμβρυικό ιστό που σχηματίζεται από επιμηκυσμένα κύτταρα, τα μεσεγγυματικά κύτταρα. Το μεσέγγυμα εκτός του ότι αποτελεί την πηγή προέλευσης για όλους τους κυτταρικούς τύπους του συνδετικού ιστού, διαφοροποιείται επίσης και σε άλλους τύπους ιστών όπως είναι τα κύτταρα του αίματος, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα λεία μυϊκά κύτταρα. Έτσι, τα αδιαφοροποίητα μεσεγγυματικά κύτταρα δίνουν γένεση σε ινοβλάστες, λιποκύτταρα, χονδροβλάστες που μετατρέπονται σε χονδροκύτταρα, οστεοβλάστες που μετατρέπονται σε οστεοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα και μεσοθηλιακά κύτταρα⁷⁴.

Οι μεσεγγυματογενείς όγκοι αποτελούν μια ετερογενή ομάδα όγκων όπως φαίνεται και από την ιστολογική προέλευση των κυττάρων που περιέχουν. Με βάση λοιπόν, την ανατομική και κλινική τους εμφάνιση ταξινομούνται ως όγκοι των μαλακών μορίων και των οστών. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) κατηγοριοποιεί τους όγκους των μαλακών μορίων και των οστών στην κατάταξη του 2002, με βάση τα κλινικά, τα ιστολογικά και τα γενετικά πλέον δεδομένα⁷⁵. Ιδιαίτερα, τονίζεται ότι η έκρηξη γενετικών πληροφοριών με κυτταρογενετικές και μοριακές γενετικές προσεγγίσεις την τελευταία εικοσαετία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο τόσο στην κατηγοριοποίηση όσο και στην κατανόηση της βιολογικής συμπεριφοράς αυτών των όγκων. Άλλωστε αυτή ακριβώς η νέα αντίληψη για την κατηγοριοποίηση των όγκων οδήγησε και στο σχηματισμό της ομάδας εργασίας CHAMP (Chromosome and Morphology collaborative study group)⁷⁶.

Πρέπει να τονιστεί ότι αυτή η ετερογένεια που συναντάται στην ιστολογική εικόνα των μεσεγγυματογενών όγκων αντικατοπτρίζεται και στο γενετικό τους προφίλ. Τα καλοήγη μεσεγγυματικά νεοπλάσματα παρουσιάζουν λίγες γενετικές ανακατατάξεις, στις περισσότερες περιπτώσεις, χωρίς πολλά ειδικά ευρήματα. Τα σαρκώματα όμως έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς τα γενετικά ευρήματα είναι πολλές φορές παθολογικά και μπορούν να συμβάλλουν στη διάγνωση. Επιπλέον, αξίζει ιδιαίτερης αναφοράς το γεγονός ότι κυτταρογενετικά μπορούν να διακριθούν σε δυο μεγάλες κατηγορίες⁷⁷. Η μια περιλαμβάνει σαρκώματα με συγκεκριμένες κυτταρογενετικές ανωμαλίες, οι οποίες είναι συνήθως μεταθέσεις που οδηγούν στο σχηματισμό υβριδικών γονιδίων, όπως π.χ το σάρκωμα Ewing, το συνοβιοσάρκωμα, το λιποσάρκωμα κ.α. Τέτοια γενετικά χαρακτηριστικά εμφανίζουν και οι αιματολογικές κακοήθειες, πράγμα που υποδηλώνει την ύπαρξη παρόμοιων ή και κοινών μηχανισμών μετάλλαξης. Η άλλη κατηγορία

περιλαμβάνει σαρκώματα τα οποία εμφανίζουν πολύπλοκους καρυοτύπους με μεγάλο αριθμό δομικών και χρωμοσωμικών ανωμαλιών, οι οποίες πολλές φορές είναι διαφορετικές από περιστατικό σε περιστατικό ή ακόμη και από κύτταρο σε κύτταρο. Αυτά τα γενετικά χαρακτηριστικά είναι παρόμοια με αυτά που συναντώνται στα καρκινώματα. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν σαρκώματα όπως το οστεοσάρκωμα, το κακόηθες ινώδες ιστοκύττωμα και το σκελετικό χονδροσάρκωμα. Αυτή η κατηγοριοποίηση των σαρκωμάτων είναι προφανές ότι τα αναδεικνύει σε ένα εξαιρετικό μοντέλο για την μελέτη της ογκογένεσης⁵⁸.



Εικόνα V.1: σχηματική αναπαράσταση της καταγωγής των κυττάρων που προέρχονται από το πολυδύναμο εμβρυϊκό μεσεγχυματικό κύτταρο.

Παρακάτω θα περιγραφούν οι κυριότεροι τύποι όγκων των μαλακών μορίων και των οστών όπως τους κατατάσσει ο ΠΟΥ, και οι οποίοι συνάμα αποτέλεσαν και υλικό προς μελέτη στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

1. Όγκοι των μαλακών μορίων

Στη συντριπτική τους πλειονότητα οι όγκοι των μαλακών μορίων είναι καλοήθεις. Τα κακοήγη μεσεγγυματικά νεοπλάσματα ή σαρκώματα αποτελούν λιγότερο από 1% του συνόλου των κακοήθων όγκων στον άνθρωπο. Είναι όμως εξαιρετικά απειλητικά για την επιβίωση του ασθενούς και έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον τόσο για τη διάγνωση όσο και για τη θεραπεία τους μιας και υπάρχουν πάνω από 50 ιστολογικοί υπότυποι όγκων των μαλακών μορίων. Ο κάθε ένας από αυτούς τους υποτύπους εμφανίζει ειδικά κλινικά, προγνωστικά και θεραπευτικά χαρακτηριστικά. Απαιτείται λοιπόν, η στενή συνεργασία χειρουργών, παθολογονατόμων, γενετιστών και παθολόγων, η οποία έχει επιφέρει σήμερα μια αύξηση στην πενταετή επιβίωση των ασθενών με σαρκώματα των μαλακών μορίων στα επίπεδα του 65-75%⁷⁸.

Οι καλοήθεις όγκοι των μαλακών μορίων αριθμούν περίπου 3000 νέες περιπτώσεις/1000000 πληθυσμού το χρόνο, ενώ τα σαρκώματα των μαλακών μορίων είναι μόλις 30 νέες περιπτώσεις/1000000 πληθυσμού το χρόνο. Το ένα τρίτο των καλοήθων όγκων είναι λιπώματα, ένα τρίτο ινώδεις όγκοι, 10% αγγειακοί όγκοι και 5% όγκοι των νευρικών ελύτρων. Το 99% των καλοήθων όγκων των μαλακών μορίων είναι επιφανειακοί όγκοι και το 95% έχει διάμετρο μικρότερη από 5 εκατοστά. Τα σαρκώματα των μαλακών μορίων μπορεί να αναπτυχθούν σε οποιαδήποτε ανατομική θέση, ωστόσο τα τρία τέταρτα αναπτύσσονται στα άκρα, με πιο συχνή εστία το κάτω τριτημόριο του μηρού και μόλις 10% στον κορμό⁷⁹. Όπως και στους άλλους κακοήθεις όγκους έτσι και στα σαρκώματα η συχνότητα εμφάνισης αυξάνει ανάλογα με την ηλικία, με μέση ηλικία εκδήλωσης τα 65 έτη. Το 10% των ασθενών με σάρκωμα έχει και μετάσταση κατά τη στιγμή της διάγνωσης και πάνω από το ένα τρίτο των ασθενών πεθαίνουν εξαιτίας του όγκου τους, συνήθως από πνευμονικές μεταστάσεις.

Η αιτιολογία τόσο των καλοήθων όγκων όσο και των σαρκωμάτων παραμένει άγνωστη. Η πλειονότητα των όγκων των μαλακών μορίων θεωρείται ότι εξελίσσονται de novo. Μερικά κακοήγη μεσεγγυματικά νεοπλάσματα αναπτύσσονται στα πλαίσια οικογενών καρκινικών συνδρόμων. Κλινικές μελέτες στη Σουηδία έχουν συσχετίσει τα σαρκώματα με την έκθεση σε φαινοξιοξικά παρασιτοκτόνα⁸⁰. Ενώ, υπάρχει και σαφής συσχέτιση με την ακτινοβολία. Μετακτινικά σαρκώματα αναπτύσσονται συχνά σε γυναίκες με καρκίνο του μαστού που υπέστησαν ακτινοβολήση σαν υποστηρικτική θεραπεία⁸¹. Τέλος, ο HPV8 διαδραματίζει μείζονα ρόλο στην ανάπτυξη του σαρκώματος

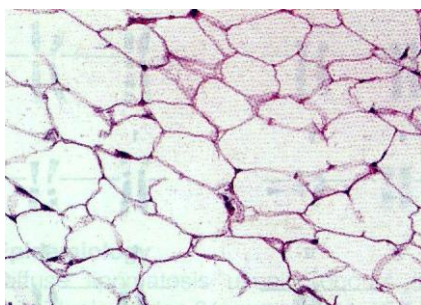
Kaposi⁸², καθώς και ο ιός Epstein-Barr (EBV) σε ασθενείς με ανοσοκαταστολή για την ανάπτυξη όγκων των λείων μυών⁸³.

Οι περισσότεροι καλοήθεις όγκοι δεν υποτροπιάζουν και η ολική εκτομή τους αποτελεί και ριζική θεραπεία. Ωστόσο, υπάρχουν και όγκοι ενδιάμεσης κακοήθειας, οι οποίοι δεν μεθίστανται αλλά υποτροπιάζουν συχνά και εμφανίζουν στοιχεία επιθετικότητας στην περιοχή της τοπικής υποτροπής. Οι κακοήθεις όγκοι εμφανίζουν πολύ συχνά τοπική υποτροπή και μεθίστανται σε ποσοστό που κυμαίνεται μεταξύ 20-100%. Η εντόπιση, ο χαρακτηρισμός και η σταδιοποίηση των όγκων των μαλακών μορίων γίνεται με τη μαγνητική τομογραφία (MRI) και η διάγνωσή τους τίθεται με βιοψία υποβοηθούμενη από μαγνητικό ή αξονικό τομογράφο⁸⁴.

- **Λιποκυτταρικοί όγκοι**

1. **Λίπωμα**

Πρόκειται για το συχνότερο καλοήγη μεσεγχυματικό όγκο των ενηλίκων, ο οποίος αποτελείται από ώριμα λευκά λιποκύτταρα. Είναι πολύ συχνός στις ηλικίες 40-60 και σπανίζει στα παιδιά. Μπορεί να αναπτυχθεί υποδερματικά, μέσα στα μαλακά μόρια, ακόμη και στην επιφάνεια οστών. Κλινικά, εμφανίζεται ως μάζα μαλακών μορίων χωρίς πόνο. Η αιτιολογία τους παραμένει αδιευκρίνιστη. Ιστολογικά, αποτελούνται από λοβούς ώριμων λιποκυττάρων⁸⁵.



Εικόνα V.2: ιστολογική εικόνα λιπώματος, με ώριμα λιποκύτταρα, τα οποία διαφέρουν στο μέγεθος και στο σχήμα.

Τα λιπώματα εμφανίζουν μεγάλη καρυοτυπική ετερογένεια. Κλωνικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες έχουν εντοπιστεί στο 60% των λιπωμάτων. Το συχνότερο εύρημα περιλαμβάνει μεταθέσεις και ανακατατάξεις της χρωμοσωμικής περιοχής 12q13-q15. Η συνηθέστερη μετάθεση είναι η t(3;12)(q27-q28;q13-q15). Σε λιπώματα που δεν

ενέχεται σε ανακατατάξεις το χρωμόσωμα 12, εντοπίζονται ανωμαλίες που περιλαμβάνουν το χρωμόσωμα 13. Η περιοχή που συνηθέστερα συμμετέχει σε μεταθέσεις και ελλείψεις είναι η 13q12-q22, με προεξάρχουσα την 13q14, όπως αποδείχθηκε και με πειράματα με τη μέθοδο FISH. Μια άλλη ομάδα λιπωμάτων χαρακτηρίζεται από ανωμαλίες του χρωμοσώματος 7 και της περιοχής 6p21-p23. Η κυτταρογενετική ετερογένεια των λιπωμάτων αναδεικνύεται και από το γεγονός ότι πολλοί όγκοι εμφανίζουν φυσιολογικούς καρυοτύπους. Σε αυτές τις περιπτώσεις είναι πιθανό να υπάρχουν γονιδιακές μεταλλάξεις σε υπομικροσκοπικό επίπεδο⁸⁶.

Στα λιπώματα με ανακατατάξεις στην περιοχή 12q13-q15 αποδείχθηκε πως εδράζονται και αναδιατάσσονται τα γονίδια *HMGA1* και *HMGA2*. Τα δυο αυτά γονίδια συμμετέχουν στην ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό αδιαφοροποίητων κυττάρων. Ανακατατάξεις του γονιδίου *HMGA2* είναι συχνό φαινόμενο σε πολλούς καλοήθεις στερεούς όγκους όπως το λειομύωμα της μήτρας και οι πολύποδες του ενδομητρίου. Μεταθέσεις σε διάφορους μεσεγχυματικούς όγκους που ενέχουν την περιοχή 12q14-q15, περιλαμβάνουν τη δημιουργία υβριδικών γονιδίων με τη συμμετοχή των εξωνίων 1-3 του γονιδίου *HMGA2*⁸⁷. Η μετάθεση t(3;12)(q27-q28;q13-q15) προκαλεί το σχηματισμό του υβριδικού γονιδίου *HMGA2/LPP*. Άλλο ένα υβριδικό γονίδιο στα λιπώματα είναι το *HMGA2/LHFP*, το οποίο παράγεται από τη μετάθεση t(12;13)(q14-q22;q21-q32)⁸⁸.

A

HMGI-C

CCA	AGA	GGC	AGA	CCT	AGG	AAA	TGG	CCA	CAA	CAA	GTC	GTT
P	R	G	R	P	R	K	W	P	Q	Q	V	V

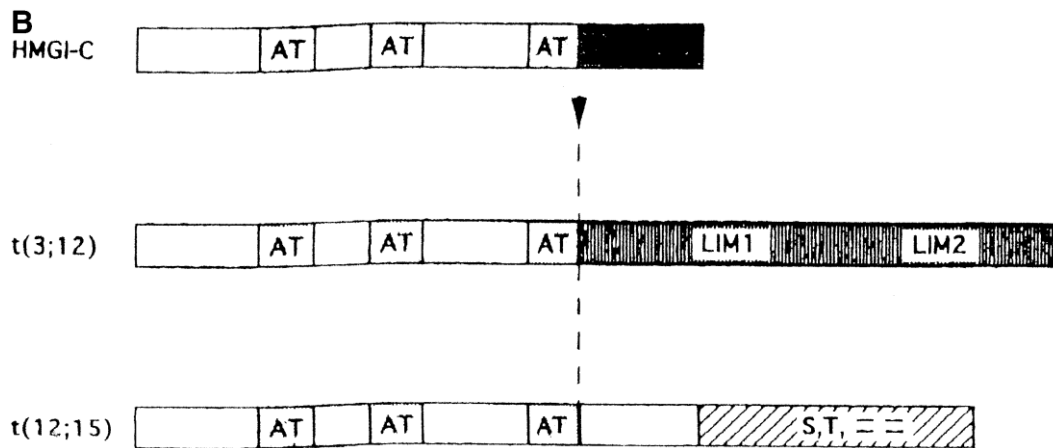
fusion sites

t(3;12)

CCA	AGA	GGC	AGA	CCT	AGG	AAA	TGG	AAT	ACT	CTG	GAG	CAG
P	R	G	R	P	R	K	W	N	T	L	E	Q

t(12;15)

CCA	AGA	GGC	AGA	CCT	AGG	AAA	TGG	CCC	GGG	CTC	CAG	AAG
P	R	G	R	P	R	K	W	P	G	L	Q	K



Εικόνα V.3: A) σχηματική αναπαράσταση της νουκλεοτιδικής και αμινοξικής αλληλουχίας του φυσιολογικού HMGI-C γονιδίου και των υβριδικών από τις μεταθέσεις t(3;12) και t(12;15). B) σχηματική αναπαράσταση της φυσιολογικής πρωτεΐνης HMGI-C και των υβριδικών πρωτεϊνών, καθώς και των δομών που τις αποτελούν. Με τη διακεκομμένη γραμμή φαίνεται το σημείο θραύσης.

2. Λιποβλάστωμα

Το λιποβλάστωμα αποτελεί όγκο αποτελούμενο από εμβρυικό λιπώδη ιστό. Μπορεί να είναι εντοπισμένο ή διάχυτο. Οι όγκοι εμφανίζονται στα τρία πρώτα έτη της ζωής. Ιστολογικά, αποτελείται από μίγμα ώριμων λιποκυττάρων και λιποβλαστών οι οποίοι βρίσκονται σε διάφορα στάδια της εξέλιξής τους. Ομοιάζει πολύ με το μυξοειδές λιποσάρκωμα⁸⁹.

Το χαρακτηριστικό κυτταρογενετικό στοιχείο είναι η αναδιάταξη της περιοχής 8q11-q13, στην οποία περιέχεται το γονίδιο *PLAG1*. Εκτός, από αυτή την περιοχή κλωνικές δομικές ανωμαλίες περιλαμβάνουν τα χρωμοσωμικά τμήματα 3q12-q13, 7p22 και 8q24. Έως σήμερα έχουν δημοσιευθεί τα υβριδικά γονίδια *HAS2/PLAG1* και *COL1A2/PLAG1*⁹⁰.

3. Αγγειολίπωμα

Είναι καλοήθης όγκος που αναπτύσσεται υποδερματικά και περιέχει λοβία ώριμων λιποκυττάρων, τα οποία συνδέονται με μικρά λεπτότοιχα αγγεία. Με την εξαίρεση ενός περιστατικού που εμφάνισε τη μετάθεση t(X;12)(p22;p12), όλα τα υπόλοιπα έχουν φυσιολογικούς καρυοτύπους⁹¹.

4. Άτυπος λιποματώδης όγκος/ Καλά διαφοροποιημένο λιποσάρκωμα

Το καλά διαφοροποιημένο λιποσάρκωμα αποτελεί ενδιάμεσης κακοήθειας (τοπικά επιθετικό) νεόπλασμα, το οποίο αποτελείται από πολλαπλασιαζόμενα λιποκύτταρα με ποικίλο μέγεθος και πυρηνική ατυπία. Το γεγονός ότι δεν μεθίσταται εκτός αν υποστεί αποδιαφοροποίηση οδήγησε στο παρελθόν στη χρήση όρων όπως άτυπο λίπωμα ή άτυπος λιποματώδης όγκος. Αποτελεί το 45-50% των λιποσαρκωμάτων και συνήθως αναπτύσσεται στα μαλακά μόρια των άκρων. Εμφανίζεται ως αναπτυσσόμενη μάζα που δεν προκαλεί άλγος και για αυτό το λόγο μπορεί να φτάσει και σε πολύ μεγάλο μέγεθος. Τέσσερις υπότυποι περιγράφονται ιστολογικά με βάση τα κύτταρα που περιέχει ο όγκος, ο λιποκυτταρικός, ο σκληρωτικός, ο φλεγμονώδης και ο ατρακτοκυτταρικός⁹².

Τα κυτταρογενετικά χαρακτηριστικά του περιλαμβάνουν δακτυλιοειδή χρωμοσώματα, γιγαντιαία χρωμοσώματα και διπλούς χρωμοσωμικούς κόκκους. Μελέτες με FISH έδειξαν συχνά, πλεόνασμα γενετικού υλικού στην χρωμοσωμική περιοχή 12q13-q15, στην οποία περιέχεται το γονίδιο *MDM2*. Η ύπαρξη πολλαπλών αντιγράφων αυτού του γονιδίου συχνά συνοδεύεται από ενίσχυση και άλλων γονιδίων τα οποία εδράζονται σε κοντινές χρωμοσωμικές περιοχές όπως τα γονίδια *SAS*, *CDK4* και *HMGA2*. Η ενίσχυση της περιοχής 12q14-q15 στην οποία εδράζεται το *MDM2* δεν παρατηρείται στα λιπώματα και επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση των καλά διαφοροποιημένων λιποσαρκωμάτων από τους καλοήθεις όγκους του λιπώδους ιστού⁹³. Αναλύσεις με την τεχνική CGH έχουν δείξει επίσης, πλεόνασμα χρωμοσωμικού υλικού στις περιοχές 1q21-q23 και 3q13.2-q25.

5. Αποδιαφοροποιημένο λιποσάρκωμα

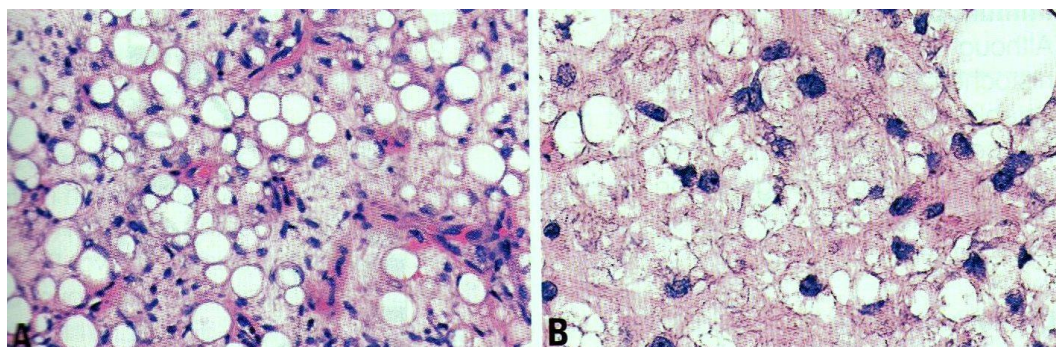
Πρόκειται για κακόηθες λιποκυτταρικό νεόπλασμα το οποίο εξελίχθηκε από καλά διαφοροποιημένο λιποσάρκωμα σε σάρκωμα ποικίλου βαθμού κακοήθειας. Αποδιαφοροποίηση συμβαίνει στο 10% των καλά διαφοροποιημένων λιποσαρκωμάτων. Το 90% αναπτύσσεται de novo και το 10% σε υποτροπές. Εμφανίζεται ως όγκος μεγάλου μεγέθους χωρίς πόνο. Το ιστολογικό χαρακτηριστικό είναι η μετάβαση από το καλά διαφοροποιημένο λιποσάρκωμα στο αποδιαφοροποιημένο λιποσάρκωμα. Το αποδιαφοροποιημένο στοιχείο είναι εκτενές και μπορεί εύκολα να διακριθεί. Υποτροπή παρατηρείται σε ποσοστό 40%, ενώ απομακρυσμένες μεταστάσεις αναπτύσσονται σε

ποσοστό 15-20% με την πενταετή επιβίωση να αγγίζει το 30%. Ο σημαντικότερος προγνωστικός παράγοντας είναι η ανατομική θέση του όγκου, με τα οπισθοπεριτοναϊκά σαρκώματα να έχουν τη χειρότερη πρόγνωση⁹⁴.

Τα κυτταρογενετικά του χαρακτηριστικά μοιάζουν με αυτά του καλά διαφοροποιημένου λιποσαρκώματος, αφού εμφανίζει δακτυλιοειδή χρωμοσώματα, γιγαντιαία χρωμοσώματα και διπλούς χρωμοσωμικούς κόκκους, ενδεικτικό της συγγένειας που έχουν αυτοί οι δύο όγκοι. Μελέτες με FISH και CGH έχουν δείξει ενίσχυση στη χρωμοσωμική περιοχή 12q13-q21, παρόμοια με αυτή που παρατηρείται στο καλά διαφοροποιημένο λιποσάρκωμα⁹⁵.

6. Μυξοειδές / στρογγυλοκυτταρικό λιποσάρκωμα

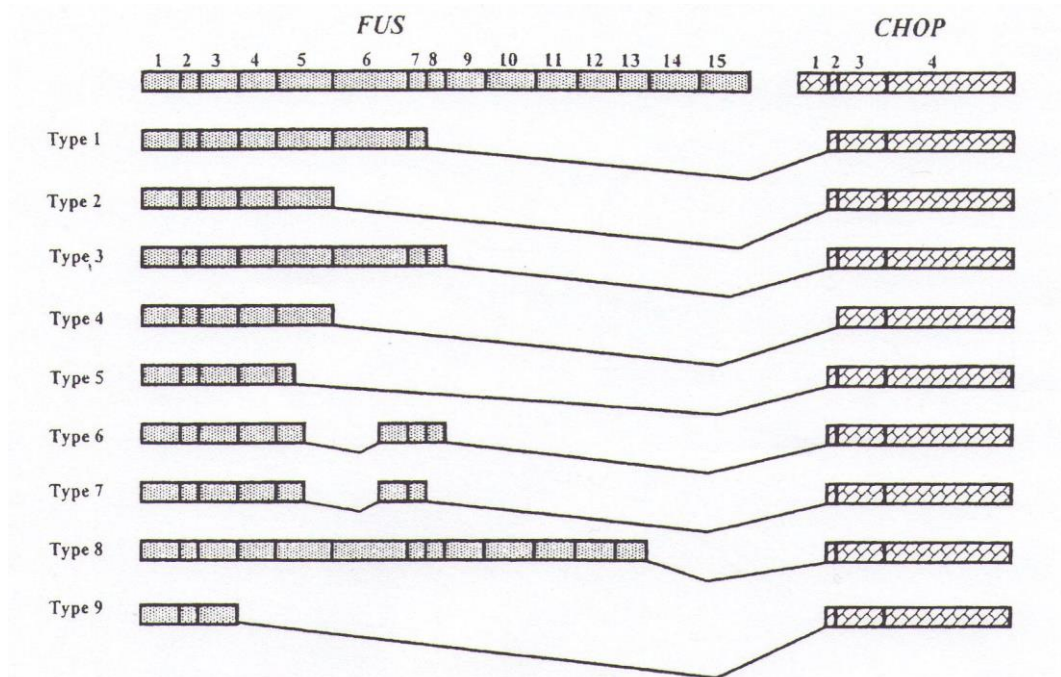
Πρόκειται για κακοήγη όγκο ο οποίος αποτελείται από αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα και μικρούς λιποβλάστες που αναπτύσσονται πάνω σε μυξοειδές στρώμα. Είναι ο δεύτερος συχνότερος υπότυπος λιποσαρκώματος και οι συνηθέστερες εστίες εντόπισής του είναι τα μαλακά μόρια των άκρων. Αποτελεί όγκο των νέων ανθρώπων με μέγιστη συχνότητα εμφάνισης την τέταρτη με πέμπτη δεκαετία της ζωής. Δίνει απομακρυσμένες μεταστάσεις σε οστά και σε άλλα μαλακά μόρια πριν εντοπιστεί στον πνεύμονα. Πολλοί ασθενείς τη στιγμή της διάγνωσης έχουν περισσότερες από μια εστίες λιποσαρκώματος. Αυτό το παράδοξο πρότυπο ανάπτυξης πιθανώς οφείλεται σε αιματογενή διασπορά του όγκου⁹⁶.



Εικόνα V.4: ιστολογική εικόνα μυξοειδούς λιποσαρκώματος, A) στρογγυλά – οβάλ αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα και πολυάρθροι λιποβλάστες αναπτυσσόμενοι σε μυξοειδές στρώμα, B) λιποβλάστες με πολυκενοτοπιώδες κυτταρόπλασμα.

Κυτταρογενετικά, χαρακτηρίζεται από τη μετάθεση t(12;16)(q13;p11) η οποία οδηγεί στο σχηματισμό ενός υβριδικού γονιδίου αποτελούμενου από τα γονίδια

CHOP(DDIT3) και *TLS(FUS)*, καθώς και στο σχηματισμό μιας υβριδικής *TLS/CHOP* πρωτεΐνης^{97, 98}. Επιπλέον, έχει περιγραφεί και η σπανιότερη μετάθεση $t(12;22)(q13;q12)$, η οποία με τη σειρά της οδηγεί στο σχηματισμό του υβριδικού γονιδίου *EWS-CHOP*⁹⁹. Η καρκινογόνος δράση του υβριδικού γονιδίου *FUS/CHOP* έχει αποδειχθεί σε πειράματα με διαγονιδιακά ποντίκια. Στο μυξοειδές λιποσάρκωμα το 5' άκρο του γονιδίου *TLS* ενώνεται με το 3' άκρο του γονιδίου *CHOP* και η υβριδική πρωτεΐνη που παράγεται αποτελείται από το 5' άμινοτελικό άκρο του *TLS* και το καρβόξυτελικό άκρο του *CHOP*^{100, 101}. Τα σημεία θραύσης των γονιδίων εντοπίζονται στα εσώνια 5 και 7 για το *TLS* και στο εσώνιο 1 για το *CHOP*. Συνολικά, έχουν αναφερθεί 9 διαφορετικοί τύποι του υβριδικού γονιδίου *TLS-CHOP*. Από αυτούς 3 είναι οι σημαντικότεροι: ο τύπος 1, όπου το εξώνιο 7 του γονιδίου *TLS* ενώνεται με το εξώνιο 2 του *CHOP* (20% των περιπτώσεων), ο τύπος 2 όπου το εξώνιο 5 του *TLS* ενώνεται με το εξώνιο 2 του *CHOP* (συναντάται στα δυο τρίτα των περιπτώσεων) και ο τύπος 3 όπου το εξώνιο 8 του *TLS* ενώνεται με το εξώνιο 2 του *CHOP* (10% των περιπτώσεων)¹⁰². Μελέτες αλληλούχησης των υβριδικών γονιδίων δείχνουν συμμετοχή των γονιδίων *translin* και *topoisomerase II* στο μηχανισμό της μετάθεσης¹⁰³.



Εικόνα V.5: σχηματική απεικόνιση των 9 τύπων του υβριδικού γονιδίου *FUS/CHOP*. Με νούμερα είναι αριθμημένα τα εξώνια κάθε γονιδίου.

7. Πολύμορφο λιποσάρκωμα

Το πολύμορφο λιποσάρκωμα είναι υψηλής κακοήθειας όγκος ο οποίος αποτελείται από μεγάλο αριθμό πολύμορφων λιποβλαστών. Είναι ο σπανιότερος τύπος λιποσαρκώματος και εμφανίζεται σε ασθενείς ηλικίας άνω των 50 ετών. Έχει επιθετική συμπεριφορά και εμφανίζονται μεταστάσεις σε ποσοστό 30-50%. Μιτωτικός δείκτης με πάνω από 20 μιτώσεις σε 10 οπτικά πεδία και ύπαρξη νέκρωσης είναι κακοί προγνωστικοί παράγοντες¹⁰⁴.

Τα γενετικά δεδομένα είναι περιορισμένα. Μελέτες με CGH έχουν δείξει πλεόνασμα γενετικού υλικού στις περιοχές 5p13-p15, 1p21, 1q21-q22 και 7q22 και απώλεια υλικού στην περιοχή 14q23-q24¹⁰⁵.

8. Μικτού τύπου λιποσάρκωμα

Είναι όγκοι που εμφανίζουν χαρακτηριστικά των καλά διαφοροποιημένων, των αποδιαφοροποιημένων, των μυξοειδών ή των πλειόμορφων λιποσαρκωμάτων. Συνήθεις εστίες ανάπτυξης του είναι ο οπισθοπεριτοναϊκός και ο ενδοκοιλιακός χώρος. Είναι σπάνιος όγκος που προσβάλλει μεγάλους σε ηλικία ασθενείς.

Κυτταρογενετικά, εμφανίζουν πολύπλοκες δομικές ανωμαλίες με πολλά αταυτοποίητα χρωμοσώματα, μη κλωνικές ανωμαλίες και πολυπλοειδίες, καθιστώντας τον εντοπισμό μιας χαρακτηριστικής ανακατάταξης αδύνατο. Μοριακές μελέτες έχουν δείξει μεταλλάξεις στα εξόνια 7 και 8 καθώς και απώλεια ετεροζυγωτίας στο γονίδιο p53¹⁰⁶.

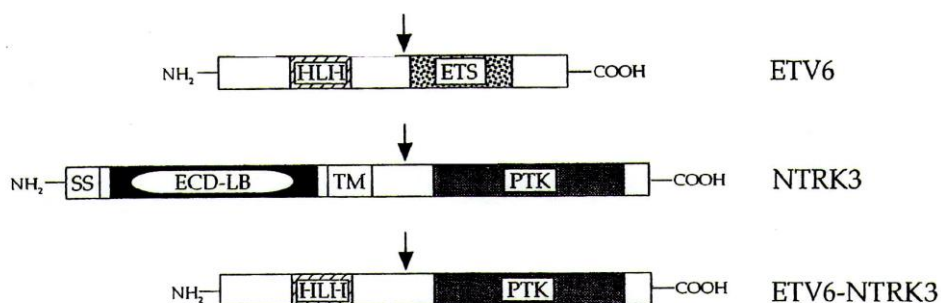
• Όγκοι ινώδους ιστού

1. Συγγενές ινοσάρκωμα

Το συγγενές ινοσάρκωμα είναι ιστολογικά πανομοιότυπο με το ινοσάρκωμα των ενηλίκων, έχει όμως πολύ καλύτερη πρόγνωση. Εμφανίζεται σε βρέφη και μικρά παιδιά και μεθίσταται σπάνια. Η αιτιολογία του είναι αδιευκρίνιστη και αναπτύσσεται συνήθως στα μαλακά μόρια των άκρων. Ιστολογικά, είναι πλούσιο σε κύτταρα νεόπλασμα αποτελούμενο από ατρακτοειδή και ωοειδή κύτταρα¹⁰⁷.

Κυτταρογενετικά, χαρακτηρίζεται από την παθολογική μετάθεση t(12;15)(p13;q26). Αυτή η ανακατάταξη οδηγεί στο σχηματισμό του υβριδικού γονιδίου

ETV6/NTRK3. Πολύ συχνή δευτερογενής ανωμαλία είναι η τρισωμία του χρωμοσώματος 11, η οποία σε συνδυασμό με τη μετάθεση t(12;15), φαίνεται να συμμετέχει στην ανάπτυξη και εξέλιξη του όγκου¹⁰⁸.



Εικόνα V.6: σχηματική αναπαράσταση της υβριδικής πρωτεΐνης, η οποία είναι αποτέλεσμα του σχηματισμού του υβριδικού γονιδίου *EWS/NTRK3*. Αναφέρονται οι πρωτεϊνικές δομές που περιέχονται, ενώ με το βέλος σημειώνεται το σημείο θραύσης.

2. Ινোসάρκωμα ενηλίκων

Το ινোসάρκωμα των ενηλίκων είναι κακοήθης όγκος, ο οποίος αποτελείται από ινοβλάστες που παράγουν κολλαγόνο. Είναι σπάνιος όγκος και εμφανίζεται σε ενήλικες μέσης και μεγάλης ηλικίας. Αναπτύσσεται στα μαλακά μέρη των άκρων. Μεθίσταται στους πνεύμονες και στα οστά σε ποσοστό που κυμαίνεται από 9-63%. Η πενταετής επιβίωση φτάνει το 39-54%¹⁰⁹.

Στα ινোসαρκώματα των ενηλίκων δεν εντοπίζεται το υβριδικό γονίδιο *ETV6/NTRK3* που συναντάμε στα συγγενή ινোসαρκώματα. Τα κυτταρογενετικά δεδομένα που είναι δημοσιευμένα εμφανίζουν μεγάλη πολυπλοκότητα. Σε δυο περιστατικά έχει αναφερθεί μη ισοζυγισμένη μετάθεση der(19)t(2;19) με το σημείο θραύσης στο χρωμόσωμα 19 να είναι ίδιο και στις δυο περιπτώσεις (19q21)¹¹⁰. Σε σύγκριση με το συγγενές ινোসάρκωμα, με το οποίο έχουν ακριβώς την ίδια ιστολογική εικόνα, το ενήλικο εμφανίζει μεγαλύτερη μιτωτική δραστηριότητα σε συνδυασμό με μειωμένη αποπτωτική δραστηριότητα. Αυτό το χαρακτηριστικό μπορεί να εξηγήσει τη μεγάλη διαφορά στην πρόγνωση που έχουν αυτές οι δυο οντότητες.

3. Χαμηλού βαθμού κακοήθειας ινομυξοειδές σάρκωμα

Αποτελεί ξεχωριστή ποικιλία του ινοσαρκώματος. Χαρακτηρίζεται από μίγμα κολλαγόνου και μυξοειδών ζωνών. Είναι σπάνια σαρκώματα με λιγότερες από 150 δημοσιευμένες περιπτώσεις. Αφορούν νέους ασθενείς με μέγιστη συχνότητα εμφάνισης την ηλικία των 34 ετών. Συνήθεις εστίες ανάπτυξης είναι τα άκρα¹¹¹.

Κυτταρογενετικά, χαρακτηρίζεται από τη μετάθεση t(7;16)(q33;p11). Το 2003 σε δυο περιστατικά εντοπίστηκε το υβριδικό γονίδιο *FUS/BBF2H7*¹¹². Σε συνέχεια των προηγούμενων μελετών, μεγαλύτερος αριθμός από χαμηλού βαθμού κακοήθειας ινοσαρκώματα που εμφάνιζε τη μετάθεση t(7;16), επανεξετάστηκε με συνδυασμό μεθόδων FISH και RT-PCR. Αυτή η μελέτη είχε ως αποτέλεσμα την ανακάλυψη του υβριδικού γονιδίου *FUS/CREB3L2*, το οποίο είναι παθογνωμονικό για αυτό τον τύπο σαρκώματος¹¹³.

4. Μυξοϊνοσάρκωμα

Το μυξοϊνοσάρκωμα περιλαμβάνει ένα εύρος κακοήθων ινοβλαστικών αλλοιώσεων με μυξοειδές στρώμα, πλειομορφισμό και καμπυλόγραμμα αγγειακό πρότυπο. Είναι συχνό σάρκωμα σε ασθενείς που διανύουν την 6^η-8^η δεκαετία της ζωής τους. Υποτροπές παρατηρούνται σε ποσοστό 50-60%¹¹⁴.

Τα γενετικά χαρακτηριστικά αυτών των όγκων περιλαμβάνουν πολύπλοκους καρυοτύπους. Έως τώρα δεν έχει αναφερθεί κάποια ειδική χρωμοσωμική αναδιάταξη. Σε 5 περιστατικά έχουν αναφερθεί δακτυλιοειδή χρωμοσώματα. Μελέτες με CGH έχουν αποκαλύψει απώλεια γενετικού υλικού στην περιοχή 6p και πλεόνασμα γενετικού υλικού στις περιοχές 9q και 12q. Νεότερες μελέτες με array CGH έδειξαν πλεόνασμα γενετικού υλικού στις χρωμοσωμικές περιοχές 7p21-p22 και 12q15-q21¹¹⁵.

• Ινοκυτταρικοί όγκοι

1. Γιγαντοκυτταρικός όγκος των τενοντίων ελύτρων

Περιλαμβάνει μια οικογένεια αλλοιώσεων οι οποίες αναπτύσσονται στον ορογόνο υμένα των αρθρώσεων και στα τενόντια έλυτρα. Το 85% των όγκων αναπτύσσονται στην άκρα χείρα και στα δάχτυλα. Κλινικά, προβάλλουν με οίδημα και ακτινολογικά εντοπίζεται μια καλά αφοριζόμενη μάζα. Η ιστολογική τους εικόνα περιλαμβάνει την

ύπαρξη μονοπύρηνων γιγαντοκυττάρων, τα οποία τις περισσότερες φορές περιβάλλονται από ινώδη κάψα¹¹⁶.

Κυτταρογενετικά δεδομένα υποστηρίζουν την νεοπλασματική φύση της αλλοίωσης. Οι συχνότερες ανωμαλίες περιλαμβάνουν τρισωμίες των χρωμοσωμάτων 5 και 7 και μεταθέσεις του χρωμοσώματος 1p11-13¹¹⁷. Μελέτες με CGH δεν αποκάλυψαν περίσσεια ή έλλειψη γενετικού υλικού¹¹⁸.

2. Κακόηθες ινώδες ιστιοκύττωμα

Πρόκειται για μια ετερογενή ομάδα όγκων. Το κακόηθες ινώδες ιστιοκύττωμα είναι το συχνότερο σάρκωμα των μαλακών μορίων των ενηλίκων. Ιστολογικά, διακρίνεται από μεγάλη ετερογένεια. Πολλές φορές η ιστολογική διάγνωση γίνεται δια της απόπου απαγωγής. Είναι πολύ επιθετικοί όγκοι που αναπτύσσονται κυρίως στα άκρα¹⁰⁴.

Κυτταρογενετικά, χαρακτηρίζονται από πολύπλοκους καρυοτύπους με διάφορες αριθμητικές και δομικές ανωμαλίες, αντικατοπτρίζοντας και την ιστολογική ετερογένεια του όγκου¹¹⁹. Έως σήμερα όμως, δεν έχει εντοπιστεί κάποια ειδική γενετική ανωμαλία για αυτό τον όγκο. Μελέτες με CGH έχουν δείξει κυρίως περίσσεια γενετικού υλικού σε διάφορες χρωμοσωμικές περιοχές. Στα χρωμοσώματα 1p32, 12q14-q15 και 6q23 η περίσσεια γενετικού υλικού σχετίζεται με τη διαφοροποίηση του όγκου¹²⁰. Ειδικά το γονίδιο *ASK1(MAP3K5)*, το οποίο εδράζεται στην περιοχή 6q23 μπορεί να αποτελέσει και πιθανό θεραπευτικό στόχο¹²¹. Επιπλέον, μελέτες έκφρασης με μικροσυστοιχίες RNA (microarrays) κατέδειξαν για μια ακόμη φορά τη μεγάλη ετερογένεια αυτού του όγκου και τη συγγένεια των κυττάρων που τον αποτελούν με διάφορα άλλα σαρκώματα¹²².

• Όγκοι των λείων μυών

1. Λειομυοσάρκωμα

Πρόκειται για κακοήγη όγκο αποτελούμενο από κύτταρα με σαφή χαρακτηριστικά λείου μυός. Αναπτύσσεται σε ενήλικες μέσης ηλικίας, ωστόσο δεν είναι ασυνήθης και σε νέους και παιδιά. Η συχνότερη εστία εντόπισης είναι το περιτόναιο. Το τυπικό ιστολογικό πρότυπο ανάπτυξης στο λειομυοσάρκωμα περιλαμβάνει καλά αφορισμένες ομάδες από ατρακτοειδή κύτταρα. Υποτροπιάζουν συχνά και δίνουν απομακρυσμένες μεταστάσεις¹²³.

Κυτταρογενετικά, χαρακτηρίζονται από πολύπλοκους καρυοτύπους, χωρίς κάποια ειδική δομική χρωμοσωμική ανωμαλία. Μελέτες με συνδυασμό κυτταρογενετικών

δεδομένων και CGH έδειξαν ότι απώλεια στο χρωμόσωμα 13q14-q21 και περίσσεια γενετικού υλικού στην περιοχή 5p14-pter σχετίζονται με μικρότερη επιβίωση¹²⁴.

• Όγκοι των σκελετικών μυών

1. Εμβρυικό ραβδομυοσάρκωμα

Πρόκειται για κακοήγη όγκο των μαλακών μορίων, ο οποίος συνοψίζει τα φαινοτυπικά και βιολογικά χαρακτηριστικά των εμβρυικών σκελετικών μυών. Αποτελεί το συχνότερο υπότυπο ραβδομυοσαρκώματος. Είναι όγκος των παιδιών και των νέων, με τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης σε ασθενείς κάτω των 5 ετών. Συχνές εστίες ανάπτυξης είναι η κεφαλή, ο τράχηλος και το γεννητικό σύστημα. Ιστολογικά, αποτελείται από αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα, τα οποία βρίσκονται σε διάφορα στάδια μυογένεσης¹²⁵.

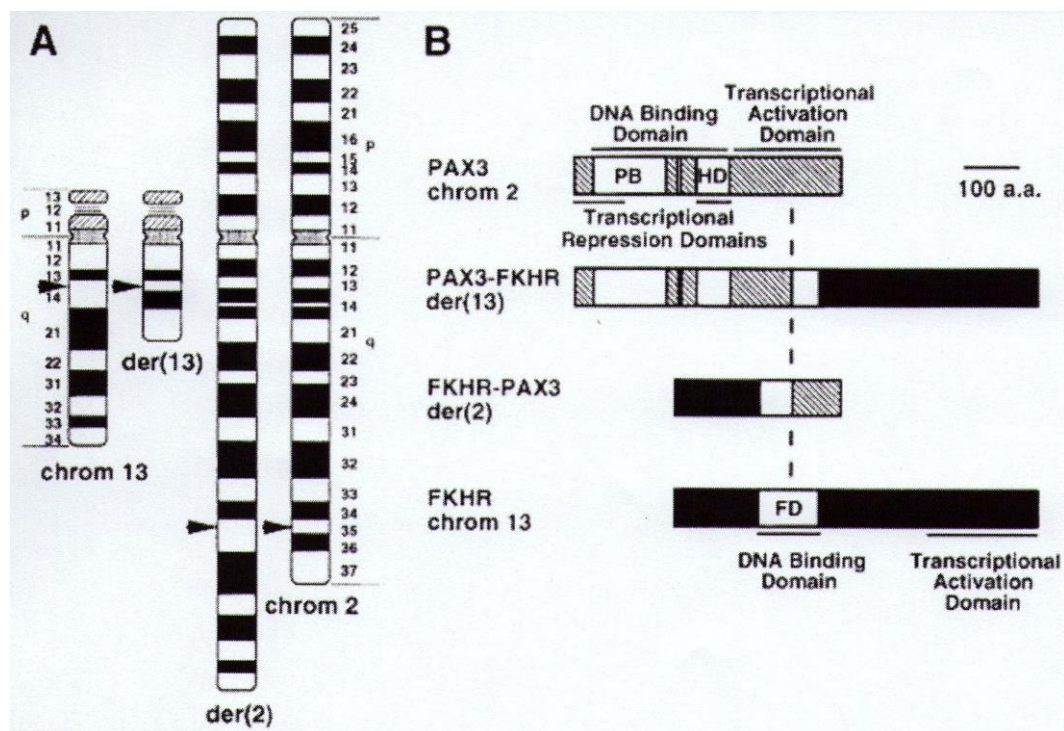
Η αιτιολογία του εμβρυικού ραβδομυοσαρκώματος περιλαμβάνει εκτός από σποραδικές μεταλλάξεις και κληρονομούμενες. Το σύνδρομο Beckwith-Wiedemann, το σύνδρομο Li Fraumeni και η νευροϊνωμάτωση τύπου I προδιαθέτουν στην ανάπτυξη εμβρυικού ραβδομυοσαρκώματος. Τα κυτταρογενετικά δεδομένα για το εμβρυικό ραβδομυοσάρκωμα είναι εξαιρετικά περιορισμένα, με αριθμητικές ανωμαλίες να συνθέτουν τους περισσότερους καρυοτύπους^{126, 127}. Πρόσφατες αναφορές σε 2 περιστατικά εμβρυικού ραβδομυοσαρκώματος αποκάλυψαν τις χρωμοσωμικές μεταθέσεις t(2;20)(q35;p12) και t(2;8)(q35;q13)^{128, 129}. Το γονίδιο *PAX3* εδράζεται στη χρωμοσωμική θέση 2q35 και συμμετέχει στο σχηματισμό υβριδικών γονιδίων στο κυψελιδικό ραβδομυοσάρκωμα. Απομένει λοιπόν να αποδειχθεί αν και τα εμβρυικά ραβδομυοσαρκώματα χαρακτηρίζονται από γενετικές ανακατατάξεις που περιλαμβάνουν αυτό το γονίδιο¹³⁰. Μοριακές αναλύσεις έχουν δείξει απώλεια αλληλίων από τη γενετική θέση 11p15. Μελέτες με CGH έδειξαν πλεόνασμα γενετικού υλικού στα χρωμοσώματα 2, 7, 8, 12, 13, 17, 18 και 19 και στην περιοχή 12q13-q15¹³¹.

2. Κυψελιδικό ραβδομυοσάρκωμα

Πρόκειται για κακοήγη όγκο με στρογγυλά κύτταρα, ο οποίος μοιάζει με λέμφωμα και εμφανίζει κατά τόπους διαφοροποίηση προς σκελετικό μυ. Είναι όγκος που προσβάλλει κυρίως τους νέους ενήλικες. Συνηθέστερη εστία ανάπτυξης είναι τα άκρα.

Ιστολογικά, αποτελείται από στρογγυλοκύτταρα με αρχέγονη μυοβλαστική διαφοροποίηση¹³².

Κυτταρογενετικά χαρακτηρίζεται από τις μεταθέσεις $t(2;13)(q35;q14)$ και $t(1;13)(p36;q14)$. Το αποτέλεσμα τους είναι η δημιουργία των υβριδικών γονιδίων *PAX3/FKHR* και *PAX7/FKHR* αντιστοίχως^{127, 133, 134}. Οι γενετικές αυτές ανακατατάξεις είναι παθογνωμονικές για το κυψελιδικό ραβδομυοσάρκωμα. Μελέτες με CGH αποκάλυψαν πλεόνασμα γενετικού υλικού στην χρωμοσωμική περιοχή 12q13-15 σε ποσοστό άνω του 50%, στην οποία περιέχονται γονίδια όπως το *CDK4*, *MDM2* και *GLI*^{135, 136}. Επίσης, παρατηρήθηκε σε ποσοστό 36% ενίσχυση της περιοχής 2p24, η οποία σχετίζεται με ενίσχυση του *MYCN* γονιδίου[89].



Εικόνα V.7: σχηματική αναπαράσταση (A) των φυσιολογικών και των αναδιαταγμένων από τη μετάθεση $t(2;13)$ χρωμοσωμάτων, με βέλη επισημαίνονται τα σημεία θραύσης. (B) Οι φυσιολογικές και οι χιμαιρικές πρωτεΐνες με τις δομές που τις αποτελούν, οι οποίες είναι αποτέλεσμα του σχηματισμού του υβριδικού γονιδίου *PAX3/FKHR*. Με τις διακεκομμένες γραμμές επισημαίνονται τα σημεία θραύσης.

3. Πλειόμορφο ραβδομυοσάρκωμα

Πρόκειται για υψηλού βαθμού κακοήθειας σάρκωμα, το οποίο αποτελείται από περίεργα στρογγυλά, ατρακτοειδή και πολυγωνικά κύτταρα με στοιχεία διαφοροποίησης

σε σκελετικό μυ. Μπορεί να αναπτυχθεί σε οποιοδήποτε σημείο του σώματος ενηλίκων που βρίσκονται συνήθως στην έκτη δεκαετία της ζωής. Κλινικά, προβάλλει ως ταχέως αναπτυσσόμενη μάζα συνοδευόμενη από πόνο και οίδημα¹³⁷.

Κυτταρογενετικά, μόνο έξι δείγματα έχουν περιγραφεί με πολύπλοκες κυτταρογενετικές ανωμαλίες^{127, 138}. Μελέτες με CGH σε 7 περιστατικά αποκάλυψαν πλεόνασμα υλικού στην περιοχή 1p22-p33 σε ποσοστό 71%, στο 7p (43%), στο 18q (43%), στο 20p (43%), στο 10q23 (71%), στο 15q21-q22 (57%), και στα 3p, 5q32-qter, 13 (43%). Αυτές οι χρωμοσωμικές περιοχές διαφέρουν από τις αντίστοιχες του κυψελιδικού ραβδομυοσάρκωματος και προσομοιάζουν με του κακοήθους ινώδους ιστιοκυττώματος και του οστεοσάρκωματος¹³⁸.

- **Αγγειακοί όγκοι**

1. Επιθηλιοειδές αιμαγγειοενδοθηλίωμα

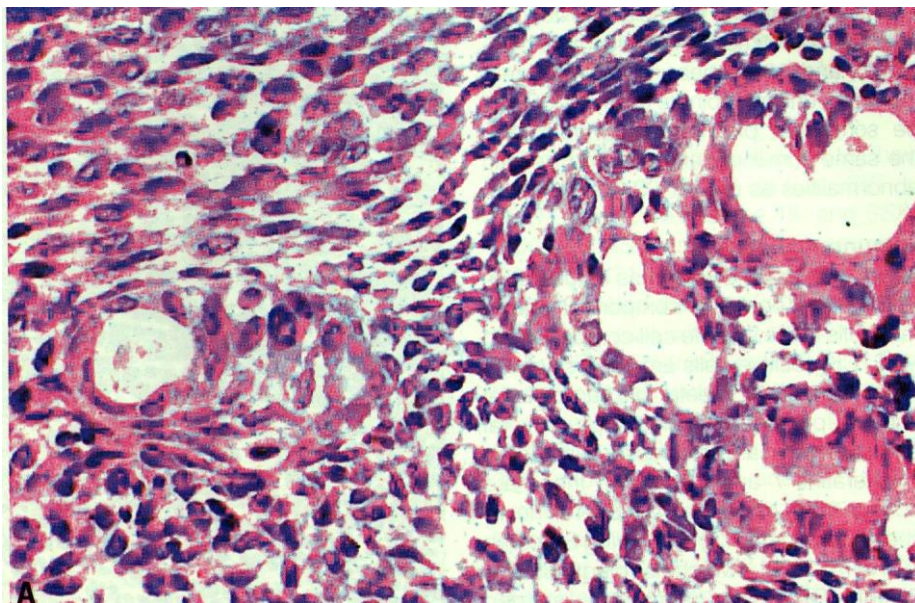
Πρόκειται για αγγειακό όγκο με μεταστατικό δυναμικό, οποίος αποτελείται από επιθηλιοειδή ενδοθηλιακά κύτταρα που σχηματίζουν ένα δίκτυο σε στρώμα μυξοϋαλίνης. Είναι ένας σπάνιος όγκος, ο οποίος μπορεί να αναπτυχθεί σε οποιαδήποτε ηλικία της ζωής. Κλινικά, προβάλλει με πόνο και μπορεί να συνοδεύεται από οίδημα και θρομβοφλεβίτιδα. Ιστολογικά, αποτελείται από δίκτυο στρογγυλών έως ατρακτοειδών κυττάρων, τα οποία ονομάζονται επιθηλιοειδή κύτταρα. Το επιθηλιοειδές αιμαγγειοενδοθηλίωμα είναι όγκος ενδιάμεσης κακοήθειας. Τοπική υποτροπή παρατηρείται σε ποσοστό 10-15%, μεταστάσεις σε ποσοστό 20-30% και θνητότητα σε 10-20% των περιπτώσεων¹³⁹.

Κυτταρογενετικά, λίγα περιστατικά έχουν περιγραφεί. Ωστόσο, σε 2 περιπτώσεις έχει αναφερθεί η μετάθεση t(1;3)(p36;q25)¹⁴⁰.

- **Όγκοι αβέβαιης διαφοροποίησης**

1. Συνοβιακό σάρκωμα

Είναι ένας μεσεγχυματικός ατρακτοκυτταρικός όγκος, ο οποίος εμφανίζει ποικίλη επιθηλιακή διαφοροποίηση. Πρόκειται για όγκο των νέων ανθρώπων με τους περισσότερους ασθενείς να έχουν ηλικία μεταξύ 15-35 ετών. Μπορεί να αναπτυχθεί σε οποιοδήποτε σημείο του σκελετού, με συχνότερη εστία το γόνατο. Κλινικά προβάλλει ως μια αργά αναπτυσσόμενη μάζα χωρίς πόνο. Ιστολογικά, διακρίνεται σε μονοφασικό και διφασικό. Το διφασικό συνοβιακό σάρκωμα αποτελείται από ατρακτοειδή και επιθηλιακά κυτταρικά στοιχεία. Το μονοφασικό συνήθως ως μοναδικό κυτταρικό στοιχείο έχει τα ατρακτοειδή κύτταρα. Το 90% των συνοβιακών σαρκωμάτων εκφράζει ανοσοϊστοχημικά τις κυτταροκερατίνες. Το 50% των συνοβιακών σαρκωμάτων υποτροπιάζουν μέσα σε 2 χρόνια. Η πενταετής επιβίωση κυμαίνεται από 36-76% και η δεκαετής από 20-63%¹⁴¹.

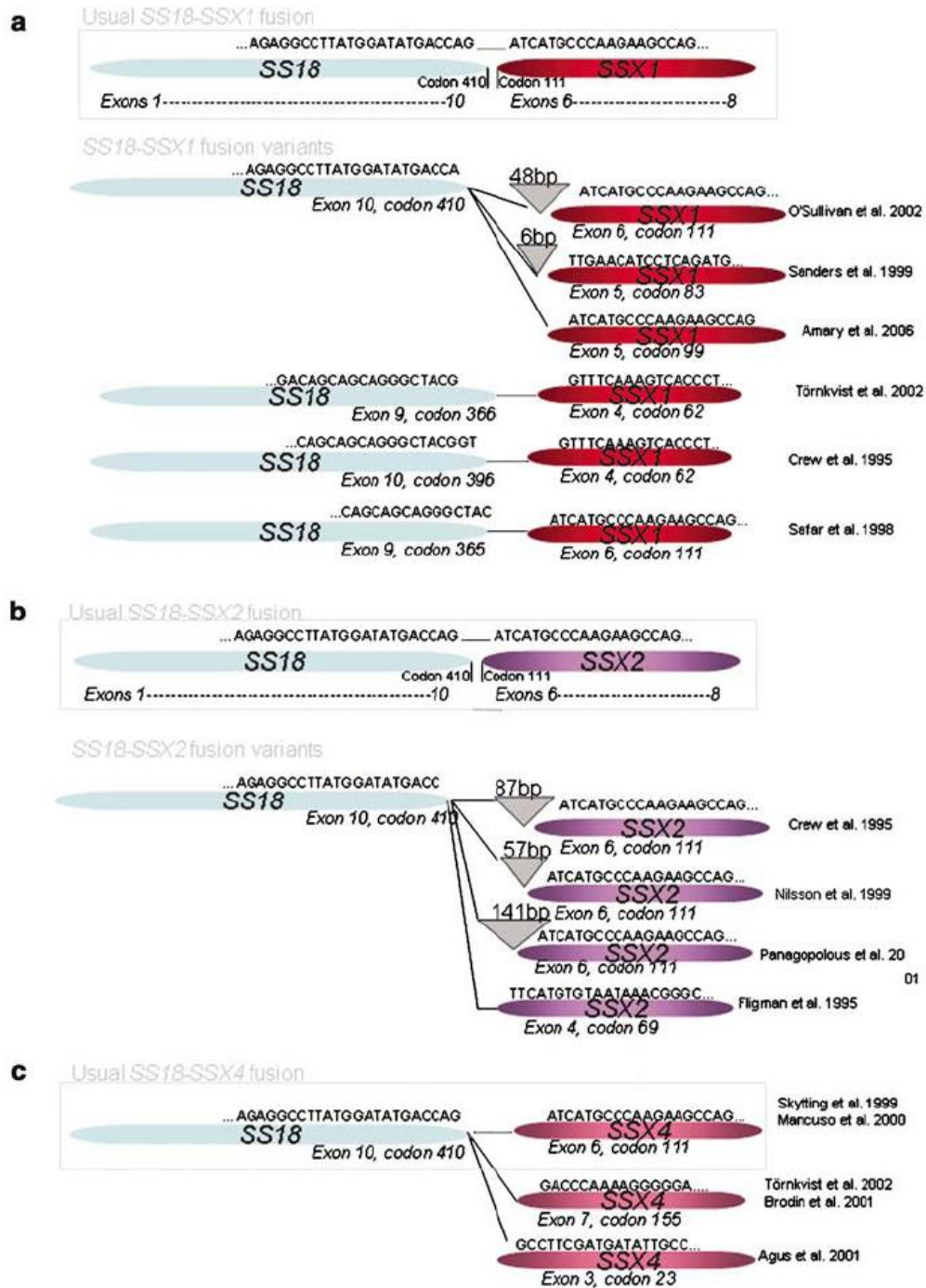


Εικόνα V.8: ιστολογική εικόνα διφασικού συνοβιακού σαρκώματος, αποτελούμενο από κοκκιώδη και ατρακτοειδή κύτταρα.

Κυτταρογενετικά ευρήματα έχουν δημοσιευθεί από το 1986. Το συνοβιακό σάρκωμα χαρακτηρίζεται από την παθολογική μετάθεση $t(X;18)(p11.2;q11.2)$, η οποία έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό του υβριδικού γονιδίου *SYT-SSX*. Αυτή η ανακατάταξη εντοπίζεται σε ποσοστό άνω του 90% των συνοβιακών σαρκωμάτων. Ο εντοπισμός της μπορεί να γίνει με διάφορες μεθόδους όπως η κλασική κυτταρογενετική, το FISH και η RT-PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφική)^{142, 143}. Στο σχηματισμό του υβριδικού γονιδίου συμμετέχει το 5' άκρο του γονιδίου *SYT(18)* με το 3' άκρο των γονιδίων *SSX1*, *SSX2*, τα οποία βρίσκονται στη χρωμοσωμική περιοχή

Xp11.2. Οι πρωτεΐνες syt και ssx είναι πυρηνικές πρωτεΐνες και ενέχονται στη ρύθμιση της μεταγραφής. Σε συνοβιακά σαρκώματα που έχουν μελετηθεί μοριακά για την ύπαρξη του υβριδικού γονιδίου, το 75% εμφάνιζε το *SYT-SSX1* και 25% των περιπτώσεων το *SYT-SSX2*. Πρέπει να τονιστεί ότι η πρόγνωση των ασθενών με τον τύπο *SYT-SSX1* υβριδικού γονιδίου είναι χειρότερη σε σύγκριση με τους άλλους με τον τύπο *SYT-SSX2*. Συνολικά, έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία 6 τύποι για το υβριδικό γονίδιο *SYT-SSX1*, 4 τύποι για το *SYT-SSX2*, 3 τύποι για το *SYT-SSX4* και μια μόνο περίπτωση με το υβριδικό γονίδιο *SS18L1-SSX1*¹⁴⁴⁻¹⁴⁷. Το *SS18L1* εντοπίζεται στη χρωμοσωμική θέση 20q13.3.

Μελέτες με CGH έδειξαν πλεόνασμα γενετικού υλικού στις χρωμοσωμικές περιοχές: 8q, 12q14-q15, 12q23-qter, 2p, 17q22-qter, 1q24-q31, 1q31-qter, 2q13-q22, Xq και 16p. Απώλειες γενετικού υλικού σημειώθηκαν στις περιοχές: 13q21-q31, 3p, 3cen-q23, 10q21, Xq21-qter, 1cen-p21, 11q14-qter και 16q. Η συχνότητα των ανακατατάξεων είναι μεγαλύτερη στους μονοφασικούς όγκους σε σχέση με τα διφασικά συνοβιακά σαρκώματα¹⁴⁸. Όγκοι με μέγεθος μεγαλύτερο από 5 εκατοστά σε διάμετρο εμφανίζουν πλεόνασμα στο χρωμόσωμα 8, σχετίζοντας τη συγκεκριμένη ανωμαλία με αυξημένο ρυθμό ανάπτυξης¹⁴⁹.

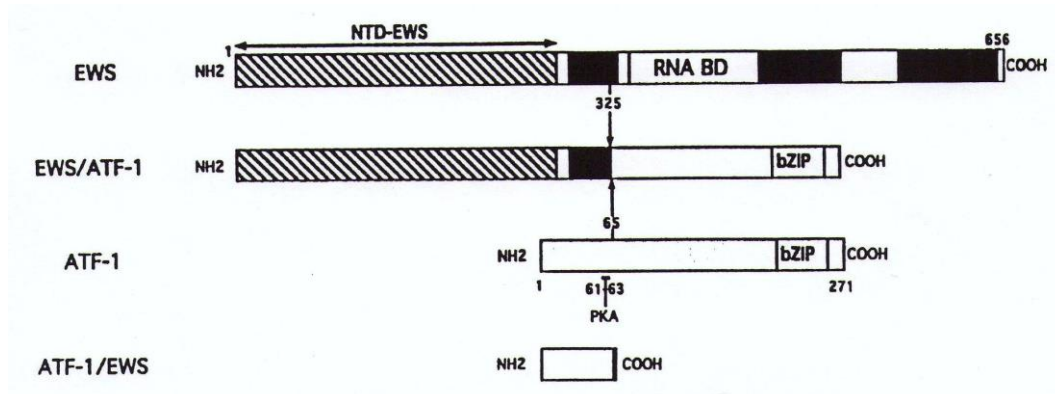


Εικόνα V.9: σχηματική αναπαράσταση των τύπων των υβριδικών γονιδίων α) SS18/SSX1, b) SS18/SSX2, c) SS18/SSX4. Επισημαίνονται τα σημεία θραύσης και οι αλληλουχίες των γονιδίων στα σημεία αυτά. Ακόμη, με τα γκρι τρίγωνα φαίνονται αλληλουχίες που δεν ανήκουν σε κανένα από τα δυο γονίδια.

2. Σάρκωμα εκ διαυγών κυττάρων

Πρόκειται για όγκο των νέων ανθρώπων με μελανοκυτταρική διαφοροποίηση. Τυπικά, προσβάλλει τους τένοντες και τις απονευρώσεις. Κυρίως αναπτύσσεται στα άκρα με την ποδοκνημική να περιλαμβάνει το 40% των περιπτώσεων. Κλινικά, προβάλλει ως αργά αναπτυσσόμενη μάζα και στο 50% των περιπτώσεων αναφέρεται πόνος και οίδημα. Ιστολογικά, ο όγκος εμφανίζει χαρακτηριστικό πρότυπο ανάπτυξης και αποτελείται από κύτταρα πολυγωνικά και ατρακτοειδή με διαυγές κυτταρόπλασμα¹⁵⁰.

Κυτταρογενετικά το σάρκωμα εκ διαυγών κυττάρων χαρακτηρίζεται από τη μετάθεση $t(12;22)(q13;q12)$. Αυτή η μετάθεση οδηγεί στο σχηματισμό του υβριδικού γονιδίου *EWS/ATF1*. Η προαναφερθείσα μετάθεση έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας υβριδικής πρωτεΐνης *ews/atf1*, η οποία λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας. Επίσης, πολύ συχνό εύρημα αποτελεί και η τρισωμία του χρωμοσώματος 8¹⁵¹.



Εικόνα V.10: σχηματική αναπαράσταση των υβριδικών πρωτεϊνών που δημιουργούνται ως αποτέλεσμα του σχηματισμού του υβριδικού γονιδίου *EWS/ATF1*

3. Κυψελιδικό σάρκωμα των μαλακών μορίων

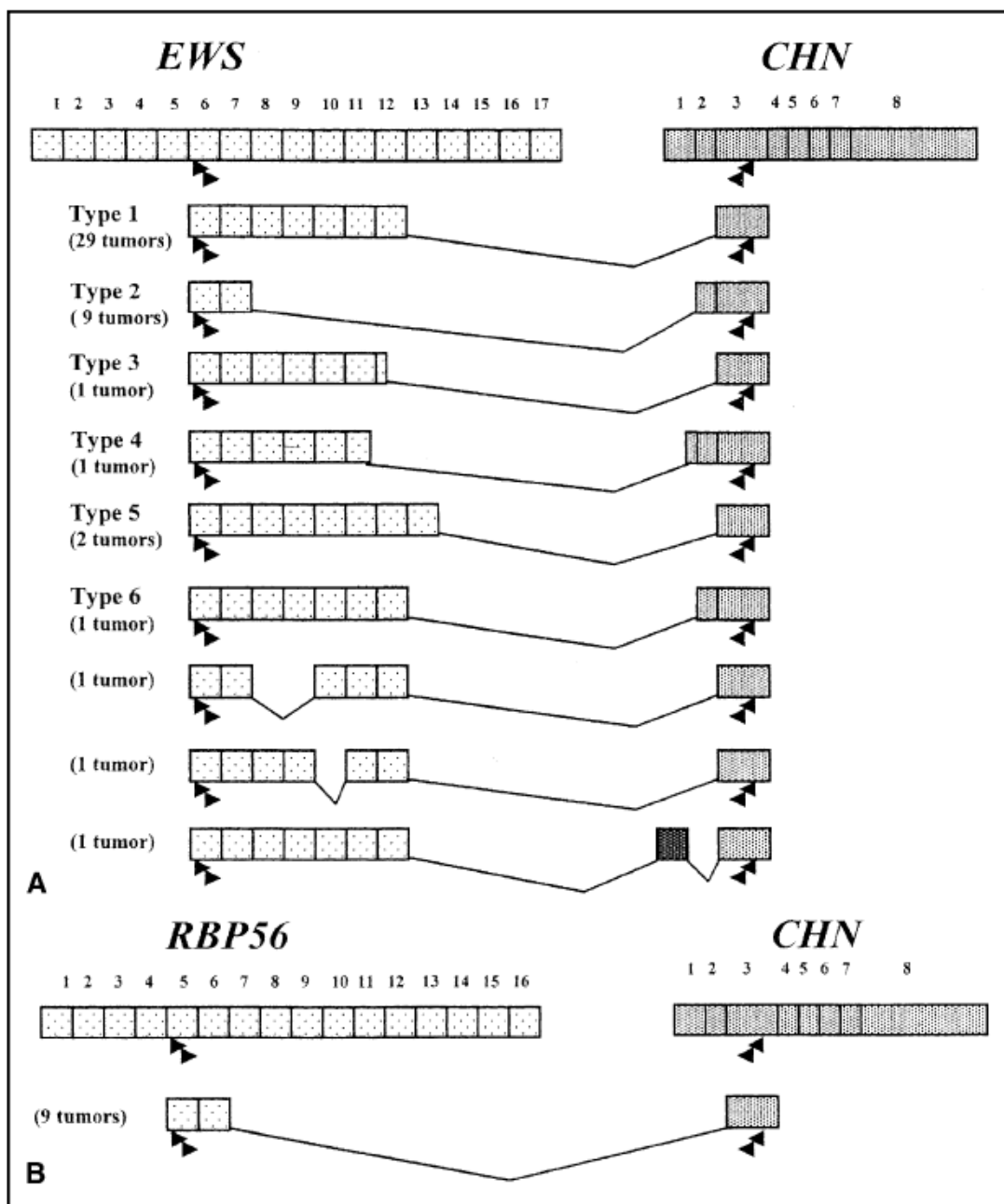
Είναι σπάνιος κακοήθης όγκος που προσβάλλει νέους ενήλικες. Αποτελείται από μεγάλα επιθηλιοειδή κύτταρα με έντονα ηωσινοφιλικό κυτταρόπλασμα, τα οποία σχηματίζουν ένα δίκτυο κυψελιδικών δομών που διαχωρίζονται από λεπτά κολποειδή αγγεία. Η μέγιστη συχνότητα εμφάνισής του κυμαίνεται σε ασθενείς ηλικίας μεταξύ 15-35 ετών. Η συνηθέστερη εστία ανάπτυξης είναι τα μαλακά μόρια του μηρού. Το χαρακτηριστικό ιστολογικό εύρημα είναι το πρότυπο δικτύωσης που παρατηρείται σε όλο το παρασκεύασμα. Αναπτύσσεται αργά και δεν υποτροπιάζει συχνά, έχει όμως πολύ υψηλό μεταστατικό δυναμικό¹⁵².

Τα κυτταρογενετικά δεδομένα είναι σχετικά περιορισμένα εξαιτίας της σπανιότητας του όγκου. Χαρακτηρίζεται από την μη ισοζυγισμένη χρωμοσωμική αναδιάταξη $\text{der}(17)t(X;17)(p11;q25)$. Αυτή η μετάθεση έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό του υβριδικού γονιδίου *ASPL/TFE3*. Το γεγονός ότι πρόκειται για μη ισοζυγισμένη αναδιάταξη είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον, αφού στη βιολογία του όγκου δεν συμμετέχει μόνο το υβριδικό γονίδιο, αλλά και η απώλεια χρωμοσωμικού υλικού από το 17q25-qter και το πλεόνασμα των αλληλουχιών στη χρωμοσωμική περιοχή Xp11-pter. Αυτή η ιδιότητα του κυψελιδικού σαρκώματος των μαλακών μορίων είναι μοναδική στα σαρκώματα των μαλακών μορίων και των οστών¹⁵³.

4. Εξωσκελετικό μυξοειδές χονδροσάρκωμα

Πρόκειται για κακοήγη όγκο των μαλακών μορίων με πολυλοβώδη αρχιτεκτονική, περίσσεια εξωκυττάριας μυξοειδούς ουσίας και παρουσία κακοήθων χονδροβλαστικών κυττάρων. Είναι σπάνιος όγκος των ενηλίκων με μέγιστη συχνότητα εμφάνισης την έκτη δεκαετία της ζωής. Προβάλλει ως αναπτυσσόμενη μάζα των μαλακών μορίων, με ή χωρίς πόνο και ανάλογα με την ανατομική του θέση μπορεί να προκαλέσει μείωση της κίνησης σε κάποια άρθρωση. Οι συχνότερες εστίες εμφάνισης είναι το κάτω τριτημόριο του μηρού και η λεκάνη. Ανασοϊστοχημικά η βιμεντίνη είναι ο μοναδικός δείκτης που εκφράζεται σε αυτό τον όγκο¹⁵⁴.

Τα κυτταρογενετικά χαρακτηριστικά του όγκου περιλαμβάνουν την ύπαρξη 3 ειδικών μεταθέσεων: $t(9;22)(q22;q12)$, $t(9;17)(q22;q11)$ και $t(9;15)(q22;q21)$. Η μετάθεση $t(9;22)(q22;q12)$ έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία του υβριδικού γονιδίου *EWS/CHN*. Αυτό το υβριδικό γονίδιο συντίθεται από το άμινοτελικό άκρο του γονιδίου *EWS* με το 5' άκρο του γονιδίου *CHN*. Τα σημεία θραύσης αυτών των δυο γονιδίων εμφανίζουν μεγάλη ποικιλότητα και έως σήμερα έχουν περιγραφεί 9 διαφορετικοί τύποι αυτού του υβριδικού γονιδίου. Η μετάθεση $t(9;17)(q22;q11)$ έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό του υβριδικού γονιδίου *RBP56/CHN*. Η αλληλουχία του γονιδίου *RBP56* (*TAF2N*, *TAF15*, *hTAFII68I*) εμφανίζει σημαντικές ομολογίες με των γονιδίων *EWS* και *FUS*. Η τρίτη μετάθεση $t(9;15)(q22;q21)$ σχηματίζει το υβριδικό γονίδιο *TCF12/CHN*. Ωστόσο, οι άμινοτελικές αλληλουχίες του γονιδίου *TCF12* δεν εμφανίζουν ομολογία με τις αντίστοιχες των γονιδίων *EWS* και *RBP56*. Οι πιο συχνές δευτερογενείς ανωμαλίες¹⁵⁵ περιλαμβάνουν τρισωμίες στα χρωμοσώματα 8, 12 και 1q, όπως αναφέρεται και σε μελέτες με CGH¹⁵⁶⁻¹⁵⁸.



Εικόνα V.11: σχηματική αναπαράσταση (A) των 9 τύπων του υβριδικού γονιδίου EWS/CHN και (B) του υβριδικού γονιδίου RBP56/CHN. Με νούμερα είναι αριθμημένα τα εξόνια κάθε γονιδίου.

5. Δεσμοπλαστικός μικροστρογγυλοκυτταρικός όγκος

Πρόκειται για όγκο ο οποίος αποτελείται από μικρά στρογγυλά κύτταρα απροσδιόριστης ιστολογικής προέλευσης τα οποία εμφανίζουν δεσμοπλασία και πολυφαινοτυπική διαφοροποίηση. Συνήθως, προσβάλλει μικρά παιδιά και νέους ανθρώπους, με μέγιστη συχνότητα εμφάνισης την τρίτη δεκαετία της ζωής. Οι συχνότερες εστίες ανάπτυξης είναι στην κοιλιακή χώρα¹⁵⁹.

Κυτταρογενετικά, εντοπίζεται η χαρακτηριστική μετάθεση $t(11;22)(p13;q12)$. Αυτή η δομική χρωμοσωμική ανωμαλία προκαλεί το σχηματισμό του υβριδικού γονιδίου *EWS/WT1*. Έως σήμερα έχουν περιγραφεί τρεις υπότυποι αυτού του υβριδικού γονιδίου (*EWS* εξώνιο 7/*WT1* εξώνιο 8, *EWS* εξώνιο 8/*WT1* εξώνιο 8 και *EWS* εξώνιο 9/*WT1* εξώνιο 8)¹⁶⁰.

2. Όγκοι των οστών

Οι πρωτοπαθείς όγκοι των οστών είναι γενικά σπάνιοι, αποτελώντας το 0,2% των όγκων που εμφανίζονται στον άνθρωπο. Το οστεοσάρκωμα είναι ο συχνότερος όγκος των οστών αποτελώντας το 35% και ακολουθείται σε συχνότητα από το χονδροσάρκωμα (25%) και από το σάρκωμα Ewing (16%). Η ηλικιακή κατανομή των όγκων των οστών παρουσιάζει δυο κορυφές. Η πρώτη εντοπίζεται στην δεύτερη δεκαετία ζωής και η δεύτερη κορυφή σε ασθενείς μετά την ηλικία των 60 ετών.

Το οστεοσάρκωμα προσβάλλει κυρίως τους νέους ασθενείς κάτω των 20 ετών και σε ποσοστό 80% εντοπίζεται στα μακρά οστά των άκρων. Τα χονδροσάρκωματα εμφανίζουν μια σταδιακή αύξηση δίνοντας τη μέγιστη συχνότητα εμφάνισης στις ηλικίες άνω των 75 ετών. Πάνω από 50% των περιπτώσεων εντοπίζονται στα μακρά οστά των άκρων. Το σάρκωμα Ewing έχει επιδημιολογικά χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά του οστεοσάρκωματος, όμως εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στη διάφυση των οστών. Επιπλέον, το σάρκωμα Ewing έχει μια σαφή προτίμηση εμφάνισης στη λευκή φυλή¹⁶¹.

Παρόλο που οι περισσότεροι όγκοι των οστών εμφανίζονται de novo, υπάρχουν περιπτώσεις που αναπτύσσονται σε προγενέστερες αλλοιώσεις. Μερικές από αυτές τις αλλοιώσεις είναι μη νεοπλασματικές εξεργασίες που όμως προδιαθέτουν στην κακοήγη εξαλλαγή. Άλλες είναι καλοήγη νεοπλάσματα που αποτελούν την πηγή ανάπτυξης του σαρκώματος.

Η αιτιολογία των όγκων των οστών παραμένει άγνωστη. Τα κλινικά τους συμπτώματα είναι μη ειδικά και για αυτό το λόγο η διάγνωση είναι πολλές φορές καθυστερημένη. Ο πόνος, το οίδημα, ο περιορισμός της κίνησης και τα παθολογικά κατάγματα αποτελούν τα κυριότερα συμπτώματα. Η διάγνωση τίθεται με βιοψία.

- **Χονδρογενείς όγκοι**

1. Οστεοχόνδρωμα

Οστεοχόνδρωμα ή εξόστωση είναι μια οστική προεξοχή που περιβάλλεται από χόνδρο. Μπορεί να είναι μονήρης βλάβη δηλαδή μονήρες οστεοχόνδρωμα ή πολλαπλές βλάβες, στα πλαίσια του κληρονομικού συνδρόμου των πολλαπλών εξοστόσεων. Οι μονήρεις βλάβες είναι συνήθως ασυμπτωματικές και συμβαίνουν στις 3 πρώτες δεκαετίες

ζωής χωρίς προτίμηση στο φύλο. Το 15% των ασθενών με οστεοχόνδρωμα έχει πολλαπλές βλάβες με παρόμοια επιδημιολογία με τις μονήρεις. Τα οστεοχονδρώματα συμβαίνουν σε οστά που περιβάλλονται από χόνδρο. Οι συχνότερες εστίες είναι η μετάφυση του μηριαίου, το βραχιόνιο, η κνήμη και η ωλένη. Η αιτιολογία τους παραμένει αδιευκρίνιστη και όταν υπάρχουν συμπτώματα είναι μη ειδικά. Η εμφάνιση συμπτωμάτων πόνου και αναπτυσσόμενης μάζας υποδηλώνουν κακοήθη εξαλλαγή σε χονδροσάρκωμα. Η πιθανότητα κακοήθους εξαλλαγής στις μονήρεις βλάβες είναι λιγότερη από 1% και στις πολλαπλές εξοστώσεις φτάνει το 3%. Ιστολογικά διακρίνονται τρεις ζώνες από περιχόνδριο, χόνδρο και οστό. Απώλεια της αρχιτεκτονικής του χόνδρου, μυξοειδής αλλαγή, αυξημένος αριθμός χονδροκυττάρων, μιτωτική δραστηριότητα, ατυπία χονδροκυττάρων και νέκρωση είναι χαρακτηριστικά κακοήθους εξαλλαγής^{156, 157}.

Στα γενετικά δεδομένα σημαντικό ρόλο παίζουν τα γονίδια *EXT*. Μεταλλάξεις στο *EXT1* (χρωμοσωμική περιοχή 8q24) και στο *EXT2* (χρωμοσωμική περιοχή 11p11-p12) ανιχνεύονται σε ασθενείς με σύνδρομο πολλαπλών εξοστόσεων. Σε ένα περιστατικό μονήρους οστεοχονδρώματος έχει αναφερθεί κλωνική έλλειψη στη χρωμοσωμική περιοχή 11p11-p12 στην οποία περιέχεται το γονίδιο *EXT2*¹⁶². Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η συμμετοχή της χρωμοσωμικής περιοχής 8q24 σε μεταθέσεις και ελλείψεις, στην οποία περιέχεται το γονίδιο *EXT1* σε περιπτώσεις σποραδικών χονδροσαρκωμάτων¹⁶³. Επιπλέον, έχει σχολιαστεί ο πιθανός ρόλος της πολυπλοειδίας και της γενωμικής αστάθειας στα χονδροσαρκώματα που εξελίχθηκαν από εξοστώσεις, σε αντίθεση με τα τελείως διαφορετικά γενετικά γεγονότα που σχετίζονται με τα σκελετικά χονδροσαρκώματα. Μελέτες με συνδυασμό κλασικής κυτταρογενετικής και CGH έδειξαν ότι υπάρχουν περιπτώσεις με ομαλό καρυότυπο και γενετικό προφίλ, που πιθανώς φέρουν μόνο γονιδιακές μεταλλάξεις που δεν μπορούν να εντοπιστούν. Τέλος, εκτός από τις ανωμαλίες στο χρωμόσωμα 8 έχουν αναφερθεί και κλωνικές ανωμαλίες στο χρωμόσωμα 1 στην περιοχή 1p13-p22¹⁶⁴.

2. Χονδρώματα

Ενχόνδρωμα, περιοστικό χόνδρωμα και ενχονδρωμάτωση. Πρόκειται για καλοήθη νεοπλάσματα του χόνδρου, που αναπτύσσονται είτε στο μυελό των οστών (ενχόνδρωμα), είτε στο περίοστεο (περιοστικό χόνδρωμα) είτε στα πλαίσια αποτυχημένης φυσιολογικής χονδρογενούς οστεοποίησης (Ollier disease, ενχονδρομάτωση). Τα ενχονδρώματα και η ενχονδρωμάτωση αναπτύσσονται συνήθως στα οστά των δακτύλων των χεριών ενώ τα

περιοστικά χονδρώματα στα μακρά οστά με συνηθέστερο το μηριαίο. Η ριζική εκτομή τους αποτελεί την ενδεδειγμένη θεραπεία. Τα ενχονδρώματα και η νόσος του Ollier μπορεί να υποστούν κακοήγη εξαλλαγή σε χονδροσάρκωμα¹⁶⁵. Στη νόσο του Ollier το ποσοστό εξαλλαγής ανέρχεται σε 25-30%.

Τα γενετικά δεδομένα για αυτούς τους όγκους είναι σχετικά περιορισμένα¹⁶⁶. Έχουν παρατηρηθεί κλωνικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες, οι οποίες δεν έχουν συσχετιστεί με συγκεκριμένο διαγνωστικό κριτήριο. Έχουν βρεθεί ανωμαλίες στο χρωμόσωμα 6 και στη χρωμοσωμική περιοχή 12q13-q15, οι οποίες φαίνεται να μην είναι τυχαίες¹⁵⁷.

3. Χονδροβλάστωμα

Είναι ένα καλοήθες νεόπλασμα του χόνδρου που αναπτύσσεται στις επιφύσεις ασθενών με ατελή σκελετική ωρίμανση. Η συνηθέστερη ηλικία εκδήλωσης της νόσου είναι τα 10-25 έτη. Τα οστά που προσβάλλονται είναι τα μακρά οστά, όπως το μηριαίο, η κνήμη και το βραχιόνιο. Ιστολογικά, το χαρακτηριστικό κύτταρο, η χονδροβλάστη, έχει σχήμα στρογγυλό έως πολυγωνικό, ηωσινοφιλικό κυτταρόπλασμα και στρογγυλό-ωοειδή πυρήνα. Η τοπική υποτροπή είναι συχνή.

Γενετικά έχουν αναφερθεί ανωμαλίες που περιλαμβάνουν τα χρωμοσώματα 5 και 8. Ειδικά η χρωμοσωμική περιοχή 8q21 έχει περιγραφεί να ενέχεται σε ανακατατάξεις σε ένα περιστατικό επιθετικού χονδροβλαστώματος¹⁵⁷.

4. Χονδρομυξοειδές ίνωμα

Το χονδρομυξοειδές είναι σπάνιος καλοήθης όγκος που αποτελείται από χαρακτηριστικά λοβία ατρακτοειδών κυττάρων με πλούσια μυξοειδή ή χόνδρινη μεσοκυττάρια ουσία. Μπορεί να αναπτυχθεί σε οποιοδήποτε σημείο του σκελετού, έχει όμως μια προτίμηση προς τα μακρά οστά. Η μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισής του είναι η δεύτερη με τρίτη δεκαετία της ζωής. Ανασοϊστοχημικά παρουσιάζει μεγάλη ποικιλία χαρακτηριστικών, κανένα όμως από τα οποία δεν είναι απόλυτα ειδικό. Παρατηρείται αυξημένη έκφραση του κολαγόνου τύπου II, των πρωτεϊνών S100B και S100A και της οστεοκαλσίνης. Η τοπική υποτροπή είναι σπάνια και όταν συμβαίνει η εκτομή της αποτελεί ριζική θεραπεία.

Γενετικά, έχουν αναλυθεί 15 περιστατικά, χωρίς να έχει περιγραφεί κάποια διαγνωστική χρωμοσωμική ανωμαλία. Οι χρωμοσωμικές περιοχές 6p25, 6q13, 6q15 ενέχονται σε κλωνικές ανακατατάξεις και απαιτείται μοριακή ανάλυση¹⁵⁷.

5. Συνοβιακή χονδρομάτωση

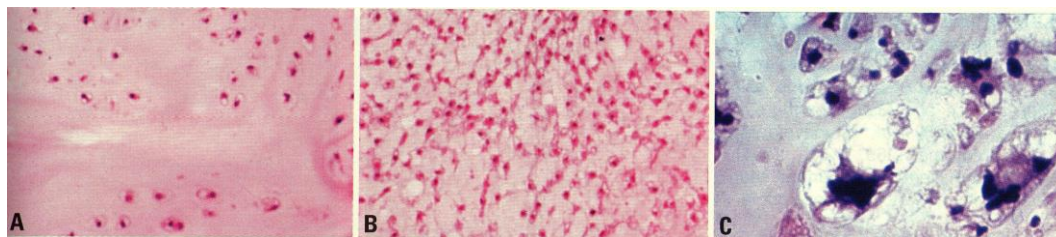
Η συνοβιακή χονδρομάτωση είναι μια εξελισσόμενη καλοήθης χόνδρινη εξεργασία που αναπτύσσεται στον ορογόνο υμένα των αρθρώσεων, των αρθρικών θυλάκων και των τενοντίων ελύτρων. Συνήθως αφορά στα οστά του ποδιού και λιγότερο συχνά στον ώμο, στον καρπό και στον αστράγαλο. Ιστολογικά παρατηρούνται λοβία χονδροκυττάρων που καλύπτονται από ινώδη κάψα. Σπάνια, η συνοβιακή χονδρομάτωση μπορεί να εξαλλαγεί σε χονδροσάρκωμα^{167, 168}.

Κυτταρογενετικά έχουν περιγραφεί ανωμαλίες υποδεικνύοντας τη νεοπλασματική καταγωγή αυτής της αλλοίωσης¹⁶⁹. Σε 5 περιστατικά έχουν βρεθεί ελλείψεις στο χρωμόσωμα 6¹⁷⁰. Μοριακές μελέτες αποδεικνύουν αυξημένη έκφραση του *FGF9* που συνδέεται με το μονοπάτι *sonic-hedgehog* (*shh* signaling pathway), το οποίο όταν παραμένει ενεργό κατά την ενήλικη ζωή μπορεί να οδηγήσει σε καρκινογένεση. Το γονίδιο *RAB23* που συμμετέχει στο *shh* μονοπάτι βρίσκεται στη χρωμοσωμική περιοχή 6p12, ενώ το κολλαγόνο τύπου IX που παράγεται από τα πολλαπλασιαζόμενα χονδροκύτταρα βρίσκεται στην περιοχή 6q12-q14¹⁷¹.

6. Χονδροσάρκωμα

Το χονδροσάρκωμα είναι κακοήθης όγκος που εμφανίζει στοιχεία διαφοροποίησης με υαλώδη χόνδρο και στον οποίο μπορεί να συνυπάρχουν στοιχεία ασβέστωσης, οστικής ή και μυξοειδούς αλλαγής. Το πρωτοπαθές σκελετικό ή κεντρικό χονδροσάρκωμα αναπτύσσεται κεντρικά σε ένα οστό μέχρι πρόσφατα υγιές. Η πλειονότητα των ασθενών είναι άνω των 50 ετών. Οι συχνότερες εστίες είναι τα οστά της λεκάνης, το μηριαίο, η κνήμη και τα πλευρά. Τα κλινικά συμπτώματα περιλαμβάνουν πόνο και οίδημα και είναι παρόντα για χρονικό διάστημα μηνών ή και ετών. Ιστολογικά παρατηρείται πλεόνασμα χόνδρινης μεσοκυττάριας ουσίας. Υπάρχει αυξημένος αριθμός κυττάρων με εκτεταμένη ατυπία ως προς το μέγεθος, το σχήμα και τους πυρήνες των χονδροκυττάρων^{172, 173}. Υπάρχει αυξημένη πιθανότητα υποτροπής και μετάστασης. Ασθενείς με στάδιο 1 έχουν

πενταετή επιβίωση σε ποσοστό 89%, ενώ σε ασθενείς σταδίου 2 και 3 η επιβίωση μειώνεται στο 53%¹⁷⁴.



Εικόνα V.12: ιστολογική εικόνα A) χονδροσάρκωμα Gr1: λίγα κύτταρα χωρίς ποικιλία σχήματος και μεγέθους, εικόνα που δύσκολα διακρίνεται από το ενχόνδρωμα, B) χονδροσάρκωμα Gr2: αυξημένος αριθμός κυττάρων με ποικιλία σχήματος και μεγέθους, πλούσιο μυξοειδές στοιχείο, C) χονδροσάρκωμα Gr3: υπερκυτταρικότητα με ποικίλη εμφάνιση και ατυπία, παρατηρούνται μιτώσεις.

Το περιοστικό χονδροσάρκωμα είναι κακοήθης όγκος που περιέχει υαλοειδή χόνδρο και αναπτύσσεται στην επιφάνεια του οστού. Ιστολογικά ταυτίζεται με το κεντρικό χονδροσάρκωμα. Τέλος, το δευτερογενές χονδροσάρκωμα αναπτύσσεται πάνω σε προϋπάρχουσα καλοήγη εξεργασία, όπως το οστεοχόνδρωμα ή το ενχόνδρωμα.

Τα κυτταρογενετικά χαρακτηριστικά του χονδrosαρκώματος περιλαμβάνουν καρυοτύπους με απλές αριθμητικές αλλαγές μέχρι και πολύπλοκους καρυοτύπους με πληθώρα δομικών και αριθμητικών ανωμαλιών. Παρά τη μεγάλη γενετική τους ετερογένεια, υπάρχουν χρωμοσωμικές ζώνες και περιοχές οι οποίες φαίνεται να είναι ειδικές¹⁷⁵. Έτσι έχουν αναφερθεί απώλειες των χρωμοσωμάτων ή των περιοχών 1p36, 1p13-p22, 4, 5q13-q31, 6q22-qter, 9p22-pter, 10p, 10q22-qter, 11p13-pter, 11q25, 13q21-qter, 14q24-qter, 18p, 18q22-qter και 22q13, καθώς και πλεόνασμα γενετικού υλικού στις περιοχές 7p13-pter, 12q15-qter, 19, 20pter-q11 και 21q.

Μοριακές μελέτες σε μεγάλο αριθμό γονιδίων έχουν καταλήξει σε αντικρουόμενα αποτελέσματα μεταξύ των διαφόρων περιπτώσεων. Έχουν δημοσιευθεί αναλύσεις έκφρασης, μεταλλάξεων και απώλειας ετεροζυγωτίας για τα γονίδια *p53*, *MDM2* και το μονοπάτι *RB51*. Επίσης, έχουν βρεθεί ελλείψεις στα γονίδια *p16 (CDKN2A)* και *p15 (MTS2)* οι οποίες παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Η χρωμοσωμική εντόπιση αυτών των γονιδίων είναι η περιοχή 9p21, η οποία εμφανίζει έλλειψη τόσο σε μελέτες CGH όσο και σε κυτταρογενετικά δεδομένα. Ακόμη, η απώλεια ετεροζυγωτίας που εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 10q δεν σχετίζεται με το *PTEN* γονίδιο, αλλά με κάποιο άλλο ογκοκατασταλτικό γονίδιο^{156, 157}.

Μελέτες CGH σε 50 χονδροσαρκώματα δείχνουν πλεόνασμα γενετικού υλικού στις περιοχές 20q12-qter, 20q, 8q24-qter, 20p και 14q24-qter. Οι συχνότερες ελλείψεις εντοπίζονται στις περιοχές Xcen-q21, 6cen-q22 και 18cen-q11.2. Σε υποτροπές και μεταστατικούς όγκους εντοπίστηκε πλεόνασμα στο χρωμόσωμα 7, 5q14-q32, 6p και 12q. Σε μια μελέτη το πλεόνασμα στην περιοχή 8q24-qter σχετιζόταν με μικρότερη επιβίωση¹⁷⁶.

Συνοπτικά η μεγάλη ετερογένεια που παρατηρείται αφορά τόσο στα κυτταρογενετικά όσο και στα μοριακά δεδομένα. Αυτή η ετερογένεια πιθανώς αντικατοπτρίζει μια πολύπλοκη διαδικασία ογκογένεσης για τα χονδροσαρκώματα. Σε αυτή την ογκογενετική διαδικασία σημαντικό ρόλο φαίνεται πως διαδραματίζουν διάφορα ογκοκατασταλτικά γονίδια. Προφανώς λοιπόν, εξέχουσας σημασίας είναι η ανακάλυψη των γονιδίων που ενέχονται στα αρχικά βήματα της ογκογένεσης, καθώς και η σειρά και η φύση των γονιδίων που συμμετέχουν στα επόμενα στάδια της νεοπλασματικής πορείας για το σχηματισμό του χονδροσαρκώματος. Τέτοιες πληροφορίες είναι δυνατό, εκτός από την καλύτερη κατανόηση της βιολογικής συμπεριφοράς των χονδροσαρκωμάτων, να μας οδηγήσουν και στη θεραπεία τους.

7. Αποδιαφοροποιημένο χονδροσάρκωμα

Το αποδιαφοροποιημένο χονδροσάρκωμα αποτελεί μια ποικιλία του χονδροσαρκώματος το οποίο περιέχει δυο σαφή συστατικά: ένα καλά διαφοροποιημένο χόνδρινο όγκο όπως ένα ενχόνδρωμα ή ένα χονδροσάρκωμα χαμηλού βαθμού (low grade chondrosarcoma) σε επαφή με ένα υψηλού βαθμού σάρκωμα χωρίς όμως χόνδρο. Αποτελεί το 10% των χονδροσαρκωμάτων και οι συνηθέστερες εστίες είναι η λεκάνη, το μηριαίο και η κνήμη. Ιστολογικά, το σύνηθες χόνδρινο συστατικό είναι ένα χαμηλού βαθμού χονδροσάρκωμα και το συχνότερο δεύτερο συστατικό είναι ένα κακήθες ινώδες ιστιοκύττωμα. Η πρόγνωσή τους είναι κακή και το 90% των ασθενών πεθαίνει σε 2 χρόνια¹⁷⁷.

Μοριακές μελέτες σε αποδιαφοροποιημένο χονδροσάρκωμα έδειξαν μεθυλίωση στον υποκινητή των p16^{INK4} και E-cadherin στο χόνδρινο χαμηλού βαθμού κακοήθειας συστατικό. Επιπλέον, βρέθηκε μεθυλίωση του *FHIT* στο υψηλής κακοήθειας οστεοσαρκωματώδες συστατικό του όγκου. Ακόμη, έχουν αναφερθεί μεταλλάξεις στο p53, καθώς και απώλεια της ετεροζυγωτίας (LOH) για το ίδιο γονίδιο και στα δυο συστατικά του όγκου. Τέλος, υπερέκφραση ή επέκταση του γονιδίου *STK15* μπορεί να

χρησιμοποιηθεί σαν προγνωστικός παράγοντας στον εντοπισμό ασθενών υψηλού ρίσκου για υποτροπή ή μετάσταση¹⁷⁸.

8. Μεσεγχυματικό χονδροσάρκωμα

Το μεσεγχυματικό χονδροσάρκωμα είναι ένας σπάνιος όγκος με διπλό πρότυπο, αποτελούμενος από αδιαφοροποίητα μικρά στρογγυλά κύτταρα και νησίδια καλά διαφοροποιημένου υαλώδους χόνδρου. Αποτελεί το 3-10% των πρωτοπαθών χονδροσαρκωμάτων με μέγιστη συχνότητα εμφάνισης τη δεύτερη και τρίτη δεκαετία ζωής. Τα κλινικά σημεία περιλαμβάνουν πόνο και οίδημα που υπάρχει από μερικές μέρες έως και χρόνια. Ιστολογικά υπάρχουν μικρά στρογγυλά αποδιαφοροποιημένα κύτταρα και νησίδια υαλώδους χόνδρου¹⁷⁹. Στις αποδιαφοροποιημένες περιοχές τα κύτταρα μοιάζουν με τα κύτταρα του σαρκόματος Ewing. Ανοσοϊστοχημικά δεν υπάρχει κάποιο διαγνωστικό χαρακτηριστικό¹⁸⁰. Υποτροπιάζει συχνά και είναι δυνατό να προκύψουν μακρινές μεταστάσεις ακόμη και μετά από διάστημα 20 ετών.

Κυτταρογενετικά έχουν περιγραφεί 2 περιπτώσεις με τη μετάθεση der(13;21)(q10;q10), η οποία πιθανώς να είναι χαρακτηριστική για αυτή την οντότητα¹⁸¹. Ωστόσο, πρέπει να αναλυθούν και άλλες περιπτώσεις. Μοριακές μελέτες έδειξαν ότι ο μεταγραφικός παράγοντας sox9, ο οποίος διαδραματίζει σημαντικότερο ρόλο στα πρώτα στάδια της διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων και έχει ρυθμιστικό ρόλο κλειδί στην χονδρογένεση, εκφράζεται σχεδόν αποκλειστικά από τα μικρά στρογγυλά αποδιαφοροποιημένα κύτταρα του όγκου. Πιθανολογείται ότι η έκφραση του Sox9 είναι χρήσιμη για την διαφοροποίηση του μεσεγχυματογενούς χονδροσαρκώματος από τα άλλα μικροκυτταρικά νεοπλάσματα. Η επίδραση διαφόρων ινοβλαστικών αυξητικών παραγόντων (FGFs) στον Sox9 ίσως έχει θεραπευτική αξία σε κάποια χονδροσαρκώματα¹⁸².

9. Χονδροσάρκωμα εκ διαυγών κυττάρων

Το χονδροσάρκωμα εκ διαυγών κυττάρων είναι ένα σπάνιο χαμηλού βαθμού κακοήθειας που αναπτύσσεται στις επιφυσσιακές άκρες των μακρών οστών. Αποτελεί μόλις το 2% των χονδροσαρκωμάτων με προτίμηση στους άνδρες και μέγιστο συχνότητας εμφάνισης στις ηλικίες 20-50 ετών. Όλα τα οστά του σκελετού μπορεί να προσβληθούν όμως οι συχνότερες εστίες είναι η κεφαλή του μηριαίου και του βραχιονίου. Ο πόνος είναι

το συχνότερο σύμπτωμα με το 55% των ασθενών να τον υποφέρει για πάνω από ένα χρόνο. Ιστολογικά το νεόπλασμα αποτελείται από λοβώδεις ομάδες κυττάρων με στρογγυλούς πυρήνες και διαυγές κυτταρόπλασμα με σαφή πλασματική μεμβράνη. Ανοσοϊστοχημικά είναι θετικό για την πρωτεΐνη S100 και το κολλαγόνο τύπου II. Η εκτομή σε υγιή όρια αποτελεί και θεραπεία. Όμως αν αυτή η επέμβαση δεν μπορεί να γίνει τότε υπάρχει 86% πιθανότητα υποτροπής. Μεταστάσεις μπορεί να συμβούν στους πνεύμονες και σε άλλα οστά. Τα γενετικά δεδομένα είναι πολύ περιορισμένα εξαιτίας της σπανιότητας των περιστατικών¹⁸³.

- **Οστεογενείς όγκοι**

1. Οστεοειδές οστέωμα

Το οστεοειδές οστέωμα είναι καλοήθης οστεοπαραγωγός όγκος με μικρό μέγεθος, περιορισμένη ανάπτυξη και χαρακτηριστικό άλγος. Προσβάλλει κυρίως παιδιά και νέους. Μπορεί να αναπτυχθεί σε οποιοδήποτε οστό του σκελετού. Χαρακτηριστικός είναι ο πόνος που υφίσταται με τη χρήση ασπιρίνης και άλλων μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων. Ιστολογικά, αποτελείται από μια κεντρική περιοχή με αγγειούμενο συνδετικό ιστό, μέσα στον οποίο οστεοβλάστες παράγουν οστεοειδές ή ακόμη και οστό. Η πρόγνωση του είναι άριστη και οι υποτροπές πολύ σπάνιες¹⁵⁷.

Κυτταρογενετικά δεδομένα έχουν δημοσιευθεί για τρεις περιπτώσεις και περιλαμβάνουν απώλεια γενετικού υλικού από το μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 22^{184, 185}.

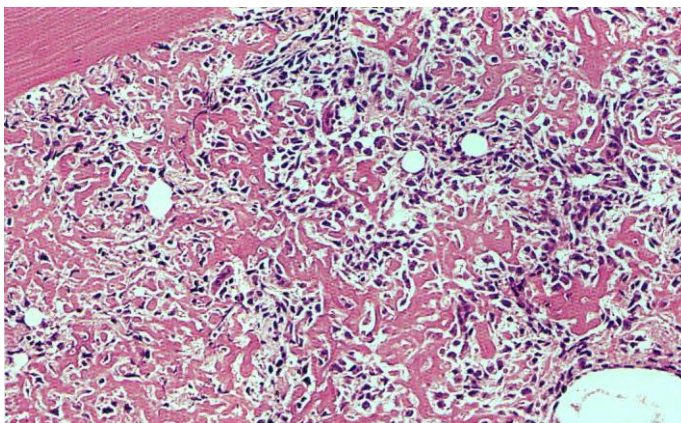
2. Οστεοβλάστωμα

Είναι σπάνιος καλοήθης όγκος που παράγει οστικές παρασχίδες, οι οποίες περιβάλλονται από οστεοβλάστες. Εντοπίζεται στην σπονδυλική στήλη και το ιερό οστό. Η ηλικιακή του κατανομή εμφανίζει μέγιστο μεταξύ 10-30 ετών. Έχει παρόμοια κλινικά συμπτώματα με το οστεοειδές οστέωμα και το μέγεθός του ποικίλει από 2-3 εκατοστά διαμέτρου μέχρι και 15 εκατοστά. Τα ιστολογικά του χαρακτηριστικά είναι όμοια με του οστεοειδούς οστεώματος. Η πρόγνωση του είναι άριστη. Κακοήθης εξαλλαγή σε οστεοσάρκωμα έχει περιγραφεί μια φορά^{157, 186}.

Έχουν δημοσιευθεί κυτταρογενετικά δεδομένα από 4 περιστατικά με πολύπλοκες ανακατατάξεις, χωρίς μεταξύ τους σχέση^{187, 188}.

3. Οστεοσάρκωμα

Πρόκειται για ενδομυελικό υψηλού βαθμού κακοήθειας όγκο των οστών, του οποίου τα κύτταρα παράγουν οστεοειδές. Είναι ο συχνότερος πρωτοπαθής κακοήθης όγκος των οστών και αφορά κυρίως τους νέους. Το 60% των ασθενών με οστεοσάρκωμα είναι νεότεροι των 25 ετών. Οι συνηθέστερες εστίες είναι τα μακρά οστά όπως το μηριαίο, η κνήμη και η ωλένη. Το κυριότερο σύμπτωμα είναι ο πόνος. Παθολογικά κατάγματα συμβαίνουν στο 5-10% των ασθενών. Η αιτιολογία του είναι αδιευκρίνιστη, παρόλο που πολλές φορές αναφέρεται ιστορικό τραυματισμού. Τις περισσότερες φορές είναι μικτού τύπου βλάβη με παράλληλη οστεβλαστική και οστεολυτική δραστηριότητα. Τα ιστολογικά του χαρακτηριστικά είναι πολύπλοκα αφού αποτελείται από διαφόρων ειδών κύτταρα όπως ατρακτοειδή, επιθηλιοειδή, πλασματοκυττοειδή, ωοειδή, υβριδικά κύτταρα, μονο- ή πολυπύρρηνα γιγαντοκύτταρα και μικρά στρογγυλά κύτταρα. Συνήθως, περιέχει μίγμα από δυο ή περισσότερους τύπους κυττάρων¹⁸⁹.



Εικόνα V.13: ιστολογική εικόνα οστεοσαρκώματος με οστεοειδές και θεμέλια ουσία να αναπτύσσονται στην κοιλότητα πρόσφατα φυσιολογικού οστού.

Γενετικά δεν χαρακτηρίζονται από κάποια συγκεκριμένη μετάθεση. Αντιθέτως, όπως και πολλά άλλα σαρκώματα χαρακτηρίζονται από ένα πολύπλοκο πρότυπο γενετικών αλλαγών στο οποίο συμμετέχουν διάφορα ογκοκατασταλτικά γονίδια και ογκογονίδια. Τα μονοπάτια *TP53* και *RB1* είναι απενεργοποιημένα απορυθμίζοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ενώ ογκογονίδια όπως τα *TP53*, *RB1*, *FOS*, *MYC*, *MET*, *SAS*, *GLI*, *ERBB2* υπερεκφράζονται. Το μονοπάτι του ρετινοβλαστώματος (*RB1*) είναι ιδιαίτερα

σημαντικό, καθώς έχει βρεθεί ότι ασθενείς με ρετινοβλάστωμα έχουν 1000 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα ανάπτυξης οστεοσαρκώματος σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό. Μεταλλάξεις στο *RB1* γονίδιο, το οποίο βρίσκεται στη χρωμοσωμική θέση 13q14, εντοπίζονται σε ποσοστό 70% των σποραδικών οστεοσαρκωμάτων, ενώ απώλεια της ετεροζυγωτίας, η οποία αναφέρεται σε ποσοστό 30%, αποτελεί και κακό προγνωστικό δείκτη. Επιπλέον, έχει βρεθεί ενίσχυση των γονιδίων *CDK4* και *MDM2*, τα οποία βρίσκονται στην χρωμοσωμική περιοχή 12q13-q15¹⁹⁰. Αυτό το γενετικό χαρακτηριστικό συναντάται και σε άλλα σαρκώματα και σχετίζεται με την ανάπτυξη του όγκου και την μετάσταση^{191, 192}. Τέλος, τα τελομερή και οι μηχανισμοί επιδιόρθωσής τους φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των οστεοσαρκωμάτων. Η τελομεράση στα οστεοσαρκώματα χαμηλής κακοήθειας είναι ανενεργή και σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη οστεοσαρκώματα με ανενεργή τόσο την τελομεράση όσο και τον εναλλακτικό δρόμο επιμήκυνσης των τελομερών εμφανίζουν καλή πρόγνωση¹⁹³.

Αναλυτικότερα, τα κυτταρογενετικά χαρακτηριστικά των οστεοσαρκωμάτων περιλαμβάνουν καρυοτύπους με πολύπλοκες δομικές και αριθμητικές ανωμαλίες. Μάλιστα, έχουν αξιοσημείωτη ετερογένεια ακόμη και από κύτταρο σε κύτταρο. Η πολυπλοκότητα των δομικών ανακατατάξεων είναι τέτοιας έκτασης που πολλά χρωμοσώματα είναι αδύνατο να ταξινομηθούν με την απλή κυτταρογενετική. Συνδυασμός τεχνικών με FISH είναι εξαιρετικά χρήσιμος στην αποσαφήνιση των χρωμοσωμικών ανωμαλιών στα οστεοσαρκώματα. Οι χρωμοσωμικές περιοχές, οι οποίες ενέχονται συχνότερα σε δομικές ανωμαλίες είναι οι: 1p11-p13, 1q11-q12, 1q21-q22, 11p14-p15, 14p11-p13, 15p11,p13, 17p και 19q13. Οστεοσαρκώματα με καρυοτύπους που έχουν μια μόνο ανωμαλία είναι λιγότερα από 5%. Μελέτες με CGH έδειξαν πλεόνασμα γενετικού υλικού στις περιοχές 6p, 12q13-q15, 17p11.2-p12 και 19q12-q13, με τις ανακατατάξεις στο 6p και 17p11-p12 να είναι ειδικές για το οστεοσάρκωμα^{194, 195}. Αναλύσεις με FISH αναφέρουν την συμμετοχή της χρωμοσωμικής περιοχής 12p σε πολλές δομικές ανακατατάξεις υποδεικνύοντας πιθανή συμμετοχή της στην ανάπτυξη και στην επιθετική συμπεριφορά του όγκου^{186, 196}.

4. Κεντρικό οστεοσάρκωμα χαμηλού βαθμού κακοήθειας

Πρόκειται για χαμηλού βαθμού κακοήθειας οστεοσάρκωμα που εξορμάται από το μυελό του οστού. Είναι πολύ σπάνιος όγκος και αναπτύσσεται συνήθως στα μακρά οστά του σκελετού. Ο πόνος και το οίδημα αποτελούν τα συνήθη συμπτώματα των ασθενών¹⁸⁶.

Κυτταρογενετικές αναλύσεις έχουν δείξει αναστροφή στο χρωμόσωμα 6, *inv(6)(p23q15)* σαν μοναδική ανωμαλία¹⁹⁷.

5. Παραοστικό οστεοσάρκωμα

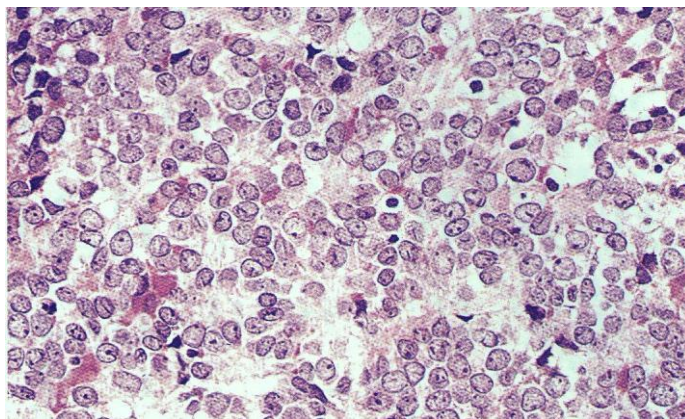
Είναι χαμηλού βαθμού κακοήθειας οστεοσάρκωμα το οποίο αναπτύσσεται στην επιφάνεια των οστών. Είναι σπάνιος όγκος και οι περισσότεροι ασθενείς βρίσκονται συνήθως στην τρίτη δεκαετία της ζωής. Οι πιο συχνές εστίες ανάπτυξης είναι τα μακρά οστά, με προεξάρχουσα το κάτω τριτημόριο του μηριαίου. Τα κλινικά συμπτώματα περιλαμβάνουν πόνο, οίδημα και δυσκινησία του προσβεβλημένου άκρου. Ιστολογικά, πρόκειται για δοκιδώδη όγκο ο οποίος αναπτύσσεται σε ένα υποκυτταρικό στρώμα¹⁸⁶.

Κυτταρογενετικές αναλύσεις δείχνουν την ύπαρξη τελομερικών ενώσεων, οι οποίες αναφέρονται και στους γιγαντοκυτταρικούς όγκους. Χαρακτηριστικό όμως εύρημα είναι τα δακτυλιοειδή χρωμοσώματα, τα οποία περιέχουν αλληλουχίες από την χρωμοσωμική περιοχή 12q13-q15, είτε ως μοναδική ανωμαλία είτε συνοδευόμενη και από μερικές άλλες ανακατατάξεις. Συνδυασμός με CGH μελέτες απέδειξε την ύπαρξη πλεονάσματος γενετικού υλικού στην περιοχή 12q13 και την γονιδιακή ενίσχυση των *MDM2*, *SAS* και *CDK4* γονιδίων¹⁹⁸.

Εκτός από τους προαναφερόμενους υποτύπους οστεοσαρκώματος υπάρχουν και μερικοί ιδιαίτερα σπάνιοι όπως το τελαγγειεκτατικό οστεοσάρκωμα, το μικροκυτταρικό οστεοσάρκωμα, το δευτεροπαθές οστεοσάρκωμα, το περιοστικό οστεοσάρκωμα και το επιφανειακό οστεοσάρκωμα υψηλού βαθμού κακοήθειας. Εξαιτίας της σπανιότητας των περιστατικών τα γενετικά δεδομένα για αυτούς τους υποτύπους οστεοσαρκώματος είναι εξαιρετικά περιορισμένα.

• Σάρκωμα Ewing/ Αρχέγονοι νευροεξωδερματικοί όγκοι PNET

Πρόκειται για στρογγυλοκυτταρικά σαρκώματα με ποικίλου βαθμού νευροεξωδερματική διαφοροποίηση. Είναι σπάνιοι όγκοι των νέων ανθρώπων, με τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισής τους σε ασθενείς νεότερους των 20 ετών. Αναπτύσσονται στη διάφυση των μακρών οστών και κλινικά προβάλλουν με πόνο και αίσθημα αναπτυσσόμενης μάζας. Ιστολογικά, η μορφολογία τους ποικίλει. Η έκφραση της CD99 πρωτεΐνης στην κυτταρική μεμβράνη είναι χαρακτηριστική, χωρίς να αποτελεί παθολογνμονικό ανοσοϊστοχημικό δείκτη¹⁹⁹.

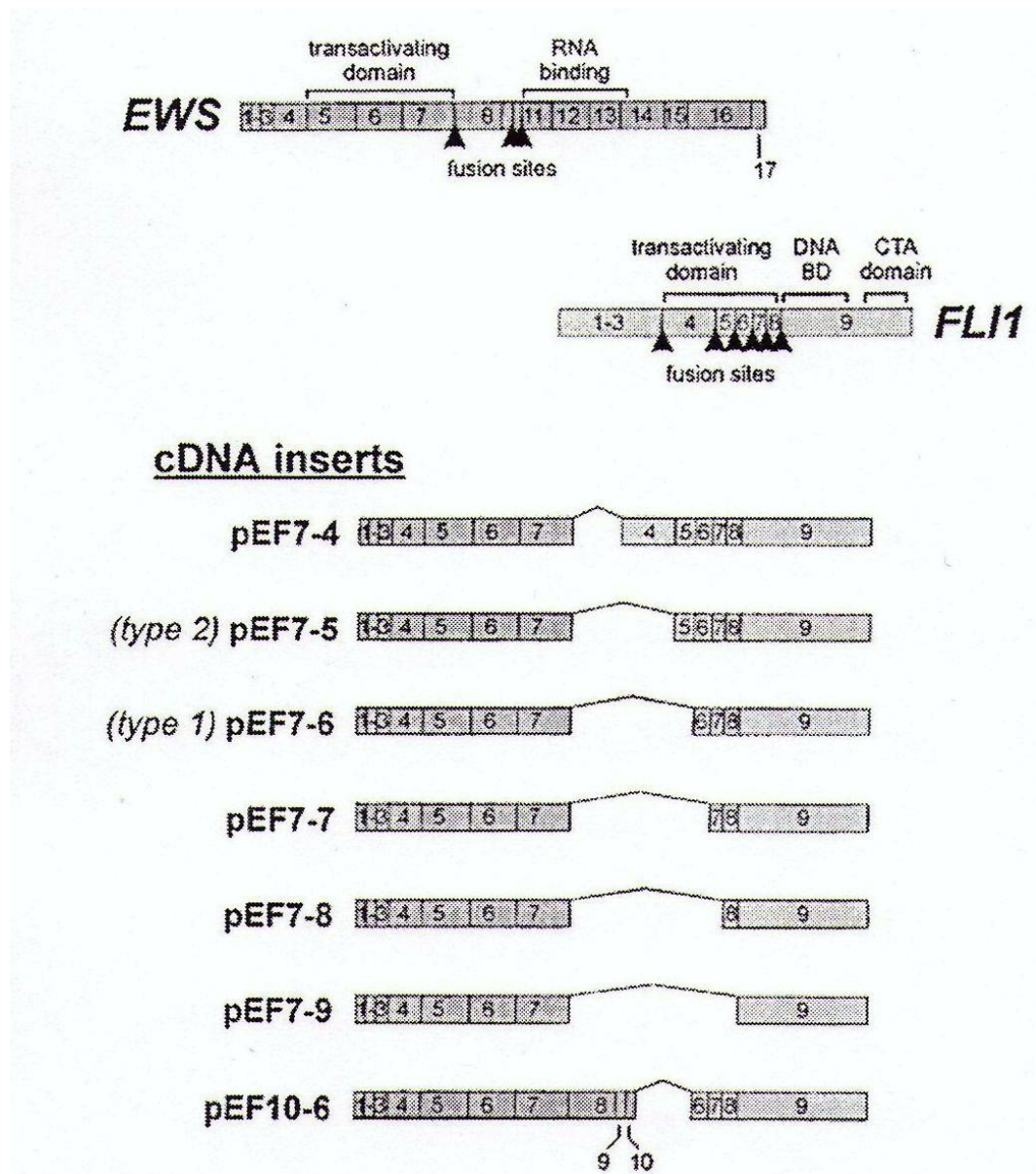


Εικόνα V.14: ιστολογική εικόνα όγκου Ewing/PNET με τις χαρακτηριστικές ροζέτες από μικρά στρογγυλά κύτταρα.

Κυτταρογενετικά, το σάρκωμα Ewing υπήρξε το πρώτο σάρκωμα στο οποίο εντοπίστηκε παθογνωμονική μετάθεση. Η μετάθεση $t(11;22)(q24;q12)$ οδηγεί στο σχηματισμό ενός υβριδικού γονιδίου στο οποίο συμμετέχει το 5' άκρο του γονιδίου *EWS* με το 3' άκρο του γονιδίου *FLI1*. Το γονίδιο *EWS* βρίσκεται στην χρωμοσωμική περιοχή 22q12 και το *FLI1* στην περιοχή 11q24, το οποίο είναι μέλος της οικογένειας γονιδίων *ETS*. Το υβριδικό γονίδιο *EWS/FLI1* εντοπίζεται στο 90-95% των περιπτώσεων²⁰⁰. Άλλες δημοσιευμένες μεταθέσεις παθογνωμονικές για το σάρκωμα Ewing είναι οι: $t(21;22)(q22;q12)$, $t(17;22)(q12;q12)$, $t(7;22)(p22;q12)$ και $t(2;22)(q33;q12)$, οι οποίες οδηγούν στο σχηματισμό των υβριδικών γονιδίων *EWS/ERG*, *EWS/E1AF*, *EWS/ETV1* και *EWS/FEV* αντιστοίχως²⁰¹⁻²⁰⁴. Οι παραγόμενες υβριδικές πρωτεΐνες έχουν ογκογόνο δράση και λειτουργούν ως μεταγραφικοί παράγοντες. Η μη ισοζυγισμένη μετάθεση $der(16)t(1;16)$ είναι η συχνότερη δευτερογενής ανωμαλία που εντοπίζεται στα σαρκώματα Ewing. Τα σημεία θραύσης είναι ποικίλα, ωστόσο η ανακατάταξη $der(16)t(1;16)(q12;q11)$ είναι η επικρατέστερη²⁰⁵. Άλλες δευτερογενείς ανωμαλίες περιλαμβάνουν τρισωμίες στα χρωμοσώματα 8, 12, 2, 5, 9 και 15, καθώς και πλεόνασμα υλικού και στους δυο βραχίονες του χρωμοσώματος 1. Μια πιθανή ερμηνεία για τις τρισωμίες των χρωμοσωμάτων 8 και 12, είναι ότι τα κύτταρα που τις φέρουν έχουν πλεονέκτημα πολλαπλασιασμού²⁰⁶. Ακόμη, η δευτερογενής ανωμαλία της έλλειψης στην περιοχή 1p φαίνεται να είναι κακός προγνωστικός δείκτης σε ασθενείς με τοπική νόσο^{207, 208}.

Μελέτες με CGH εμφανίζουν συχνότερα περίσσεια γενετικού υλικού παρά απώλεια²⁰⁹. Πλεόνασμα γενετικού υλικού έχει εντοπιστεί στα χρωμοσώματα 8 και 12 και 1q. Οι περιοχές με τη μεγαλύτερη γενετική ενίσχυση είναι οι 1q21-q22 και 8q13-q24. Έρευνες από άλλες ομάδες δείχνουν έντονη γενετική ενίσχυση στις περιοχές 1q31-q41 και

8q. Από αυτά τα δεδομένα το πλεόνασμα στα χρωμοσώματα 8, 12 και 1q21-22 συσχετίζεται κλινικά με χειρότερη πρόγνωση, ενώ πλεόνασμα στο 6p συνδέεται με μειωμένη επιβίωση^{208, 210, 211}.



Εικόνα V.15: στο άνω μέρος αναπαρίστανται οι πρωτεϊνικές δομές και τα εξώνια στα οποία αντιστοιχούν στα γονίδια *EWS* και *FLI1*. Στο κάτω μέρος της εικόνας φαίνονται οι τύποι του υβριδικού γονιδίου *EWS/FLI1*. Με νούμερα είναι αριθμημένα τα εξώνια κάθε γονιδίου.

- Όγκοι λιπώδους και επιθηλιακής προέλευσης

1. Λίπωμα των οστών

Πρόκειται για καλοήγη όγκο αποτελούμενο από λιποκύτταρα, ο οποίος αναπτύσσεται στο μυελό ή στην επιφάνεια των οστών. Είναι σπάνιος όγκος με συχνότερες εστίες εμφάνισης τις επιφύσεις των μακρών οστών. Ιστολογικά, αποτελείται από λοβία ώριμων λιποκυττάρων, τα οποία μπορεί να καταλαμβάνουν τον μυελό του οστού ή να περιβάλλουν τις οστικές δοκίδες.

Γενετικά, χαρακτηρίζεται από τη μετάθεση $t(3;12)(q28;q14)$, η οποία έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό του υβριδικού γονιδίου *HMGA2/LPP*. Αυτή η ανακατάταξη συναντάται και στα λιπώματα των μαλακών μορίων, υποδεικνύοντας την κοινή παθοϊστογενετική καταγωγή των δυο αυτών όγκων²¹².

2. Αδαμαντίνωμα

Το αδαμαντίνωμα είναι κακοήθης διφασικός όγκος, ο οποίος αποτελείται κυρίως από επιθηλιακά κύτταρα, τα οποία περιβάλλονται από ατρακτοειδή κύτταρα και ένα οστεοϊνώδες στρώμα. Η κνήμη αποτελεί τη συνηθέστερη εστία ανάπτυξης του όγκου. Γενετικά δεδομένα περιλαμβάνουν την ύπαρξη ανωμαλιών στο *TP53* γονίδιο²¹³.

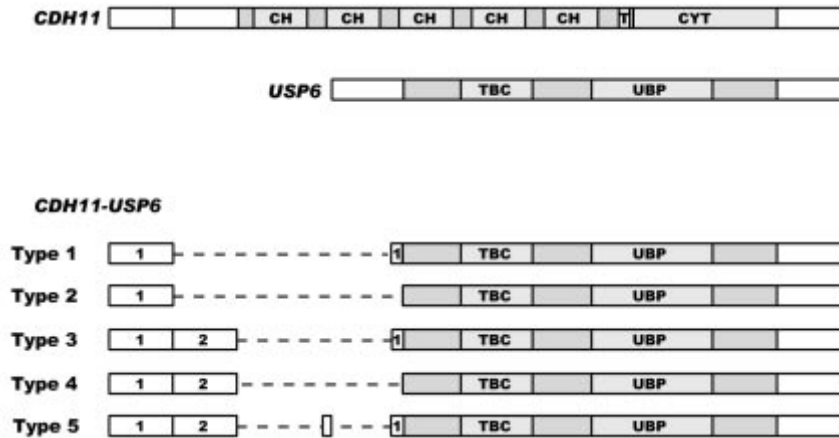
• Όγκοι απροσδιόριστης νεοπλασματικής φύσης

Ανευρυσματική κύστη των οστών

Η ανευρυσματική κύστη των οστών είναι μια καλοήθης κυστική αλλοίωση, η οποία έχει μια κοιλότητα γεμάτη με αίμα και συνδετικό ιστό αποτελούμενο από ινοβλάστες και οστεοκλαστικά γιγαντοκύτταρα. Συνήθως, εμφανίζεται κατά τη δεύτερη δεκαετία της ζωής και αναπτύσσεται στα μακρά οστά του σκελετού. Υποτροπιάζει συχνά σε ποσοστό που κυμαίνεται από 20-70%, ενώ έχουν αναφερθεί σπάνιες περιπτώσεις κακοήθους εξαλλαγής.

Η νεοπλασματική φύση αυτής της αλλοίωσης αποδείχθηκε με την ανακάλυψη της κλωνικής μετάθεσης $t(16;17)(q22;p13)$. Από την πρώτη αυτή δημοσίευση το 1999 έχουν περιγραφεί και άλλες μεταθέσεις όπως $t(11;16)(q13;q22)$, $t(17;17)(q12;p13)$, $t(1;17)(p34;p13)$ και $t(5;17)(q33;p13)$. Ωστόσο, η πρώτη μετάθεση $t(16;17)(q22;p13)$

θεωρείται παθογνωμονική για τη διάγνωση της ανευρυσματικής κύστης των οστών και προκαλεί το σχηματισμό του υβριδικού γονιδίου *CDH11/USP6*²¹⁴⁻²¹⁶.



Εικόνα V.16: σχηματική αναπαράσταση των φυσιολογικών γονιδίων και των τύπων υβριδικού γονιδίου *CDH11/USP6*. Επισημαίνονται τα σημεία θραύσης και οι πρωτεϊνικές δομές που αντιστοιχούν σε κάθε τμήμα του γονιδίου. Με άσπρο παρίστανται οι μη κωδικές και με γκρι οι κωδικές περιοχές των γονιδίων.

VI. Συμβολή της γενετικής στη διάγνωση, πρόγνωση και θεραπεία των μεσεγχυματογενών όγκων. Προοπτικές για το μέλλον.

Πίνακας VI.1 με τις κυριότερες μεταθέσεις στα σαρκώματα των μαλακών μορίων και των οστών

Είδος σαρκώματος	Χρωμοσωμική ατυπία	Χιμαιρικό γονίδιο
Μυξοειδές/στρογγυλοκυτταρικό λιποσάρκωμα	t(12;16)(q13;p11) t(12;22)(q13;q12)	<i>TLS(FUS)-CHOP</i> <i>EWS-CHOP</i>
Αγγειοματώδες ινώδες ιστιοκύττωμα	t(12;16)(q13;p11)	<i>FUS-ATF1</i>
Δερματοϊνοσάρκωμα	t(17;22)(q22;q13) r(17;22)	<i>COL1A1-PDGFB</i>
Ινοσάρκωμα	t(12;15)(p13;q25)	<i>ETV6-NTRK3</i>
Δεσμοπλαστικός μικροστρογγυλοκυτταρικός όγκος	t(11;22)(p13;q12)	<i>EWS-WT1</i>
Ewing's σάρκωμα	t(11;22)(q24;q12) t(21;22)(q22;q12) t(7;22)(p22;q12) t(7;22)(q12;q12) t(17;22)(q21;q21) t(2;22)(q33;q12)	<i>EWS-FLI</i> <i>EWS-ERG</i> <i>EWS-ETV1</i> <i>EWS-ETV4</i> <i>EWS-E1AF</i> <i>EWS-FEV</i>
Κυψελιδικό ραβδομυοσάρκωμα	t(2;13)(q35;q14) t(1;13)(q36;q14) t(2;2)(q35;q23)	<i>PAX3-FKHR</i> <i>PAX7-FKHR</i> <i>PAX3-NCOA1</i>
Εξωσκελετικό μυξώδες χονδροσάρκωμα	t(9;22)(q22;q12) t(9;17)(q22;q11.2)	<i>EWS-CHN(TEC)</i> <i>RBP56(HTAF1168)-CHN(TEC)</i>
Σάρκωμα εκ διαγών κυττάρων	t(12;22)(q13;q12)	<i>EWS-ATF1</i>

Συνοβιακό σάρκωμα	t(X;18)(p11.2;q11.2)	SYT-SSX1 SYT-SSX2 SYT-SSX4
	t(X;20)(p11;q 13)	SS18L1-SSX1
Ινομυξοειδές σάρκωμα(low grade)	t(7;16)(q33;p11)	FUS-BBF2H7

Η γενετική αποτελεί σήμερα σημαντικό εργαλείο στη διάγνωση, πρόγνωση, παρακολούθηση, ακόμη και στη θεραπεία του καρκίνου. Παραδείγματα όπως ο εντοπισμός της υπερέκφρασης του γονιδίου *her2/neu* στον καρκίνο του μαστού και του υβριδικού γονιδίου *bcr/abl* στην χρόνια μυελογενή λευχαιμία είναι τα πλέον χαρακτηριστικά. Η χορήγηση του χημειοθεραπευτικού φαρμάκου trastuzumab (εμπορική ονομασία Herceptin) προϋποθέτει την απόδειξη της υπερέκφρασης του γονιδίου *her2/neu*. Παρομοίως, η ανίχνευση του υβριδικού γονιδίου *bcr/abl*, εκτός από παθογνωμονικό εύρημα για τη χρόνια μυελογενή λευχαιμία αποτελεί και βασικό κριτήριο για τη χορήγηση του σκευάσματος imatinib.

Στους μεσεγχυματογενείς όγκους και ιδιαίτερα στα σαρκώματα η γενετική τα τελευταία είκοσι χρόνια έχει αποκαλύψει εξαιρετικά σημαντικά στοιχεία που αφορούν στη διάγνωση, στη βιολογική συμπεριφορά του όγκου, ακόμη και στους μηχανισμούς που οδηγούν στην ογκογένεση. Η διαγνωστική τους κατά κύριο λόγο χρησιμότητα σήμερα, αναδεικνύεται από το γεγονός ότι η κυτταρογενετική και μοριακή ανάλυση αποτελεί αναπόσπαστο τμήμα της κλινικής πρακτικής για τους όγκους των μαλακών μορίων και των οστών^{58, 217}.

Το χαρακτηριστικότερο παράδειγμα είναι το σάρκωμα Ewing. Ιστοπαθολογικά, η κατηγορία των μπλε μικροστρογγυλοκυτταρικών όγκων αποτελεί μια δύσκολη υπόθεση για κάθε παθολογοανατόμο. Αν σε αυτό μάλιστα προστεθεί και η πληροφορία ότι κάθε όγκος αυτής της κατηγορίας έχει διαφορετική πρόγνωση και απαιτεί διαφορετική θεραπευτική αντιμετώπιση, εύκολα συνάγεται το συμπέρασμα ότι η σωστή διάγνωση είναι εξέχουσας σημασίας ζήτημα τόσο για τον ασθενή όσο και για τον γιατρό. Ο εντοπισμός της χαρακτηριστικής χρωμοσωμικής μετάθεσης t(11;22)(q24;q12) ή του υβριδικού γονιδίου *EWS-FLI* που δημιουργείται αποτελεί διαφοροδιαγνωστικό κριτήριο για αυτό τον όγκο. Η εξέλιξη της τεχνολογίας και των τεχνικών δυνατοτήτων επιτρέπουν τον εντοπισμό

αυτής της γενετικής ανωμαλίας με πλειάδα τρόπων. Έτσι, μπορεί κανείς να εντοπίσει τη μετάθεση $t(11;22)$ χρησιμοποιώντας την κλασική κυτταρογενετική. Επειδή η κυτταρογενετική έχει μεγάλα ποσοστά αποτυχίας, η διάγνωση διευκολύνεται από τη χρήση άλλων τεχνικών όπως η RT-PCR και το FISH, με τις οποίες μπορεί να εντοπιστεί το υβριδικό γονίδιο *EWS/FLI*. Όμως πρέπει να τονιστεί ότι η συγκεκριμένη ανωμαλία χαρακτηρίζει το 90% των περιπτώσεων. Μια ολοκληρωμένη ωστόσο μελέτη πρέπει να περιλαμβάνει συνδυασμό τεχνικών, αφού υπάρχουν ποικιλίες που αφορούν στις χρωμοσωμικές μεταθέσεις ακόμη και για τον ίδιο όγκο, αλλά και στα σημεία θραύσης των γονιδίων. Ακόμη, πολλές φορές παρατηρείται το φαινόμενο το ένα από τα δυο γονίδια, όπως εδώ το *EWS* να συμμετέχει σε υβριδικά γονίδια με περισσότερα του ενός γονίδια παρτενέρ. Η σημασία αυτών των «λεπτομερειών» είναι πολύ μεγάλη. Έχει βρεθεί ότι ο τύπος 1 του υβριδικού γονιδίου *EWS/FLI*, δηλαδή (*EWS* εξώνιο7, *FLI* εξώνιο 6) έχει πολύ καλύτερη πρόγνωση από οποιονδήποτε άλλο τύπο υβριδικού γονιδίου που συναντάται στο σάρκωμα Ewing²⁰¹.

Μια ακόμη περίπτωση που η γενετική έχει παίξει καθοριστικό ρόλο είναι αυτή του συνοβιακού σαρκώματος. Η ιστοπαθολογική του εικόνα απαιτεί τη διαφοροδιάγνωσή του από το ινοσάρκωμα, το μελάνωμα, το επιθηλιοειδές σάρκωμα και τα μεταστατικά καρκινώματα. Με την ανίχνευση της μετάθεσης $t(X;18)(p11;q11)$ και του σχηματιζόμενου *SYT/SSX* υβριδικού γονιδίου, μπορεί κανείς με ασφάλεια να θέσει τη διάγνωση του συνοβιακού σαρκώματος. Και σε αυτό το σάρκωμα παρατηρείται το φαινόμενο το *SYT* γονίδιο να έρχεται σε σύνδεση με τα *SSX1*, *SSX2*, *SSX4*, τα οποία βρίσκονται όλα στη χρωμοσωμική Xp11. Ο εντοπισμός του *SYT/SSX1* έχει σχετιστεί με καλύτερη πρόγνωση σε σχέση με τους ασθενείς που έχουν το *SYT/SSX2* γονίδιο¹⁴².

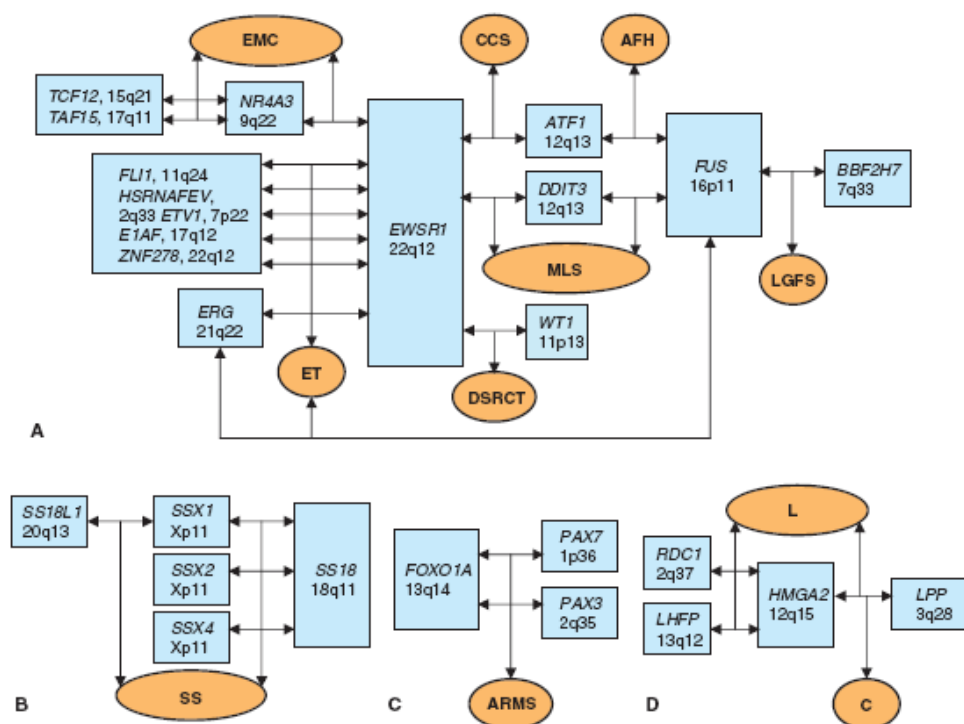
Στο κυψελιδικό ραβδομυοσάρκωμα ο εντοπισμός της μετάθεσης $t(2;13)(q35;q14)$ ή της $t(1;13)(q36;q14)$ και των αντίστοιχων υβριδικών γονιδίων *PAX3/FKHR* και *PAX7/FKHR* έχει απόλυτα διαγνωστικό χαρακτήρα. Οι ασθενείς στους οποίους εντοπίζεται το υβριδικό γονίδιο *PAX3/FKHR* έχουν χειρότερη πρόγνωση από αυτούς με το *PAX7/FKHR*¹²⁶.

Δύο ακόμη όγκοι για τους οποίους η γενετική ανάλυση έφερε στο φως στοιχεία που βοήθησαν στην καλύτερη ταξινόμησή τους και στη διαφοροδιάγνωσή τους είναι το συγγενές ινοσάρκωμα και το μεσοβλαστικό νέφρωμα. Η μετάθεση $t(12;15)(p13;q25)$, η οποία εντοπίζεται και στους δύο όγκους αντικατοπτρίζει και τα πανομοιότυπα σχεδόν ιστολογικά και κλινικοπαθολογικά τους χαρακτηριστικά. Μια παρόμοια ιστορία αποτελούν το δερματοϊνοσάρκωμα και το γιγαντοκυτταρικό ινοβλάστωμα. Ο εντοπισμός

της μετάθεσης t(17;22)(q22;q13) και στους δυο όγκους δεν αποτέλεσε έκπληξη για τους παθολογοανατόμους.

Στο μυξοειδές λιποσάρκωμα η μετάθεση t(12;16)(q13;p11) και ο σχηματισμός του υβριδικού γονιδίου *FUS/CHOP* αποτελούν εξαιρετικά αξιόπιστα στοιχεία για τη διάγνωση αυτού του όγκου. Ανάλογα, το εξωσκελετικό μυξοειδές χονδρσάρκωμα πλέον είναι δυνατό να διαγνωστεί με τον εντοπισμό είτε της μετάθεσης t(9;22)(q22;q12) είτε του υβριδικού γονιδίου *EWS/CHN*.

Από τα παραπάνω, είναι προφανές πως η γενετική συνέβαλε τα μέγιστα στην καλύτερη ταξινόμηση των όγκων των μαλακών μορίων και των οστών. Επίσης, προσέφερε νέα δεδομένα για τη διάγνωση αυτών των όγκων αλλά και για την πρόγνωσή τους. Η γενετική ανάλυση των όγκων των μαλακών μορίων και των οστών με συνδυασμό μεθόδων είναι δυνατό να δώσει πληροφορίες που να αφορούν στην κατανόηση της βιολογίας τους, αλλά και πιθανά να αποκαλύψει νέους θεραπευτικούς στόχους²¹⁸.



Εικόνα VI.1: σχηματική αναπαράσταση των γονιδίων που ενέχονται σε ανακατατάξεις στους όγκους των οστών και των μαλακών μορίων. *AFH*: αγγειοματώδες ινώδες ιστιοκύττωμα, *ARMS*: κυψελιδικό ραβδομυοσάρκωμα, *C*: χόνδρωμα, *CCS*: σάρκωμα εκ διαυγών κυττάρων, *DSRCT*: δεσμοπλαστικός μικροστρογγυλοκυτταρικός όγκος, *EMC*: εξωσκελετικό μυξοειδές χονδρσάρκωμα,

ET: σάρκωμα Ewing, L: λίπωμα, LGFS: χαμηλού βαθμού κακοήθειας ινομυξοειδές σάρκωμα, MLS: μυξοειδές λιποσάρκωμα και SS: συνοβιακό σάρκωμα.

VII. Σκοπός

Οι μεσεγγυματογενείς όγκοι αποτελούν μια ετερογενή ομάδα όγκων οι οποίοι ταξινομούνται κατ' αρχήν σε όγκους των μαλακών μορίων και όγκους των οστών με βάση την ανατομική και κλινική τους εικόνα. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) στην πρόσφατη κατάταξη του 2002 λαβαίνοντας υπ' όψη την έκρηξη πληροφοριών της κυτταρογενετικής και της μοριακής γενετικής, ως επιπλέον κριτήριο των προαναφερθέντων, χρησιμοποιεί στην ταξινόμηση των επιμέρους κατηγοριών των όγκων των μαλακών μορίων και των οστών, τα σύγχρονα αυτά γενετικά δεδομένα.

Οι μέχρι σήμερα γενετικές πληροφορίες έχουν αξιοποιηθεί περαιτέρω, τόσο στην μελέτη της βιολογίας αυτών των όγκων, καθώς επίσης και ως γενετικοί δείκτες διαφορικής διάγνωσης. Παρόλη την πρόοδο που επισημάνθηκε, εν τούτοις σε σχέση με την γενικότερη σημασία αυτών νεοπλασμάτων, που υπογραμμίζεται ιδιαίτερα από το γεγονός ότι πολλοί από αυτούς εμφανίζονται σε παιδιά και νέους, η γενετική μελέτη των μεσεγγυματογενών όγκων είναι ένα πεδίο συνεχούς σημαντικής έρευνας. Αυτό γίνεται εύκολα κατανοητό, αν έχει κανείς μια συνολική εικόνα των γενετικών ευρημάτων και το πλήθος των σχετικών μελετών. Κατ' αρχήν υπάρχουν όγκοι στους οποίους δεν υπάρχει καμμία γενετική μελέτη και υπάρχουν επίσης κατηγορίες όγκων με οριακό αριθμό περιπτώσεων. Συνέπεια αυτού είναι ότι και εκεί που υπάρχουν βασικές γνώσεις αυτές κυρίως αναφέρονται στις πρωτογενείς ανωμαλίες και αγνοούμε τις υπόλοιπες, που συνδέονται με την εξέλιξη των όγκων, υπάρχουν σε ορισμένες περιπτώσεις τα αδρά γενετικά χαρακτηριστικά, ενώ απεχουμε από την περιγραφή ενός ολοκληρωμένου γενετικού προφίλ και των μηχανισμών οι οποίοι το δημιουργούν. Τέλος δεν υπάρχουν επαρκείς κλινικοπαθολογικές συσχετίσεις και βασικά συμπεράσματα που θα συντελέσουν στην πρόγνωση και αντιμετώπιση τους.

Από την κατάσταση αυτή πηγάζει η αναγκαιότητα περαιτέρω μελετών και **ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής, ο οποίος είναι η πολύπλευρη γενετική ανάλυση των μεσεγγυματογενών στόχων με σκοπό την μελέτη της ογκογένεσης των μεσεγγυματογενών όγκων και την προσπάθεια ανάδειξης νέων γενετικών δεικτών χρήσιμων στην αντιμετώπιση αυτών των όγκων.**

Οι συγκεκριμένοι στόχοι που εξυπηρετούν αυτό τον σκοπό είναι:

1. Να επιβεβαιωθούν περιπτώσεις που υπάρχουν οριακά δεδομένα,

2. Να αναζητηθούν νέα εντελώς ευρήματα δεδομένου ότι υπάρχουν μεσουγχυματογενείς όγκοι που μέχρι σήμερα δεν υπάρχει κανένα γενετικό εύρημα.
3. Να προστεθούν πληροφορίες εκεί όπου είναι αναγκαία μια κρίσιμη μάζα για να αποσαφηνισθούν περαιτέρω κλινικοπαθολογικές και γενετικές συσχετίσεις, να προστεθούν νέοι γενετικοί δείκτες, όπου είναι δυνατόν και να φωτισθούν μηχανισμοί της ογκογένεσης.

VIII. Υλικά και μέθοδοι

1. Υλικό

Το υλικό που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή προέρχεται από καλοήθεις και κακοήθεις μεσεγχυματογενείς όγκους ασθενών, οι οποίοι νοσηλεύθηκαν στο νοσοκομείο «ο Άγιος Σάββας» και στο νοσοκομείο παιδών «Αγία Σοφία». Περιλαμβάνεται μεγάλη ποικιλία όγκων των μαλακών μορίων και των οστών, τα οποία ήταν δείγματα από υλικό βιοψίας ή από χειρουργεία ολικής αφαίρεσης του όγκου.

2. Κυτταρογενετική μεθοδολογία

A. Αποδιάταξη και καλλιέργεια του ιστού

Ιστοτεμάχιο από το χειρουργείο είτε από το παθολογοανατομικό τμήμα του Νοσοκομείου παραλαμβάνεται στο τμήμα Γενετικής για τη διενέργεια κυτταρογενετικής ανάλυσης. Ο ιστός για να καλλιεργηθεί πρέπει πρώτα να υποστεί χημική και μηχανική αποδιάταξη. Αυτό το βήμα αποσκοπεί στον κατακερματισμό του συνδετικού υλικού και της εξωκυττάριας ουσίας του όγκου, ούτως ώστε να προκύψουν μικρά συσσωματώματα κυττάρων ή και μονήρη κύτταρα.

Για την μηχανική αποδιάταξη χρησιμοποιούνται αποστειρωμένες λαβίδες, ψαλίδια και νυστέρια. Στη συνέχεια, το μηχανικά αποδιαταγμένο ιστοτεμάχιο τοποθετείται σε τρυβλίο που περιέχει διαλύματα κολλαγενάσης I, II και υαλουρονιδάσης μαζί με θρεπτικό υλικό (RPMI medium) και αντιβιοτικά (πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη), με τελική συγκέντρωση 400U/ml για κάθε ένζυμο, σε όγκο διαλύματος 4ml. Η χημική αποδιάταξη διαρκεί 4-6 ώρες. Το τρυβλίο τοποθετείται σε κλίβανο με συνθήκες 37 °C, 5% CO₂. Η μορφολογία των κυττάρων και η πρόοδος της αποδιάταξης παρακολουθούνται σε μικροσκόπιο ανεστραμένου φωτός.

Όταν ο ιστός είναι αποδιαταγμένος πλήρως και στο τρυβλίο παρατηρούνται κύτταρα και μικρά συσσωματώματα κυττάρων χωρίς παρουσία συνδετικού ιστού το υλικό είναι έτοιμο για καλλιέργεια²¹⁹.

B. Εγκαθίδρυση και κυτταροκαλλιέργεια

Το αποδιαταγμένο υλικό από το τρυβλίο μεταφέρεται σε σωλήνα φυγοκέντρου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 10000 στροφές και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Το ίζημα, το οποίο περιέχει τον ιστό διαλύεται ξανά σε wash medium (RPMI medium, Penicillin, Streptomycin) και φυγοκεντρείται εκ νέου για να απομακρυνθούν τα ένζυμα και τα κύτταρα να είναι έτοιμα για εγκαθίδρυση σε φλάσκα καλλιέργειας.

Το ίζημα των κυττάρων από την τελευταία φυγοκέντρηση μεταφερόταν σε φιάλη καλλιέργειας με καλλιεργητικό μέσο (RPMI medium, αντιβιοτικό PEST, fetal bovine serum). Το καλλιεργητικό μέσο στην αρχή ήταν 2,5-3,5 ml ανάλογα με την ποσότητα των κυττάρων για να διευκολυνθούν στην προσκόλληση. Η κυτταροκαλλιέργεια τοποθετούνταν σε κλίβανο με συνθήκες 37 °C, 5% CO₂. Στη συνέχεια μπορούσε να προστεθεί καλλιεργητικό υλικό μέχρι τελικού όγκου 5ml. Η πορεία της κυτταροκαλλιέργειας παρατηρούνταν σε μικροσκόπιο ανεστραμένου φωτός²¹⁹.

Γ. Απομόνωση χρωμοσωμάτων

Η καλλιέργεια διαρκούσε 3-6 ημέρες, ανάλογα με το είδος των κυττάρων στην κυτταροκαλλιέργεια και από το ρυθμό πολλαπλασιασμού τους, έως ώτου να παρατηρηθεί το άριστο σημείο ανάπτυξης και μιτωτικής δραστηριότητας. Αυτό είναι το κατάλληλο σημείο για την απομόνωση των χρωμοσωμάτων. Στη φιάλη προστίθεται κολχικίνη (colcemid, GIBCO), η οποία σταματά τα διπλασιαζόμενα κύτταρα στο στάδιο της μετάφασης, σε συγκέντρωση 20ng/ml καλλιεργητικού υλικού για 2,5-3 ώρες. Στη συνέχεια, το καλλιεργητικό μέσο από τη φιάλη μεταφέρεται σε σωλήνα φυγοκέντρου και στη φιάλη προστίθεται διάλυμα θρυψίνης 2ml για την αποκόλληση των διπλασιαζόμενων κυττάρων. Η φιάλη επανατοποθετείται στον κλίβανο για 2 λεπτά και στη συνέχεια το ένζυμο και τα αποκολλημένα κύτταρα μεταφέρονται στο σωλήνα φυγοκέντρου.

Ο σωλήνας φυγοκέντρου φυγοκεντρείται στις 1000 στροφές για 10 λεπτά. Κατόπιν το υπερκείμενο απορρίπτεται και στο ίζημα γίνεται υποτονική μεταχείριση των κυττάρων με προσθήκη περίπου 5 ml KCl 0.05M, ήπια ανάδευση και παραμονή για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια γίνεται προσεκτική ήπια μονιμοποίηση με διάλυμα μεθανόλης: οξικού οξέως 3:1. Αναλυτικά: το σωληνάριο με το υποτονικό φυγοκεντρείται 3 φορές στις 1350 στροφές για 6 λεπτά, με χρόνους παραμονής στο μονιμοποιητικό προοδευτικά αυξανόμενους (1 λεπτό, 10 λεπτά, 30 λεπτά). Σε κάθε φυγοκέντρηση

αφαιρείται σταδιακά το υποτονικό και προστίθεται με ήπια ανάδευση όλο και περισσότερο μονιμοποιητικό διάλυμα ώστε μετά το τέλος και της τρίτης φυγοκέντρωσης τα κύτταρα να βρίσκονται μέσα σε καθαρό μονιμοποιητικό διάλυμα και να είναι έτοιμα προς επίστρωση. Τα κύτταρα με μικρή ποσότητα μονιμοποιητικού (περίπου 0.4 ml) επιστρώνονται σε καθαρές αντικειμενοφόρους που φυλάγονταν σε απεσταγμένο νερό στο ψυγείο. Οι αντικειμενοφόροι με τα κύτταρα τοποθετούνται σε ξηρό κλίβανο 60° C για 12-16 ώρες αφού προηγουμένως είχαν στεγνώσει στον αέρα. Όταν οι αντικειμενοφόροι βγουν από το ξηρό κλίβανο, τοποθετούνται σε υδατόλουτρο 60° C εντός διαλύματος 2XSSC (μίγμα των διαλυμάτων 0.6 M NaCl και 0.06M Na₃Citrate σε ίσες αναλογίες) για 3.5 ώρες ώστε να καθαριστούν από υπολείμματα κυταροπλάσματος, σκουπίδια κ.λ.π, κατόπιν τοποθετούνται στο ψυγείο για 30 λεπτά και τελικά ξεπλένονται με νερό βρύσης. Όταν τα πλακίδια είναι απολύτως στεγνά (συνήθως μετά από 24 ώρες) ξεκινά η διαδικασία της χρωμοσωμικής σήμανσης τύπου G²¹⁹.

Πίνακας VIII.1 : Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια στις κυτταροκαλλιέργειες

ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ	ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
Διάλυμα κολλαγενάσης	Collagenase I RPMImedium	400U/ ml medium
Διάλυμα κολλαγενάσης	Collagenase II RPMImedium	400U/ ml medium
Διάλυμα υαλουρονιδάσης	Hyalouronidase RPMImedium	400U/ ml medium
Wash καλλιεργητικό μέσο	RPMI medium Penicillin Streptomycin	100 ml 50U/ml medium 50 µg/ml medium
Sarcoma Καλλιεργητικό μέσο	RPMI medium Penicillin Streptomycin Fetal Bovine Serum	100 ml 50U/ml medium 50 µg/ml medium 17% medium

Δ. Χρωμοσωμική σήμανση (G banding)

Για τη σήμανση τύπου G (banding) χρησιμοποιείται η τεχνική κατά Mandahl με χρωστική Wright (Sigma)²¹⁹.

Αναλυτικά χρησιμοποιούνται τα ακόλουθα αντιδραστήρια: Α) ρυθμιστικό διάλυμα Sorensen (p.H=6.8) που προκύπτει από μίξη δύο διαλυμάτων Α, Β (Α=0.06M Na₂HPO₄, Β=0.06M KH₂PO₄) σε αναλογία Α:Β, 51:49. Β) διάλυμα χρωστικής Wright που προκύπτει με διάλυση 0.25g χρωστικής σε 100 ml μεθανόλης.

Η διαδικασία της χρώσης γινόταν ως εξής: Οι αντικειμενοφόροι τοποθετούνταν οριζόντια και καλύπτονταν με ρυθμιστικό διάλυμα για 30-45 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, το ρυθμιστικό διάλυμα απορρίπτονταν και το πλακάκι καλύπτονταν με μίγμα διαλύματος χρωστικής και ρυθμιστικού διαλύματος Sorensen (σε αναλογία 1:3 αντίστοιχα) για 2-2,5 λεπτά. Μετά τη χρώση οι αντικειμενοφόρες πλάκες ξεπλένονταν με νερό βρύσης, στεγνωναν στον αέρα, καλύπτονταν με καλυπτρίδα όταν ήταν τελείως στεγνές και ήταν έτοιμες για μικροσκοπική παρατήρηση.

Ε. Μικροσκοπική παρατήρηση – Καρυοτυπική ανάλυση

Η παρατήρηση των παρασκευασμάτων γινόταν με φωτονικό μικροσκόπιο Zeiss. Οι μιτώσεις ανιχνεύονταν αρχικά με μεγέθυνση 10X10 και η παρατήρησή τους γινόταν με καταδυτικό φακό 10X100. Για κάθε περιστατικό αναλύονταν στο μικροσκόπιο όλες οι διαθέσιμες μεταφάσεις και επιλέγονταν οι καταλληλότερες από αυτές για τη δημιουργία καρυογραμμάτων. Το μικροσκόπιο ήταν εφοδιασμένο με κατάλληλο λογισμικό σύστημα (Ikarus, Metasystems) με δυνατότητα αποθήκευσης και επεξεργασίας των παρατηρούμενων μεταφάσεων καθώς και άμεσης εκτύπωσης των καρυογραμμάτων. Επιλέγοντας τα καταλληλότερα από αυτά (συνήθως 2-5 καρυογράμματα) δημιουργείτο ο καρυότυπος κάθε περιστατικού. Τα κριτήρια κλωνικότητας και η περιγραφή των καρυοτύπων έγιναν σύμφωνα με την Διεθνή Ονοματολογία (ISCN 2005)²⁰.

3. Μεθοδολογία *in situ* υβριδισμού (mFISH, mBAND)

Η μεθοδολογία του FISH έγινε με βάση το πρωτόκολλο, το οποίο προτείνει η εταιρεία METASYSTEMS, από την οποία έγινε η προμήθεια των υλικών που χρησιμοποιήθηκαν.

A. Πολυχρωματικός *in situ* υβριδισμός mFISH

Με την τεχνική του mFISH τα 24 ανθρώπινα χρωμοσώματα μπορούν να χρωματιστούν με διαφορετικό χρώμα το καθένα, χρησιμοποιώντας 5 φθοριοχρώματα και τα κατάλληλα φίλτρα ενός μικροσκοπίου φθορισμού⁶⁵. Αναλυτικά τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι τα παρακάτω:

- **Δημιουργία χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων**

Το σημαντικότερο βήμα για την επιτυχία της τεχνικής του mFISH είναι η παρασκευή αντικειμενοφόρων πλακών πλούσιων σε μεταφάσεις με ευμεγέθη χρωμοσώματα. Έτσι, χρησιμοποιώντας υλικό από το ίζημα με το μονιμοποιητικό διάλυμα (fixative) όπως περιγράφηκε παραπάνω στο 2Γ δημιουργούνται αντικειμενοφόρες πλάκες με μεταφασικά χρωμοσώματα. Είναι σημαντικό τα χρωμοσωμικά παρασκευάσματα να είναι σχετικά πρόσφατα, το πολύ 10 ημερών και να διατηρούνται στους -20°C.

- **Αποδιάταξη των χρωμοσωμάτων**

Η αποδιάταξη των χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων επιτυγχάνεται με την επίδραση της θερμοκρασίας, αλλά και με τη χρήση χημικών ουσιών. Αφού λοιπόν, οι αντικειμενοφόρες πλάκες εμβαπτιστούν σε διαλύματα αιθανόλης 100%, 95%, 70% για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου, για να επανυδατωθεί το DNA, τότε προχωράμε στην αποδιάταξη. Εμβαπτίζονται οι αντικειμενοφόρες πλάκες σε διάλυμα 0,1 SSC για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια στους 70°C σε διάλυμα 2 SSC για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, τα χρωμοσωμικά παρασκευάσματα μεταφέρονται σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου μισή ώρα και ακολουθεί ένα ακόμη βήμα σταθεροποίησης του DNA σε διάλυμα 0,1 SSC σε θερμοκρασία δωματίου. Το επόμενο βήμα, περιλαμβάνει την χημική επίδραση για την αποδιάταξη με διάλυμα NaOH 0,07N για ένα λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, το DNA ξανασταθεροποιείται σε διαλύματα 0,1 SSC και 2 SSC στους 4°C για 1 λεπτό και αφού αφυδατωθεί με διαλύματα 70%, 95%, 100% αιθανόλης για 1 λεπτό σε

θερμοκρασία δωματίου, τότε οι αντικειμενοφόρες πλάκες αφήνονται στον αέρα για αποξήρανση.

- **Αποδιάταξη του ιχνηθέτη (probe)**

Ο ιχνηθέτης (probe), ο οποίος παρασκευάζεται από την εταιρεία Metasystems αποδιατάσσεται μόνο με την επίδραση της θερμοκρασίας. Έτσι, ο κατάλληλος όγκος ιχνηθέτη – όπως αυτός ορίζεται από την εταιρεία ανάλογα με την έκταση της αντικειμενοφόρου πλάκας που θα υβριδοποιηθεί – τοποθετείται στους 75°C για 5 λεπτά και εν συνεχεία ψύχεται τάχιστα σε πάγο. Ακολουθεί επώαση στους 30°C για 30 λεπτά και ο ιχνηθέτης είναι έτοιμος για υβριδοποίηση.

- **Υβριδοποίηση χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων και ιχνηθέτη**

Τα αποδιαταγμένα χρωμοσωμικά παρασκευάσματα και ο αποδιαταγμένος ιχνηθέτης είναι έτοιμα για υβριδοποίηση. Ο απαιτούμενος όγκος του ιχνηθέτη απλώνεται πάνω στις αντικειμενοφόρες πλάκες και καλύπτεται με καλυπτρίδα. Στη συνέχεια η καλυπτρίδα σφραγίζεται με τη χρήση κόλλας. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετούνται σε θήκη με υγρασία και αφήνονται να υβριδοποιηθούν μέσα σε κλίβανο 37°C για 2-4 ημέρες.

- **Βήματα μετά την υβριδοποίηση**

Τα βήματα αυτά αποσκοπούν στην απομάκρυνση της περίσσειας του ιχνηθέτη ώστε να αποφευχθεί μη ειδική σήμανση. Έτσι, αφαιρείται η κόλλα και οι καλυπτρίδες με πολλή προσοχή για να μην τραυματιστούν τα χρωμοσωμικά παρασκευάσματα. Στη συνέχεια οι αντικειμενοφόρες πλάκες εμβαπτίζονται σε διάλυμα 1 SSC στους 75°C για 5 λεπτά και ακολουθεί ένα ακόμη βήμα με διάλυμα 4 SSCT για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα προστίθεται διάλυμα 50μl που περιέχει 50μl blocking reagent και 1μl detection reagent, καλύπτεται με καλυπτρίδα και επωάζεται στους 37°C για 15 λεπτά. Ακολουθεί έκπλυση σε διάλυμα 4 SSCT, σε θερμοκρασία δωματίου δυο φορές για 3 λεπτά. Εν συνεχεία, ακολουθεί σύντομη εμβάπτιση σε νερό και αποξήρανση στον αέρα. Πριν την μικροσκοπική παρατήρηση προστίθενται 20μl διάλυμα DAPI και καλύπτεται η αντικειμενοφόρος πλάκα με καλυπτρίδα.

- **Μικροσκοπική παρατήρηση**

Για τη μικροσκοπική παρατήρηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε μικροσκόπιο φθορισμού (Axionplan, Zeiss) εφοδιασμένο με λάμπα φθορισμού 100 watt πηγής υδραργύρου και κατάλληλα φίλτρα για την απεικόνιση των σημάτων υβριδισμού. Η

απεικόνιση και επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με κατάλληλο λογισμικό σύστημα (Isis) της εταιρίας Metasystems.

B. Πολυχρωματικός-πολυταινικός in situ υβριδισμός mBAND

Η διαδικασία της αποδιάταξης του χρωμοσωμικού παρασκευάσματος και του ιχνηθέτη, της υβριδοποίησης, αλλά και οι εκπλύσεις μετά την υβριδοποίηση είναι κοινές με το mFISH⁶⁶. Οι διαφορές που υπάρχουν εντοπίζονται στη χρήση του κατάλληλου ιχνηθέτη ανάλογα με το χρωμόσωμα που πρόκειται να αναλυθεί, αλλά και στο χρόνο υβριδισμού, ο οποίος μπορεί να μειωθεί στις 2 μέρες. Για τη μικροσκοπική ανάλυση χρησιμοποιείται το λογισμικό (Isis) της εταιρίας Metasystems.

Πίνακας VIII.2 : Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια στο mFISH και mBAND

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
Διάλυμα SSC	0,1 SSC, 1SSC, 2SSC
Διάλυμα NaOH	NaOH 0,07 mol/l
Διάλυμα αιθανόλης	Αιθανόλη 100%, 95%, 70%
Ιχνηθέτης probe	Προϊόν METASYSTEMS
Διάλυμα SSCT	4 SSCT, SSC+Tween20
Blocking reagent	Προϊόν METASYSTEMS
Detection reagent1	Προϊόν METASYSTEMS
Διάλυμα DAPI	Προϊόν Vysis
Ιχνηθέτης Xcyte για κατάλληλο χρωμόσωμα	Προϊόν METASYSTEMS

4. Μεθοδολογία συγκριτικού γενωμικού υβριδισμού (CGH)

Για την εφαρμογή της τεχνικής του CGH είναι απαραίτητη η απομόνωση HMW DNA καλής ποιότητας και συγκέντρωσης τουλάχιστον 200ng/μl. Τα βήματα που ακολουθούνται είναι τα παρακάτω.^{70, 71}

- **Nick translation**

Δουλεύοντας πάντα σε πάγο σχηματίζεται το μίγμα της αντίδρασης. Σε τελικό λουπόν όγκο 50μl, αναμιγνύονται 5μl μίγματος νουκλεοτιδίων (dNTPs), 1,5μl φθορίζοντων νουκλεοτιδίων (Sp. Green, Sp. Red dUTPs), 1μl πολυμεράση I (polymerase I), 12μl από το ένζυμο DNase/Polymerase I και νερό με όγκο 29,5-V, όπου V είναι ο όγκος από το DNA που θα χρησιμοποιηθεί. Η τελική ποσότητα του DNA στην αντίδραση ιδανικά είναι τα 1,6μg. Στη συνέχεια η αντίδραση τοποθετείται στους 15°C για 70 λεπτά και ύστερα στους 70°C για 15 λεπτά. Το προϊόν της αντίδρασης ηλεκτροφορείται σε 1,5% ζελέ αгарόζης. Το nick translated DNA πρέπει να έχει μέγεθος 300bp-2kbp, ώστε να είναι κατάλληλο για υβριδοποίηση.

- **Υβριδοποίηση 1**

Με βάση την ένταση του προς ανάλυση αλλά και του φυσιολογικού DNA, επιλέγονται και οι όγκοι που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για την υβριδοποίηση. Έτσι, σε τελικό όγκο αντίδρασης 330μl αναμιγνύονται 35μl από κάθε nick translated DNA, 30μl Cot1 DNA, 220μl αιθανόλη 100% και 10μl οξικό νάτριο 3M. Η αντίδραση τοποθετείται στους -20°C μέχρι την επόμενη μέρα.

- **Υβριδοποίηση 2**

Τα DNA φυγοκεντρούνται στους 40°C για 30 λεπτά και αφήνονται στον αέρα για αποξήρανση. Στη συνέχεια, το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται με LSI 10μl στους 37°C για 15 λεπτά και η αποδιάταξη των αλυσίδων στο μίγμα των DNAs επιτυγχάνεται με την τοποθέτηση του προϊόντος του 70°C για 5 λεπτά. Επίσης, αποδιατάσσονται μεταφασικά χρωμοσώματα σε αντικειμενοφόρες πλάκες με την επίδραση τόσο της θερμοκρασίας 74°C, αλλά και χημικών μέσων (φορμαμίδιο, SSC) για 5 λεπτά. Ακολουθεί η σταθεροποίηση του DNA με εμβάπτιση σε διαλύματα 2SSC και αιθανόλης 70%, 85%, 100% από 2 λεπτά και τελικά οι αντικειμενοφόρες πλάκες αφήνονται στον αέρα για αποξήρανση. Σε κάθε αποδιαταγμένη αντικειμενοφόρο πλάκα τοποθετούνται 10μl από το αποδιαταγμένο DNA, καλύπτονται με καλυπτρίδα, σφραγίζονται με κόλλα και τοποθετούνται σε κλίβανο με συνθήκες 37°C και 5% CO₂ για 72 ώρες.

- **Βήματα μετά την υβριδοποίηση**

Από κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα αφαιρείται η καλυπτρίδα και εμβαπτίζεται σε 3 δοχεία corlin, τοα οποία περιέχουν 50% φορμαμίδιο και ακολούθως σε 2 δοχεία corlin με 2SSC στους 46°C για 10 λεπτά έκαστο. Εν συνεχεία, εμβαπτίζονται σε διάλυμα 2SSCT και μετά σε νερό για 10 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τέλος, τοποθετούνται 10μl

DAPI, το παρασκεύασμα καλύπτεται με καλυπτρίδα, η οποία μονιμοποιείται με βερνίκι νυχιών και ακολουθεί η μικροσκοπική παρατήρηση.

- **Μικροσκοπική παρατήρηση**

Για τη μικροσκοπική παρατήρηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε μικροσκόπιο φθορισμού (Axionplan, Zeiss) εφοδιασμένο με λάμπα φθορισμού 100 watt πηγής υδραργύρου και κατάλληλα φίλτρα για την απεικόνιση των σημάτων υβριδισμού. Η απεικόνιση και επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με κατάλληλο λογισμικό σύστημα (Isis) της εταιρίας Metasystems.

Πίνακας VIII.3: Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια στο CGH

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
Μίγμα νουκλεοτιδίων	6 µl 10mM dTTP 20 µl 10mM dCTP 20 µl 10mM dATP 20 µl 10mM dGTP 500 µl 1M TRIS-HCL (pH 7,8) 50 µl 1M MgCl ₂ 6,8 µl 14,3 β-mercapthoethanol 10 µl 10mg/ml BSA 367,2 µl MQ-H ₂ O
Sp Green dUTPs	Sp Green dUTP (50nmol)
Sp Red dUTPs	Sp Red dUTP (50nmol)
3M NaAc, pH 5,2	40,8gr NaAc (M=136,08) 40ml MQ-H ₂ O
Tris-HCl 1M, pH 7,8 (100ml)	12,1 gr TRIS (m=121,1g/mol) 80 ml MQ-H ₂ O
MgCl₂ 1M (100ml)	20,33 gr MgCl ₂ (M=203,3 g/mol) 100 ml MQ-H ₂ O
50% φορμαμίδιο/2SSC	100 ml φορμαμίδιο 20 ml 20SSC 80 ml MQ-H ₂ O
2xSSC/0,1% Tween,	50 ml 20SSC

pH 7,0 (500 ml)	0,5 ml Tween 400 ml MQ-H ₂ O
DNA polII (E.coli) (10u/μl)	Προϊόν INVITROGEN
DNA polII/ Dnase I	Προϊόν INVITROGEN
Human Cot-1 DNA	Προϊόν INVITROGEN

5. Μοριακή μεθοδολογία

A. Απομόνωση γενωμικού DNA

Η απομόνωση του γενωμικού DNA γίνεται με βάση το πρωτόκολλο της εταιρείας PROMEGA. 20-30μg κατεψυγμένου ιστού κατατέμνονται μηχανικά με ψαλίδι ή νυστέρι και αποδιατάσσονται ενζυμικά με 500μl Nuclei Lysis solution. Ακολουθεί ενζυμική αποδιάταξη με 20μl πρωτεΐνης K (20mg/ml) στους 55°C για 3 τουλάχιστον ώρες ή και περισσότερο μέχρι ο ιστός να ομογενοποιηθεί και αποδιαταχθεί πλήρως. Ακολουθεί καθίζηση των πρωτεϊνών με 200μl Protein Precipitation solution και επώαση στον πάγο για 5 λεπτά. Φυγοκεντρώντας για 4 λεπτά στις 13000 στροφές το ίζημα των πρωτεϊνών καθιζάνει. Προσεκτικά, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο μικροσωληνάριο φυγοκέντρου, το οποίο περιέχει 600μl ισοπροπανόλης σε θερμοκρασία δωματίου. Αναστρέφοντας το σωληνάριο σχηματίζεται ίζημα, το οποίο περιέχει το DNA και ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 13000 στροφές για 5 λεπτά. Εν συνεχεία, ακολουθεί έκπλυση με 600μl 70% αιθανόλης στις 13000 στροφές για 5 λεπτά. Τελικά, το ίζημα του DNA αποξηραίνεται στον αέρα και επανυδατώνεται με 20μl DNA Rehydration solution.

Πίνακας VIII.4: Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια στην απομόνωση γενωμικού DNA

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
Nuclei Lysis solution	Προϊόν PROMEGA
Protein precipitation solution	Προϊόν PROMEGA
Isopropanol	Isopropanol 100%
Ethanol	Ethanol 70%
DNA Rehydration solution	Προϊόν PROMEGA

B. Απομόνωση RNA

Η απομόνωση του RNA γίνεται με βάση το πρωτόκολλο της εταιρείας MACHEREY-NAGEL. 30mg κατεψυγμένου ιστού κατατέμονται και ομογενοποιούνται μηχανικά με ψαλίδι και νυστέρι και χημικά με διάλυμα 5μl β-μερκαπτοαιθανόλης και 500μl RA1. Το διάλυμα περνά από φίλτρο Nucleospin filter και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 11000 στροφές. Το ομογενοποιημένο έκλουμα αναμιγνύεται με 350μl 70% αιθανόλης. Το νέο διάλυμα φιλτράρεται στη Nucleospin RNA II κολώνα και φυγοκεντρείται στις 8000 στροφές για 30 δευτερόλεπτα. Η μεμβράνη της Nucleospin RNA II κολώνας αποξηραίνεται με 350μl MDB και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 11000 στροφές. Ακολουθεί πέψη του DNA με 95μl DNase I για 15 λεπτά. Στη συνέχεια, 200μl διαλύματος RA2 απενεργοποιούν το ένζυμο της DNase. Ακολουθούν 2 εκπλύσεις με διάλυμα RA3. Τέλος, με 40μl νερού επαναδιαλύεται το RNA μετά από φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στις 11000 στροφές.

Πίνακας VIII.5: Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια στην απομόνωση RNA

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
RA1 buffer	Προϊόν MACHEREY-NAGEL
RA2 buffer	Προϊόν MACHEREY-NAGEL
RA3 buffer	Προϊόν MACHEREY-NAGEL
MDB buffer	Προϊόν MACHEREY-NAGEL
DNase I	Προϊόν MACHEREY-NAGEL 10μl DNase I 90μl DNase reaction buffer
Nucleospin filter	Προϊόν MACHEREY-NAGEL
Nucleospin RNA κολώνες	Προϊόν MACHEREY-NAGEL
αιθανόλη	Αιθανόλη 70%
Β-μερκαπτοαιθανόλη	Προϊόν MERCK

Γ. Κατασκευή συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Η κατασκευή του συμπληρωματικού DNA (cDNA) προϋποθέτει την απομόνωση RNA. Για την κατασκευή του cDNA χρησιμοποιούνται 9μl RNA, 1μl εκκινητών (random primers) και 1μl μίγματος δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs 10mM), τα οποία επωάζονται για 5 λεπτά στους 65°C. Ακολούθως, μετά από διακοπή της αντίδρασης στους 4°C για 5 λεπτά προστίθενται στο μίγμα 4μl first strand reaction buffer, 2μl DTT, 1μl ένζυμο RNase και 1μl ένζυμο αντίστροφης μεταγραφάσης Superscript II. Η αντίδραση επωάζεται στους 25°C για 13 λεπτά, στους 42°C για 50 λεπτά και η αντίδραση τερματίζει στους 70°C για 15 λεπτά.

Πίνακας VIII.6: Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια στην κατασκευή συμπληρωματικού DNA (cDNA)

ΑΝΤΙΑΠΑΣΤΗΠΙΟ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
Random primers	INVITROGEN
dNTPs 10mM	INVITROGEN
0,1 DTT	INVITROGEN
RNase OUT	INVITROGEN
Superscript II	INVITROGEN
First strand reaction buffer	INVITROGEN

Δ. Real time PCR

Η τεχνική του real time PCR δίνει τη δυνατότητα μελέτης της έκφρασης ενός γονιδίου προσδιορίζοντας την ποσότητα του RNA αυτού του γονιδίου. Η εφαρμογή αυτής της τεχνικής έγινε με τη χρήση της φθορίζουσας ουσίας SYBR Green. Για την πραγματοποίηση του real time PCR είναι απαραίτητη η κατασκευή συμπληρωματικού μορίου DNA (cDNA) από το RNA του προς εξέταση ιστού. Κατά την εφαρμογή της τεχνικής χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο της εταιρείας INVITROGEN, η οποία προμηθεύει και τα απαραίτητα αντιδραστήρια. Αναλυτικά, το μίγμα περιέχει 10μl SYBR Green, 1μl BSA, 0,2μl από έκαστο εκκινητή (primer), 6,6μl νερό και 2μl cDNA από τον

ιστό. Το μίγμα τοποθετείται σε ειδικά τριχοειδή σωληνάκια (LightCycler capillaries 20μl) και η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε συσκευή Real time PCR Ligt Cycler ROCHE. Η αντίδραση περιλαμβάνει 1 κύκλο αποδιάταξης στους 95°C για 5 δευτερόλεπτα, πολλαπλασιασμό του προϊόντος με ένα βήμα στους 95°C για 5 δευτερόλεπτα, ένα βήμα στους 60 ή 65°C για 5 δευτερόλεπτα και ένα βήμα στους 72°C για 20 δευτερόλεπτα. Ο πολλαπλασιασμός του προϊόντος γίνεται για 40 διαδοχικούς κύκλους. Ακολουθεί η τήξη του προϊόντος με ένα βήμα στους 95°C για 1 δευτερόλεπτο, ένα βήμα στους 60 ή 65°C για 5 δευτερόλεπτα και ένα βήμα στους 95°C για 1 δευτερόλεπτο. Το πρωτόκολλο τελειώνει με ψύξη στους 40°C για 30 δευτερόλεπτα. Για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης εκτός από τα μελετούμενα γονίδια, χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας το γονίδιο $\beta 2$ microglobulin και ως δείμα μάρτυρας ένα δείγμα από περιφερικό αίμα. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα RelQuant και η στατιστική ανάλυση με το πρόγραμμα SPSS.

Πίνακας VIII.7: Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια στο Real time PCR

ΑΝΤΙΑΠΑΣΤΗΡΙΟ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
SYBR Green	INVITROGEN
BSA	INVITROGEN
Primers (εκκινητές)	INVITROGEN
H₂O	INVITROGEN

Πίνακας VIII.8: Χρησιμοποιούμενοι εκκινητές (primers) για κάθε γονίδιο που μελετήθηκε με Real time PCR

Γονίδιο	Forward primer	Reverse primer
Xrcc5	5'-GACGTGGGCTTTACCATGAGT-3'	5'-TCAGTGCCATCTGTACCAAAC-3'
Xrcc6	5'-AGTCATATTACAAAACCGAGGGC-3'	5'-CCTTGAGGGCATCAACCAAAAA-3'
Xrcc4	5'-ATCTCTCTGGGTTCAG-3'	5'-TTTCGACGTCTCAGGTAGTGAA-3'
Polm	5'-CTCATCCTGTACCACCAGCA-3'	5'-GCTGTTGGGTAGTTTCTGGG-3'
Pol la	5'-GGGGTATCTTGAAGGCATTTCC-3'	5'-CCATGCTGAACAATCTGCTTCT-3'
Rad52	5'-TTGGACAGTGCCAGTACACAG-3'	5'-ATTCTGCTGCGTGATGGAG-3'

E. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR και nested PCR)^{220, 221}

Η ανίχνευση των υβριδικών γονιδίων *FUS/CHOP* και *SYT/SSX* σε περιστατικά λιποσαρκώματος και συνοβιακού σαρκώματος αντιστοίχως γίνεται με την εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και ειδικότερα της παραλλαγής της nested PCR. Στην nested PCR χρησιμοποιούνται δυο ζεύγη εκκινητών. Το δεύτερο ζεύγος βρίσκεται εσωτερικά του πρώτου ζεύγους εκκινητών. Έτσι, το προϊόν της πρώτης PCR ξαναπολλαπλασιάζεται με το δεύτερο ζεύγος των εσωτερικότερων εκκινητών. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται μεγαλύτερη ειδικότητα στο τελικό προϊόν, κάτι το οποίο είναι απολύτως απαραίτητο, αφού πρόκειται για διαγνωστικό αποτέλεσμα. Για την εφαρμογή της τεχνικής είναι απαραίτητη η κατασκευή συμπληρωματικού μορίου DNA (cDNA) από το RNA του προς εξέταση ιστού.

Για το λιποσάρκωμα η αντίδραση περιλαμβάνει 5μl 10PCR buffer, 5μl μίγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων (2mM dNTPs), 1,5μl MgCl₂ (50mM), 0,5μl από έκαστο εκκινητή (primer), 0,3μl ένζυμο πολυμεράσης Platinum Taq, 35,2μl νερό και 2μl cDNA από τον ιστό. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε μηχανήμα PCR. Το πρόγραμμα ξεκινά με 3 λεπτά στους 95°C για αποδιάταξη, ακολουθούν 25 κύκλοι πολλαπλασιασμού του προϊόντος με τους εκκινητές FC1, FC2 στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα, στους 54°C για 45 δευτερόλεπτα και 72°C για 1 λεπτό. Ο τελικός πολυμερισμός του προϊόντος γίνεται στους 72°C για 5 λεπτά. Το προϊόν αυτής της πρώτης αντίδρασης ξαναπολλαπλασιάζεται με τη χρήση των εσωτερικότερων εκκινητών FC3, FC4. Η αντίδραση περιέχει τα ίδια υλικά με τη μόνη διαφορά ότι χρησιμοποιούνται 2μl από το προϊόν της πρώτης PCR αντί για cDNA. Το πρόγραμμα ξεκινά με 3 λεπτά στους 95°C για αποδιάταξη, ακολουθούν 40 κύκλοι πολλαπλασιασμού του προϊόντος με τους εκκινητές FC3, FC4 στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα, στους 64°C για 45 δευτερόλεπτα και 72°C για 1 λεπτό. Ο τελικός πολυμερισμός του προϊόντος γίνεται στους 72°C για 5 λεπτά. Το προϊόν της αντίδρασης ηλεκτροφορείται σε ζελέ αгарόζης 1,5%.

Για το σάρκωμα Ewing η αντίδραση περιλαμβάνει 5μl 10PCR buffer, 5μl μίγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων (2mM dNTPs), 1,5μl MgCl₂ (50mM), 0,5μl από έκαστο εκκινητή (primer), 0,3μl ένζυμο πολυμεράσης Platinum Taq, 35,2μl νερό και 2μl cDNA από τον ιστό. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε μηχανήμα PCR. Το πρόγραμμα ξεκινά με 5 λεπτά στους 94°C για αποδιάταξη, ακολουθούν 30 κύκλοι πολλαπλασιασμού του προϊόντος με τους εκκινητές EWS 22.8F, FLI 11R στους 94°C για 1 λεπτό, στους 65°C για 40 δευτερόλεπτα και 72°C για 1 λεπτό. Ο τελικός πολυμερισμός του προϊόντος γίνεται στους

72°C για 10 λεπτά. Το προϊόν αυτής της πρώτης αντίδρασης ξαναπολλαπλασιάζεται με τη χρήση των εσωτερικότερων εκκινητών από τους προαναφερόμενους. Η αντίδραση περιέχει τα ίδια υλικά με τη μόνη διαφορά ότι χρησιμοποιούνται 2μl από το προϊόν της πρώτης PCR αντί για cDNA. Το πρόγραμμα ξεκινά με 5 λεπτά στους 94°C για αποδιάταξη, ακολουθούν 30 κύκλοι πολλαπλασιασμού του προϊόντος με τους εκκινητές EWS 22.3F, FLI 11.3R στους 94°C για 1 λεπτό, στους 65°C για 40 δευτερόλεπτα και 72°C για 1 λεπτό. Ο τελικός πολυμερισμός του προϊόντος γίνεται στους 72°C για 10 λεπτά. Το προϊόν της αντίδρασης ηλεκτροφορείται σε ζελέ αгарόζης 1,5%.

Για το συνοβιακό σάρκωμα η αντίδραση περιλαμβάνει 5μl 10PCR buffer, 5μl μίγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων (2mM dNTPs), 2,5μl MgCl₂ (50mM), 0,5μl από ένα εκκινητή (primer), 0,5μl ένζυμο πολυμεράσης Platinum Taq, 33μl νερό και 3μl cDNA από τον ιστό. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε μηχανήμα PCR. Το πρόγραμμα ξεκινά με 5 λεπτά στους 95°C για αποδιάταξη, ακολουθούν 30 κύκλοι πολλαπλασιασμού του προϊόντος με τους εκκινητές SYT949F, SSX1512R στους 94°C για 1 λεπτό, στους 49°C για 1 λεπτό και 72°C για 1 λεπτό. Ο τελικός πολυμερισμός του προϊόντος γίνεται στους 74°C για 10 λεπτά. Το προϊόν αυτής της πρώτης αντίδρασης αραιώνεται 1/1000 και ξαναπολλαπλασιάζεται με τη χρήση των εσωτερικότερων εκκινητών SYT44F, SSX1 και SYT44F, SSX2 για τον εντοπισμό των 2 συχνότερων υποτύπων του υβριδικού γονιδίου SYT/SSX. Η αντίδραση περιέχει τα ίδια υλικά με τη μόνη διαφορά ότι χρησιμοποιούνται 2μl από το αραιωμένο προϊόν της πρώτης PCR αντί για cDNA. Το πρόγραμμα ξεκινά με 5 λεπτά στους 95°C για αποδιάταξη, ακολουθούν 30 κύκλοι πολλαπλασιασμού του προϊόντος με τους εκκινητές SYT44F, SSX1 και SYT44F, SSX2 στους 94°C για 50 δευτερόλεπτα, στους 60°C για 50 δευτερόλεπτα και 72°C για 1 λεπτό. Ο τελικός πολυμερισμός του προϊόντος γίνεται στους 72°C για 10 λεπτά. Το προϊόν της αντίδρασης ηλεκτροφορείται σε ζελέ αгарόζης 1,5%.

Το ηλεκτροφορημένο προϊόν είτε άμεσα το προϊόν της PCR, καθαρίζεται και αλληλουχοποιείται. Η αλληλουχία που προκύπτει συγκρίνεται με προγράμματα BLAST και ALIGN με τις αλληλουχίες που είναι καταχωρημένες στο διαδίκτυο. Με αυτό τον τρόπο εντοπίζεται ακριβώς το σημείο θραύσης των γονιδίων και το ακριβές υβριδικό γονίδιο που δημιουργήθηκε.

Πίνακας VIII.9: Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια στην nested PCR

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
10PCR Buffer	INVITROGEN
Μίγμα νουκλεοτιδίων dNTPs	INVITROGEN
MgCl ₂	INVITROGEN
Εκκινητές (primers)	ITE
Platinum Taq ένζυμο πολυμεράσης	INVITROGEN
νερό	WFI

Πίνακας VIII.10: Χρησιμοποιούμενοι εκκινητές (primers) για την ανίχνευση των υβριδικών γονιδίων FUS/CHOP και SYT/SSX στο λιποσάρκωμα και στο συνοβιακό σάρκωμα, αντιστοίχως.

Όγκος	Forward primer	Reverse primer
Λιποσάρκωμα 1ο βήμα	FC1: 5'-GGCTATGGAAGTCAGTCAAC-3'	FC2: 5'-TTTCATCTGAAGACAGGACC-3'
Λιποσάρκωμα 2ο βήμα	FC3: 5'-AATCGTCTTACGGGCAGCAGTC-3'	FC4: 5'-CTCATACCAGGCTTCCAGCTCC-3'
Σάρκωμα Ewing 1ο βήμα	EWS22.8F: 5'-CTCCCACTAGTTACCCACCCCAA-3'	FLI11R: 5'-AGTCAACCCGAACGAAAAGGCGA-3'
Σάρκωμα Ewing 2ο βήμα	EWS22.3F: 5'-ATCCTACAGCCAAGCTCCAAGT-3'	FLI11.3R: 5'-ACTTGAGGGGCAACCAGGGGAGG-3'
Συνοβιακό σάρκωμα 1ο βήμα	SYT949F: 5'-CAACAGCAAGATGCATACCA-3'	SSX1512R: 5'-CATGCCCATGTTTCGTGAAAGGT-3'
Συνοβιακό σάρκωμα 2ο βήμα	SYT44F: 5'-ATCCACCCCAGCAGCAGCAGTA-3'	SSX1: 5'-GGCACAGCTCTTCCCATCA-3'
Συνοβιακό	SYT44F:	SSX2:

σάρκωμα 2^ο βήμα	5'-ATCCACCCCAGCAGCAGCAGTA-3'	5'-GGTGCAGTTGTTTCCCCATCG-3'
---	------------------------------	-----------------------------

Στ. Καθαρισμός προϊόντος από πήκτωμα αγαρόζης ή άμεσα του προϊόντος της PCR

Για τον καθαρισμό προϊόντος είτε από πήκτωμα αγαρόζης είτε άμεσα από την αντίδραση της PCR χρησιμοποιείται το πρωτόκολλο της εταιρείας MACHEREY-NAGEL από την οποία παρέχονται και τα αντιδραστήρια.

- **Προϊόν από πήκτωμα αγαρόζης**

Η ζώνη από το πήκτωμα αγαρόζης κόβεται πολύ προσεκτικά με αποστειρωμένο νυστέρι. Το κομμάτι αυτό μεταφέρεται σε μικροσωληνάριο φυγοκέντρου, το οποίο περιέχει 400μl διαλύματος NT buffer και επωάζεται στους 50°C για 10-15 λεπτά, ώπου το διάλυμα να είναι πλήρως ομογενοποιημένο. Εν συνεχεία, το διάλυμα αυτό φυγοκεντρείται στις 11000 στροφές για 1 λεπτό και φιλτράρεται μέσα από κολώνα Nucleospin Extract II. Η μεμβράνη της προαναφερθείσας στήλης ξεπλένεται με 600μl διαλύματος NT3 και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 11000 στροφές. Η στήλη επαναφυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 11000 στροφές ώστε να απομακρυνθούν πιθανά υπολείμματα διαλύματος NT3. Τέλος, το προϊόν εκλούεται με 25μl διαλύματος Elution buffer NE σε αποστειρωμένο μικροσωληνάριο φυγοκέντρου με φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στις 11000 στροφές.

- **Προϊόν PCR**

Το προϊόν της αντίδρασης άμεσα μεταφέρεται για καθαρισμό. Ποσότητα ενός όγκου από το προϊόν αναμιγνύεται με διπλάσιο όγκο διαλύματος NT. Εν συνεχεία, το διάλυμα αυτό φυγοκεντρείται στις 11000 στροφές για 1 λεπτό και φιλτράρεται μέσα από κολώνα Nucleospin Extract II. Η μεμβράνη της προαναφερθείσας στήλης ξεπλένεται με 600μl διαλύματος NT3 και φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 11000 στροφές. Η στήλη επαναφυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 11000 στροφές ώστε να απομακρυνθούν πιθανά υπολείμματα διαλύματος NT3. Τέλος, το προϊόν εκλούεται με 25μl διαλύματος Elution buffer NE σε αποστειρωμένο μικροσωληνάριο φυγοκέντρου με φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στις 11000 στροφές.

Πίνακας VIII.11: Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια στον καθαρισμό προϊόντος είτε άμεσα από την αντίδραση PCR είτε από ζελέ ηλεκτροφόρησης.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
NT Buffer	MACHEREY-NAGEL
Nucleospin Extract column (στήλη)	MACHEREY-NAGEL
NT3 Buffer	MACHEREY-NAGEL
NE elution buffer	MACHEREY-NAGEL

Z. 5' RACE (Rapid amplification of 5' cDNA ends)

Η τεχνική RACE δίνει τη δυνατότητα πολλαπλασιασμού μιας αλληλουχίας από την οποία είναι γνωστό μόνο το 5' άκρο. Έτσι, χρησιμοποιώντας έναν εκκινητή (primer) για το γνωστό τμήμα της αλληλουχίας που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε και με την εφαρμογή της τεχνικής είναι εφικτή η ανάγνωση όλου του τμήματος και από το 5' και από το 3' άκρο του. Για την εφαρμογή της τεχνικής είναι απαραίτητη η απομόνωση πολύ καλής ποιότητας RNA. Από αυτό το RNA κατασκευάζεται το συμπληρωματικό μόριο cDNA, χρησιμοποιώντας 1-5μg RNA, 2,5 pmol εκκινητή (GSP1) και νερό μέχρι τελικού όγκου 15,5μl. Αυτό το διάλυμα αποδιατάσσεται στους 70°C για 10 λεπτά και στη συνέχεια προστίθενται 2,5μl 10PCR Buffer, 2,5μl 25mM MgCl₂, 1μl 10mM μίγματος νουκλεοτιδίων dNTPs και 2,5μl 0,1M DTT. Το νέο διάλυμα ομογενοποιείται καλά και επωάζεται για 1 λεπτό στους 42°C. Ύστερα, προστίθεται και 1μl ένζυμο αντίστροφης μεταγραφάσης Superscript II RT και η αντίδραση παραγματοποιείται στους 42°C για 50 λεπτά. Διακόπτεται στους 70°C για 15 λεπτά και στο προϊόν προστίθεται 1μl ένζυμο RNase για 30 λεπτά στους 37°C.

Μετά την κατασκευή του cDNA, το προϊόν καθαρίζεται μέσω μιας στήλης SNAP. Έτσι, στο προϊόν του πρώτου βήματος προστίθενται 120μl διαλύματος NaI και το νέο διάλυμα μεταφέρεται στη στήλη SNAP και φυγοκεντρείται στις 13000 στροφές για 20 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια ακολουθούν 4 εκπλύσεις της στήλης με κρύο (4°C) διάλυμα έκπλυσης 1WASH Buffer και ακολούθως 3 εκπλύσεις με κρύο (4°C) διάλυμα αιθανόλης

70%. Το καθαρό πλέον cDNA εκλούεται από τη στήλη με 50μl προξεσταμένου (65°C) νερού με φυγοκέντρωση στις 13000 στροφές για 20 δευτερόλεπτα.

Στο καθαρό cDNA γίνεται επεξεργασία για τη δημιουργία τεχνητά ενός άκρου από την 3' περιοχή στην οποία δεν γνωρίζουμε την αλληλουχία που υπάρχει. Αναλυτικά, 6,5 μl νερού, 5μl 5Tailing Buffer, 2,5 μl dCTP 2,5mM και 10μl από το έκλουμα της στήλης αναμιγνύονται και επωάζονται για 3 λεπτά στους 94°C. Στη συνέχεια, προστίθεται 1μl ενζύμου TdT και η αντίδραση λαμβάνει χώρα στους 37°C για 10 λεπτά. Η δράση του ενζύμου διακόπτεται με εφαρμογή 65°C για 10 λεπτά.

Στο cDNA που έχει προκύψει είναι πλέον γνωστές οι αλληλουχίες και στα 2 άκρα του. Έτσι ακολουθεί η πρώτη PCR στην οποία χρησιμοποιούνται 31,5μl νερού, 5μl 10PCR Buffer, 3μl 25mM MgCl₂, 1μl μίγματος νουκλεοτιδίων dNTPs 10mM, 2μl εκκινητή GSP2, 2μl εκκινητή Abridged Anchor Primer και 5μl από το cDNA που κατασκευάστηκε στο προηγούμενο βήμα. Σε αυτό το διάλυμα προστίθεται και ένζυμο πολυμεράσης Platinum Taq 0,5μl και η αντίδραση τοποθετείται στη συσκευή της PCR. Το πρόγραμμα ξεκινά με 5 λεπτά στους 94°C για αποδιάταξη, ακολουθούν 35 κύκλοι πολλαπλασιασμού του προϊόντος με τους εκκινητές GSP2 και Abridged Anchor Primer στους 94°C για 1 λεπτό, στους 55°C για 1 λεπτό και 72°C για 2 λεπτά. Ο τελικός πολυμερισμός του προϊόντος γίνεται στους 72°C για 7 λεπτά. Το προϊόν της αντίδρασης ηλεκτροφορείται σε ζελέ αгарόζης 1,5%.

Είναι πολύ πιθανό όμως, από αυτή την πρώτη PCR το προϊόν είτε να μην είναι ορατό με την ηλεκτροφόρηση είτε να μην είναι απόλυτα σαφές. Έτσι, για να αυξηθεί η ειδικότητα του προϊόντος γίνεται και μια δεύτερη nested PCR με εσωτερικότερους primers. Για την εφαρμογή της nested PCR το προϊόν της προηγούμενης αντίδρασης αραιώνεται 1/100 ή ακόμη και 1/1000. Αναλυτικά, χρησιμοποιούνται 33,5μl νερού, 5μl 10PCR Buffer, 3μl 25mM MgCl₂, 1μl μίγματος νουκλεοτιδίων dNTPs 10mM, 2μl εκκινητή GSP3, 2μl εκκινητή AUAP και 5μl από το αραιωμένο προϊόν της προηγούμενης αντίδρασης. Σε αυτό το διάλυμα προστίθεται και ένζυμο πολυμεράσης Platinum Taq 0,5μl και η αντίδραση τοποθετείται στη συσκευή της PCR. Το πρόγραμμα ξεκινά με 5 λεπτά στους 94°C για αποδιάταξη, ακολουθούν 35 κύκλοι πολλαπλασιασμού του προϊόντος με τους εκκινητές GSP3 και AUAP στους 94°C για 1 λεπτό, στους 55°C για 1 λεπτό και 72°C για 2 λεπτά. Ο τελικός πολυμερισμός του προϊόντος γίνεται στους 72°C για 7 λεπτά. Το προϊόν της αντίδρασης ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αгарόζης 1,5%.

Οι ζώνες που εμφανίζονται στην ηλεκτροφόρηση κόβονται και καθαρίζονται όπως περιγράφηκε. Αυτά τώρα τα καθαρά προϊόντα για να αλληλουχοποιηθούν πρέπει να

κλωνοποιηθούν σε βακτήρια με τη χρήση κατάλληλου πλασμιδίου ως φορέα κλωνοποίησης. Οι αλληλουχίες που προκύπτουν συγκρίνονται με προγράμματα BLAST και ALIGN με τις αλληλουχίες που είναι καταχωρημένες στο διαδίκτυο. Με αυτό τον τρόπο καθίσταται εφικτή η ανάγνωση μιας γονιδιακής περιοχής που δεν ήταν ολόκληρη γνωστή.

Πίνακας VIII.12: Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια στην τεχνική 5' RACE

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
10PCR Buffer	INVITROGEN
25mM MgCl ₂	INVITROGEN
Μίγμα νουκλεοτιδίων dNTPs 10mM	INVITROGEN
0,1M DTT	INVITROGEN
Ένζυμο αντ. μεταγραφάσης Superscript II RT	INVITROGEN
Ένζυμο RNase	INVITROGEN
5Tailing Buffer	INVITROGEN
2,5mM dCTP	INVITROGEN
Ένζυμο TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase)	INVITROGEN
AAP (Abridged Anchor Primer)	INVITROGEN
AUAP (Abridged Universal Amplification Primer)	INVITROGEN
Νερό	INVITROGEN
GSP1 εκκινητής	ITE
GSP2 εκκινητής	ITE
GSP3 εκκινητής	ITE

Πίνακας VIII.13: Χρησιμοποιούμενοι εκκινητές (primers) στην τεχνική 5' RACE

Στάδια RACE	Αλληλουχία primer
Σχηματισμός cDNA	GSP1: 5'-AGTATGTCTTGCTCATCAAT-3'
PCR 1	GSP2: 5'-CATGCCCATGTTCGTGAAAGGT-3'

PCR 1	AAP: 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGGIIGGGIIGGGIIG-3'
PCR 2	GSP3: 5'-CATGCCCATGTTTCGTGAAAGGTCATGCAT-3'
PCR 2	AUAP: 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'

Η. Κλωνοποίηση

Για την αλληλουχοποίηση του προϊόντος από τη RACE είναι απαραίτητη η κλωνοποίηση του σε βακτήρια. Έτσι, 4μl από το πολλαπλασιασμένο τμήμα DNA που πρόκειται να αναλυθεί, αναμιγνύεται με 1μl πλασμιδίου pCRII-TOPO και επωάζονται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για να ανσυνδυαστούν. Τα βακτήρια *E.coli*, τα οποία πρόκειται να μετασχηματιστούν τοποθετούνται σε πάγο και 100μl αναμιγνύονται με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, όπου μένουν στον πάγο για 20 λεπτά. Στη συνέχεια, για 45 δευτερόλεπτα σοκάρονται στους 42°C και ξανατοποθετούνται στον πάγο για 5 λεπτά για να ολοκληρωθεί ο μετασχηματισμός. Έπειτα, στο διάλυμα προστίθενται 900μl shock medium και επωάζεται στους 37°C για 1 ώρα με ανάδευση. Το προϊόν καλλιεργείται σε τρυβλία τα οποία περιέχουν αντιβιοτικό αμπικιλίνη για την επιλογή των βακτηρίων που μετασχηματίστηκαν από τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια, για 1 μέρα σε κλίβανο στους 37°C. Την επόμενη μέρα τουλάχιστον 4-5 αποικίες από τα τρυβλία ανακαλλιεργούνται σε υγρές καλλιέργειες με 10 ml θρεπτικό υλικό και 10μl αντιβιοτικό (αμπικιλίνη) στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση για 10 ώρες. Οι υγρές αποικίες φυγοκεντρώνται για 15 λεπτά στις 15000 στροφές. Στο ίζημα, το οποίο αποτελείται από τα βακτήρια, θα γίνει απομόνωση του DNA με βάση το πρωτόκολλο της MACHERY-NAGEL.

Αναλυτικά, 250μl διαλύματος A1 επαναδιαλύουν το ίζημα των βακτηρίων. Στη συνέχεια, προστίθενται 5μl διαλύματος A2 και τα μικροσωληνάρια αναδεύονται ήρεμα 6-8 φορές και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Ύστερα, προστίθενται 300μl διαλύματος A3 και ακολουθεί ήρεμη ανάδευση 6-8 φορές. Τα μικροσωληνάρια φυγοκεντρώνται στις 11000 για 5 λεπτά ώστε το DNA να διαχωριστεί στο υπερκείμενο από τα κυτταρικά υπολείμματα, τα οποία θα μείνουν στο ίζημα. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε στήλη Nucleospin Plasmid column και φυγοκεντρείται στις 11000 στροφές για 1 λεπτό. Η μεμβράνη της στήλης εκπλένεται με 500μl προθερμασμένου (50°C)

διαλύματος ΑW και στη συνέχεια με 600μl διαλύματος Α4. ακολουθεί φυγοκέντρηση 2 φορές στις 11000 στροφές για 1 και 2 λεπτά κάθε φορά για την απομάκρυνση υπολειμμάτων που μπορεί να μολύνουν το τελικό προϊόν. Το πλασμιδιακό DNA εκλύεται με 35-50μl διαλύματος ΑΕ ύστερα από φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11000 στροφές. Εν συνεχεία, το πλασμιδιακό DNA ελέγχεται ότι πράγματι έχει ανασυνδυαστεί μετά από επώαση για 3 ώρες στους 37°C με ένζυμο περιοριστικής ενδονουκλεάσης όπως η EcoRI. Το κομμένο DNA ηλεκτροφορείται και τότε προχωρά για αλληλουχοποίηση.

Πίνακας VIII.14: Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια στον καθαρισμό πλασμιδιακού DNA

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
Διάλυμα Α1	MACHEREY-NAGEL
Διάλυμα Α2	MACHEREY-NAGEL
Διάλυμα Α3	MACHEREY-NAGEL
Διάλυμα έκπλυσης ΑW	MACHEREY-NAGEL
Διάλυμα Α4	MACHEREY-NAGEL
Διάλυμα έκλουσης ΑΕ	MACHEREY-NAGEL
Στήλες Nucleospin Plasmid Columns	MACHEREY-NAGEL
RNase A	MACHEREY-NAGEL

IX. Αποτελέσματα

Συνολικά, έχουν συλλεχθεί δείγματα από 125 ασθενείς. Η κυτταρογενετική ανάλυση σε 63 από αυτά έδειξε ανώμαλους καρυοτύπους, 29 ομαλούς και σε 33 δεν κατέστη δυνατή η καλλιέργειά τους. Σε 6 επιλεγμένα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές μοριακής κυτταρογενετικής όπως mFISH και mBAND, προκειμένου να αναδειχθούν και να αποσαφηνιστούν οι χωμοσωμικές ανωμαλίες που περιείχαν. Επιπλέον, σε 20 περιστατικά χονδρογενών όγκων (enchondρωμάτων, εξοστώσεων και χονδροσάρκωμάτων) εφαρμόστηκε η τεχνική CGH, προκειμένου να περιγραφούν οι ανωμαλίες που τα χαρακτηρίζουν σε επίπεδο γενωμικού DNA και ήταν επιτυχής σε 13, καθώς και σε ένα επιθηλιοειδές αιμαγγειοενδοθηλίωμα.

Ακόμη, σε 14 δείγματα λιποσαρκώματος και σε 10 δείγματα χονδροσαρκώματος έγινε μελέτη της έκφρασης γονιδίων που ενέχονται στην επιδιόρθωση του DNA. Ειδικότερα, μελετήθηκαν τα γονίδια *xrcc5*, *xrcc6*, *xrcc4*, *polm*, *pol la*, *rad52* τα οποία ανήκουν στους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς NHEJ και HR. Επιπρόσθετα, σε 12 λιποσαρκώματα, σε 5 σαρκώματα Ewing και σε 4 συνοβιοσαρκώματα έγινε εντοπισμός και χαρακτηρισμός των υβριδικών γονιδίων *FUS/CHOP*, *EWS/FLI* και *SYT/SSX* που τα χαρακτηρίζουν αντιστοίχως. Σε δύο επίσης περιστατικά συνοβιακού σαρκώματος στα οποία η κλασική μέθοδος προσδιορισμού των πιθανών υβριδικών γονιδίων με nested PCR δεν κατάφερε να εντοπίσει κανένα εκ των *SYT/SSX* και *SS18L1/SSX*, εφαρμόστηκε η τεχνική RACE. Αναλυτικά τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες.

1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Πίνακας Ι. Κυτταρογενετικά ευρήματα

α/α	α/ε	καρυότυπος	διάγνωση
1	4697	83-93,XXY,+X,-Y,-1,-3,-4,+7,+9,+i(9)(p10)x2,+10,+11,+12,+16,der(16)(16pter→16p11::1q25→1q21::16q13→cen→16p11::1q25→1qter)x2,-17,add(17)(q24),-18,-21,-22[cp65]/46,XY[35]	Ew
2	11197	47,XY,t(5;21)(p12;p12),t(15;20)(q14;q13),+mar[58]	ΜΛ
3	14297	46,XY,t(12;16)(q13.3;p11.2)[10]/46,XY[15]	ΜΛ
4	14797	50,XX,+2,+2,+6,+7[50]	Ew
5	15297	46,XY,add(2)(p16),del(7)(q11),del(10)(q22),der(12)(12pter→cen→12q13::?:10q22→10qter),der(16)(q24::?:7q11→7qter)[8]/46,XY[7]	Λ
6	17697	48,XY,+8,i(7)(q10),t(12;16)(q13;p11)[8]	ΜΛ
7	17797	58-65,XXY,add(1)(q22)x2,del(3)(p13),der(X;3)(Xpter→Xq28::?:3cen→3qter),-4,add(4),-5,-5,-6,i(11)(q10),der(1;11)(q31;p14),der(11)(?:11p14→11q24::22q12::22q13::?),-12,der(12;13)(q10;q10),-13,add(13)(q33),ins(14;?)(q12;?),-15,-16,-16,add(17)(p13)x3,-18,-18,-19,-19,-20,-21,-21,-22,der(22)t(11;22)(q24;q12),+der(?)t(?;5)(?:q12),+5-12mar[12]/110-130 idemx2[4]/46,XY[20]	Ew
8	18097	?86-?94,XXYY,del(1)(q32),add(1)(p31),-2,-2,-3,-4,-4,del(4)(p15),add(7)(p22),-8,-8,-9,-9,-10,del(12)(q12),-13,-17,-17,inc[4]	Oσ
9	17997	46,XY,t(16;18)(p13;q21)[4]/46,XY[15]	Λμ
10	18897	46,XY,del(1)(q24q41),der(1)(q24→q41::p36→qter)[4]/46,XY[15]	I
11	22897	48,XX,+8,+8,t(11;22)(q24;q12),del(16)(q12)[17]/46,XX[13]	Ew
12	22997	85-89,XXXX,add(2)(q22),der(4)(pter→q27::?:11q21→11qter)x2,-5,-5,-6,-6,del(6)(p12)x2,-10,+der(11)(11pter→11q14.3::?:12q21.2→12qter)x2,der(11),del(11)(p11.2),add(11)(q14)x2,-13,-13,-14,add(16)(q24),-17,-19,-19,-21,-21,-22,-22[39]/46,XX[5]	X
13	24797	46,XY,del(1)(q24),t(3;12)(q27;q13)[40]/46,XY[100]	Λ
14	24697	46,XY[12]	X
15	25097	58-67,XXY,-1,-3,ins(3;?)(p2?),-4,-4,-4,-5,-6,add(9)(p13),-11,+12,-13,-13,-14,-15,+16,-17,+add(18)(q21),-19,add(19)(q13)x2,-22,+mar1,+mar2+mar3+mar4,+mar5,+mar6,+mar7,[cp40]/46,XY[4]	X
16	26397	46,XY[15]	Λ
17	26597	72-76,XXY,+1,+2,-3,der(3)(p26),del(3)(q13),-5,add(5)(q22),+7,+11,-14,add(16)(q21),-17,der(17)(8qter::?:17p12→17pter),t(19;22)(q13;p13),+der(20)t(3;20)(p21;q13)x2,+der(?)t(?;3)(?:q13),+12mar,dm[cp20]	Oσ
18	26897	85-97,XX,-Y,-Y,+2,-4,-5,-6,-6,+8,add(9)(p12)x2,+der(9)t(9;14)(p11;q11)x2,add(10)(p11)x2,-14,-14,-16,add(17)(p12)x2,+19,-20,-22,+1-3mar[cp3]/154-180idemx2[cp6]/46,XY,inv(9)(p13;q13)[45]	X
19	0798	41-48,XY,der(X)t(X;10)(q23;p21),t(3;20)(p21;q13),-4,-4,del(6)(q25),+8,-10,-10,t(11;22)(24;q12),add(11)(p15),del(12)(p12),+der(12)add(12)(p11),add(12)(q21),del(16)(q22),-19,+2-5mar[cp7]/79-87,idemx2[cp43]/46,XY[3]	Ew

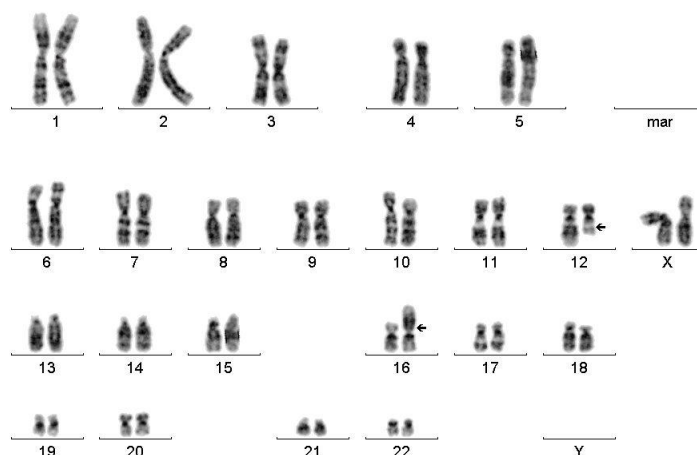
20	1198	47,XY,+7 [5]/46,XY[10]	Ew
21	3998	40-43,XX,del(1)(p21),add(1)(p36),ins(2;?)(q31;?),inv(7)(q11.2-q31.3),-10,t(11;22)(q24;q12),der(11)t(11;18)(p12;q12),-18,-19 [cp50] /46,XX[8]	Ew
22	5498	46,XY[12]	Eξ
23	6898	46,XY,add(22)(p13)[5]/46,XY[12]	Eγχ
24	7298	46,XY,inv(3)(p13;p22)[7]/46,XY	ΠΛ
25	9098	45-46,XX,del(3)(q21)[cp3]/45-46,XX,del(13)(q31)[cp2]/ 46,XX,del(7)(q22)[cp2] /45,XX,+mar[cp2]/46,XX[3]	K.I.I
26	9698	46,XX,t(1;15)(p21;q21)[12]/46XX[55]	Γγ O
27	10898	46,XY[12]	Eξ- X
28	11098	46,XY[20]	Eγχ
29	98188	47,XX,del(1)(p31p35),+2,[16]/46,XX[17]	Ew grIII
30	19398	67,X,-X,-Y,-1,+der(2)t(2;5)(p15;p13), der(3) (1qter→1q25::?:3p22->cen->3qter),-4,add(?4)(q21),-5,-6,+7, der(9;15) (q10;q10)x2or der(9)t(9;15)(p21;q14)x2, der(11) (?:11p15→11p13::11p11→ cen→11q22::3p12->3pter),+12,-13,-14,-15,+16,-17, add(18)(q21), der(19)t(?4;19) (q28;q13), hsr(19)(q13),+20,+21,-22,+r,+2mar	X grI
31	21698	42-47,XY,der(5)(5qter→5p15::hsr::?), der(6) (6pter→6p25::?:hsr), tas(14;16) (p13;p13),+r,+mar[cp30]	Eξ οσ grII
32	22698	46,XX[10]	IvoΛ
33	23798	42,XY,t(X;18)(p11;q11),add(1)(p36),r(3)(cen→p25::?:q28→cen)t(4;9)(q34;q13),der(10)(10pter→10q22::?22q11→22qter::?),add(12)(p13),-14,r(19),-20,-21,-22,-22,+mar[5]/43,idem,+20[5] / 46,XY[3]	Σ grIII
34	23898	42-52,XY,add(11)(q13),+2-4r,+1-4mar[cp13]/46-52,XY,add(11)(q14),+1-3r,+1-2mar [cp13]/93-104,XXYY, add(11)(q13),add(11)(q14),+3-6r,+2-4mar[cp16]/46,XY[2]	Επιθ.αι μαγ
35	24198	46,XY[20]	K.I.I
36	26598	36-38,?,der(X),dic(5;?)(q31;?),inv(16)(q?),add(18p11)inc[6]/58-78, idemx2,inc[5]	Oσ
37	27198	49,XX,der(4)t(1;4)(q12;q35),+6,+11,+12,+18, add(22)(p11) [cp25] /46,XX [10]	PNET
38	27398	46,XY[8]	Eξ
39	27698	55-67,XXY,-1,-1,der(1)t(1;3)(p36;p21),add(3)(p13),-4,add(5)(q31), add(6)(q?24),-7,-7,-8, i(8)(p10),-10,-11,-12,-13,-13,-14,-14,-15,-15,der (16)add(16)(p13)del(16)(q22),-17,-17,-18,-19,add(19)(q13),-20,-21,-22,+1-8mar,+1-4r[cp12]/110-?124,idemx2,add(3) (q27),der(5)t(3;5)(p13;p14),add(6)(q?14),add(8)(q?12)[cp10]/150, idemx4[cp3]	Oσ
40	8999	66-72,XX,-X,-1,-6,+7,+8,-9,-9,-13,-14,+15,del(16)(q12),add(17)(q25)x2,der(17) t(1;17)(q12;q25),-18,+mar[cp17] /120-140, idemx2[cp5]	Χov.οσ
41	19299	43-45,XX,t(X;18)(p11;q11),der(19)t(19;?)(p13;?),t(?;22)(?:q11),-22 [32] /46,XX[8]	Σ
42	28399	46,XY,inv(1) (p13q12)[7]	K
43	28499	47,XY,+mar [5]/46,XY[7]	Ew
44	1700	45-46,XY,t(3;17)(q21~22;q21),-12,+mar[4]/ 46,XY,del(6)(q21) [cp2]/ 46-47,XY,add(5)(q34)[cp2]/46,XY[2]	Δεσμ. όγκος
45	6600	46,XY[25]	X
46	15000	46,XX[41]	Av.K.
47	2101	47,XX,+r[2]/46,XX[50]	Av.K.
48	3303	46,XY,+8,t(11;22)(q24;q12),add(13)(q12),der(16)t(16;17)(q11;q12),-17[7] /46,XY[40]	Ew
49	5903	45-46,XY,del(3)(q21),add(4)(q34),t(6;13)(q16;q31),t(7;9)(q11;q34),t(12;19) (q13;p13),add(16)(p13)[6]/46,XY[3]	Σ
50	6003	46,XX[14]	Λ
51	6103	46,XY,inv(1)(p13q12)c[50]	K
52	6303	46,XX[39]	Oσ M

53	7603	45,X,-X[3]/46,XX[57]	Οσ Μ
54	7903	53,XY,+X,+5,+6,+7,+11,+12,+20[4]/54,idem,+mar[5]	Ε
55	8203	47,XY,+7[8]/46-47,XY,del(11)(p11)[2]/46,XY[130]	X Gr I
56	9303	46,XY[30]	Av.K
57	9403	46,XX[10]	K
58	0404	46,XX [15]	K.I.I
59	2804	46,XX[20]	Γγ Ο
60	3504	46,XX[[25]	Εγγ
61	9104	54,XX,t(2;18)(q13;q22),t(12;16)(q13;p12),+11,+17,+20,+20,+22,+22[9]	ΜΛ
62	20204	46,XX[10]	Λ
63	21604	46,XY[15]	K.I.I
64	21804	45,XX,der(1;7)(q10;q10),-7[21]/46,XX[95]	Λ
65	21904	46,XY,t(7;8)(q22-31;q24)[13]/46,XY[46]	Λ
66	22004	46,XY[35]	Καλ.I.I
67	28904	46,XX,t(2;12)(q14;q14)[18]/46,XX[30]	Λ
68	2005	46,XX,add(16)(q24)[2]/46,XX[25]	IvoΛ
69	2205	46,XY[30]	K
70	4805	42-46,XX, t(1;9)(q12;p12),del(3)(p14),add(5)(q23),-6,-12,-17,-18,-19[cp20]/46,XX[25]	X Gr II
71	7505	37-45,XY,-3,-5,-8,-10,-12,-12,-17,-20[cp14]	Ενδ αιμαγ
72	7805	38-44,XX,-3,-16[cp7]	Γγ. Ο
73	10905	46,XX[10]	Γγ. Ο
74	11205	45,XX,-1[3],46,XX[14]	Ενδ Λ
75	13705	46,XY[12]	P grIII
76	14105	46,XY,del(3)(q23),add(13)(q33),ins(16,?)(q22;?)[5]/46,XY[10]	Σ
77	14505	46,XY,t(1;14)(q25;q31)[25]/46,XY[10]	ΣX → X Gr I
78	14605	46,XY,add(X)(p11),+8,add(15)(q14-15),add(18)(q12),-21[10]/46,XY[15]	Σ
79	15505	46,XX[12]	Γγ. Ο
80	15805	46,XX,t(12;16)(q13;p11)[20]/46,XX[17]	ΜΛ
81	00306	46,XX,add(10)(q26),add(12)(q13),-16,+mar[20]/46,XX	ΜΛ
82	00406	46,XY,t(12;16)(q13;p11)[15]/46,XY[20]	ΜΛ
83	00906	46,XY[8]	Εγγ
84	1106	46,XY[19]	Αιμ
85	4306	46,XY,t(12;16)(q13;p11)[5]/46,XY[12]	ΜΛ
86	8906	46,XY,t(7;12)(q35;q21)[7]/46,XY[16]	Λ
87	15306	46,XY,ins(1;12)(q31;q24q14)[8]/46,XY[15]	ΑτΛ
88	17906	46,XY[9]	ΜΛ
89	18706	46,XY[22]	Λμ
90	12107	46,XX[23]	Εγγ
91	13107	45,XY,-1,t(1;15)(q22-23;q23-24)[3]/46,XY[10]	K.I.I grII
92	25307	46,XY,der(16)t(1;16)(q12;q11),t(12;16)(q13;p11)[8]/46,XY[12]	ΜΛ

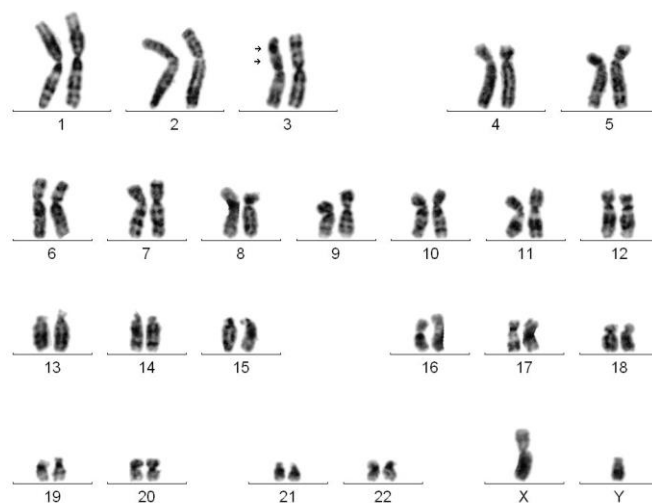
α/α: αύξων αριθμός, **α/ε:** αριθμός εργαστηρίου

Εw: Σάρκωμα Ewing , **ΜΛ:** Μυξοειδές Λιποσάρκωμα , **Λ:** Λίποωμα, **Κ:** Κύστη, **Οσ:** Οστεοσάρκωμα, **Λμ:** Λειομύωμα, **K.I.I:** Κακόηθες ινώδες ιστιοκύττωμα,

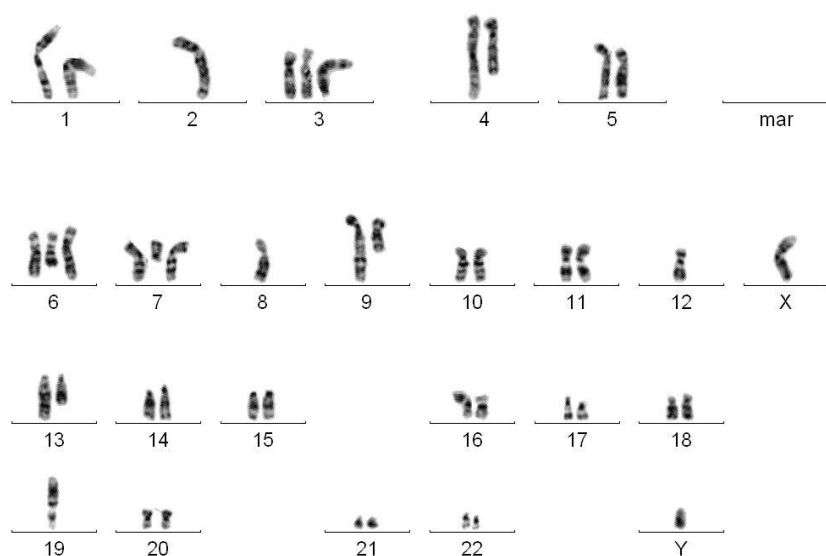
Εγχ: Εγγόνδρωμα, **Αιμ:** αιμαγγείωμα, **Επιθ αιμ:** επιθηλιοειδές αιμαγγειοενδοθηλίωμα, **Σ.Χ:** Συνοβιακή χονδρομάτωση, **Χ:** Χονδροςάρκωμα, **Σ:** Συνοβιοσάρκωμα, **Ρ:** Ραβδομυοσάρκωμα, **Γιγ Ο:** Γιγαντοκυτταρικός όγκος, **Ξ:** Ξάνθωμα, **Εξ:** Εξόστωση, **Οσ Μ:** Οστεοποιός μυοσίτιδα, **Κλ Ι.Ι:** καλόηθες ινώδες ιστοκύτταωμα, **Ατ Λ:** άτυπο λίπωμα, **Ενδ αιμ:** ενδομυϊκό αιμαγγείωμα, **Αν Κ:** ανευρυσματική κύστη



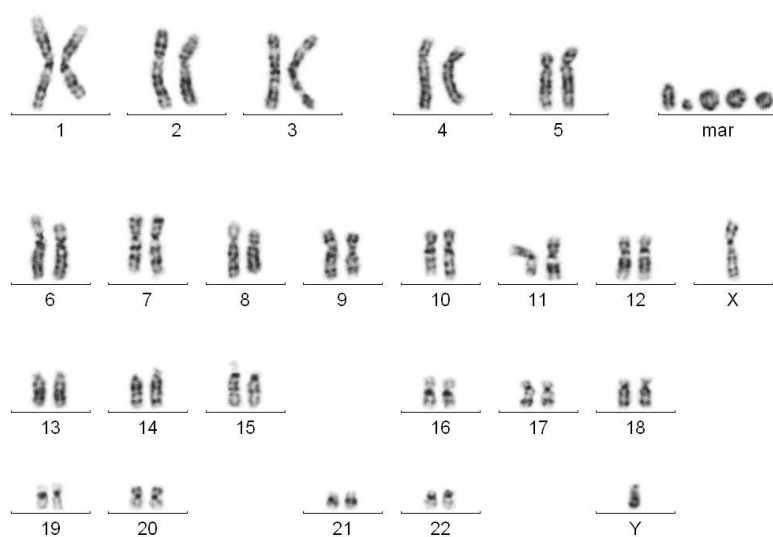
Εικόνα IX.1 : Χαρακτηριστικό καρυόγραμμα λιποσαρκώματος με τη μετάθεση 46,XX,t(12;16)(q13;p11) στο περιστατικό 15805, τα βέλη δείχνουν τα σημεία θραύσης των χρωμοσωμάτων 12 και 16.



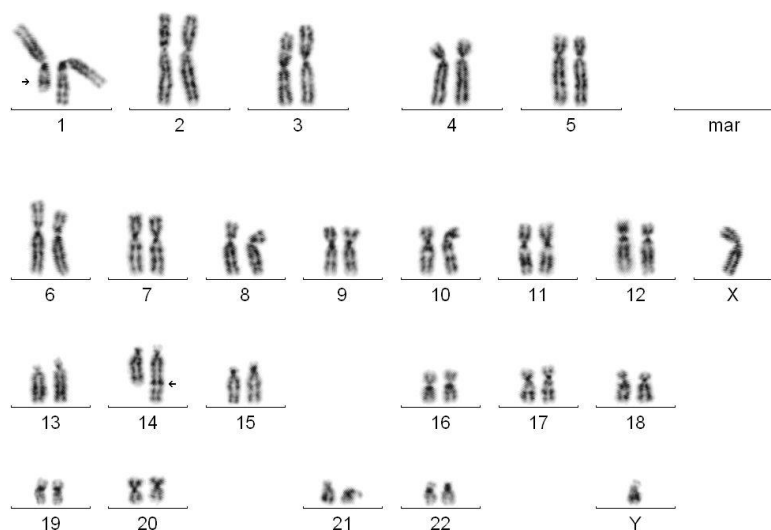
Εικόνα IX.2 : Καρυόγραμμα πολύμορφου λιποσαρκώματος, περιστατικό 7298, με την ανωμαλία inv(3)(p13;p22), τα βέλη δείχνουν τα σημεία θραύσης στο χρωμόσωμα 3.



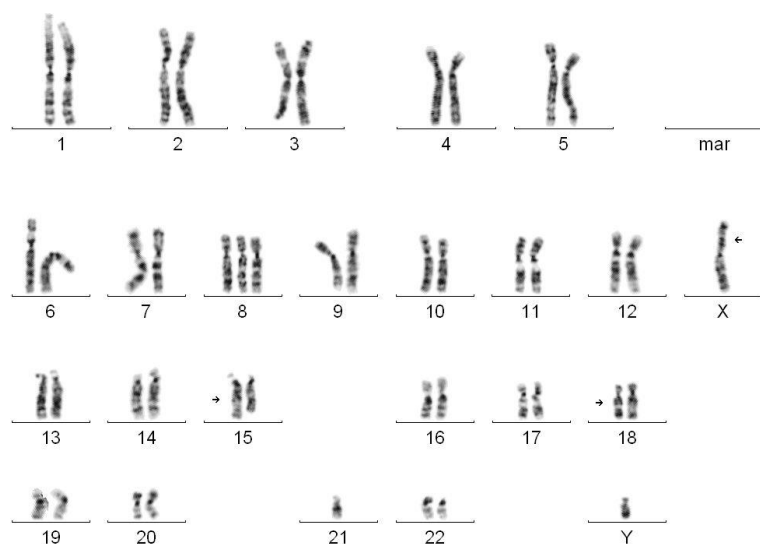
Εικόνα IX. 3: Πολύπλοκο καρνόγραμμα συνοβιακού σαρκώματος, περιστατικό 5903.



Εικόνα IX.4: Καρνόγραμμα επιθηλιοειδούς αιμαγγειοενδοθηλιώματος, περιστατικό 23898, με δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες, δακτυλιοειδή χρωμοσώματα και χρωμοσώματα markers.



Εικόνα IX.5 : Καρυόγραμμα συνοβιακής χονδρομάτωσης που εξελίχθηκε σε χονδροσάρκωμα gr I (περιστατικό 14505), με τη χρωμοσωμική μετάθεση $t(1;14)$, τα βέλη δείχνουν τα σημεία θραύσης των χρωμοσωμάτων.



Εικόνα IX.6 : Καρυόγραμμα συνοβιακού σαρκώματος με τη μετάθεση $t(X;15;18)$, τρισωμία του χρωμοσώματος 8 και μονοσωμία του 21, στο περιστατικό 14605, τα βέλη δείχνουν τα σημεία θραύσης των χρωμοσωμάτων.

2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

Πίνακας II. Καρυότυποι με απροσδιόριστες ανακατατάξεις

α/α	α/ε	Καρυότυπος	Διάγνωση
1	23898	42-52,XY,add(11)(q13),+2-4r,+1-4mar[cp13]/46-52,XY, add(11)(q14),+1-3r,+1-2mar[cp13]/93-104,XXYY, add(11)(q13),add(11)(q14),+3-6r, +2-4mar[cp16]/46,XY[2]	Επιθηλιοειδές αιμαγγειοενδοθηλίωμα
2	14505	46,XY,t(1;14)(q25;q31)[25]/46,XY[10]	Συνοβιακή χονδρομάτωση → Χονδροσάρκωμα GrI
3	4805	42-46,XX, t(1;9)(q12;p12),del(3)(p14),add(5)(q23),-6,-12,-17,-18,-19[cp20]/ 46,XX[25]	Χονδροσάρκωμα GrI
4	14605	46,XY,add(X)(p11),+8,add(15)(q14-15),add(18)(q12),-21[10]/46,XY[15]	Συνοβιοσάρκωμα
5	0306	46,XX,add(10)(q26),add(12)(q13),-16,+mar[20]/46,XX	Μυξοειδές λιποσάρκωμα

α/α: αύξων αριθμός, **α/ε:** αριθμός εργαστηρίου

Πίνακας III. Χρωμοσωμικές ανακατατάξεις πριν και μετά την εφαρμογή του FISH

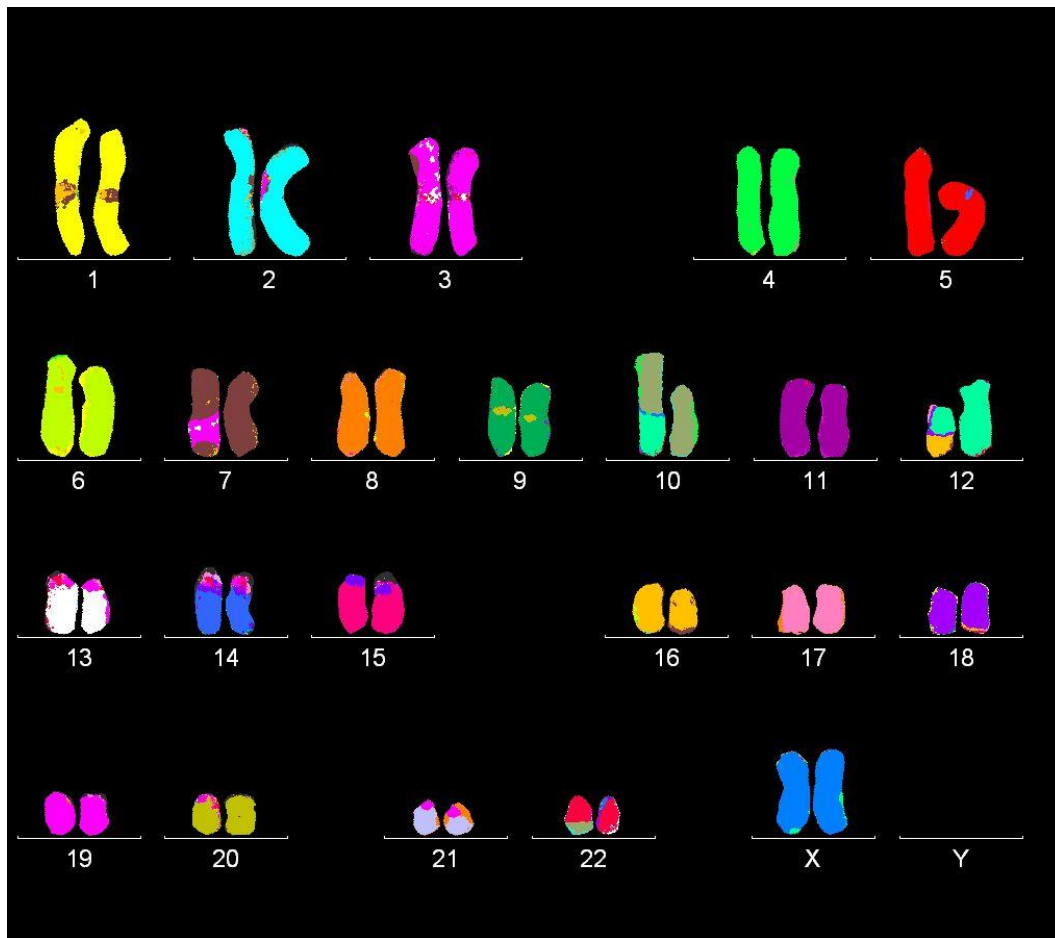
α/α	α/ε	Κυτταρογενετική	FISH	Διάγνωση
1	23898	add(11)(q13), add(11)(q14) r mar	rev ish enh (11q13-q14), dim(11q21-qter) amp(12q12-q13, 12q14-q21) amp(12q12-q13, 12q14-q21)	Επιθ. Αιμαγγειοενδ.
2	14505	t(1;14)(q25;q31)	t(1;14)(q23.1~24;q24.1~3)	Συνοβ. Χονδρομ. → Χονδροσα GrI
3	48005	del(3)(p14),add(5)(q23),-6,-17	der(3)(3qter→3p12::1p12→1pter), t(4;17)(p11;q11), t(5;6)(q23;q14-16)	Χονδροσα GrI
4	14605	add(X)(p11),add(15)(q14-15),add(18)(q12)	t(X;15;18) (p11;q14-15;q11)	Συνοβιοσα
5	0306	add(10)(q26),add(12)(q13),-16,+mar	t(10;12;16;22)(q26;q13;p11;q13)	Μυξ.λιποσα

α/α: αύξων αριθμός, **α/ε:** αριθμός εργαστηρίου

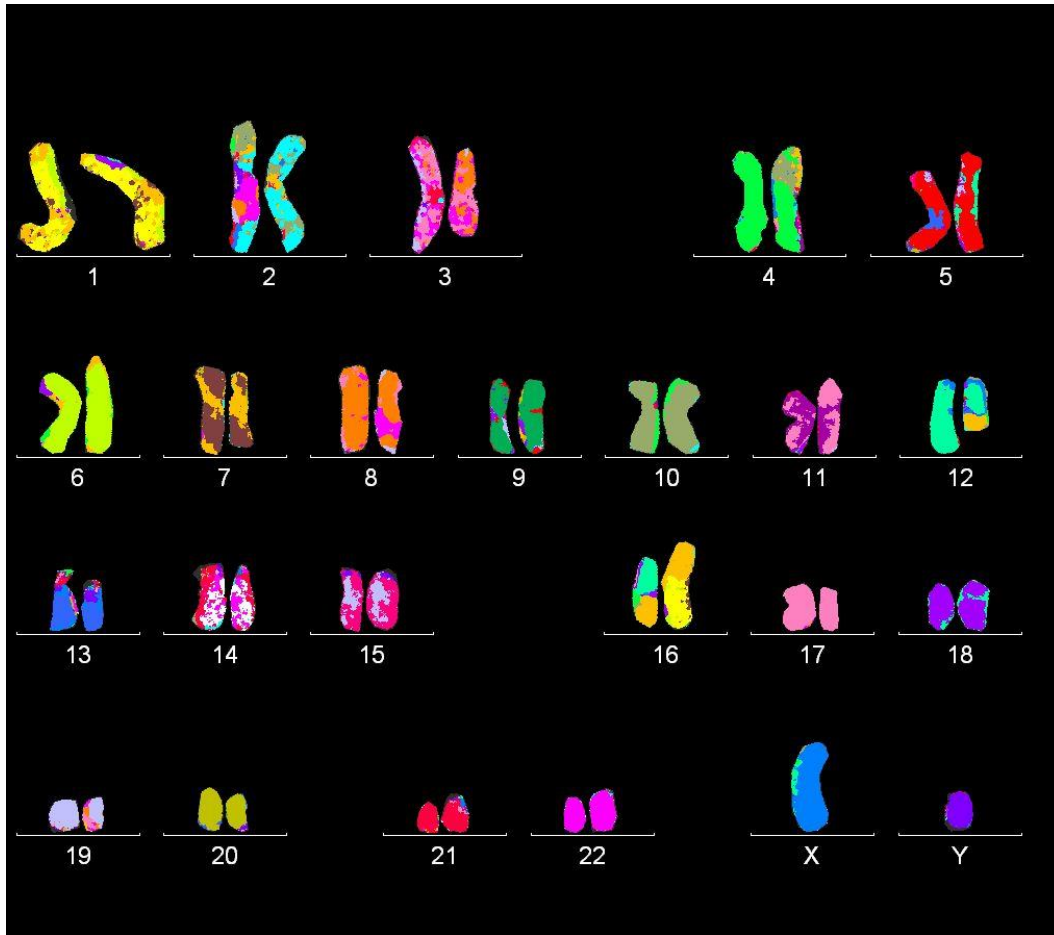
Πίνακας IV. Καρυότυποι με προσδιορισμένες ανακατατάξεις

α/α	α/ε	Καρυότυπος	Διάγνωση
1	23898	42-52,XY,add(11).rev ish enh(11)(q13-q14),+2-4r.amp (12q12-q13, 12q14-q21),+1-4mar. amp (12q12-q13, 12q14-q21) [cp13]/46-52,XY, add(11).rev ish enh(11)(q13-q14),+1-3r. amp (12q12-q13, 12q14-q21),+1-2mar. amp (12q12-q13, 12q14-q21) [cp13]/93-104,XXYY, idemx2[cp16]/46,XY[2]	Επιθ. Αιμαγγειοενδ.
2	14505	46,XY,t(1;14)(q23.1~24;q24.1~3)[25]/46,XY[10]	Συνοβ.χονδρομ. →Χονδροσα GrI
3	4805	42-46,XX, t(1;9)(q12;p12), der(3)(3pter→3p12::1p12→1pter), t(4;17)(p11;q11), t(5;6)(q23;q14-16),-6,-17,-18,-19 [cp20]/46,XX[25]	Χονδροσάρκωμα GrI
4	14605	46,XY,t(X;15;18)(p11;q14-15;q11), +8,-21[10]/46,XY[15]	Συνοβιοσα
5	0306	46,XX,t(10;12;16;22)(q26;q13;p11;q13) [20]/46,XX[2]	Μυξ.λιποσα

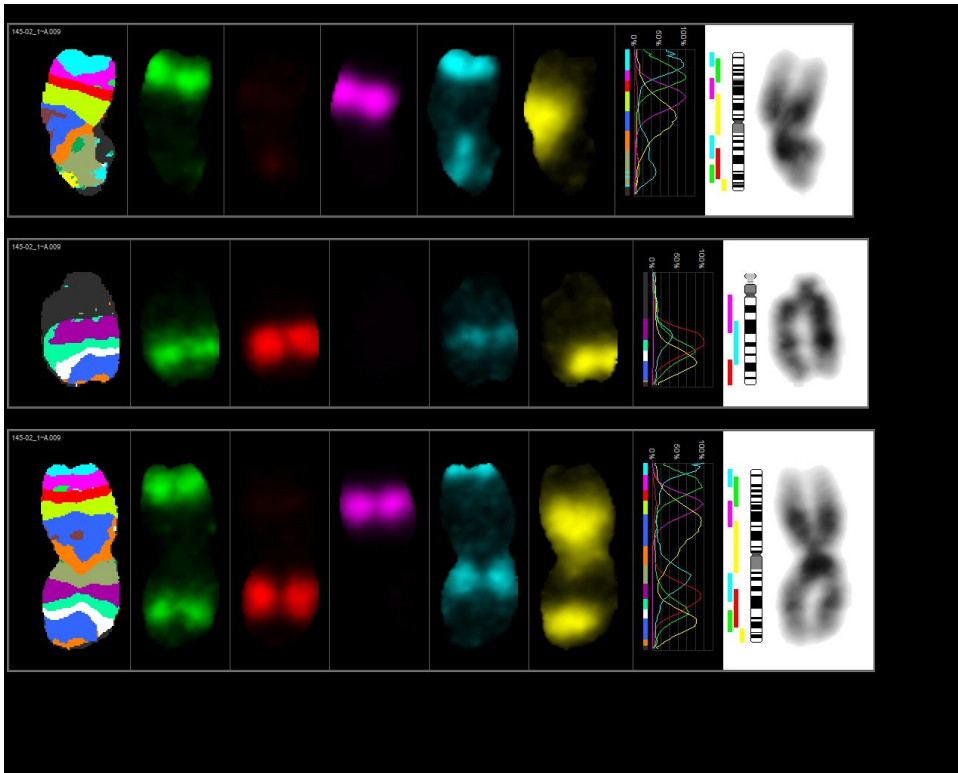
α/α: αύξων αριθμός, **α/ε:** αριθμός εργαστηρίου



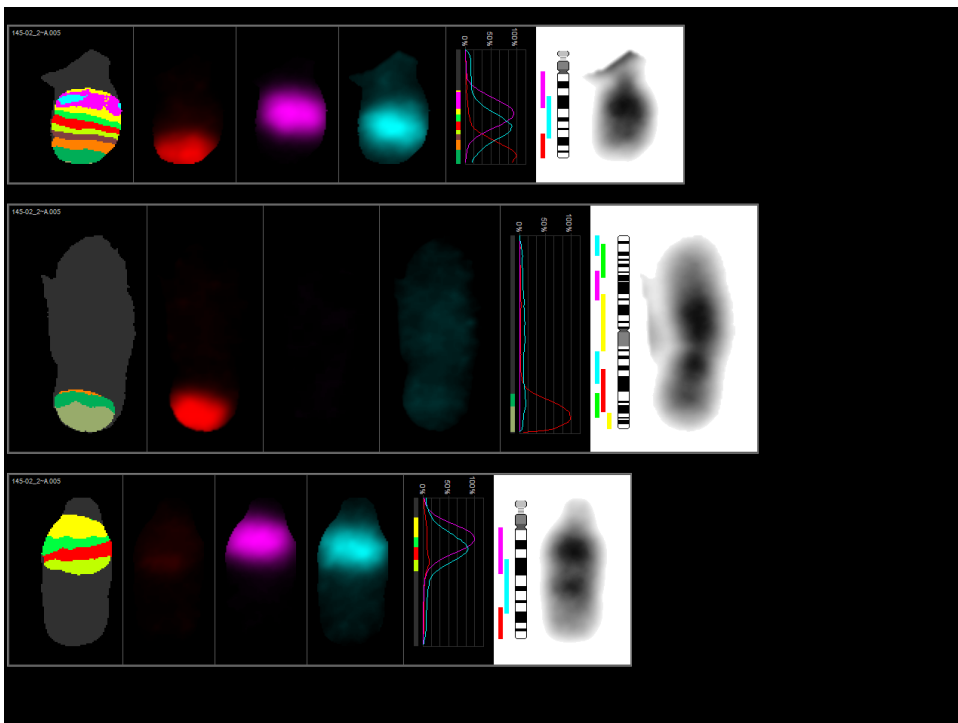
Εικόνα IX.7 : Καρυόγραμμα μυξοειδούς λιποσαρκώματος με την τεχνική mFISH (περιστατικό 0306), στο οποίο κάθε χρωμόσωμα είναι βαμμένο με διαφορετικό χρώμα και στο οποίο εντοπίζεται η μετάθεση t(10;12;16;22).



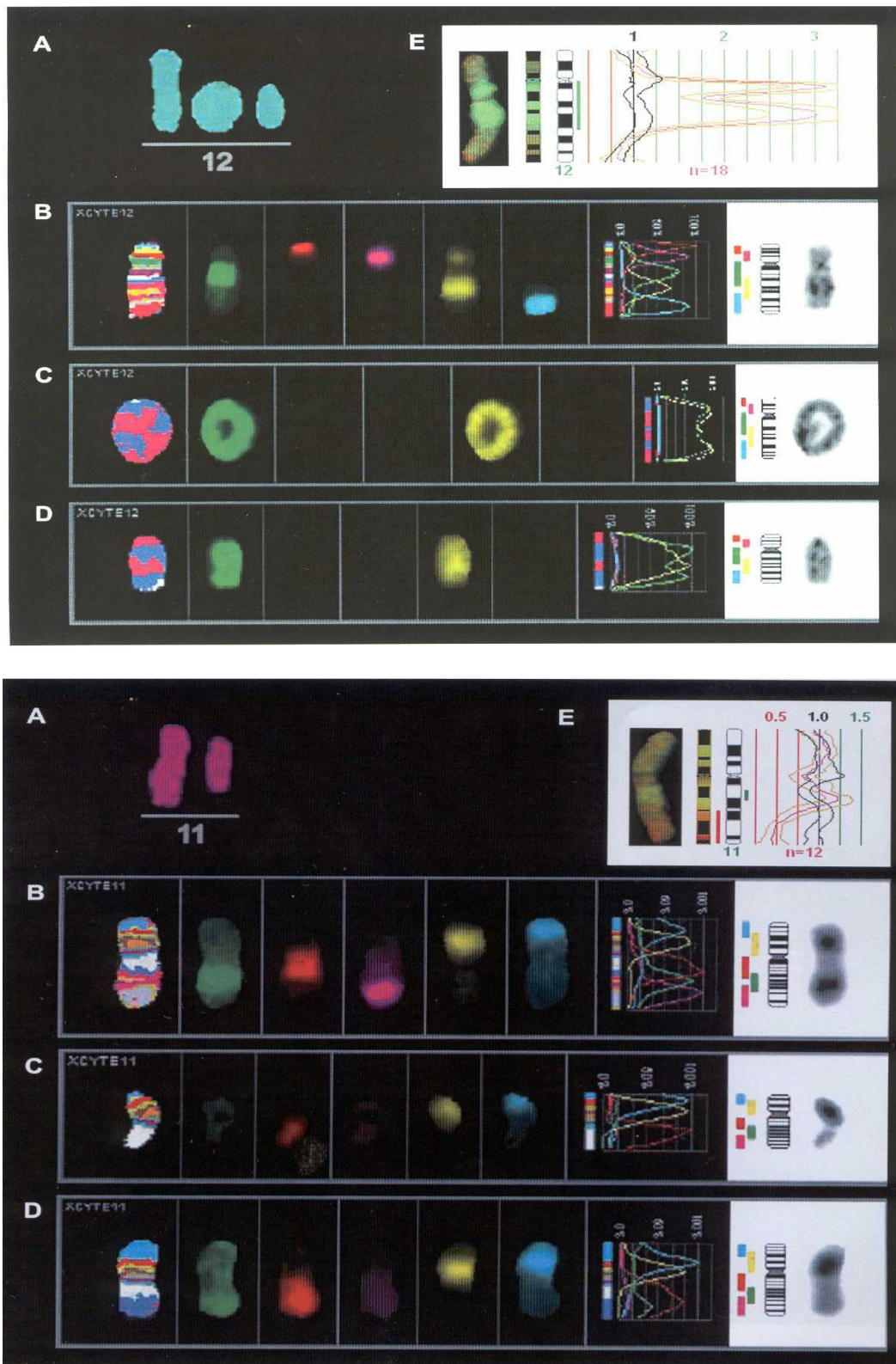
Εικόνα IX.8 : Καρυόγραμμα μυξοειδούς λιποσαρκώματος (περιστατικό 25307) με την τεχνική mFISH, στο οποίο αναδεικνύονται τόσο η $t(12;16)$, όσο και η ανωμαλία $der(16)t(1;16)$.



Εικόνα IX.9 : mBAND ανάλυση στα χρωμοσώματα 1 και 14, που ενέχονται στην $t(1;14)$ και στο φυσιολογικό χρωμόσωμα 1, περιστατικό 14505.



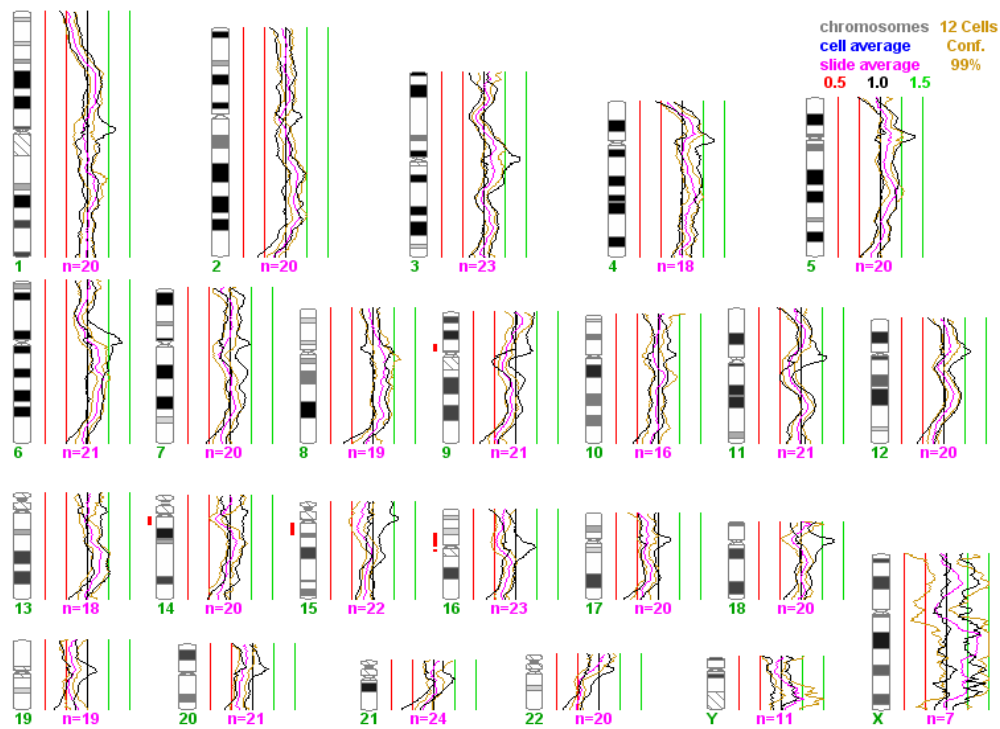
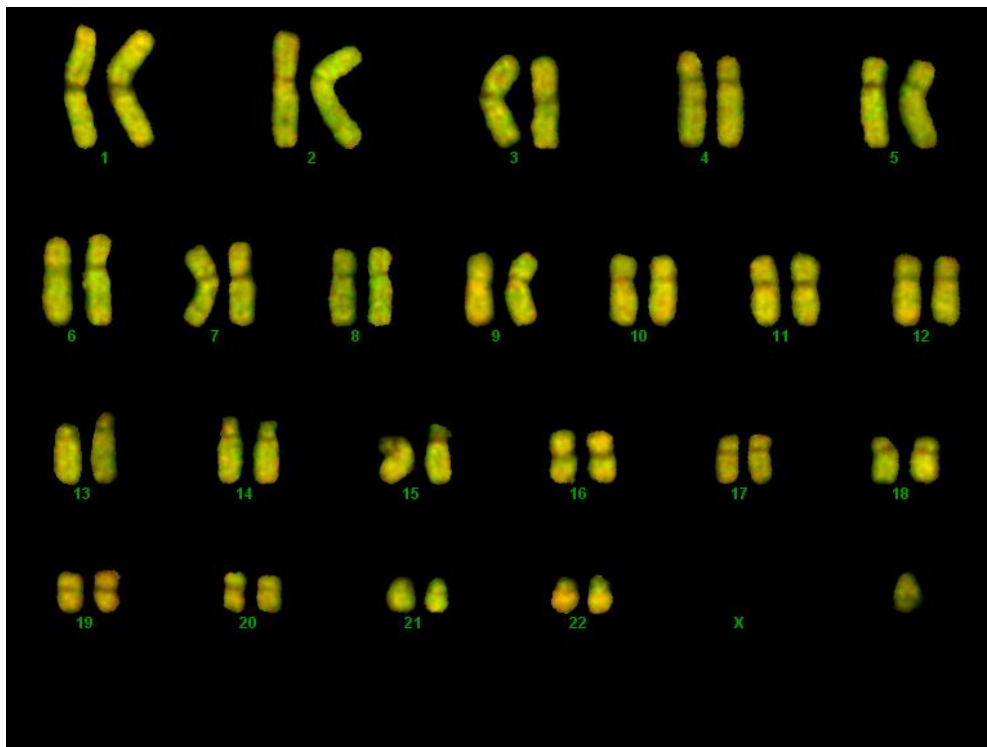
Εικόνα IX.10 : mBAND ανάλυση στο φυσιολογικό χρωμόσωμα 14, και στα χρωμοσώματα 1 και 14 που ενέχονται στην $t(1;14)$, περιστατικό 14505.



Εικόνα IX.11 και IX.12: συνδυασμός τεχνικών mFISH, mBAND και CGH σε ένα επιθηλιοειδές αιμαγγειοενδοθηλίωμα (περιστατικό 23898). Στην εικόνα 11 αναλύονται χρωμοσώματα ring και markers, τα οποία περιέχουν τμήματα του χρωμοσώματος 12 με τις τεχνικές που αναφέρθηκαν. Στην εικόνα 12 αναλύονται χρωμοσώματα ring και markers, τα οποία περιέχουν τμήματα του χρωμοσώματος 11 με τις τεχνικές που αναφέρθηκαν.

Πίνακας V. Αποτελέσματα CGH ανάλυσης

α/α	α/ε	Αποτελέσματα	Διάγνωση
1	24697	46,XY	Χονδροσάρκωμα GrI
2	25097	46,XY	Χονδροσάρκωμα GrI
3	3898	46,XX	Χονδροσάρκωμα GrI
4	10998	46,XY	Χονδροσάρκωμα GrI
5	19198	46,XX	Χονδροσάρκωμα GrI
6	23898	Rev ish enh(11q13~q14,12q11~q21),dim(11q21~qter), amp(12q12~q13,12q14~q21)	Επιθηλιοειδές αιμαγγειοενδοθηλίωμα
7	2200	46,XX	Χονδροσάρκωμα από εξοστώσεις
8	0601	46,XX	Χονδροσάρκωμα GrI
9	3801	Rev ish dim (16p11-12)	Χονδροσάρκωμα GrI
10	4401	Rev ish enh (21q22) amp(21q22)	Οστεοχόνδρωμα/ Εξόστωση
11	2002	46,XX	Εγχόνδρωμα
12	4902	46,XY	Οστεοχόνδρωμα/ Εξόστωση
13	4602	Rev ish enh (16p11-p13, 19p13-q13.2), amp (16p11-p13, 19p13,19q13.1-q13.2)	Οστεοχόνδρωμα/ Εξόστωση
14	4404	Rev ish enh (1q32, 3q24-q26, 4q22-q32, 7q22-q31, 8q22-q23) amp(4q22-q32, 7q22- q31, 8q22-q23, 12q15-q21) dim(16p13-p11, 22q11-q13)	Χονδροσάρκωμα GrIII

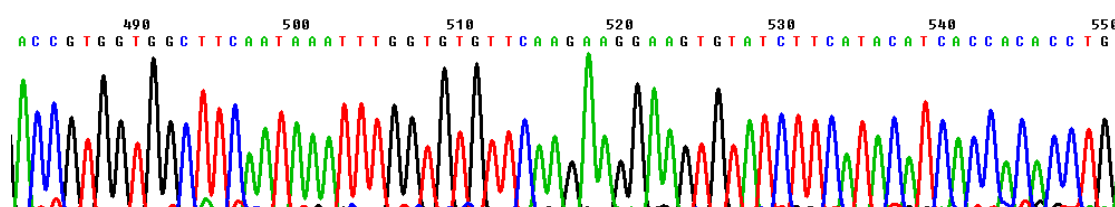


Εικόνα IX.13 και IX.14: CGH ανάλυση χονδροσαρκώματος gr I (περιστατικό 3801). Στην εικόνα 13 φαίνεται ένα χαρακτηριστικό καρνόγραμμα υβριδισμού. Στην εικόνα 14 αναπαριστάται το γενετικό προφίλ της περίσσειας και των ελλείψεων γενετικού υλικού στα 24 χρωμοσώματα.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Πίνακας VI. Υβριδικά γονίδια

α/α	α/ε	Υβριδικά γονίδια	Διάγνωση
1	67099	<i>FUS/CHOP</i>	Μυξοειδές λιποσάρκωμα
2	14006	<i>FUS/CHOP</i>	Μυξοειδές λιποσάρκωμα
3	17906	<i>FUS/CHOP</i>	Μυξοειδές λιποσάρκωμα
4	269099	<i>FUS/CHOP</i>	Μυξοειδές λιποσάρκωμα
5	87001	-	Μυξοειδές λιποσάρκωμα
6	15805	<i>FUS/CHOP</i>	Μυξοειδές λιποσάρκωμα
7	03006	<i>FUS/CHOP</i>	Μυξοειδές λιποσάρκωμα
8	43006	<i>FUS/CHOP</i>	Μυξοειδές λιποσάρκωμα
9	25307	<i>FUS/CHOP</i>	Μυξοειδές λιποσάρκωμα
10	91004	<i>FUS/CHOP</i>	Μυξοειδές λιποσάρκωμα
11	35408	<i>FUS/CHOP</i>	Μυξοειδές λιποσάρκωμα
12	3700	<i>FUS/CHOP</i>	Μυξοειδές λιποσάρκωμα
13	9901	<i>EWS/FLI</i>	Σάρκωμα Ewing
14	5703	<i>EWS/FLI</i>	Σάρκωμα Ewing
15	3303	<i>EWS/FLI</i>	Σάρκωμα Ewing
16	1803	<i>EWS/FLI</i>	Σάρκωμα Ewing
17	4507	<i>EWS/FLI</i>	Σάρκωμα Ewing
18	23099	<i>SYT/SSX1</i>	Συνοβιακό σάρκωμα
19	23798	<i>SYT/SSX1</i>	Συνοβιακό σάρκωμα
20	5903	-	Συνοβιακό σάρκωμα
21	14105	-	Συνοβιακό σάρκωμα
22	14605	<i>SYT/SSX1</i>	Συνοβιακό σάρκωμα



Εικόνα IX.15 : Χρωματογράφημα από την αλληλούχιση μυξοειδούς λιποσαρκώματος (περιστατικό 7-0306) για το υβριδικό γονίδιο *FUS/CHOP*. Στο νουκλεοτίδιο 509 διακόπτεται το εξώνιο7 του γονιδίου *FUS* και στο νουκλεοτίδιο 510 συνεχίζει το εξώνιο3 του γονιδίου *CHOP*.

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ RACE PCR

Η τεχνική εφαρμόστηκε με επιτυχία στο περιστατικό 141-05. Ωστόσο, τα αποτελέσματα από την αλληλουχοποίηση των προϊόντων τα οποία απομονώθηκαν και πολλαπλασιάστηκαν δεν ανέδειξαν την ύπαρξη κάποιου υβριδικού γονιδίου. Εντοπίστηκε

μόνο το γονίδιο *SSX1*, για το οποίο είχαν σχεδιαστεί οι εκκινητές (primers) στο 5' άκρο, χωρίς την παρουσία αλληλουχίας από κάποιο άλλο γονίδιο.

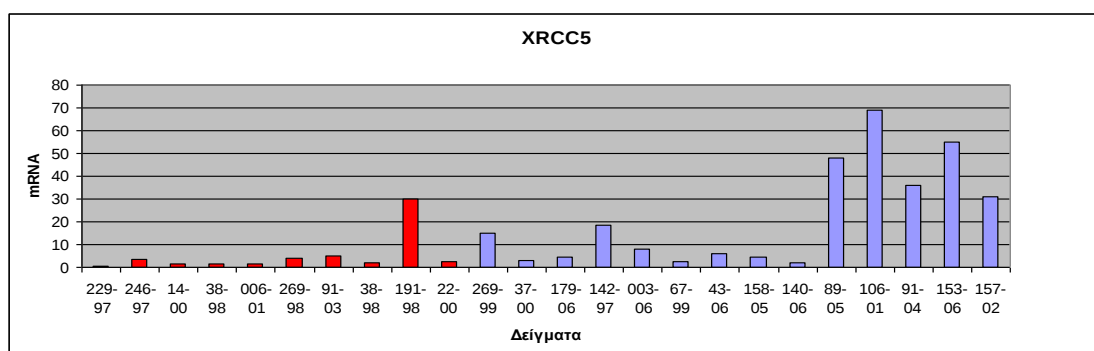
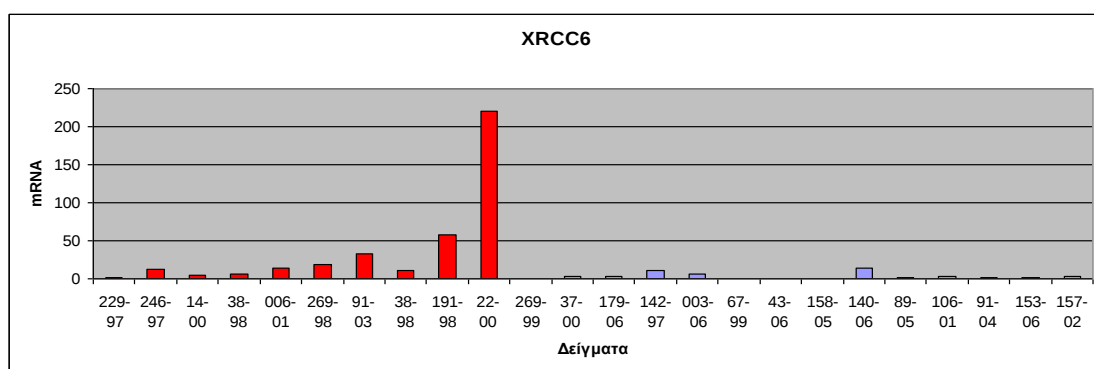
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ REAL TIME PCR

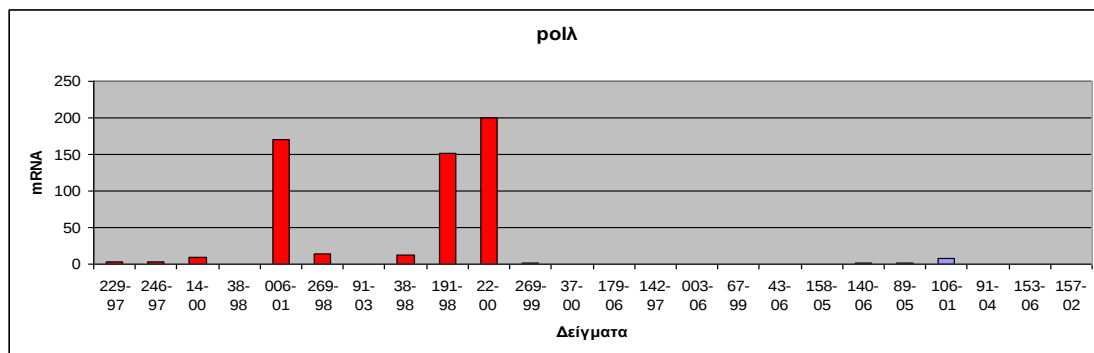
Πίνακας VII. Έκφραση γονιδίων

Γονίδιο	Χονδροσαρκώματα		Λιποσαρκώματα		Pearson χ^2 test
	high	low	high	low	
<i>XRCC5</i>	10%	90%	43%	57%	0,081
<i>XRCC6</i>	30%	70%	7%	93%	0,001
<i>POL μ</i>	10%	90%	7%	93%	0,803
<i>POL λ</i>	30%	70%	0%	100%	0,028
<i>RAD52</i>	10%	90%	14%	86%	0,754

% Η επί τοις εκατό υπερ/υποέκφραση των γονιδίων

Ακολουθούν γραφήματα στα οποία φαίνεται η έκφραση του γονιδίου σε κάθε δείγμα. Με κόκκινο φαίνονται τα περιστατικά χονδροσαρκώματος, ενώ με γαλάζιο τα περιστατικά των λιποσαρκωμάτων.





Πίνακας VIII. Συγκεντρωτικά κυτταρογενετικά, μοριακά και κλινικά δεδομένα

α/α	α/ε	Καρυότυπος	Μοριακή ανάλυση	Διάγν	Η	ΜΟ	Παρακολούθηση		
							Μ	Υ	Κ
1	4697	83-93,XXY,+X,-Y,-1,-3,-4,+7,+9,+i(9)(p10)x2,+10,+11,+12,+16,der(16)(16pter→16p11::1q25→1q21::16q13→cen→16p11::1q25→1qter)x2,-17,add(17)(q24),-18,-21,-22 [cp65] /46,XY[35]		Ew	20	6	-	+	+
2	11197	47,XY,t(5;21)(p12;p12),t(15;20)(q14;q13),+mar[58]		ΜΛ	37	9	-	-	-
3	14297	46,XY,t(12;16)(q13.3;p11.2)[10],46,XY[15]		ΜΛ	44	8,5	-	-	-
4	14797	50,XX,+2,+2,+6,+7[50]		Ew	22	2	+	+	+
5	15297	46,XY,add(2)(p16),del(7)(q11),del(10)(q22),der(12)(12pter→cen→12q13::?:10q22→10qter),der(16)(q24::?:7q11→7qter)[8]/ 46,XY[7]		Λ	55	1,5	-	-	-
6	17697	48,XY,Y,+8,iso(7)(q10),t(12;16)(q13;p11)[8]		ΜΛ	65	10	-	-	-
7	17797	58-65,XXY,add(1)(q22)x2,del(3)(p13),der(X;3) (Xpter→Xq28::?:3cen→3qter), -4,add(4),-5,-5,-6,i(11)(q10), der(1;11) (q31;p14), der(11)(?:11p14→11q24::22q12::22q13::?),-12,der(12;13) (q10;q10),-13,add(13)(q33),ins(14;?) (q12;?),-15,-16,-16,add(17) (p13)x3 -18,-18,-19,-19,-20,-21,-21,-22,der(22) t(11;22)(q24;q12), +der(?)t(?)5)(?:q12),+5-12mar [12] / 110-130 idemx2[4]/46,XY[20]		Ew	20	51	+	+	+
8	18097	?86-?94,XXYY,del(1)(q32),add(1)(p31),-2,-2,-3,-4,-4,del(4)(p15),add(7)(p22),-8,-8,-9,-9,-10,del(12)(q12),-13,-17,-17,inc[4]		Οσ	30	1,5	+	+	+
9	17997	46,XY,t(16;18)(p13;q21)[4]/46,XY[15]		Λμ	18	2	-	-	-
10	18897	46,XY,del(1)(q24q41),der(1)(q24→q41::p36→qter)[4]/46,XY [15]		I	37	8	-	-	-
11	22897	48,XX,+8,+8,t(11;22)(q24;q12),del(16)(q12)[17]/46,XX[13]		Ew	12	1,5	+	+	+
12	22997	85-89,XXXX,add(2)(q22),der(4) (pter→q27::?:11q21→11qter)x2,-5,-5,-6,-6,del(6)(p12)x2,-10,+der(11) (11pter→		X	69	18	-	+	-

		11q14.3::?:12q21.2→12qter)x2, der(11), del(11)(p11.2), add(11)(q14)x2,-13,-13 -14, add(16) (q24),-17,-19,-19,-21,-21, -22,-22[39]/46,XX[5]							
13	24697	46,XY[12]		X	42	10	-	+	-
14	24797	46,XY,del(1)(q24),t(3;12)(q27;q13)[40]/46,XY[100]		Λ	42	3,3	-	-	-
15	25097	58-67,XXY,-1,-3,ins(3;?)(p2?),-4,-4,-4,-5,-6,add(9)(p13),-11,+12,-13,-13, -14,-15,+16, -17,+add(18)(q21),-19,add(19) (q13)x2,-22, +mar1, +mar2,+mar3,+mar4,+mar5, +mar6, +mar7,[cp40]/46,XY[4]		X	50	3,5	-	+	-
16	26397	46,XY[15]		Λ	39	3	-	-	-
17	26597	72-76,XXY,+1,+2,-3,der(3)(p26),del(3)(q13),-5,add(5)(q22),+7,+11,-14, add(16)(q21),-17,der(17)(8qter::?:17p12→17pter),t(19;22)(q13;p13), +der(20)t(3;20)(p21;q13)x2,+der(?)t(?;3) (?;q13), +12mar, dms[cp20]		Oσ	16	1,2	+	+	+
18	26897	85-97,XX,-Y,-Y,+2,-4,-5,-6,-6,+8,add(9) (p12)x2 ,+der(9) t(9;14)(p11;q11)x2,add(10) (p11)x2,-14,-14,-16,add(17) (p12)x2,+19,-20,-22,+1 -3mar[cp3]/154-180idemx2[cp6] /46,XY,inv(9)(p13;q13)[45]		X	57	15	-	-	-
19	0798	41-48,XY,der(X)t(X;10)(q23;p21),t(3;20)(p21;q13),-4,-4, del(6)(q25),+8, -10,-10, t(11;22)(24;q12),add(11)(p15), del(12)(p12), +der(12)add(12) (p11),add(12)(q21), del(16)(q22),-19,+2-5mar[cp7]/79-87,idemx2[cp43] /46,XY[3]		Ew	35	2,5	-	+	+
20	1198	47,XY,+7 [5]/46,XY[10]		Ew	20	2	+	+	+
21	3998	40-43,XX,del(1)(p21),add(1)(p36),ins(2;?)(q31;?),inv(7)(q11.2-q31.3),-10, t(11;22)(q24;q12),der(11)t(11;18)(p12;q12),-18,-19 [cp50] /46,XX[8]		Ew	19	1,5	+	+	+
22	5498	46,XY[12]		Eξ	20	9	-	-	-
23	6898	46,XY,add(22)(p13)[5]/46,XY[12]		Eγχ	45	2	-	-	-
24	7298	46,XY,inv(3)(p13;p22)[7]/46,XY		Π Λ	60	7,5	-	-	-
25	9098	45-46,XX,del(3)(q21)[cp3]/45-46,XX,del(13)(q31)[cp2]/ 46,XX,del(7)(q22) [cp2]/45,XX,+mar[cp2]/46,XX[3]		K.I.I	66	5	-	+	+

26	9698	46,XX,t(1;15)(p21;q21)[12]/46XX[55]		Γγ. όγκος	28	0,6	-	+	-
27	10898	46,XY[12]		Εξ- X	48	5	-	+	-
28	11098	46,XY[20]		Εγγ	50	0,2	-	-	-
29	18898	47,XX,del(1)(p31p35),+2,[16]/46,XX[17]		Ew grIII	45	4,5	-	-	-
30	19398	67,X,-X,-Y,-1,+der(2)t(2;5)(p15;p13), der(3) (1qter→1q25::?:3p22→3qter), -4,add(?4)(q21),-5,-6, +7, der(9;15) (q10;q10)x2or der(9)t(9;15) (p21;q14)x2, der(11) (?:11p15→11p13::11p11→ 11q22::3p12→3pter), +12,-13, -14, -15,+16-17,+add(18)(q21), der(19)t(?4;19) (q28;q13), hsr(19)(q13),+20,+21,-22,+r, +2mar		X grI	50	8,2	-	+	-
31	21698	42-47,XY,der(5)(5qter→5p15::hsr::?), der(6) (6pter→6p25::?:hsr), tas(14;16)(p13;p13), +r,+mar[cp30]		Εξ,οσ. grII	40	16,5	-	-	-
32	22698	46,XX[10]		Ivol.	54	28	-	-	
33	23798	42,XY,t(X;18)(p11;q11),add(1)(p36),r(3)(cen→p25::?:q28→cen), t(4;9)(q34;q13),der(10)(10pter→10q22::?22q11→22qter::?), add(12)(p13),-14, r(19),-20,-21 ,-22,-22, +mar[5]/43,idem,+20[5]/ 46,XY[3]	SYT/SSX	Σ grIII	68	2,5	+	-	-
34	23898	42-52,XY,add(11).rev ish enh(11)(q13-q14),+2-4r.amp (12q12-q13,12q14-q21),+1-4mar. amp (12q12-q13, 12q14-q21) [cp13]/46-52,XY, add(11).rev ish enh(11)(q13-q14),+1-3r. amp (12q12-q13, 12q14-q21),+1-2mar. amp (12q12-q13, 12q14-q21) [cp13]/93-104,XXYY, idemx2[cp16]/46,XY[2]		Επ.αι μ	21	11	+	+	+
35	24198	46,XY[20]		K.I.I	50	2	-	-	-
36	26598	36-38,?,der(X),dic(5;?)(q31;?),inv(16)(q?),add(18p11)inc[6]/58-78,idemx2, inc[5]		Οσ	60	3,2	-	-	+
37	27198	49,XX,der(4)t(1 ;4)(q12 ;q35),+6,+11,+12,+18, add(22)(p11) [cp25] /46,XX[10]		PNET	83	13	-	-	+
38	27398	46,XY[8]		Εξ.	23	7	-	+	-
39	27698	55-67,XXY,-1,-1,der(1)t(1;3)(p36;p21),add(3)(p13),-4,add(5)(q31),		Οσ	15	1,4	-	-	-

		add(6)(q?24),-7,-7,-8,i(8)(p10),-10,-11,-12,-13,-13,-14,-14,-15,-15,der(16) add(16)(p13)del(16)(q22),-17,-17,-18,-19,add(19)(q13),-20,-21,-22,,+1-8mar, +1-4r[cp12]/110-?124,idemx2,add(3)(q27),der(5)t(3;5)(p13;p14),add(6)(q?14), add(8) (q?12)[cp10]/ 150,idemx4[cp3]								
40	6799		<i>FUS/CHOP</i>	MΛ	52	14	-	+	-	
41	8999	66-72,XX,-X,-1,-6,+7,+8,-9,-9,-13,-14,+15,del(16)(q12),add(17)(q25)x2, der(17)t(1;17)(q12;q25),-18,+mar[cp17] /120-140, idemx2[cp5]		X.Oσ	67	11	+	+	+	
42	19299	43-45,XX,t(X;18)(p11;q11),der(19)t(19;?)(p13;?),t(?;22)(?;q11),-22[32] /46,XX[8]		Σ	27	1,9	-	-	-	
43	23099		<i>SYT/SSX</i>	Σ	53	4	-	-	-	
44	26999		<i>FUS/CHOP</i>	MΛ	44	9,5	-	+	-	
45	28399	46,XY,inv(1) (p13q12)[7]		K	24	6,5	-	-	-	
46	28499	47,XY,+mar [5]/46,XY[7]		Ew	12	1,5	+	-	+	
47	1700	45-46,XY,t(3;17)(q21~22;q21),-12,+mar[4]/ 46,XY,del(6)(q21) [cp2]/ 46- 47,XY,add(5)(q34)[cp2]/46,XY[2]		Δ	20	1,3	-	+	-	
48	3700		<i>FUS/CHOP</i>	MΛ	70	4	-	+	-	
49	6600	46,XY[25]		X	59	3	+	+	+	
50	15000	46,XX[41]		Av.	20	5	-	-	-	
51	2101	47,XX,+r[2]/46,XX[50]		Av.K	35	7	-	-	-	
52	8701		<i>FUS/CHOP</i>	MΛ.	45	5	-	+	-	
53	9901		<i>EWS/FLI</i>	Ew	48	7	+	+	+	
54	1803		<i>EWS/FLI</i>	Ew	53	4,9	+	+	-	
55	3303	46,XY,+8,t(11;22)(q24;q12),add(13)(q12),der(16)t(16;17)(q11;q12),-17[7] /46,XY[40]	<i>EWS/FLI</i>	Ew	21	2	+	+	+	
56	5703		<i>EWS/FLI</i>	Ew	61	9	+	+	-	
57	5903	45-46,XY,del(3)(q21),add(4)(q34),t(6;13)(q16;q31),t(7 ;9)(q11 ;q34), t(12 ;19)(q13 ;p13),add(16)(p13)[6]/46,XY[3]		Σ	57	14	+	+	+	

58	6003	46,XX[14]		Λ	67	1	-	-	-
59	6103	46,XY,inv(1)(p13q12)c[50]		K	18	4	-	+	-
60	6303	46,XX[39]		Oσ M	47	6	-	-	-
61	7603	45,X,-X[3]/46,XX[57]		Oσ M	48	6	-	-	-
62	7903	53,XY,+X,+5,+6,+7,+11,+12,+20[4]/54,idem,+mar[5]		Ξ	69	3,5	-	-	-
63	8203	47,XY,+7[8]/46-47,XY,del(11)(p11)[2]/46,XY[130]		X Gr I	73	7	-	+	-
64	9303	46,XY[30]		Av.K	22	4,5	-	-	-
65	9403	46,XX[10]		K	27	3	-	-	-
66	0404	46,XX [15]		K.I.I	76	11,5	-	-	
67	2804	46,XX[20]		Γγ.O	31	1,5	-	-	-
68	3504	46,XX[[25]		Eγγ	33	1	-	-	-
69	9104	54,XX,t(2;18)(q13;q22),t(12;16)(q13;p12),+11,+17,+20,+20,+22, +22[9]	<i>FUS/CHOP</i>	MΛ	47	6,8	-	-	-
70	20204	46,XX[10]		Λ	52	4	-	-	-
71	21604	46,XY[15]		K.I.I	72	4,5	+	+	+
72	21804	45,XX,der(1;7)(q10;q10),-7[21]/46,XX[95]		Λ	45	21	-	-	-
73	21904	46,XY,t(7;8)(q22-31;q24)[13]/46,XY[46]		Λ	60	7,5	-	-	-
74	22004	46,XY[35]		Kλ.I.I	31	1,5	-	-	-
75	28904	46,XX,t(2;12)(q14;q14)[18]/46,XX[30]		Λ	35	7	-	-	-
76	2005	46,XX,add(16)(q24)[2]/46,XX[25]		IvoΛ	55	4	-	-	-
77	2205	46,XY[30]		K	58	3,5	-	-	-
78	4805	42-46,XX, t(1;9)(q12;p12), der(3)(3qter→3p12::1p12→1pter), t(4;17)(p11;q11), t(5;6)(q23;q14-16),-6,-17,-18,-19 [cp20]/ 46,XX[25]		X gr II	65	5	-	+	-
79	7505	37-45,XY,-3,-5,-8,-10,-12,-12,-17,-20[cp14]		Ενδ. αμσγ	29	7,5	-	-	-
80	7805	38-44,XX,-3,-16[cp7]		Γγ.O	59	3,6	-	+	-
81	10905	46,XX[10]		Γγ.O	59	1,5	-	+	-
82	11205	45,XX,-1[3],46,XX[14]		Λ	59	4,3	-	-	-

83	13705	46,XY[12]		P. grIII	74	17	-	-	-
84	14105	46,XY,del(3)(q23),add(13)(q33),ins(16,?)(q22;?)[5]/46,XY[10]		Σ	35	14	+	+	-
85	14505	46,XY,t(1;14)(q23.1~24;q24.1~3)[25]/46,XY[10]		Σ .X → XGr I	54	6,5	-	-	-
86	14605	46,XY,t(X;15;18)(p11;q14-15;q11), +8,-21[10]/46,XY[15]	SYT/SSX	Σ	51	10	-	-	-
87	15505	46,XX[12]		Γ_{γ} .O	67	5,8	-	-	-
88	15805	46,XX,t(12;16)(q13;p11)[20]/46,XX[17]	FUS/CHOP	MΛ	30	9,5	-	-	-
89	0306	46,XX,t(10;12;16;22)(q26;q13;p11;q13) [20]/46,XX[2]	FUS/CHOP	MΛ	49	9	-	-	-
90	0406	46,XY,t(12;16)(q13;p11)[15]/46,XY[20]	FUS/CHOP	MΛ	56	13	-	+	-
91	0906	46,XY[8]		Eγχ	49	3	-	-	-
92	1106	46,XY[19]		Δμ	47	5,5	-	-	-
93	4306	46,XY,t(12;16)(q13;p11)[5]/46,XY[12]	FUS/CHOP	MΛ	56	1	+	+	-
94	8906	46,XY,t(7;12)(q35;q21)[7]/46,XY[16]		Λ	32	9	-	-	-
95	15306	46,XY,ins(1;12)(q31;q24q14)[8]/46,XY[15]		Ατ Λ	50	9,9	-	-	-
96	17906	46,XY[9]	FUS/CHOP	MΛ.	24	1,8	-	+	-
97	18706	46,XY[22]		Δμ	47	6	-	-	-
98	4507		EWS/FLI	Ew	47	7	-	-	-
99	12107	46,XX[23]		Eγχ	46	4	-	-	-
100	13107	45,XY,-1,t(1;15)(q22-23;q23-24)[3]/46,XY[10]		K.I.I grII	45	2,8	-	-	-
101	25307	46,XY,der(16)t(1;16)(q12;q11),t(12;16)(q13;p11)[8]/46,XY[12]	FUS/CHOP	MΛ	42	12	+	+	-
102	35408		FUS/CHOP	MΛ	42	5	-	-	-

α/α: αύξων αριθμός, **α/ε:** αριθμός εργαστηρίου, **H:** ηλικία, **MO:** μέγεθος όγκου, **M:** μετάσταση, **Y:**υποτροπή, **K:** κατάληξη

Ew: Σάρκωμα Ewing , **ΜΛ:** Μυξοειδές Λιποσάρκωμα , **Λ:** Λίπωμα, **Κ:** Κύστη, **Οσ:** Οστεοσάρκωμα, **Λμ:** Λειομύωμα, **Κ.Ι.Ι:** Κακόηθες ινώδες ιστιοκύττωμα, **Εγγ:** Εγγόνδρωμα, **Αιμ:** αιμαγγείωμα, **Επιθ αιμ:** επιθηλιοειδές αιμαγγειοενδοθηλίωμα, **Σ.Χ:** Συνοβιακή χονδρομάτωση, **Χ:** Χονδροσάρκωμα, **Σ:** Συνοβιοσάρκωμα, **P:** Ραβδομυοσάρκωμα, **Γιγ Ο:** Γιγαντοκυτταρικός όγκος, **Ξ:** Ξάνθωμα, **Εξ:** Εξόστωση, **Οσ Μ:** Οστεοποιός μυοσίτιδα, **Κλ Ι.Ι:** καλόηθες ινώδες ιστιοκύττωμα, **Ατ Λ:** άτυπο λίπωμα, **Ενδ αιμ:** ενδομυϊκό αιμαγγείωμα, **Αν Κ:** ανευρυσματική κύστη

X. Συζήτηση

Οι μεσεγχυματογενείς όγκοι αποτελούν ένα αντικείμενο μελέτης με τεράστιο εύρος και ποικιλία, τόσο όσον αφορά την ιστολογική τους εικόνα, όσο και την κλινική τους συμπεριφορά. Αυτή η ετερογένεια γίνεται εμφανής και στο γενετικό προφίλ των όγκων αυτής της κατηγορίας, υποδηλώνοντας μάλλον τη σχέση του γονοτύπου με τον ιστολογικό και κλινικό φαινότυπο. Οι γενετικές πληροφορίες για τους όγκους των μαλακών μορίων και των οστών, είτε είναι καλοήθεις είτε κακοήθεις, εμφανίζουν τεράστια ποικιλία, η οποία αντικατοπτρίζεται στα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής και επιβεβαιώνεται από τη διεθνή βιβλιογραφία^{58, 86, 97, 108, 142, 151, 153, 156, 157, 186, 201, 222, 223}.

Οι γενετικές πληροφορίες που υπάρχουν για τους μεσεγχυματογενείς όγκους, μπορεί να διακριθούν σε γενετικές πληροφορίες με κλινική σημασία, δηλαδή με διαγνωστική αξία και προγνωστική αξία και σε αυτές που δίνουν στοιχεία για την βιολογία και την εξέλιξη του όγκου. Αυτές οι πληροφορίες αφορούν γενετικές ανωμαλίες, οι οποίες εντοπίζονται σε χρωμοσωμικό επίπεδο, σε μοριακό επίπεδο και σε επίπεδο των προϊόντων των γονιδίων. Προκειμένου λοιπόν, να αντληθούν αυτές οι πληροφορίες είναι απαραίτητη η εφαρμογή πολλαπλών τεχνικών και μεθόδων της γενετικής και της μοριακής βιολογίας.

Η επιλογή της κατάλληλης τεχνικής και μεθοδολογίας κάθε φορά εξαρτάται από το συγκεκριμένο ερώτημα το οποίο καλείται να απαντήσει, από τις δυνατότητες και τα όρια της, αλλά και από το υλικό (νωπός ιστός, κατεψυγμένος ιστός, μονιμοποιημένο υλικό) που θα χρησιμοποιηθεί^{224, 225}. Η επισήμανση αυτή ισχύει για την γενετική ανάλυση στην εφαρμογή των ήδη αποκτηθεισών γνώσεων, δηλαδή για εξετάσεις ρουτίνας, πολύ όμως περισσότερο για την ερευνητική εργασία^{217, 226-228}.

Για τους λόγους αυτούς στη παρούσα διατριβή, στην πλειοψηφία των δειγμάτων στα οποία υπήρχε νωπό υλικό και μπορούσε να εφαρμοσθεί, χρησιμοποιήθηκε η κυτταρογενετική ανάλυση (G-banding), η οποία ως πανοραμική μέθοδος επέτρεπε την παρατήρηση του συνόλου του γενετικού υλικού. Στην συνέχεια τα αποτελέσματα αυτής της προσέγγισης, προσανατόλιζαν για τις περαιτέρω μελέτες. Όπου υπήρχαν άγνωστοι δείκτες (markers) και υπήρχε διαθέσιμο υλικό, εντοπίζονταν με πολυχρωματικό FISH και σε δύο περιπτώσεις νέας μετάθεσης ο περαιτέρω λεπτομερέστερος προσδιορισμός έγινε με πολυζωνικό πολυχρωματικό FISH (Multicolor–Multiband FISH) για τον ακριβέστερο εντοπισμό των χρωμοσωμικών περιοχών που ενέχονταν στην χρωμοσωμική ανακατάταξη.

Σε περιπτώσεις, όπου κρίθηκε απαραίτητο η ακριβέστερη προσέγγιση των μικρότερων δυνατών σημαντικών περιοχών και σε περιπτώσεις καρυοτύπων χωρίς χρωμοσωμικές ανωμαλίες χρησιμοποιήθηκε η CGH ανάλυση, η οποία ανιχνεύει υπομικροσκοπικές ελλείψεις (10-20Mb) και/ή επιπλέον γενετικό υλικό. Ανάλογα τώρα με τα αποτελέσματα της κυταρογενετικής και της μοριακής κυταρογενετικής, δηλαδή των πανοραμικών μεθόδων, σε δυο κατηγορίες χρησιμοποιήθηκαν και τεχνικές της συνήθους μοριακής γενετικής: Α. Εκεί όπου υπήρχαν γνωστές χαρακτηριστικές μεταθέσεις ακολουθήθηκε η μοριακή πιστοποίηση υβριδικών γονιδίων τα οποία θεωρούνται ότι αυτές τα προκαλούν και Β. σε καρυότυπους χωρίς ανωμαλίες (φυσιολογικούς) με ισχυρές όμως κλινικοπαθολογικές ενδείξεις για τον εντοπισμό πιθανά ενεχόμενων γνωστών υβριδικών γονιδίων

Τέλος χρησιμοποιήθηκαν δύο ακόμη προσεγγίσεις, 1. η τεχνική RACE για τον εντοπισμό αγνώστου παρτεναιρ ενός γονιδίου που συμμετείχε σε ένα υβριδικό γονίδιο και 2. η μελέτη με Real time PCR της έκφρασης γονιδίων που αφορούσαν δυο κατηγορίες σαρκωμάτων με διαφορετικό κυταρογενετικό προφίλ (σαρκώματων με απλές χρωμοσωμικές ανωμαλίες και σαρκώματων με πολύπλοκες).

Η πολύπλευρη κοπιώδης στρατηγική αυτή, προσέγγιση των μεσεγγυματογενών όγκων υπήρξε σε γενικές γραμμές αποτελεσματική. Τα ευρήματα της απέφεραν μια πληθώρα δεδομένων τα οποία αφενός μεν επιβεβαίωσαν τα αντίστοιχα προηγούμενων μελετών, αφετέρου δε προσέθεσαν νέες πληροφορίες. Αναλυτικότερα, από τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής εργασίας, προκύπτουν τα παρακάτω σημεία που αξίζουν ιδιαίτερου σχολιασμού:

Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 192 δειγматы για γενετικές αναλύσεις από 125 ασθενείς (125 για κυταρογενετική ανάλυση, 5 για MFISH και MBAND, 21 για CGH, 22 για PCR, 24 για Real time PCR και 2 για RACE), δηλαδή ένας εξαιρετικά μεγάλος αριθμός εργαστηριακών σύγχρονων και πολύπλοκων δοκιμασιών, οι περισσότερες από τις οποίες καθ' ολοκληρία ή εν μέρει δεν είναι αυτοματοποιημένες και ως εκ τούτου χρονοβόρες (οι κυταρογενετικές ιδιαίτερα) ^{63, 229}. Η κυταρογενετική επεξεργασία, όπως φαίνεται από τους πίνακες των αποτελεσμάτων τους, απέδωσε τα εξής: Ενενήντα δύο δείγματα (73,6%) καλλιεργήθηκαν και κατέστη δυνατή η κυταρογενετική ανάλυσή τους. Τα υπόλοιπα 33 (26,4%), είτε δεν καλλιεργήθηκαν, γιατί επιμολύνθηκαν, είτε δεν πολλαπλασιάσθηκαν κατά την κυταροκαλλιέργεια. Τα ποσοστά αυτά συμβαδίζουν απόλυτα με τα διεθνή δεδομένα στα οποία η επιτυχής καλλιέργεια των μεσεγγυματογενών

όγκων κυμαίνεται από 50-75%²²⁷. Το ποσοστό μη επιτυχούς καλλιέργειας αυτών των όγκων καταδεικνύει τα μειονεκτήματα αυτής της τεχνικής εν μέρει μόνο. Ένα σημαντικό μερίδιο στην αιτία της αποτυχίας οφείλεται στην ιστολογική αρχιτεκτονική των όγκων. Οι μεσεγγυματογενείς όγκοι έχουν πλούσιο συνδετικό ιστό και θεμέλια ουσία, τα οποία περιέχουν τεράστια ποικιλία μορίων, όπως γλυκοπρωτεΐνες, πρωτεογλυκάνες, υαλουρονικό οξύ και διάφορα είδη κολλαγόνου και ελαστικών ινών²³⁰. Αυτά τα μόρια πολλές φορές είναι αδύνατο να αποδιαταχθούν με τις ουσίες που χρησιμοποιούνται για την ενζυματική αποδιάταξή τους. Επιπλέον, ο παρατεταμένος χρόνος δράσης των ενζύμων (ή η μεγαλύτερη συγκέντρωση), επιδρά όχι μόνο στη μεσοκυττάρια ουσία, αλλά και στα ίδια τα κύτταρα, προκαλώντας βλάβες οι οποίες εμποδίζουν την προσκόλλησή τους και γενικότερα την προσαρμογή τους στις *in vitro* συνθήκες, έτσι ώστε να μη μπορούν περαιτέρω να διαιρεθούν. Επιπλέον, σημαντικό ρόλο διαδραματίζει και η «καθαρότητα» του προς εξέταση δείγματος, δηλαδή η παρουσία νεκρωτικών και φλεγμονωδών σημείων.

Τα κυτταρογενετικά δεδομένα των 92 όγκων χρήζουν ερμηνείας και αξιολογήσης. Τα 49 δείγματα είναι σαρκώματα και τα 43 είναι καλοήθεις όγκοι των μαλακών μορίων και των οστών. Από τα 49 σαρκώματα, τα 42 χαρακτηρίζονται από ανώμαλους καρυοτύπους, ενώ μόλις 7 εμφάνισαν ομαλούς καρυοτύπους. Από τους 43 καλοήθεις όγκους κυτταρογενετικές ανωμαλίες εμφάνισαν 21, ενώ 22 είχαν φυσιολογικούς καρυοτύπους.

Όταν σήμερα είναι γνωστό ότι μεταλλάξεις υπάρχουν σε όλα τα νεοπλάσματα τόσο τα καλοήθη όσο και τα κακοήθη, οι φυσιολογικοί καρυότυποι είναι ένα πρόβλημα. Έχει βρεθεί όμως ότι σε περιπτώσεις νεοπλασμάτων με φυσιολογικό καρυότυπο τεχνικές διεισδυτικότερες της μοριακή κυτταρογενετικής ή της συνήθους μοριακής γενετικής ανιχνεύουν υποмикροσκοπικές ανακατατάξεις²³¹. Είναι λοιπόν πιθανόν και στις ανωτέρω περιπτώσεις των φυσιολογικών καρυοτύπων, οι γενετικές ανωμαλίες να βρίσκονται σε υποκυτταρικό επίπεδο, δηλαδή να είναι γονιδιακές μεταλλάξεις, για τις οποίες καθίσταται αδύνατος ο εντοπισμός τους με τις τεχνικές της κυτταρογενετικής. Ακόμη, δεν μπορούμε να αποκλείσουμε την πιθανότητα μερικές φορές τα νεοπλασματικά κύτταρα να έχουν σε συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας μικρή ικανότητα κυτταρικής διαίρεσης σε σχέση με τα ομαλά κύτταρα (οπότε υπάρχει υπερανάπτυξη του φυσιολογικού πληθυσμού κυττάρων εις βάρος του νεοπλασματικού) ή και καθόλου, έτσι ώστε ο φυσιολογικός καρυότυπος να αντιπροσωπεύει τα δεύτερα²³². Ο μεγαλύτερος αριθμός περιπτώσεων με χρωμοσωμικές ανωμαλίες στα σαρκώματα μπορεί να υποδηλώνει ότι το είδος και ο αριθμός των μοριακών ανακατατάξεων που απαιτούνται για την κακοήθη εξαλλαγή επιφέρουν ένα

είδος γενωμικής αστάθειας που έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευση χρωμοσωμικών ανωμαλιών συχνότερα^{196, 209}. Και με αυτό τον τρόπο να ερμηνεύεται η μεγάλη διαφορά στη σχέση ανωμάτων καρυοτύπων προς ομαλούς μεταξύ καλοήθων και κακίθων όγκων.

Ακόμη, ο αριθμός των ανωμάτων ανά όγκο (NA) για τους καλοήθεις όγκους υπολογίστηκε στο 1,9 ενώ στα σαρκώματα βρέθηκε NA=11,25, εξαπλάσιος περίπου. Ο αριθμός των μη ισοζυγισμένων ανωμάτων ανά όγκο (NI) είναι 1,3 στους καλοήθεις όγκους, ενώ στα σαρκώματα το NI είναι 8,55, επίσης εξαπλάσιος. Από τα παραπάνω είναι φανερό, ότι το κυτταρογενετικό προφίλ των καλοήθων μεσεγχυματογενών όγκων χαρακτηρίζεται από λίγες και απλές ανωμαλίες, οι οποίες δεν δημιουργούν την εικόνα των πολύπλοκων καρυοτύπων που συναντάται στα σαρκώματα. Οι συχνότερες δομικές ανωμαλίες στην παρούσα μελέτη εντοπίστηκαν στα χρωμοσώματα 1, 7q και 12q, δεν υπάρχει όμως αντίστοιχη παρατήρηση συγκεντρωτικών αποτελεσμάτων στους καλοήθεις όγκους για να μπορεί να αξιολογηθεί περαιτέρω αυτό το εύρημα.

Στους καλοήθεις όγκους, όπως και στο σύνολο των μεσεγχυματογενών όγκων που μελετήθηκαν η πλειοψηφία των συγκεκριμένων χρωμοσωμικών ανωμάτων συνάδει με τα με μέχρι σήμερα δεδομένα των υπόλοιπων ερευνητικών ομάδων. Νέα αξιοσημείωτα ευρήματα, τα οποία πρέπει να αναφερθούν αφορούν τρεις ομάδες καλοήθων όγκων, τα ξανθώματα, τους δεσμοειδείς όγκους και τις κύστει των οστών. Συγκεκριμένα:

Μια περίπτωση αφορούσε ένα **Ξάνθωμα των οστών** (7903) (καλόηθες ινώδες ιστοκύττωμα των οστών) που αποτελεί μια σπάνια οντότητα. Η κυτταρογενετική ανάλυση ανέδειξε κλωνικές αριθμητικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες και ένα δεύτερο κλώνο κυττάρων με επιπλέον χρωμόσωμα άγνωστης προέλευσης. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν κυτταρογενετικά δεδομένα για αυτό τον τύπο όγκου στη διεθνή βιβλιογραφία.

Μια περίπτωση ενός **Δεσμοειδούς όγκου** (1700) στην οποία η κυτταρογενετική ανάλυση ανίχνευσε 3 ανώμαλους κλώνους κυττάρων με πολλές δομικές ανωμαλίες. Η πολυπλοκότητα των καρυοτύπων είναι τόσο μεγάλη που δεν κατέστη δυνατή η πλήρης διευκρίνιση όλων των χρωμοσωμικών ανακατατάξεων. Ο κλινικός χαρακτήρας αυτών των όγκων να υποτροπιάζουν, θα μπορούσε να αναζητηθεί στην κυτταρογενετική τους εικόνα και βαθύτερα, στα γονίδια που εντοπίζονται στα σημεία θραύσης των χρωμοσωμάτων που ενέχονται σε δομικές ανωμαλίες.

Δυο ακόμη περιπτώσεις που χρήζουν προσοχής είναι οι **Κύστει οστού** (23899 και 6103). Η κυτταρογενετική ανάλυση αποκάλυψε μια απλή χρωμοσωμική ανωμαλία κοινή και στις δυο περιπτώσεις. Ανιχνεύθηκε λοιπόν, η ίδια ακριβώς ανωμαλία η αναστροφή

inv(1)(p13q12) και στις δύο περιπτώσεις. Το αξιοσημείωτο και στις δύο περιπτώσεις είναι το γεγονός ότι η ανωμαλία εντοπίστηκε σε όλα τα κύτταρα τα οποία αναλύθηκαν χωρίς καμμία παρέκλιση δημιουργώντας την εντύπωση ότι πρόκειται περί συγγενούς χρωμοσωμικής ανωμαλίας (constitutional). Η επιβεβαίωση της άποψης αυτής είναι εφικτή αν η συγκεκριμένη ανωμαλία εντοπισθεί και σε άλλο ιστό (πχ αίμα, ινοβλάστες δέρματος κλπ), εκτός του παρεγχύματος του όγκου. Κάτι τέτοιο δεν έγινε εφικτό λόγω αδυναμίας εύρεσης κατάλληλου υλικού για περαιτέρω έλεγχο. Στη περίπτωση όντως συγγενούς χρωμοσωμικής ανωμαλίας και ύπαρξης υλικού είναι δυνατή η κλωνοποίηση των γονιδίων τα οποία εδράζονται στα σημεία θραύσης και κατ' αυτό τον τρόπο ο εντοπισμός γονιδίων προδιαθεσικών στην ανάπτυξη αυτών των αλλοιώσεων όπως έχει συμβεί στο παρελθόν και σε άλλες περιπτώσεις.

Με βάση τα γενετικά τους χαρακτηριστικά τα σαρκώματα, όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενο κεφάλαιο, διακρίνονται σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη περιλαμβάνει τα σαρκώματα στα οποία συμβαίνουν απλές συνήθως ισοζυγισμένες χρωμοσωμικές μεταθέσεις και σχηματίζονται υβριδικά γονίδια, και η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει όγκους με πολύπλοκους καρυοτύπους, παρόμοιους ως προς την πολυπλοκότητα, με αυτούς των καρκινωμάτων⁵⁸. Στην πρώτη κατηγορία εντάσσονται 25 όγκοι, ενώ στη δεύτερη 17. Μια σημαντική διαφορά που φαίνεται μελετώντας τα κυτταρογενετικά δεδομένα είναι ότι στους όγκους της πρώτης ομάδας υπάρχουν περιπτώσεις, όπου εντοπίζεται μόνο μια (πρωτογενής) ανωμαλία (5/25 δείγματα), δηλαδή η χρωμοσωμική μετάθεση που τους χαρακτηρίζει, αλλά και περιπτώσεις στις οποίες έχουν συσσωρευθεί επιπρόσθετες (δευτερογενείς) ανωμαλίες (20/25 δείγματα). Στις περιπτώσεις που υπάρχουν και δευτερογενείς ανωμαλίες ο αριθμός των ανακατατάξεων ανά περιστατικό (NA, number of aberrations) είναι κατά μέσο όρο 7,5. Στην περίπτωση των σαρκωμάτων, τα οποία δεν εμφανίζουν κάποια χαρακτηριστική χρωμοσωμική ανωμαλία, ο αντίστοιχος αριθμός κατά μέσο όρο είναι 15. Από αυτή την παρατήρηση είναι σαφές ότι η δεύτερη κατηγορία σαρκωμάτων εμφανίζει πολύ περισσότερες ανακατατάξεις από την πρώτη.

Στα παραπάνω δεδομένα όμως, μπορεί να προστεθεί η παράμετρος του είδους των χρωμοσωμικών ανωμαλιών που συμβαίνουν. Έτσι, αν υπολογιστεί ο αριθμός των μη ισοζυγισμένων ανωμαλιών (NI, number of imbalancies), δηλαδή στις περιπτώσεις που η ποσότητα του γενετικού αλλάζει, τότε για την πρώτη κατηγορία όγκων κατά μέσο όρο υπάρχουν 5,6 μη ισοζυγισμένες ανωμαλίες, ενώ στη δεύτερη 11,5. Από αυτή την παρατήρηση προκύπτει ότι τα σαρκώματα της πρώτης κατηγορίας εμφανίζουν πιο απλές

ανακατατάξεις από τα σαρκώματα της δεύτερης κατηγορίας. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι αυτή η κυτταρογενετική κατηγοριοποίηση των σαρκωμάτων δεν κατανέμεται σε όλα τα είδη τους, αλλά υπάρχει συσχέτιση με συγκεκριμένους τύπους. Καρυότυποι συνήθως απλοί με χαρακτηριστικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες αντιστοιχούν σε σαρκώματα Ewing, συνοβιακά σαρκώματα και λιποσαρκώματα, ενώ πολύπλοκοι καρυότυποι βρίσκονται σε οστεοσαρκώματα και χονδροσαρκώματα. Συνδυάζοντας την παρατήρηση για την ύπαρξη διαφοράς ως προς το πλήθος των ανωμαλιών μεταξύ των δυο ομάδων σαρκωμάτων, με την παρατήρηση για διαφορά στην πολυπλοκότητα των ανωμαλιών, διατυπώνεται η υπόθεση ότι οι όγκοι των δυο αυτών κατηγοριών έχουν διαφορετική πορεία εξέλιξης, η οποία πιθανά καθορίζεται από μια κρίσιμη μετάλλαξη σε πρώιμο στάδιο. Η διαφορετικότητα αυτή ως προς τον αριθμό των χρωμοσωμικών ανωμαλιών και το είδος (ισοζυγισμένες ή μη) που έχει επισημανθεί από πολλούς ερευνητές δεν έχει εξηγηθεί έως σήμερα²³³⁻²³⁵. Για τον λόγο αυτό στην παρούσα μελέτη επιχειρήθηκε η διερεύνησή της χρησιμοποιώντας μια ομάδα λιποσαρκωμάτων που συνήθως εμφανίζουν απλούς καρυότυπους και συγκρίθηκαν με χονδροσαρκώματα που παρουσιάζουν πολύπλοκους καρυότυπους διερευνώντας τους μοριακούς μηχανισμούς που θεωρούνται ότι παίζουν ρόλο στην συσσώρευση των χρωμοσωμικών ανωμαλιών.

Σε μια προσπάθεια σύνδεσης των κυτταρογενετικών δεδομένων με τους μηχανισμούς που προκαλούν τις χρωμοσωμικές ανωμαλίες, μελετήθηκε η έκφραση διαφόρων επιδιορθωτικών γονιδίων. Οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί του ομόλογου και μη ομόλογου ανασυνδυασμού (HR, NHEJ) είναι αυτοί που αναλαμβάνουν την επιδιόρθωση των σπασιμάτων της διπλής έλικας του DNA. Ωστόσο, έχειδειχθεί ότι ειδικά το NHEJ είναι μεταλλαξογόνο και συμβάλλει στο σχηματισμό χρωμοσωμικών μεταθέσεων⁴⁸. Εφόσον, τα σαρκώματα γενετικά διακρίνονται σε σαρκώματα με χαρακτηριστικές χρωμοσωμικές μεταθέσεις και σε σαρκώματα με πολύπλοκους καρυότυπους και κυτταρογενετική εικόνα παρόμοια με των καρκινωμάτων, είναι πιθανό αυτές οι δυο κατηγορίες σαρκωμάτων να εμφανίζουν διαφορετική επιδιορθωτική δραστηριότητα. Εξαιτίας αυτής της διαφορετικής επιδιορθωτικής συμπεριφοράς συσσωρεύουν διαφορετικού είδους ανωμαλίες. Για τη μελέτη αυτή επελέγησαν τα λιποσαρκώματα (14) ως αντιπροσωπευτικός όγκος της κατηγορίας των σαρκωμάτων με τις χαρακτηριστικές χρωμοσωμικές μεταθέσεις. Από τη δεύτερη κατηγορία σαρκωμάτων επελέγησαν τα χονδροσαρκώματα (10). Τα γονίδια που μελετήθηκαν είναι τα *xrcc5*, *xrcc6*, *xrcc4*, *polm*, *pol 1a*, *rad52*. Με την εφαρμογή της τεχνικής Real time PCR επιχειρήθηκε η μέτρηση του επιπέδου έκφρασης του κάθε γονιδίου στους δυο τύπους όγκου που αναφέρθηκαν. Για να

είναι αξιόπιστα τα αποτελέσματα των μετρήσεων, τονίζεται ότι όλες οι μετρήσεις έγιναν τουλάχιστον 2 φορές. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το mRNA από περιφερικό αίμα υγιούς δότη, ενώ η έκφραση των προς εξέταση γονιδίων συγκρινόταν με ένα γονίδιο μάρτυρα, που στην προκειμένη περίπτωση ήταν η β2μικροσφαιρίνη. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του προγράμματος SPSS. Από τα είδη της στατιστικής επεξεργασίας που ήταν δυνατό να εφαρμοστεί, επελέγη το τεστ Pearson χ^2 .

Έτσι, η συχνότητα των γονιδίων που είχαν υψηλή ή χαμηλή έκφραση μεταξύ των δυο τύπων όγκου είχε στατιστικά σημαντική διαφορά στα γονίδια *pol la* και *xrcc6*. Πρέπει να τονιστεί ότι τα γονίδια *xrcc5*, *xrcc6* είναι τα πρώτα 2 γονίδια που κατευθύνονται στη σπασμένη διπλή έλικα^{236, 237}. Οι *pol la* και *polm* αποτελούν τα τελευταία σε χρονική σειρά γονίδια που σπεύδουν σε αυτό το μονοπάτι. Η έκφραση των *xrcc5*, *xrcc6* στα χονδροσάρκωματα ποικίλει, αλλά δεν είναι πάντα χαμηλή. Αντίθετα, στα λιποσάρκωματα η έκφραση στο *xrcc6* είναι πολύ χαμηλή, ενώ στο *xrcc5* διατηρείται σχετικά ψηλά. Αυτό δείχνει ότι τα πρώτα βήματα της επιδιόρθωσης στα χονδροσάρκωματα λειτουργούν με παρόμοιο τρόπο, ενώ στα λιποσάρκωματα λειτουργεί μόνο το ένα (*xrcc5*). Ωστόσο, το ιδιαίτερα σημαντικό στοιχείο προκύπτει από τη διαφορά στην έκφραση της *pol la*, η οποία βρίσκεται στο τέλος της αντίδρασης²³⁸. Στα λιποσάρκωματα αυτό το κομμάτι δεν λειτουργεί, ενώ στα χονδροσάρκωματα εμφανίζει σαφώς υψηλή έκφραση σε κάποιες τουλάχιστον περιπτώσεις. Αυτή λοιπόν η αδυναμία επιδιόρθωσης των βλαβών είναι πιθανό να οδηγεί στο σχηματισμό των μεταθέσεων, που στα λιποσάρκωματα συναντάται παντού. Από την άλλη πλευρά η απορρύθμιση της επιδιόρθωσης σε κάποια χονδροσάρκωματα, ίσως είναι αποτέλεσμα του σχηματισμού δομικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών σε μερικά από αυτά.

Η ανωτέρω κυτταρογενετική εικόνα, δηλαδή οι δυο βασικές ομάδες, αυτή των σαρκωμάτων με απλούς καρυότυπους, και η άλλη με τους πολύπλοκους καρυότυπους γεννά το ερώτημα αν οι μεσυγχυματογενείς όγκοι ακολουθούν ιδιαίτερα μονοπάτια ογκογένεσης και εξέλιξης διαφορετικά από αυτά των καρκινωμάτων. Είναι γεγονός ότι η μέχρι σήμερα γενετική εικόνα των καρκινωμάτων γενικά εμφανίζονταν διαφορετική. Στα καρκινώματα κυριαρχούσαν μέχρι πρόσφατα οι πολύπλοκοι καρυότυποι χωρίς χαρακτηριστικές μεταθέσεις και υπήρχε η αντίληψη ότι βασικά σε αυτά τα σημαντικότερα γενετικά γεγονότα είναι οι σημειακές μεταλλάξεις. Αν και υπήρχαν από καιρό μερικές περιπτώσεις με ισοζυγισμένες μεταθέσεις (νεφροί²³⁹, θυρεοειδής²⁴⁰) οι περιπτώσεις αυτές ήταν ελάχιστες. Πρόοδοι στις τεχνικές και στην μεθοδολογία άρχισαν να αλλάζουν αυτή

την εικόνα. Η ανεύρεση απλών μεταθέσεων σε μεγάλο αριθμό περιπτώσεων καρκινωμάτων του μαστού ²⁴¹ κατ' αρχήν και αργότερα και άλλων (παγκρέατος, ²⁴² παχέος εντέρου ²⁴³ κλπ) άρχισαν να διαμορφώνουν μια καινούρια κατάσταση. Ιδιαίτερα δε, ο εντοπισμός υβριδικών γονιδίων πολύ πρόσφατα, στα καρκινώματα του προστάτη⁶⁰ επιβεβαίωσε την επιστημολογική άποψη του Πόπερ²⁴⁴ ότι η απουσία εύρεσης ενός μαύρου κύκνου δεν σημαίνει κατά ανάγκη την ανυπαρξία του. Αυτό οδήγησε τον Hoglund et al²⁴⁵, στο να συνδυάσει τον NA και τον NI και να τις εξετάσει ως πηλίκο NA/NI, το οποίο περιλαμβάνει τη συχνότητα και το είδος των χρωμοσωμικών ανωμαλιών, στα σαρκώματα Ewing και στα συνοβιακά σαρκώματα και στα καρκινώματα. Επομένως η κυτταρογενετική εξέλιξη των παραπάνω σαρκωμάτων εμφανίζει ομοιότητες με αυτή των καρκινωμάτων. Το ίδιο επιχειρήθηκε και στο δικό μας υλικό μεταξύ σαρκωμάτων με απλούς καρυότυπους και σαρκωμάτων με πολύπλοκους. Το πηλίκο NA/NI για την πρώτη κατηγορία όγκων βρέθηκε να είναι 1,33, ενώ για τη δεύτερη 1,30. Επομένως, το συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι μπορεί οι δυο κατηγορίες όγκων να εμφανίζουν διαφορές ως προς τα πρότυπα των γενετικών των γενετικών ανωμαλιών που εμφανίζουν, όμως τελικά το πρότυπο ανάπτυξης του όγκου συνολικά είναι παρόμοιο. Μάλιστα οι ομοιότητες επεκτείνονται και σε διαφορετικής ιστολογικής προέλευσης όγκους. Αν αυτό το τελευταίο στοιχείο συνδυαστεί και από το γεγονός ότι και τα γονίδια που ενέχονται στην ογκογένεση τόσο των σαρκωμάτων, όσο και των αιματολογικών κακοηθειών και των καρκινωμάτων είναι κοινά σε μεγάλο βαθμό⁶¹, τότε μπορεί να συναχθεί το συμπέρασμα ότι οι μηχανισμοί της καρκινογένεσης είναι καθολικοί.

Μελετώντας τα σαρκώματα ως ένα ενιαίο σύνολο τα γενετικά δεδομένα αποκτούν βαρύνουσα σημασία. Τα κυτταρογενετικά αποτελέσματα δείχνουν αυξημένη συχνότητα δομικών ανωμαλιών στα χρωμοσώματα 1, 3, 9, 11, 12, 13 και 16. Ειδικότερα, οι χρωμοσωμικές περιοχές που φαίνεται να συμμετέχουν συχνά σε δομικές ανακατατάξεις είναι: 1p36, 1q25, 3p22, 3q13, 4q34, 7q11, 9p13, 11p11, 11q14, 10q21, 10q22, 13q33, 15q14, 16q11, 16q22, 16p13, 17q25, 19p13, 19q13, 20p13, 20q13, 22p11. Σε αυτές τις περιοχές είναι πιθανό να εδράζονται γονίδια καθοριστικής σημασίας για την εξέλιξη και τη συμπεριφορά των σαρκωμάτων.

Αναλυτικότερα, μελετώντας ξεχωριστά κάθε ιστολογική κατηγορία σαρκωμάτων τα δεδομένα διαφέρουν.

Εκτός των παραπάνω παρατηρήσεων που αφορούσαν την γενετική μελέτη των σαρκωμάτων ως σύνολο, με σκοπό την εξαγωγή χρήσιμων συμπερασμάτων για την

προσέγγιση των μηχανισμών ογκογένεσης, επιχειρήθηκε η αναλυτική μελέτη των συγκεκριμένων γενετικών ανωμαλιών μία προς μια με τελικό σκοπό την ανεύρεση συγκεκριμένων δεικτών διάγνωσης και πρόγνωσης. Σε 19 περιπτώσεις βρέθηκαν οι ήδη γνωστές χαρακτηριστικές μεταθέσεις και υβριδικά γονίδια^{58, 227} που ενέχονται στα σαρκώματα Ewing, στα συνοβιοσαρκώματα και στα λιποσαρκώματα, συγκεκριμένα η μετάθεση t(11;22) και/η το υβριδικό γονίδιο EWS/FLI 5 φορές, η μετάθεση t(X;18) και/η το υβριδικό γονίδιο SYT/SSX 3 φορές και η μετάθεση t(12;16) και/η το υβριδικό γονίδιο FUS/CHOP 11 φορές αντιστοίχως. Οι παραπάνω μεταθέσεις επιβεβαίωσαν τις προηγούμενες μελέτες και ταυτόχρονα πιστοποίησαν την αποτελεσματικότητα των τεχνικών και της μεθοδολογίας που εφαρμόστηκαν στην παρούσα διατριβή.

Όμως εκτός των ανωτέρω μια σειρά νέων δεδομένων προέκυψαν από την μελέτη των ανωμαλιών μια προς μια.

Συγκεκριμένα στα **Λιποσαρκώματα**: 1. Σε ένα από αυτά (0306) εντοπίστηκε, μετά από multicolor FISH ανάλυση, η τετραπλή μετάθεση t(10;12;16;22)(q26;q13;p11;q13). Η πλειοψηφία των λιποσαρκώματων φέρει τις απλές χαρακτηριστικές γι' αυτόν τον όγκο μεταθέσεις t(12;16) και t(12;22), ενώ μόνο 4 φορές έχουν εντοπιστεί τριπλές ή τετραπλές μεταθέσεις⁹⁷. Σε καμία από τις ήδη γνωστές δεν έχει αναφερθεί η συμμετοχή του χρωμοσώματος 10. Κρίθηκε σκόπιμο να διερευνηθεί αν στον σχηματισμό του υβριδικού γονιδίου FUS/CHOP υπεισέρχονται και αλληλουχίες του χρωμοσώματος 10 και 22, ώστε να αλλάζει η δομή του υβριδικού γονιδίου και να λαμβάνει χώρα αλλαγή του μοριακού μηχανισμού. Η μοριακή ανάλυση όμως έδειξε ότι δεν υπεισέρχονται νουκλεοτιδικές αλληλουχίες του χρωμοσώματος 10 ούτε του 22 και επομένως η εμπλοκή του χρωμοσώματος αυτών δεν φαίνεται να παίζει κάποιο λειτουργικό ρόλο.

2. Σε μια άλλη περίπτωση (7298) ένα πολύμορφο λιποσάρκωμα έφερε μία μόνο δομική ανωμαλία, την inv(3)(p13q22), αν και τα πολύμορφα λιποσαρκώματα χαρακτηρίζονται από πολύπλοκους καρυότυπους με δομικές και αριθμητικές ανωμαλίες. Η ανωμαλία αυτή δεν έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα σε πολύμορφο λιποσάρκωμα και είναι πιθανόν στις συγκεκριμένες περιοχές της χρωμοσωμικής αυτής ανακατάταξης να εδράζονται γονίδια που διαδραματίζουν ρόλο στον σχηματισμό ή/και την εξέλιξη αυτού του όγκου^{97, 233}.

3. Τέλος σε μια περίπτωση (15306) καλά διαφοροποιημένου λιποσαρκώματος παρατηρήθηκε η δομική ανωμαλία inv(1;12)(q31;q24q14). Στην περιοχή 12q14-q24 η οποία αναδιατάσσεται με την εισχώρηση του τμήματος του χρωμοσώματος 1 έχει βρεθεί

οτι εδράζεται το γονίδιο MDM2 για το οποίο είναι γνωστό η γονιδιακή του ενίσχυση συνδέεται με διαφορους όγκους λιπώδους προέλευσης²⁴⁶.

Στα Συνοβιακά σαρκώματα: 1. Αξιοσημείωτη παρατήρηση είναι η συχνή εμπλοκή του χρωμοσώματος 19 σε πολύπλοκους καρυοτύπους. Εντοπίσθηκε σε 3 περιπτώσεις από τις 5 που αναλύθηκαν στην παρούσα μελέτη και μπορούμε να την χαρακτηρίσουμε ως δευτερογενή δεδομένου, ότι σε δύο περιπτώσεις συνυπάρχει με την γνωστή χαρακτηριστική πρωτογενή των συνοβιακών σαρκωμάτων $t(X;18)$. Μέχρι σήμερα η ανωμαλία αυτή δεν έχει εντοπισθεί στις δευτερογενείς ανωμαλίες των συνοβιακών σαρκωμάτων στην διεθνή βιβλιογραφία και δεν μπορεί να υπάρξει σαφής ερμηνεία του γιατί στην δική μας σειρά είναι τόσο συχνή, αν δηλαδή είναι τυχαίο γεγονός ή οφείλεται σε κάποιο είδος γεωγραφικής ετερογένειας¹⁴². Είναι επίσης άξιο λόγου ότι σε δυο από τις τρεις περιπτώσεις η εμπλοκή του χρωμοσώματος 19 είναι δομική, ανακατατάσσεται το 19p13. Πιθανά σε αυτή την περιοχή εδράζονται γονίδια σημαντικά της εξέλιξης του όγκου.

2. Σε μια περίπτωση συνοβιακού σαρκώματος (14605) σε ένα απλό κατά τα άλλα καρυότυπο εντοπίστηκε ένα χρωμόσωμα δείκτης (marker). Με την εφαρμογή του πολυχρωματικού FISH ο marker «αποκρυπτογραφήθηκε» και βρέθηκε ότι αποτελούνταν από την τριπλή μετάθεση $t(X;15;18)(p11;q14-15;q11)$, δηλαδή εμπεριέχει την χαρακτηριστική μετάθεση των συνοβιακών σαρκωμάτων $t(X;18)(p11;q11)$. Η ανακατάταξη αυτή, δηλαδή η τριπλή μετάθεση που εμπεριέχει την $t(X;18)$ εντοπίζεται για πρώτη φορά.¹⁴² Η μοριακή ανάλυση όμως έδειξε ότι δεν υπεισέρχονται νουκλεοτιδικές αλληλουχίες του χρωμοσώματος 10 και επομένως η εμπλοκή του χρωμοσώματος αυτού δεν φαίνεται να παίζει κάποιο λειτουργικό ρόλο.

3. Ιδιαίτερη αναφορά πρέπει να γίνει σε δυο περιπτώσεις (14105 και 5903) συνοβιακών σαρκωμάτων. Και στα δυο αυτά περιστατικά απουσιάζε τόσο σε χρωμοσωμικό επίπεδο, όσο και σε μοριακό η χαρακτηριστική μετάθεση $t(X;18)$ και το αντίστοιχο SYT/SSX υβριδικό γονίδιο. Εξαιτίας της πολυπλοκότητας των καρυοτύπων, οι οποίοι δεν επέτρεπαν την εξαγωγή ενός ασφαλούς συμπεράσματος για τις ακριβείς χρωμοσωμικές ανακατατάξεις, αλλά και εξαιτίας της αδυναμίας ανίχνευσης όλων των πιθανών υποτύπων του υβριδικού γονιδίου SYT/SSX, δηλαδή και το SS18/SSX και το SS18L1/SSX, τα δείγματα αυτά έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον^{142, 147}. Θεωρήθηκε λοιπόν, με βάση και τα κυτταρογενετικά δεδομένα, στα οποία εντοπίζεται συμμετοχή της περιοχής 3p21 δομικές ανωμαλίες, καθώς και σε συνδυασμό με τα μοριακά ευρήματα, πιθανή η ύπαρξη ενός νέου υποτύπου του υβριδικού γονιδίου SYT/SSX, του SS18L2/SSX. Το

γονίδιο SS18L2 εδράζεται στην περιοχή 3p21^{247, 248}. Προς αυτή την κατεύθυνση, η προσέγγιση που επιχειρήθηκε περιελάμβανε τη χρήση της τεχνικής RACE, με σκοπό τη χαρτογράφηση της αλληλουχίας που θα ξεκινούσε από το 3' άκρο του γονιδίου SSX και θα κατέληγε στο 5' άκρο. Αν υπήρχε σχηματισμός υβριδικού γονιδίου, κάποιο σημείο της αλληλουχίας του SSX γονιδίου θα διακοπτόταν και θα συνέχιζε η αλληλουχία από το SS18L2 γονίδιο. Αυτό ωστόσο, δεν κατέστη δυνατό, αφού στο πρώτο περιστατικό εντοπίστηκαν μόνο αλληλουχίες του SSX γονιδίου, ενώ στη δεύτερη περίπτωση η τεχνική απέτυχε. Έτσι, το ερώτημα που παραμένει, αφορά το μικρό ποσοστό των συνοβιακών σαρκωμάτων στα οποία δεν εντοπίζεται η χαρακτηριστική ανωμαλία με καμία από τις τεχνικές που εφαρμόζονται (G-banding, FISH, PCR)¹⁴³. Σε αυτές τις περιπτώσεις είναι ανοικτό το ενδεχόμενο είτε η ιστολογική διάγνωση να είναι εσφαλμένη, είτε να υπάρχει μια υποκατηγορία από αυτά τα σαρκώματα, τα οποία να σχηματίζονται από μια διαφορετική μετάλλαξη από την t(X;18) που ακόμη παραμένει άγνωστη.

Στα Σαρκώματα Ewing

1. Σε μια περίπτωση ενός σαρκώματος Ewing (18898) Grade III, ο καρυότυπος περιγράφηκε ως 47, XX,del(1)(p31p35),+2. Ο συγκεκριμένος καρυότυπος αποτελέσει έκπληξη όχι μόνο γιατί δεν περιείχε καμμία από τις γνωστές χαρακτηριστικές μεταθέσεις των σαρκωμάτων Ewing, αλλά και γιατί ήταν εξαιρετικά απλός για σάρκωμα υψηλού βαθμού διαφοροποίησης, δεδομένου ότι το υψηλό grade σε αυτούς τους όγκους έχει σχετισθεί με πολύπλοκους καρυότυπους²⁰¹. Η απουσία παθογνωμοινικής μετάθεσης θα μπορούσε να οδηγήσει στην άποψη ότι η μετάθεση είναι «κρυπτική» δηλαδή δεν είναι ορατή στο κοινό μικροσκόπιο²⁴⁹. Η απουσία επιπλέον υλικού στέρησε την δυνατότητα επαλήθευσης ή όχι με μοριακές τεχνικές. Όμως η απλότητα του καρυότυπου οδηγεί σε δύο υποθέσεις. ι. Υπάρχει και άλλο άγνωστο υβριδικό γονίδιο, το οποίο σχηματίζεται ως αποτέλεσμα της έλλειψης με παθογενετική σημασία ανάλογη των γνωστών, δεδομένου ότι το σάρκωμα Ewing είναι γνωστό ότι παρουσιάζει γενετική intertumor ετερογένεια. ιι.Υπαρχει intratumor γενετική ετερογένεια, δηλαδή υπάρχουν περισσότεροι από ένας κλώνοι και ανιχνεύθηκε ένας από τους δύο, όμως μέχρι σήμερα δεν έχει αναφερθεί να συμβαίνει σε αυτό το είδος των όγκων.

2. Δύο ακόμη περιπτώσεις είναι αξιοσημείωτες (14797 και 1198). Και στα δύο το κοινό χαρακτηριστικό είναι η τρισωμία του χρωμοσώματος 7, χωρίς καμμία άλλη δομική ανωμαλία και ιδιαίτερα χωρίς καμμία από τις χαρακτηριστικές μεταθέσεις αυτών των όγκων. Οπωσδήποτε και εδώ μπορεί να υποτεθεί ότι υπάρχουν κρυπτικές μεταθέσεις. Η τρισωμία του χρωμοσώματος 7 επειδή εκτός του γεγονότος ότι είναι συχνό εύρημα

πολλών όγκων και επομένως δεν μπορεί να αξιολογηθεί ως ιδιαίτερο εύρημα, έχει βρεθεί και σε μη νεοπλασματικές καταστάσεις (λιπώδες ήπαρ ²⁵⁰, αρθρίτιδες ²⁵¹) οπότε δεν μπορεί να θεωρηθεί ως παθογενές δεδομένο καθοριστικό της συγκεκριμένης ογκογένεσης^{201, 207, 208, 234, 252, 253}.

Στα Χονδροσαρκώματα

1. Μια περίπτωση (14505) αποτελεί μια σπάνια ιστολογική οντότητα, στην οποία χονδροσάρκωμα Gr I έχει αναπτυχθεί σε έδαφος συνοβιακής χονδρωμάτωσης. Αυτή η σπάνια κατάσταση αποτελεί ένα διαγνωστικό δίλημμα για τον κλινικό ιατρό, καθώς τόσο η ακτινολογικές απεικονίσεις, όσο και η ιστολογική εξέταση δεν μπορούν να διαφοροδιάγνουν τις δυο αυτές καταστάσεις^{167, 168, 254}. Επιπρόσθετα, η μελέτη αυτής της περίπτωσης θέτει το καίριο ερώτημα της διαφοροδιάγνωσης γενικότερα των χονδροσαρκωμάτων Gr I από τις καλοήθεις χονδρογενείς αλλοιώσεις των οστών. Σήμερα, τα κυτταρογενετικά δεδομένα από σειρές μελετών χονδρογενών όγκων υποστηρίζουν την άποψη ότι η ανεύρεση ενός ανώμαλου καρυοτύπου πρέπει να θέτει την υπόνοια της διάγνωσης του κακοήθους χονδροσαρκώματος και όχι μιας καλοήθους χόνδρινης αλλοίωσης^{175, 255, 256}. Στην προκειμένη περίπτωση, ανιχνεύθηκε μια χρωμοσωμική μετάθεση t(1;14) ως μοναδική ανωμαλία. Η συγκεκριμένη μετάθεση δεν έχει αναφερθεί ποτέ, ούτε σε περιπτώσεις χονδροσαρκώματος, ούτε σε περιπτώσεις συνοβιακής χονδρωμάτωσης. Προκειμένου να αναλυθεί και να περιγραφούν τα σημεία θραύσης με μεγαλύτερη ακρίβεια, εφαρμόστηκε και η τεχνική mBAND. Τελικά, η χρωμοσωμική αυτή αναδιάταξη περιγράφηκε με τον καρυότυπο 46,XY,t(1;14)(q23.1~24;q24.1~3). Η κλινική της σημασία παραμένει αδιευκρίνιστη, όμως τα σημεία θραύσης υποδεικνύουν περιοχές με γονίδια, που μπορεί να συμβάλλουν στην εξέλιξη αυτών των όγκων.

2. Τρεις περιπτώσεις χονδροσαρκωμάτων στον ίδιο ασθενή (25097, 19398 και 10898) ήταν από τα δείγματα εκείνα που παρουσίαζαν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω του γεγονότος ότι αναπτύχθηκαν σε ασθενή με πολλαπλές εξοστώσεις. Οι κληρονομικές πολλαπλές εξοστώσεις είναι μια αυτοσωματικά κυρίαρχη νόσος στα άκρα των μακρών οστών. Πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει την ύπαρξη τριών γονιδίων υπεύθυνων για αυτή τη νόσο, των γονιδίων *EXT1*, *EXT2* και *EXT3* τα οποία εδράζονται στις χρωμοσωμικές περιοχές 8q24.1, 11p13 (11p11-12), και 19p αντιστοίχως^{162, 163}. Οι διάφορες μελέτες δίνουν ένα ποσοστό κυμαινόμενο από 0.6% έως 2.8% κινδύνου εξαλαγής σε χονδροσάρκωμα¹⁵⁷. Το ενδιαφέρον εστιάζεται στο γεγονός ότι μέχρι σήμερα δεν έχουν μελετηθεί κυτταρογενετικά ποτέ, περισσότερα από ένα χονδροσαρκώματα στον ίδιο ασθενή με πολλαπλές εξοστώσεις.

Το πρώτο δείγμα χαρακτηρίζεται ως υποτροπή χονδροσάρκωματος στην βουβωνική χώρα δεξιά, το δεύτερο (μετά ένα χρόνο περίπου), ως υποτροπή χονδροσάρκωματος του δεξιού υποχονδρίου Grade I και το τρίτο χαρακτηρίζεται ως υποτροπή χονδροσάρκωματος μηρού δεξιά.. Τα δύο πρώτα εμφανίζουν τριπλοειδικούς πολύπλοκους καρυοτύπους με διάφορες δομικές και αριθμητικές ανωμαλίες, ενώ το τρίτο εμφανίζει φυσιολογικό καρυότυπο. Μια πιθανή ερμηνεία μεταξύ άλλων για αυτή τη διαφορά είναι ότι στα δύο πρώτα, το προς εξέταση δείγμα αντιπροσώπευε το χονδροσάρκωμα, ενώ στο τρίτο την εξόστωση, στην οποία σπάνια εντοπίζονται χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Τα συνήθη χονδροσάρκωματα εμφανίζουν μια γκάμα χρωμοσωμικών αριθμητικών και δομικών αλλαγών χωρίς μέχρι σήμερα να έχει βρεθεί κάποια συγκεκριμένη χαρακτηριστική ανωμαλία¹⁵⁶. Παρόλα αυτά φαίνεται καθαρά ότι το κυτταρογενετικό προφίλ δεν είναι τυχαίο.

Το ενδιαφέρον στα δείγματα του ασθενούς της παρούσας μελέτης εστιάζεται στα κυτταρογενετικά ευρήματα των δύο πρώτων χονδροσάρκωμάτων. Τα οποία εκτός της τριπλοειδίας παρουσιάζουν μια μεγάλη κυτταρογενετική ομοιότητα μεταξύ τους. Συγκεκριμένες πολλές χρωμοσωμικές ανωμαλίες (der3, der3, der9, der19, mar1, mar2, mar3), είναι ακριβώς οι ίδιες και στα δύο, υποδεικνύοντας μια πρωτοφανή ταυτότητα, ως να προκειται περί του ίδιου όγκου. Τέτοιου είδους ποιοτική ταυτότητα και σε τέτοια έκταση, κυτταρογενετικά δεν έχει εντοπισθεί μέχρι σήμερα σε κανένα είδος όγκου πλήν των μεταστάσεων και υπολειπόμενης νόσου. Ο χαρακτηρισμός του χονδροσάρκωματος στην ιστολογική έκθεση, ως υποτροπή, δεδομένου ότι δεν πρόκειται για την ίδια ανατομική θέση, μάλλον δεν ευσταθεί. Επίσης, το γεγονός ότι ο ασθενής φέρει πολλαπλές εξοστώσεις οδηγεί στην άποψη ότι είναι πιθανόν να πρόκειται περί νέου ανεξάρτητου όγκου. Σε αυτή την περίπτωση τα κυτταρογενετικά ευρήματα αναδεικνύονται σε κεφαλαιώδους σημασίας για την ογκογένεση των χονδροσάρκωμάτων, δεδομένου ότι η πολυσταδιακή ογκογένεση με βαθμιαία απόκτηση νέων γενετικών ανωμαλιών μέχρι σήμερα δεν έχει τεκμηριωθεί στους μεσεγχυματογενείς όγκους.

3. Με την τεχνική CGH μελετήθηκαν 4 καλοήθεις χονδρογενείς όγκοι (οστεοχονδρώματα), στα οποία η κλασσική κυτταρογενετική ανάλυση είχε αποτύχει και 8 χονδροσάρκωματα από τα οποία τα 6 επίσης είχαν αποτύχει στην κυτταρογενετική ανάλυση. Από τα 4 οστεοχονδρώματα τα δύο δεν εμφάνισαν μη ισοζυγισμένες ανωμαλίες δηλαδή περίσσεια ή έλλειψη χρωμοσωμικού υλικού όπως ήταν αναμενόμενο για την πλειοψηφία των καλοήθων όγκων που βασικά εμφανίζουν ισοζυγισμένες μεταθέσεις. Τα άλλα δύο παρουσίασαν μια απρόσμενη εικόνα πολλών περιοχών με περίσσεια γενετικού

υλικού 16p11-p13, 19p13 και 19q13 το ένα και περίσσεια του 21q22 το δεύτερο, που δεν μπορεί να ερμηνευθεί εύκολα, ειδικά για το πρώτο.

Στα χονδροσαρκώματα τα 6 απο τα 7 που ήταν Grade I δεν εμφάνισαν ελλείψεις ή περίσσεια γενετικού υλικού που μπορεί να σημαίνει ότι οι τυχόν ανακατατάξεις σε χαμηλής διαφοροποίησης όγκους είναι ισοζυγισμένες. Χωρίς όμως να αποκλείεται το ενδεχόμενο αυτό, το αποτέλεσμα να οφείλεται στα όρια της τεχνικής, δεδομένου ότι προϋπόθεση για επιτυχή ανάλυση είναι η παρουσία 70% των κυττάρων στο δείγμα να είναι νεοπλασματικά. Στα άλλα δύο χονδροσαρκώματα, το ένα με grade I εμφάνισε μια έλλειψη στο 16p11-p12 και το δεύτερο με grade III μια πιο σύνθετη εικόνα που συνάδει με την προχωρημένη διαφοροποίηση, παρουσίασε ελλείψεις των 16p13, 22q11-q13 και περίσσεια των 1q32, 3q24-q26, 4q22-q32, 7q22-q31 και 8q22-q23. Η τελευταία ανακατατάξη είναι συχνό εύρημα και άλλων ερευνητών^{257, 258}.

Στα Οστεοσαρκώματα

Ιδιαίτερη προσοχή αξίζει να δοθεί σε μία περίπτωση (21698) ενός εξωσκελετικού οστεοσαρκώματος, το οποίο αποτελεί μια πολύ σπάνια ιστολογική οντότητα. Έως σήμερα, έχουν δημοσιευθεί μόνο 3 περιστατικά με κυτταρογενετικά ευρήματα. Τα 4 εξωσκελετικά οστεοσαρκώματα που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα, συμπεριλαμβανομένου και του δικού μας, δεν παρουσιάζουν εμφανείς ομοιότητες. Η παρούσα περίπτωση χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη γιγαντιαίων χρωμοσωμάτων και ενός δακτυλιοειδούς χρωμοσώματος. Τα γιγαντιαία χρωμοσώματα φαίνεται ότι αποτελούνται σε μεγάλο μέρος τους από ομογενώς χρωσμένες περιοχές, το κυτταρογενετικό αντίστοιχο της γονιδιακής ενίσχυσης. Η σημαντική intercellular ετερογένεια ως προς τον αριθμό και την δομή των δακτυλιοειδών χρωμοσωμάτων και των γιγαντιαίων markers σε μια υποκατηγορία μεσεγχυματιγενών όγκων, θα μπορούσε να εξηγηθεί από συνεχείς ανασυνδυασμούς κύκλων σπασιμάτων-συγχωνεύσεων και γεφυρών των χρωμοσωμάτων. Αυτή η διεργασία συνεχίζεται μέχρι τα σπασμένα άκρα των χρωμοσωμάτων να σταθεροποιηθούν πχ με την απόκτηση τελομερικών τμημάτων από άλλα χρωμοσώματα. Τέτοιοι σχηματισμοί είναι συχνοί σε όγκους των μαλακών μορίων χαμηλού Grade ή μεταιχμιακούς. Είναι αξιοσημείωτο ότι στην συγκεκριμένη περίπτωση ο ασθενής δεν έχει εμφανίσει σε βάθος δεκαετίας ούτε υποτροπή, ούτε μετάσταση και επομένως είναι πιθανόν σε συνδυασμό με τα παραπάνω η παρουσία τους να αποτελεί ένα δείκτη καλής πρόγνωσης.

Τέλος μία περίπτωση (23898) ενός **Επιθηλιοειδούς Αιμαγγειοενδοθηλιώματος** προσεγγίστηκε με πολλαπλούς τρόπους. Κλασσική κτταρογενετική, πολυχρωματικό FISH, πολυχρωματική ταινιοποίηση και CGH, γιατί παρουσίαζε ένα ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω

της σπανιότητας τέτοιων περιστατικών, των ιδιαίτερων αλλά ασαφών, σε γενικές γραμμές, αποτελεσμάτων της κλασσικής κυτταρογενετικής ανάλυσης και επειδή υπήρχε αξιοποιήσιμο υλικό. Τα τελικά αποτελέσματα αποτελούν ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα της σημασίας της εφαρμογής πολλαπλών προσεγγίσεων στην μελέτη των όγκων²⁵⁹.

Η κλασσική κυτταρογενετική ανίχνευσε 3 σχετιζόμενους κλώνους που εμφανίζουν αριθμητικές και δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες, μονοσωμίες χρωμοσωμάτων, επιπρόσθετα δακτυλιοειδή χρωμοσώματα και markers αγνώστου χρωμοσωμικής προέλευσης, ελλείψεις και επιπρόσθετο χρωμοσωμικό υλικό στα χρωμοσώματα με τις ελλείψεις. Οι τρεις κλώνοι παρουσιάζουν την εξέλιξη των ανωμαλιών με αστάθεια χρωμοσωμική και μετάβαση από την διπλοειδία στην πολυπλειδία. Η CGH τεχνική προσδιόρισε τις ελλείψεις του γενετικού υλικού στην χρωμοσωμική περιοχή 11q21-qter, πρόσθετο γονιδιακό υλικό στην περιοχή 11q13-q14, και ενίσχυση των γονιδίων που εδράζονται στις περιοχές 12q12-q13 και 12q14-q21. Το MFISH προσδιόρισε την φύση των δακτυλιοειδών χρωμοσωμάτων και των markers (ότι αποτελούνται από υλικό του χρωμοσώματος 12) και τέλος η MBAND αποσαφήνισε την συγκεκριμένη θέση των χρωμοσωμικών ελλείψεων και την δομή των markers και δακτυλιοειδών χρωμοσωμάτων, δηλαδή την διάταξη του ενισχυμένου γενετικού υλικού. Στις γενετικές περιοχές που έχουν ενισχυθεί στον συγκεκριμένο όγκο έχει βρεθεί ότι εδράζονται τα γονίδια *CDK4*, *HMG1-C* και *MDM2*. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το τελευταίο γονίδιο έχει βρεθεί σε παλιότερες μελέτες να ενισχύεται και να συμμετέχει σε δακτυλιοειδή χρωμοσώματα σε όγκους των μαλακών μορίων. Επίσης, ότι παίζει ένα σημαντικό ρόλο στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου.

Ωστόσο, τα γενετικά δεδομένα, ιδιαίτερα δε τα κυτταρογενετικά, αν και ήδη έχουν προσφέρει και εξακολουθούν να προσφέρουν πολύτιμες πληροφορίες για την ογκογένεση καθώς και σημαντικά στοιχεία που σχετίζονται με τις κλινικοπαθολογικές κατηγορίες – μερικά πολύτιμα για την **ακριβέστερη ή διαφορική διάγνωση**– εν τούτοις όσον αφορά την **κλινική προγνωστική σημασία**, η εικόνα που παρουσιάζεται δεν είναι ξεκάθαρη. Το γεγονός αυτό οφείλεται κυρίως στο ότι προς το παρόν δεν υπάρχει ικανός αριθμός μελετηθέντων περιπτώσεων. Αυτό γίνεται κατανοητό αν συγκρίνει κανείς τους αριθμούς των ασθενών που έχουν μελετηθεί στις διάφορες κατηγορίες νεοπλασμάτων. Στις αιματολογικές κακοήθειες για παράδειγμα που ήδη υπάρχουν γενετικοί δείκτες όχι μόνον διάγνωσης αλλά πρόγνωσης, ανταπόκρισης στην θεραπεία και παρακολούθησης υπολειπόμενης νόσου, οι κυτταρογενετικές μόνο μελέτες είναι της τάξης 40.000, στα

καρκινώματα λίγων χιλιάδων και στα σαρκώματα δεν ξεπερνούν τις μερικές εκατοντάδες. Ειδικά τα σαρκώματα που αποτελούν μια ομάδα ετερογενών όγκων⁶. Η ομάδα CHAMP διενεργώντας τη μεγαλύτερη μελέτη στον κόσμο, εξέτασε κυτταρογενετικά συνολικά 221 σαρκώματα^{234, 235}.

Στην παρούσα μελέτη αν και εξετάστηκαν 125 ασθενείς είναι φανερό από την ανάγνωση των αποτελεσμάτων ότι αν διαχωρίσει κανείς τους ασθενείς σε κατηγορίες συγκεκριμένων τύπων σαρκωμάτων οι αριθμοί είναι πενιχροί για την εξαγωγή τέτοιου είδους συμπερασμάτων. Η πολυπληθέστερη ομάδα των δικών μας δειγμάτων ανήκε σε ασθενείς με σαρκωμα Ewing (13 ασθενείς). Αν και ο αριθμός είναι εξαιρετικά μικρός φαίνεται ότι υπάρχουν περιπτώσεις που παρ' όλο που ο καρυότυπος είναι εξαιρετικά απλός και με ελάχιστες ανωμαλίες οι ασθενείς στους οποίους ανήκουν αυτοί οι καρυότυποι είχαν δυσμενή εξέλιξη, υποτροπή μετάσταση και κατάληξη. Αυτό το δεδομένο υποδεικνύει ότι η προτεινόμενη από ορισμένους ερευνητές συσχέτιση αριθμού ανωμαλιών, αριθμού χρωμοσωμάτων και τρισωμίας του 20 είναι προς το παρόν επισφαλής. Συμπερασματικά φαίνεται, ότι χρειάζεται μεγάλη συσσώρευση περιπτώσεων ακόμη, ώστε να υπάρξουν σαφείς εκτιμήσεις και αξιόπιστα δεδομένα που αφορούν την συσχέτιση κυτταρογενετικών ευρημάτων και πρόγνωσης.

Συνοψίζοντας, η παρούσα εργασία με τις πολλαπλές προσεγγίσεις, πέρα από την επαλήθευση των μέχρι σήμερα μελετών και με αυτό τον έμμεσο τρόπο, επιβεβαίωσε την ορθότητα της μεθοδολογίας που ακολουθήθηκε, πρόσθεσε περισσότερες περιπτώσεις στην δεξαμενή των δεδομένων και καθιστά ευκολότερη την εξαγωγή συμπερασμάτων. Κυρίως όμως προσέθεσε νέα δεδομένα για τους μηχανισμούς ογκογένεσης και νέες πληροφορίες για γενετικούς δείκτες που πιθανά να παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην κλινική διάγνωση.

XI. Συμπεράσματα

1. Η χρησιμοποίηση πολλαπλών μεθολογικών και τεχνικών προσεγγίσεων αποδείχτηκε ένα χρήσιμο εργαλείο, πιστοποιώντας ευρήματα η μια της άλλης, αποσαφηνίζοντας δεδομένα και αποκαλύπτοντας περαιτέρω ευρήματα. Το αποτέλεσμα αυτό πρέπει να λαμβάνεται ιδιαίτερα υπ' όψιν όσον αφορά την έρευνα αλλά και τις εξετάσεις ρουτίνας ειδικά ως προς την επιλογή της καταλληλότερης για το κάθε συγκεκριμένο ερώτημα.
2. Υπήρξε επιβεβαίωση ευρημάτων προηγούμενων μελετών και συσσώρευση περιστατικών που προστιθέμενα στα ήδη υπάρχοντα συντελούν στην εξαγωγή συμπερασμάτων, δεδομένου ότι ο αριθμός των μελετήθεντων γενετικά μεσεγγυματογενών όγκων είναι εξαιρετικά μικρός συγκρινόμενος με τον αντίστοιχο αριθμό αιματολογικών νεοπλασιών και καρκινωμάτων. Η επιβεβαίωση και η προσθήκη περιστατικών, αφορά τόσον πληροφορίες σχετικές με χρωμοσωμικούς και γονιδιακούς δείκτες διάγνωσης, όσον και γενικώτερων που συνδέουν συγκεκριμένες κλινικοπαθολογικές κατηγορίες με το γενετικό προφίλ των κατηγοριών αυτών, προσθέτοντας στοιχεία στην ογκογένεση.
3. Σημαντικά νέα στοιχεία προέκυψαν για την ογκογένεση των σαρκωμάτων, δηλαδή για τους μηχανισμούς και τα γονίδια που υπεισέρχονται σε αυτούς. Τα σαρκώματα σε σχέση με το κυτταρογενετικό προφίλ τους από προηγούμενες μελέτες αλλά και από την παρούσα κατηγοριοποιούνται σε δυο μεγάλες ομάδες. Σαρκώματα με λίγες απλές και χαρακτηριστικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες (λιποσαρκώματα, συνοβιοσαρκώματα σαρκώματα Ewing κ.α), και σαρκώματα με πολλές και πολύπλοκες χρωμοσωμικές ανωμαλίες (χονδροσαρκώματα, οστεοσαρκώματα κ.α.). Σε αντιπροσωπευτικές ομάδες αυτών των δύο κατηγοριών, λιποσαρκώματα και χονδροσαρκώματα μελετήθηκαν γονίδια (*χrcc4*, *χrcc5*, *χrcc6*, *polm*, *pol,la*, *rad52*), που η λειτουργία τους συνδέεται με την επιδιόρθωση των σπασιμάτων της διπλής έλικας του DNA. Βρέθηκε ότι η εκφραση αυτών των γονιδίων είναι διαφορετική και ερμηνεύθηκε με αυτό τον τρόπο η διαφορετική χρωμοσωμική εικόνα των δύο ανωτέρω ομάδων.

4. Σημαντικό επίσης εύρημα της παρούσας μελέτης ήταν μετά από μια νέα προσέγγιση και επεξεργασία των κυτταρογενετικών αποτελεσμάτων και συγκεκριμένα των ισοζυγισμένων και μη χρωμοσωμικών των σαρκωμάτων η ισχυρή ένδειξη για πρώτη φορά στηριγμένη σε πειραματικά δεδομένα ότι τα σαρκώματα ανεξάρτητα από το κυτταρογενετικό προφίλ τους μοιράζονται τούς ίδιους γενετικούς μηχανισμούς μεταξύ τους και τον ίδιο με τις αιματολογικές κακοήθειες και τα καρκινώματα.
5. Βρέθηκαν νέες χρωμοσωμικές περιοχές που υπάρχει περίσσεια ή έλλειψη χρωμοσωμικού υλικού. Οι περιοχές αυτές περιέχουν νέα γονίδια που πιθανά παίζουν ρόλο στην ογκογένεση των σαρκωμάτων.
6. Τέλος εντοπίστηκαν νέες χρωμοσωμικές ανωμαλίες με προσδιορισμένα τα σημεία θραύσης των χρωμοσωμάτων που ενέχονται στις ανακατατάξεις αυτές και πιθανά οδηγούν στην εύρεση νέων υβριδικών γονιδίων. Οι ανωμαλίες αυτές είναι: I.. Η αναστροφή $inv(3)(p13q22)$ σε ένα ,πολύμορφο λιποσάρκωμα ως μοναδική δομική ανωμαλία. Ανωμαλία. II.. Η εισχώρηση $ins(1;12)(q31;q24q14)$ σε ένα καλά διαφοροποιημένου λιποσάρκωμα. III. Η έλλειψη $del(1)(p31p35)$ ως μοναδική δομική ανωμαλία σε ένα σάρκωμα Ewing. IV. Η μετάθεση $(1;14)(q23.1\sim 24;q24.1\sim 3)$ σε χονδροσάρκωμα που αναπτύχθηκε σε έδαφος συνοβιακής χονδρομάτωσης.

ΧΙΙ. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι μεσεγγυματογενείς όγκοι αποτελούν μια ετερογενή ομάδα όγκων με μεγάλη σημασία ιδιαίτερα από το γεγονός ότι πολλοί από αυτούς εμφανίζονται σε παιδιά και νέους. Παρά την γενικότερη πρόοδο της επιστήμης και ειδικότερα της ογκολογίας εξακολουθούν να είναι όγκοι που αντιμετωπίζονται δύσκολα. Η ραγδαία εξέλιξη της ογκολογικής γενετικής την τελευταία εικοσαετία έχει συμβάλει στην κατανόηση των μηχανισμών ογκογεγένεσης αυτών των όγκων και έχει αρχίσει να δημιουργεί το γενετικό προφίλ τους συσχετίζοντας τις χρωμοσωμικές και γονιδιακές ανακατατάξεις με συγκεκριμένους τύπους όγκων. Οι γενετικές πληροφορίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην κατηγοριοποίηση των μεσεγγυματογενών όγκων, στη μελέτη της βιολογίας τους αλλά και σε άμεσες πρακτικές εφαρμογές, χρησιμοποιώντας τις γενετικές ανακατατάξεις ως δείκτες διαφορικής διάγνωσης ορισμένων δυσδιάγνωστων περιπτώσεων.

Οι μέχρι σήμερα γενετικές πληροφορίες συμβάλουν σημαντικά στην κατανόηση και ως εκ τούτου στην αντιμετώπιση των μεσεγγυματογενών όγκων. Η σημαντικότητα αυτή των γενετικών ευρημάτων σε συνδυασμό με το γεγονός ότι ακόμη υπάρχουν περιπτώσεις που δεν έχουν μελετηθεί καθόλου ή υπάρχουν οριακά δεδομένα (κυρίως για μεθοδολογικούς και τεχνικούς λόγους) αναδεικνύει την ανάγκη πρόσθεσης νέων γενετικών πληροφοριών. Σε αυτή την κατεύθυνση εκπονήθηκε η παρούσα διατριβή, με σκοπό την προσπόριση νέων ευρημάτων και την επαλήθευση αμφιβόλων λόγω αριθμού συμπερασμάτων. Για την επίτευξη του σκοπού αυτού χρησιμοποιήθηκαν πολλαπλές προσεγγίσεις κλασσικής κυτταρογενετικής, μοριακής γενετικής και μοριακής κυτταρογενετικής.

Μελετήθηκαν συνολικά 192 δείγματα από 125 ασθενείς. (125 με κυτταρογενετική, 5 με MFISH και MBAND, 21 με CGH, 22 με PCR, 24 με Real time PCR και 2 με RACE). Τα αποτελέσματα των ανωτέρω μελετών ήταν:

Υπήρξε επιβεβαίωση ευρημάτων προηγούμενων μελετών και συσσώρευση περιστατικών που προστιθέμενα στα ήδη υπάρχοντα συντελούν στην εξαγωγή συμπερασμάτων, δεδομένου ότι σε 12 λιποσαρκώματα, σε 5 σαρκώματα Ewing και σε 4 συνοβιοσαρκώματα έγινε εντοπισμός και χαρακτηρισμός των υβριδικών γονιδίων *FUS/CHOP*, *EWS/FLI* και *SYT/SSX* που τα χαρακτηρίζουν αντιστοίχως και αποτελούν δείκτες διάγνωσης.

Εντοπίστηκαν νέες χρωμοσωμικές ανωμαλίες, με προσδιορισμένα τα σημεία θραύσης των χρωμοσωμάτων που ενέχονται στις ανακατατάξεις αυτές και πιθανά οδηγούν στην εύρεση νέων υβριδικών γονιδίων. Οι ανωμαλίες αυτές είναι: Η αναστροφή $inv(3)(p13q22)$ σε ένα πολύμορφο λιποσάρκωμα ως μοναδική δομική ανωμαλία. Η εισχώρηση $ins(1;12)(q31;q24q14)$ σε ένα καλά διαφοροποιημένου λιποσάρκωμα. Η έλλειψη $del(1)(p31p35)$ ως μοναδική δομική ανωμαλία σε ένα σάρκωμα Ewing. Η μετάθεση $t(1;14)(q23.1\sim24;q24.1\sim3)$ σε χονδροσάρκωμα που αναπτύχθηκε σε έδαφος συνοβιακής χονδρομάτωσης.

Σημαντικά νέα στοιχεία προέκυψαν για την ογκογένεση των σαρκωμάτων, δηλαδή για τους μηχανισμούς και τα γονίδια που υπεισέρχονται σε αυτούς. Τα σαρκώματα σε σχέση με το κυτταρογενετικό προφίλ τους κατηγοριοποιούνται σε δυο μεγάλες ομάδες. Σαρκώματα με λίγες απλές και χαρακτηριστικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες (λιποσαρκώματα, συνοβιοσαρκώματα σαρκώματα Ewing κ.α), και σαρκώματα με πολλές και πολύπλοκες χρωμοσωμικές ανωμαλίες (χονδροσαρκώματα, οστεοσαρκώματα κ.α.). Σε αντιπροσωπευτικές ομάδες αυτών των δύο κατηγοριών, λιποσαρκώματα και χονδροσαρκώματα, η μελέτη των γονιδίων *xrcc4*, *xrcc5*, *xrcc6*, *polm*, *pol*, *la*, *rad52*, που η λειτουργία τους συνδέεται με την επιδιόρθωση των σπασμάτων της διπλής έλικας του DNA, έδειξε ότι η έκφραση αυτών των γονιδίων είναι διαφορετική και ερμηνεύθηκε με αυτό τον τρόπο η διαφορετική χρωμοσωμική εικόνα των δύο ανωτέρω ομάδων.

Σημαντικό επίσης εύρημα της παρούσας μελέτης, ήταν μετά από μια νέα προσέγγιση και επεξεργασία των κυτταρογενετικών αποτελεσμάτων και συγκεκριμένα των ισοζυγισμένων και μη χρωμοσωμικών ανωμαλιών των σαρκωμάτων η ισχυρή ένδειξη για πρώτη φορά στηριγμένη σε πειραματικά δεδομένα, ότι τα σαρκώματα ανεξάρτητα από το κυτταρογενετικό προφίλ τους μοιράζονται τους ίδιους γενετικούς μηχανισμούς μεταξύ τους και τον ίδιο με τις αιματολογικές κακοήθειες και τα καρκινώματα.

Συμπερασματικά, τα ανωτέρω ευρήματα τεκμηριώνουν πρϋπάρχουσες μελέτες και προσθέτουν νέα στοιχεία για τον εντοπισμό γονιδίων που ενέχονται στους μεσεγγυματογενείς όγκους και νέων πληροφοριών για την ογκογένεση τους που πιθανό να οδηγήσουν σε νέους θεραπευτικούς στόχους.

ABSTRACT

Mesenchymal tumors are an heterogeneous group of tumors of great importance because of their occurrence in children and young people. Despite the general development of science and especially of oncology, they still remain tumors that cannot be treated adequately. The great development of genetic oncology the last 20 years has contributed to the understanding of these tumors and has started to create their genetic profile by correlating chromosomal and gene aberrations with several types of tumors. The genetic data play a very important role in the classification of mesenchymal tumors, in the studies of their biology and in practical applications, by using the genetic aberrations as markers for differential diagnosis of several borderline cases.

The already known genetic data contribute to the understanding and subsequently to the treatment of mesenchymal tumors. The importance of the genetic findings combined with the fact that still exist cases that are not studied at all or share borderline features, because of methodological or technical reasons, depict the emergence of addition of new genetic data. This PhD thesis was originated with the scope of finding new genetic data and confirm conclusions that where in doubt because of small number of cases. In order to fulfill that scope we performed several approaches of classical cytogenetics, molecular genetics and molecular cytogenetics.

We studied 192 samples of 125 patients. (125 with cytogenetics, 5 with MFISH and MBAND, 21 with CGH, 22 with PCR, 24 with Real time PCR and 2 with RACE). The results of these studies are:

We confirmed the data that already existed and by adding our cases contributes to the conclusions made, because we analysed 12 liposarcomas, 4 synovial sarcomas and 5 Ewing sarcomas by detecting the fusion genes FUS/CHOP, SYT/SSX and EWS/FLI, which are diagnostic markers.

We also detected new chromosomal aberrations and the precise chromosome breakpoints that can lead to the identification of new fusion genes. These aberrations are: the inversion $\text{inv}(3)(\text{p13q22})$ in a pleomorphic liposarcoma as a sole structural abnormality. The insertion $\text{ins}(1;12)(\text{q31;q24q14})$ in a case of a well differentiated liposarcoma. The deletion $\text{del}(1)(\text{p31p35})$ as a sole structural abnormality in a case of Ewing sarcoma. The translocation $\text{t}(1;14)(\text{q23.1~24;q24.1~3})$ in a case of chondrosarcoma arising in the context of synovial chondromatosis.

Important new data were revealed concerning the oncogenesis of sarcomas, meaning the mechanisms and the genes involved. Sarcomas according to their cytogenetic profile are categorized into 2 groups. Sarcomas with few, simple and characteristic chromosomal abnormalities (liposarcomas, synovial sarcomas, Ewing sarcomas etc) and sarcomas with many and complex chromosomal abnormalities (chondrosarcomas, osteosarcomas etc). In representative tumor types of these 2 categories, liposarcomas and chondrosarcomas, the study of the genes *xrcc4*, *xrcc5*, *xrcc6*, *polm*, *pol,la*, *rad5*. The function of these genes is correlated with the DNA repair of double strand breaks and their study showed that the expression of these genes is different and so can be explained the different chromosomal image of these 2 groups of tumors.

An important also finding from this study was after a new approach the processing of cytogenetic results and especially of balanced and imbalanced chromosomal aberrations in sarcomas. For the first time is indicated by experimental data, that sarcomas despite their cytogenetic profile share the same genetic mechanisms with hematologic malignancies and carcinomas.

To conclude, the data mentioned above confirm old studies, add new evidence to identify new fusion genes involved in the pathogenesis of mesenchymal tumors and add new data for the oncogenesis of these tumors that possibly can lead to the discovery of new therapeutical targets.

XIII. Βιβλιογραφία

1. Love R, International Union against Cancer. Manual of clinical oncology. 7th ed. New York: Wiley-Liss; 1999.
2. Rudson RW. Cancer biology. 4th ed. Oxford ; New York: Oxford University Press; 2007.
3. Hayat MJ, Howlader N, Reichman ME, Edwards BK. Cancer statistics, trends, and multiple primary cancer analyses from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. *Oncologist* 2007;12(1):20-37.
4. Scriver CR. The metabolic & molecular bases of inherited disease. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001.
5. Thompson MW, McInnes RR, Willard HF, Thompson JS. Thompson & Thompson Genetics in medicine. 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co.; 1991.
6. Mitelman F JB, Mertens F, editors. Mitelman database of chromosome aberrations in cancer. Available at <http://cgap.nih.nci.gov/chromosomes/Mitelman>
7. Ames BN, Gold LS. Re: E. Farber, Cell proliferation as a major risk factor for cancer: a concept of doubtful validity. *Cancer Res.*, 55: 3759-3762, 1995. *Cancer Res* 1996;56(18):4267-9; author reply 72-4.
8. Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, Weinberg RA. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 1999;400(6743):464-8.
9. Gustafson GE, Green JA, Cleland JW. Robustness of individual identity in the cries of human infants. *Dev Psychobiol* 1994;27(1):1-9.
10. Boveri T. Zur frage der entstehung maligner tumoren. Jena,: G. Fischer; 1914.
11. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976;194(4260):23-8.
12. Sharpless NE, DePinho RA. Cancer: crime and punishment. *Nature* 2005;436(7051):636-7.
13. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988;319(9):525-32.
14. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61(5):759-67.
15. Weinberg RA, Cold Spring Harbor Laboratory. *Oncogenes and the molecular origins of cancer*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
16. Offit K. *Clinical cancer genetics : risk counseling and management*. New York: Wiley-Liss; 1998.
17. Narod SA, Hawkins MM, Robertson CM, Stiller CA. Congenital anomalies and childhood cancer in Great Britain. *Am J Hum Genet* 1997;60(3):474-85.
18. Heim S, Mitelman F. *Cancer cytogenetics*. 3rd ed. Hoboken, N.J.: John Wiley & Sons; 2009.
19. Muleris M, Almeida A, Dutrillaux AM, et al. Oncogene amplification in human gliomas: a molecular cytogenetic analysis. *Oncogene* 1994;9(9):2717-22.
20. International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature., Shaffer LG, Tommerup N. *ISCN 2005 : an international system for human cytogenetic nomenclature (2005) : recommendations of the International Standing*

Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. Basel ; Farmington, CT: Karger; 2005.

21. Adamowicz M, Radlwimmer B, Rieker RJ, et al. Frequent amplifications and abundant expression of TRIO, NKD2, and IRX2 in soft tissue sarcomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2006;45(9):829-38.
22. Myllykangas S, Bohling T, Knuutila S. Specificity, selection and significance of gene amplifications in cancer. *Semin Cancer Biol* 2007;17(1):42-55.
23. Watson PH, Safneck JR, Le K, Dubik D, Shiu RP. Relationship of c-myc amplification to progression of breast cancer from in situ to invasive tumor and lymph node metastasis. *J Natl Cancer Inst* 1993;85(11):902-7.
24. Ioannidis P, Trangas T, Dimitriadis E, et al. C-MYC and IGF-II mRNA-binding protein (CRD-BP/IMP-1) in benign and malignant mesenchymal tumors. *Int J Cancer* 2001;94(4):480-4.
25. Myllykangas S, Knuutila S. Manifestation, mechanisms and mysteries of gene amplifications. *Cancer Lett* 2006;232(1):79-89.
26. Kiefer PE, Wegmann B, Bacher M, Erbil C, Heidtmann H, Havemann K. Different pattern of expression of cellular oncogenes in human non-small-cell lung cancer cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol* 1990;116(1):29-37.
27. Bordow SB, Haber M, Madafiglio J, Cheung B, Marshall GM, Norris MD. Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene correlates with amplification and overexpression of the N-myc oncogene in childhood neuroblastoma. *Cancer Res* 1994;54(19):5036-40.
28. Gerlach B, Harder AH, Hulsebos TJ, et al. Radiosensitivity and TP 53, EGFR amplification and LOH10 analysis of primary glioma cell cultures. *Strahlenther Onkol* 2002;178(9):491-6.
29. Barth TF, Martin-Subero JJ, Joos S, et al. Gains of 2p involving the REL locus correlate with nuclear c-Rel protein accumulation in neoplastic cells of classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2003;101(9):3681-6.
30. Pollack JR, Sorlie T, Perou CM, et al. Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program of human breast tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(20):12963-8.
31. Myllykangas S, Himberg J, Bohling T, Nagy B, Hollmen J, Knuutila S. DNA copy number amplification profiling of human neoplasms. *Oncogene* 2006;25(55):7324-32.
32. Hattinger CM, Reverter-Branchat G, Remondini D, et al. Genomic imbalances associated with methotrexate resistance in human osteosarcoma cell lines detected by comparative genomic hybridization-based techniques. *Eur J Cell Biol* 2003;82(9):483-93.
33. Paulson TG, Almasan A, Brody LL, Wahl GM. Gene amplification in a p53-deficient cell line requires cell cycle progression under conditions that generate DNA breakage. *Mol Cell Biol* 1998;18(5):3089-100.
34. Quintas-Cardama A, Kantarjian HM, Cortes JE. Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Cancer Control* 2009;16(2):122-31.
35. Joensuu H, Fletcher C, Dimitrijevic S, Silberman S, Roberts P, Demetri G. Management of malignant gastrointestinal stromal tumours. *Lancet Oncol* 2002;3(11):655-64.

36. Bleeker WA, Hayes VM, Karrenbeld A, et al. Impact of KRAS and TP53 mutations on survival in patients with left- and right-sided Dukes' C colon cancer. *Am J Gastroenterol* 2000;95(10):2953-7.
37. McLean SR, Gana-Weisz M, Hartzoulakis B, et al. Imatinib binding and cKIT inhibition is abrogated by the cKIT kinase domain I missense mutation Val654Ala. *Mol Cancer Ther* 2005;4(12):2008-15.
38. Jiang F, Lin F, Price R, et al. Rapid detection of IgH/BCL2 rearrangement in follicular lymphoma by interphase fluorescence in situ hybridization with bacterial artificial chromosome probes. *J Mol Diagn* 2002;4(3):144-9.
39. Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971;68(4):820-3.
40. Maser RS, DePinho RA. Telomeres and the DNA damage response: why the fox is guarding the henhouse. *DNA Repair (Amst)* 2004;3(8-9):979-88.
41. Bartkova J, Horejsi Z, Koed K, et al. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 2005;434(7035):864-70.
42. Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001;411(6835):366-74.
43. Friedberg EC. DNA damage and repair. *Nature* 2003;421(6921):436-40.
44. Auckley DH, Crowell RE, Heaphy ER, et al. Reduced DNA-dependent protein kinase activity is associated with lung cancer. *Carcinogenesis* 2001;22(5):723-7.
45. Helleman J, van Staveren IL, Dinjens WN, et al. Mismatch repair and treatment resistance in ovarian cancer. *BMC Cancer* 2006;6:201.
46. Heyer WD, Li X, Rolfmeier M, Zhang XP. Rad54: the Swiss Army knife of homologous recombination? *Nucleic Acids Res* 2006;34(15):4115-25.
47. Hoogervorst EM, van Steeg H, de Vries A. Nucleotide excision repair- and p53-deficient mouse models in cancer research. *Mutat Res* 2005;574(1-2):3-21.
48. Weinstock DM, Richardson CA, Elliott B, Jasin M. Modeling oncogenic translocations: distinct roles for double-strand break repair pathways in translocation formation in mammalian cells. *DNA Repair (Amst)* 2006;5(9-10):1065-74.
49. Zhang Y, Rowley JD. Chromatin structural elements and chromosomal translocations in leukemia. *DNA Repair (Amst)* 2006;5(9-10):1282-97.
50. Elliott B, Jasin M. Double-strand breaks and translocations in cancer. *Cell Mol Life Sci* 2002;59(2):373-85.
51. Bertolini LR, Bertolini M, Anderson GB, Maga EA, Madden KR, Murray JD. Transient depletion of Ku70 and Xrcc4 by RNAi as a means to manipulate the non-homologous end-joining pathway. *J Biotechnol* 2007;128(2):246-57.
52. Lefevre SH, Coquelle A, Gonin-Laurent N, et al. Non-homologous end-joining genes are not inactivated in human radiation-induced sarcomas with genomic instability. *J Radiat Res (Tokyo)* 2005;46(2):223-31.
53. Le Morvan V, Longy M, Bonaiti-Pellie C, et al. Genetic polymorphisms of the XPG and XPD nucleotide excision repair genes in sarcoma patients. *Int J Cancer* 2006;119(7):1732-5.
54. Xia SJ, Barr FG. Chromosome translocations in sarcomas and the emergence of oncogenic transcription factors. *Eur J Cancer* 2005;41(16):2513-27.
55. Mercado GE, Barr FG. Looking downstream of sarcoma-associated chimeric transcription factors: when is a target really a target? *Cancer Biol Ther* 2005;4(4):456-8.

56. Fujimura Y, Siddique H, Lee L, Rao VN, Reddy ES. EWS-ATF-1 chimeric protein in soft tissue clear cell sarcoma associates with CREB-binding protein and interferes with p53-mediated trans-activation function. *Oncogene* 2001;20(46):6653-9.
57. Ohno T, Rao VN, Reddy ES. EWS/Fli-1 chimeric protein is a transcriptional activator. *Cancer Res* 1993;53(24):5859-63.
58. Sandberg AA. Cytogenetics and molecular genetics of bone and soft-tissue tumors. *Am J Med Genet* 2002;115(3):189-93.
59. Riggi N, Cironi L, Provero P, et al. Expression of the FUS-CHOP fusion protein in primary mesenchymal progenitor cells gives rise to a model of myxoid liposarcoma. *Cancer Res* 2006;66(14):7016-23.
60. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 2005;310(5748):644-8.
61. Mitelman F, Johansson B, Mertens F. Fusion genes and rearranged genes as a linear function of chromosome aberrations in cancer. *Nat Genet* 2004;36(4):331-4.
62. Antonescu CR. The role of genetic testing in soft tissue sarcoma. *Histopathology* 2006;48(1):13-21.
63. Varella-Garcia M. Molecular cytogenetics in solid tumors: laboratorial tool for diagnosis, prognosis, and therapy. *Oncologist* 2003;8(1):45-58.
64. Iwasaki H, Nabeshima K, Nishio J, et al. Pathology of soft-tissue tumors: daily diagnosis, molecular cytogenetics and experimental approach. *Pathol Int* 2009;59(8):501-21.
65. Bayani J, Squire J. Multi-color FISH techniques. *Curr Protoc Cell Biol* 2004;Chapter 22:Unit 22 5.
66. Chudoba I, Hickmann G, Friedrich T, Jauch A, Kozlowski P, Senger G. mBAND: a high resolution multicolor banding technique for the detection of complex intrachromosomal aberrations. *Cytogenet Genome Res* 2004;104(1-4):390-3.
67. Raap AK. Advances in fluorescence in situ hybridization. *Mutat Res* 1998;400(1-2):287-98.
68. Gagos S, Chiourea M, Christodoulidou A, et al. Pericentromeric instability and spontaneous emergence of human neoacrocentric and minute chromosomes in the alternative pathway of telomere lengthening. *Cancer Res* 2008;68(19):8146-55.
69. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235(4785):177-82.
70. Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, et al. Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 1994;10(4):231-43.
71. Teixeira MR, Tsarouha H, Kraggerud SM, et al. Evaluation of breast cancer polyclonality by combined chromosome banding and comparative genomic hybridization analysis. *Neoplasia* 2001;3(3):204-14.
72. Davies JJ, Wilson IM, Lam WL. Array CGH technologies and their applications to cancer genomes. *Chromosome Res* 2005;13(3):237-48.
73. Knutsen T, Gobu V, Knaus R, et al. The interactive online SKY/M-FISH & CGH database and the Entrez cancer chromosomes search database: linkage of

chromosomal aberrations with the genome sequence. *Genes Chromosomes Cancer* 2005;44(1):52-64.

74. Junqueira LCU, Carneiro J, Contopoulos AN. Basic histology. In. Los Altos, Calif.: Lange Medical Publications; 1975:v.

75. Fletcher CDM UK, Mertens F. World Health Organization classification of tumors. Pathology and genetics of tumors of soft tissue and bone. Lyon: IARC Press, 2002.

76. Tallini G, Akerman M, Dal Cin P, et al. Combined morphologic and karyotypic study of 28 myxoid liposarcomas. Implications for a revised morphologic typing, (a report from the CHAMP Group). *Am J Surg Pathol* 1996;20(9):1047-55.

77. Montgomery E, Argani P, Hicks JL, DeMarzo AM, Meeker AK. Telomere lengths of translocation-associated and nontranslocation-associated sarcomas differ dramatically. *Am J Pathol* 2004;164(5):1523-9.

78. Singer S, Demetri GD, Baldini EH, Fletcher CD. Management of soft-tissue sarcomas: an overview and update. *Lancet Oncol* 2000;1:75-85.

79. Gustafson P. Soft tissue sarcoma. Epidemiology and prognosis in 508 patients. *Acta Orthop Scand Suppl* 1994;259:1-31.

80. Eriksson M, Hardell L, Adami HO. Exposure to dioxins as a risk factor for soft tissue sarcoma: a population-based case-control study. *J Natl Cancer Inst* 1990;82(6):486-90.

81. Karlsson P, Holmberg E, Samuelsson A, Johansson KA, Wallgren A. Soft tissue sarcoma after treatment for breast cancer--a Swedish population-based study. *Eur J Cancer* 1998;34(13):2068-75.

82. Weiss RA, Whitby D, Talbot S, Kellam P, Boshoff C. Human herpesvirus type 8 and Kaposi's sarcoma. *J Natl Cancer Inst Monogr* 1998(23):51-4.

83. McClain KL, Leach CT, Jenson HB, et al. Association of Epstein-Barr virus with leiomyosarcomas in children with AIDS. *N Engl J Med* 1995;332(1):12-8.

84. Skubitz KM, D'Adamo DR. Sarcoma. *Mayo Clin Proc* 2007;82(11):1409-32.

85. Enzinger FM, Weiss SW. Soft tissue tumors. 2nd ed. St. Louis: Mosby; 1988.

86. Sandberg AA. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: lipoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;150(2):93-115.

87. Schoenmakers EF, Wanschura S, Mols R, Bullerdiek J, Van den Berghe H, Van de Ven WJ. Recurrent rearrangements in the high mobility group protein gene, HMGI-C, in benign mesenchymal tumours. *Nat Genet* 1995;10(4):436-44.

88. Ashar HR, Fejzo MS, Tkachenko A, et al. Disruption of the architectural factor HMGI-C: DNA-binding AT hook motifs fused in lipomas to distinct transcriptional regulatory domains. *Cell* 1995;82(1):57-65.

89. Collins MH, Chatten J. Lipoblastoma/lipoblastomatosis: a clinicopathologic study of 25 tumors. *Am J Surg Pathol* 1997;21(10):1131-7.

90. Hibbard MK, Kozakewich HP, Dal Cin P, et al. PLAG1 fusion oncogenes in lipoblastoma. *Cancer Res* 2000;60(17):4869-72.

91. Sciort R, Akerman M, Dal Cin P, et al. Cytogenetic analysis of subcutaneous angiolipoma: further evidence supporting its difference from ordinary pure lipomas: a report of the CHAMP Study Group. *Am J Surg Pathol* 1997;21(4):441-4.

92. Weiss SW, Rao VK. Well-differentiated liposarcoma (atypical lipoma) of deep soft tissue of the extremities, retroperitoneum, and miscellaneous sites. A follow-up study of 92 cases with analysis of the incidence of "dedifferentiation". *Am J Surg Pathol* 1992;16(11):1051-8.
93. Dal Cin P, Kools P, Sciort R, et al. Cytogenetic and fluorescence in situ hybridization investigation of ring chromosomes characterizing a specific pathologic subgroup of adipose tissue tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1993;68(2):85-90.
94. Hasegawa T, Seki K, Hasegawa F, et al. Dedifferentiated liposarcoma of retroperitoneum and mesentery: varied growth patterns and histological grades--a clinicopathologic study of 32 cases. *Hum Pathol* 2000;31(6):717-27.
95. Gisselsson D, Pettersson L, Hoglund M, et al. Chromosomal breakage-fusion-bridge events cause genetic intratumor heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(10):5357-62.
96. Gustafson P, Rydholm A, Willen H, Baldetorp B, Ferno M, Akerman M. Liposarcoma: a population-based epidemiologic and prognostic study of features of 43 patients, including tumor DNA content. *Int J Cancer* 1993;55(4):541-6.
97. Sandberg AA. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: liposarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;155(1):1-24.
98. Nakanishi H, Araki N, Joyama S, et al. Myxoid liposarcoma with adipocytic maturation: detection of TLS/CHOP fusion gene transcript. *Diagn Mol Pathol* 2004;13(2):92-6.
99. Matsui Y, Ueda T, Kubo T, et al. A novel type of EWS-CHOP fusion gene in myxoid liposarcoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;348(2):437-40.
100. Perez-Losada J, Sanchez-Martin M, Rodriguez-Garcia MA, et al. Liposarcoma initiated by FUS/TLS-CHOP: the FUS/TLS domain plays a critical role in the pathogenesis of liposarcoma. *Oncogene* 2000;19(52):6015-22.
101. Willeke F, Ridder R, Mechttersheimer G, et al. Analysis of FUS-CHOP fusion transcripts in different types of soft tissue liposarcoma and their diagnostic implications. *Clin Cancer Res* 1998;4(7):1779-84.
102. Antonescu CR, Elahi A, Healey JH, et al. Monoclonality of multifocal myxoid liposarcoma: confirmation by analysis of TLS-CHOP or EWS-CHOP rearrangements. *Clin Cancer Res* 2000;6(7):2788-93.
103. Kanoe H, Nakayama T, Hosaka T, et al. Characteristics of genomic breakpoints in TLS-CHOP translocations in liposarcomas suggest the involvement of Translin and topoisomerase II in the process of translocation. *Oncogene* 1999;18(3):721-9.
104. Fletcher CD. Pleomorphic malignant fibrous histiocytoma: fact or fiction? A critical reappraisal based on 159 tumors diagnosed as pleomorphic sarcoma. *Am J Surg Pathol* 1992;16(3):213-28.
105. Szymanska J, Virolainen M, Tarkkanen M, et al. Overrepresentation of 1q21-23 and 12q13-21 in lipoma-like liposarcomas but not in benign lipomas: a comparative genomic hybridization study. *Cancer Genet Cytogenet* 1997;99(1):14-8.
106. Meis-Kindblom JM, Sjogren H, Kindblom LG, et al. Cytogenetic and molecular genetic analyses of liposarcoma and its soft tissue simulators: recognition of new variants and differential diagnosis. *Virchows Arch* 2001;439(2):141-51.

107. Coffin CM, Jaszcz W, O'Shea PA, Dehner LP. So-called congenital-infantile fibrosarcoma: does it exist and what is it? *Pediatr Pathol* 1994;14(1):133-50.
108. Sandberg AA, Bridge JA. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: congenital (infantile) fibrosarcoma and mesoblastic nephroma. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;132(1):1-13.
109. Scott SM, Reiman HM, Pritchard DJ, Ilstrup DM. Soft tissue fibrosarcoma. A clinicopathologic study of 132 cases. *Cancer* 1989;64(4):925-31.
110. Limon J, Szadowska A, Iliszko M, et al. Recurrent chromosome changes in two adult fibrosarcomas. *Genes Chromosomes Cancer* 1998;21(2):119-23.
111. Devaney DM, Dervan P, O'Neill S, Carney D, Leader M. Low-grade fibromyxoid sarcoma. *Histopathology* 1990;17(5):463-5.
112. Storlazzi CT, Mertens F, Nascimento A, et al. Fusion of the FUS and BBF2H7 genes in low grade fibromyxoid sarcoma. *Hum Mol Genet* 2003;12(18):2349-58.
113. Panagopoulos I, Storlazzi CT, Fletcher CD, et al. The chimeric FUS/CREB3L2 gene is specific for low-grade fibromyxoid sarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2004;40(3):218-28.
114. Mentzel T, Calonje E, Wadden C, et al. Myxofibrosarcoma. Clinicopathologic analysis of 75 cases with emphasis on the low-grade variant. *Am J Surg Pathol* 1996;20(4):391-405.
115. Simons A, Schepens M, Jeuken J, et al. Frequent loss of 9p21 (p16(INK4A)) and other genomic imbalances in human malignant fibrous histiocyoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;118(2):89-98.
116. Ushijima M, Hashimoto H, Tsuneyoshi M, Enjoji M. Giant cell tumor of the tendon sheath (nodular tenosynovitis). A study of 207 cases to compare the large joint group with the common digit group. *Cancer* 1986;57(4):875-84.
117. Sciort R, Rosai J, Dal Cin P, et al. Analysis of 35 cases of localized and diffuse tenosynovial giant cell tumor: a report from the Chromosomes and Morphology (CHAMP) study group. *Mod Pathol* 1999;12(6):576-9.
118. Brandal P, Bjerkehagen B, Heim S. Molecular cytogenetic characterization of tenosynovial giant cell tumors. *Neoplasia* 2004;6(5):578-83.
119. Engellau J, Anderson H, Rydholm A, et al. Time dependence of prognostic factors for patients with soft tissue sarcoma: a Scandinavian Sarcoma Group Study of 338 malignant fibrous histiocyomas. *Cancer* 2004;100(10):2233-9.
120. Idbaih A, Coindre JM, Derre J, et al. Myxoid malignant fibrous histiocyoma and pleomorphic liposarcoma share very similar genomic imbalances. *Lab Invest* 2005;85(2):176-81.
121. Chibon F, Mariani O, Derre J, et al. ASK1 (MAP3K5) as a potential therapeutic target in malignant fibrous histiocyomas with 12q14-q15 and 6q23 amplifications. *Genes Chromosomes Cancer* 2004;40(1):32-7.
122. Nielsen TO, West RB, Linn SC, et al. Molecular characterisation of soft tissue tumours: a gene expression study. *Lancet* 2002;359(9314):1301-7.
123. de Saint Aubain Somerhausen N, Fletcher CD. Leiomyosarcoma of soft tissue in children: clinicopathologic analysis of 20 cases. *Am J Surg Pathol* 1999;23(7):755-63.
124. Wang R, Titley JC, Lu YJ, et al. Loss of 13q14-q21 and gain of 5p14-pter in the progression of leiomyosarcoma. *Mod Pathol* 2003;16(8):778-85.

125. Mackenzie WE, Holmes DS, Newton JR. A study comparing transcervical with transabdominal chorionic villus sampling (CVS). *Br J Obstet Gynaecol* 1988;95(1):75-8.
126. Barr FG. Molecular genetics and pathogenesis of rhabdomyosarcoma. *J Pediatr Hematol Oncol* 1997;19(6):483-91.
127. Goldstein M, Meller I, Issakov J, Orr-Urtreger A. Novel genes implicated in embryonal, alveolar, and pleomorphic rhabdomyosarcoma: a cytogenetic and molecular analysis of primary tumors. *Neoplasia* 2006;8(5):332-43.
128. Meloni-Ehrig A, Smith B, Zgoda J, et al. Translocation (2;8)(q35;q13): a recurrent abnormality in congenital embryonal rhabdomyosarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2009;191(1):43-5.
129. Ho RH, Johnson J, Dev VG, Whitlock JA. A novel t(2;20)(q35;p12) in embryonal rhabdomyosarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;151(1):73-7.
130. Croes R, Debiec-Rychter M, Cokelaere K, De Vos R, Hagemeijer A, Sciort R. Adult sclerosing rhabdomyosarcoma: cytogenetic link with embryonal rhabdomyosarcoma. *Virchows Arch* 2005;446(1):64-7.
131. Weber-Hall S, Anderson J, McManus A, et al. Gains, losses, and amplification of genomic material in rhabdomyosarcoma analyzed by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 1996;56(14):3220-4.
132. Tsokos M, Webber BL, Parham DM, et al. Rhabdomyosarcoma. A new classification scheme related to prognosis. *Arch Pathol Lab Med* 1992;116(8):847-55.
133. Xia SJ, Pressey JG, Barr FG. Molecular pathogenesis of rhabdomyosarcoma. *Cancer Biol Ther* 2002;1(2):97-104.
134. Barr FG. Gene fusions involving PAX and FOX family members in alveolar rhabdomyosarcoma. *Oncogene* 2001;20(40):5736-46.
135. Meddeb M, Valent A, Danglot G, et al. MDM2 amplification in a primary alveolar rhabdomyosarcoma displaying a t(2;13)(q35;q14). *Cytogenet Cell Genet* 1996;73(4):325-30.
136. Driman D, Thorner PS, Greenberg ML, Chilton-MacNeill S, Squire J. MYCN gene amplification in rhabdomyosarcoma. *Cancer* 1994;73(8):2231-7.
137. Furlong MA, Fanburg-Smith JC, Miettinen M. The morphologic spectrum of hibernoma: a clinicopathologic study of 170 cases. *Am J Surg Pathol* 2001;25(6):809-14.
138. Gordon A, McManus A, Anderson J, et al. Chromosomal imbalances in pleomorphic rhabdomyosarcomas and identification of the alveolar rhabdomyosarcoma-associated PAX3-FOXO1A fusion gene in one case. *Cancer Genet Cytogenet* 2003;140(1):73-7.
139. Mentzel T, Beham A, Calonje E, Katenkamp D, Fletcher CD. Epithelioid hemangioendothelioma of skin and soft tissues: clinicopathologic and immunohistochemical study of 30 cases. *Am J Surg Pathol* 1997;21(4):363-74.
140. Mendlick MR, Nelson M, Pickering D, et al. Translocation t(1;3)(p36.3;q25) is a nonrandom aberration in epithelioid hemangioendothelioma. *Am J Surg Pathol* 2001;25(5):684-7.
141. dos Santos NR, de Bruijn DR, van Kessel AG. Molecular mechanisms underlying human synovial sarcoma development. *Genes Chromosomes Cancer* 2001;30(1):1-14.
142. Sandberg AA, Bridge JA. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors. Synovial sarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;133(1):1-23.

143. Amary MF, Berisha F, Bernardi Fdel C, et al. Detection of SS18-SSX fusion transcripts in formalin-fixed paraffin-embedded neoplasms: analysis of conventional RT-PCR, qRT-PCR and dual color FISH as diagnostic tools for synovial sarcoma. *Mod Pathol* 2007;20(4):482-96.
144. Tamborini E, Agus V, Mezzelani A, et al. Identification of a novel spliced variant of the SYT gene expressed in normal tissues and in synovial sarcoma. *Br J Cancer* 2001;84(8):1087-94.
145. Tornkvist M, Brodin B, Bartolazzi A, Larsson O. A novel type of SYT/SSX fusion: methodological and biological implications. *Mod Pathol* 2002;15(6):679-85.
146. Fligman I, Lonardo F, Jhanwar SC, Gerald WL, Woodruff J, Ladanyi M. Molecular diagnosis of synovial sarcoma and characterization of a variant SYT-SSX2 fusion transcript. *Am J Pathol* 1995;147(6):1592-9.
147. Storlazzi CT, Mertens F, Mandahl N, et al. A novel fusion gene, SS18L1/SSX1, in synovial sarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;37(2):195-200.
148. Allander SV, Illei PB, Chen Y, et al. Expression profiling of synovial sarcoma by cDNA microarrays: association of ERBB2, IGFBP2, and ELF3 with epithelial differentiation. *Am J Pathol* 2002;161(5):1587-95.
149. Skytting BT, Szymanska J, Aalto Y, et al. Clinical importance of genomic imbalances in synovial sarcoma evaluated by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 1999;115(1):39-46.
150. Deenik W, Mooi WJ, Rutgers EJ, Peterse JL, Hart AA, Kroon BB. Clear cell sarcoma (malignant melanoma) of soft parts: A clinicopathologic study of 30 cases. *Cancer* 1999;86(6):969-75.
151. Sandberg AA, Bridge JA. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: clear cell sarcoma (malignant melanoma of soft parts). *Cancer Genet Cytogenet* 2001;130(1):1-7.
152. Foschini MP, Eusebi V. Alveolar soft-part sarcoma: a new type of rhabdomyosarcoma? *Semin Diagn Pathol* 1994;11(1):58-68.
153. Sandberg A, Bridge J. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: alveolar soft part sarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;136(1):1-9.
154. Meis-Kindblom JM, Bergh P, Gunterberg B, Kindblom LG. Extraskeletal myxoid chondrosarcoma: a reappraisal of its morphologic spectrum and prognostic factors based on 117 cases. *Am J Surg Pathol* 1999;23(6):636-50.
155. Day SJ, Nelson M, Rosenthal H, Vergara GG, Bridge JA. Der(16)t(1;16)(q21;q13) as a secondary structural aberration in yet a third sarcoma, extraskeletal myxoid chondrosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1997;20(4):425-7.
156. Sandberg AA, Bridge JA. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: chondrosarcoma and other cartilaginous neoplasms. *Cancer Genet Cytogenet* 2003;143(1):1-31.
157. Sandberg AA. Genetics of chondrosarcoma and related tumors. *Curr Opin Oncol* 2004;16(4):342-54.
158. Gatter KM, Olson S, Lawce H, Rader AE. Trisomy 8 as the sole cytogenetic abnormality in a case of extraskeletal mesenchymal chondrosarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2005;159(2):151-4.
159. Gerald WL, Miller HK, Battifora H, Miettinen M, Silva EG, Rosai J. Intra-abdominal desmoplastic small round-cell tumor. Report of 19 cases of a

- distinctive type of high-grade polyphenotypic malignancy affecting young individuals. *Am J Surg Pathol* 1991;15(6):499-513.
160. Liu J, Nau MM, Yeh JC, Allegra CJ, Chu E, Wright JJ. Molecular heterogeneity and function of EWS-WT1 fusion transcripts in desmoplastic small round cell tumors. *Clin Cancer Res* 2000;6(9):3522-9.
 161. Dorfman HD, Czerniak B. Bone cancers. *Cancer* 1995;75(1 Suppl):203-10.
 162. Wuyts W, Van Hul W, Hendrickx J, et al. Identification and characterization of a novel member of the EXT gene family, EXTL2. *Eur J Hum Genet* 1997;5(6):382-9.
 163. Ahn J, Ludecke HJ, Lindow S, et al. Cloning of the putative tumour suppressor gene for hereditary multiple exostoses (EXT1). *Nat Genet* 1995;11(2):137-43.
 164. Sawyer JR, Thomas EL, Lukacs JL, et al. Recurring breakpoints of 1p13 approximately p22 in osteochondroma. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;138(2):102-6.
 165. Rozeman LB, Hameetman L, van Wezel T, et al. cDNA expression profiling of chondrosarcomas: Ollier disease resembles solitary tumours and alteration in genes coding for components of energy metabolism occurs with increasing grade. *J Pathol* 2005;207(1):61-71.
 166. Gunawan B, Weber M, Bergmann F, Wildberger J, Niethard FU, Fuzesi L. Clonal chromosome abnormalities in enchondromas and chondrosarcomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;120(2):127-30.
 167. Wittkop B, Davies AM, Mangham DC. Primary synovial chondromatosis and synovial chondrosarcoma: a pictorial review. *Eur Radiol* 2002;12(8):2112-9.
 168. Hallam P, Ashwood N, Cobb J, Fazal A, Heatley W. Malignant transformation in synovial chondromatosis of the knee? *Knee* 2001;8(3):239-42.
 169. Sciot R, Dal Cin P, Bellemans J, Samson I, Van den Berghe H, Van Damme B. Synovial chondromatosis: clonal chromosome changes provide further evidence for a neoplastic disorder. *Virchows Arch* 1998;433(2):189-91.
 170. Buddingh EP, Krallman P, Neff JR, Nelson M, Liu J, Bridge JA. Chromosome 6 abnormalities are recurrent in synovial chondromatosis. *Cancer Genet Cytogenet* 2003;140(1):18-22.
 171. Sun X, Lewandoski M, Meyers EN, Liu YH, Maxson RE, Jr., Martin GR. Conditional inactivation of *Fgf4* reveals complexity of signalling during limb bud development. *Nat Genet* 2000;25(1):83-6.
 172. Papachristou D, Pirttiniemi P, Kantomaa T, Agnantis N, Basdra EK. Fos- and Jun-related transcription factors are involved in the signal transduction pathway of mechanical loading in condylar chondrocytes. *Eur J Orthod* 2006;28(1):20-6.
 173. Papachristou DJ, Papachristou GI, Papaefthimiou OA, Agnantis NJ, Basdra EK, Papavassiliou AG. The MAPK-AP-1/-Runx2 signalling axes are implicated in chondrosarcoma pathobiology either independently or via up-regulation of VEGF. *Histopathology* 2005;47(6):565-74.
 174. Rubin BP, Fletcher JA. Skeletal and extraskeletal myxoid chondrosarcoma: related or distinct tumors? *Adv Anat Pathol* 1999;6(4):204-12.
 175. Mandahl N, Gustafson P, Mertens F, et al. Cytogenetic aberrations and their prognostic impact in chondrosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2002;33(2):188-200.

176. Larramendy ML, Tarkkanen M, Valle J, et al. Gains, losses, and amplifications of DNA sequences evaluated by comparative genomic hybridization in chondrosarcomas. *Am J Pathol* 1997;150(2):685-91.
177. Bovee JV, Cleton-Jansen AM, Rosenberg C, Taminiau AH, Cornelisse CJ, Hogendoorn PC. Molecular genetic characterization of both components of a dedifferentiated chondrosarcoma, with implications for its histogenesis. *J Pathol* 1999;189(4):454-62.
178. Casorzo L, Chiecchio L, Pisacane A, et al. Cytogenetic findings in a case of dedifferentiated chondrosarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2003;144(1):61-4.
179. Aigner T, Loos S, Muller S, Sandell LJ, Unni KK, Kirchner T. Cell differentiation and matrix gene expression in mesenchymal chondrosarcomas. *Am J Pathol* 2000;156(4):1327-35.
180. Theodorou DJ, Theodorou SJ, Xenakis T, Demou S, Agnantis N, Soucacos PN. Mesenchymal chondrosarcoma of soft tissues of the calf. *Am J Orthop* 2001;30(4):329-32.
181. Naumann S, Krallman PA, Unni KK, Fidler ME, Neff JR, Bridge JA. Translocation der(13;21)(q10;q10) in skeletal and extraskeletal mesenchymal chondrosarcoma. *Mod Pathol* 2002;15(5):572-6.
182. Wehrli BM, Huang W, De Crombrughe B, Ayala AG, Czerniak B. Sox9, a master regulator of chondrogenesis, distinguishes mesenchymal chondrosarcoma from other small blue round cell tumors. *Hum Pathol* 2003;34(3):263-9.
183. Nishio J, Reith JD, Ogose A, Maale G, Neff JR, Bridge JA. Cytogenetic findings in clear cell chondrosarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2005;162(1):74-7.
184. Dal Cin P, Sciot R, Samson I, De Wever I, Van den Berghe H. Osteoid osteoma and osteoblastoma with clonal chromosome changes. *Br J Cancer* 1998;78(3):344-8.
185. Baruffi MR, Volpon JB, Neto JB, Casartelli C. Osteoid osteomas with chromosome alterations involving 22q. *Cancer Genet Cytogenet* 2001;124(2):127-31.
186. Sandberg AA, Bridge JA. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: osteosarcoma and related tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 2003;145(1):1-30.
187. Mascarello JT, Krous HF, Carpenter PM. Unbalanced translocation resulting in the loss of the chromosome 17 short arm in an osteoblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1993;69(1):65-7.
188. Angervall L, Persson S, Stenman G, Kindblom LG. Large cell, epithelioid, telangiectatic osteoblastoma: a unique pseudosarcomatous variant of osteoblastoma. *Hum Pathol* 1999;30(10):1254-9.
189. Hopper KD, Egli KD, Haseman DB, Moser RP, Jr. Osteosarcomatosis and metastatic osteosarcoma. *Cancer Treat Res* 1993;62:163-71.
190. Forus A, Larramendy ML, Meza-Zepeda LA, et al. Dedifferentiation of a well-differentiated liposarcoma to a highly malignant metastatic osteosarcoma: amplification of 12q14 at all stages and gain of 1q22-q24 associated with metastases. *Cancer Genet Cytogenet* 2001;125(2):100-11.
191. Ladanyi M, Bridge JA. Contribution of molecular genetic data to the classification of sarcomas. *Hum Pathol* 2000;31(5):532-8.
192. Tsuchiya T, Sekine K, Hinohara S, Namiki T, Nobori T, Kaneko Y. Analysis of the p16INK4, p14ARF, p15, TP53, and MDM2 genes and their

prognostic implications in osteosarcoma and Ewing sarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;120(2):91-8.

193. Ulaner GA, Huang HY, Otero J, et al. Absence of a telomere maintenance mechanism as a favorable prognostic factor in patients with osteosarcoma. *Cancer Res* 2003;63(8):1759-63.

194. Stock C, Kager L, Fink FM, Gadner H, Ambros PF. Chromosomal regions involved in the pathogenesis of osteosarcomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;28(3):329-36.

195. Selvarajah S, Yoshimoto M, Maire G, et al. Identification of cryptic microaberrations in osteosarcoma by high-definition oligonucleotide array comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2007;179(1):52-61.

196. Selvarajah S, Yoshimoto M, Ludkovski O, et al. Genomic signatures of chromosomal instability and osteosarcoma progression detected by high resolution array CGH and interphase FISH. *Cytogenet Genome Res* 2008;122(1):5-15.

197. Grubb G, Hctor V, Venter D, Choong P. Inversion (6)(p23q15) as the sole anomaly in a low-grade intraosseous osteosarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1999;109(1):70-1.

198. Wunder JS, Eppert K, Burrow SR, Gokgoz N, Bell RS, Andrulis IL. Co-amplification and overexpression of CDK4, SAS and MDM2 occurs frequently in human parosteal osteosarcomas. *Oncogene* 1999;18(3):783-8.

199. Dehner LP. Primitive neuroectodermal tumor and Ewing's sarcoma. *Am J Surg Pathol* 1993;17(1):1-13.

200. de Alava E, Gerald WL. Molecular biology of the Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor family. *J Clin Oncol* 2000;18(1):204-13.

201. Sandberg AA, Bridge JA. Updates on cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: Ewing sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;123(1):1-26.

202. Mastrangelo T, Modena P, Tornielli S, et al. A novel zinc finger gene is fused to EWS in small round cell tumor. *Oncogene* 2000;19(33):3799-804.

203. Zhao L, Hayes K, Van Fleet T, Glassman A. Detection of a novel reciprocal t(16;22)(q11.2;q12) in a Ewing sarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2003;140(1):55-7.

204. Mangham DC, Williams A, McMullan DJ, et al. Ewing's sarcoma of bone: the detection of specific transcripts in a large, consecutive series of formalin-fixed, decalcified, paraffin-embedded tissue samples using the reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Histopathology* 2006;48(4):363-76.

205. Stark B, Mor C, Jeison M, et al. Additional chromosome 1q aberrations and der(16)t(1;16), correlation to the phenotypic expression and clinical behavior of the Ewing family of tumors. *J Neurooncol* 1997;31(1-2):3-8.

206. Betts DR, Avoledo P, von der Weid N, Greiner J, Niggli FK. Cytogenetic characterization of Ewing tumors with high-ploidy. *Cancer Genet Cytogenet* 2005;159(2):160-3.

207. Hattinger CM, Potschger U, Tarkkanen M, et al. Prognostic impact of chromosomal aberrations in Ewing tumours. *Br J Cancer* 2002;86(11):1763-9.

208. Roberts P, Burchill SA, Brownhill S, et al. Ploidy and karyotype complexity are powerful prognostic indicators in the Ewing's sarcoma family of tumors: a study by the United Kingdom Cancer Cytogenetics and the Children's Cancer and Leukaemia Group. *Genes Chromosomes Cancer* 2008;47(3):207-20.

209. Ferreira BI, Alonso J, Carrillo J, et al. Array CGH and gene-expression profiling reveals distinct genomic instability patterns associated with DNA repair and cell-cycle checkpoint pathways in Ewing's sarcoma. *Oncogene* 2008;27(14):2084-90.
210. Ohali A, Avigad S, Zaizov R, et al. Prediction of high risk Ewing's sarcoma by gene expression profiling. *Oncogene* 2004;23(55):8997-9006.
211. Kullendorff CM, Mertens F, Donner M, Wiebe T, Akerman M, Mandahl N. Cytogenetic aberrations in Ewing sarcoma: are secondary changes associated with clinical outcome? *Med Pediatr Oncol* 1999;32(2):79-83.
212. Bridge JA, DeBoer J, Walker CW, Neff JR. Translocation t(3;12)(q28;q14) in parosteal lipoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1995;12(1):70-2.
213. Fujii H, Honoki K, Enomoto Y, et al. Adamantinoma-like Ewing's sarcoma with EWS-FLI1 fusion gene: a case report. *Virchows Arch* 2006;449(5):579-84.
214. Panoutsakopoulos G, Pandis N, Kyriazoglou I, Gustafson P, Mertens F, Mandahl N. Recurrent t(16;17)(q22;p13) in aneurysmal bone cysts. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;26(3):265-6.
215. Althof PA, Ohmori K, Zhou M, et al. Cytogenetic and molecular cytogenetic findings in 43 aneurysmal bone cysts: aberrations of 17p mapped to 17p13.2 by fluorescence in situ hybridization. *Mod Pathol* 2004;17(5):518-25.
216. Oliveira AM, Hsi BL, Weremowicz S, et al. USP6 (Tre2) fusion oncogenes in aneurysmal bone cyst. *Cancer Res* 2004;64(6):1920-3.
217. Lazar A, Abruzzo LV, Pollock RE, Lee S, Czerniak B. Molecular diagnosis of sarcomas: chromosomal translocations in sarcomas. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130(8):1199-207.
218. Tuveson DA, Fletcher JA. Signal transduction pathways in sarcoma as targets for therapeutic intervention. *Curr Opin Oncol* 2001;13(4):249-55.
219. Rooney DE. Human cytogenetics : a practical approach. 3rd ed. Oxford ; New York: Oxford University Press; 2001.
220. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239(4839):487-91.
221. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987;155:335-50.
222. Mandahl N, Mertens F, Panagopoulos I, Knuutila S. Genetic characterization of bone and soft tissue tumors. *Acta Orthop Scand Suppl* 2004;75(311):21-8.
223. Graadt van Roggen JF, Hogendoorn PC, Fletcher CD. Myxoid tumours of soft tissue. *Histopathology* 1999;35(4):291-312.
224. Birch NC, Antonescu CR, Nelson M, et al. Inconspicuous insertion 22;12 in myxoid/round cell liposarcoma accompanied by the secondary structural abnormality der(16)t(1;16). *J Mol Diagn* 2003;5(3):191-4.
225. Darai-Ramqvist E, de Stahl TD, Sandlund A, et al. Array-CGH and multipoint FISH to decode complex chromosomal rearrangements. *BMC Genomics* 2006;7:330.
226. Pfeifer JD, Hill DA, O'Sullivan MJ, Dehner LP. Diagnostic gold standard for soft tissue tumours: morphology or molecular genetics? *Histopathology* 2000;37(6):485-500.

227. Knuutila S. Cytogenetics and molecular pathology in cancer diagnostics. *Ann Med* 2004;36(3):162-71.
228. Mentzel T, Fletcher CD. Recent advances in soft tissue tumor diagnosis. *Am J Clin Pathol* 1998;110(5):660-70.
229. Rooney DE, Czepulkowski BH. Human cytogenetics : a practical approach. Oxford ; New York: IRL Press; 1992.
230. Pakos EE, Goussia AC, Tsekeris PG, Papachristou DJ, Stefanou D, Agnantis NJ. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR/Flk-1, in soft tissue sarcomas. *Anticancer Res* 2005;25(5):3591-6.
231. Kleivi K, Lothe RA, Heim S, et al. Genome profiling of breast cancer cells selected against in vitro shows copy number changes. *Genes Chromosomes Cancer* 2002;33(3):304-9.
232. Pandis N, Bardi G, Heim S. Interrelationship between methodological choices and conceptual models in solid tumor cytogenetics. *Cancer Genet Cytogenet* 1994;76(2):77-84.
233. Mertens F, Fletcher CD, Dal Cin P, et al. Cytogenetic analysis of 46 pleomorphic soft tissue sarcomas and correlation with morphologic and clinical features: a report of the CHAMP Study Group. *Chromosomes and Morphology. Genes Chromosomes Cancer* 1998;22(1):16-25.
234. Mertens F, Stromberg U, Mandahl N, et al. Prognostically important chromosomal aberrations in soft tissue sarcomas: a report of the Chromosomes and Morphology (CHAMP) Study Group. *Cancer Res* 2002;62(14):3980-4.
235. Mertens F, Stromberg U, Rydholm A, et al. Prognostic significance of chromosome aberrations in high-grade soft tissue sarcomas. *J Clin Oncol* 2006;24(2):315-20.
236. Celli GB, Denchi EL, de Lange T. Ku70 stimulates fusion of dysfunctional telomeres yet protects chromosome ends from homologous recombination. *Nat Cell Biol* 2006;8(8):885-90.
237. Guirouilh-Barbat J, Rass E, Plo I, Bertrand P, Lopez BS. Defects in XRCC4 and KU80 differentially affect the joining of distal nonhomologous ends. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(52):20902-7.
238. Capp JP, Boudsocq F, Bertrand P, et al. The DNA polymerase lambda is required for the repair of non-compatible DNA double strand breaks by NHEJ in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 2006;34(10):2998-3007.
239. Yan BC, Mackinnon AC, Al-Ahmadie HA. Recent developments in the pathology of renal tumors: morphology and molecular characteristics of select entities. *Arch Pathol Lab Med* 2009;133(7):1026-32.
240. Pierotti MA. Chromosomal rearrangements in thyroid carcinomas: a recombination or death dilemma. *Cancer Lett* 2001;166(1):1-7.
241. Pandis N, Jin Y, Gorunova L, et al. Chromosome analysis of 97 primary breast carcinomas: identification of eight karyotypic subgroups. *Genes Chromosomes Cancer* 1995;12(3):173-85.
242. Gorunova L, Hoglund M, Andren-Sandberg A, et al. Cytogenetic analysis of pancreatic carcinomas: intratumor heterogeneity and nonrandom pattern of chromosome aberrations. *Genes Chromosomes Cancer* 1998;23(2):81-99.
243. Bardi G, Johansson B, Pandis N, et al. Cytogenetic aberrations in colorectal adenocarcinomas and their correlation with clinicopathologic features. *Cancer* 1993;71(2):306-14.
244. Radnitzky G, Bartley WW, Popper KR. Evolutionary epistemology, rationality, and the sociology of knowledge. La Salle [Ill.]: Open Court; 1987.

245. Hoglund M, Gisselsson D, Mandahl N, Mitelman F. Ewing tumours and synovial sarcomas have critical features of karyotype evolution in common with epithelial tumours. *Int J Cancer* 2005;116(3):401-6.
246. Schneider-Stock R, Walter H, Radig K, et al. MDM2 amplification and loss of heterozygosity at Rb and p53 genes: no simultaneous alterations in the oncogenesis of liposarcomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 1998;124(10):532-40.
247. de Bruijn DR, Geurts van Kessel A. Common origin of the human synovial sarcoma associated SS18 and SS18L1 gene loci. *Cytogenet Genome Res* 2006;112(3-4):222-6.
248. de Bruijn DR, Kater-Baats E, Eleveld M, Merckx G, Geurts Van Kessel A. Mapping and characterization of the mouse and human SS18 genes, two human SS18-like genes and a mouse Ss18 pseudogene. *Cytogenet Cell Genet* 2001;92(3-4):310-9.
249. Torres L, Lisboa S, Cerveira N, Lopes JM, Lopes C, Teixeira MR. Cryptic chromosome rearrangement resulting in SYT-SSX2 fusion gene in a monophasic synovial sarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2008;187(1):45-9.
250. Bardi G, Johansson B, Pandis N, et al. Trisomy 7 in nonneoplastic focal steatosis of the liver. *Cancer Genet Cytogenet* 1992;63(1):22-4.
251. Broberg K, Limon J, Palsson E, et al. Clonal chromosome aberrations are present in vivo in synovia and osteophytes from patients with osteoarthritis. *Hum Genet* 1997;101(3):295-8.
252. Schaad K, Strombeck B, Mandahl N, et al. FISH mapping of i(7q) in acute leukemias and myxoid liposarcoma reveals clustered breakpoints in 7p11.2: implications for formation and pathogenetic outcome of the idic(7)(p11.2). *Cytogenet Genome Res* 2006;114(2):126-30.
253. Zielenska M, Zhang ZM, Ng K, et al. Acquisition of secondary structural chromosomal changes in pediatric ewing sarcoma is a probable prognostic factor for tumor response and clinical outcome. *Cancer* 2001;91(11):2156-64.
254. Sperling BL, Angel S, Stoneham G, Chow V, McFadden A, Chibbar R. Synovial chondromatosis and chondrosarcoma: a diagnostic dilemma. *Sarcoma* 2003;7(2):69-73.
255. Tallini G, Dorfman H, Brys P, et al. Correlation between clinicopathological features and karyotype in 100 cartilaginous and chordoid tumours. A report from the Chromosomes and Morphology (CHAMP) Collaborative Study Group. *J Pathol* 2002;196(2):194-203.
256. Sjogren H, Orndal C, Tingby O, Meis-Kindblom JM, Kindblom LG, Stenman G. Cytogenetic and spectral karyotype analyses of benign and malignant cartilage tumours. *Int J Oncol* 2004;24(6):1385-91.
257. Larramendy ML, Mandahl N, Mertens F, et al. Clinical significance of genetic imbalances revealed by comparative genomic hybridization in chondrosarcomas. *Hum Pathol* 1999;30(10):1247-53.
258. Brisset S, Schleiermacher G, Peter M, et al. CGH analysis of secondary genetic changes in Ewing tumors: correlation with metastatic disease in a series of 43 cases. *Cancer Genet Cytogenet* 2001;130(1):57-61.
259. Tsarouha H, Kyriazoglou AI, Ribeiro FR, Teixeira MR, Agnantis N, Pandis N. Chromosome analysis and molecular cytogenetic investigations of an epithelioid hemangioendothelioma. *Cancer Genet Cytogenet* 2006;169(2):164-8.

