



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ ΤΩΝ
ΚΥΚΛΙΝΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΑΣΤΑΛΤΩΝ ΤΟΥΣ
ΣΤΙΣ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΚΟΗΘΕΙΕΣ**

**ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ ΧΑΤΖΗΜΙΧΑΗΛ
ΙΑΤΡΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ



ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2008



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



Ημερομηνία αίτησης της κ. Χατζημιχαήλ Ελευθερίας: 16-10-1998

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 371^α/22-12-1998

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Μπουραντάς Κων/νος Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας-Αιματολογίας

Μέλη

Σεφεριάδης Κων/νος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας

Γεωργίου Ιωάννης, Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας με γνώσεις Κλινικής Γενετικής

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 31-3-1999

«Μελέτη της έκφρασης και της κλινικής σημασίας των κυκλινών και της μεθυλίωσης των ανασταλτών τους στις αιματολογικές κακοήθειες »

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 646^α/22-10-2008

1. Γεωργούλης Αναστάσιος Καθηγητής Ορθοπαιδικής Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Κωνσταντόπουλος Σταύρος Καθηγητής Πνευμονολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Μπουραντάς Κωνσταντίνος Καθηγητής Παθολογίας-Αιματολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Σεφεριάδης Κωνσταντίνος τ. Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
5. Γεωργίου Ιωάννης Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής -Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Σύρρου Μαρίκα Επίκουρη Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας-Ιατρικής Γενετικής Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Τσιάρα Σταυρούλα Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 5-11-2008



ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Γουδέβενος Ιωάννης

Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας

Η Γραμματεία της Σχολής

ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΤΣΑΓΓΑΛΑ



στο σύζυγό μου Αλέκο

και στα λατρευτά μου παιδιά, Χρήστο και Κυριάκο



στους γονείς μου Χρήστο και Κίτσα



Πρόλογος

Η αυξημένη επίπτωση του καρκίνου με την πρόοδο της ηλικίας έχει από καιρό θεωρηθεί ότι οφείλεται σε πολλαπλές γενετικές αλλαγές, που πολλές φορές αφορούν σε γονίδια που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Η κλασική γενετική ωστόσο από μόνη της δε μπορεί να εξηγήσει την πληθώρα των φαινοτύπων σε ένα δεδομένο πληθυσμό, ούτε γιατί οργανισμοί με πανομοιότυπες αλληλουχίες DNA, όπως τα μονοζυγωτικά δίδυμα, παρουσιάζουν διαφορετικό φαινότυπο και διαφορετική επιρρέπεια σε νόσους. Οι επιγενετικές αλλαγές μπορούν να προσφέρουν μια μερική εξήγηση αυτών των φαινομένων. Ο πιο συχνός επιγενετικός μηχανισμός στον άνθρωπο είναι η μεθυλίωση του DNA, η οποία σχετίζεται με μεταγραφική αποσιώπηση των γονιδίων. Διάταραχές στο πρότυπο μεθυλίωσης του DNA έχει βρεθεί σε μία πλειάδα αιματολογικών κακοηθειών.

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν να μελετηθούν γονίδια που συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, αλλά και οι επιγενετικές αλλαγές, μέσω μεθυλίωσης που αυτά μπορεί να έχουν υποστεί κυρίως σε ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα. Κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής, είχα τη δυνατότητα να μελετήσω σε βάθος το πολλαπλό μυέλωμα, να παρακολουθήσω στενά μια ομάδα ασθενών από τη διάγνυσή τους, να ασχοληθώ ουσιαστικά με την έρευνα, να εξοικειωθώ με σύγχρονες εργαστηριακές τεχνικές, να διατυπώσω προβληματισμούς και υποθέσεις αλλά και να καταλήξω σε ενδιαφέροντα αποτελέσματα και συμπεράσματα. Σ' αυτό το «επιστημονικό ταξίδι» είχα την τιμή και την ευτυχία να γνωρίσω και να συνεργαστώ με αξιόλογους ιατρούς, επιστήμονες και εξαιρετικούς ανθρώπους, τόσο από την Ελλάδα, όσο και από το εξωτερικό, που στάθηκαν σημαντικοί αρωγοί αυτής της προσπάθειας και τους οποίους οφείλω να ευχαριστήσω.

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου και τις πιο θερμές μου ευχαριστίες στον επιβλέποντα της διατριβής και δάσκαλό μου, από τα φοιτητικά μου χρόνια μέχρι και σήμερα, τον Καθηγητή Παθολογίας-Αιματολογίας κ. Κωνσταντίνο Μπουραντά για την ανάθεση ενός τόσο ενδιαφέροντος θέματος, την αμέριστη υποστήριξη, τη συνεχή ενθάρρυνση και έμπειρη καθοδήγηση σε κάθε στάδιο της μελέτης. Δυσκολίες υπήρξαν πολλές, αλλά για όλες είχε τη λύση. Η άσκηση της ιατρικής ως λειτούργημα, η αγάπη του για την έρευνα και τη συνεχιζόμενη εκπαίδευση, αλλά και η καθημερινή προσφορά του στον πάσχοντα συνάνθρωπο εμφυσήθηκαν μέσα από το καθημερινό βίωμα και σε ένα κλίμα αμοιβαίας εμπιστοσύνης. Η συμβολή του στην ιατρική και επιστημονική κατάρτιση και σταδιοδρομία μου υπήρξε καθοριστική, ενώ το πάθος του για την Αιματολογία συνεχίζει να αποτελεί πηγή έμπνευσης για μελλοντική ερευνητική δραστηριότητα. Τον ευχαριστώ ειλικρινά και θερμά από τα βάθη της καρδιάς μου για όλα τα παραπάνω και ιδιαίτερα για την



εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην ανάπτυξη του Ερευνητικού Αιματολογικού Εργαστηρίου, που αποτέλεσε για μένα ιδιαίτερη τιμή.

Ευχαριστώ επίσης θερμά, τον Καθηγητή Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής και μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, κ. Ιωάννη Γεωργίου για το ενδιαφέρον του, τη στήριξη του και τις ουσιαστικές παρατηρήσεις και συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης. Ιδιαίτερα τον ευχαριστώ γιατί με παρότρυνε να ασχοληθώ με τη μελέτη της μεθυλίωσης πολύ πριν η επιστημονική κοινότητα δείξει τόσο ενδιαφέρον. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον τ. Καθηγητή Βιολογικής Χημείας και μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, κ. Κωνσταντίνο Σεφεριάδη για τη συνεχή υποστήριξη του αλλά και για την κριτική και τις παρατηρήσεις του που βελτίωσαν την τελική μορφή του κειμένου.

Ιδιαίτερα σημαντική και καθοριστική υπήρξε η βοήθεια και καθοδήγηση στην εκτέλεση των πειραμάτων μελέτης της μεθυλίωσης από την Επίκουρη Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας κ. Μαρίκα Σύρρου, την οποία και ευχαριστώ θερμά. Στο Εργαστήριο της, που τόσο φιλόξενα με δέχτηκε, ξεκίνησε η μελέτη της μεθυλίωσης και παρά το ότι τα πρώτα αποτελέσματα ήταν αρνητικά, με ενθάρρυνε να συνεχίσω και με στήριξε μέχρι την ολοκλήρωση της μελέτης.

Στο Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας, είχα την τύχη και τη χαρά να γνωρίσω και να συνεργαστώ με την κ. Αγγελική Δασούλα, Βιολόγο, η βοήθεια της οποίας στην εκτέλεση των πειραμάτων της μελέτης της μεθυλίωσης ήταν ανεκτίμητη. Την ευχαριστώ θερμά για την υπομονή της να με εκπαιδεύσει στις εργαστηριακές τεχνικές της απομόνωσης και χημικής τροποποίησης του DNA, και της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ειδικής της μεθυλίωσης, για τη βοήθειά της κατά τη συγγραφή του τελικού κειμένου αλλά ιδιαίτερα την ευχαριστώ για τον ενθουσιασμό της, την προθυμία της και τη συμβολή της στην οργάνωση του Ερευνητικού Αιματολογικού Εργαστηρίου.

Στη διαμόρφωση και διόρθωση του τελικού κειμένου καθοριστική ήταν η συμβολή της Επίκουρης Καθηγήτριας Παθολογίας και μέλους της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, κ. Σταυρούλας Τσιάρα. Την ευχαριστώ θερμά για την επίπονη προσπάθειά της και το χρόνο που αφιέρωσε ώστε το τελικό κείμενο να είναι αψεγάδιαστο, για τη στήριξη και συμπαράσταση καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης, αλλά και για την άριστη συνεργασία που είχαμε κατά τη διάρκεια της μελέτης της κατάστασης μεθυλίωσης του υποκινητή του p73.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω το συνάδελφό μου, κ. Λεωνίδα Μπενετάτο, ειδικευόμενο Αιματολογίας, για τη σημαντική βοήθειά του στη συλλογή των δειγμάτων αναρρόφησης μυελού των οστών, για τη συμπαράστασή του αλλά και για τις εποικοδομητικές συζητήσεις και την ανταλλαγή απόψεων που είχαμε όλα τα χρόνια της συνεργασίας μας. Ευχαριστώ επίσης την κ. Αμαλία Βάσσου, Επιμελήτρια Α' της Αιματολογικής Κλινικής του Π.Γ.Ν. Ιωαννίνων για την κλινική εκπαίδευση που



μου παρείχε, αλλά και για τις πρωτοβουλίες που με άφησε να αναπτύξω στην αντιμετώπιση αυτών των ασθενών στο εξωτερικό Αιματολογικό Ιατρείο.

Απευθύνω επίσης, τις ευχαριστίες μου στον Καθηγητή Ορθοπαιδικής κ. Αναστάσιο Γεωργούλη και στον Καθηγητή Πνευμονολογίας, κ Σταύρο Κωνσταντόπουλο, μέλη της επταμελούς εξεταστικής για τις εύστοχες παρατηρήσεις τους και τα σχόλιά τους.

Η παρούσα διατριβή δεν θα μπορούσε να ολοκληρωθεί χωρίς την ιδιαίτερα σημαντική βοήθεια, συνεχή παρότρυνση και συμπαράσταση που είχα από αξιόλογους επιστήμονες του εξωτερικού. Κατά την εκπαίδευσή μου στο St. Bartholomew's Hospital, London, UK είχα την ευτυχία να γνωρίσω και να συνεργαστώ με τον κ. Justin Stebbing, MA MRCP FRCPath PhD, Consultant Medical Oncologist/ Senior Lecturer, Imperial College, Charing Cross Hospital, Dept Medical Oncology, London, UK. Αισθάνομαι την ανάγκη να τον ευχαριστήσω θερμά όχι μόνο για την άριστη κλινική εκπαίδευση, αλλά κυρίως για τη συνεχή παρότρυνση του για την ολοκλήρωση αυτής της μελέτης, παρά τις πολλές δυσκολίες, παρέχοντας κάθε δυνατή βοήθεια και συμπαράσταση μέχρι τέλους. Η συνεργασία μαζί του με γέμισε ενθουσιασμό, μου έδωσε την αυτοπεποίθηση να συνεχίσω και συνεχίζει να αποτελεί πηγή ανάπτυξης νέων ερευνητικών δραστηριοτήτων. Ένα μεγάλο μέρος των πειραμάτων έγινε στο Cancer Genetics and Epigenetics Laboratory, Institute of Cancer Research, London, UK υπό την άριστη εποπτεία του Tim Crook MBS Sc MRCP, MRCPath PhD, Professor in Cancer Medicine. Ο κ. Tim Crook με εκπαίδευσε περαιτέρω στη μελέτη της μεθυλίωσης, μου πρόσφερε πολύτιμες συμβουλές και τεχνογνωσία, μου παρείχε όλα τα μέσα και τις διευκολύνσεις για τη μελέτη έκφρασης των κυκλινών στο εργαστήριό του και κάθε δυνατή στήριξη για να εργαστώ και να αναπτύξω ερευνητική δραστηριότητα. Για όλα τα παραπάνω, αλλά και για τη συνεχή συμπαράστασή του, τις πρωτοποριακές ιδέες του και ουσιαστική συμβολή του στη συγγραφή επιστημονικών άρθρων, τον ευχαριστώ θερμά. Η άριστη στατιστική ανάλυση έγινε από τον κ. George Dranitsaris, BPharm, MSc, DPH, FCSHP, Clinical Epidemiologist, Breast Cancer Disease Site group, Princess Margaret Hospital, Toronto, Canada. Από τη συνεργασία που είχα μαζί του, εξοικειώθηκα με τη στατιστική και τη σωστή καταγραφή κλινικών στοιχείων που αυτή απαιτεί. Τον ευχαριστώ θερμά για την υπομονή και για την ουσιαστική συμβολή του στη συγγραφή των επιστημονικών άρθρων που προέκυψαν.

Με την ολοκλήρωση αυτής της διατριβής γίνεται φανερό ότι η μελέτη της μεθυλίωση όχι μόνο στο πολλαπλό μύελωμα, αλλά και στις άλλες αιματολογικές κακοήθειες είναι πλέον επιτακτική. Το ενδιαφέρον των ερευνητών είναι όλο και μεγαλύτερο και οι εξελίξεις είναι πλέον ραγδαίες.

Ενδεχομένως στο μέλλον, ο καθορισμός όχι μόνο του γονοτύπου, αλλά και του «μεθυλότυπου» του



κάθε ασθενούς να είναι ένας ρεαλιστικός στόχος και να ανοίξει το δρόμο στην πλήρη στοχευμένη και εξατομικευμένη θεραπεία με μέγιστα οφέλη και τις λιγότερο δυνατές παρενέργειες



Πίνακας Περιεχομένων

σελίδα

Γενικό Μέρος

Εισαγωγή	1
1. Μοριακή βάση των αιματολογικών κακοηθειών	5
1.1 Γενικά	
1.2 Βασικές έννοιες των αιματολογικών κακοηθειών	6
1.2.1 Μονοκλωνικότητα	7
1.2.2 Μονοκλωνική ανάπτυξη	
1.2.3 Το «κακότηδες αρχέγονο πολυδύναμο κύτταρο»	8
1.2.4 Σχέση φαινοτύπου –γονοτύπου	10
1.3 Η φύση των επίκτητων γενετικών διαταραχών	11
1.3.1 Μεταθέσεις	
1.3.2 Ελλείψεις και ανευπλοειδία	12
1.3.3 Σημειακές μεταλλάξεις	
1.3.4 Επιγενετικές αλλαγές	13
2. Κυτταρικός κύκλος και κυκλίνες	15
2.1 Ιστορική αναδρομή	
2.2 Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου	
2.3 Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου από τη φάση G0 στη φάση G1	18
2.4 Η μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S	
2.5 Ρύθμιση από τη φάση S στη φάση G2 και φάση M	20
3. Ο ρόλος των επιγενετικών αλλαγών στις αιματολογικές κακοήθειες	23
3.1 Εισαγωγή	
3.2 Ο μοριακός ρόλος της μεθυλίωσης του DNA	24
3.3 Μεθοδολογία ανίχνευσης των μεθυλιωμένων CpG	25
3.4 Επιγενετικές αλλαγές στον καρκίνο	27
3.5 Μονοπάτια που έχουν επηρεαστεί από αλλαγές της μεθυλίωσης του DNA	29
3.6 Υπερμεθυλίωση CpG νησίδων σε αιματολογικές κακοήθειες	30
3.7 Ο ρόλος της μεθυλίωσης στην πρόγνωση	31
3.8 Επιγενετικές αλλαγές ως στόχος για θεραπεία	33
4. Μονοκλωνικές γαμμαπάθειες	35
4.1 Ορισμός	
4.2 Πολλαπλό Μυέλωμα (ΠΜ)	35
4.2.1 Ορισμός	
4.2.2 Επιδημιολογία	36
4.2.3 Παθογένεια	36
4.2.4 Ο ρόλος του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών στην παθογένεια του ΠΜ	36
4.2.5 Κλινική εικόνα	38
4.2.6 Διάγνωση	39
4.2.7 Υποκατηγορίες πολλαπλού μυελώματος	41
4.2.8 Κλινική σταδιοποίηση	42
4.2.9 Πρόγνωση και προγνωστική παράγοντες σε ασθενείς με ΠΜ	43
4.3 Μακροσφαιριναιμία του Waldenström (MW)	45
4.3.1 Παθογένεια	
4.3.2 Κλινική Εικόνα	
4.2.3 Κλινική Πορεία και πρόγνωση	46
5. Διαταραχές των κυκλινών στο ΠΜ	49
5.1 Μοριακή Παθογένεια ΠΜ	
5.1.1 Μεταθέσεις ανοσοσφαιρίνης Ig στο ΠΜ	
5.1.2. Υπερδιπλοειδικοί και Μη-υπερδιπλοειδικοί όγκοι ΠΜ	50
5.1.3 Κυκλίνες τύπου D στο ΠΜ	50



5.1.4 Ταξινόμηση βάσει των μεταθέσεων και της έκφρασης των κυκλινών D στο ΠΜ	51
6. Διαταραχές της μεθυλίωσης γονιδίων ρυθμιστικών του κυτταρικού κύκλου	55
6.1. p15INK4b (CDKN2B), p16INK4A (CDKN2A)	
6.2 P57KIP2 (CDKN1C)	56
6.3 TP73 (p73)	57
6.4 Polo-like κινάσες	58
6.5 Von Hippel Lindau (VHL) γονίδιο	59
Σκοπός	61
Ειδικό Μέρος	63
7. Ασθενείς	65
8. Μέθοδοι	67
8.1 Μελέτη της έκφρασης των κυκλινών D1, D2 και D3 με τη μέθοδο qRT-PCR	67
8.2 Μελέτη της μεθυλίωσης γονιδίων που αναστέλλουν τις κυκλίνες ή/ και συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου	68
8.2.1 Απομόνωση του DNA	69
8.2.2 Μελέτη της μεθυλίωσης- Χημική κατεργασία με NaHSO ₃ (bisulphite modification)	70
8.2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	71
8.2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ειδική της μεθυλίωσης (Methylation specific polymerase chain reaction- MSP)	73
8.2.5 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης	75
8.2.6 Παρασκευή πηκτώματος αгарόζης 2% για την ηλεκτροφόρηση	77
8.2.7 Συνθήκες ηλεκτροφόρησης	77
8.2.8 Παρασκευή μη αποδιατακτικού πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου 14% (w/v)	78
8.2.9. Χρησιμοποιούμενα διαλύματα	80
8.3 Στατιστική ανάλυση	82
9. Αποτελέσματα	83
9.1 Κλινικά και Εργαστηριακά ευρήματα	
9.1.2 Ασθενείς με MW	
9.1.3 Ασθενείς με ΜΓΑΣ	
9.1.4 Ασθενείς με ΠΜ	
9.2 Μελέτη της έκφρασης των κυκλινών σε ασθενείς με ΠΜ	89
9.2.1 Συσχέτιση της έκφρασης των κυκλινών D1, D2 και D3 με κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους	89
9.3 Μελέτη της μεθυλίωσης του υποκινητή του p57 σε ασθενείς με μονοκλωνικές γαμμαπάθειες	94
9.4 Μελέτη της μεθυλίωσης του υποκινητή του TP73 σε ασθενείς με μονοκλωνικές γαμμαπάθειες	
9.5 Μελέτη της μεθυλίωσης του υποκινητή του CDKN2B (p15INK4B) σε ασθενείς με μονοκλωνικές γαμμαπάθειες και συσχέτιση με εργαστηριακές και κλινικές παραμέτρους	95
9.6 Μελέτη της μεθυλίωσης του υποκινητή του CDKN2A (p16INK4A) σε ασθενείς με μονοκλωνικές γαμμαπάθειες και συσχέτιση με εργαστηριακές και κλινικές παραμέτρους	96
9.7 Μελέτη της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου του Snk/Pik2 σε ασθενείς με μονοκλωνικές γαμμαπάθειες και συσχέτιση με εργαστηριακές και κλινικές παραμέτρους	98
9.8 Μελέτη της μεθυλίωσης του υποκινητή του VHL σε ασθενείς με μονοκλωνικές γαμμαπάθειες και συσχέτιση με εργαστηριακές και κλινικές παραμέτρους	99
9.9 Μελέτη συσχέτισης μεταξύ των γονιδίων	101
10. Συζήτηση	103



9.1 Μελέτη της έκφρασης και της κλινικής σημασίας των κυκλινών τύπου D σε ασθενείς με Πολλαπλό Μυέλωμα	103
10.2 Μελέτη της μεθυλίωσης γονιδίων ρυθμιστικών του κυτταρικού κύκλου	105
10.2.1 Μελέτη της μεθυλίωσης του γονιδίου p57 (CDKN1C)	106
10.2.2 Μελέτη της μεθυλίωσης του γονιδίου TP73	107
10.2.3 Μελέτη της μεθυλίωσης των γονιδίων p15 (CDKN2B) και p16 (CDKN2A)	108
10.2.4 Μελέτη της μεθυλίωσης του γονιδίου VHL	110
10.2.5 Μελέτη της μεθυλίωσης του γονιδίου Snk/Plk2	111
10.3 Περιορισμοί	113
Επίλογος	115
Συμπεράσματα	117
Περιλήψεις	121
Δημοσιεύσεις – Ανακοινώσεις	129
Βιβλιογραφία	131



ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



Εισαγωγή

Η διαταραχή της ισορροπίας ανάμεσα στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, δηλαδή την απόπτωση είναι βασική προϋπόθεση για την ανάπτυξη ενός νεοπλασματος. Ειδικότερα σε ένα δεδομένο κυτταρικό πληθυσμό ο αριθμός των κυττάρων που παράγονται υποσκελίζει τον αριθμό των κυττάρων που καταστρέφονται κατά την ίδια χρονική περίοδο. Η κατανόηση του ρυθμού ανάπτυξης και της κινητικής του κυττάρου έχει αποτελέσει τελευταία αντικείμενο εντατικής μελέτης στην Αιματολογία (1).

Η αυξημένη επίπτωση του καρκίνου με την πρόοδο της ηλικίας έχει από καιρό θεωρηθεί ότι οφείλεται στη συσσώρευση **γενετικών αλλαγών** που είναι απαραίτητες για την ογκογένεση, μία θεωρία που βασίστηκε σε συστηματική μελέτη γενετικών διαταραχών που έγινε αρχικά σε καρκινικά κύτταρα παχέως εντέρου (2,3). Ο Peter Nowel πρότεινε αρχικά το 1976 ότι τα καρκινικά κύτταρα μπορεί να έχουν **μεταλλάξεις** που οδηγούν σε αστάθεια του γενώματος με επακόλουθη επιταχυνόμενη κυτταρική εξέλιξη (4). Μελέτες που ακολούθησαν επιβεβαίωσαν αυτήν τη θεωρία. Για παράδειγμα, μεταλλάξεις σε γονίδια που επιδιορθώνουν το DNA προδιαθέτουν τους φορείς τους σε καρκίνο, πιθανά αυξάνοντας τη γενωμική αστάθεια (5). **Χρωμοσωμικές ανωμαλίες**, όπως η απώλεια ή προσθήκη ολόκληρου χρωμοσώματος, η ανευπλοειδία και άλλες διαταραχές είναι επίσης συχνές στα καρκινικά κύτταρα (6-8). Ακολούθως, η έρευνα έδειξε ότι μεταλλάξεις σε γονίδια που εκφράζονται **σημεία ελέγχου** του κυτταρικού κύκλου, οδηγούν επίσης σε γενωμική αστάθεια και επιταχυνόμενη κυτταρική εξέλιξη (9). Τα γονίδια αυτά, με κύριο εκπρόσωπο το ογκοκατασταλτικό γονίδιο **p53**, δρουν επιβραδύνοντας τον κυτταρικό κύκλο με σκοπό να εξασφαλιστεί η επιδιόρθωση βλαβών του DNA πριν το κύτταρο προχωρήσει στη φάση της μείωσης (10). Έτσι αναγνωρίστηκε η μεγάλη σημασία τόσο των ρυθμιστικών σημείων ελέγχου, όσο και της ρύθμισης του **κυτταρικού κύκλου** γενικότερα στην ογκογένεση.

Ο κυτταρικός κύκλος ελέγχεται από μία σειρά ρυθμιστικών μηχανισμών, καθένας από τους οποίους εξαρτάται από την ολοκλήρωση μίας προηγούμενης διαδικασίας, με αποτέλεσμα η διαταραχή ενός μηχανισμού να οδηγεί σε μία αλυσιδωτή απορύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Έξι τουλάχιστον ομάδες παραγόντων έχουν σχέση με τον έλεγχο της κυτταρικής διαίρεσης:

1. **εξωγενείς αυξητικοί παράγοντες**, όπως ο GM-CSF (granulocyte-monocyte colony stimulating factor, αυξητικός παράγοντας κοκκιοκυττάρων και μονοκυττάρων),
2. **εξωγενείς ανασταλτικοί παράγοντες**

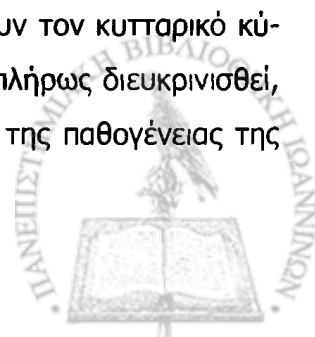


3. **υποδοχείς αυξητικών παραγόντων**, είτε στην κυτταρική μεμβράνη, είτε στον πυρήνα, όπως το c-erbB 2,
4. **κινάσες**, οι οποίες είναι ένζυμα που ελέγχουν διάφορες πρωτεϊνικές λειτουργίες μέσω φωσφορυλίωσης, όπως οι κινάσες που εξαρτώνται από τις κυκλίνες,
5. **κυκλίνες**, οι οποίες είναι ενδοκυττάρια πρωτεΐνες που έχουν τη δυνατότητα να ενεργοποιήσουν τις κινάσες την κατάλληλη στιγμή, προκαλώντας μεταβολές που θα επιφέρουν τελικά την κυτταρική διαίρεση και
6. **ογκοκατασταλτικά γονίδια**, όπως το p53, το γονίδιο Von Hippel-Lindau (VHL) και το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος (Rb).

Διαταραχή σε οποιαδήποτε από τα παραπάνω επίπεδα ρυθμιστικού ελέγχου έχει ως αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία της κυτταρικής διαίρεσης που μπορεί να συντελέσει στην καρκινογένεση.

Η κλασική γενετική δε μπορεί από μόνη της να εξηγήσει την πληθώρα των φαινοτύπων σε ένα δεδομένο πληθυσμό. Παρομοίως, δεν είναι δυνατό να εξηγηθεί με την κλασική γενετική πως μονοζυγωτικά δίδυμα (11) ή κλωνοποιημένα ζώα (12) με πανομοιότυπες αλληλουχίες DNA μπορεί να έχουν διαφορετικό φαινότυπο και διαφορετική ευπάθεια σε νόσους. Οι **επιγενετικές αλλαγές** μπορούν να συνεισφέρουν στη μερική εξήγηση αυτών των φαινομένων. Ο όρος «επιγενετική» (epigenetics) εισήχθη για πρώτη φορά το 1939 από τον C.H. Waddington για να περιγράψει «τις αιτιολογικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γονιδίων και των προϊόντων τους, που οδηγούν στην εμφάνιση ενός συγκεκριμένου φαινοτύπου» (13), ενώ αργότερα ο όρος επιγενετική χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει όλες τις κληρονομούμενες αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση που δεν οφείλονται σε αλλαγή της αλληλουχίας του DNA (14). Ο πιο καλά μελετημένος επιγενετικός μηχανισμός στον άνθρωπο είναι η μεθυλίωση του DNA, η οποία σχετίζεται με μεταγραφική αποσιώπηση των γονιδίων. Διαταραχές στο πρότυπο μεθυλίωσης του DNA έχουν βρεθεί σε μία πλειάδα αιματολογικών κακοηθειών.

Είναι γνωστό ότι στην παθογένεια των πλασματοκυτταρικών δυσκρασιών –όπως είναι το πολλαπλό μυέλωμα, η μακροσφαιριναιμία Waldenström και η μονοκλωνική γαμμαπάθεια αδιευκρίνιστης σημασίας- σημαντικό ρόλο παίζουν γενετικές αλλαγές και πιο συγκεκριμένα μεταθέσεις της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης (IgH), που οδηγούν σε ενεργοποίηση ογκογονιδίων. Έχουν επίσης παρατηρηθεί διαταραχές γονιδίων που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο. Ο ρόλος των μεθυλίωσης του DNA στα νοσήματα αυτά δεν έχει πλήρως διευκρινισθεί, και έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, όχι μόνο για την περαιτέρω κατανόηση της παθογένειας της



νόσου, αλλά κυρίως γιατί ανοίγει νέους ορίζοντες στη θεραπευτική αντιμετώπιση τους, με τη χρήση των απομεθυλιωτικών παραγόντων.

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν γονίδια που συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, αλλά και οι επιγενετικές αλλαγές, μέσω μεθυλίωσης που αυτά μπορεί να έχουν υποστεί. Ειδικότερα, μελετήθηκε η έκφραση και η κλινική σημασία των κυκλινών D1, D2 και D3, ενώ επιπλέον μελετήθηκε και η μεθυλίωση γονιδίων που συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου ή αναστέλλουν τις κυκλίνες σε ασθενείς με μονοκλωνικές γαμμαπάθειες.



1. Η ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΑΣΗ ΤΩΝ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΚΑΚΟΗΘΕΙΩΝ

1.1 Γενικά

Ο μέσος ανθρώπινος οργανισμός παράγει μερικά δισεκατομμύρια ερυθροκυττάρων και ουδετεροφίλων κάθε ημέρα. Αυτή η διαδικασία επάγεται από φυσιολογικά στρεσογόνα ερεθίσματα, όπως είναι η φλεγμονή και η απώλεια αίματος, τα οποία και μπορεί να αυξήσουν την παραγωγή των αντίστοιχων κυττάρων περίπου κατά 10 φορές παραπάνω. Το αιμοποιητικό σύστημα διατηρεί αυτήν την ισορροπημένη παραγωγή κυττάρων μέσω στενού ελέγχου του πολλαπλασιασμού των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, της δέσμευσης προς μία συγκεκριμένη κυτταρική σειρά και της διαφοροποίησης (15,16). Διαταραχή σε μία οποιαδήποτε από αυτές τις διαδικασίες οδηγεί στις αιματολογικές κακοήθειες (17).

Η έρευνα στο πεδίο των λευχαιμιών και των λεμφωμάτων ουσιαστικά άνοιξε το δρόμο στην μελέτη της βιολογίας του καρκίνου παρέχοντας συγκεκριμένα μοντέλα. Για την ανάπτυξη μιας κακοήθειας, θεωρείται πλέον πιο αποδεκτό το μοντέλο των «πολλαπλών χτυπημάτων», κατά το οποίο σημαντικά κυτταρικά μονοπάτια έχουν διαταραχθεί από συσσωρευμένες βλάβες του γενετικού υλικού, οδηγώντας έτσι σε ένα αυτόνομο πολλαπλασιαζόμενο κυτταρικό κλώνο. Ο φαινότυπος της κακοήθειας καθορίζεται από τα συγκεκριμένα μονοπάτια που έχουν διαταραχθεί, συχνά με ένα στερεότυπο τρόπο. Έτσι συγκεκριμένοι τύποι κακοήθειας σχετίζονται με συγκεκριμένες γενετικές αλλαγές που δεν απαντώνται σε άλλες αιματολογικές κακοήθειες.

Στο κεφάλαιο αυτό θα ανασκοπηθεί σύντομα η μοριακή παθογένεια των αιματολογικών κακοηθειών. Αρχικά θα περιγραφούν μερικές βασικές αρχές που αφορούν στην παθογένεια των αιματολογικών νεοπλασιών, συμπεριλαμβανομένων των εννοιών της κλωνικότητας και της κλωνικής ανάπτυξης, του «λευχαιμικού κλωνικού κυττάρου» και της σχέσης γονοτύπου-φαινοτύπου. Στη συνέχεια θα γίνει αναφορά στη φύση των επίκτητων γενετικών διαταραχών που σχετίζονται με τις αιματολογικές κακοήθειες, όπως είναι οι γενετικές ανακατατάξεις, οι σημειακές μεταλλάξεις και τα **επιγενετικά φαινόμενα**.



1.2 Βασικές έννοιες των αιματολογικών κακοηθειών

1.2.1 Μονοκλωνικότητα

Η μελέτη των αιματολογικών κακοηθειών ουσιαστικά άνοιξε το δρόμο για την καθιέρωση της μονοκλωνικότητας των όγκων. Αυτό οφείλεται κυρίως στο ότι, τόσο τα φυσιολογικά, όσο και τα κακοήθη κύτταρα είναι εύκολο να συλλεγούν και να καλλιεργηθούν και να χαρακτηρισθούν σε μοριακό επίπεδο. Υπάρχουν τρεις κύριες πηγές απόδειξης που υποδηλώνουν ότι οι αιματολογικές κακοήθειες προέρχονται από ένα μοναδικό αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο, και άρα είναι «μονοκλωνικές».

1. Σε όλες τις λεμφοϋπερπλαστικές διαταραχές και σε μία μειοψηφία οξείων μυελογενών λευχαιμιών, ο νεοπλασματικός πληθυσμός φέρει μία μοναδική αναδιάταξη είτε μιας ανοσοσφαιρίνης (IgH) είτε του γονιδίου TcR, του υποδοχέα του T- κυττάρου. Αντίθετα, οι μη κακοήθεις υπερπλασίες λεμφοκυττάρων χαρακτηρίζονται από ένα πολυκλωνικό πρότυπο αναδιατάξεων του αντιγονικού υποδοχέα. Αυτό είναι μία πειστική απόδειξη της κλωνικής αρχής των λεμφοειδών κακοηθειών και υποδηλώνει ότι ένα καθοριστικό γεγονός μεταμόρφωσης συνέβη πριν ή μετά την γονιδιακή αναδιάταξη (18).

2. Απόδειξη της κλωνικότητας προκύπτει επίσης από την μελέτη του προτύπου αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X σε θήλεα άτομα (19-21). Η διαδικασία αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X είναι τυχαία και συμβαίνει νωρίς κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Σε γυναίκες, μια πολυκλωνική υπερπλασία θα αποτελείται από ένα μείγμα κυττάρων που μερικά θα έχουν ενεργό το μητρικό χρωμόσωμα X, ενώ κάποια άλλα το πατρικό. Εν αντιθέσει, σε μία κλωνική υπερπλασία τα κύτταρα φέρουν το ενεργό X είτε από τον πατέρα, είτε από την μητέρα. Δυστυχώς η διαγνωστική χρησιμότητα τέτοιων μελετών είναι περιορισμένη από το γεγονός ότι φυσιολογικές γυναίκες με την πάροδο της ηλικίας αναπτύσσουν ένα μικτό πρότυπο αδρανοποίησης στα κύτταρα του αίματος (22).

3. Επίκτητες κυτταρογενετικές ή μοριακές αλλαγές που προκύπτουν κατά την ανάπτυξη μιας κακοήθειας μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως κλωνικοί δείκτες. Για παράδειγμα, στη Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία (ΧΜΛ) το χρωμόσωμα Φιλαδέλφειας μπορεί να βρεθεί σε διάφορους τύπους κυττάρων του αίματος, συμπεριλαμβανομένων των ουδετεροφίλων, των μο-

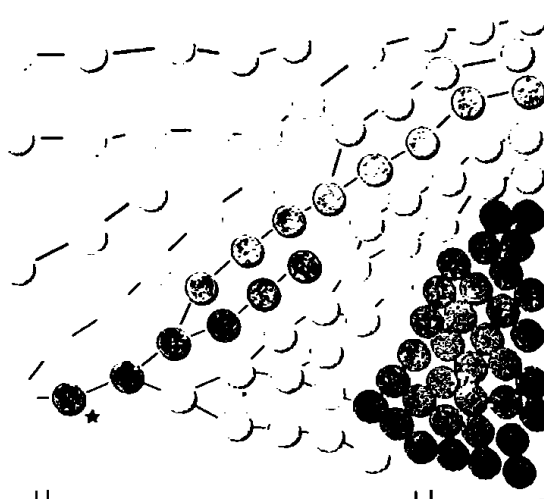


νοκυττάρων, των βασεοφίλων και των Β λεμφοκυττάρων, υποδηλώνοντας ότι η νόσος προκύπτει από ένα αρχέγονο πολυδύναμο κύτταρο (23).

1.2.2 Μονοκλωνική ανάπτυξη

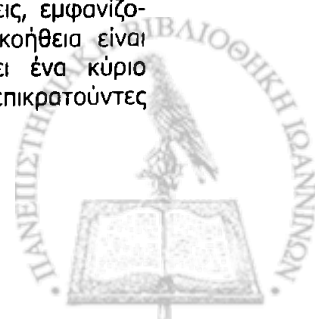
Οι περισσότερες κακοήθειες θεωρείται ότι είναι αποτέλεσμα πολλαπλών επίκτητων μεταλλάξεων, που γίνονται διαδοχικά και τυχαία, παρά απότοκες μίας μοναδικής καταστροφικής μετάλλαξης. Παρόμοια με τη θεωρία της φυσικής επιλογής του Darwin, η κακοήθεια ξεκινά από μία αλλαγή στο γενετικό υλικό ενός πρόδρομου κυττάρου που του προσδίδει ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα. Κύτταρα που προκύπτουν από αυτό το αρχικό κύτταρο αποκτούν επιπλέον μεταλλάξεις, ενισχύοντας έτσι το πλεονέκτημα επιλογής, και έτσι τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται μέχρις ότου η νόσος καταστεί κλινικά εμφανής. Καθώς οι μεταλλάξεις είναι τυχαία γεγονότα, μερικές από αυτές μπορεί να οδηγήσουν στην εξαφάνιση του αντίστοιχου υποκλώνου. Πολλοί διαφορετικοί υποκλώνοι, όλοι προερχόμενοι από το ίδιο αρχέγονο κύτταρο, θα συνυπάρχουν μέσα στο νεοπλασματικό πληθυσμό και ορισμένες λεπτές διαφορές μπορεί να υπάρχουν όσον αφορά στην ικανότητα πολλαπλασιασμού ή την αντίσταση στα φάρμακα (Εικόνα 1.1).

Υπάρχουν διάφορες αποδείξεις για το ότι περισσότερες από μία μεταλλάξεις είναι απαραίτητες για την πλήρη εμφάνιση κακοήθειας. Τόσο σε κυτταροκαλλιέργειες όσο και σε μοντέλα επιμύων που χρησιμοποιήθηκαν για να εκτιμήσουν μεταθέσεις που έχουν βρεθεί σε λευχαιμία, το υβριδικό γονίδιο από μόνο του δεν επαρκούσε για να οδηγήσει στην εμφάνιση λευχαιμικού φαινοτύπου. Σε επίμυες, η έγχυση αιμοποιητικών πολυδύναμων κυττάρων που φέρουν το υβριδικό γονίδιο, αναπτύσσεται λευχαιμία μετά από μία μακρά περίοδο, υποδηλώνοντας ότι και επιπλέον συμβάματα είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη της νεοπλασίας (24). Στον άνθρωπο, η μεταβίβαση του μεταλλαγμένου γονιδίου RUNX1 σε όλα τα



Φυσιολογικά Προκλινικά Κλινικά έκδηλη κακοήθεια

Εικόνα 1.1 Κλωνική εξέλιξη της κακοήθειας. Η διαδικασία ξεκινά με ένα μόνο πράσινο κύτταρο (*) που αποκτά μία μετάλλαξη που θα του δώσει ένα ελαφρό επιλεκτικό πλεονέκτημα. Στη συνέχεια, ο απόγονος αυτού του κυττάρου αποκτά επιπλέον μεταλλάξεις (μπλε, ροζ, κόκκινο). Μερικές από αυτές τις μεταλλάξεις μπορεί να είναι καταστροφικές, οπότε και ο κλώνος αυτό πεθαίνει (μπλε). Με τον καιρό, ένας κλώνος μπορεί να αποκτήσει επιπλέον μεταλλάξεις, εμφανίζοντας πιο επιθετική συμπεριφορά. Η κακοήθεια είναι τελικά ετερογενής και συμπεριλαμβάνει ένα κύριο κλώνο (κόκκινο) και άλλους λιγότερο επικρατούντες κλώνους (πράσινο και ροζ)



κύτταρα, οδηγεί στην εμφάνιση μονοκλωνικής λευχαιμίας (σε ένα δηλαδή κύτταρο) αργότερα στη ζωή, υποδεικνύοντας ότι και επιπρόσθετα γεγονότα είναι απαραίτητο να «συνεργαστούν» με τη μετάλλαξη RUNX1 για την εμφάνιση λευχαιμίας.

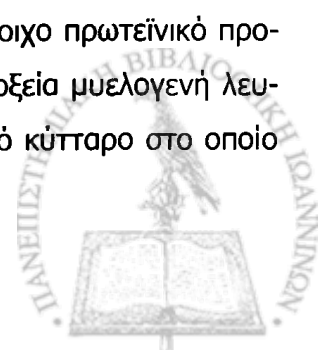
Το μοντέλο της μονοκλωνικής ανάπτυξης συμπεριλαμβάνει επίσης, τη θεωρία ότι ο πληθυσμός των νεοπλασματικών κυττάρων περιέχει και υποκλώνους που έχουν επίκτητες διακριτές δευτεροπαθείς αλλαγές, και έτσι μπορεί να παρουσιάζουν και διαφορετικά βιολογικά χαρακτηριστικά. Η αντίσταση στα φάρμακα (*drug resistance*) είναι ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της παρατήρησης. Σε μελέτες που έχουν γίνει σε ασθενείς με χρόνια μυελογενή λευχαιμία (ΧΜΛ), οι οποίοι αρχικά απαντούν στη χορήγηση *imatinib*, αλλά αργότερα εμφανίζουν ανθεκτικότητα, η αντίσταση οφείλεται σε σημειακές μεταλλάξεις που επηρεάζουν το σημείο πρόσδεσης του φαρμάκου με την υβριδική πρωτεΐνη *bcr-abl*.

1.2.3 Το «κακόηθες αρχέγονο πολυδύναμο κύτταρο»

ι. Μυελοειδείς κακοήθειες

Ένα κεντρικό χαρακτηριστικό των αιματολογικών κακοηθειών είναι η ικανότητα των κακοήθων κυττάρων να αυτοανανεώνονται. Η αυτοανανέωση είναι χαρακτηριστικό και των φυσιολογικών αρχέγονων πολυδύναμων κυττάρων, και αυτό οδήγησε στη διατύπωση της θεωρίας ότι οι κακοήθειες προκύπτουν από την μεταμόρφωση ενός μόνο αρχέγονου πολυδύναμου κυττάρου. Αυτή η θεωρία μπορούσε να εξηγήσει και το γεγονός ότι το αρχικό κύτταρο και οι απόγονοι του, μπορούσαν να επιβιώσουν τόσο ώστε να αποκτήσουν και επιπρόσθετες δευτερογενείς μεταλλάξεις. Μια εναλλακτική υπόθεση είναι ότι η αρχική μετάλλαξη συμβαίνει σε ένα πιο ώριμο κύτταρο, το οποίο φυσιολογικά είχε καθοριστεί να διαφοροποιηθεί και να πεθάνει, αλλά το αρχικό γεγονός είναι αρκετό για να του προσδώσει την ικανότητα της αυτοανανέωσης. Θα μπορούσε βέβαια, αυτά τα δύο μοντέλα να υπάρχουν σε διαφορετικούς τύπους κακοήθειας.

Μελέτες στις μυελοειδείς κακοήθειες παρείχαν τις πρώτες αποδείξεις που στήριξαν την υπόθεση του κακοήθους αρχέγονου κυττάρου. Σε ασθενείς με ΧΜΛ, κύτταρα από διαφορετικές αιμοποιητικές σειρές φέρουν το χιμαιρικό γονίδιο *bcr-abl* και το αντίστοιχο πρωτεϊνικό προϊόν του. Επιπλέον, το γεγονός ότι η ΧΜΛ μπορεί να εκτραπεί τόσο σε οξεία μυελογενή λευχαιμία όσο και οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία υποδηλώνει ότι το αρχικό κύτταρο στο οποίο



συνέβη η βλάβη είχε δυνατότητα τόσο λεμφικής όσο και μυελικής διαφοροποίησης (25,26). Αυτές οι ιδιότητες των λευχαιμικών προγονικών προγονικών κυττάρων έχουν σημαντικές επιπτώσεις στο σχεδιασμό της θεραπείας των αιματολογικών κακοηθειών. Μία θεραπευτική στρατηγική, με σκοπό την ίαση, θα πρέπει λοιπόν να μπορεί να εξαφανίσει όλα τα κύτταρα που έχουν την ικανότητα να αυτοανανεώνονται. Επιπλέον, ένα μέρος των λευχαιμικών προγονικών κυττάρων μπορεί να είναι μεταβολικά αδρανή και να βρίσκονται στη φάση G0 του κυτταρικού κύκλου, και έτσι πολλά συμβατικά κυτταροτοξικά φάρμακα ειδικά του κυτταρικού κύκλου να είναι αναποτελεσματικά.

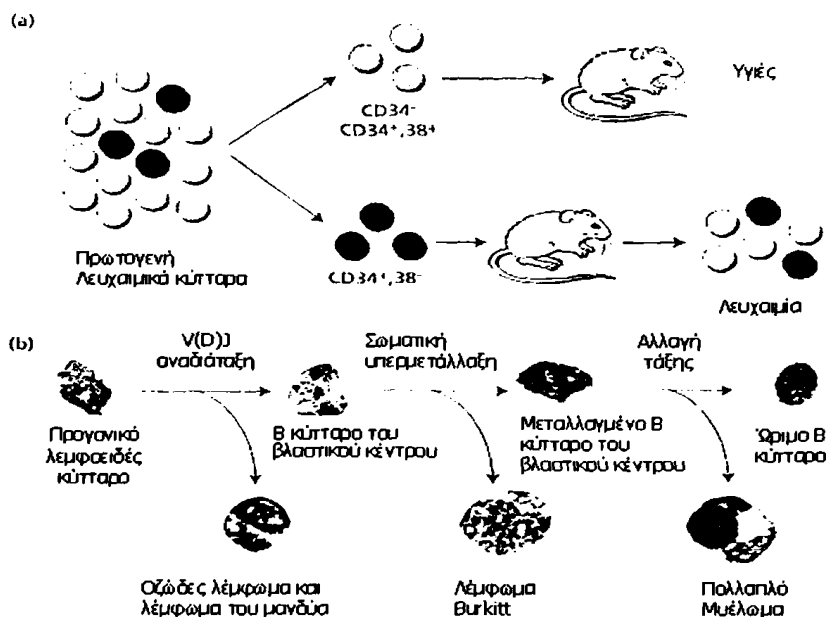
ii. Λεμφοειδείς κακοήθειες

Σε αντίθεση με τις μυελοειδείς κακοήθειες, οι λεμφικές κακοήθειες δε φαίνεται να προκύπτουν από την μεταμόρφωση ενός αρχέγονου πολυδύναμου αιμοποιητικού κυττάρου, αλλά από κύτταρα που είχαν ήδη «δεσμευθεί» προς λεμφική διαφοροποίηση (27). Αυτό ενδεχομένως να αντανακλά εν μέρει το γεγονός ότι τα λεμφοκύτταρα διατηρούν την ικανότητα να αυτοανανεώνονται και να πολλαπλασιάζονται μετά από αντιγονικό ερεθισμό. Οι μεταθέσεις που σχετίζονται με τις λεμφικές κακοήθειες συχνά αντανακλούν λάθη που συμβαίνουν κατά τη φυσιολογική διαδικασία της ανακατάταξης του αντιγονικού υποδοχέα μετά από αντιγονικό ερεθισμό. Κατά τη φυσιολογική ανάπτυξη των Β-λεμφοκυττάρων, ο IgH επίτοπος διαδοχικά υπόκειται V(D)J αναδιάταξη (Variable Diversity Joining rearrangement), σωματική υπερμετάλλαξη (somatic hypermutation) και αλλαγή τάξης (class switching) (28). Έτσι, στις κακοήθειες Β κυτταρικής αρχής, ο χρόνος εμφάνισης μιας σχετικής μετάθεσης μπορεί να βρεθεί μετά από ανάλυση της αλληλουχίας του επίτοπου της ανοσοσφαιρίνης που βρίσκεται δίπλα στην περιοχή του σπασίματος (breakpoint) (Εικόνα 1.2).

Η προέλευση του κυττάρου για το λέμφωμα μανδύα και το οζώδες λέμφωμα είναι προπλαστικού ή βλαστικού κέντρου, κύτταρα δηλαδή που έχουν υποστεί αναδιάταξη του γονιδίου της ανοσοσφαιρίνης. Τα σημεία του σπασίματος των μεταθέσεων t(11;14) και t(14;18) είναι μεταξύ των D και J τμημάτων του επίτοπου IgH, που υποδηλώνει ότι οφείλονται σε λάθη της DJ αναδιάταξης. Στα λεμφώματα Burkitt, το c-myc γονίδιο βρίσκεται πολύ συχνά δίπλα σε μία πλήρως αναδιαταγμένη V(D)J και υπερμεταλλαγμένη IgH ποικίλη περιοχή στη μετάθεση t(8;14). Αντίστοιχα, ο ανασυνδυασμός της αλλαγής ομάδας φαίνεται να είναι υπεύθυνος ως επί το πλείστον, για τις μεταθέσεις που εμφανίζονται στο πολλαπλό μυέλωμα (ΠΜ),



αφού τα σπασίματα αφορούν κυρίως στο γονίδιο της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης (IgH) (29,30).



Εικόνα 1.2. Το αρχικό κύτταρο στις αιματολογικές κακοηθίες.

(α) πρωτογενές δείγμα από ασθενή με OML που περιέχει ένα μικρό αριθμό λευχαιμικών κυττάρων (κόκκινο) με επιφανειακούς δείκτες παρόμοιους με αυτούς των φυσιολογικών αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (CD34+, CD38-). Μεταμόσχευση λευχαιμικών κυττάρων αλλά όχι η πλειοψηφία των λευχαιμικών κυττάρων (πορτοκαλί) οδηγεί σε λευχαιμία ανοσοκατασταλμένα ποντίκια.

(β) Φυσιολογική ωρίμανση των B κυττάρων περιλαμβάνει την αναδιάταξη και αλλαγή τάξης των ανοσοσφαιρινών. Λάθη που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια αυτών των αναδιατάξεων μπορεί να οδηγήσουν σε λευχαιμιόγρονες μεταθέσεις. Αναλύσεις των αλληλουχιών που βρίσκονται παρακείμενα του σπασίματος της μετάθεσης υποδηλώνουν ότι οι μεταθέσεις συμβαίνουν σε διαφορετικά στάδια διαφοροποίησης για κάθε διακριτό λέμφωμα
OML: οξεία μυελογενής λευχαιμία

1.2.4 Σχέση φαινοτύπου-γονοτύπου

Μία από τις πιο εντυπωσιακές ιδιότητες των λευχαιμιών και των λεμφωμάτων είναι η πολύ στενή σχέση μεταξύ συγκεκριμένων κυτταρογενετικών ή μοριακών διαταραχών και μοναδικών μορφολογικών και κλινικών χαρακτηριστικών. Για παράδειγμα, τα κύτταρα του λεμφώματος Burkitt χαρακτηρίζονται από μία ιδιαίτερη μορφολογική εμφάνιση ενώ σχεδόν πάντα σχετίζονται με μεταθέσεις του γονιδίου c-myc. Παρομοίως, ισχυρή συσχέτιση υπάρχει μεταξύ της οξείας μυελομονοκυτταρικής λευχαιμίας με παθολογικά ηωσινόφιλα και της διαταραχής *inv(16)* καθώς και μεταξύ της οξείας προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας και του χιμαιρικού γονιδίου PML-RARa (31).



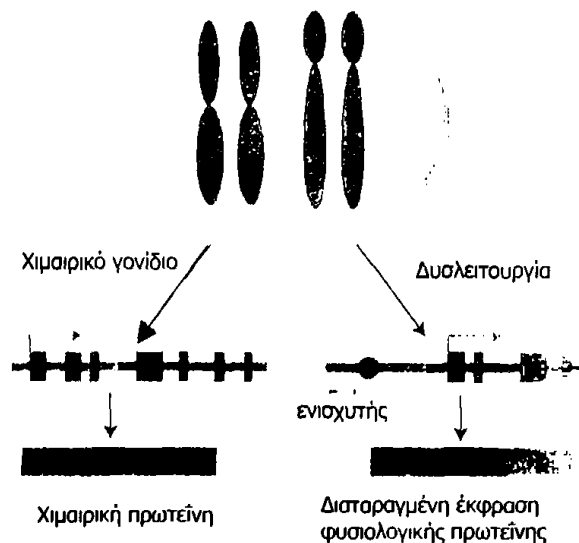
Υπάρχουν δύο πιθανές εξηγήσεις για αυτό το φαινόμενο. Η φύση της χρωμοσωμικής ανωμαλίας καθορίζει και τον φαινότυπο του λευχαιμικού κυττάρου. Ή εναλλακτικά, μια ειδική χρωμοσωμική αναδιάταξη μπορεί να συμβαίνει μόνο σε, ή να προσδίδει επιλεκτικό πλεονέκτημα για, αρχέγονα κύτταρα που έχουν καθοριστεί να διαφοροποιηθούν προς μία συγκεκριμένη σειρά. Και τα δύο πρότυπα μπορεί να είναι σωστά. Για παράδειγμα, διάφοροι υπότυποι οξείας μυελοδγενούς λευχαιμίας (ΟΜΛ) σχετίζονται με συγκεκριμένες μεταθέσεις και εμφανίζουν διαφορετική μορφολογία και περιέχουν αρχέγονα κύτταρα τα οποία παρουσιάζουν τα ίδια αντιγόνα επιφανείας. Φαίνεται δηλαδή ότι στη ΟΜΛ, η επίκτητη γενετική διαταραχή καθορίζει τους διάφορους φαινότυπους (32). Εν αντιθέσει, διάφορες μεταθέσεις που εμπλέκουν τους IgH και TcR τύπους περιορίζονται στις λεμφικές νεοπλασίες επειδή οι αλληλουχίες δίπλα στα ογκογονίδια μιμούνται αλληλουχίες των IgH ανακατατάξεων. Έτσι, αυτές μεταθέσεις μπορεί να συμβούν μόνο σε κύτταρα που βρίσκονται σε συγκεκριμένο στάδιο λεμφικής διαφοροποίησης.

1.3 Η φύση των επίκτητων γενετικών ανωμαλιών

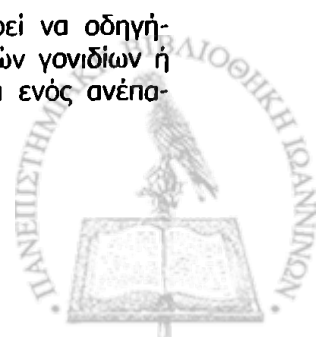
1.3.1 Μεταθέσεις

Οι πιο καλά κατανοητές γενετικές ανωμαλίες στις αιματολογικές κακοήθειες είναι οι μεταθέσεις. Οι μεταθέσεις αφορούν στην αμοιβαία ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ δύο χρωμοσωμάτων και μπορεί να οδηγήσουν σε απόκλιση της φυσιολογικής λειτουργίας των γονιδίων που είναι παρακείμενα στο σημείο του σπασίματος. Δυο συχνοί μηχανισμοί έχουν περιγραφεί.

Πρώτον, το χιμαιρικό γονίδιο μπορεί να δημιουργεί και να κωδικοποιεί μία χιμαιρική πρωτεΐνη με ογκογενετικές ιδιότητες. Αυτός ο μηχανισμός απαντάται σε πολλές από τις μεταθέσεις που σχετίζονται με τις μυελικές κακοήθειες και τρισμένες οξείες λεμφοβλαστικές λευχαιμίες (ΟΛΛ). Συνήθως οι χιμαιρικές πρωτεΐνες που



Εικόνα 1.3. Μεταθέσεις μπορεί να οδηγήσουν στο σχηματισμό χιμαιρικών γονιδίων ή σε μεταγραφική δυσλειτουργία ενός ανέπαφου γονιδίου



προκύπτουν περιλαμβάνουν συνδυασμό των λειτουργικών μονάδων από τις δύο πρωτεΐνες που προέρχονται και αποκτούν νέες ιδιότητες. Για παράδειγμα στις χιμαιρικές πρωτεΐνες που αφορούν σε τυροσινικές κινάσες, η μία πρωτεΐνη προσδίδει ένα τμήμα διμερισμού που επιτρέπει στην νέα πρωτεΐνη να δημιουργεί ολιγομερή αυτόματα, γεγονός που οδηγεί σε συνεχή ενεργοποίηση της κινάσης.

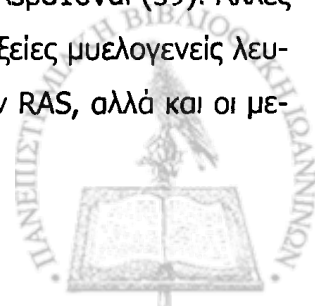
Η δεύτερη κατηγορία μεταθέσεων οδηγεί σε ένα δομικά ακέραιο γονίδιο το οποίο βρίσκεται δίπλα σε ρυθμιστικά στοιχεία ενός γονιδίου στο άλλο χρωμόσωμα. Αυτό το σενάριο απαντάται πιο συχνά στις λεμφικές κακοήθειες (33).

1.3.2 Ελλείψεις και ανευπλοειδία

Τα ελλείμματα περιοχών και οι διαταραχές στον αριθμό των χρωμοσωμάτων είναι μεταξύ των πιο συχνών χρωμοσωμικών ανωμαλιών που απαντώνται στις αιματολογικές κακοήθειες και οδηγούν στην αύξηση ή την μείωση των αντιγράφων πολλών γονιδίων. Η υπερπλοειδία είναι η πιο συχνή κυτταρογενετική ανωμαλία στην παιδική οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία, και κάθε χρωμόσωμα μπορεί να έχει διπλασιαστεί (34). Η τρισωμία 8 είναι η πιο συχνή αριθμητική ανωμαλία των κλωνικών μυελοειδών διαταραχών και μπορεί να βρεθεί σε οξεία μυελογενή λευχαιμία, μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα και μυελοϋπερπλαστικές διαταραχές (35-37). Πιθανά οι ποσοτικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες τέτοιου είδους οδηγούν σε αλλαγή των επιπέδων έκφρασης ογκογονιδίων ή ογκοκατασταλτικών γονιδίων που συμβάλλουν στην καρκινογένεση.

1.3.3 Σημειακές μεταλλάξεις

Σημειακές μεταλλάξεις, που δεν ανιχνεύονται με την κλασσική κυτταρογενετική, παίζουν επίσης σπουδαίο ρόλο στην εμφάνιση των αιματολογικών κακοηθειών. Η ανακάλυψη τέτοιων μεταλλάξεων απαιτεί τον προσεκτικό έλεγχο των δειγμάτων των ασθενών για γνωστά τέτοια γονίδια. Έχουν αναγνωρισθεί πολλές μεταλλάξεις που οδηγούν σε ενεργοποίηση γονιδίων. Για παράδειγμα, η σημασία του stem cell factor (SCF) και του υποδοχέα του, που ονομάζεται KIT για τη φυσιολογική ανάπτυξη και επιβίωση των μαστοκυττάρων οδήγησε στην έρευνα σημειακών μεταλλάξεων αυτών των γονιδίων στην συστηματική μαστοκυττάρωση (38). Είναι πλέον γνωστό ότι το 40% των περιπτώσεων, ιδιαίτερα εκείνων με συμμετοχή του μυελού των οστών, έχουν σημειακή μετάλλαξη στο KIT γονίδιο, και πιο συχνά την Asp816Val (39). Άλλες γνωστές και σημαντικές μεταλλάξεις είναι η FLT3 που απαντάται στις οξείες μυελογενείς λευχαιμίες (40), οι μεταλλάξεις που αφορούν στην οικογένεια των γονιδίων RAS, αλλά και οι με-



ταλλάξεις που αφορούν στα ογκοκατασταλτικά γονίδια p53 και Rb (retinoblastoma), που απαντώνται τόσο σε συμπαγείς όγκους όσο και σε αιματολογικές κακοήθειες(41-43).

1.3.4 Επιγενετικές αλλαγές

Υπάρχουν όλο και περισσότερες αναφορές στη βιβλιογραφία ότι επιπρόσθετα των γενετικών αλλαγών, σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση παίζουν και οι επιγενετικές αλλαγές που επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση χωρίς αλλαγές στη νουκλεοτιδική αλληλουχία. Κύριες επιγενετικές αλλαγές είναι η μεθυλίωση του DNA και η μεθυλίωση και ακετυλίωση των ιστονών, ενώ θα μπορούσαν να συμπεριληφθούν και τα microRNAs (mir). Τα micro RNA είναι μόρια μονής έλικας RNA, περίπου 21-23 νουκλεοτιδίων σε μήκος, τα οποία επίσης ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων. Τα microRNAs κωδικοποιούνται από γονίδια τα οποία μεταγράφονται από DNA, αλλά δε μεταφράζονται σε πρωτεΐνες (non-coding RNA).

Η μεθυλίωση του DNA σχετίζεται γενικά με μεταγραφική αποσιώπηση των γονιδίων. Ο «φυσιολογικός» ρόλος της μεθυλίωσης στον άνθρωπο περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.1. Διαταραχές στο πρότυπο μεθυλίωσης του DNA έχει βρεθεί σε μία πλειάδα αιματολογικών κακοηθειών. Μία σφαιρική γενωμική υπομεθυλίωση έχει περιγραφεί σε λεμφοκύτταρα χρόνια λεμφογενούς λευχαιμίας (ΧΛΛ) και σε βλάστες οξείας μυελογενούς λευχαιμίας (ΟΜΛ) σε σχέση με φυσιολογικά αιμοποιητικά κύτταρα (44,45). Υπομεθυλίωση του DNA έχει περιγραφεί για διάφορα γονίδια που εμπλέκονται στις αιματολογικές κακοήθειες μεταξύ των οποίων του BCL2 (στην ΧΛΛ), του TNF-β (στη ΧΜΛ και ΟΜΛ), του H-RAS (στη ΧΛΛ), και του FMS (στην ΟΜΛ) (46). Εφ' όσον η υπομεθυλίωση γενικά επάγει τη μεταγραφική δραστηριότητα, είναι ευνόητο ότι αυτές οι επιγενετικές αλλαγές οδηγούν σε υπερέκφραση αυτών των γονιδίων. Αντίθετα, υπερμεθυλίωση έχει αναφερθεί για πολλά ογκοκατασταλτικά γονίδια μεταξύ των οποίων το CDKN2A (p16INK4A), CDKN2B (p15INK2B) και η E-cadherin κυρίως στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα και τις οξείες μυελογενείς λευχαιμίες. Ο ρόλος των επιγενετικών αλλαγών στις αιματολογικές κακοήθειες αναπτύσσεται αναλυτικότερα στο κεφάλαιο 3.

Η τροποποίηση των ιστονών είναι ένας ακόμα επιγενετικός μηχανισμός που ρυθμίζει την μεταγραφή. Διαταραχές της ακετυλίωσης των ιστονών έχουν περιγραφεί στις λευχαιμίες. Η ακετυλίωση των ιστονών ρυθμίζεται από δύο ομάδες ενζύμων, τις ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών, που οδηγούν σε χαλάρωση της δομής της χρωματίνης και τις αποακετυλάσες των ιστονών (HDACs: histone deacetylases), που οδηγούν σε κλειστή μορφή χρωματίνης και με-



ταγραφική καταστολή. Διάφοροι χιμαιρικοί μεταγραφικοί παράγοντες πιστεύεται ότι λειτουργούν μέσω ενεργοποίησης των HDACs, αποσιωπώντας γονίδια που είναι σημαντικά για τη φυσιολογική διαφοροποίηση, οδηγώντας έτσι σε αναστολή της ωρίμανσης (47,48).

Έτσι, είναι πλέον φανερό ότι οι επιγενετικές αλλαγές ανευρίσκονται σε όλες τις αιματολογικές κακοήθειες. Για το λόγο αυτό τελευταία έχει δοθεί μεγάλη έμφαση στην ανάπτυξη θεραπευτικών παραγώγων που αναστέλλουν τις HDACs ή της DNA μεθυλοτρανσφεράσες (DNMTs: DNA methyl-transferases) (49,50).



2. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ ΚΑΙ ΚΥΚΛΙΝΕΣ

2.1 Ιστορική Αναδρομή

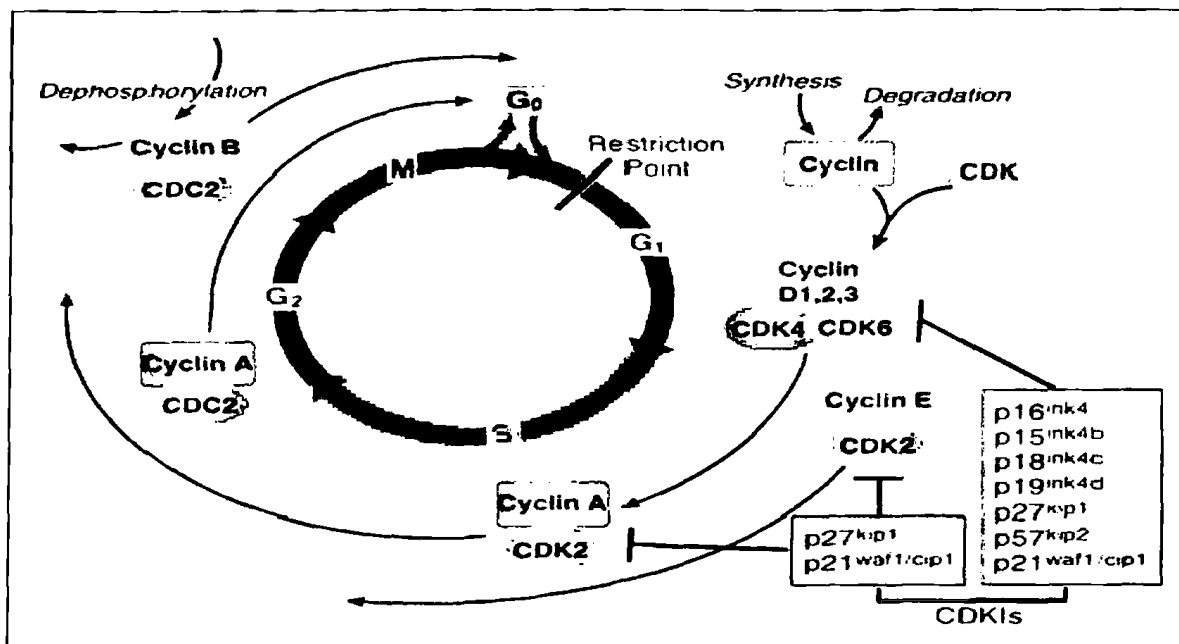
Έχουν περάσει 25 χρόνια από την ανακάλυψη της κυκλίνης από τον Tim Hunt και τους συνεργάτες του κατά τη διάρκεια μιας σειράς μαθημάτων Φυσιολογίας στο Εργαστήριο Marine Biology στο Woods Hole (51). Όπως πολλές σημαντικές ανακαλύψεις, η ανακάλυψη της κυκλίνης αντικατοπτρίζει το σταυροδρόμι της τύχης, με την ευφυΐα και το σθένος της ανάπτυξης μιας υπόθεσης από μία ουσιαστική παρατήρηση. Η παρατήρηση αφορούσε στην αύξηση και μείωση των επιπέδων αυτής της πρωτεΐνης κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, με ένα τρόπο κυκλικό, εξ' ου και η ονομασία κυκλίνη. Ο Hunt διατύπωσε «Είναι δύσκολο να πιστέψω ότι η συμπεριφορά των κυκλινών δε σχετίζεται με διαδικασίες που εμπλέκονται στην κυτταρική διαίρεση» και συνέχισε προτείνοντας ότι η σύνθεση αυτής της πρωτεΐνης οδηγεί τα κύτταρα σε μίτωση και η αποδόμησή της επιτρέπει στα κύτταρα να ολοκληρώσουν ένα κυτταρικό κύκλο και να ξεκινήσουν έναν άλλο. Ο χρόνος τον δικαίωσε. Η ανακάλυψη των κυκλινών οδήγησε στην ανάπτυξη του μοντέλου ενός αυτόνομου «ταλαντωτή» (oscillator) που οδηγεί το κύτταρο σε κυτταρικό κύκλο από τα πρώιμα εμβρυονικά κύτταρα, ενώ η ανακάλυψη των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (52) αποκάλυψε ότι αυτός ο «ταλαντωτής» μπορούσε να εμπλέκεται και σε μηχανισμούς αντιγραφής των χρωμοσωμάτων και διαχωρισμού των αδερφών χρωματίδων (53). Οι Βρετανοί Timothy Hunt και Paul Nurse, της οργάνωσης Imperial Cancer Research Fund της Βρετανίας και ο Αμερικανός Leland H. Hartwell, διευθυντής του Κέντρου Έρευνας για τον καρκίνο Fred Hutchinson στο Σιάτλ θα μοιραστούν τελικά το βραβείο Νόμπελ Ιατρικής - Φυσιολογίας για το 2001 για την ανακάλυψη των κυκλινών.

2.2 Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου

Ο κυτταρικός κύκλος είναι μια διαδικασία υψηλής ρύθμισης που οδηγεί στο διπλασιασμό και τη μεταβίβαση της γενετικής πληροφορίας από τη μία κυτταρική γενιά στην άλλη. Κατά τη διαδικασία αυτή το γενετικό υλικό (DNA) πρέπει να διπλασιαστεί με ακρίβεια και πανομοιότυπα χρωμοσωμικά αντίγραφα να μοιραστούν στα θυγατρικά κύτταρα (54).



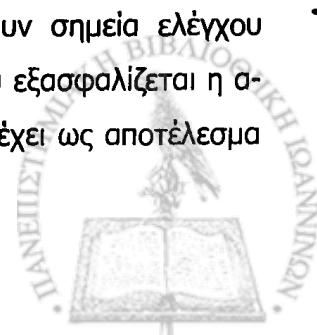
Ο κυτταρικός κύκλος διακρίνεται σε 4 φάσεις: τη **Φάση S** (Synthesis), κατά την οποία γίνεται η σύνθεση του DNA, τη **Φάση M** (Mitosis), η οποία χαρακτηρίζεται από τη δημιουργία των διπολικών μιτωτικών ατράκτων, το διαχωρισμό των αδελφών



Εικόνα 2.1. Ο κυτταρικός κύκλος. Ο κυτταρικός κύκλος διακρίνεται σε 4 φάσεις (G₁, S, G₂ και M). Η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου ευοδώνεται από τις κινάσες που εξαρτώνται από τις κυκλίνες (CDKs), οι οποίες ρυθμίζονται θετικά από τις κυκλίνες και αρνητικά από τους αναστολείς των CDKs (CDKIs). Το περιοριστικό σημείο (restriction point) είναι το σημείο από το οποίο και μετά τα κύτταρα προχωρούν στην επόμενη φάση του κυτταρικού κύκλου ανεξαρτήτως εξωτερικών ερεθισμάτων. Πηγή: Schwartz, J Clin Oncol 2005 (1)

χρωματίδων και την κυτταρική διαίρεση, ενώ μεταξύ των δύο αυτών φάσεων υπάρχουν περιόδοι ποικίλου χρόνου, η φάση G₁ και η φάση G₂. Η **φάση G₁** (gap 1, χάσμα 1) είναι το μεσοδιάστημα μεταξύ της μίτωσης (φάση M) και της σύνθεσης του DNA (φάση S). Στη φάση αυτή το κύτταρο δέχεται διέγερση από εξωκυττάριους μιτογόνους και αυξητικούς παράγοντες. Σε απόκριση αυτών των ερεθισμάτων, το κύτταρο περνάει από τη φάση G₁ και προχωράει στη σύνθεση του DNA στη φάση S. Η **φάση G₂** (gap 2, χάσμα 2) είναι το μεσοδιάστημα από την ολοκλήρωση της αντιγραφής του DNA στη φάση S (Εικόνα 2.1). Ως **φάση G₀** ορίζεται η φάση ηρεμίας του κυττάρου (55).

Η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου πρέπει να εξασφαλίζει ότι οι διαδικασίες σε κάθε φάση ολοκληρώνονται πριν τη μετάβαση στην επόμενη φάση. Έτσι υπάρχουν σημεία ελέγχου (checkpoints) σε στρατηγικά σημεία προς το τέλος της κάθε φάσης όπου εξασφαλίζεται η ακεραιότητα του DNA (56). Οποιαδήποτε διαταραχή στα σημεία ελέγχου έχει ως αποτέλεσμα



των ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό του κυττάρου ή τη μεταβίβαση βλαβών του DNA στην επόμενη γενιά κυττάρων (57), (58). Γονίδια που εμπλέκονται στα σημεία ελέγχου αποτελούν αντικείμενο μελέτης σε όλες τις κακοήθειες (9).

Η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου ελέγχεται στενά από μία αλυσίδα συμπλεγμάτων, κάθε μία από τις οποίες αποτελείται από μία ρυθμιστική υποομάδα (**κυκλίνη**) και μία καταλυτική υποομάδα (κινάση που εξαρτάται από την κυκλίνη, **CDKs: cyclin dependent kinases**) (59). Οι CDKs είναι σερίνο-θρεονινο-κινάσες (Ser/Thr κινάσες), οι οποίες γίνονται ενεργείς μόνο όταν ενώνονται με την αντίστοιχη ρυθμιστική πρωτεΐνη (πχ κυκλίνη ή άλλες πρωτεΐνες). Μέχρι σήμερα 13 CDKs και 25 πρωτεΐνες που περιέχουν κυκλίνες έχουν ταυτοποιηθεί. Μεταξύ αυτών οι CDKs 1,2,4,6 και οι κυκλίνες A,B,D,E άμεσα ρυθμίζουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (60). Η έκφραση αυτών των κυκλινών ποικίλει κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, υποδηλώνοντας την αρχή της κάθε φάσης και τη μετάβαση από τη μία φάση στην άλλη (1).

Γενικά, το σύμπλεγμα CDK 4,6/κυκλίνη D και CDK2/κυκλίνη E φωσφορυλιώνουν και αδρανοποιούν την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (Rb), απελευθερώνοντας και ενεργοποιώντας τους μεταγραφικούς παράγοντες E2F/DP1 και επάγοντας τη μεταγραφή πολλών γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τη G1/S μετάβαση και την πρόοδο της κυτταρικής φάσης S (61). Το σύμπλεγμα CDK2/κυκλίνη A είναι επίσης απαραίτητο για την πρόοδο της κυτταρικής φάσης S. Τα συμπλέγματα CDK1(cdc2)/κυκλίνη A και /κυκλίνη B καθορίζουν την G2/M μετάβαση. Τα συμπλέγματα CDK2/κυκλίνη E και CDK1/κυκλίνη B εμπλέκονται στην ολοκλήρωση της φάσης M. Το τριμερές σύμπλεγμα CDK7/κυκλίνη H/MAT1 (που ονομάζεται και CDK- activator kinase, CAK) εμπλέκεται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου μέσω φωσφορυλίωσης ειδικών υπολειμμάτων θρεονίνης και ενεργοποιώντας τις CDK1,2,4/6.

Η πλήρης ενεργοποίηση των ολοενζύμων CDK/κυκλίνης απαιτεί επίσης την αποφωσφορυλίωση των CDKs σε ειδικά υπολείμματα τυροσίνης και θρεονίνης, μία διαδικασία για την οποία μεσολαβούν οι φωσφατάσες διπλής ειδικότητας (dual specificity phosphatases: **DUSPs**) πχ η cdc25 (62).

Η δραστηριότητα των CDKs ρυθμίζεται αρνητικά από ενδογενείς αναστολείς που ονομάζονται **αναστολείς των κινασών που εξαρτώνται από τις κυκλίνες (CDKIs: cyclin dependent kinase inhibitors)**, οι οποίοι λειτουργούν ως αρνητικοί ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου και



σταματούν το κύτταρο από το να προχωρήσει στην επόμενη φάση του κυτταρικού κύκλου (63).

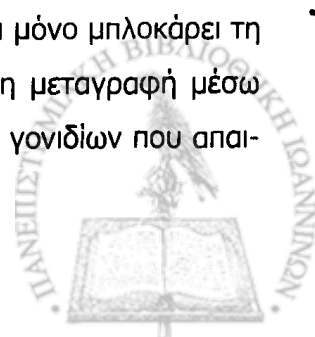
Οι CDKIs διακρίνονται σε δύο ομάδες. Η πρώτη ομάδα ονομάζεται οικογένεια **INK4** και περιλαμβάνει του αναστολείς CDKN2A (p16INK4A), CDKN2B (p15INK4B), p18INK4 ψ και το p19INK4d. Οι αναστολείς αυτοί είναι ειδικοί της G1 φάσης και αναστέλλουν τα συμπλέγματα που σχηματίζει η κυκλίνη D με τις κινάσες CDK2,-4 και -6. Η δεύτερη ομάδα ονομάζεται οικογένεια **CIP/KIP** και περιλαμβάνει τους αναστολείς p21WAF1, p27kip1 και CDKN1C (p57kip2) (64). Η ανασταλτική τους δράση περιλαμβάνει ένα μεγάλο εύρος συμπλεγμάτων κυκλινών και CDKs (κυρίως της κυκλίνης E και της κυκλίνης A) που συμμετέχουν στη φάση G1 και S (65-69).

2.3 Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου από τη φάση G0 στη φάση G1

Τα υγιή κύτταρα πρέπει να αποφασίσουν πότε θα διαιρεθούν (άρα πότε θα εισέλθουν στον κυτταρικό κύκλο) και πότε θα παραμείνουν στη φάση G0 (φάση ηρεμίας). Αν και ονομάζεται φάση ηρεμίας, η φάση G0 είναι στη πραγματικότητα μια ενεργής φάση στην οποία διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, αλλά και κυτταρική ανάπτυξη λαμβάνουν χώρα (70). Είναι απαραίτητο να υπάρχει ακριβής ρύθμιση, γιατί σε αντίθετη περίπτωση (δηλαδή ανεξέλεγκτη κυτταρική διαίρεση χωρίς κυτταρική ανάπτυξη) θα οδηγούσε σε όλο και μικρότερα κύτταρα με κάθε διαίρεση. Η είσοδος στο κυτταρικό κύκλο (G1) ελέγχεται από το περιοριστικό σημείο (restriction point) – ένα μεταβατικό σημείο πέρα από το οποίο η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου είναι ανεξάρτητη από την επίδραση εξωτερικών μιτογόνων ερεθισμάτων (71). Μιτογόνα ερεθίσματα μεταβιβάζονται μέσω του μονοπατιού RAS/RAF/MAPK του οποίου τελικό σημείο είναι η διέγερση για την παραγωγή κυκλινών τύπου D (72).

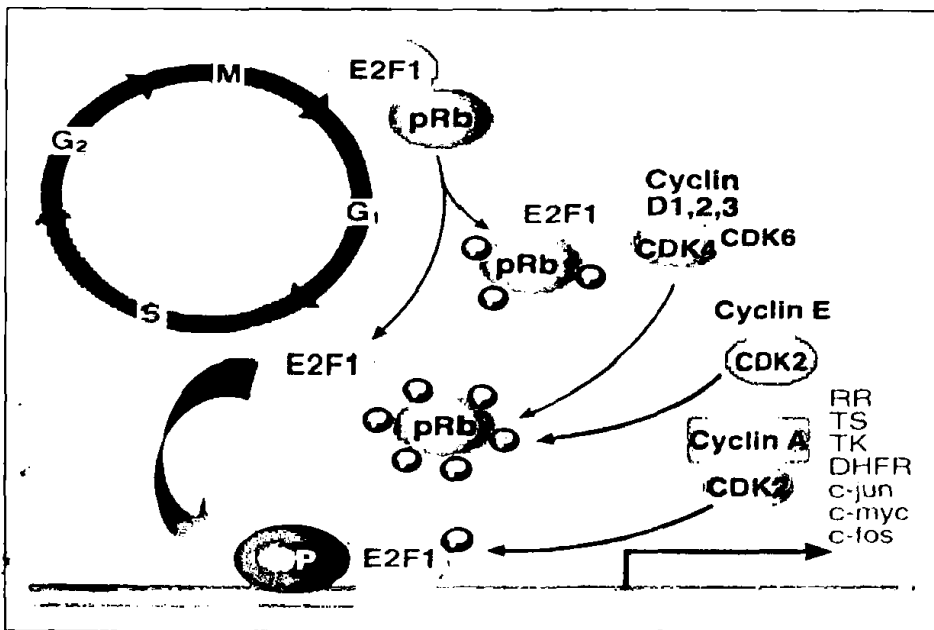
2.4 Η μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S

Η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (Rb) παίζει κεντρικό ρόλο στη μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S. Στην υποφωσφορυλιωμένη μορφή του η πρωτεΐνη Rb αναστέλλει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου από τη φάση G1 στη φάση S μέσω αλληλεπίδρασης με μέλη της οικογένειας του μεταγραφικού παράγοντα E2F. Αυτή η αλληλεπίδραση όχι μόνο μπλοκάρει τη μεταγραφική ενεργοποίηση του E2F, αλλά επίσης ενεργά καταστέλλει τη μεταγραφή μέσω στρατολόγησης των αποακετυλασών των ιστονών για τους εκκινητές των γονιδίων που απαι-



τούνται για την είσοδο στη φάση S (73). Κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, το Rb αδρανοποιείται από διαδοχική φωσφορυλίωση μέσω των συμπλεγμάτων της κυκλίνης D-CDK4 και -6 και της κυκλίνης E-CDK2. Σε απόκριση μιτογόνων ερεθισμάτων, το κύτταρο συνθέτει κυκλίνες τύπου D οι οποίες ενώνονται με τις CDK-4 και -6. Όταν το Rb είναι μερικά φωσφορυλιωμένο από το σύμπλεγμα κυκλίνης D-CDK4 και -6, είναι ακόμα ενωμένο με τον E2F, όμως αυτός ο μεταγραφικός παράγοντας μπορεί να συμμετέχει στη μεταγραφή ορισμένων γονιδίων όπως της κυκλίνης E. Η κυκλίνη E τότε ενώνεται με τη CDK2 και φωσφορυλιώνει πλήρως το Rb, απελευθερώνοντας τον παράγοντα E2F που οδηγεί στην ενεργοποίηση πολλών πρωτεϊνών της φάσης S, όπως της θυμιδυλ-συνθετάσης (TS) και της διυδροφυλικής ρεντουκτάσης (DHFR) (Εικόνα 2.2)(74).

Αν και το Rb αποτελεί κύριο στόχο των κινασών που εξαρτώνται από την κυκλίνη D, το σύμπλεγμα κυκλίνης E-CDK2 φωσφορυλιώνει και άλλους στόχους επίσης, όπως το p27KIP1, το οποίο επιπλέον διευκολύνει την είσοδο στη φάση S, την πρωτεΐνη p220, που χαρτογραφείται στον τόπο του γονιδίου της Αταξίας Τηλαγγειεκτασίας, και που διεγείρει την μεταγραφή γονιδίων ιστονών που εξαρτώνται από την αντιγραφή και τη νουκλεοσομίνη, η οποία ρυθμίζει το διπλασιασμό του κεντρομεριδίου (54). Η φάση G1 ρυθμίζεται επίσης από τα μέλη της οικογένειας INK4, τα οποία δρουν ως ειδικοί αναστολείς των κινασών 4 και 6.



Εικόνα 2.2. Η μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S και η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (Rb). Η υποφωσφορυλιωμένη μορφή του Rb ενώνεται με το μεταγραφικό παράγοντα E2F1. Οι CDK2, CDK4 και CDK6 φωσφορυλιώνουν την πρωτεΐνη Rb. Ο E2F1 απελευθερώνεται, ενώνεται με το DNA και επάγει τη σύνθεση της θυμιδυλ-συνθετάσης, της θυμιδιν-κινάσης και της διυδροφυλικής ρεντουκτάσης. Η φωσφορυλίωση του E2F1 από το σύμπλεγμα κυκλίνη A-CDK2 έχει ως αποτέλεσμα την αποδόμησή του (1).



Στη αρχή της S φάσης, οι κυκλίνες D και E αποδομούνται από το **πρωτεάσωμα***. Η παραγωγή της κυκλίνης A σε συνδυασμό με τη CDK2 ευοδώνει την πρόοδο της S φάσης, με την παραγωγή και άλλων ενζύμων και πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη σύνθεση του DNA, συμπεριλαμβανομένων και ιστονών, αλλά και του PCNA (proliferating cell nuclear antigen). Ωστόσο για τη σωστή πρόοδο της S φάσης είναι απαραίτητη και η προοδευτική αδρανοποίηση του E2F, που εν μέρει επιτυγχάνεται με τη φωσφορυλιωτική δράση των συμπλεγμάτων της κυκλίνης A με αντίστοιχες κινάσες. Το σύμπλεγμα της κυκλίνης A-CDK2 σταθερά ενώνεται με τον E2F αδρανοποιώντας έτσι την ικανότητα που έχει να συνδέεται με το DNA (75).

2.5 Ρύθμιση από τη φάση S στη φάση G2 και φάση M

Στο τέλος της φάσης S και κατά τη διάρκεια της φάσης G2, τα κύτταρα προετοιμάζονται για τη φάση M αυξάνοντας τα επίπεδα των κυκλινών A και B. Καθώς τα επίπεδα της κυκλίνης B αυξάνονται, δημιουργείται ένα σύμπλεγμα με την CDK1 (cdc2) στο κυτταρόπλασμα, όπου παραμένει μέχρι την μίτωση, οπότε και εισέρχεται στον πυρήνα. Πρόσφατα περιγράφηκε ένα καινούριο σημείο ελέγχου στη φάση S, που ονομάστηκε σημείο ελέγχου αντιγραφής (replication checkpoint). Αυτό το σημείο ελέγχου επιμελείται την πρόοδο στην S φάση και μειώνει την ταχύτητα σύνθεσης του DNA. Συμπεριλαμβάνει την ενεργοποίηση των κινασών ATM και ATR με ακόλουθη ενεργοποίηση των Chk1 (checkpoint 1) και Chk2 (checkpoint 2) (76). Αυτά τα μονοπάτια τελικώς ελέγχουν την ικανότητα του κυττάρου να εισέλθει στη μίτωση, που εξαρτάται από την ολοκλήρωση της φάσης S. Η είσοδος στη φάση M καθορίζεται από τη ενεργοποίηση του συμπλέγματος κυκλίνης B-cdc2, που ρυθμίζεται από την κατάσταση φωσφορυλίωσης του, τόσο ευοδωτικά μέσω φωσφορυλίωσης στο Thr161 από το σύμπλεγμα H-CDK7, όσο και ανασταλτικά στο Thr14 και Thr15 (77). Σε περίπτωση βλάβης του DNA οι κινάσες ATM και ATR ενεργοποιούνται φωσφορυλιώνοντας τις Chk1 και Chk2 αλλά και την cdc25 η οποία εμποδίζει την ενεργοποίηση του συμπλέγματος της κυκλίνης B-cdc2 και έτσι συγκρατεί την πρόοδο της φάσης S και της G2 και την είσοδο στη φάση M (78).

Κατά τη διάρκεια της μίτωσης, η δημιουργία της μιτωτικής (ή πυρηνικής) ατράκτου από το κεντρόσωμα είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της ακεραιότητας του γενετικού υλικού μεταξύ των θυγατρικών κυττάρων και ελέγχεται από ένα σημείο που ανιχνεύει διαταραχές

* Το πρωτεάσωμα είναι σύμπλεγμα πρωτεϊνών και βρίσκεται στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα των ευκαρυωτικών οργανισμών. Κύρια λειτουργία του είναι η αποδόμηση πρωτεϊνών που έχουν υποστεί βλάβη ή που δε χρειάζονται.



των μικροσωληνίσκων (79). Ανωμαλίες του κεντροσώματος ανιχνεύονται συχνά στις κακοήθειες και οδηγούν σε γενωμική αστάθεια. Η ωρίμανση του κεντροσώματος είναι πολύ σημαντική για τη διαίρεση του κυττάρου και ρυθμίζεται από διάφορες κινάσες όπως π.χ. **οι polo κινάσες (Plks)** και οι **aurora κινάσες (80)**. Η ωρίμανση του κεντροσώματος ξεκινά με το διπλασιασμό των κεντριολίων, που συμβαίνει στη φάση G1 και πυροδοτείται από τα συμπλέγματα κυκλίνης E-CDK2 και κυκλίνης D-CDK2. Η polo κινάση εμπλέκεται στο σχηματισμό της γ-τουμπουλίνης και στην ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Asp. Η aurora κινάση εμπλέκεται επίσης, στην ωρίμανση του κεντροσώματος. Η κινάση αυτή φαίνεται να είναι απαραίτητη για το σωστό σχηματισμό των πόλων της ατράκτου και τη διπολικότητα της, και φαίνεται να είναι απαραίτητη στο στάδιο διπλασιασμού/διαχωρισμού του κύκλου των κεντριολίων (81). Η πρωτεΐνη συζυγίου φαίνεται να παίζει επίσης ρόλο στη ρύθμιση της μιτωτικής ατράκτου και στη διατήρηση της κυτταρικής βιωσιμότητας, λόγω της έκφρασής της κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης στο κυτταρικό κύκλο (82).

Στις ανθρώπινες κακοήθειες, οι γενετικές διαταραχές σ' αυτά τα ρυθμιστικά του κυτταρικού κύκλου μόρια (συμπεριλαμβανομένων των κυκλινών, των CDKs, των ενδογενών CDKIs, του Rb) συμβαίνουν συχνά. Αποτέλεσμα αυτών των διαταραχών είναι ο μη ελεγχόμενος πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων λόγω της απώλειας ελέγχου στα περιοριστικά σημεία. Αλλαγές στον καταρράκτη CDK4,6/κυκλίνη D/INK4/ pRb/ E2F έχουν παρατηρηθεί στο 80% των κακοηθειών (83-85).



3. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΛΛΑΓΩΝ ΣΤΙΣ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΚΟΗΘΕΙΕΣ

3.1 Εισαγωγή

Έχει αναγνωρισθεί εδώ και πολλά χρόνια ότι η ογκογένεση είναι μία διαδικασία που περιλαμβάνει πολλαπλές γενετικές διαταραχές οι οποίες συμβάλλουν στην προοδευτική μεταμόρφωση των φυσιολογικών κυττάρων προς ένα νεοπλασματικό φαινότυπο (86). Αυτές οι διαταραχές περιλαμβάνουν μη αναστρέψιμες αλλαγές στην αλληλουχία του DNA, όπως μεταλλάξεις, ελλείψεις και μεταθέσεις που μπορεί να οδηγήσουν σε ενεργοποίηση ογκογονιδίων ή αδρανοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, ή το σχηματισμό νέων χιμαιρικών πρωτεϊνών. Γνωστά παραδείγματα τέτοιων γενετικών αλλαγών είναι οι σημειακές μεταλλάξεις που αφορούν στο γονίδιο RAS (42,87), η έλλειψη της ρυθμιστικής για τον κυτταρικό κύκλο πρωτεΐνης CDKN2A (p16INK4A) (88,89) και η αμοιβαία μετάθεση t(9;22) που οδηγεί στο σχηματισμό του χιμαιρικού γονιδίου bcr-abl.

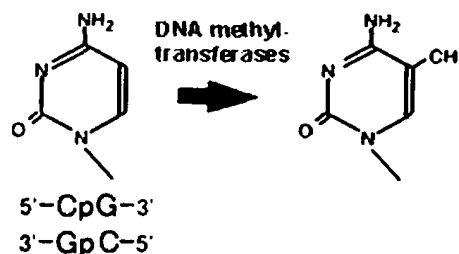
Τελευταία γίνεται φανερό ότι ο καρκίνος δεν είναι μόνο μια γενετική και περιβαλλοντική νόσος, αλλά και μία επιγενετική νόσος (90). Ο όρος **επιγενετικές αλλαγές (epigenetics)** αναφέρεται στις αλλαγές της γονιδιακής έκφρασης με μηχανισμούς που δεν επηρεάζουν την γονιδιακή αλληλουχία του DNA. Οι αλλαγές αυτές παραμένουν κατά την κυτταρική διαίρεση, δηλαδή κληρονομούνται. Η επιγενετική μελετά όλους αυτούς τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στη δημιουργία της φαινοτυπικής πολυπλοκότητας κατά τη μορφογένεση. Οι μηχανισμοί αυτοί επιτρέπουν στα κύτταρά μας να χρησιμοποιούν από τη γενετική πληροφορία μόνο αυτή που πρέπει. Αν και κάθε κύτταρό μας διαθέτει ολόκληρη τη γενετική πληροφορία για τη δημιουργία του οργανισμού, δε χρησιμοποιεί παρά μόνο ένα μέρος της. Για παράδειγμα, τα κύτταρα του ήπατος, τα οποία χρειάζεται να παράγουν ένζυμα χρησιμοποιούν διαφορετικό κομμάτι γενετικής πληροφορίας από τα κύτταρα του καρδιακού μυός, ο οποίος πρέπει να μπορεί να πάλλεται και διαφορετικό από τα ερυθρά αιμοσφαίρια που κύριο ρόλο έχουν τη μεταφορά οξυγόνου στους ιστούς. Οι επιγενετικές αλλαγές λειτουργούν σαν ένα είδος «διακόπτη» ο οποίος ενεργοποιεί μόνο όσα γονίδια πρέπει να εκφραστούν σε κάθε κυτταρικό τύπο. Επιπροσθέτως, αποτελούν ένα είδος μνήμης, η οποία περνά από το ένα κύτταρο στο θυγατρικό του: έτσι τα νέα κύτταρα ενός ιστού (τα οποία προέρχονται από διαίρεση των παλιών) διατηρούν την ταυτότητα του ιστού στον οποίο ανήκουν. Η πληροφορία δηλαδή, όπως προαναφέρθηκε, κληρονομείται.



Οι πιο γνωστοί μέχρι σήμερα επιγενετικοί μηχανισμοί είναι η μεθυλίωση του DNA και η μεθυλίωση και ακετυλίωση των ιστονών. Ο κύριος επιγενετικός μηχανισμός στα θηλαστικά, και ιδιαίτερα στον άνθρωπο είναι η μεθυλίωση. Όπως προαναφέρθηκε, σε ένα υγιές κύτταρο, η μεθυλίωση του DNA διατηρείται σε όλες τις κυτταρικές διαιρέσεις, επιτρέποντας την έκφραση μίας συγκεκριμένης ομάδας γονιδίων απαραίτητα για το συγκεκριμένο τύπο κυττάρου και μπλοκάροντας την έκφραση εξωγενών αλληλουχιών (91). Η μεθυλίωση δηλαδή αποτελεί έναν τρόπο άρσης της έκφρασης ενός γονιδίου, και άρα τα προϊόντα που προκύπτουν από τη μεταγραφή του παύουν να παράγονται όταν αυτό μεθυλιωθεί.

3.2 Ο μοριακός ρόλος της μεθυλίωσης του DNA

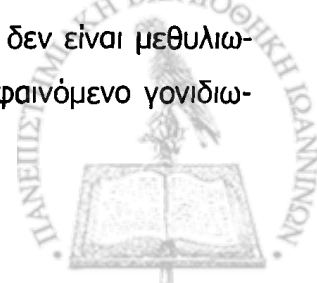
Η μεθυλίωση του DNA είναι ένας τύπος χημικής τροποποίησης του DNA που μπορεί να κληρονομηθεί, όπως προαναφέρθηκε χωρίς αλλαγή στην αλληλουχία του DNA. Η μεθυλίωση του DNA περιλαμβάνει την προσθήκη μιας μεθυλ-ομάδας στο DNA, π.χ. στη θέση 5 του άνθρακα του δακτυλίου της κυτοσίνης της πυριμιδίνης (εικόνα 3.1) και απαιτεί τη δράση συγκεκριμένων ενζύμων, των μεθυλοτρανσφερασών (DNMTs)(92).



Αυτή η τροποποίηση λαμβάνει χώρα μόνο όταν η κυτοσίνη ακολουθείται από μία βάση γουανίνης, δηλαδή μόνο το δινουκλεοτίδιο CpG μπορεί να είναι μεθυλιωμένο (όπου ρ φωσφοδιεστερικός δεσμός μεταξύ γουανίνης και κυτοσίνης).

Τα CpG δινουκλεοτίδια εμφανίζονται περίπου 1 στα 80 δινουκλεοτίδια, αντί 1 προς 16 όπως θα αναμέναμε από μια τυχαία κατανομή. Στα φυσιολογικά κύτταρα η μεθυλίωση είναι συχνότερη σε περιοχές με ελαττωμένη συχνότητα CpG δινουκλεοτιδίων (CpG poor). Αντίθετα, μεθυλίωση δε συμβαίνει σε περιοχές που είναι πλούσιες σε CpG δινουκλεοτίδια, και ονομάζονται «CpG νησίδες» στη *θάλασσα του πτωχού γονιδιώματος σε CpG*. Αυτές οι CpG νησίδες αποτελούν το 1-2% ολόκληρου του γονιδιώματος και χαρακτηρίζονται από μια συνολική CG περιεκτικότητα πάνω από 55% και από μία περίπου πέντε φορές πιο συχνή εμφάνιση του δινουκλεοτιδίου CpG (93). Οι CpG νησίδες δηλαδή, δεν είναι μεθυλιωμένες. Μια αξιοσημείωτη εξαίρεση αποτελούν τα αποτυπωμένα γονίδια (φαινόμενο γονιδιω-

Εικόνα 3.1 Δράση των μεθυλοτρανσφερασών για την προσθήκη $-CH_3$ στον 5-C του δακτυλίου της κυτοσίνης.



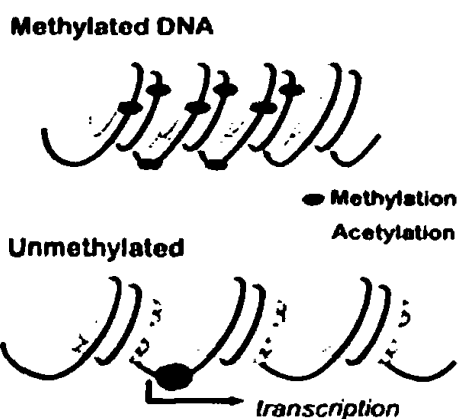
ματικής αποτύπωσης: genetic imprinting) και το αδρανές χρωμόσωμα X στα θήλεα άτομα όπου οι CpG νησίδες είναι σχεδόν εξ ολοκλήρου μεθυλιωμένες (94).

Η μεθυλίωση του DNA οδηγεί μαζί με την αποακετυλίωση του DNA στο σχηματισμό πιο πυκνής χρωματίνης (ετεροχρωματίνη), μειώνοντας έτσι την πρόσβαση των περιοχών των εκκινητών για το βασικό μεταγραφικό μηχανισμό και αναστέλλοντας κατά συνέπεια τη γονιδιακή έκφραση (Εικόνα 3.2). Σε αντίθεση, στη μεταγραφικά ενεργή ευχρωματίνη οι ιστόνες είναι ακετυλιωμένες και το DNA μη μεθυλιωμένο και έτσι αυτή αντιγράφεται νωρίς κατά την φάση S του κυτταρικού κύκλου.

Περίπου το 50% των γονιδιακών εκκινητών στον άνθρωπο περιλαμβάνουν «CpG νησίδες». Αν και η πλειοψηφία των CpG νησίδων σχετίζεται με γονίδια «οικονομίας» (housekeeping), μερικές από αυτές βρίσκονται σε γονίδια ειδικά για το συγκεκριμένο ιστό (tissue-specific genes)(95). Η υπερμεθυλίωση των CpG νησιδίων που βρίσκονται σε περιοχές εκκινητών ογκοκατασταλτικών γονιδίων έχει καθιερωθεί πλέον ως ένας σημαντικός μηχανισμός γονιδιακής αδρανοποίησης (44). Η υπερμεθυλίωση δεν είναι ένας μεμονωμένος μηχανισμός επιγενετικού ελέγχου, αλλά σχετίζεται όπως αναφέρθηκε και παραπάνω και με άλλα κομμάτια του «παζλ», όπως οι DNMTs, HDACs, και οι μεθυλοτρανσφεράσες των ιστονών (96). Ο βαθμός της ειδικότητας καθενός από αυτούς τους μηχανισμούς στην αδρανοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων δεν έχει πλήρως διευκρινισθεί.

3.3 Μεθοδολογία ανίχνευσης των μεθυλιωμένων CpG

Σχεδόν όλες οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται σήμερα για την ανίχνευση της μεθυλίωσης της κυτσοσίνης μπορούν να διαιρεθούν σε δύο ομάδες: τεχνικές που βασίζονται σε **περιοριστικά ένζυμα** (Southern Blot υβριδισμός ή αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης) (97) και τεχνικές



Εικόνα 3.2 Μεθυλίωση του DNA, δομή χρωματίνης και γονιδιακή έκφραση.

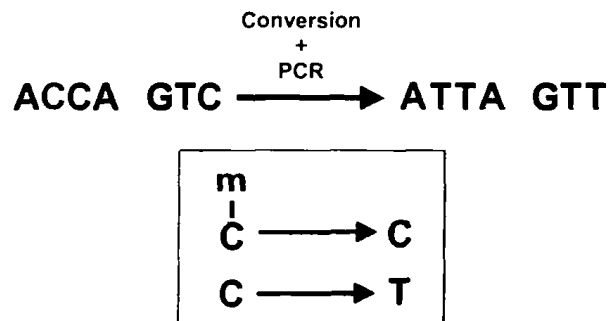
Η μεθυλίωση και επακόλουθη αποακετυλίωση του DNA οδηγεί σε πιο συμπυκνωμένη χρωματίνη, αναστέλλοντας τη μεταγραφή. Η απομεθυλίωση του DNA επιτρέπει την ακετυλίωση ευοδώνοντας τη μεταγραφή



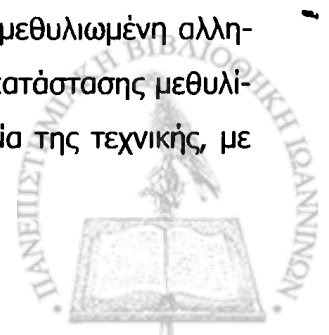
που βασίζονται στη **χημική κατεργασία με NaHSO₃** ενώ ακολουθεί αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης (PCR) (98,99).

Στην πρώτη περίπτωση εκμεταλλευόμαστε την αναστολή συγκεκριμένων περιοριστικών ενζύμων λόγω μεθυλίωσης των περιοχών αναγνωρισιμότητάς τους, ως ένδειξη της παρουσίας μεθυλίωσης. Ωστόσο, αυτός ο τρόπος προσέγγισης απαιτεί μεγάλες ποσότητες DNA υψηλού μοριακού βάρους και η πληροφορία σχετικά με την κατάσταση μεθυλίωσης περιορίζεται μόνο για τις περιοχές που είναι αναγνωρίσιμες από το ένζυμο, ενώ είναι και αρκετά χρονοβόρος μέθοδος. Στη δεύτερη περίπτωση η χημική κατεργασία με NaHSO₃ μετατρέπει τις μη μεθυλιωμένες κυτοσίνες σε ουρακίλες, ενώ οι μεθυλιωμένες κυτοσίνες προστατεύονται και μένουν ως έχουν. Αυτή η χημική μετατροπή έχει αποτελέσει τη βάση για πολλές τεχνικές που αναλύουν τη μεθυλίωση του DNA. Η επακόλουθη ενίσχυση του DNA, που έχει τροποποιηθεί από το NaHSO₃, με PCR αντικαθιστά τις ουρακίλες με θυμιδίνες και τις 5-μεθυλκυτοσίνες με κυτοσίνες (Εικόνα 3.3). Τα προϊόντα που προκύπτουν από την PCR μπορούν να αναλυθούν με διάφορες μεθόδους όπως η ανάλυση αλληλουχίας μετά από κατεργασία με NaHSO₃ (bisulphite sequencing) (99), η methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE) (100), η περιοριστική ανάλυση μετά από επεξεργασία με NaHSO₃ (bisulfite restriction analysis) (101), ή enzymatic regional methylation assay (ERMA) (102). Όλες αυτές οι τεχνικές παρέχουν λεπτομερή ποσοτική πληροφορία σχετικά με μία συγκεκριμένη περιοχή που έχει υποστεί μεθυλίωση.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ειδική της μεθυλίωσης (MSP: Methylation Specific PCR) έχει κυριαρχήσει στην ποιοτική ανάλυση μεθυλίωσης ογκοκατασταλτικών γονιδίων σε δείγματα ασθενών (103-106). Η προσέγγιση με την τεχνική MSP, απαιτεί επίσης αρχικά κατεργασία του γενωμικού DNA με NaHSO₃, και η ακόλουθη PCR γίνεται με δύο διαφορετικά ζεύγη εκκινητών, που είναι ειδικά είτε για τη μεθυλιωμένη είτε για τη μη μεθυλιωμένη αλληλουχία. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται πλέον ευρέως για τη μελέτη της κατάστασης μεθυλίωσης των CpG νησίδων στις ανθρώπινες κακοήθειες. Η μεγάλη ευαισθησία της τεχνικής, με



Εικόνα 3.3. Αρχή της χημικής κατεργασίας με NaHSO₃: απαμίνωση της κυτοσίνης παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων NaHSO₃, ενώ η μεθυλιωμένη κυτοσίνη παραμένει αναλλοίωτη. Αυτή η διαφορά στη χημική αντιδραστικότητα μεταφράζει την επιγενετική τροποποίηση ως αλλαγή στην πρωταρχική αλληλουχία



όριο ανίχνευσης περίπου 0,1% του μεθυλιωμένου DNA που βρίσκεται σε ένα κατά τα άλλα μη μεθυλιωμένο δείγμα, επιτρέπει την ποιοτική ανάλυση μεθυλίωσης όχι μόνο από φρέσκο περιφερικό αίμα, μυελό των οστών ή άλλα φρέσκα κατεψυγμένα παρασκευάσματα, αλλά και από βιοψίες παραφίνης (105,105-109).

Η πλέον αξιόπιστη μέθοδος για την ανίχνευση μεθυλίωσης παραμένει η ανάλυση αλληλουχίας μετά από κατεργασία με NaHSO_3 (bisulphite sequencing). Οι εκκινητές σχεδιάζονται για να ενισχύσουν μια περιοχή DNA, που έχει κατεργασθεί με NaHSO_3 , ανεξαρτήτως από την κατάσταση μεθυλίωσης και στο ενισχυμένο κομμάτι μπορεί ή να γίνει απευθείας ανάλυση της αλληλουχίας (sequencing) ή να κλωνοποιηθεί και να γίνει προσδιορισμός των μεμονωμένων κλώνων. Η δεύτερη μέθοδος είναι προτιμότερη γιατί επιτρέπει την ανίχνευση ακόμα και ενός μεμονωμένου μεθυλιωμένου CpG δινουκλεοτιδίου (110).

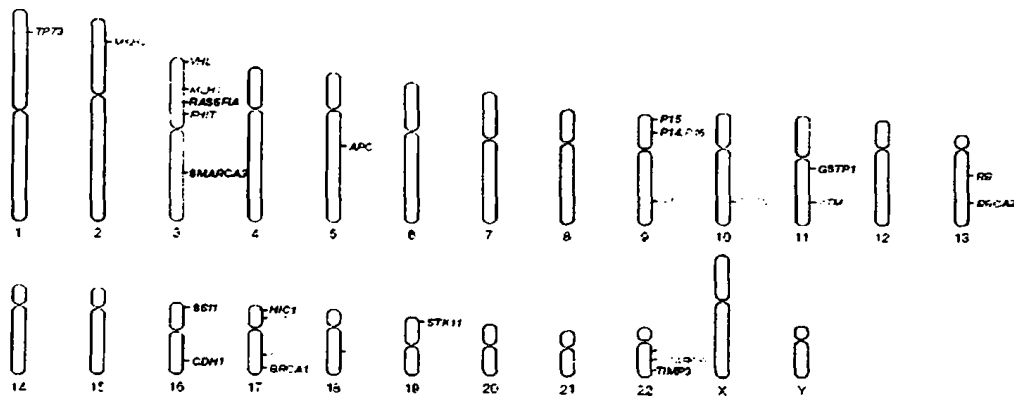
3.4 Επιγενετικές αλλαγές στον καρκίνο

Διαταραχές στη μεθυλίωση στον καρκίνο έχουν αναγνωριστεί εδώ και 20 χρόνια. Αρχικά, είχε περιγραφεί ότι το γένωμα των κακοήθων κυττάρων χαρακτηρίζεται από σφαιρική υπομεθυλίωση (global hypomethylation) (111), που περιλαμβάνει ιντρόνια, γονίδια αλλά και επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες του DNA. Στη συνέχεια, παρατηρήθηκε επιπλέον ότι ουσιαστικά όλοι οι τύποι καρκίνου παρουσιάζουν υπερμεθυλίωση σε CpG νησίδες εκκινητών που σχετίζονται με μεταγραφική αδρανοποίηση (112-115). Αυτό το φαινόμενο της μεθυλίωσης είναι τουλάχιστον το ίδιο συχνό όσο και η εμφάνιση σημειακών μεταλλάξεων ως μηχανισμός αδρανοποίησης ογκοκατασταλτικών γονιδίων (Εικόνα 3.4) (90).

Όπως έχει προταθεί στην «υπόθεση δύο χτυπημάτων» από τον Knudson*, η διαταραχή της λειτουργίας ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου γενικά, απαιτεί την απόλυτη απώλεια της λειτουργίας και των δύο αλληλομόρφων (116). Σε αυτό το πλαίσιο, μια μη φυσιολογική υπερμεθυλίωση ενός υποκινητή μπορεί να έχει το ίδιο αποτέλεσμα όπως μία μετάλλαξη ή έλλειψη σε ένα από τα δύο αλληλόμορφα και έτσι μπορεί να θεωρηθεί σαν ένας επιπρόσθετος μηχανισμός που συμβάλλει στην απώλεια ενός ή και των δύο αλληλομόρφων (113).

* Ο Alfred Knudson πρότεινε το 1971, ότι απαιτούνται δύο διαδοχικά γενετικά «χτυπήματα» για να μετατρέψουν ένα φυσιολογικό κύτταρο σε νεοπλασματικό: το πρώτο χτύπημα κληρονομείται. Τα αδρανοποιητικά αυτά χτυπήματα προκαλούν απώλεια της έκφρασης ογκοκατασταλτικών γονιδίων.





Εικόνα 3.4 Χάρτης του ανθρώπινου γονιδιώματος: Γονίδια που είναι συχνά μεθυλιωμένα ή και μεταλλαγμένα. Γονίδια τα οποία είναι γνωστό να είναι μόνο μεταλλαγμένα συμβολίζονται με πράσινο, γονίδια που είναι γνωστό να είναι μόνο μεθυλιωμένα συμβολίζονται με κόκκινο και γονίδια που έχουν βρεθεί τόσο μεθυλιωμένα όσο και μεταλλαγμένα συμβολίζονται με μωβ. Είναι αξιοσημείωτα ότι μεθυλιωμένα έχουν βρεθεί τόσα, αν όχι και περισσότερα, από όσα έχουν βρεθεί μεταλλαγμένα.

ATM: Ataxia telangiectasia mutated, *APC*: adenomatosis polyposis coli, *BRCA 1/2*: breast cancer1/2 early onset, *CDH-1*: E-cadherin, *CDKN2A/B*: cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/B, *FHIT*: fragile histidine triad, *GSTP1*: glutathionine S-transferase pi, *MLH1*: mutL homologue 1, colon cancer, non polyposis type, *MSHS*: mutS homologue 2, colon cancer, non-polyposis type 1, *NF1/2*: neurofloromin1/2, *PTCH*: patched homologue, *SMARCA3/B1*: SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily A, member 3/subfamily B, member 1, *STK11*: serine threonine kinase 11, *TIMP3*: tissue inhibitor of metalloproteinase 3, *TP53/73*: tumour protein p53, p73, *VHL*: Von-Hippel Lindau syndrome, Πηγή: Jones PA, Nature Rev Genet 2002

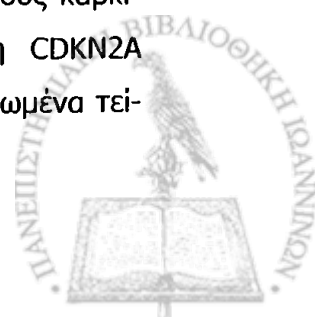
Περίπου το 50% των γονιδίων που ευθύνονται για τις οικογενείς μορφές καρκίνου είναι μεταλλαγμένα στη βλαστική σειρά, ενώ είναι μεθυλιωμένα και συνεπώς δεν εκφράζονται στις σποραδικές μορφές του καρκίνου. Περίπου το 50% των γονιδίων που ευθύνονται για τις οικογενείς μορφές καρκίνου είναι μεταλλαγμένα στη βλαστική σειρά, ενώ είναι μεθυλιωμένα και συνεπώς δεν εκφράζονται στις σποραδικές μορφές του καρκίνου. Επιπλέον, υπάρχει μία συνεχώς αυξανόμενη λίστα υποψήφιων ογκοκατασταλτικών γονιδίων, τα οποία είναι σιωπηλά λόγω μεθυλίωσης των εκκινητών τους σε διάφορες μορφές καρκίνου. Τα γονίδια αυτά φαίνεται να είναι σημαντικά στην ογκογένεση με βάση την πιθανολογούμενη δράση τους, χωρίς όμως να έχουν βρεθεί μεταλλαγμένα στις ίδιες μορφές καρκίνου. Παραδείγματα τέτοιων γονιδίων περιλαμβάνουν το γονίδιο MGMT (*O*⁶-methyl guanine-DNA-methyltransferase) (117), το οποίο κωδικοποιεί ένα σημαντικό γονίδιο επιδιόρθωσης του DNA, ο αναστολέας 2B της κινάσης που εξαρτάται από την κυκλίνη (CDKN2A), που κωδικοποιεί το p15 (118), και το RASSF1A (119), το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη αγνώστου λειτουργικότητας που ενώνεται όμως με το ογκογονίδιο RAS. Έτσι, τα τελευταία χρόνια φάνηκε ότι η μεθυλίωση των εκκινητών γονιδίων σχετίζεται με απώλεια της έκφρασης και προσδίδει έτσι μία επιλεκτική υπεροχή στα νεοπλασματικά κύτταρα, όπως ακριβώς και οι μεταλλάξεις. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν τα γονίδια VHL (Von Hippel-Lindau) (120), BRCA1 (breast cancer 1) (121,122) και

STK11 (serine/threoninekinase 11) (123), σημειακές μεταλλάξεις των οποίων προκαλούν οικογενείς μορφές καρκίνου νεφρού, μαστού και εντέρου αντίστοιχα, ενώ επιγενετική αποσιώπηση τους ανευρίσκεται στις σποραδικές μορφές αυτών των νεοπλασμάτων (124-126). Η σημασία της επιγενετικής αποσιώπησης στην αιτιολογία των μη οικογενών μορφών καρκίνου διαφάνηκε σε μελέτες που αφορούσαν το γονίδιο BRCA1. Αν και το γονίδιο θεωρούνταν σημαντικό μόνο για τις οικογενείς μορφές καρκίνου του μαστού, βρέθηκε μεθυλιωμένο στο 15% των γυναικών με τη σποραδική μορφή του καρκίνου. Επιπλέον ανάλυση με μικροσυστοιχίες υπέδειξε ότι το προφίλ της γονιδιακής έκφρασης των σποραδικών μορφών καρκίνου με μεθυλιωμένο το BRCA ήταν πανομοιότυπο με αυτό των οικογενών μορφών καρκίνου του μαστού με μεταλλαγμένο το BRCA και διαφορετικό από άλλου τύπου καρκίνου του μαστού (127).

Ένα ιδιαίτερο προφίλ υπερμεθυλίωσης νησιδίων CpG έχει περιγραφεί ανάλογα με τον τύπο της κακοήθειας. Έτσι για παράδειγμα, η υπερμεθυλίωση του γονιδίου BRCA1 είναι χαρακτηριστική του καρκίνου του μαστού και των ωοθηκών, ενώ δεν συμβαίνει σε άλλους τύπους καρκίνου (127). Ανάλογα, η υπερμεθυλίωση του hMLH1 συμβαίνει πιο συχνά σε κακοήθειες του παχέος εντέρου και του στομάχου και σε νεοπλάσματα του ενδομητρίου και σχεδόν σε κανένα άλλο τύπο νεοπλασματος (128,129). Αυτό το συγκεκριμένο πρότυπο επιγενετικής αδρανοποίησης δεν αποτελεί ιδιότητα μόνων των σποραδικών μορφών καρκίνου αλλά και νεοπλασμάτων που εμφανίζονται σε κληρονομικές μορφές καρκίνου, όπου η υπερμεθυλίωση των CpG νησιδίων φαίνεται να σχετίζεται με τον κάθε υπότυπο. Έχει προταθεί ότι θα μπορούσε αυτό το πρότυπο μεθυλίωσης να ονομαστεί «μεθυλότυπος» σε αναλογία του γενετικού όρου «γονότυπος», και διάφοροι μεθυλότυποι έχουν περιγραφεί για τις αιματολογικές κακοήθειες. Η περιγραφή ενός συγκεκριμένου προφίλ υπερμεθυλίωσης για κάθε τύπο κακοήθειας προσφέρει χρήσιμες πληροφορίες για την παρακολούθηση και την αντιμετώπιση των ασθενών βάσει της γνώσης της μεθυλίωσης του DNA.

3.5 Μονοπάτια που έχουν επηρεαστεί από αλλαγές της μεθυλίωσης του DNA

Ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων που επηρεάζουν ουσιώδη κυτταρικά μονοπάτια (pathways) έχουν βρεθεί να έχουν υποστεί μεθυλίωση με επακόλουθη μεταγραφική αποσιώπηση στον καρκίνο (44,90,113). Αν και ορισμένα γονίδια είναι μεθυλιωμένα σε πολλούς τύπους καρκίνου, όπως για παράδειγμα η ρυθμιστική του κυτταρικού κύκλου πρωτεΐνη CDKN2A (p16INK4A), έρευνες δείχνουν ότι το φάσμα των γονιδίων που βρίσκονται μεθυλιωμένα τεί-



νουν να είναι ειδικά για τον ιστό από τον οποίο προέρχεται η κακοήθεια. Επίσης έχουν βρεθεί συγκεκριμένα πρότυπα μεθυλίωσης σε διάφορες κακοήθειες (44,130). Μπορεί να υποθέσει κανείς ότι η επιγενετική αποσιώπηση πολλών γονιδίων μπορεί να προσδώσει ένα πλεονέκτημα επιβίωσης στο κύτταρο, αφού ουσιαστικά όλα τα κυτταρικά μονοπάτια που έχουν σχετισθεί κατά καιρούς με την ογκογένεση μπορούν να επηρεαστούν από την αποσιώπηση γονιδίων λόγω μεθυλίωσης, όπως φαίνεται και στον πίνακα 3.1 (131). Έτσι, επιπρόσθετα των γενετικών αλλαγών, αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA μπορούν να συμβάλλουν στη διαδικασία μεταμόρφωσης ενός φυσιολογικού κυττάρου σε νεοπλασματικό.

Πίνακας 3.1 Μονοπάτια που έχουν διαταραχθεί λόγω μεθυλίωσης και επακόλουθης αποσιώπησης ογκοκατασταλτικών γονιδίων στις ανθρώπινες νεοπλασίες

Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου	Rb, p14, p15, p16, p73
Κυτταρική διείσδυση και προσκόλληση	E-cadherin, APC, TIMP-3, VHL
Ρύθμιση της απόπτωσης	DAP-kinase 1, caspase 8, TMS-1
Διόρθωση βλαβών DNA	O ⁶ MGMT, hMLH, BRCA1, GSTπ
Απόκριση σε αυξητικούς παράγοντες	RARβ2, CRBP1, SOCS-1, SOCS-3, ER

3.6 Υπερμεθυλίωση CpG νησίδων σε αιματολογικές κακοήθειες

Αποσιώπηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων λόγω μεθυλίωσης έχει βρεθεί να συμβαίνει σε πληθώρα αιματολογικών νεοπλασμάτων (131-133) και μπορεί να συμβαίνει σε πρώιμο στάδιο της παθογένειας αυτών των νεοπλασιών (134). Το προφίλ της μεθυλίωσης στις αιματολογικές κακοήθειες διαφέρει από αυτό των συμπαγών όγκων, όσον αφορά στα γονίδια που επηρεάζονται, αλλά από την άλλη έχουν βρεθεί διαταραγμένα όλα τα μονοπάτια που σχετίζονται με τον καρκίνο. Στον πίνακα 3.2 που ακολουθεί αναφέρονται τα γονίδια που έχουν βρεθεί πιο συχνά μεθυλιωμένα στις κυριότερες αιματολογικές κακοήθειες (48,135-142).

Επιπλέον, υπάρχουν όλο και περισσότερες ενδείξεις ότι οι επιγενετικές αλλαγές μπορεί να συμβάλλουν, όχι μόνο στη λευχαιμογένεση, αλλά να αλληλεπιδρούν και με τις χρωμοσωμικές αλλαγές. Στην οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία με τη χαρακτηριστική μετάθεση t(15;17), υπάρχουν πειραματικές αποδείξεις για συσχέτιση μεταξύ γενετικών και επιγενετικών αλλαγών (143,144). Έχει προταθεί ότι η χιμαιρική πρωτεΐνη PML/RARα που προκύπτει από τη μετά-



θεση στρατολογεί DNMTs στους υποκινητές γονιδίων-στόχων οδηγώντας σε μεθυλίωση των CpG νησίδων που βρίσκονται κοντά στο σημείο έναρξης μεταγραφής του RARβ2 (44).

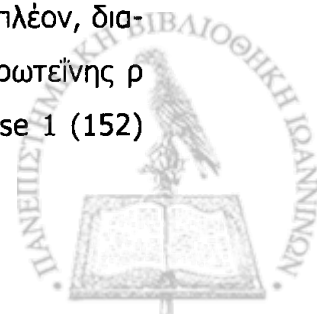
Πίνακας 3.2 Γονίδια συχνά μεθυλιωμένα στις αιματολογικές κακοήθειες (48)

<i>Κακοήθεια</i>	<i>Γονίδια</i>
Μη-Hodgkin Λεμφώματα	DAP kinase1, p57, p16, O ⁶ MGMT, RARβ2
Πολλαπλό μύελωμα	P16, SOCS-1, E-cadherin, DAP-kinase 1
Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία	P15, abl
Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία	E-cadherin, p16, p15, p73, DAP-kinase 1, O ⁶ MGMT
Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία	P15, E-cadherin, SOCS-1, p73, DAP-kinase 1, HIC1, RARβ2

Πρόσφατα προτάθηκε ένα νέο μοντέλο λευχαιμογένεσης, σύμφωνα με το οποίο δύο τουλάχιστον διαφορετικές τάξεις γενετικών διαταραχών συνεργάζονται προσδίδοντας ένα πλεονέκτημα επιβίωσης και πολλαπλασιασμού (40). Το μοντέλο αυτό προτείνει ότι μία μετάλλαξη από κάθε τάξη απαιτείται για την εμφάνιση οξείας μυελογενούς λευχαιμίας, αλλά δεν αποκλείει ότι και άλλα γεγονότα μπορεί να είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη του κακόηθους φαινότυπου. Έτσι εκτός από τις πολυάριθμες γνωστές κυτταρογενετικές ανωμαλίες που είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας, μία πλειάδα γονιδίων που συμμετέχουν σε βασικά μονοπάτια κυτταρικών λειτουργιών μπορεί να είναι επηρεασμένα από επιγενετικές αλλαγές. Για την περαιτέρω μελέτη της επίδρασης της μεθυλίωσης του DNA στην παθογένεια της οξείας μυελογενούς, είναι απαραίτητο να καθοριστούν λεπτομερή προφίλ μεθυλίωσης για διάφορες υποομάδες ασθενειών μέσα στο ήδη υπάρχον πλαίσιο των συνυπάρχουσων γενετικών διαταραχών σε μεγάλες σειρές ασθενών.

3.7 Ο ρόλος της μεθυλίωσης στην πρόγνωση

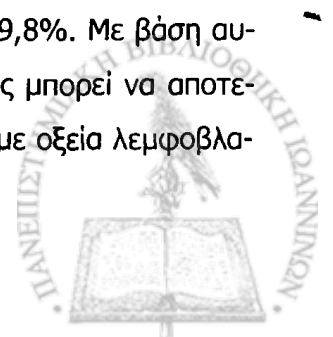
Οι κυτταρογενετικές ανωμαλίες στην οξεία μυελογενή λευχαιμία και στο πολλαπλό μύελωμα κατά τη διάγνωση θεωρούνται πλέον χρήσιμοι προγνωστικοί δείκτες (145,146). Επιπρόσθετα, όλο και περισσότερες μελέτες υποδεικνύουν τη προγνωστική δυναμική που μπορεί να έχουν οι αλλαγές στη μεθυλίωση σ' αυτές τις νόσους. Υπερμεθυλίωση του p15 (CDKN2B) έχει συσχετιστεί με πτωχότερη πρόγνωση στην οξεία μυελογενή λευχαιμία (144,147). Επιπλέον, διαταραχές στην κατάσταση μεθυλίωσης της ρυθμιστικής του κυτταρικού κύκλου πρωτεΐνης p16 (CDKN2A) (148-151) και της ρυθμιστικής πρωτεΐνης της απόπτωσης DAP kinase 1 (152)



μπορεί να είναι αρνητικοί δείκτες πρόγνωσης σε ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα. Ωστόσο, αυτά τα πρώιμα αποτελέσματα από σχετικά μικρές σειρές ασθενών χρήζουν επιβεβαίωσης σε μεγαλύτερες και προοπτικές κλινικές μελέτες.

Μία πιο άμεση εφαρμογή της κατάστασης μεθυλίωσης γονιδίου στη λήψη θεραπευτικών αποφάσεων αφορά στην αποσιώπηση του γονιδίου επιδιόρθωσης του γονιδίου O⁶MGMT σε ασθενείς με λέμφωμα διάχυτο από μεγάλα κύτταρα (DLBCL). Η πρωτεΐνη O⁶MGMT είναι ένα ένζυμο υπεύθυνο για την επιδιόρθωση της προσθήκης μιας αλκυλ-ομάδας στη βάση γουανίνη. Αυτή η βάση αποτελεί μείζονα στόχο για διάφορες αλκυλιούντες κυτταροτοξικούς παράγοντες. Έρευνες έχουν δείξει ότι υπερμεθυλίωση του O⁶MGMT σε δείγματα ασθενών με DLBCL που ελάμβαναν χημειοθεραπεία με βάση την κυκλοφωσφαμίδη είχαν στατιστικώς σημαντική αύξηση στην ολική επιβίωση και στην επιβίωση ελεύθερης προόδου νόσου. Έτσι, η αποσιώπηση του O⁶MGMT λόγω υπερμεθυλίωσης μπορεί να συμβάλει στην μεγαλύτερη ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων στους αλκυλιούντες παράγοντες, αφού οι βλάβες του DNA που προκλήθηκαν από τη χημειοθεραπεία δεν είναι δυνατό να επιδιορθωθούν, οδηγώντας το κύτταρο σε προγραμματισμένο θάνατο (137). Παρόμοια συμπεράσματα σχετικά με την απόκριση στη θεραπεία έχουν εξαχθεί από μελέτες που έγιναν σε ασθενείς με γλοίωμα που ελάμβαναν έναν άλλον αλκυλιούντα παράγοντα, την καρμουστίνη (105,137). Άρα υπάρχουν ενδείξεις ότι επιλεγμένοι βιοδείκτες (biomarkers) μεθυλίωσης, μπορεί να είναι χρήσιμοι στην εκτίμηση απόκρισης στην κυτταροτοξική θεραπεία, τόσο σε ασθενείς με συμπαγείς όγκους όσο και σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες.

Πρόσφατα, σε μία μελέτη από τους Roman-Gomez και συν. (148) η κατάσταση μεθυλίωσης του p15INK4B σε 251 ασθενείς με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία κατά τη διάγνωση φάνηκε να σχετίζεται με μειωμένη συνολική και ελεύθερη νόσου επιβίωση. Επιπλέον, σε επιλεγμένες ομάδες ασθενών, που είχαν ταξινομηθεί με βάση τις κυτταρογενετικές ανωμαλίες TEL-AML1 και BCR-ABL, η προσθήκη μεθυλιωμένων δεικτών οδηγούσε σε μία πιο λεπτομερή κατηγοριοποίηση των ασθενών με διαφορετικά ποσοστά επιβίωσης. Αξιοσημείωτο ήταν επίσης, ότι ασθενείς θετικοί για το χρωμόσωμα Φιλαδέλφειας (BCR-ABL +) που γενικά θεωρείται αρνητικός προγνωστικός δείκτης στην οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία, όταν είχαν υψηλό ποσοστό μεθυλίωσης γονιδίων είχαν συνολική 7ετή επιβίωση 0%, έναντι αυτών που δεν είχαν κανένα γονίδιο υπερμεθυλιωμένο, των οποίων η συνολική 7ετής επιβίωση ήταν 59,8%. Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις, οι συγγραφείς πρότειναν ότι το προφίλ μεθυλίωσης μπορεί να αποτελέσει έναν επιπλέον βιοδείκτη για την εκτίμηση της πρόγνωσης ασθενών με οξεία λεμφοβλα-



στική λευχαιμία, συμπληρώνοντας την κλασσική ανοσοφαινοτυπική, κυτταρογενετική και μοριακή ανάλυση (148).

3.8 Επιγενετικές αλλαγές ως στόχος για θεραπεία

Σε αντίθεση με τις γενετικές ανωμαλίες οι διαταραχές της μεθυλίωσης είναι δυνητικά αναστρέψιμες με φαρμακολογική αναστολή της μεθυλίωσης του DNA και της αποακετυλίωσης των ιστονών. Σε πειράματα, τα ανάλογα της κυτιδίνης, η 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) και η 5-azacytidine μπορούν να ενεργοποιήσουν ογκοκατασταλτικά γονίδια που είχαν αποσιωπηθεί λόγω μεθυλίωσης των εκκινήτων τους (153-156). Τα φάρμακα αυτά πρέπει να ενσωματωθούν στο DNA ως ανάλογα κυτοσίνης για να ασκήσουν τη δράση του και έτσι μπορεί να προκαλέσουν μη ειδικές και τοξικές για το κύτταρο βλάβες. Ωστόσο η πιο χαρακτηριστική τους δράση είναι η απομεθυλίωση μέσω μη αναστρέψιμης αναστολής των DNA μεθυλοτρανσφερασών (DNMTs).

Τα παραπάνω φάρμακα έχουν μια αξιοσημείωτη ιστορία στη θεραπεία του καρκίνου, γενικά, και στις αιματολογικές κακοήθειες ειδικότερα. Αν και η σύνθεση της 5-azacytidine έγινε τη δεκαετία του 1960, οι απομεθυλιωτικές της δράσεις αναγνωρίστηκαν 15 χρόνια μετά από τους Jones και συν. (155). Η κλινική χρήση του φαρμάκου τότε δεν έτυχε μεγάλης προσοχής μέχρι η δεκαετία του 1990 οπότε και η αναγνώριση της αποσιώπησης ογκοκατασταλτικών γονιδίων, αναζωπύρωσαν το ενδιαφέρον για τη χρήση παραγόντων έναντι της αποσιώπησης μεθυλιωμένων γονιδίων. Τα εξαιρετικά ποσοστά απόκρισης ασθενών με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα, οδήγησαν στην έγκριση αυτών των φαρμάκων από το FDA (Food and Drug Administration) για αυτά τα νοσήματα, σχεδόν 40 χρόνια μετά την αρχική τους σύνθεση.

Η πρώτη μελέτη που έδειξε ότι η κλινική πορεία των ασθενών με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα μπορεί να αλλάξει με τη χρήση μη ενταντικοποιημένης θεραπείας, βελτιώνοντας την ποιότητα ζωής και που είχε ουσιώδη ρόλο για την έγκριση της 5-azacytidine από το FDA, δημοσιεύθηκε το 2002 από τους Silverman και συν. (157). Επρόκειτο για μία τυχαίοποιημένη και ελεγχόμενη κλινική μελέτη φάσεως III, όπου σύγκριναν την υποδόρια χορήγηση 5-azacytidine έναντι υποστηρικτικής αγωγής. Το συνολικό ποσοστό απόκρισης έφτασε το 60% στο σκέλος της 5-azacytidine με μία σημαντική αύξηση του ποσοστού επιβίωσης και καθυστέρηση της εμφάνισης οξείας λευχαιμίας.



Κλινικές μελέτες υποδεικνύουν ότι οι απομεθυλιωτικοί παράγοντες (5-azacytidine: Vidaza® και decitabine: Dacogen®) έχουν θέση και στη θεραπεία και άλλων νοσημάτων όπως της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (158) και της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας με t(15;17) ή t(8;21) (159). Οι Kantarjian και συν. (158) χορήγησαν decitabine σε 130 ασθενείς με ΧΜΛ (64 σε βλαστική φάση, 51 σε επιταχυνόμενη φάση, 8 σε χρόνια φάση), από τους οποίους 123 ήταν θετικοί για το χρωμόσωμα Φιλαδέλφειας και 7 αρνητικοί. Από τους 64 ασθενείς που ήταν σε βλαστική φάση 18 ασθενείς (28%) πέτυχαν αντικειμενική απόκριση. Από τους 51 ασθενείς σε επιταχυνόμενη φάση, 28 ασθενείς (55%) πέτυχαν αντικειμενική απόκριση. Από τους 8 ασθενείς σε χρόνια φάση, 5 (63%) πέτυχαν αντικειμενική απόκριση. Η ζετής επιβίωση ήταν λιγότερο από 5% για τη βλαστική φάση και 27% για την επιταχυνόμενη φάση. Μελέτες φάσεως III βρίσκονται σε εξέλιξη για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας των απομεθυλιωτικών παραγόντων -μόνων τους ή σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα- στις αιματολογικές κακοήθειες.



4. ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΕΣ ΓΑΜΜΑΠΑΘΕΙΕΣ

4.1 Εισαγωγή

Η ανάπτυξη ενός κλώνου διαφοροποιημένων Β-λεμφοκυττάρων, που εκκρίνουν μία ανοσοσφαιρίνη, οδηγεί στην εμφάνιση μιας ανοσοεκκριτικής διαταραχής. Αυτές οι μονοκλωνικές υπερπλασίες είτε πλασματοκυττάρων (που παραδοσιακά είναι γνωστές ως **πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες**) ή πλασμοειδών λεμφοκυττάρων χαρακτηρίζονται από την έκκριση μίας μοναδικής ανοσοσφαιρίνης, γνωστή ως μονοκλωνική πρωτεΐνη. Το προεξάρχον αυτό χαρακτηριστικό της μονοκλωνικής πρωτεΐνης στην ηλεκτροφόρηση ορού ή /και ούρων οδήγησε στην ονομασία αυτών των διαταραχών ως «**μονοκλωνικές γαμμαπάθειες**», «δυσπρωτεϊναιμίες» ή «παρπρωτεϊναιμίες» (160).

Μονοκλωνική πρωτεΐνη μπορεί να βρεθεί σε κακοήθεις καταστάσεις (πολλαπλό μυέλωμα, μακροσφαιριναιμία Waldenström, λέμφωμα, μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα κ.α.) αλλά και σε καλοήθεις ή προκαρκινωματώδεις διαταραχές (π.χ. μονοκλωνική γαμμαπάθεια αδιευκρίνιστης σημασίας, αυτοάνοσα νοσήματα). Μεταξύ των γαμμαπαθειών υπάρχει μία πληθώρα κλινικοπαθολογοανατομικών οντοτήτων, μερικές είναι κυρίως πλασματοκυτταρικές, όπως το ΠΜ και το πλασματοκύττωμα, ενώ άλλες συμπεριλαμβάνουν λεμφοκύτταρα και πλασματοκύτταρα, όπως η νόσος βαρέων αλύσεων και η μακροσφαιριναιμία Waldenström (MW) .

4.2 Πολλαπλό Μυέλωμα (ΠΜ)

4.2.1 Ορισμός

Το ΠΜ είναι μία νεοπλασματική νόσος που οφείλεται στην παραγωγή μονοκλωνικών νεοπλασματικών πλασματοκυττάρων που παράγουν μεγάλα ποσά ανοσοσφαιρίνης ή τμήματος της ανοσοσφαιρίνης. Οι υπόλοιπες ανοσοσφαιρίνες δεν παράγονται σε επαρκή ποσά με αποτέλεσμα να έχουμε ανοσοπάρεση. Τα κακοήθη πλασματοκύτταρα καταλαμβάνουν κυρίως των μυέλο των οστών, αν και μικρός αριθμός μπορεί να βρεθεί και στο περιφερικό αίμα. Η ταξινόμηση των πλασματοκυτταρικών νεοπλασμάτων σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ) και οι υποκατηγορίες του πολλαπλού μυελώματος, όπου παρατηρείται εναπόθεση ανοσοσφαιρινών στους ιστούς, όπως η πρωτοπαθής αμυλοείδωση και η νόσος ελαφρών και βαρέων αλύσεων αναγράφονται στον Πίνακα 4.1 (161).



4.2.2 Επιδημιολογία

Το ΠΜ αποτελεί περίπου το 2,5% όλων των κακοηθειών και το 10% των αιματολογικών κακοηθειών, αντιπροσωπεύοντας τη 2^η πιο συχνή αιματολογική κακοήθεια στις ΗΠΑ. Περίπου 15.000 νέα περιστατικά ή 40 ανά εκατομμύριο διαγιγνώσκονται κάθε χρόνο. Η μέση ηλικία διάγνωσης είναι τα 65 έτη αν και περιστασιακά (<2%) μπορεί να εμφανιστεί και πριν την 4η δεκαετία της ζωής (162).

4.2.3. Παθογένεια

Η αιτιολογία της νόσου είναι άγνωστη. Γενετικοί παράγοντες, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία, ιοί, βενζένιο και διοξίνες είναι μερικοί από τους ενοχοποιητικούς παράγοντες (163). Το ΠΜ είναι μία νόσος που παραμένει ανίατη, παρά την πρόοδο που έχει σημειωθεί τα τελευταία χρόνια τόσο στην κύρια όσο και στην υποστηρικτική αγωγή.

4.2.4 Ο ρόλος του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών στην παθογένεια του ΠΜ

Τα πλασματοκύτταρα προέρχονται από Β λεμφοκύτταρα των λεμφαδένων ως ανοσολογική απόκριση σε φλεγμονή ή νόσο. Η μεταμόρφωση του πλασματοκυττάρου σε κακόηθες μυελωματικό κύτταρο είναι μία διαδικασία πολλαπλών σταδίων που περιλαμβάνει και γενετικές ανωμαλίες (164). Το μυελωματικό κύτταρο μέσω της κυκλοφορίας του αίματος εγκαθίσταται στο μυελό των οστών, όπου και προκαλεί ανεπανόρθωτες βλάβες. Πρόσφατα έγινε γνωστό ότι η αλληλεπίδραση των μυελωματικών κυττάρων με το **μικροπεριβάλλον** του μυελού των οστών είναι τόσο σημαντική, όσο και οι γενετικές ανωμαλίες, για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό τους (Εικόνα 4.1).

Πίνακας 4.1

Πλασματοκυτταρικά νεοπλάσματα

Πολλαπλό Μυέλωμα

Μη εκκριντικό πολλαπλό μυέλωμα

Έρπον μυέλωμα

Ασυμπτωματικό μυέλωμα

Πλασματοκυτταρική λευχαιμία

Πλασματοκύττωμα

Μονήρες πλασματοκύττωμα οστού

Εξωμυελικό πλασματοκύττωμα

Νόσοι εξ' εναποθέσεως ανοσοσφαιρίνης

Πρωτοπαθής αμυλοειδωση

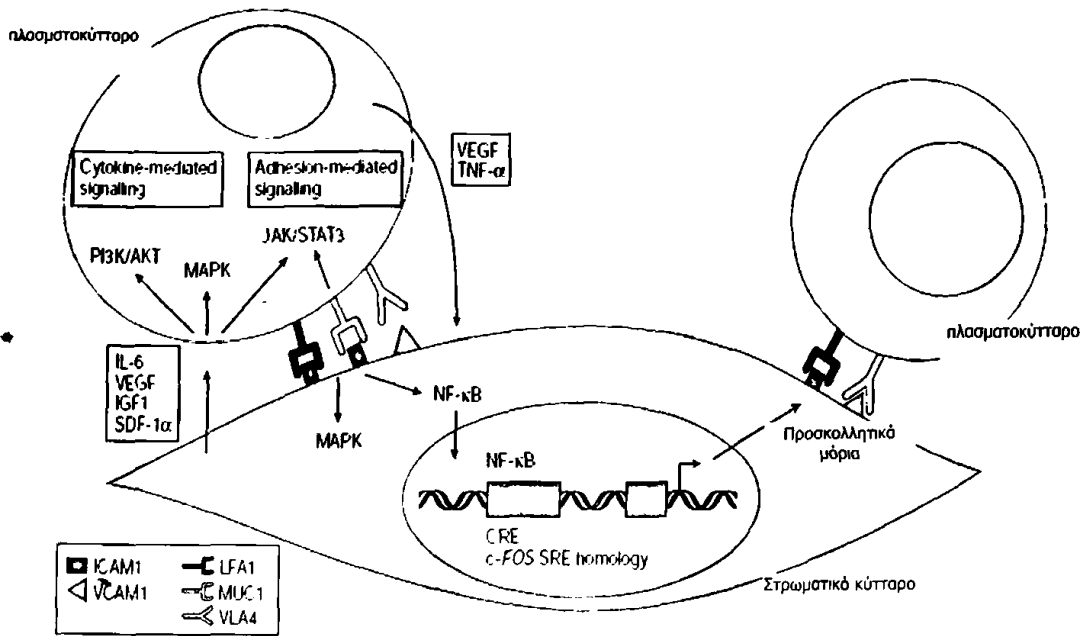
Συστηματική νόσος εξ' εναποθέσεως

ελαφρών ή βαρέων αλύσων

Οστεοσκληρυντικό Μυέλωμα (σύνδρομο POEMS)

Νόσος Βαρέων αλύσων





Εικόνα 4.1. Η αλληλεπίδραση μεταξύ μυελωματικών κυττάρων και του μικροπεριβάλλοντος τους. Η προσκόλληση των μυελωματικών κυττάρων στα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών πυροδοτεί τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και τη μετανάστευση των μυελωματικών κυττάρων, μέσω κυτταροκινών και μορίων προσκόλλησης. Αρχικά ενεργοποιείται η MAPK (mitogen-activated protein kinase) και ο NF-κB στα στρωματικά κύτταρα. Η ενεργοποίηση του NF-κB οδηγεί στην αύξηση των προσκολλητικών μορίων τόσο στα μυελωματικά, όσο και στα στρωματικά κύτταρα. Κυτταροκίνες που εκκρίνονται από τα μυελωματικά κύτταρα επάγουν την έκκριση των IL-6, VEGF, TNF- α και NF-κB στα στρωματικά κύτταρα, ενώ κυτταροκίνες που εκκρίνονται από τα στρωματικά κύτταρα ενεργοποιούν τα μονοπάτια MAPK, JAK/STAT3 και PI3K/AKT.

Φυσιολογικά τα πλασματοκύτταρα αποτελούν λιγότερο από το 5% των κυττάρων του μυελού των οστών. Τα μυελωματικά κύτταρα, ωστόσο εμφανίζουν στην επιφάνειά τους προσκολλητικά μόρια που τους επιτρέπουν να προσκολλώνται στα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών. Η προσκόλληση των μυελωματικών κυττάρων στα στρωματικά κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα διάφορες αλληλεπιδράσεις που οδηγούν στον πολλαπλασιασμό των μυελωματικών κυττάρων (29).

Το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών περιλαμβάνει την εξωκυττάρια ουσία και πέντε τουλάχιστον τύπους στρωματικών κυττάρων: τους ινοβλάστες, τους οστεοκλάστες, τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα και τα λεμφοκύτταρα. Θετικές και αρνητικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών μεταβιβάζονται από μία πληθώρα κυτταροκινών και προσκολλητικών μορίων (165). Η εγκατάσταση (homing) των μυελωματικών κυττάρων στο μυελό των οστών φαίνεται να εμπλέκει την εκλεκτική προσκόλληση σε ενδοθηλιακά κύτταρα του μυελού των οστών,



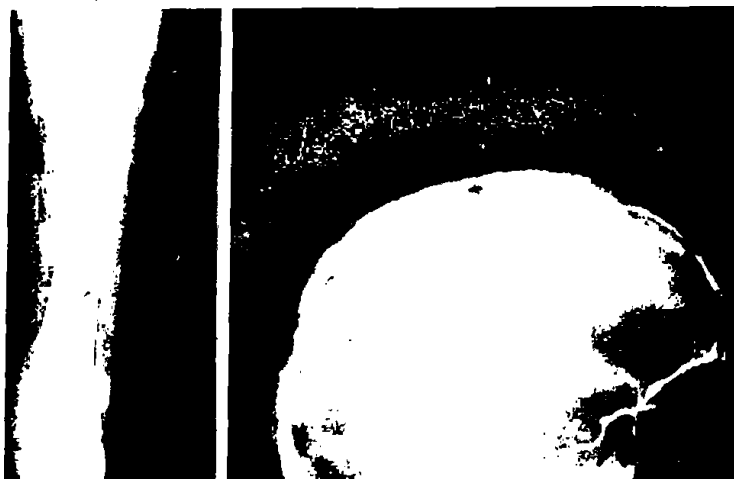
την διενδοθηλιακή μετανάστευση και την προσκόλληση σε στρωματικά κύτταρα μέσω του stromal-derived factor-1 (SDF-1) και του insulin-like growth factor 2 (IGF-1), οι οποίοι εκκρίνονται από ενδοθηλιακά και στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών και έχουν χημειοτακτική επίδραση στα μυελωματικά κύτταρα. Η προσκόλληση των μυελωματικών κυττάρων στα στρωματικά κύτταρα μέσω του VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) επάγει την παρακρινική έκκριση των ιντερλευκινών (IL)-6, IL-1β, IL-11, του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF: tumor necrosis factor), του TGF-β (transforming growth factor-β) και του υποδοχέα ενεργοποίησης του συνδέσμου του πυρηνικού παράγοντα-κ β (RANKL: Receptor for Activation of Nuclear Factor κ β Ligand). Η παραγωγή IL-6 από τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών, μέσω ενεργοποίησης του NF-κΒ, οδηγεί στον πολλαπλασιασμό των μυελωματικών κυττάρων (166). Η ενεργοποίηση του NF-κΒ είναι υπεύθυνη και για την παραγωγή και άλλων αυξητικών παραγόντων και προσκολλητικών μορίων, όπως του VEGF (vascular endothelial growth factor), του VCAM-1 και της E-selectin (30,167). Όλες αυτές οι κυτταροκίνες διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των μυελωματικών κυττάρων και αναστέλλουν την απόπτωσή τους, οδηγώντας σε υπερπλασία του μυελωματικού κλώνου και οστική καταστροφή (168).

4.2.5 Κλινική εικόνα

Η νόσος χαρακτηρίζεται από i. αναιμία, ii. μονοκλωνική παραγωγή ανοσοσφαιρίνης και την μειωμένη παραγωγή ανοσοσφαιρινών από τα φυσιολογικά πλασματοκύτταρα οδηγώντας σε υπογαμμασφαιριναιμία (ανοσοπάρεση) και προδιάθεση σε λοιμώξεις, iii. οστεολυτική νόσο, iv. υπερασβεστιαίμια, v. νεφρική ανεπάρκεια και vi. νευρολογικές διαταραχές λόγω σχηματισμού πλασματοκυττωμάτων

- i. Η αναιμία οφείλεται σε χαμηλά επίπεδα ερυθροποιητίνης και αναστολή της σύνθεσης των κυττάρων της ερυθράς σειράς και εκδηλώνεται με αδυναμία, ωχρότητα και δύσπνοια.
- ii. Η διαταραχή τόσο της κυτταρικής όσο και της χυμικής ανοσίας, λόγω της προαναφερθείσας ανοσοπάρεσης έχει ως αποτέλεσμα ευπάθεια σε μικροβιακές και ιογενείς λοιμώξεις.
- iii, iv. Τα οστικά άλγη απαντώνται στα $\frac{3}{4}$ των ασθενών. Οστεολυτικές βλάβες (Εικόνα 4.2) και συμπιεστικά κατάγματα μπορεί να παρατηρηθούν στη σπονδυλική στήλη και στα μακρά οστά. Στους ασθενείς με ΠΜ υπάρχει αυξημένη οστεοκλαστική δραστηριότητα που οφείλεται σε παράγοντες που ενεργοποιούν τους οστεοκλάστες και αυτό οδηγεί στην εμφάνιση της υπερασβεστιαίμιας.





Εικόνα 4.2. Απλές ακτινογραφίες με χαρακτηριστικές οστεολύσεις σε ασθενή με ΠΜ

v. Η νεφρική ανεπάρκεια είναι πολυπαραγοντική αλλά οφείλεται κυρίως στην εναπόθεση ελαφρών αλύσων (Bence Jones πρωτεΐνη) στα σωληνάρια. Άλλα αίτια είναι η υπερουριχαιμία, η υπερασβεστιαίμια, η διήθηση από πλασματοκύτταρα, η εναπόθεση αμυλοειδούς, οι συχνές ουρολοιμώξεις και η χρήση μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών παραγόντων για αναλγησία.

vi. Οι νευρολογικές διαταραχές είναι συχνές στη πορεία της νόσου και μπορεί να οφείλονται σε πίεση του νωτιαίου σωλήνα από μάζα (πλασματοκύττωμα) που εκδηλώνεται ως οσφυαλγία, ισχιαλγία ή μυϊκή αδυναμία ή σε απομυελινωτική νευροπάθεια (παρaneoπλασματική εκδήλωση της παραπρωτεΐνης) (169).

4.2.6 Διάγνωση

Η ΠΟΥ, σε πρόσφατη ταξινόμηση των νεοπλασιών του αιμοποιητικού και λεμφικού ιστού, έχει ορίσει μείζονα και ελάσσονα κριτήρια για τη διάγνωση του ΠΜ καθώς και κριτήρια για τον ορισμό των διαφόρων κλινικών παραλλαγών της νόσου (159).

Για τη διάγνωση της νόσου απαιτείται να πληρούνται ένα μείζον και ένα έλασσον κριτήριο ή τρία ελάσσονα κριτήρια στα οποία πρέπει να περιλαμβάνονται το πρώτο και το δεύτερο κριτήριο. Τα κριτήρια αυτά θα πρέπει να εκδηλώνονται σε ένα συμπτωματικό ασθενή με προοδευτική νόσο.

Τα μείζονα κριτήρια είναι:

- πλασματοκύτταρα στο μυελό >30%



- πλασματοκύττωμα σε βιοψία
- μονοκλωνική πρωτεΐνη :
 - ο στον ορό IgG > 3,5 g/dl ή IgA > 2 g/dl
 - ο στα ούρα > 1 g/24ωρο πρωτεΐνης Bence Jones

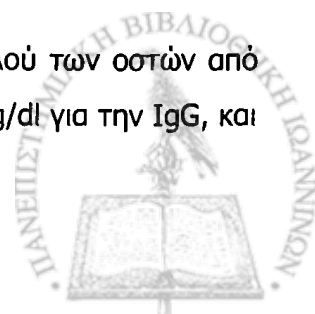
Τα **ελάσσονα κριτήρια** είναι:

- πλασματοκύτταρα στο μυελό 10-30%
- μονοκλωνική πρωτεΐνη σε μικρότερη συγκέντρωση (από αυτή που αναγράφεται παραπάνω)
- οστεολύσεις
- μείωση των φυσιολογικών ανοσοσφαιρινών <50% του φυσιολογικού (IgG < 600 mg/dl, IgA < 100 mg/dl, IgM < 50 mg/dl)

Ο πιο συχνός τύπος μονοκλωνικής πρωτεΐνης είναι η IgG, και ακολουθούν σε συχνότητα η IgA, IgD ενώ εξαιρετικά σπάνια είναι η IgE. Το IgA μέλωμα σχετίζεται περισσότερο με οστική νόσο ενώ το IgD με πλασματοκυτταρική λευχαιμία και νεφρική νόσο. Σε ορισμένες περιπτώσεις η νόσος εμφανίζεται de novo ενώ σε άλλες προϋπάρχει **μονοκλωνική γαμμαπάθεια αδιευκρίνιστης σημασίας (ΜΓΑΣ, MGUS: monoclonal gammopathy of undetermined significance)**. Σε μία μελέτη από τη Mayo Clinic, το 58% των ασθενών με ΠΜ είχε προηγουμένως ΜΓΑΣ ή πλασματοκύττωμα (170).

Εξ' ορισμού ασθενείς με ΜΓΑΣ είναι ασυμπτωματικοί και έχουν σταθερά επίπεδα παραπρωτεΐνης. Οι ασθενείς αυτοί εξ' ορισμού έχουν λιγότερο από 10% διήθηση του μυελού των οστών από πλασματοκύτταρα, μονοκλωνική πρωτεΐνη IgG < 3,5 g/dl και IgA < 2 g/dl και πρωτεΐνη bence jones στα ούρα < 1g/24ωρο, απουσία οστεολύσεων και απουσία ιστικής βλάβης ή οργανικής ανεπάρκειας που να σχετίζεται με το ΠΜ. Η οντότητα αυτή είναι πολύ πιο συχνή από το ΠΜ και εμφανίζεται το 1% του πληθυσμού με ηλικία >50 έτη και στο 3% με ηλικία >70 έτη (171). Οι ασθενείς αυτοί μπορεί να βρίσκονται μόνο σε παρακολούθηση και δε χρειάζονται χημειοθεραπεία. Κατά τη διάρκεια μακροχρόνιας παρακολούθησης το 25% των ασθενών με ΜΓΑΣ θα εμφανίσουν ΠΜ, ή λέμφωμα ή πρωτοπαθή αμυλοείδωση ή MW, ή ΧΛΛ ή πλασματοκύττωμα με ρυθμό 1% ανά έτος (172). Η μετάβαση από το στάδιο ΜΓΑΣ στο ΠΜ δεν προϋποθέτει τη μετάβαση από το στάδιο του λανθάνοντος μυελώματος.

Οι ασθενείς με **ενεργό ΠΜ** (Πίνακας 4.2) εμφανίζουν διήθηση του μυελού των οστών από πλασματοκύτταρα σε ποσοστό $\geq 10\%$, μονοκλωνική πρωτεΐνη ορού >3,5 g/dl για την IgG, και



> 2 g/dl για την IgA, οστική νόσο, αναιμία, ανοσοκαταστολή και νεφρική ανεπάρκεια, ενώ ορισμένοι ασθενείς μπορεί να εμφανίσουν νόσο σε εξωμυελικές θέσεις, όπως το δέρμα, το ήπαρ, το σπλήνα, τους λεμφαδένες και πλασματοκύτταρα στο πλευριτικό υγρό και περιφερικό αίμα.

4.2.7 Υποκατηγορίες ΠΜ

Το **μη εκκριτικό μυέλωμα** είναι μία σπάνια μορφή της νόσου, όπου τα πλασματοκύτταρα παράγουν, αλλά δεν εκκρίνουν παθολογική πρωτεΐνη, η οποία όμως μπορεί να ανιχνευθεί μέσα στα πλασματοκύτταρα με ανοσοϊστοχημεία ή ανοσοφθορισμό. Η κλινική πορεία δε διαφέρει από αυτήν της κλασσικής νόσου, εκτός του ότι η νεφρική προσβολή είναι πιο σπάνια. Η παρακολούθηση των ασθενών αυτών και η απόκριση στη θεραπεία είναι πιο δυσχερής αφού απαιτείται η διενέργεια οστεομυελικής βιοψίας για την εκτίμηση του ποσοστού των πλασματοκυττάρων.

Το **έρπον μυέλωμα** (smoldering myeloma, 2% του ΠΜ) χαρακτηρίζεται από επίπεδα μονοκλωνικής πρωτεΐνης όπως αυτά των μείζονων κριτηρίων (IgG > 3,5 g/dl ή IgA > 2 g/dl), διήθηση του μυελού των οστών από πλασματοκύτταρα σε ποσοστό $\geq 10\%$ αλλά $\leq 30\%$ και καμία από τις άλλες επιπλοκές του μυελώματος (173)(Πίνακας 4.2).

Το **ήπιο μυέλωμα** (indolent myeloma) χαρακτηρίζεται από μονοκλωνική πρωτεΐνη στον ορό IgG < 7 g/dl, IgA < 5 g/dl, οστεολύσεις < 3 και χωρίς συμπιεστικά κατάγματα, φυσιολογική συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης, ασβεστίου και κρεατινίνης ορού και απουσία λοιμώξεων. Τελευταία υπάρχει η τάση το έρπον και το ήπιο μυέλωμα να χαρακτηρίζονται ως **ασυμπτωματικό μυέλωμα**, αφού οι ασθενείς δεν εμφανίζουν συμπτώματα από τη νόσο και ουσιαστικά χρήζουν μόνο παρακολούθησης και δε χρειάζεται να χορηγηθεί θεραπεία.

Η εξωμυελική εμφάνιση του ΠΜ με συμμετοχή του περιφερικού αίματος ονομάζεται **πλασματοκυτταρική λευχαιμία**. Μπορεί να εμφανιστεί de novo ή στα πλαίσια προόδου νόσου σε ασθενή με πολλαπλό μυέλωμα. Χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση πλασματοκυττάρων στο περιφερικό αίμα σε ποσοστό 20% ή >2000/μL σε απόλυτο αριθμό. Η νόσος είναι επιθετική με συχνές επιπλοκές και πτωχή πρόγνωση.

Πίνακας 4.2 Ταξινόμηση Ασθενών με ΜΓΑΣ και ΠΜ

Ταξινόμηση	Χαρακτηριστικά	Αντιμετώπιση
------------	----------------	--------------



Μονοκλωνική Γαμμαπάθεια Αδιευκρίνιστης Σημασίας (ΜΓΑΣ)	<ul style="list-style-type: none"> • Παραπρωτεΐνη <3 g/dl και • Διήθηση μυελού των οστών από πλάσματοκύτταρα <10% • Απουσία άλλου Β-λεμφοεπερπλαστικού νοσήματος • Μη σχετιζόμενη με το ΠΜ οργανική ανεπάρκεια * 	Παρακολούθηση
Ασυμπτωματικό ή Λανθάνον Μυέλωμα	<ul style="list-style-type: none"> • Παραπρωτεΐνη ≥3 g/dl ή/και • Διήθηση μυελού των οστών από πλάσματοκύτταρα ≥10% • Μη σχετιζόμενη με το ΠΜ ιστική βλάβη ή οργανική ανεπάρκεια * 	Παρακολούθηση, έ-ναρξη θεραπείας με πρόοδο νόσου
Συμπτωματικό μυέλωμα	<ul style="list-style-type: none"> • Παραπρωτεΐνη σε ορό ή/και ούρα • Διήθηση μυελού των οστών από πλάσματοκύτταρα ή πλάσματοκύττωμα • Σχετιζόμενη με το ΠΜ ιστική βλάβη ή οργανική ανεπάρκεια 	Άμεση έναρξη αγωγής Διφωσφονικά

*Σχετιζόμενη με το πολλαπλό μυέλωμα ιστική βλάβη ή οργανική ανεπάρκεια είναι η υπερασβεστιαμία, η νεφρική ανεπάρκεια, η αναιμία και η οστική νόσος.

4.2.8 Κλινική σταδιοποίηση

Για τη σταδιοποίηση των ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα χρησιμοποιείται μέχρι και σήμερα το σύστημα των **Durie και Salmon** (Πίνακας 4.3), το οποίο προτάθηκε για πρώτη φορά το 1975 (174), και λαμβάνει υπόψη τις κύριες κλινικές παραμέτρους σε σχέση με τη συνολική μάζα των πλάσματοκυττάρων. Ένα εναλλακτικό σύστημα σταδιοποίησης είναι το Διεθνές Σύστημα Σταδιοποίησης (**ISS, International Staging System**), το οποίο εστιάζει κυρίως στις τιμές της β₂-μικροσφαιρίνης (β₂M) και της αλβουμίνης (Πίνακας 4.4). Τόσο η αλβουμίνη όσο και η β₂M αποτελούν προϊόντα των πλάσματοκυττάρων και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες πρόοδου της νόσου. Η αλβουμίνη του ορού είναι ένας έμμεσος δείκτης της IL-6, της ηπατικής βιολογίας και της θρέψης του ασθενούς. Χαμηλά επίπεδα αλβουμίνης σχετίζονται τόσο με ταχεία πρόοδο του μυελώματος όσο και με τη γενικότερη κατάσταση του ασθενούς (performance status) (175).



4.2.9 Πρόγνωση και προγνωστικοί παράγοντες σε ασθενείς με ΠΜ

Το ΠΜ είναι μία ανίατη ασθένεια, με μέση επιβίωση 3 ετών και 10ετή επιβίωση της τάξης του 10%. Σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά Durie και Salmon, ασθενείς σταδίου I έχουν μέση επιβίωση > 60 μήνες, σταδίου OIH έχουν μέση επιβίωση 41 μηνών και σταδίου III 23 μηνών. Ασθενείς με φυσιολογική νεφρική λειτουργία έχουν μία διάμεση επιβίωση 37 μηνών, έναντι 8 μηνών για ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια (174). Άλλοι προγνωστικοί παράγοντες είναι η αιμοσφαιρίνη, η τιμή ασβεστίου του ορού, η τιμή αλβουμίνης του ορού, η τιμή της γαλακτικής δευδρογενάσης του ορού (LDH), οι λυτικές εστίες, το ποσό της ανοσοσφαιρίνης και η τιμή της β_2M . Η εκτίμηση του ποσού διήθησης του μυελού από πλασματοκύτταρα σε οστεομυελική βιοψία έχει επίσης προγνωστική αξία. Η πλασμαβλαστική μορφολογία και η ανίχνευση του δείκτη πολλαπλασιασμού Ki-67 σχετίζεται επίσης με πτωχότερη πρόγνωση. Γενετικές ανωμαλίες που σχετίζονται με δυσμενή πρόγνωση είναι η έλλειψη 13q, που ανευρίσκεται στο 50% των ασθενών και μετάθεση t(4;14) που σχετίζεται με πτωχότερη απόκριση των ασθενών που λαμβάνουν μεγαθεραπεία και αυτόλογη μεταμόσχευση περιφερικών αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (30).



Πίνακας 4.3 Σταδιοποίηση κατά Durie-Salmon

Κριτήρια	Μάζα πλασματοκυττάρων (κύτταρα x 10¹²/m²)
Στάδιο I (χαμηλή μάζα πλασματοκυττάρων)	
Όλα τα ακόλουθα <ul style="list-style-type: none"> • Hb > 10 g/dl • Ca⁺⁺ ορού φυσιολογικό ή ≤ 12 mg/dl • Χωρίς οστεολύσεις ή μονήρες πλασματοκύττωμα • Χαμηλή τιμή παραπρωτεΐνης (IgG < 5 g/dl, IgA < 3 g/dl, Bence jones πρωτεΐνη ούρων < 4 g/24 h)	< 0,6
Στάδιο II (ενδιάμεση μάζα πλασματοκυττάρων)	
Μη ταξινόμηση σε στάδιο I ή στάδιο III	0,6-1,2
Στάδιο III (υψηλή μάζα πλασματοκυττάρων)	
Ένα ή περισσότερα από τα ακόλουθα <ul style="list-style-type: none"> • Hb < 8,5 g/dl • Ca⁺⁺ ορού > 12 mg/dl • Βαριά οστική νόσος • Υψηλή τιμή παραπρωτεΐνης (IgG > 7 g/dl, IgA > 3 g/dl, Bence jones πρωτεΐνη ούρων > 12 g/24 h) 	> 1,2
Υποκατηγορίες (A ή B)	
A: Σχετικά φυσιολογική νεφρική λειτουργία (Κρεατινίνη ορού < 2mg/dl)	
B: Έκπτωση νεφρικής λειτουργίας (Κρεατινίνη ορού ≥ 2mg/dl)	

Πίνακας 4.4 Διεθνές Σύστημα σταδιοποίησης (ISS, International Staging System)

Στάδιο	Κριτήρια
I	β ₂ M < 3,5 mg/dl και αλβουμίνη ≥ 3,5 g/dl
II	β ₂ M < 3,5 mg/dl και αλβουμίνη < 3,5 g/dl ή β ₂ 3,5 – 5 mg/dl
III	β ₂ M > 3,5 mg/dl

β₂M = β₂ μικροσφαιρίνη

4.3 Μακροσφαιριναιμία του Waldenström (MW)

Το 1944, ο Jan Waldenström περιέγραψε 2 άρρνες ασθενείς που παρουσίαζαν εύκολη κόπωση, αιμορραγική διάθεση από τα ούλα και το ρινικό βλεννογόνο, λεμφαδενοπάθεια, επιδεινούμενη ορθόχρωμη αναιμία και χαμηλά επίπεδα ινωδογόνου, παρά την αυξημένη ταχύτητα καθίζησης ερυθρών (ΤΚΕ) και εξαιρετικά αυξημένο ιξώδες ορού λόγω μιας παθολογικής μακροσφαιρίνης περίπου 1.000.000 kDa (176). Οι ασθενείς αυτοί δεν είχαν λυτικές βλάβες σε απλές ακτινογραφίες, αλλά ούτε και άλλα τυπικά ευρήματα ΠΜ κατά τη νεκροτομή. Αυτό το σύνδρομο, που τώρα ονομάζεται μακροσφαιριναιμία του Waldenström (MW) είναι η εκδήλωση μίας νεοπλασματικής νόσου ενός κλώνου Β-λεμφοκυττάρων που παράγουν IgM ανοσοσφαιρίνη. Η MW είναι μία σπάνια νόσος που αποτελεί περίπου το 6% όλων των λεμφοϋπερπλαστικών διαταραχών. Έχει μόνο το 1/6 του εκτιμώμενου επιπολασμού του ΠΜ (177).

4.3.1 Παθογένεια

Τα νεοπλασματικά κύτταρα στη MW προέρχονται από Β λεμφοκύτταρα που έχουν διαφοροποιηθεί μέσω του βλαστικού κέντρου αλλά ακόμα δεν έχουν υποστεί την αναδιάταξη της αλλαγής του ισοτύπου της ανοσοσφαιρίνης (immunoglobulin isotype switch recombination) (178). Οι ανοσοσφαιρίνες που παράγονται από αυτά τα κύτταρα είναι της τάξης IgM και από ποικίλες περιοχές (variable regions) που έχουν υποστεί σωματική μετάλλαξη. Στην ανοσοσφαιρίνη IgM που παράγεται από αυτά τα κύτταρα οφείλεται το μεγαλύτερο μέρος της θνητότητας της νόσου. Το ιξώδες του αίματος αυξάνεται όταν αυξάνεται η ποσότητα της παραπρωτεΐνης IgM στον ορό. Τα υψηλά επίπεδα ιξώδους επηρεάζουν τη λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων και διαταράσσουν τη ροή του αίματος, μειώνοντας την απόδοση οξυγόνου στους ιστούς μέσω της μικροκυκλοφορίας. Αυτό μπορεί να οδηγήσει στο σύνδρομο υπεργλοιότητας.

4.3.2 Κλινική Εικόνα

Οι ασθενείς με MW ευρίσκονται κυρίως στην 6^η ή 7^η δεκαετία της ζωής, με διάμεση ηλικία κατά τη διάγνωση τα 63 έτη. Αν και περιστασιακά νέοι ασθενείς μπορεί να εμφανίσουν MW, μόνο το 3% των ασθενών είναι νεώτεροι των 40 ετών. Η νόσος είναι πιο συχνή στους Ευρω-



παίους από ότι στους Αφρικανούς και πιο συχνή στους άνδρες από ότι στις γυναίκες (178,179).

Οι ασθενείς πιο συχνά εμφανίζουν συμπτώματα κόπωσης, αδυναμίας και απώλειας βάρους. Επίσης συχνά είναι τα επεισόδια ουλορραγίας και ρινικής επίσταξης ενώ μερικοί ασθενείς μπορεί να παρουσιάσουν σημεία και συμπτώματα του συνδρόμου υπεργλοιοτότητας. Η κεφαλαλγία είναι ένα πρόδρομο σύμπτωμα του συνδρόμου, πιθανά λόγω έκπτυξης του όγκου του πλάσματος και αυξημένης ενδοκράνιας πίεσης. Οι ασθενείς μπορεί να εμφανίσουν διαταραχές όρασης, ενώ μπορεί επίσης να παρατηρηθούν αταξία, νυσταγμός, σύγχυση και αλλαγές στο επίπεδο συνείδησης μέχρι και κώμα. Σε ασθενείς με εγκεφαλικό επεισόδιο και άνοια λόγω υπεργλοιοτότητας, έχει παρατηρηθεί βελτίωση της κλινικής εικόνας μετά από πλασμαφαίρεση. Λόγω της αναιμίας και του αυξημένου ιξώδους του αίματος μπορεί να παρατηρηθούν σημεία συμφορητικής καρδιακής ανεπάρκειας (180).

Τα πιο συχνά ευρήματα από τη φυσική εξέταση είναι η λεμφαδενοπάθεια και η ηπατοσπληνομεγαλία. Οι φυσικές ιδιότητες της παραπρωτεΐνης IgM μπορεί επίσης να οδηγήσουν σε συμπτώματα, όπως νόσο από ανοσοσυμπλέγματα με την IgG η οποία μπορεί να έχει δράση ρευματοειδούς παράγοντα και να δημιουργήσει ανοσοσυμπλέγματα με την IgG, ειδικά σε χαμηλές θερμοκρασίες και ενεργοποιώντας το συμπλήρωμα να οδηγήσει σε ιστική καταστροφή. Σύνδεση της παραπρωτεΐνης με αυτοαντιγόνα μυών μπορεί να οδηγήσει σε μυοπάθεια, ενώ σύνδεση με τα ερυθρά αιμοσφαίρια μπορεί να οδηγήσει σε αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία (181).

4.2.3 Κλινική πορεία και πρόγνωση

Η WM είναι μία ήπια νόσος που μπορεί να εξελίσσεται με την πάροδο των ετών. Σε μία πρόσφατη μετα-ανάλυση η διάμεση επιβίωση από τη στιγμή της διάγνωσης ήταν 106 μήνες. Ωστόσο, η κλινική πορεία μπορεί να ποικίλει. Χαρακτηριστικά που σχετίζονται με δυσμενή πρόγνωση είναι τιμή αιμοσφαιρίνης < 10 g/dl, ηλικία > 65 ετών, απώλεια βάρους και κρουοσφαιριναιμία. Ασθενείς με χειρότερη πρόγνωση έχουν συνήθως 2 ή περισσότερα από τα παραπάνω χαρακτηριστικά ή οποιοδήποτε από τα ακόλουθα: θρομβοπενία, σπληνομεγαλία, λεμφαδενοπάθεια, λεμφοπλασματοκυτταρική διήθηση μυελού των οστών > 50% και/ή αυξημένα επίπεδα μονοκλωνική πρωτεΐνης ορού. Αυξημένα επίπεδα β₂M και χαμηλά επίπεδα αλβουμίνης ορού σχετίζονται επίσης με δυσμενή πρόγνωση (177).



Η υπεργλοιότητα, η αναιμία, η αιμορραγία, η θρόμβωση και οι λοιμώξεις αποτελούν παράγοντες που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο θανάτου. Σε ορισμένες περιπτώσεις η νόσος μπορεί να μεταπέσει σε λέμφωμα με χαρακτήρες παρόμοιους με τη μετάπτωση της χρόνιας λεμφογενούς λευχαιμίας σε λέμφωμα Richter (179).

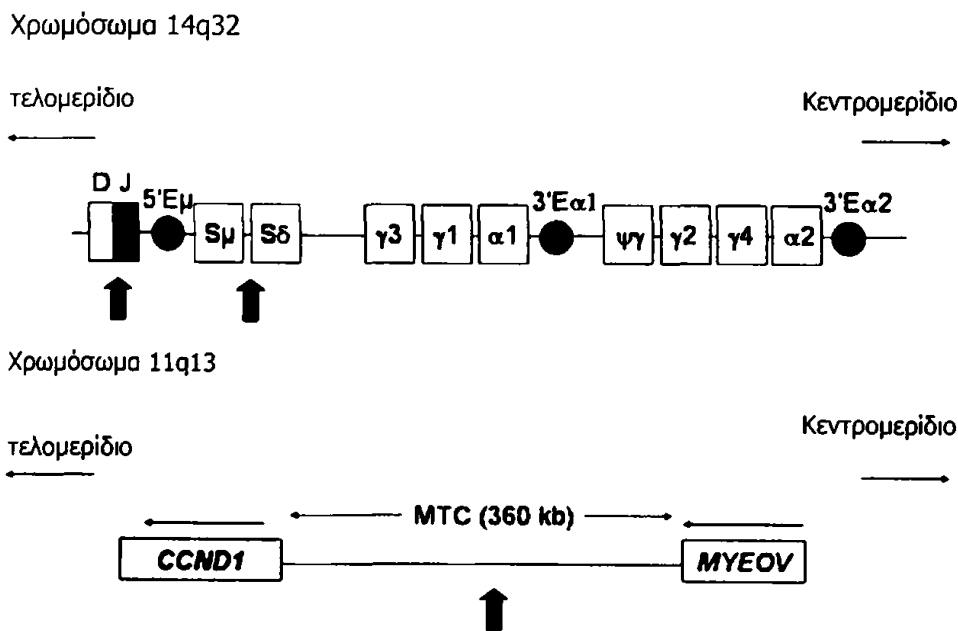


5. Διαταραχές των κυκλινών στο ΠΜ

5.1 Μοριακή Παθογένεια ΠΜ

5.1.1 Μεταθέσεις ανοσοσφαιρίνης Ig στο ΠΜ

Το ΠΜ όπως έχει ήδη αναφερθεί είναι μία κακοήθεια τελικώς διαφοροποιημένων πλασματοκυττάρων με χαμηλό δείκτη πολλαπλασιασμού που συνθέτουν μονοκλωνική παραπρωτεΐνη. Τα κακοήθη κύτταρα είναι μετά του βλαστικού κέντρου και έχουν υποστεί αναδιάταξη των αλληλουχιών VDJ των γονιδίων της βαριάς αλυσίδας (IgH), αλλαγή της τάξης και σωματική υπερμετάλλαξη (Εικόνα 1.2) (182). Σε πολλούς όγκους Β-κυτταρικής αρχής, συμπεριλαμβανομένου και τρυ ΠΜ, παρουσιάζονται χρωμοσωμικές μεταθέσεις λόγω λαθών που συμβαίνουν κατά την αναδιάταξη VDJ (183). Οι επιπτώσεις αυτών των μεταθέσεων είναι διαταραχή στην έκφραση ενός ογκογονιδίου το οποίο βρίσκεται δίπλα σε ένα ισχυρό Ig ενισχυτή (Εικόνα 5.1).



Εικόνα 5. 1 Σχηματική απεικόνιση των χρωμοσωμάτων 11 και 14 και των σημείων σπασίματος (breakpoints) στο ΠΜ. Ο επίτοπος IgH στο χρωμόσωμα 14q32 περιέχει 3 διαφορετικούς ενισχυτές (κλειστοί κύκλοι, 5'Εμ, 3'Εα1 και 3'Εα2). Στα μυελωματικά κύτταρα τα σπασίματα (έντονα βέλη) που συμβαίνουν φέρνουν το γονίδιο της κυκλίνης D1 (CCND1) δίπλα στους ενισχυτές 3'Εα1 ή/και 3'Εα2. Περιστασιακά, σπασίματα συμβαίνουν στην περιοχή VDJ. Σε αυτή την περίπτωση το γονίδιο της κυκλίνης D1 βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του ενισχυτή 5'Εμ. Το MYCOV γονίδιο έχει αναγνωριστεί ως ογκογονίδιο στον καρκίνο του στομάχου, αλλά υπερέκφρασή του δεν έχει βρεθεί στο ΠΜ

Ο επιπολασμός αυτών των IgH μεταθέσεων ποικίλλει με το στάδιο της νόσου: 50% στην ΜΓΑΣ ή το έρπον μυέλωμα, 55 με 73% στο ενδομυελικό μυέλωμα, 85% στην πρωτοπαθή



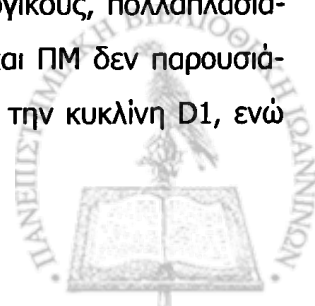
πλασματοκυτταρική λευχαιμία και πάνω από 90% σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές ΠΜ (184-186). Υπάρχουν 5 ογκογονίδια που εμπλέκονται πιο συχνά στις μεταθέσεις της IgH στην ΜΓΑΣ και το ΠΜ: 4p16 (MMSET και συνήθως FGFR3), 6p21 (CCN D3), 11q13, (CCN D1), 16q23 (c-MAF), και 20q11 (MAFB) (187-190). Ο επιπολασμός και των πέντε αυτών μεταθέσεων της IgH είναι 40% στο ΠΜ. Αναλυτικότερα είναι 15% για την 4p16, 3% για την 6p21, 15% για την 11q13, 5% για την 16q23 και 2% για την 20q11. Ο εμφανώς χαμηλότερος επιπολασμός των μεταθέσεων 4p16 και 16q23 στην ΜΓΑΣ υποδηλώνει ότι οι μεταθέσεις αυτές μπορεί να ευθύνονται για την *de novo* ανάπτυξη του ΠΜ και/ή ότι σχετίζονται με τη μετάπτωση από ΜΓΑΣ σε ΠΜ.

5.1.2. Υπερδιπλοειδικοί και Μη-υπερδιπλοειδικοί όγκοι ΠΜ

Όλοι οι όγκοι ΠΜ και ΜΓΑΣ έχουν αριθμητικές ή/και δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες (182). Αν και κανένα γονίδιο δεν έχει ταυτοποιηθεί, η απώλεια του χρωμοσώματος 13, του 13q και του 13q14, που συμβαίνουν στο 60% των ΠΜ και περίπου στο 50% των ΜΓΑΣ, ήταν από τις πρώτες χρωμοσωμικές ανωμαλίες που σχετίστηκαν με δυσμενή πρόγνωση (191,192). Σχεδόν οι μισοί όγκοι ΠΜ είναι υπερδιπλοειδικοί (48-75 χρωμοσώματα) και συχνά έχουν πολλαπλές τρισωμίες που συμπεριλαμβάνουν ένα από τα οκτώ μονά χρωμοσώματα (3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, 21). Οι μη-υπερδιπλοειδικοί όγκοι (<48 ή >75 χρωμοσώματα), που μπορεί να είναι υποδιπλοειδικοί, ψευδοδιπλοειδικοί ή υποτετραδιπλοειδικοί, έχουν αναφερθεί ότι έχουν πτωχότερη πρόγνωση από τους διπλοειδικούς όγκους (193). Πιο πρόσφατα, αναφέρθηκε ότι τουλάχιστον τρεις από τις πέντε πιο συχνές IgH μεταθέσεις συμβαίνουν πιο συχνά σε μη υπερδιπλοειδικούς όγκους (194).

5.1.3 Κυκλίνες τύπου D στο ΠΜ

Τα μυελωματικά κύτταρα στην ΜΓΑΣ και το ΠΜ μοιάζουν με τα φυσιολογικά, μη πολλαπλασιαζόμενα πλασματοκύτταρα περισσότερο από ότι με τους φυσιολογικούς, αλλά πολλαπλασιαζόμενους πλασμαβλάστες, από τους οποίους περισσότερο από το 30% μπορεί να βρίσκεται στη φάση S. Είναι αξιοσημείωτο όμως, ότι παρά το χαμηλό δείκτη πολλαπλασιασμού, τα επίπεδα του mRNA της κυκλίνης D1, D2 και D3 είναι υψηλά σε όλα τα ΠΜ και ΜΓΑΣ, σε σχέση με τα επίπεδα του mRNA της κυκλίνης D2 που εκφράζεται σε φυσιολογικούς, πολλαπλασιαζόμενους πλασμαβλάστες (195). Επίσης, περίπου το 40% των ΜΓΑΣ και ΠΜ δεν παρουσιάζουν τη μετάθεση t(11;14), αλλά είναι υπερδιπλοειδικοί και εκφράζουν την κυκλίνη D1, ενώ



τα φυσιολογικά πλασματοκύτταρα του μυελού των οστών δεν εκφράζουν ανιχνεύσιμη κυκλίνη D1. Οι υπόλοιποι όγκοι ΠΜ, συμπεριλαμβανομένων και αυτών με τη μετάθεση t(4;14), παρουσιάζουν έκφραση της κυκλίνης D2 σε σχέση με τα φυσιολογικά πλασματοκύτταρα του μυελού των οστών.

Σε πολλές εργασίες διαπιστώθηκε ότι ουσιαστικά όλοι οι όγκοι ΜΓΑΣ και ΠΜ έχουν διαταραχή στην έκφραση τουλάχιστον μιας από τις κυκλίνες D1, D2 ή D3. Η διαταραχή σε μία από τις κυκλίνες τύπου D καθιστά το κύτταρο πιο ευαίσθητο σε ερεθίσματα αύξησης του πολλαπλασιασμού και έτσι διατυπώθηκε η πρόταση ότι είναι ένα **πρώιμο ενοποιητικό ογκογενετικό γεγονός** στο ΠΜ (195).

Συνδυάζοντας όλα τα παραπάνω ευρήματα, έχουν προταθεί δύο μονοπάτια για την παθογένεια του ΠΜ: ένα μη υπερδιπλοειδικό μονοπάτι, που συνήθως περιλαμβάνει μία από τις πέντε πιο συχνά εμφανιζόμενες μεταθέσεις της IgH ως πρώιμο γεγονός, και το υπερδιπλοειδικό μονοπάτι που σχετίζεται με μία από τις πολλές τρισωμίες των οκτώ μονών χρωμοσωμάτων, μέσω ενός μηχανισμού που ακόμα δεν έχει καθοριστεί (182,194).

Όπως προαναφέρθηκε, διαταραχή σε ένα γονίδιο κυκλίνης, μερικές φορές ως αποτέλεσμα μετάθεσης της IgH ή άλλου άγνωστου μέχρι στιγμής μηχανισμού, φαίνεται να είναι ένα πρώιμο γεγονός. Η διαταραχή της ρύθμισης των κυκλινών D μπορεί να καθιστά τα κύτταρα πιο ευπαθή σε εξωτερικά αυξητικά ερεθίσματα, που οδηγεί στην επιλεκτική εξάπλωσή τους, ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης των στρωματικών κυττάρων του μυελού των οστών που παράγουν IL-6 και άλλες κυτταροκίνες.

5.1.4 Ταξινόμηση βάσει των μεταθέσεων και της έκφρασης των κυκλινών D στο ΠΜ

Αναλύοντας τα στοιχεία του προφίλ της γονιδιακής έκφρασης από 2 διαφορετικά εργαστήρια οι Bergsagel και Kuehl (196) δημοσίευσαν για πρώτη φορά το 2003 νέα ταξινόμηση για υπότυπους ΠΜ (TC ταξινόμηση, όπως αυτή φαίνεται στον Πίνακα 5.2) που βασίζεται τόσο στην παρουσία μετάθεσης (T: traslocation) όσο και στον τύπο της κυκλίνης (Cyclin) που εκφράζεται. Δύο χρόνια αργότερα, και μετά από νέα ευρήματα οι ίδιοι ερευνητές (41) αναθεώρησαν την ταξινόμηση και πρότειναν μια καινούρια που συμπεριλάμβανε 8 υποομάδες, πάντα όμως βάσει της έκφρασης των κυκλινών D1, D2 και D3 και των πέντε πιο συχνά εμφανιζόμενων



μεταθέσεων: 11q23 (CCN D1), 6p21 (CCN D3), 4p16 (MMSET, FGFR3), 16q23 (maf), και 20q11 (MAFB) (Πίνακας 5.1).

Πίνακας 5.1 TC ταξινόμηση ασθενών με ΠΜ

Ομάδα	Μετά- θεση	Γονίδιο που ενεργο- ποιείται	D Κυ- κλίνη	Πλοειδία	Συχνότητα (%)	Πρόγνωση
6p21	6p21	CCND3	D3	NH	3	καλή;
11q23	11q13	CCND1	D1	D, NH	16	καλή
D1	Καμία	Κανένα	D1	H	34	καλή
D1+D2	Καμία	Κανένα	D1 & D2	H	6	πτωχή;
D2	Καμία	Κανένα	D2	H, NH	17	;
Κανένα	Καμία	Κανένα	Καμία	NH	2	καλή;
4p16	4p16	FGFR3/M MSET	D2	NH>H	15	πτωχή
maf	16q23 20q11	c-maf mafB	D2	NH	5 2	πτωχή

H: υπερδιπλοειδικοί όγκοι, NH: μη-υπερδιπλοειδικοί όγκοι

Οι ομάδες 11q13 (16%) και 6p21 (3%) εκφράζουν υψηλά επίπεδα κυκλίνης D1 και D3 ως αποτέλεσμα IgH μετάθεσης. Οι όγκοι της ομάδας D1 (34%) εκφράζουν χαμηλά ή μέτρια επίπεδα κυκλίνης D1 παρά την απουσία μετάθεσης t(11;14), ενώ στην ομάδα D1+D2 εκφράζεται επιπλέον και η D2. Στην ομάδα D2 συμπεριλαμβάνονται ΠΜ που δεν εμπίπτουν σε καμία από τις άλλες κατηγορίες αλλά εκφράζουν κυκλίνη D2. Στην κατηγορία «καμία», καμία από τις κυκλίνες D δεν εκφράζεται. Τα ΠΜ με 4p16 (15%) εκφράζουν υψηλά επίπεδα κυκλίνης D2 και MMSET ως αποτέλεσμα της μετάθεσης t(11;14). Τα ΠΜ maf (7%) εκφράζουν υψηλά επίπεδα κυκλίνης D2 και επίσης c-maf ή mafB.

Εκτός από το ότι οι ομάδες της TC ταξινόμησης μοιράζονται κοινό γονιδιακό προφίλ έκφρασης, κάθε μία από αυτές σχετίζεται και με συγκεκριμένες βιολογικές και κλινικές παραμέτρους (195). Για παράδειγμα, η ομάδα TC D1 δε συμπεριλαμβάνει καθόλου όγκους πλασματοκυτταρικής λευχαιμίας ή κυτταρικών σειρών ΠΜ, υποδηλώνοντας ότι οι όγκοι αυτοί έχουν μια ισχυρή εξάρτηση από την αλληλεπίδρασή τους με τα κύτταρα του στρώματος του μυελού. Επιπλέον, πιο αυξημένος επιπολασμός οστικής νόσου (περίπου 90%) ανευρίσκεται στις ομά-



δες TC_6p21, TC 11q23, TC D1 και TC D1+D2, και χαμηλότερος (περίπου 55%) στις ομάδες TC 4p16 και TC maf (197,198).

Φαίνεται λοιπόν, ότι και το ΠΜ όπως και η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία συμπεριλαμβάνει πολλές νόσους (ομάδες) που έχουν διαφορετική γονιδιακή έκφραση, κλινικά χαρακτηριστικά, πρόγνωση και απόκριση στη θεραπεία.



6. Διαταραχές της μεθυλίωσης γονιδίων ρυθμιστικών του κυτταρικού κύκλου

6.1. p15INK4b (CDKN2B), p16INK4A (CDKN2A)

Τόσο το γονίδιο CDKN2B, που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p15INK4B, όσο και το γονίδιο CDKN2A που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p16INK4A, βρίσκονται στο χρωμόσωμα 9p21 και κωδικοποιούν όπως έχει ήδη αναφερθεί αναστολές για τις CDK4 και CDK6, οπότε και εμπλέκονται στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου κατά τη μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S (199).

Πρόσφατα το p16INK4A (CDKN2A), αναγνωρίστηκε ως αρνητικός ρυθμιστής της κυτταρικής διαίρεσης. Με ανάλυση Northern Blot, προκύπτει ένα μεταγραφικό προϊόν 0.9 kb. Το p16INK4A (CDKN2A) mRNA είναι εξαιρετικά σταθερό και τα επίπεδά του παραμένουν σταθερά κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Η έκφραση του p16INK4A ποικίλει ανάλογα με το τύπο του κυττάρου. Τα ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα δεν εκφράζουν καθόλου το p16INK4A. Η υπερέκφραση του p16INK4A σε φυσιολογικά κύτταρα, όπως στα U20S κύτταρα οστεοσαρκώματος, οδηγεί σε αναστολή της φάσης G1. Ωστόσο υπερέκφραση του p16INK4A σε κυτταρικές σειρές που δεν εκφράζουν το Rb δεν οδηγεί σε αύξηση του αριθμού των κυττάρων που έχουν σταματήσει στη φάση (63). Η αλληλεπίδραση του p16INK4A με τις κινάσες CDK4 και CDK6 οδηγεί σε συμπλέγματα που δεν είναι δυνατό να φωσφορυλιώσουν μέλη της οικογένειας του Rb, όπως οι πρωτεΐνες p107 και p130. Αυτή η αναστολή εμποδίζει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Ομόζυγη έλλειψη του CDKN2A (p16INK4A) βρίσκεται συχνά σε ασθενείς με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία, οξεία T λευχαιμία/λέμφωμα και B-χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (200,201).

Τα ρυθμιστικά γονίδια του κυτταρικού κύκλου CDKN2B (p15INK4b) και CDKN2A (p16INK4A) είναι τα πιο καλά μελετημένα παραδείγματα επιγενετικής αδρανοποίησης στις αιματολογικές κακοήθειες (47,202). Το γονίδιο p15INK4B επάγεται ως απόκριση στον TGF-β (transforming-growth factor β) μέσω άμεσης ενεργοποίησης της μεταγραφής (203). Αν και η ομόζυγη έλλειψη είτε και των δύο (p15INK4B, p16INK4A) ή έστω μόνο του p16INK4A έχουν περιγραφεί σε μία πληθώρα νεοπλασιών, μεμονωμένη έλλειψη του p15INK4B έχει περιγραφεί μόνο σε ορισμένες περιπτώσεις λευχαιμίας και λεμφωμάτων (204). Αντίθετα, η μεθυλίωση του p15INK4B είναι ένα συχνό γεγονός σε ασθενείς με λευχαιμία, λέμφωμα ή μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο (201,205). Αφού δύο διαφορετικές ομάδες ερευνητών επιβεβαίωσαν ανεξάρτητα



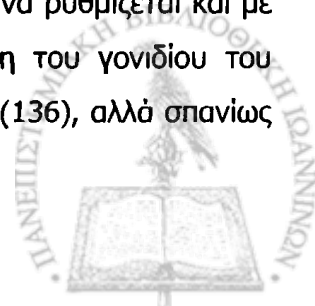
την προγνωστική αξία της υπερμεθυλίωσης του p15INK4b στην οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία (144,206), αυτός ο ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου αποτελεί το καλύτερο παράδειγμα διαγνωστικής και προγνωστικής αξίας των επιγενετικών τροποποιήσεων στις αιματολογικές κακοήθειες.

Μεθυλίωση του CDKN2A (p16INK4A) απαντάται σχεδόν αποκλειστικά στα μη-Hodgkin λεμφώματα και μόνο πολύ σπάνια στις λευχαιμίες (207). Στα λεμφώματα, η μεθυλίωση του CDKN2A (p16INK4A) σχετίζεται με υψηλό βαθμό κακοήθειας και δυσμενή πρόγνωση (208). Η προγνωστική αξία της μεθυλίωσης του CDKN2A (p16INK4A) στο ΠΜ δεν έχει πλήρως διευκρινισθεί και αντικρουόμενα αποτελέσματα έχουν δημοσιευθεί (141,207,209-212)}.

6.2 P57KIP2 (CDKN1C)

Η πρωτεΐνη p57KIP2 ανήκει, όπως προαναφέρθηκε, στην οικογένεια των CIP/KIP αναστολέων των κινασών που εξαρτώνται από τις κυκλίνες και βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11p15.5, περιοχή που έχει συσχετισθεί με το σύνδρομο Beckwith-Wiedmann (213-215). Αυτή η περιοχή είναι ένας συχνός τόπος για απώλεια ετεροζυγωτίας σε ανθρώπινες κακοήθειες, όπως για παράδειγμα στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως, του ήπατος, κεφαλής και τραχήλου και του μαστού (216-218). Το p57KIP2 αποτελεί έναν ικανό αναστολέα διαφόρων συμπλεγμάτων κυκλίνης-CDK και είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Το p57 ενώνεται με τις κινάσες CDK2, CDK3, CDK4 και τις κυκλίνες E, A, και D1. Το p57 εκφράζεται σε τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα, υποδηλώνοντας συμμετοχή αυτού CDKI στην έξοδο του κυττάρου από τον κυτταρικό κύκλο κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης (63). Χρησιμοποιώντας αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα και μικροσυστοιχίες, οι Scandura και συν. ταυτοποίησαν το p57 ως τον μοναδικό αναστολέα CDK που επάγεται από τον TGF-beta (219). Αυξημένα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης του p57 παρατηρήθηκαν προ της διακοπής του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 μέσω του TGF-beta. Αδρανοποίηση του p57 μέσω σημειακών μεταλλάξεων δεν είναι συχνή στις αιματολογικές κακοήθειες (219,220). Έτσι η υπερμεθυλίωση θα μπορούσε να είναι ένας πιθανός μηχανισμός αδρανοποίησης του γονιδίου.

Στους επίμυες, η αποτύπωση του γονιδίου του p57 ρυθμίζεται αυστηρά με τη μεθυλίωση (221), ενώ στους ανθρώπους η μητρική μονοαλληλική έκφραση μπορεί να ρυθμίζεται και με μηχανισμό διαφορετικό από αυτόν της μεθυλίωσης. Συχνή μεθυλίωση του γονιδίου του p57KIP2 έχει περιγραφεί σε λεμφοειδείς νεοπλασίες B κυτταρικής αρχής (136), αλλά σπανίως



σε μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (222). Οι Kikuchi και συν. έχουν αναφέρει αδρανοποίηση του p57KIP2 λόγω μεθυλίωσης στο 28% των ασθενών τους με οξεία μυελογενή λευχαιμία (223). Η μεθυλίωση του P57KIP2 δεν έχει μελετηθεί μέχρι σήμερα επαρκώς σε ασθενείς με μονοκλωνικές γαμμαπάθειες.

6.3 TP73 (p73)

Το γονίδιο TP73 ανακαλύφθηκε μόλις το 1997 από τους Kaghad και συν. και βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1p36.33, μια περιοχή που συχνά παρουσιάζει έλλειψη στο νευροβλάστωμα (224). Το γονίδιο αυτό παρουσιάζει μια σημαντικού βαθμού ομολογία με το «φύλακα του γονιδιώματος» το p53 (10,225). Αυτές οι δομικές ομοιότητες αντικατοπτρίζονται και από λειτουργικές ομοιότητες. Η πρωτεΐνη p73 μπορεί να επάγει την αναστολή του κυτταρικού κύκλου, την απόπτωση, την επιδερμική διαφοροποίηση και τη διαφοροποίηση του νευρικού συστήματος (226-229). Η πρωτεΐνη ενεργοποιείται από βλάβη του DNA και αυτή η ενεργοποίηση μπορεί να πυροδοτήσει την απόπτωση ανεξαρτήτως της κατάστασης του p53 (230). Το p73 φαίνεται να ρυθμίζει την έκφραση διαφόρων γονιδίων μερικά από τα οποία είναι στόχοι και του p53, όπως τα Mdm2, Bax, PUMA, p21/Waf1, IGF-BP3(231-234).

Τα σταθερά επίπεδα έκφρασης του p73 είναι ιδιαίτερα χαμηλά σε φυσιολογικές συνθήκες. Παρόμοια με το p53, το p73 σταθεροποιείται σε επίπεδο πρωτεΐνης σε απόκριση μιας υποομάδας παραγόντων που βλάπτουν το DNA και έπειτα εκδηλώνει τις προαποπτωτικές του ιδιότητες. Υπάρχουν όλο και περισσότερα δεδομένα που υποδεικνύουν ότι ο μεταβολισμός του p73 ρυθμίζεται τόσο από μονοπάτια που εξαρτώνται από την ουβικουΐνη (βλ. παρακάτω), αλλά και ανεξάρτητα από αυτήν. Το MDM2 λειτουργεί ως E3 –ουβικουΐνη λιγκάση για το p53 και προάγει την πρωτεολυτική αποδόμηση του από το πρωτεάσωμα. Από την άλλη, το MDM2 σταθεροποιεί το p73, υποδηλώνοντας ότι η σταθεροποίηση του p73 ρυθμίζεται από μονοπάτι διαφορετικό από αυτό του p53 (235). Επιπλέον, ο Ohtsuka και συν, ανέφεραν ότι η κυκλίνη G ενώνεται με το p73 και ενεργοποιεί την πρωτεολυτική του αποδόμηση μέσω του συστήματος της ουβικουΐνης αν και ο ακριβής μηχανισμός παραμένει άγνωστος (236).

Δεδομένου ότι το p73 έχει ιδιότητες παρόμοιες με αυτές του p53 και βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1p36.2-3, περιοχή που συχνά λείπει σε μια ποικιλία κακοηθειών, συμπεριλαμβανομένου και του νευροβλαστώματος, είναι πιθανό το p73 να είναι ένα από τα κλασσικά ογκογονίδια τύπου Knudson (224). Ωστόσο, παρά τις εκτεταμένες έρευνες, το p73 σπάνια είναι μεταλ-



λαγμένο σε πρωτοπαθείς όγκους (237). Η μεθυλίωση του εκκινητή του p73 στην οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (238),(239) και στο λέμφωμα Burkitt είναι συχνό φαινόμενο (238,240), αντίθετα στα υπόλοιπα μη Hodgkin λεμφώματα και στις μονοκλωνικές γαμμαπάθειες δεν έχει πλήρως διευκρινισθεί η συχνότητα μεθυλίωσης (241).

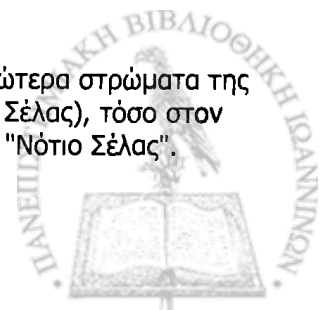
6.4 Polo-like κινάσες

Όπως προαναφέρθηκε οι polo-like κινάσες (Plks) είναι μία οικογένεια σερίνο-θρεονίνο κινάσων που συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και στα σημεία ελέγχου (checkpoints) βλαβών του DNA (242). Η Polo, το πρωταρχικό μέλος της οικογένειας των polo-like κινάσων, αναγνωρίστηκε σε μεταλλαγμένα στελέχη *drosophila*, που παρουσίαζαν διαταραχές των πόλων της μιτωτικής ατράκτου (243). Διάφορα μεταλλαγμένα στελέχη έδειξαν διαταραχές στους πόλους των ατράκτων και έτσι πήραν το όνομά τους από τους μαγνητικούς πόλους της γης, ή τα γεωμαγνητικά φαινόμενα που σχετίζονται με αυτούς, όπως Polo και Aurora*.

Η οικογένεια Polo αποτελείται από πολλά μέλη και σε όλα τα είδη. Στα κύτταρα των θηλαστικών έχουν αναγνωρισθεί πολλές Plks (Plk1, Plk2/snk, Plk3/Fnk/Prk και Plk4/Sak) και θεωρούνται πλέον σημαντικοί ρυθμιστές πολλαπλών λειτουργιών, πριν και κατά τη διάρκεια της μιτωτικής κυτταρικής διαίρεσης (244,245).

Από αυτές, η Plk1 είναι η πιο καλά μελετημένη και φαίνεται να ρυθμίζει θετικά την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2(244). Οι Plk2 (Snk/Plk2) και Plk3 ανιχνεύθηκαν αρχικά ως πρώιμα μετάγραφα σε ινοβλάστες επίμυων, ενώ η Plk4 φαίνεται να έχει λειτουργία στη φάση S του κυτταρικού κύκλου (246). Η ακριβής λειτουργία της Snk/Plk2 δεν είναι γνωστή. Ωστόσο από μελέτες που έγιναν σε Plk2^{-/-} επίμυες, φαίνεται ότι αυτή η πρωτεΐνη έχει ρόλο στην εξέλιξη και εμπλέκεται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Η Snk/Plk2 απαιτείται για το διπλασιασμό των κεντριολίων κατά τη μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S, αν και Plk2^{-/-} επίμυες είναι βιώσιμοι, ενδεχομένως γιατί υπάρχει μερική αλληλοεπικάλυψη μεταξύ των λειτουργιών των Plks (247). Μελέτες έχουν δείξει επίσης ότι η Snk/Plk2 επάγεται από τον άγριο τύπο του p53 μετά από βλάβη του DNA και υπό αυτές τις συνθήκες ενεργοποιεί το G2

* Aurora = Το **Σέλας**, είναι το φωτεινό ουράνιο φαινόμενο που συμβαίνει στα ανώτερα στρώματα της ατμόσφαιρας και που παρατηρείται ιδίως στις πολικές περιοχές (εξ ου και Πολικό Σέλας), τόσο στον Βόρειο ημισφαίριο όσο και στο Νότιο αποκαλούμενο ανάλογα "Βόρειο Σέλας" και "Νότιο Σέλας".



σημείο ελέγχου. Η πρώτη μελέτη που υπέδειξε την ογκοκατασταλτική λειτουργία της Snk/Plk2 ήταν από τους Syed και συν (248). Στη μελέτη αυτή περιγράφεται αποσιώπηση, δηλαδή απώλεια έκφρασης και μεθυλίωση, της κινάσης αυτής σε κυτταρικές σειρές από λέμφωμα Burkitt, αλλά και σε άλλα Β-λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα. Αντίθετα, το γονίδιο εκφραζόταν και δεν ήταν μεθυλιωμένο σε φυσιολογικά Β-λεμφοκύτταρα και σε αδενοκαρκίνωμα του μαστού και πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου. Αξίζει να σημειωθεί ότι η μεθυλίωση της Snk/plk2 κινάσης δεν έχει περιγραφεί σε ασθενείς με πλασματοκυτταρικές δυσπλασίες ή κακοήθειες της μυελικής σειράς.

6.5 Von Hippel Lindau (VHL) γονίδιο

Το γονίδιο Von Hippel Lindau (VHL) εδρεύει στο χρωμόσωμα 3 και στη θέση 3p25 και απώλεια του σχετίζεται με την ομώνυμη νόσο που κληρονομείται με τον αυτοσωμικό επικρατούμενο χαρακτήρα. Η πρωτεΐνη VHL αποτελεί μέρος του συστήματος ουβικουιτίνης-λιγκάσης.

Η **ουβικουιτίνη** (ubiquitin) ($\approx 8,5\text{kDa}$) είναι μια πρωτεΐνη αποτελούμενη από 76 αμινοξέα η οποία είναι ευρύτατα διαδεδομένη και συντηρημένη στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (εξού και η ονομασία της από το αγγλικό ubiquitous δηλ. πανταχού παρών) (249). Η προσθήκη ενός ή λίγων μορίων ουβικουιτίνης σε μια πρωτεΐνη (μονοουβικουιτίνωση ή ολιγοουβικουιτίνωση αντίστοιχα) επηρεάζει τη δραστηριότητα της και τη θέση της μέσα στο κύτταρο. Αντίθετα, η προσθήκη πολλών μορίων ουβικουιτίνης σε μια πρωτεΐνη (πολυουβικουιτίνωση) οδηγεί στο σχηματισμό αλυσίδων ή "δέντρων" ουβικουιτίνης πάνω στην πρωτεΐνη-στόχο και τη "μαρκάρει" για μεταφορά και αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα (250). Η διαδικασία προσθήκης ουβικουιτίνης σε μια πρωτεΐνη ξεκινάει με τη σύνδεση μεταξύ ενός "ένζυμου που ενεργοποιεί την ουβικουιτίνη" (**E1**, ubiquitin-activating enzyme) και του καρβοξυτελικού άκρου (C-άκρου) ελεύθερης ουβικουιτίνης. Η ενεργοποιημένη, πλέον, ουβικουιτίνη μεταφέρεται με ένα "ένζυμο που προσθέτει ουβικουιτίνη" (**E2**, ubiquitin-conjugating enzyme). Τέλος, με τη βοήθεια μιας λιγκάσης ουβικουιτίνης (**E3**, ubiquitin-ligase) καταλύεται η σύνδεση της ουβικουιτίνης στην ε-αμινομάδα κάποιου υπολείμματος λυσίνης της πρωτεΐνης-στόχου. Κατά την πολυουβικουιτίνωση τα πρόσθετα μόρια ουβικουιτίνης συνδέονται μέσω της λυσίνης τους στη θέση 48 (lys-48) με τη γλυκίνη στη θέση 76 (gly-76) του καρβοξυτελικού άκρου μορίου ουβικουιτίνης που έχει ήδη συνδεθεί άμεσα ή έμμεσα (μέσω άλλου μορίου ουβικουιτίνης) στην πρωτεΐνη-στόχο (251).



Παρουσία οξυγόνου η πρωτεΐνη VHL ενώνεται με τον HIF-1α (hypoxia inducible factor 1 alpha) με σκοπό την αποδόμηση του από το πρωτεάσωμα. Επί απουσίας του VHL ο HIF-1α σταθεροποιείται με αποτέλεσμα να επάγει την έκφραση πολλών γονιδίων στόχων, συμπεριλαμβανομένων γονιδίων που επάγουν την αγγειογένεση, τη γλυκόλυση, την ομοιοστασία του υποστρώματος και την κυτταρική επιβίωση (252).

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών είναι υποξικό. Κατά την πρόοδο νόσου, στο ΠΜ, έχει παρατηρηθεί μία προ-αγγειογενετική απόκριση, αλλά η μηχανιστική βάση αυτής της απόκρισης δεν έχει πλήρως διευκρινισθεί (253). Στην παρούσα διατριβή υποθέσαμε ότι η απώλεια της έκφρασης του γονιδίου VHL, μέσω μεθυλίωσης, θα μπορούσε να είναι ένας από τους μηχανισμούς που να οδηγούν σε συνεχή ενεργοποίηση του HIF-1α, και άρα σε αυξημένη αγγειογένεση. Μεθυλίωση του VHL έχει περιγραφεί κυρίως σε συμπαγείς όγκους (254). Η μεθυλίωση του VHL στις αιματολογικές κακοήθειες δεν έχει μελετηθεί επαρκώς.



Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν να μελετηθούν

1. η έκφραση των κυκλινών τύπου D, δηλαδή οι κυκλίνες D1, D2 και D3 σε ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα
2. η κλινική σημασία των διαταραχών της έκφρασης των κυκλινών τύπου D σε ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα συσχετίζοντας την έκφραση με σχετικές κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους
3. η κατάσταση μεθυλίωσης των υποκινητών γονιδίων που αναστέλλουν τις κυκλίνες, και ειδικότερα των p15 (CDKN2B), p16 (CDKN2A), p57 (CDKN1C), p73 (TP73) σε ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα, μονοκλωνική γαμμαπάθεια αδιευκρίνιστης σημασίας και μακροσφαιριναιμίας του Waldenström
4. η κατάσταση μεθυλίωσης των υποκινητών γονιδίων που παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου όπως το snk/rlk2 και του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών, όπως το VHL σε ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα, μονοκλωνική γαμμαπάθεια αδιευκρίνιστης σημασίας και μακροσφαιριναιμίας του Waldenström
5. η συσχέτιση της κατάστασης μεθυλίωσης των υπό μελέτη γονιδίων με σχετικές κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους, όπως η επιβίωση, η αναιμία, το στάδιο νόσου, η παρουσία οστικής ή εξωμυελικής νόσου, η αλβουμίνη ορού και η β₂M ορού



ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



7. ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Όλοι οι ασθενείς διαγνώστηκαν και παρακολουθήθηκαν στην Αιματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων και ήταν ελληνικής καταγωγής.

Μελετήθηκαν 45 ασθενείς με ΠΜ, 4 ασθενείς με MW και σε 3 ασθενείς με ΜΓΑΣ. Από τους 45 ασθενείς με ΠΜ 21 ήταν γυναίκες και 24 άνδρες με μέση ηλικία 66,4 έτη (μέση τιμή±SD, 66,4 ± 12.4), από τους 4 ασθενείς με MW, 2 ήταν άνδρες και 2 γυναίκες με μέση ηλικία 68 έτη (μέση τιμή ±SD, 61.7 ± 3,5), και 3 ασθενείς με ΜΓΑΣ ήταν άνδρες με μέση ηλικία 72 έτη (μέση τιμή±SD, 72 ±7). Αρχικά είχε προγραμματιστεί να μελετηθεί και η έκφραση των κυκλικών τύπου D σε όλους τους ασθενείς. Σε 10 ασθενείς όμως δε βρέθηκε οστεομυελική βιοψία (OMB), σε 4 το υλικό της OMB ήταν ανεπαρκές και σε 8 ασθενείς δεν κατέστη δυνατό να απομονωθεί κυκλικό DNA. Έτσι η μελέτη της έκφρασης των κυκλικών τύπου D έγινε σε 23/45 ασθενείς. Όλες οι οστεομυελικές βιοψίες έγιναν κατά τη διάγνωση της νόσου. Τα δείγματα μυελού των οστών από παρακέντηση ελήφθησαν κατά τη διάγνωση σε 42 ασθενείς και σε 3 ασθενείς σε φάση υψηλού plateau. Σε 5 ασθενείς υπήρχε και δεύτερο δείγμα όταν παρουσίασαν υποτροπή ή πρόοδο νόσου.

Η διάγνωση της νόσου του ΠΜ και της ΜΓΑΣ έγινε βάσει των κριτηρίων που αναφέρονται στο κεφάλαιο 4.2.6, ενώ η διάγνωση της MW βασίστηκε κυρίως στην παρουσία μονοκλωνικής IgM ανοσοσφαιρίνης στον ορό και στην οστεομυελική βιοψία. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν 10 άτομα που προσήλθαν στο Εξωτερικό Αιματολογικό Ιατρείο για διερεύνηση οριακής θρομβοπενίας και αποδείχθηκε ότι δεν είχαν κάποια αιματολογική ή άλλη κακοήθεια. Η μέση ηλικία των μαρτύρων ήταν 65,3 έτη (διακύμανση 2,4 έτη) και 4 ήταν γυναίκες και 6 άνδρες.

Η λήψη των δειγμάτων μυελού των οστών και η διενέργεια των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε μετά από συγκατάθεση όλων των ασθενών και έγκριση της Επιστημονικής Επιτροπής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Η κλασική κυτταρογενετική ανάλυση των δειγμάτων μυελού των οστών των ασθενών έγινε στο Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος», Τμήμα Κυτταρογενετικής και Βιοδοσιμετρίας, Διευθυντής Γ. Παντελιάς, στα πλαίσια διερεύνησης του υποκείμενου αιματολογικού νοσήματος, όπως γίνεται σε κάθε νέο αιματολογικό ασθενή.



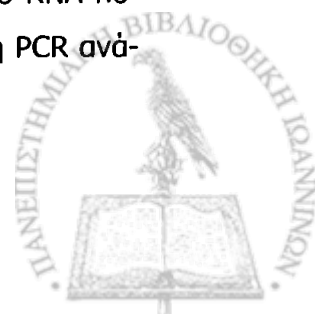
8. ΜΕΘΟΔΟΙ

8.1 Μελέτη της έκφρασης των κυκλινών D1, D2 και D3 με τη μέθοδο qRT-PCR

Η μελέτη της έκφρασης των κυκλινών D1, D2 και D3 έγινε σε 23 ασθενείς με πολλαπλό μύελωμα με τη μέθοδο Sybergreen qPCR (quantitative PCR). Τα πειράματα διεξήχθησαν στο **Cancer Genetics and Epigenetics Laboratory, Breakthrough Breast Cancer Center** στο **Institute of Cancer Research** στο Λονδίνο υπό την εποπτεία του Dr Tim Crook.

Ολικό κυτταρικό RNA απομονώθηκε από βιοψίες μυελού των οστών σε τομές παραφίνης χρησιμοποιώντας το RecoverALL™ kit (Ambion) με ορισμένες τροποποιήσεις. Όλες οι διαδικασίες έγιναν σε περιβάλλον ελεύθερου RNA. Αρχικά, τομές πάχους 20 μm κόπηκαν από βιοψίες μυελού των οστών σε κύβους παραφίνης με τη χρήση μικροτόμου. Τρεις τομές από κάθε περιστατικό τοποθετήθηκαν μέσα σε αποστειρωμένο μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο των 2 ml και επωάστηκαν σε τελικό όγκο 1 ml ξυλόλης στους 50° C για 5 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 16.000 rpm και απόρριψη της ξυλόλης. Το ίζημα ξεπλύθηκε 2 φορές με διάλυμα αιθανόλης 100% σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια αφέθηκε να στεγνώσει στον αέρα για 20 λεπτά.

Στη συνέχεια προστέθηκαν 400 μL από το διάλυμα πέψης και 4 μL πρωτεάσης και τα δείγματα επωάστηκαν στους 50°C για 3 ώρες. Ακολούθως προστέθηκαν 480 μL από το παρεχόμενο προσθετικό απομόνωσης (isolation additive) και έγινε ανάδευση σε vortex, προσθήκη 1,1 ml 100% αιθανόλης και εκ νέου ανάδευση με τη χρήση της πιπέτας. Από αυτό το διάλυμα 700 μL εισήχθησαν σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο καθαρισμού με προσαρτημένο ηθμό που παρέχονταν από την κατασκευαστική εταιρεία. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 10,000 rpm για 1 λεπτό. Ο ιστός που είχε κατακρατηθεί στον ηθμό ξεπλύθηκε με διαδοχικά διαλύματα πλύσης (wash solution 1: 700 μl και wash solution 2 και 3: 500 μL) και φυγοκεντρήθηκε στις 10.000 rpm. Για την αποφυγή τυχόν επιμολύνσεων DNA πραγματοποιήθηκε πέψη με 60 μL DNάσης σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά, ενώ ακολούθησε ξέπλυμα με 700 μL διαλύματος wash solution 1 και 500 μL wash solution 2, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Τέλος, το δεσμευμένο RNA διαλύθηκε μετά από διαδοχική προσθήκη 2 δόσεων των 30 μL, διαλύματος έκλουσης (elution solution) και φυγοκέντρησης στις 16.000 rpm. Το απομονωμένο RNA ποσοτικοποιήθηκε με φωτόμετρο και αποθηκεύθηκε στους -80° C μέχρι την ποσοτική PCR ανά-
λυση



SyberGreen Ποσοτική PCR

Η ποσοτική PCR έγινε με τη χρήση του ABI PROSM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany) χρησιμοποιώντας ειδικούς ανιχνευτές για κάθε κυκλίνη και GADPH (PE applied Biosystems). Χρησιμοποιήθηκε το TaqMan Universal PCR master mix (Applied Biosystems) και κάθε δείγμα αναλύθηκε 3 φορές. Οι αλληλουχίες των εκκινητών για την ποσοτική SyberGreen PCR ήταν οι ακόλουθοι:

Κυκλίνη D1

Forward: TATTGCGCTGCTACCGTTGA

Reverse: CCAATAGCAGCAAAACAATGTGAAA

Μέγεθος προϊόντος: 90 bp

Κυκλίνη D2

Forward: GCTGGCTAAGATCACCAACACA

Reverse: CCTCAATCTGCTCCTGGCAA

Μέγεθος προϊόντος: 62 bp

Κυκλίνη D3

Forward: GCCCTCTGTGCTACAGATTATACCT

Reverse: TGCTGCCCGTGGCG

Μέγεθος προϊόντος: 64 bp

8.2 Μελέτη της μεθυλίωσης γονιδίων που αναστέλλουν τις κυκλίνες ή/ και συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου

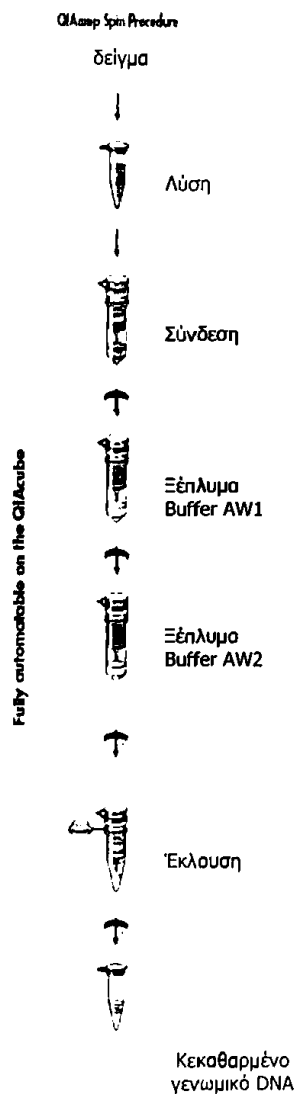
Η μελέτη της μεθυλίωσης των γονιδίων έγινε στο **Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας** του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, υπό την εποπτεία της Επικ. Καθηγήτριας Μ. Σύρρου, στο **Cancer Genetics and Epigenetics Laboratory, Breakthrough Breast Cancer Center** στο **Institute of Cancer Research** στο Λονδίνο υπό την εποπτεία του Dr Tim Crook, και στο **Ερευνητικό Αιματολογικό Εργαστήριο** του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, Διευθυντής: Καθηγητής Κ.Λ. Μπουραντάς.



Η συλλογή δειγμάτων μυελού των οστών έγινε σε σωληνάρια με αντιπηκτικό EDTA μετά από παρακέντηση με άσηπτες μεθόδους. Η φύλαξη των δειγμάτων έγινε στους -20°C μέχρι το επόμενο στάδιο της μελέτης.

8.2.1 Απομόνωση DNA

Για την απομόνωση του γενωμικού DNA από τον μυελό των οστών χρησιμοποιήθηκε το QIAamp DNA mini kit (Qiagen, BioAnalytica, Athens Greece). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την απομόνωση DNA από δείγματα μυελού των οστών ήταν η εξής (Σχήμα 8.1): 20 μL Qiagen πρωτεάσης τοποθετήθηκαν σε ένα σωλήνα μικροφυγοκέντρωσης ενώ στη συνέχεια προστέθηκαν 200 μL του δείγματος και 200 μL buffer AL (Λύση). Μετά από ταχεία ανάδευση για 15 δευτερόλεπτα σε vortex, ακολούθησε επώαση στους 56°C για 10 λεπτά. Μετά από προσθήκη 200 μL αιθανόλης (96-100%) και ταχεία ανάδευση το διάλυμα τοποθετούνταν σε σωληνάρια μικροφυγοκέντρωσης και ακολουθούσε φυγοκέντρωση στις 8000 rpm (κατακράτηση DNA στον ηθμό). Ακολούθησε εκ νέου προσθήκη 500 μL Buffer AW1 και νέα φυγοκέντρωση στις 8000 rpm για 1 λεπτό και μετά προσθήκη 500 μL Buffer AW2 και φυγοκέντρωση στις 14000 rpm για 3 λεπτά (Ξέπλυμα). Στη συνέχεια το κάθε σωληνάριο τοποθετούνταν σε ένα νέο σωληνάριο (χωρητικότητας 2 ml) και μετά από προσθήκη 200 μL Buffer AE ή απεσταγμένου νερού γινόταν μια νέα φυγοκέντρωση στις 8000 rpm για 1 λεπτό οπότε και στο υποκείμενο διάλυμα εκλούονταν το γενωμικό DNA (Έκλυση). Οι φυγοκεντρήσεις έγιναν στη φυγόκεντρο Eppendorf, Centrifuge 5424.

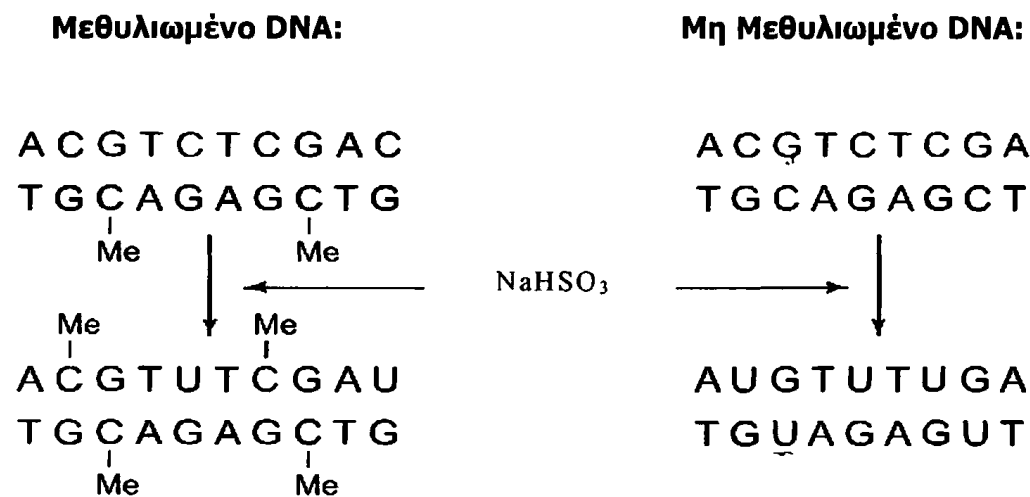


Σχήμα 8.1. Σχηματική απεικόνιση απομόνωσης DNA



8.2.2 Μελέτη της μεθυλίωσης- Χημική κατεργασία με NaHSO₃ (bisulphite modification)

Πριν από τη δεκαετία του '90 υπήρχαν πολύ λίγες τεχνικές για την εκτίμηση της κατάστασης μεθυλίωσης μεμονωμένων CpG νησίδων κατά μήκος του γενωμικού DNA, οι περισσότερες από τις οποίες απαιτούσαν σχετικά μεγάλες ποσότητες DNA (της τάξης των 10 µg). Το πρόβλημα αυτό ξεπεράστηκε με τη χρήση της μεθόδου της χημικής κατεργασίας με NaHSO₃, μέθοδο την οποία συνέλαβε αρχικά ως ιδέα ο G. W. Grigg και υλοποίησε στη συνέχεια με τη βοήθειά του D. Millar (255). Με την τεχνική αυτή επιδρούμε με την χημική ουσία NaHSO₃ στις κυτοσίνες αποδιαταγμένου DNA. Οι μη μεθυλιωμένες κυτοσίνες μετατρέπονται σε ουρακίλες μετά από απαμινώσεις και σουλφονυλιώσεις (Σχήμα 8.2), αντίθετα οι 5- μεθυλοκυτοσίνες (5-mC) παραμένουν ως έχουν. Στη συνέχεια το χημικά κατεργασμένο DNA πολλαπλασιάζεται με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), όπου χρησιμοποιούνται δύο ζεύγη ειδικά σχεδιασμένων εκκινήτων: ένα για την περίπτωση που η αλληλουχία που μελετάται είναι μεθυλιωμένη και έναν άλλο για την περίπτωση που η αλληλουχία δεν είναι μεθυλιωμένη.



Σχήμα 8.2 Μετά από επεξεργασία με NaHSO₃ στην περίπτωση που οι κυτοσίνες είναι μεθυλιωμένες παραμένουν ως έχουν, ενώ στην περίπτωση που δεν είναι μεθυλιωμένες μετατρέπονται σε ουρακίλες.

Για τη χημική κατεργασία με NaHSO₃ χρησιμοποιήθηκε το EZ DNA Methylation kit (Zymo Research, CA, USA). Η διαδικασία έχει ως εξής:



Προσθέτουμε 5 μl M-Dilution Buffer σε 5 μl DNA (περίπου 2 μg) και συμπληρώνουμε με αποστειρωμένο H₂O μέχρι τα 45 μl. Το μείγμα αναδεύεται. Τα δείγματα επωάζονται στους 37 °C για 15 min. Προσθέτουμε 100 μl CT Conversion Reagent σε κάθε δείγμα και αναδεύουμε ελαφρώς. Επωάζουμε στους 50 °C στο σκοτάδι για 12-16 ώρες, (το CT Conversion Reagent είναι διάλυμα φωτοευαίσθητο) σε υδατόλουτρο. Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων στους 0-4 °C (π.χ. σε πάγο) για 10 min. Προσθέτουμε 400 μl M-Binding Buffer και αναδεύουμε. Μεταφέρουμε το δείγμα σε Zymo-Spin I Columns τα οποία εναποθέτουμε εντός μικροφυγοκεντρικών σωληναρίων των 2 ml. Φυγοκεντρούμε στις 10000 x g για 15-30 sec. Προσθέτουμε 100 μl M-Wash Buffer στη στήλη και φυγοκεντρούμε στις προηγούμενες συνθήκες. Προσθέτουμε 200 μl M- Desulphonation Buffer στη στήλη και φυγοκεντρούμε στις 10000 x g για 15-30sec. Έπειτα προσθέτουμε άλλα 200 μl M-Wash Buffer και φυγοκεντρούμε στις 10000 x g για 30sec. Τέλος προσθέτουμε 100 μl ddH₂O και αναδεύουμε ελαφρώς. Το τελικό διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία -20° C. Μαζί με τα προς ανάλυση δείγματα υφίσταται χημική κατεργασία με NaHSO₃ και δείγμα DNA ολικά μεθυλιωμένο (CpG Genome™ Universal Methylated, Chemicon International), το οποίο χρησιμοποιείται σαν θετικός μάρτυρας κατά την ηλεκτροφόρηση.

Η χημική κατεργασία με NaHSO₃ που περιγράφηκε υπερτερεί έναντι της χρήσης περιοριστικών ενζύμων, ευαίσθητων στη μεθυλίωση, που χρησιμοποιούνταν παλιότερα, αφού αρχικά πληροφορεί για την κατάσταση της μεθυλίωσης των CpG νησίδων ευρύτερα και όχι μόνο εκείνων που βρίσκονται εντός της περιοχής που αναγνωρίζεται από τα περιοριστικά ένζυμα. Επιπλέον, η χρήση της μεθόδου των περιοριστικών ενζύμων ευαίσθητων στη μεθυλίωση προϋποθέτει την πλήρη πέψη του μη μεθυλιωμένου γενωμικού DNA κάτι το οποίο δεν είναι εύκολα εφικτό.

8.2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μία μέθοδος η οποία δίδει τη δυνατότητα παραγωγής πολλών αντιγράφων συγκεκριμένου τμήματος DNA με μεγάλη ταχύτητα και ευαισθησία. Αναλυτικότερα η αντίδραση PCR περιλαμβάνει τρία στάδια (Εικόνα 8.3):

1. **Στάδιο αποδιάταξης του DNA (denaturation):** Η αντίδραση επιτυγχάνεται σε υψηλή θερμοκρασία (92-96° C για 30-60 sec). Με αυτό τον τρόπο σπάνε οι δεσμοί υδρογόνου



που συγκρατούν τις δύο αλυσίδες της διπλής έλικας του DNA και το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται σε μονόκλωνο.

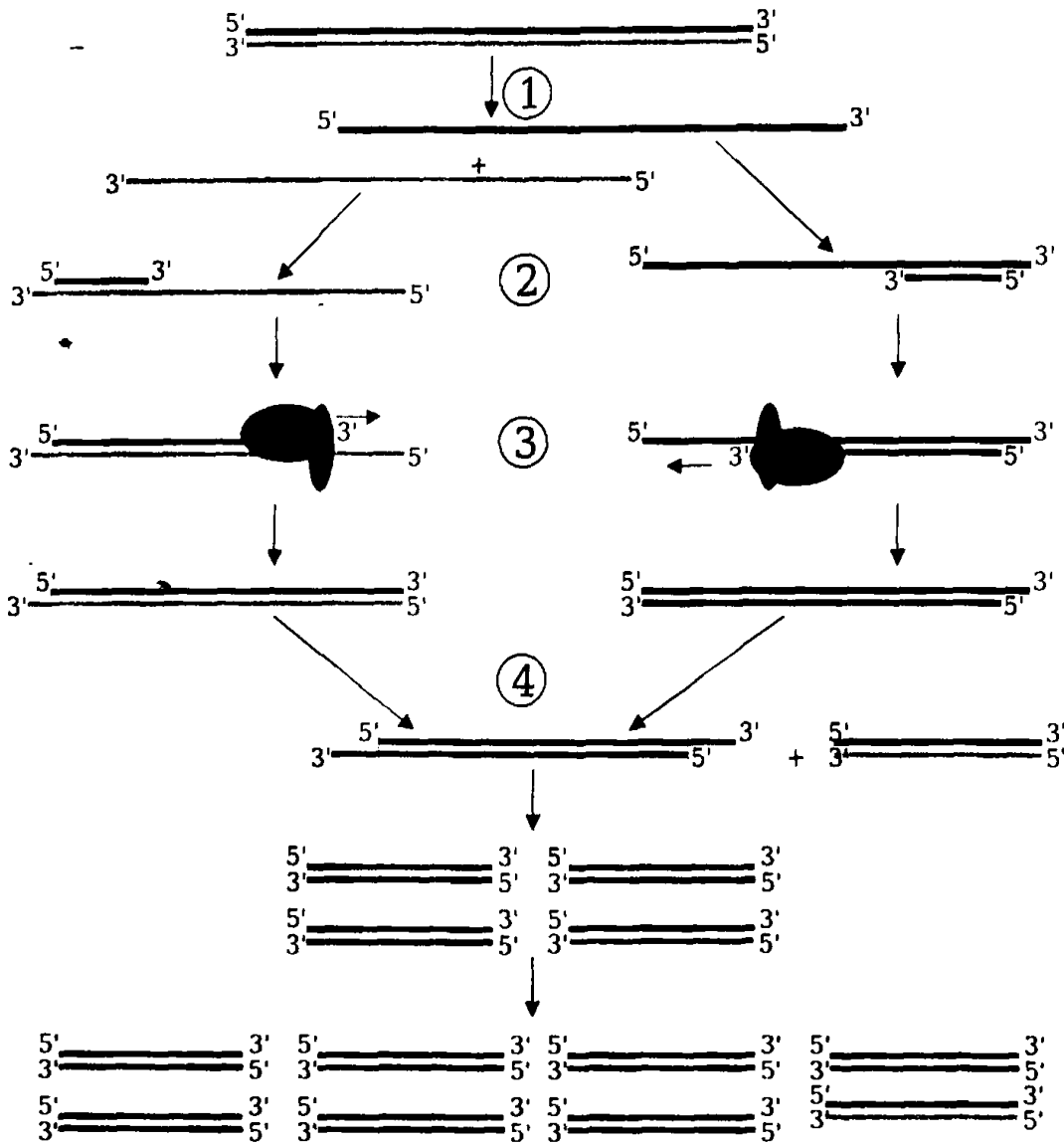
2. **Στάδιο υβριδισμού του γενωμικού DNA με τους εκκινητές (annealing):** Το στάδιο αυτό πραγματοποιείται με μείωση της θερμοκρασίας στους 35°C με 70°C για 20-60 sec. Σε αυτό επιτυγχάνεται υβριδισμός των εκκινητών (primers) στις συμπληρωματικές περιοχές των ανοικτών αλυσίδων του DNA. Οι εκκινητές είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια μεγέθους 15-30 βάσεων τα οποία απομονώνουν την αλληλουχία του DNA που επιθυμούμε να ενισχύσουμε. Αποτελούνται από διαφορετικές μη συμπληρωματικές αλληλουχίες, με αποτέλεσμα να μην υβριδίζονται μεταξύ τους, αλλά με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA. Η θερμοκρασία αυτού του σταδίου καθώς και η συγκέντρωση των εκκινητών είναι καθοριστικοί παράγοντες για την επιτυχία της αντίδρασης.

3. **Στάδιο επιμήκυνσης-σύνθεσης νέου DNA (extension):** Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο πραγματοποιείται η σύνθεση των συμπληρωματικών κλώνων του DNA με επέκταση του 3' άκρου των εκκινητών σε θερμοκρασία $70-72^{\circ}\text{C}$ για 60-180 sec. Αυτό το βήμα επιτυγχάνεται με την χρήση του ενζύμου Taq DNA πολυμεράση (Taq DNA polymerase). Πρόκειται για ένα θερμοανθεκτικό ένζυμο που μιμείται τον τρόπο με τον οποίο τα ένζυμα του κυτταρικού πυρήνα διπλασιάζουν το DNA προκειμένου το κύτταρο να προχωρήσει στη μίτωση.

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε ένα διάλυμα που αποτελείται από το DNA, το κατάλληλο ζεύγος εκκινητών, ιόντα μαγνησίου, ισομοριακό μείγμα των τεσσάρων δεοξυριβοτριφωσφορικών νουκλεοτιδίων (dNTP's: dATP, dCTP, dGTP, dTTP,) και Taq πολυμεράση με το συνοδό ρυθμιστικό διάλυμά της. Σε μια τυπική αντίδραση PCR ο κύκλος αποδιάταξης, υβριδισμού και σύνθεσης νέου DNA μπορεί να επαναληφθεί συνήθως 30-40 φορές. Η ενίσχυση είναι εκθετική αφού τα πολλαπλασιασμένα προϊόντα από τον προηγούμενο κύκλο χρησιμοποιούνται ως νέα καλούπια για τον επόμενο κύκλο πολλαπλασιασμού καταλήγοντας έτσι στον σχηματισμό περισσότερων από 2^{30} ή 1 δισεκατομμυρίου ακριβών αντιγράφων του αρχικού τμήματος του DNA.

Όλη η διαδικασία προετοιμασίας του διαλύματος της PCR αντίδρασης γίνεται υπό άσηπτες συνθήκες. Σε όλα τα δείγματα προστέθηκε παραφινέλαιο σαν επικάλυψη για προστασία από την εξάτμιση στις υψηλές θερμοκρασίες. Η ανάλυση των προϊόντων γίνεται με ηλεκτροφόρηση.





Εικόνα 8.3 Σχηματική απεικόνιση ενός κύκλου PCR. (1) στάδιο αποδιάταξης του DNA, (2) Στάδιο υβριδισμού του γενωμικού DNA με τους εκκινητές, (3) Στάδιο επιμήκυνσης-σύνθεσης νέου DNA, P= polymerase (4) ο πρώτος κύκλος έχει ολοκληρωθεί.

8.2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ειδική της μεθυλίωσης (Methylation specific polymerase chain reaction- MSP)

Πρόκειται για μία νέα μέθοδο PCR, ιδιαίτερα ευαίσθητη στην μελέτη μεθυλίωσης CpG περιοχών των CpG νησίδων η οποία προτάθηκε από την ομάδα του James G. Herman το 1996 (256). Για το λόγο αυτό έχουν σχεδιαστεί ειδικοί εκκινητές (primers), για τον διαχωρισμό των μεθυλιωμένων από τα μη μεθυλιωμένα αλληλόμορφα μετά την κατεργασία τους με NaHSO_3 .



Εφ' όσον μετά την κατεργασία με NaHSO_3 οι δύο αλυσίδες του DNA δεν είναι πλέον συμπληρωματικές, οι εκκινητές μπορούν να σχεδιαστούν για κάθε μία από τις δύο αλυσίδες.

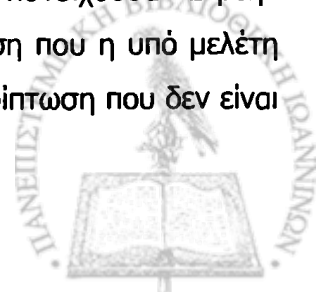
Η τεχνική αυτή πλεονεκτεί έναντι άλλων μεθόδων που χρησιμοποιούνταν ως τώρα. Είναι πιο ευαίσθητη μέθοδος από ότι η ανάλυση κατά Southern, διευκολύνοντας την ανίχνευση μικρού μεγέθους αλληλομόρφων προερχόμενα από μικρή ποσότητα DNA. Επιπλέον η MSP επιτρέπει τη μελέτη δειγμάτων που περιέχουν παραφίνη, που δεν μπορούσαν να εξεταστούν πριν. Δεν χρησιμοποιούνται ακριβά ή ραδιενεργά αντιδραστήρια και θεωρείται κατάλληλη για ανάλυση πολλών δειγμάτων.

Η αντίδραση PCR έγινε σε τελικό όγκο 25 μl που περιείχε:

	Συγκέντρωση	Χρησιμοποιούμενη ποσότητα
DNA χημικά κατεργασμένο		5 μl
HotStarTaq Master Mix		12,5 μl
Εκκινητής για τη μεθυλιωμένη περιοχή (forward)/ Εκκινητής για τη μη μεθυλιωμένη περιοχή (forward)	10 pmol/ μl	2,0 μl
Εκκινητής για τη μεθυλιωμένη περιοχή (reverse)/ Εκκινητής για τη μη-μεθυλιωμένη περιοχή (reverse)	10 pmol/ μl	2,0 μl
Δις-απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό		Μέχρι τελικού όγκου 25 μl

Το HotstarTaq master mix παρέχει τελική συγκέντρωση 1,5 mM MgCl_2 στο τελικό μείγμα και απαιτεί ένα βήμα ενεργοποίησης 15 λεπτών στους 95°C.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της μεθυλίωσης των γονιδίων CDKN2A (p16), CDKN2B (p15), CDKN1C (p57), TP73, VHL, PIK2/Snk και οι συνθήκες της αντίδρασης PCR είναι αναγράφονται στον Πίνακα 8.1. Για κάθε δείγμα ασθενούς αντιστοιχούσαν 2 μείγματα. Ένα μείγμα με εκκινητές που έχουν σχεδιαστεί για την περίπτωση που η υπό μελέτη περιοχή είναι μεθυλιωμένη και ένα άλλο μείγμα με εκκινητές για την περίπτωση που δεν είναι



μεθυλιωμένη. Για κάθε αντίδραση PCR παράλληλα με τα υπό εξέταση δείγματα χρησιμοποιούνται και ένα δείγμα χωρίς DNA για έλεγχο τυχόν επιμολύνσεων το οποίο λειτουργούσε ως τυφλό (*blank*).

Για το σχεδιασμό των MSP εκκινήτων για το κάθε υπό μελέτη γονίδιο γινόταν αρχικά ανεύρεση της αλληλουχίας της αντίστοιχης CpG νησίδας (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) και στη συνέχεια χρησιμοποιούνταν το ελεύθερα διαθέσιμο στο διαδίκτυο πρόγραμμα **Methprimer** (<http://www.urogene.org/methprimer>). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο σχεδιασμός των MSP εκκινήτων είναι πολύ σημαντικός. Συχνά οι εκκινήτες αφορούν σε ένα μόνο κομμάτι της CpG νησίδας και σε αυτό μπορεί να οφείλονται διαφορές σε ποσοστά μεθυλίωσης γονιδίων μεταξύ διαφορετικών ερευνητικών ομάδων, αλλά και ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα.

8.2.5 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τον διαχωρισμό τμημάτων DNA σύμφωνα με το μέγεθός τους. Η πηκτή αγαρόζης είναι εμπλουτισμένη με 0,5 mg/ml βρωμιούχου αιθιδίου. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε διάλυμα 1X TBE (89mM Tris-HCL, 89mM Boric acid, 2.5mM EDTA pH=8). Η ταχύτητα κίνησης και επομένως η απόσταση που διανύουν μέσα στην πηκτή αγαρόζης εξαρτάται από:

- Το μοριακό βάρος του DNA (αντιστρόφως ανάλογη)
- Τη διαμόρφωση του DNA (κυκλικό, γραμμικό)
- Τη συγκέντρωση της αγαρόζης (μικρή συγκέντρωση της αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μεγάλων τμημάτων DNA, ενώ μεγαλύτερη συγκέντρωση χρησιμοποιείται για τα μικρά τμήματα. Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε πηκτή αγαρόζης 2 και 2.5%).
- Τη διαφορά τάσης του ηλεκτροφορητικού πεδίου. Σε χαμηλή τάση ρεύματος (Volt) η κινητικότητα του γραμμικού DNA είναι ανάλογη της τάσης και η δυνατότητα διαχωρισμού ελαττώνεται όταν αυξάνεται η τάση του ρεύματος.

Οι ηλεκτροφορητικές ζώνες των PCR προϊόντων φωτογραφίζονται σε υπεριώδες φως στο τέλος της ηλεκτροφόρησης και ακολουθεί ανάλυση αυτών. Το βρωμιούχο αιθίδιο όταν είναι δεσμευμένο σε DNA δίνει έντονο πορτοκαλί χρώμα φθορισμού. Στην περίπτωση των προϊόντων των αλυσιδωτών αντιδράσεων πολυμεράσης που πραγματοποιήσαμε, τα αναμενόμενα μεγέ-



θη αναγράφονται στον πίνακα. Υπενθυμίζεται ότι για όλα τα πειράματά μας χρησιμοποιήθηκε ανθρώπινο DNA ολικά μεθυλιωμένο που διατίθεται στο εμπόριο (Intergen Company, Purchase, NY) ως θετικός μάρτυρας και ότι όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.



Πίνακας 8.1 Στον πίνακα αναγράφονται οι αλληλουχίες των εκκινητών για το κάθε γονίδιο που μελετήθηκε και οι αντίστοιχες συνθήκες PCR

ΚΕΣ PCR

Γονίδιο	Εκκινητές	M-MSP εκκινητές 5' -3'	Μέγεθος προϊόντος PCR σε bp	U-MSP εκκινητές 5' -3'	Κύκλοι	Συνθήκες PCR	Μέγεθος προϊόντος PCR σε bp
P16	Forward	TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC	150	TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT	35	95°C: 30sec 62°C: 30sec 72°C: 30sec	151
	Reverse	GACCCCGAACCCGACCGTAA		CAACCCCAAAACCACAACCATATA			
P57	Forward	CGCGGTCGTTTAATTAGTCGC	200	TTTGTTTTGGTTGTTAAATTAGTTGT	35	95°C: 30sec 63°C: 30sec 72°C: 30sec	200
	Reverse	ACACAAGGCACCTAACTCTATAA		ACACAACGCACCTAACTCTATAA			
P73	Forward	GGACGTAGCGAAATCGGGGTTTC	60	AGGGGATGTAGTGAAATTTGGGGTTT	35	95°C: 30sec 60°C: 30sec 72°C: 30sec	69
	Reverse	ACCCCGAACATCGACGTCCG		ATCACAACCCCAACATCAACATCCA			
Snk/pik2	Forward	GATAGGGTTCGTTTGTAGTTGTTTC	202	TAGGGTTTGTGTAGTTGTTTTGT	39	95°C: 30sec 56°C: 30sec 72°C: 30sec	202
	Reverse	TAAAATCCTAACACGATTAACCGAT		AATAAAATCCTAACACAAATTAACCAAT			
P15	Forward	TTTCGGTTAAGTTTACGGGTAGAC	24	TTTTGGTTAAGTTTATGGGTAGATGA	40	95°C: 30sec 62°C: 30sec 72°C: 30sec	23
	Reverse	AACTACTACTACTCCACGACGCG		AACTACTACTACTCCACAACACAAA			
VHL	Forward	GTTGGATTTTTTGTGTATGT	158	TGGAGGATTTTTTGGGTACGC	40	95°C: 30sec 60°C: 30sec 72°C: 30sec	165
	Reverse	CCCAAAACCAACACCACAAA		GAACCCGAACGCCCGGAA			



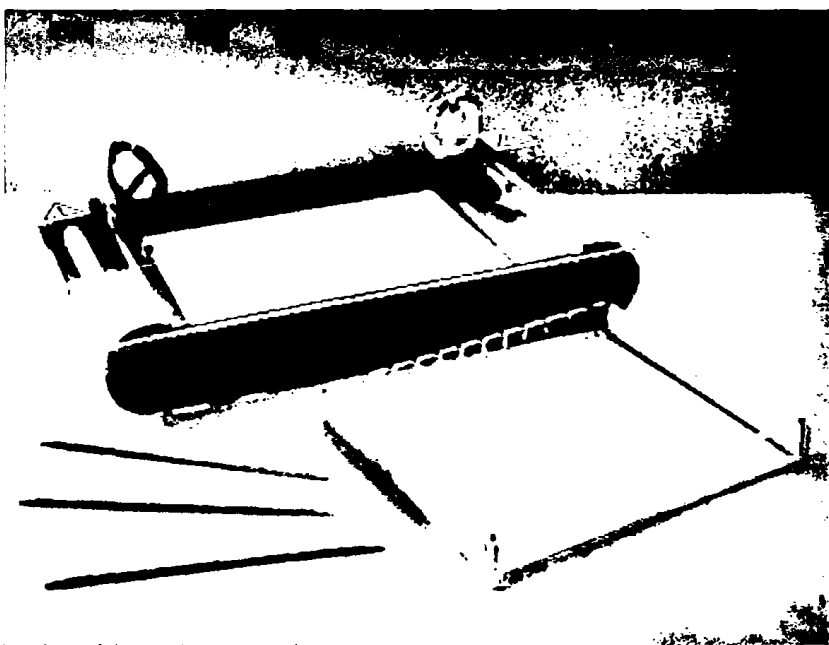
8.2.6 Παρασκευή πηκτώματος αгарόζης 2% για την ηλεκτροφόρηση

Αγαρόζη 2 g διαλύεται σε 100 ml TBE 1X (διάλυμα ηλεκτροφόρησης), στους 100° C. Έπειτα προστίθεται το βρωμιούχο αιθίδιο και όλο μαζί το μείγμα εκχέεται σε εκμαγείο, όπου και στερεοποιείται. Στα προς ανάλυση δείγματα (προϊόντα PCR) προστίθεται χρωστική (loading buffer, Invitrogen), η οποία αφενός επιτρέπει την παρακολούθηση του μετώπου της ηλεκτροφόρησης αφετέρου αυξάνει την πυκνότητα των δειγμάτων του DNA ώστε να παραμένουν στις θέσεις υποδοχής τους στο πηκτώμα.

8.2.7 Συνθήκες ηλεκτροφόρησης

Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε οριζόντια συσκευή. Μαζί με τα προς ανάλυση δείγματα τοποθετούνται στην ηλεκτροφόρηση θετικός μάρτυρας (control), δείγμα blank (για έλεγχο τυχόν επιμολύνσεων), και ladder 100 bp (μας παρέχεται από την εταιρία Invitrogen, 50μg (1,0 μg/μl) και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία -20°C) το οποίο μας επιτρέπει να ελέγχουμε το μέγεθος των τμημάτων του DNA μετά από την PCR αντίδραση.

Συνήθως η διακοπή της ηλεκτροφόρησης γίνεται όταν η χρωστική έχει διανύσει τα 4/5 του μήκους του πηκτώματος της αγαρόζης. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στη συσκευή Fisherbrand με τη χρήση τροφοδοτικού Fisher Scientific Power 3000, Electrophoresis Power Supply (Εικόνα 8.3)



Εικόνα 8.3 Οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης



8.2.8 Παρασκευή μη αποδιατακτικού ηλεκτώματος πολυακρυλαμιδίου 14% (w/v)

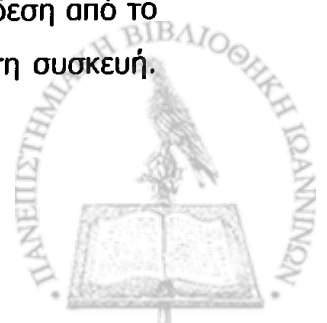
α. Για την παρασκευή του ηλεκτώματος ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιούνται γυάλινες πλάκες διαστάσεων (22x30) cm. Αφού καθαρισθούν σχολαστικά οι πλάκες με αιθανόλη, αποτίθεται η μεγάλη πλάκα σε καθαρή επιφάνεια, τοποθετούνται δεξιά, αριστερά και κάτω οι διαχωριστές (spacers) όμοιου πάχους 0.4 mm και επάνω η μικρότερη πλάκα, έτσι ώστε να είναι ισοεπίπεδη με τη μεγαλύτερη.

β. Σταθεροποιούνται οι πλάκες με ειδικούς σφιγκτήρες και αυτοκόλλητη ταινία, αφού ευθυγραμμισθούν και είναι ισοεπίπεδες.

Για την ετοιμασία της ηλεκτικής ακολουθούνται τα εξής στάδια:

1. Σε γυάλινο ποτήρι ζέσεως προσθέτουμε 21 ml διαλύματος ακρυλαμιδίου/δισ 30% και 24 ml διαλύματος TBE 10x. Ακολουθεί ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα.
2. Το διάλυμα φιλτράρεται με φίλτρο 0.45 μ
3. Λίγο πριν μεταφερθεί το διάλυμα στις πλάκες ηλεκτροφόρησης προστίθενται 570 μl APS (από διάλυμα 10% w/v που έχουμε προετοιμάσει ήδη) και 57 μl TEMED, για τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου.
4. Μετά από ήπια ανάδευση το διάλυμα μεταφέρεται προσεκτικά μεταξύ των πλακών ηλεκτροφόρησης. Η παροχή πρέπει να γίνει με αργό ρυθμό και ιδιαίτερη προσοχή ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία φυσαλίδων αέρα στο πήκτωμα.
5. Με προσοχή τοποθετείται το «κτένι» πάχους 0.4 mm για το σχηματισμό των θέσεων φόρτωσης. Αφήνεται το πήκτωμα να πολυμερισθεί για περίπου 60-80 λεπτά.
6. Μετά την πήξη, αφαιρείται προσεκτικά το κτένι και οι δύο πλάκες τοποθετούνται με προσοχή κατακόρυφα μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία γεμίζει με διάλυμα TBE 1x μέχρι το σημείο που αναγράφεται από την εταιρεία

Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε ήταν FisherBrand (Εικόνα 8.4). Ακολουθεί το «φόρτωμα» των δειγμάτων. Κάθε φορά προστίθενταν 5 μl από το προϊόν της PCR από κάθε δείγμα και 2 μl χρωστικής loading buffer. Το μίγμα τοποθετούνταν με τη βοήθεια πιπέτας και μικρού πλαστικού ρύγχους στο αντίστοιχο «πηγαδάκι». Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 90 Volt για 17 ώρες περίπου. Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης ακολουθεί αποσύνδεση από το βηχάνημα και προσεκτική αφαίρεση του συστήματος πλακών-ηλεκτώματος από τη συσκευή.

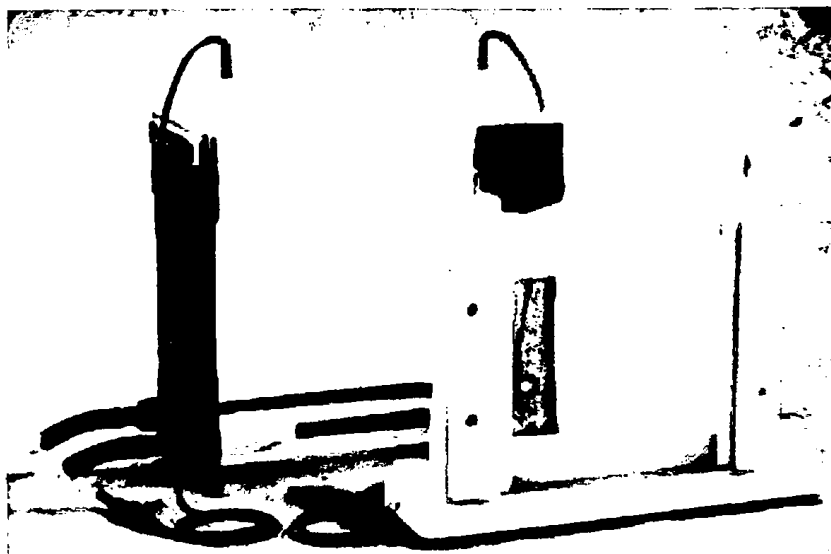


Ακολουθεί χρώση με AgNO_3 αφού πρώτα αποσπάσουμε τις 2 γυάλινες πλάκες χωρίς να σπάσει το πήκτωμα.

1^ο Βήμα: Προετοιμάζουμε διάλυμα με 400 H_2O , 40 ml αιθανόλης και 2 ml οξικού οξέος. Τοποθετούμε το πήκτωμα με προσοχή σε πλαστική λεκάνη και προσθέτουμε 200 ml από το παραπάνω μίγμα. Περιμένουμε 3 λεπτά, αφαιρούμε το διάλυμα, προσθέτουμε άλλα 200 ml και επαναλαμβάνουμε. Τέλος, ξεπλένουμε με H_2O .

2ο Βήμα: Προετοιμάζουμε το διάλυμα AgNO_3 (1 gr AgNO_3 σε 1 l H_2O). Προσθέτουμε 200 ml διαλύματος AgNO_3 στην πλαστική λεκάνη με το πήκτωμα μέχρι όπου καλυφθεί πλήρως και περιμένουμε 10 λεπτά. Ακολουθεί ξέπλυμα με H_2O (Η αιθανόλη και το οξικό οξύ βοηθάνε να εισχωρήσει ο AgNO_3 εντός των μορίων του ηηκτώματος).

3^ο Βήμα: Προετοιμάζουμε το διάλυμα της εμφάνισης. Σε 200 ml H_2O προσθέτουμε 1 κόκκο εμφανιστικού Natriumborhydrid (Fluka), 2 ml φορμαλδεΐδης (Fluka) και 4 gr NaOH. Αναδεύουμε σε μαγνητικό αναδευτήρα. Προσθέτουμε 200 ml του διαλύματος στην πλαστική λεκάνη με το πήκτωμα και περιμένουμε περίπου 20 λεπτά μέχρι να εμφανιστούν οι χαρακτηριστικές μαύρες ζώνες στο πήκτωμα.



Εικόνα 8.4 Κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης

8.2.9. Χρησιμοποιούμενα διαλύματα

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ηλεκτροφόρηση στο μη αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμιδίου είναι τα εξής:

i. Διάλυμα ακρυλαμιδίου / Δις 29:1

Acrylamide	29 gr
N', N'-methylene-bis acrylamide	1 gr
ddH ₂ O μέχρι τα	100 ml

acrylamide: C₃H₅NO (MB 71.08) (Sigma, USA)

N', N'-methylene-bis acrylamide: C₇H₁₀N₂O₂ (MB 154.2) (Sigma, USA)

ii. 10X TBE

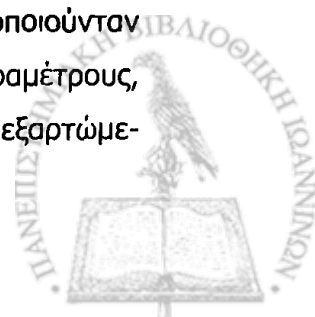
Tris HCL	108 gr
Boric acid	55 gr
EDTA	7.44 gr
ddH ₂ O μέχρι το	1 l

Trizma Base, minimum, 99.9% titration: C₄H₁₁NO₃ (MB121.14) (Sigma-Aldrich, Germany)

Boric acid : H₃BO₃ (MB 61.83) (Sigma-Aldrich, Germany)

8.3 Στατιστική Ανάλυση

Τα δημογραφικά και κλινικά στοιχεία των ασθενών αναλύθηκαν ως μέσες τιμές, διάμεσες τιμές και ως ποσοστά. Για λόγους στατιστικής ανάλυσης ασθενείς με ΠΜ και στάδιο νόσου \geq ΙΙΑ κατά Durie και Salmon θεωρούνταν ότι έχουν προχωρημένο στάδιο νόσου ενώ ως αναιμία ορίστηκαν τιμές αιμοσφαιρίνης (Hb) \leq 10 g/dl. Για τη σύγκριση μέσων τιμών (βιοχημικών παρμετρών και τιμών κυκλικών) μεταξύ υποομάδων των ασθενών χρησιμοποιήθηκε το μη-παραμετρικό στατιστικό τεστ Mann-Whitney. Λόγω του σχετικά μικρού δείγματος ασθενών χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση απλής λογιστικής παλινδρόμησης (simple logistic regression analysis), όπου η κατάσταση μεθυλίωσης του κάθε γονιδίου υπό μελέτη χρησιμοποιούνταν ως μοναδική προγνωστική μεταβλητή για να εκτιμηθεί η συσχέτιση με κλινικές παραμέτρους, όπως η αναιμία, το στάδιο νόσου, η παρουσία εξωμυελικής ή/και οστικής νόσου (εξαρτώμε-



νες μεταβλητές). Οι καμπύλες εκτίμησης επιβίωσης έγιναν με τη χρήση της μεθόδου Kaplan Meier και η σύγκρισή τους με τη μέθοδο log-rank. Αναλύθηκαν ασθενείς που ήταν εν ζωή ή χάθηκαν από την παρακολούθηση στις 15 Μαΐου 2008. Ο σχετικός κίνδυνος θανάτου μεταξύ των διαφόρων υποομάδων έγινε με τη χρήση της παλινδρόμησης Cox proportional Hazard με μόνο μία προγνωστική μεταβλητή να παραμένει στο τελικό μοντέλο. Τιμές $p < 0.05$ θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές. Για τα παραπάνω στατιστικά τεστ χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα Stata, release 9.0 (Stata Corp., College Station, Texas, USA).



9. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

9.1 Κλινικά και Εργαστηριακά Ευρήματα

9.1.2 Ασθενείς με MW

Οι ασθενείς με MW που μελετήθηκαν ήταν 2 άνδρες και 2 γυναίκες, με μέση ηλικία 68 έτη (μέση τιμή ± σταθερά διακύμανσης, $68 \pm 8,1$). Η μέση τιμή αιμοσφαιρίνης (Hb) ήταν 12,35 g/dl, η μέση τιμή λευκών αιμοσφαιρίων (WBC) ήταν $7,16 \times 10^6/l$, η μέση τιμή αιμοπεταλίων (PLT) ήταν $179,5 \times 10^9/l$, η μέση τιμή IgM ήταν 2334,3 mg/dl, η μέση τιμή β_2M ήταν 4332 μg/l, η μέση τιμή αλβουμίνης ήταν 2,2 g/dl, η μέση τιμή κρεατινίνης ορού ήταν 0,8 mg/dl. Κλασσική κυτταρογενετική ανάλυση έγινε σε μία μόνο ασθενή, η οποία και είχε φυσιολογικό καρυότυπο.

9.1.3 Ασθενείς με ΜΓΑΣ

Μελετήθηκαν 3 ασθενείς με ΜΓΑΣ που ήταν άνδρες ηλικίας 67, 80 και 69 ετών αντίστοιχα. Η μονοκλωνική ανοσοσφαιρίνη ήταν τύπου IgG και στους τρεις (μέση τιμή 4150 mg/dl). Η μέση τιμή Hb ήταν 12,3 g/dl, η μέση τιμή WBC ήταν $5,474 \times 10^9/l$, η μέση τιμή PLT ήταν 176,4 $\times 10^9/l$, η μέση τιμή β_2M ήταν 2744,5 μg/l, η μέση τιμή αλβουμίνης ήταν 4,8 g/dl. Κλασσική κυτταρογενετική ανάλυση έγινε σε 2 από τους 3 ασθενείς οι οποίοι και είχαν φυσιολογικό καρυότυπο.

9.1.4 Ασθενείς με ΠΜ

Μελετήθηκαν 45 ασθενείς, 21 γυναίκες και 24 άνδρες με μέση ηλικία 66,4 έτη (μέση τιμή ± σταθερά διακύμανσης, $66,4 \pm 12,4$). Η σταδιοποίηση των ασθενών σύμφωνα με το σύστημα Durie-Salmon είχε ως εξής: στάδιο IA 9 ασθενείς, στάδιο IIA στάδιο IIA 13, στάδιο IIIA 7 ασθενείς, IIIB 9 ασθενείς και έρπον μυέλωμα 7 ασθενείς. Η σταδιοποίηση των ασθενών με το σύστημα ISS είχε ως εξής: στάδιο I 17/45, στάδιο II 14/45, στάδιο III 13/45. Οστική νόσο παρουσίαζαν 25 ασθενείς, εξωμυελική νόσο παρουσίαζαν 12 ασθενείς και ακτινοθεραπεία για οστικά κατάγματα ή για ανακούφιση πόνου από βαριά οστική νόσο έλαβαν 11 ασθενείς. Σημαντική αναιμία (Hb < 10 mg/dl) είχαν 16 ασθενείς ενώ προχωρημένο στάδιο νόσου (DS ≥ II) είχαν 29 ασθενείς (Πίνακας 9.1) .



Πίνακας 9.1 Κλινικές παράμετροι σχετικές με τη νόσο σε 45 ασθενείς με ΠΜ

Κλινικές Παράμετροι	Συχνότητα (ασθενείς)	Ποσοστό, %
Αιμοσφαιρίνη < 10mg/dl	16/45	35,5
Οστική Νόσος	25/45	55,5
Εξωμυελική Νόσος	12/45	26,6
Προχωρημένο στάδιο Νόσου (DS≥II)	29/45	64,4
Ακτινοθεραπεία	11/45	24,4

Η μέση τιμή Hb για τους ασθενείς με ΠΜ ήταν 10,8 mg/dl, η μέση τιμή WBC ήταν $8,5 \times 10^9/l$, η μέση τιμή PLT $202,1 \times 10^9/l$, η μέση τιμή β_2M ήταν 5205 $\mu g/l$, η μέση τιμή αλβουμίνης ορού (Alb) ήταν 3,4 mg/dl, η μέση τιμή ασβεστίου του ορού ήταν 9,92 mg/dl και η μέση τιμή κρεατινίνης ορού ήταν 1,3 mg/dl. Τα κύρια εργαστηριακά ευρήματα των ασθενών με ΠΜ παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.2.

Πίνακας 9.2. Εργαστηριακές παράμετροι σε 45 ασθενείς με ΠΜ

Εργαστηριακές Παράμετροι	Μέση Τιμή	Σταθερή Διακύμανση (SD)	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη Τιμή
Hb, mg/dl	10,8	2,37	5,8	16
WBC, $\times 10^9/l$	8,5	1,3	2,3	92,1
PLT, $\times 10^9/l$	202,1	101,5	9	493
β_2M , $\mu g/l$	5205,6	5103,2	1448	20000
Αλβουμίνη ορού, g/dl	3,4	0,57	2,3	4,7
Κρεατινίνη ορού, mg/dl	1,35	0,9	0,7	6,5
Ασβέστιο ορού, mg/dl	9,92	1,4	8,3	14,6

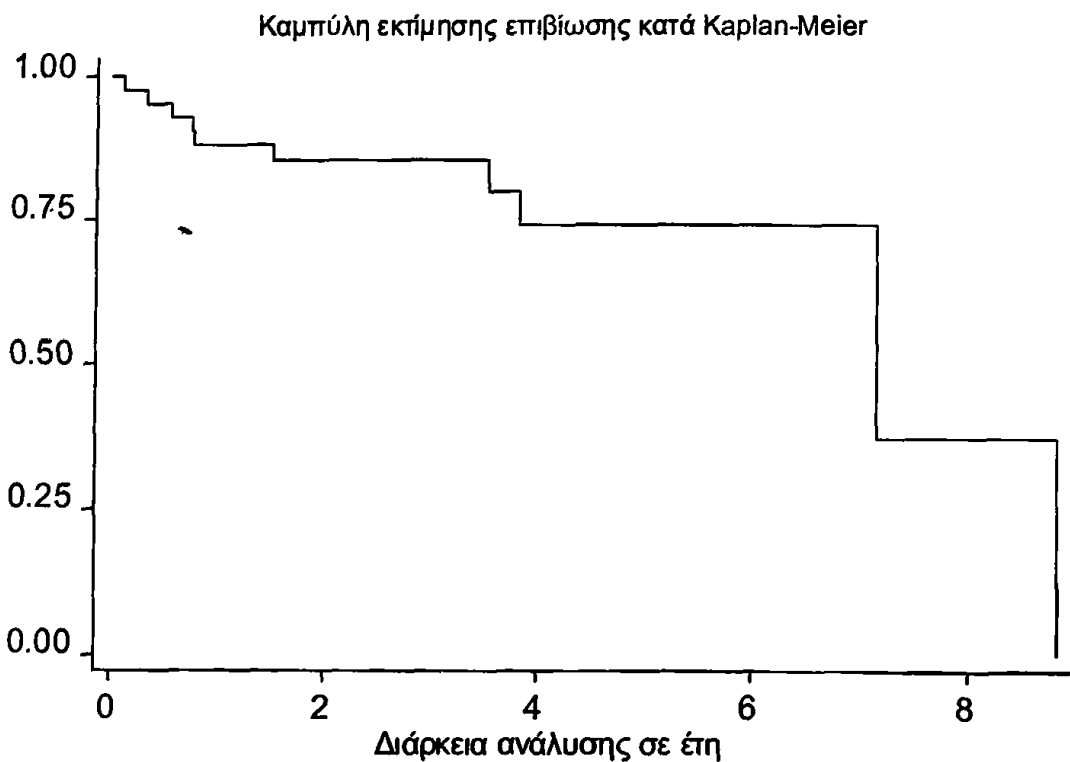
Φυσιολογικές Τιμές: β_2M (β_2 μικροσφαιρίνη): 700-3400 $\mu g/L$, αλβουμίνη ορού: 3,5-5 mg/dl, κρεατινίνης ορού 0,6-1,2 mg/dl, ασβεστίου ορού: 8,2-10,6 mg/dl

Κλασσική κυτταρογενετική ανάλυση ήταν διαθέσιμη σε 23/45 ασθενείς. Φυσιολογικό καρύοτυπο (46,XX ή 46, XY) παρουσίαζαν 19/23, ενώ από τους υπόλοιπους, 3 παρουσίαζαν καρύο-



τυπο 45,X,-Y, και ένας 47,XY,+8. Κατά τη διάρκεια της μελέτης σημειώθηκαν 11 θάνατοι από τους οποίους οι 5 σχετίζονταν με τη νόσο.

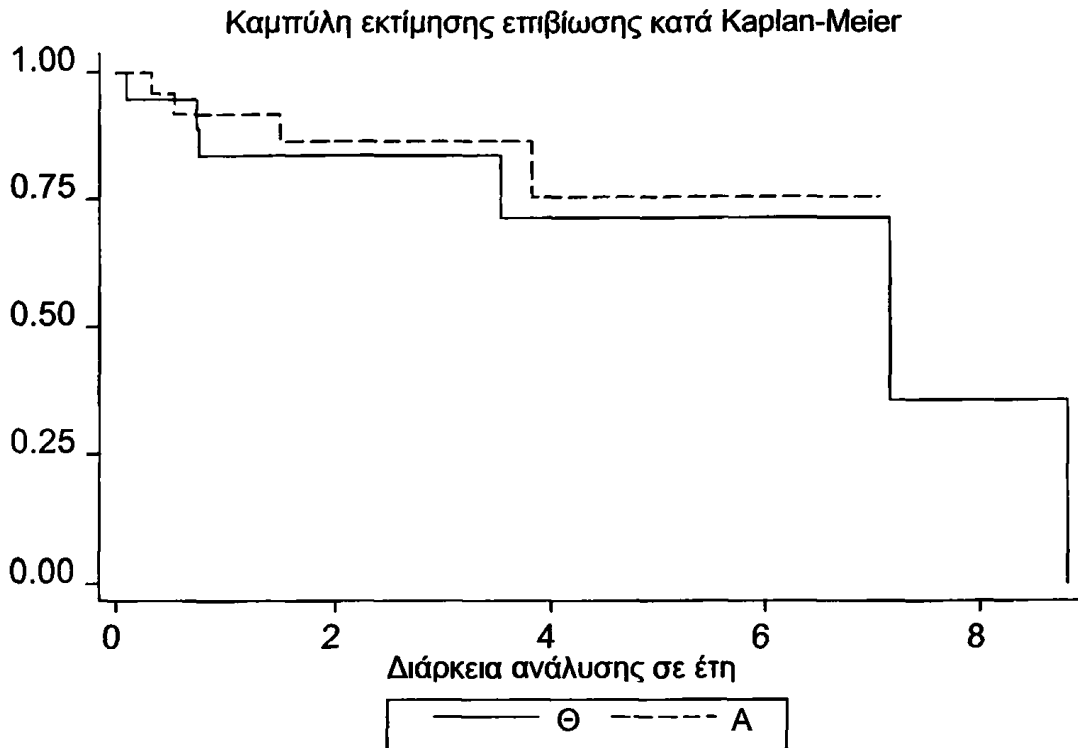
Η διάμεση επιβίωση των 45 ασθενών με ΠΜ που μελετήθηκαν ήταν 7,2 έτη (IQR 3.3-8.8) (Εικόνα 9.1).



Εικόνα 9.1 Καμπύλη εκτίμησης επιβίωσης με τη μέθοδο Kaplan Meier για τους 45 ασθενείς με ΠΜ

Οι άνδρες παρουσίασαν μικρότερη επιβίωση σε σχέση με τις γυναίκες αλλά η διαφορά δεν ήταν στατιστικώς σημαντική $p=0.67$ (Εικόνα 9.2)

Οι ασθενείς με οστική νόσο είχαν 5,1 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να καταλήξουν σε θάνατο σε σχέση με τους ασθενείς που δεν παρουσίαζαν οστική νόσο κατά τη διάγνωση ($HR= 5.1$, $p=0.128$) (Εικόνα 9.3).

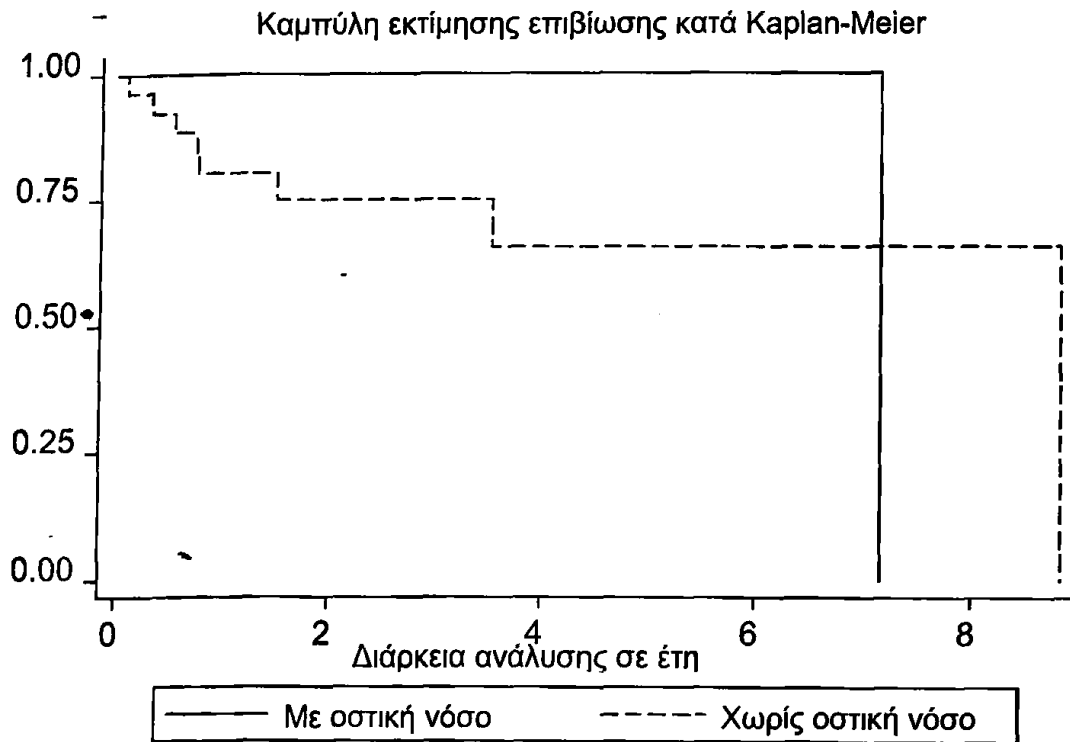


Εικόνα 9.2 Καμπύλη εκτίμησης επιβίωσης με τη μέθοδο Kaplan-Meier ανάλογα με το φύλο (Θ: θήλεα, A: αρρενες) σε 45 ασθενείς με ΠΜ

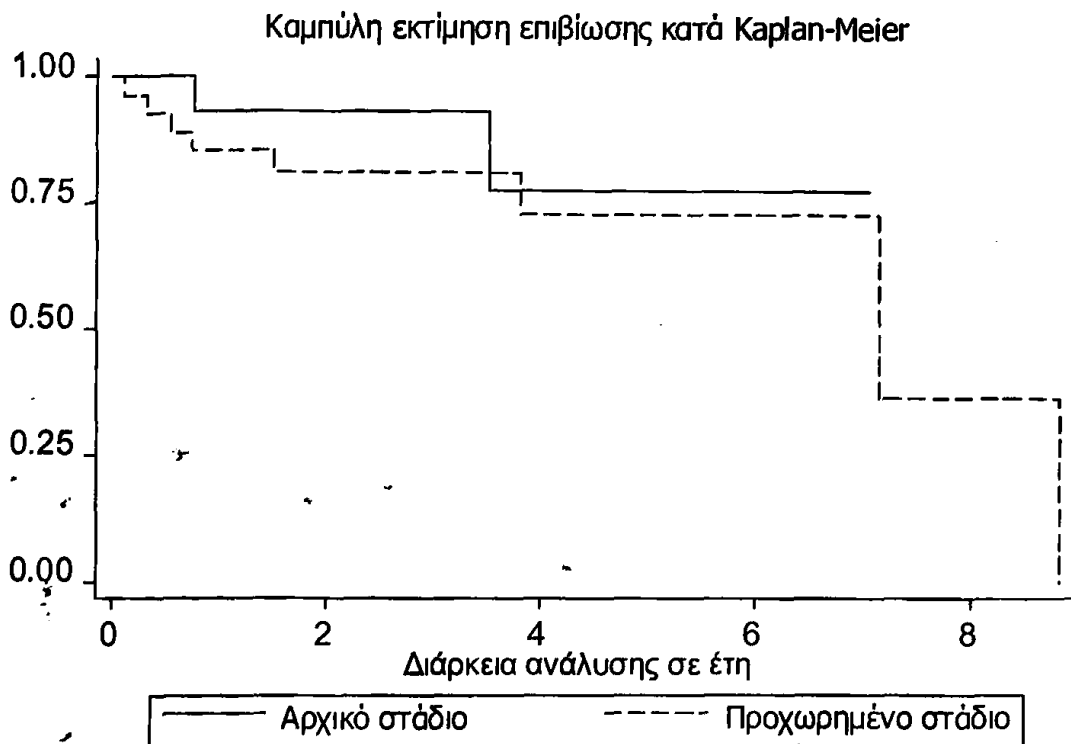
Ασθενείς με προχωρημένο στάδιο νόσου ($DS \geq II$) ήταν 1,6 φορές πιο πιθανό να καταλήξουν σε θάνατο σε σχέση με τους ασθενείς που κατά τη διάγνωση ήταν σε αρχικό στάδιο νόσου, αλλά αυτή η διαφορά δεν ήταν στατιστικώς σημαντική ($p=0.553$) (Εικόνα 9.4).

Ασθενείς με εξωμυελική νόσο εμφάνισαν 3,4 μεγαλύτερο κίνδυνο θανάτου σε σχέση με τους ασθενείς που δεν παρουσίαζαν εξωμυελική νόσο, αλλά το \tilde{p} δεν ήταν σε στατιστικώς σημαντικά επίπεδα ($p=0.087$) (Εικόνα 9.5).

Ασθενείς με σημαντική αναιμία κατά τη διάγνωση ($Hb < 10 \text{ mg/dl}$) είχαν επίσης αυξημένο κίνδυνο θανάτου ($HR=1.8$) σε σχέση με αυτούς που δεν ήταν αναιμικοί κατά τη διάγνωση ($p=0.355$) (Εικόνα 9.6).

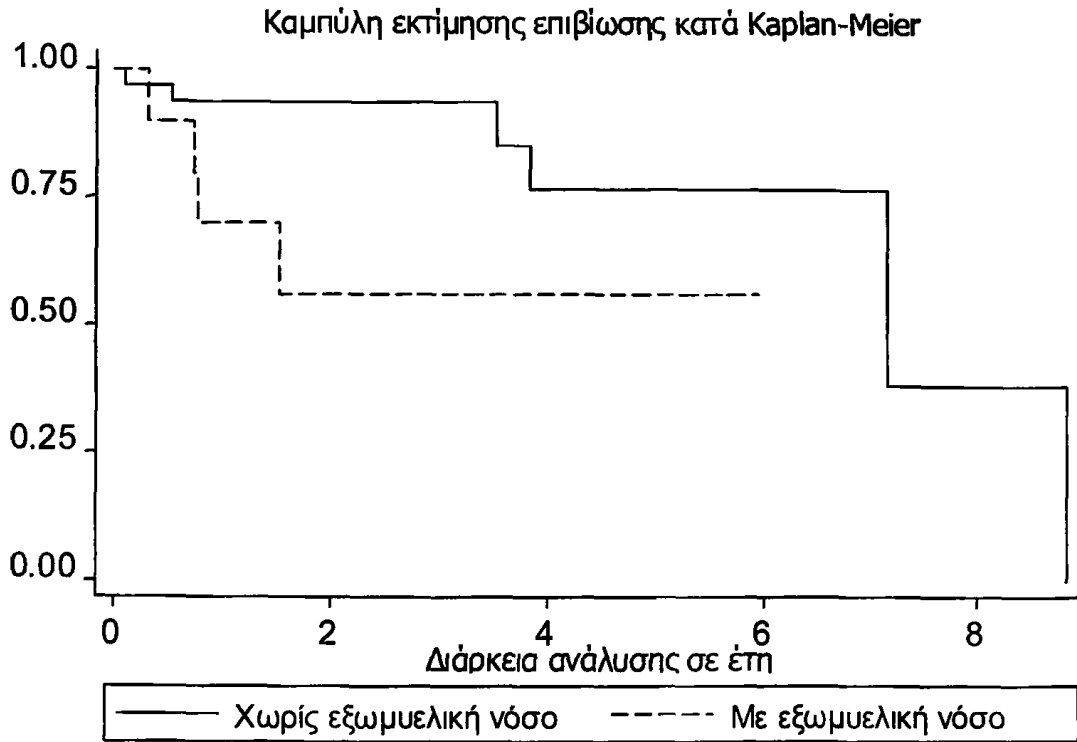


Εικόνα 9.3 Καμπύλη εκτίμησης επιβίωσης κατά Kaplan-Meier ανάλογα με τη παρουσία οστικής νόσου σε 45 ασθενείς με ΠΜ

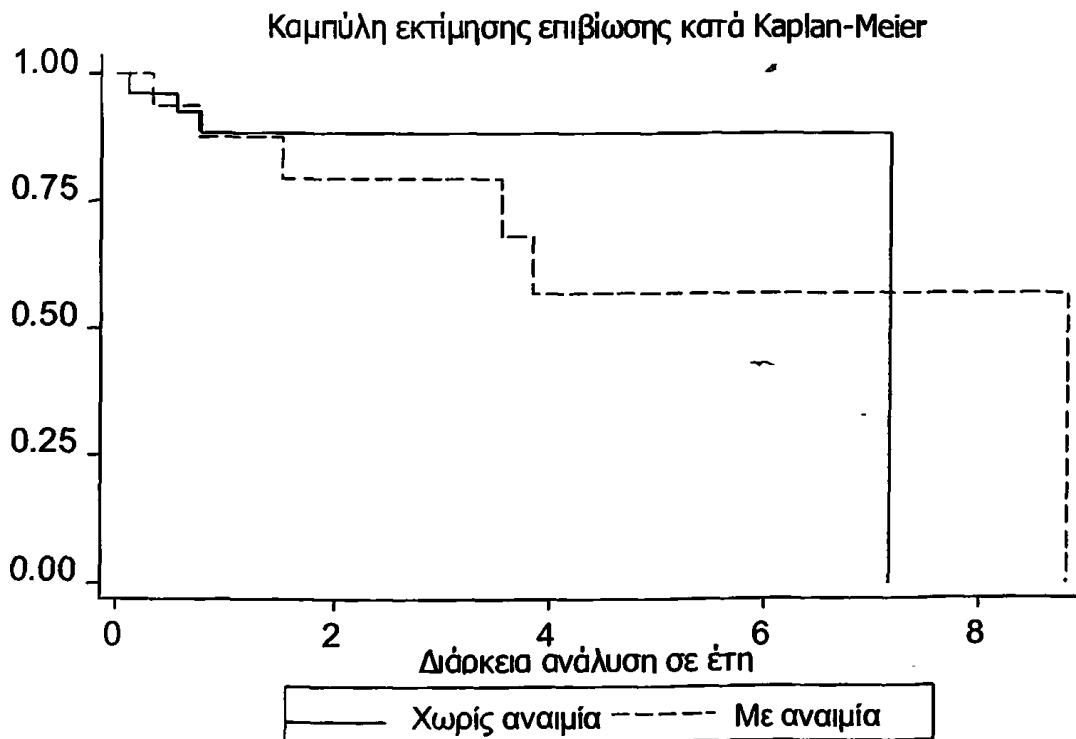


Εικόνα 9.4 Καμπύλη εκτίμησης επιβίωσης κατά Kaplan-Meier σε 45 ασθενείς ανάλογα με το στάδιο νόσου σε 45 ασθενείς με ΠΜ





Εικόνα 9.5 Καμπύλη εκτίμησης επιβίωσης κατά Kaplan-Meier ανάλογα με την παρουσία εξωμυελικής νόσου σε 45 ασθενείς με ΠΜ



Εικόνα 9.6 Καμπύλη εκτίμησης επιβίωσης κατά Kaplan-Meier ανάλογα με την παρουσία αναιμίας σε 45 ασθενείς με ΠΜ



9.2 Μελέτη της έκφρασης των κυκλινών σε ασθενείς με ΠΜ

Μελετήθηκε η έκφραση των κυκλινών D1, D2 και D3 σε 23 ασθενείς (11 άνδρες και 12 γυναίκες) με ΠΜ. Η μέση ηλικία αυτής της ομάδας των ασθενών ήταν 63 έτη. Η σταδιοποίηση των ασθενών κατά Durie και Salmon είχε ως εξής: έρπον μύελωμα 4 ασθενείς, στάδιο IA 3 ασθενείς, στάδιο IIA 4 ασθενείς, στάδιο IIIA 5 ασθενείς και σταδίου IIIB 7 ασθενείς. Η ταξινόμηση με το ISS είχε ως εξής: στάδιο I 7, στάδιο II 8 ασθενείς και στάδιο III 8 ασθενείς. Οστική νόσο παρουσίαζαν 15/23 ασθενείς, εξωμυελική νόσο παρουσίαζαν 6/23 ασθενείς ενώ σημαντική αναιμία ($Hb \leq 10 \text{ g/dl}$) είχαν 8/23 ασθενείς. Σ' αυτήν την ομάδα ασθενών η μέση τιμή Hb ήταν $10,8 \text{ g/dl}$, η μέση τιμή WBC ήταν $6,82 \times 10^9/l$, η μέση τιμή PLT ήταν $221 \times 10^9/l$, η μέση τιμή αλβουμίνης όρου $3,3 \text{ mg/dl}$ και η μέση τιμή $\beta_2 M$ ήταν 5626 mg/dl .

Κλασική κυτταρογενετική ανάλυση ήταν διαθέσιμη σε 13/23 ασθενείς. Εκτός από 3 ασθενείς που παρουσίασαν καρυότυπο 45, X,-Y, οι υπόλοιποι είχαν φυσιολογικό καρυότυπο.

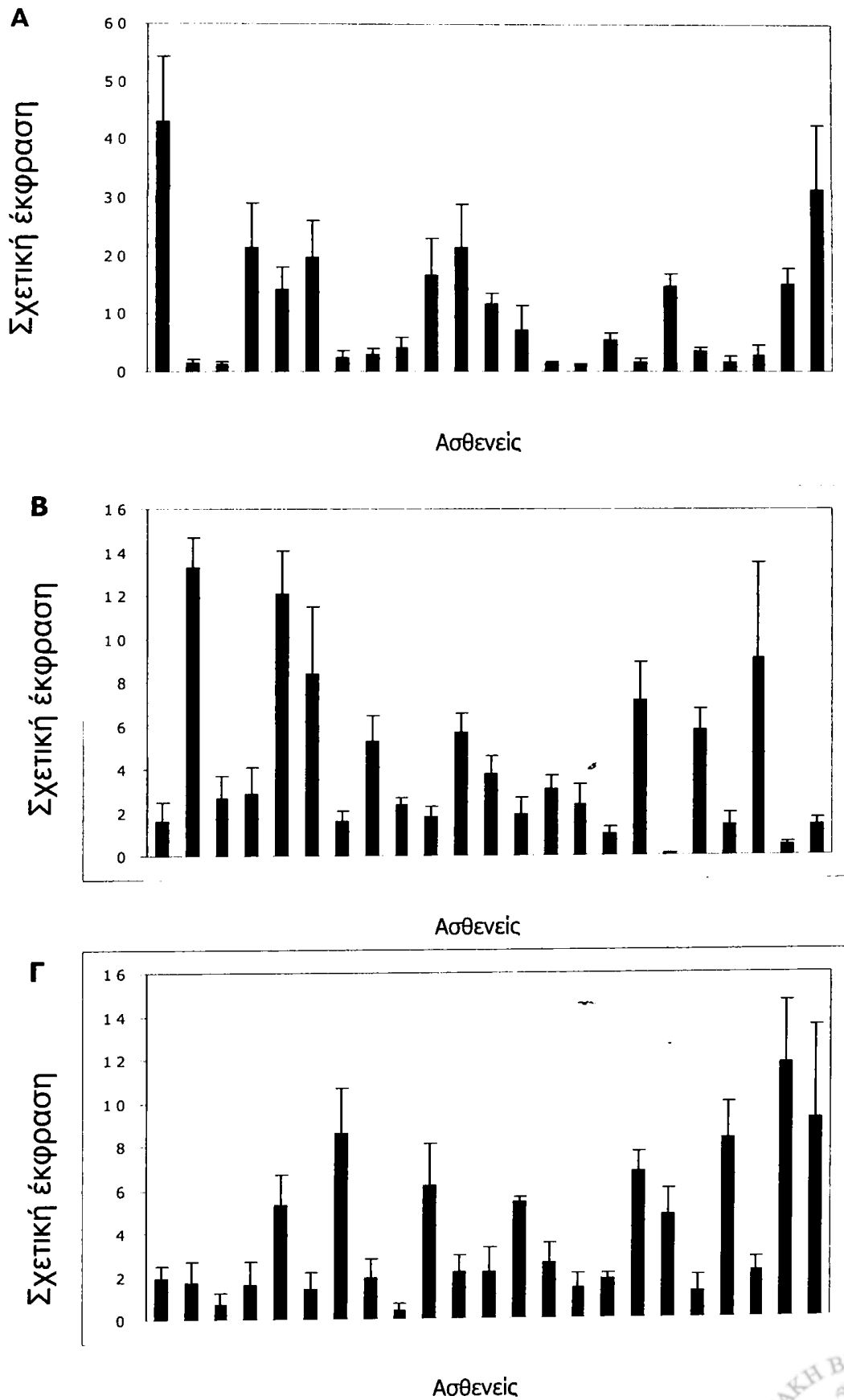
9.2.1 Συσχέτιση της έκφρασης των κυκλινών D1, D2 και D3 με κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους.

Η έκφραση των κυκλινών D1, D2 και D3 έγινε όπως αναφέρθηκε και παραπάνω με τη μέθοδο RT-PCR. Τα επίπεδα της κάθε κυκλίνης εκφράζονται σε σχέση με το δείγμα με τη χαμηλότερη έκφραση. Κάθε δείγμα ασθενούς μελετήθηκε τρεις φορές, οπότε και το τελικό σχετικό αποτέλεσμα είναι η μέση τιμή \pm τη σταθερά διακύμανσης (Εικόνα 9.7 A, B, C). Τα αποτελέσματα της έκφρασης της κυκλίνης D1 και D2 στους προαναφερθέντες 23 ασθενείς με ΠΜ αναγράφονται αναλυτικά στον Πίνακα 9.3, όπου φαίνεται επίσης το στάδιο νόσο και οι τιμές Hb, WBC και PLT για κάθε ασθενή.

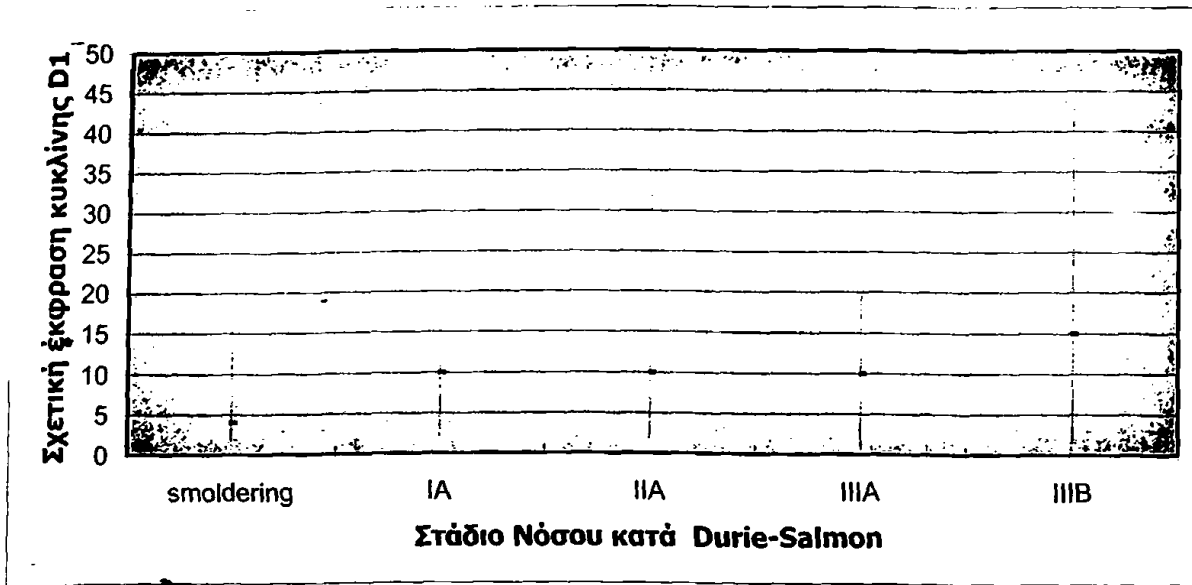
Η μέση τιμή της κυκλίνης D1 για τους ασθενείς που μελετήθηκαν ήταν $11,2 (\pm 11,4)$, ενώ η μέση τιμή της κυκλίνης D2 ήταν $4,2 (\pm 3,6)$. Οι τιμές της κυκλίνης D1 ήταν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερες σε σχέση με τις τιμές της κυκλίνης D2 ($p=0.01$) και τις τιμές της D3 ($p=0.004$).

Οι μέγιστες, ελάχιστες και μέσες τιμές των κυκλινών D1, D2 και D3 ανά στάδιο κατά Durie και Salmon φαίνονται στους πίνακες 9.8, 9.9, 9.10.

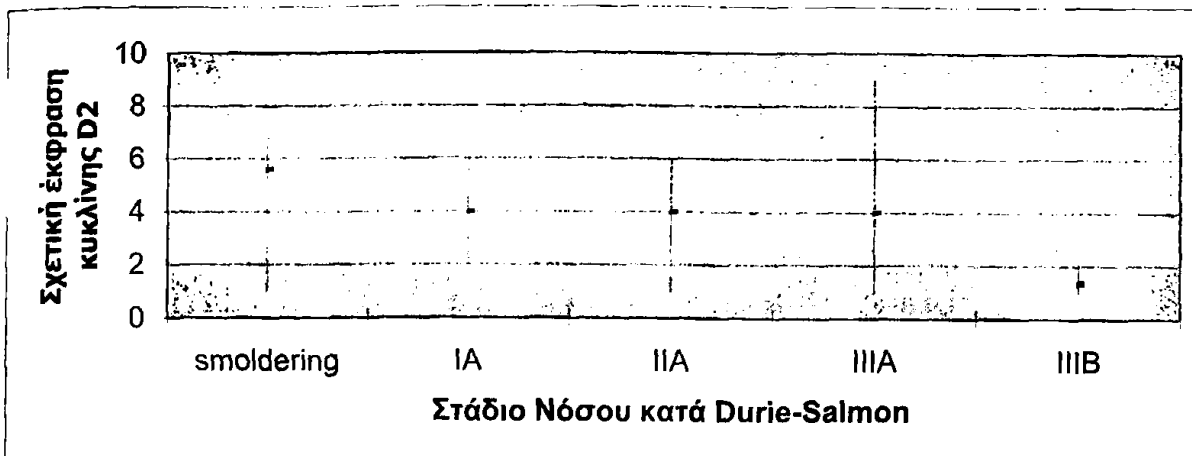




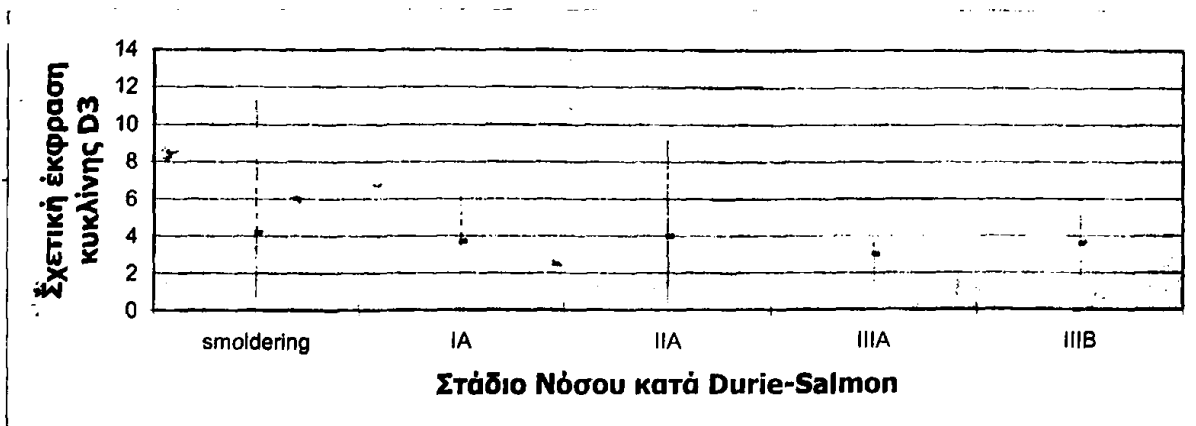
Εικόνα 9.7 Σχετική έκφραση της κυκλίνης D1 (A), της κυκλίνης D2 (B) και της κυκλίνης D3 (Γ) σε 23 ασθενείς με ΠΜ



Εικόνα 9.8 Εύρος και μέση τιμή σχετικής έκφρασης της κυκλίνης D1 ανά στάδιο κατά Durie και Salmon σε 23 ασθενείς με ΠΜ



Εικόνα 9.9 Εύρος και μέση τιμή σχετικής έκφρασης της κυκλίνης D2 ανά στάδιο κατά Durie και Salmon σε 23 ασθενείς με ΠΜ



Εικόνα 9.10 Εύρος και μέση τιμή σχετικής έκφρασης της κυκλίνης D3 ανά στάδιο κατά Durie και Salmon σε 23 ασθενείς με ΠΜ

Πίνακας 9.3 Αναγράφονται αναλυτικά οι μέσες τιμές σχετικής έκφρασης των κυκλινών D1 και D2, το στάδιο νόσου και οι κύριες αιματολογικές παράμετροι σε 23 ασθενείς με ΠΜ

Ασθ.	Έκφραση κυκλίνης D1 Mean (\pm SD)	Έκφραση κυκλίνης D2 Mean (\pm SD)	Έκφραση κυκλίνης D3 Mean (\pm SD)	Στάδιο Νόσου κατά Durie Salmon	Στάδιο Νόσου κατά ISS	Τιμή Hb (g/dl)	Τιμή WBC $\times 10^9/L$	Τιμή PLT $\times 10^9/L$
#1	2,9 (1,7)	9,1 (4,4)	2,2 (0,6)	III A	II	9,2	5,750	188
#2	21,4 (7,7)	2,9 (1,2)	1,6 (1,1)	III B	III	9,6	7,920	159
#3	3,1 (0,8)	5,3 (1,2)	1,9 (0,9)	III B	III	8	3,700	180
#4	3,6 (0,5)	5,8 (1,0)	1,2 (0,8)	II A	I	11,6	6,870	371
#5	1,5 (0,3)	3,1 (0,6)	2,6 (0,9)	I A	I	13,8	7,820	274
#6	43,1 (11,2)	1,6 (0,9)	1,9 (0,6)	III B	III	11,1	11,500	321
#7	4,2 (1,7)	2,4 (0,3)	0,4 (0,3)	II A	II	11,8	16,960	18
#8	15,2 (2,6)	0,5 (0,1)	11,8 (2,9)	έρπον	I	10,5	4,070	172
#9	1,8 (0,4)	7,2 (1,7)	6,8 (0,9)	έρπον	I	12,2	5,170	263
#10	1,5 (0,6)	13,3 (1,4)	0,4 (0,3)	III B	III	8,4	13,030	118
#11	19,8 (6,2)	8,4 (3,1)	1,7 (1)	III A	II	12,9	6,280	199
#12	7,2 (4,2)	1,9 (0,8)	8,3 (1,7)	έρπον	II	9,9	4,560	198
#13	1,3 (0,5)	2,7 (1,0)	1,4 (0,8)	έρπον		10,9	5,710	214
#14	1,7 (0,9)	1,4 (0,6)	5,4 (0,2)	II A	II	11,4	8,220	160
#15	14,8 (2,1)	0,1 (0)	0,7 (0,5)	III A	II	10,4	4,580	251
#16	21,5 (7,3)	5,7 (0,9)	2,2 (0,76)	I A	I	14	4,280	218
#17	1,1 (0,2)	2,4 (0,9)	1,4 (0,7)	III A	I	12,5	4,100	254
#18	16,7 (6,2)	1,8 (0,5)	6,2 (1,9)	I A	I	13,7	7,430	493
#19	14,3 (3,8)	12,1 (2,0)	5,3 (1,4)	III B	III	7,4	5,960	197
#20	31,6 (10,9)	1,4 (0,3)	8,6 (2,1)	II A	II	10,3	5,370	381
#21	5,6 (1,0)	1,0 (0,3)	2,2 (0,4)	III B	III	6,8	4,970	9
#22	2,5 (2,6)	1,6 (0,1)	1,2 (0,3)	III A	II	8,5	4,324	134
#23	11,8 (10,9)	3,8 (0,3)	4,7 (0,6)	III B	III	9,1	5,320	167

Mean (\pm SD) : Μέση τιμή (\pm Σταθερά διακύμανσης), ISS: International Scoring System, Hb=haemoglobin: αιμοσφαιρίνη, WBC=white blood cells: λευκά αιμοσφαίρια, PLT=Platelets: αιμοπετάλια



Ασθενείς με υψηλή έκφραση κυκλίνης D1 δεν είχαν μεγαλύτερη πιθανότητα να έχουν αναιμία σε σχέση με τους ασθενείς με χαμηλή έκφραση ($p=0.7$). Ασθενείς με υψηλή έκφραση κυκλίνης D1 είχαν τον ίδιο κίνδυνο να εμφανίσουν εξωμυελική νόσο ($OR=1$, $p=0.5$) και προχωρημένο στάδιο νόσου ($OR=1$, $p=0.68$) ενώ είχαν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης οστική νόσου ($OR=1.5$, $p=0.5$). Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στις τιμές της αλβουμίνης ορού ανάμεσα σε ασθενείς με υψηλή και χαμηλή έκφραση κυκλίνης D1 (μέση τιμή 3,34 g/dl και για τις δύο ομάδες, $p=0.9$). Ασθενείς με υψηλή έκφραση κυκλίνης D1 είχαν και υψηλότερες τιμές β2 μικροσφαιρίνης (6319,1 $\mu\text{g/l}$ έναντι 4862,9 $\mu\text{g/l}$, $p=0.5$).

Ασθενείς με υψηλή έκφραση κυκλίνης D2 είχαν μεγαλύτερο κίνδυνο να έχουν οστική νόσο ($OR=1.8$, $p=0.6$) και προχωρημένο στάδιο νόσου ($OR=1.8$, $p=0.57$), ενώ η υψηλή έκφραση δε συσχετίσθηκε με την εξωμυελική νόσο ή την αναιμία ($OR=0.5$, $p=0.6$ και $OR=0.3$, $p=0.3$ αντίστοιχα). Ασθενείς με χαμηλή έκφραση κυκλίνης D2 είχαν μέση τιμή αλβουμίνης ορού 3,37 g/dl ενώ ασθενείς με υψηλή έκφραση είχαν μέση τιμή αλβουμίνης ορού 3,26 g/dl. Η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικώς σημαντική ($p=0.66$). Η μέση τιμή β₂M για τους ασθενείς με υψηλή έκφραση ήταν 6362,8 $\mu\text{g/l}$ ενώ για τους ασθενείς με χαμηλή έκφραση ήταν 5172,0 $\mu\text{g/l}$ διαφορά στατιστικώς μη σημαντική ($p=0.62$).

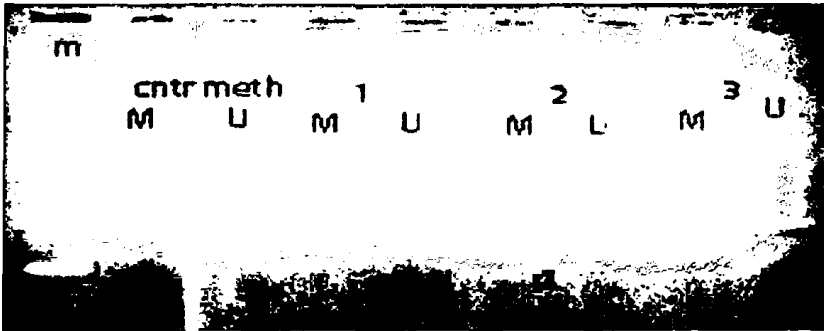
Ασθενείς με υψηλή έκφραση κυκλίνης D3 είχαν τριπλάσια πιθανότητα να ευρίσκονται σε προχωρημένο στάδιο της νόσου ($OR=3$, $p=0.3$). Η υψηλή έκφραση της κυκλίνης D3 δε συσχετίσθηκε ωστόσο με την οστική νόσο ($OR=0.7$, $p=1$), την εξωμυελική νόσο ($OR=0.75$, $p=1$) ή την αναιμία ($OR=1.8$, $p=0.65$). Ασθενείς με υψηλή έκφραση D3 είχαν μέση τιμή αλβουμίνης ορού 3,47 g/dl ($\pm 0,3$) ενώ ασθενείς με χαμηλή έκφραση είχαν μέση τιμή αλβουμίνης ορού 2,97 g/dl ($\pm 0,5$). Η διαφορά δεν ήταν στατιστικώς σημαντική ($p=0.2$). Επίσης η μέση τιμή β₂M των ασθενών με υψηλή έκφραση ήταν 6170 $\mu\text{g/l}$ (± 3543) ενώ για τους ασθενείς με χαμηλή έκφραση ήταν 3,968 $\mu\text{g/l}$ (± 2381) διαφορά στατιστικώς μη σημαντική ($p=0.35$).



9.3 Μελέτη της μεθυλίωσης του υποκινητή του p57 σε ασθενείς με μονοκλωνικές γαμμαπάθειες

Η κατάσταση μεθυλίωσης του υποκινητή του p57 μελετήθηκε σε 45 ασθενείς με ΠΜ, 3 με ΜΓΑΣ και 4 με ΜW.

Μεθυλίωση του υποκινητή του p57 δεν παρατηρήθηκε στα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Όλα τα δείγματα ασθενών που μελετήθηκαν δεν έδειξαν μπάντα που να αντιστοιχεί στο μεθυλιωμένο αλληλίο του p57 (Εικόνα 9.11), ενώ η μπάντα που αντιστοιχούσε στο μη μεθυλιωμένο αλληλίο ήταν καθαρά ορατή σε όλους (257). Το ολικά μεθυλιωμένο DNA που χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας σε κάθε ζεύγος αντιδράσεων ήταν πάντα θετικό.



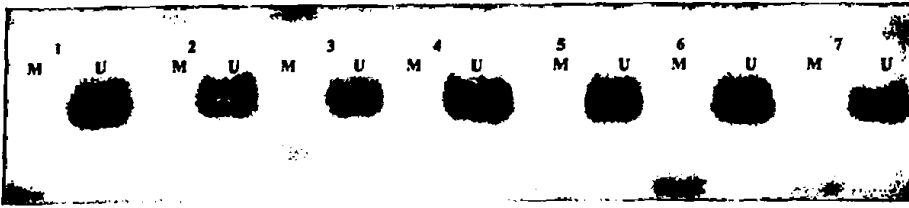
Εικόνα 9.11. Παρατήρηση των προϊόντων αντίδρασης PCR για τη κατάσταση μεθυλίωσης του γονιδίου CDKN1C από 3 ασθενείς (# 1, 2, 3) με ΠΜ μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 2,5%. Χρησιμοποιήθηκαν ζεύγη εκκινητών ειδικά σχεδιασμένων για την περίπτωση που η περιοχή είναι μεθυλιωμένη (M) και για την περίπτωση που δεν είναι μεθυλιωμένη (U). Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκε ολικά μεθυλιωμένο DNA το οποίο λειτουργούσε ως θετικός μάρτυρας (cntr meth). Και οι 3 ασθενείς βρέθηκαν μη μεθυλιωμένοι. (m: 100 bp ladder)

9.4 Μελέτη της μεθυλίωσης του υποκινητή του TP73 σε ασθενείς με μονοκλωνικές γαμμαπάθειες

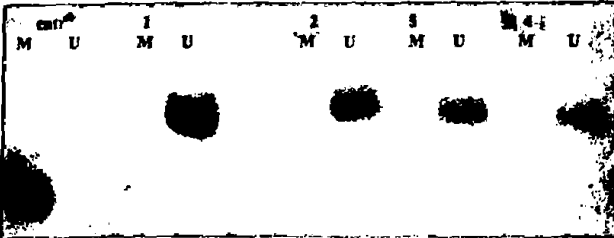
Η κατάσταση μεθυλίωσης του υποκινητή του TP73 μελετήθηκε σε 45 ασθενείς με ΠΜ, 3 με ΜΓΑΣ και 4 με ΜW. Μεθυλίωση του υποκινητή του TP73 δεν παρατηρήθηκε στα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Όλα τα δείγματα ασθενών, εκτός από 1, που μελετήθηκαν δεν έδειξαν μπάντα που να αντιστοιχεί στο μεθυλιωμένο αλληλίο του TP73, ενώ η μπάντα που αντιστοιχούσε στο μη μεθυλιωμένο αλληλίο ήταν καθαρά ορατή σε όλους. Το ολικά μεθυλιωμένο DNA που χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας σε κάθε ζεύγος αντιδράσεων ήταν πάντα θετικό (Εικόνα 9.12).



A.



B.

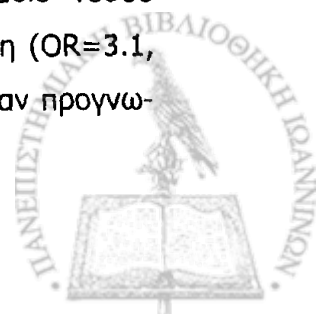


Εικόνα 9.12 Παρατήρηση των προϊόντων αντίδρασης PCR για τη κατάσταση μεθυλίωσης του γονιδίου TP73 από 7 ασθενείς με ΠΜ (A # 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7,) και από 3 ασθενείς (B # 1, 2, 3) με MW μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 14%. Χρησιμοποιήθηκαν ζεύγη εκκινητών ειδικά σχεδιασμένων για την περίπτωση που η περιοχή είναι μεθυλιωμένη (M) και για την περίπτωση που δεν είναι μεθυλιωμένη (U). Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκε ολικά μεθυλιωμένο DNA το οποίο λειτουργούσε ως θετικός μάρτυρας (B: cptr meth). Όλοι οι ασθενείς βρέθηκαν μη μεθυλιωμένοι. Το μεθυλιωμένο προϊόν της αντίδρασης ήταν 60 bp και το μη μεθυλιωμένο 69 bp.

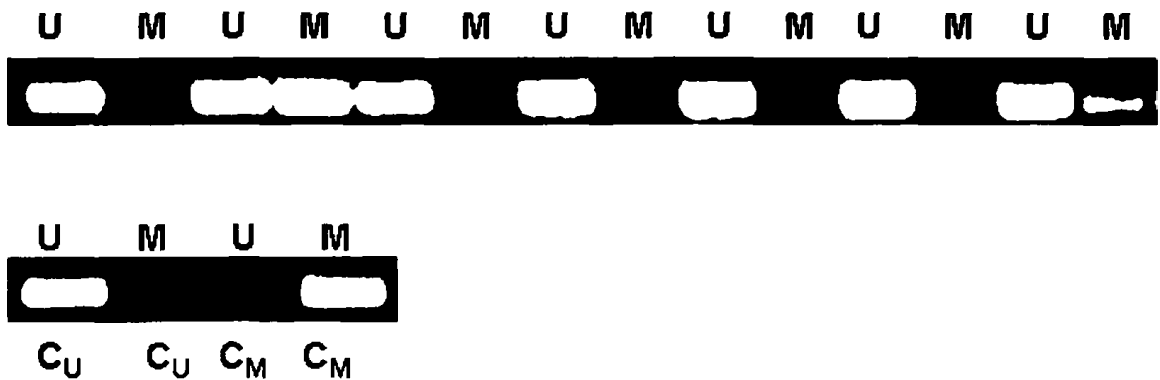
9.5 Μελέτη της μεθυλίωσης του υποκινητή του CDKN2B (p15INK4B) σε ασθενείς με μονοκλωνικές γαμμαπάθειες και συσχέτιση με κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους

Η κατάσταση μεθυλίωσης του CDKN2B μελετήθηκε σε 45 ασθενείς με ΠΜ, 3 ασθενείς με ΜΓΑΣ και 4 με MW. Μεθυλίωση του υποκινητή του CDKN2B παρατηρήθηκε σε 13/45 ασθενείς με ΠΜ (28,8%), 2 ασθενείς με WM και σε κανένα ασθενή με ΜΓΑΣ, ενώ δεν παρατηρήθηκε σε κανένα από τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Το ολικά μεθυλιωμένο DNA που χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας σε κάθε ζεύγος αντιδράσεων ήταν πάντα θετικό (Εικόνα 9.13).

Οι ασθενείς με μεθυλιωμένο τον υποκινητή του CDKN2B είχαν διάμεση επιβίωση 7,5 έτη ενώ οι ασθενείς με μη μεθυλιωμένο το γονίδιο είχαν διάμεση επιβίωση 8,8 έτη. Οι ασθενείς με μεθυλιωμένο το CDKN2B (p15INK4B) ήταν 2,1 φορές πιο πιθανό να καταλήξουν σε θάνατο (HR=2.1, p=0.04), ήταν 2,5 φορές πιο πιθανό να έχουν προχωρημένο στάδιο νόσου (OR=2.5, p=0.04) και 3,1 φορές πιο πιθανό να έχουν αναιμία κατά τη διάγνωση (OR=3.1, p=0,03). Αντίθετα, η μεθυλίωση του υποκινητή του CDKN2B (p16INK2B) δεν ήταν προγνω-

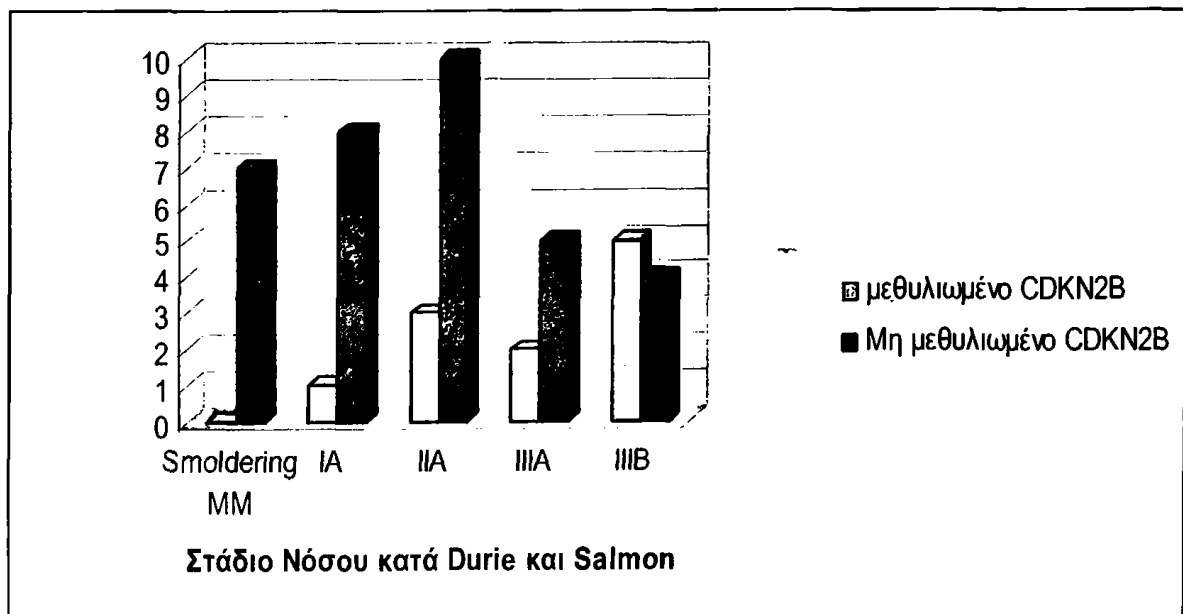


στικός δείκτης ανάπτυξης οστικής (OR=0.95, $p=0.3$) ή εξωμυελικής νόσου (OR=0.78, $p=0.7$). Η κατάσταση μεθυλίωσης του CDKN2B (p15INK4B) ανάλογα με το στάδιο νόσου κατά Durie-Slamon σε ασθενείς με ΠΜ φαίνεται στην εικόνα 9.14.



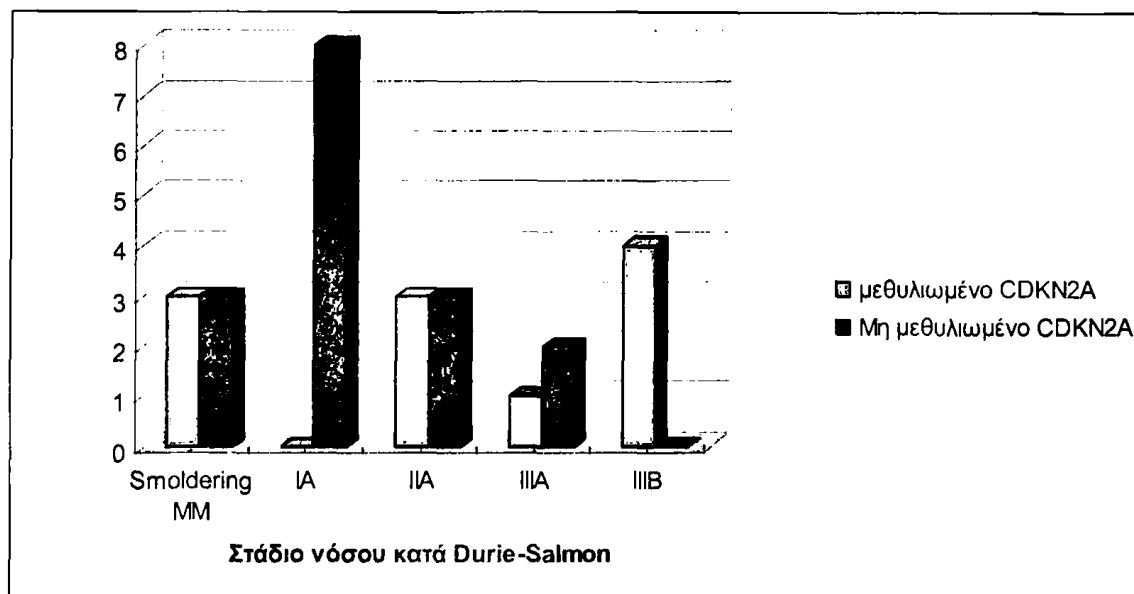
Εικόνα 9.13. Παρατήρηση των προϊόντων αντίδρασης PCR για τη κατάσταση μεθυλίωσης του γονιδίου CDKN2B από 7 ασθενείς με ΠΜ μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 2,5%. Χρησιμοποιήθηκαν ζεύγη εκκινητών ειδικά σχεδιασμένων για την περίπτωση που η περιοχή είναι μεθυλιωμένη (M) και για την περίπτωση που δεν είναι μεθυλιωμένη (U). Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκε ολικά μεθυλιωμένο DNA το οποίο λειτουργούσε ως θετικός μάρτυρας (C_M).

Δε βρέθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ της κατάστασης μεθυλίωσης του CDKN2B και των επιπέδων της β₂M ($p=0.48$) ή της αλβουμίνης του ορού ($p=0.46$).



Εικόνα 9.14 Κατάσταση μεθυλίωσης του CDKN2B ανάλογα με το στάδιο της νόσου κατά Durie- Salmon σε ασθενείς με ΠΜ

προγνωστικός δείκτης της ανάπτυξης οστικής (OR=0.55, $p=0.3$) ή εξωμυελικής νόσου (OR=0.88, $p=0.8$). Δε βρέθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ της κατάστασης μεθυλίωσης του p16 και των επιπέδων της β2 μικροσφαιρίνης ($p=0.58$) ή της αλβουμίνης του ορού ($p=0.26$). Στην εικόνα 9.16 φαίνεται σχηματικά η μεθυλίωση του CDKN2A (p16INK4A) ανάλογα με το στάδιο νόσου κατά Durie και Salmon σε ασθενείς με ΠΜ.

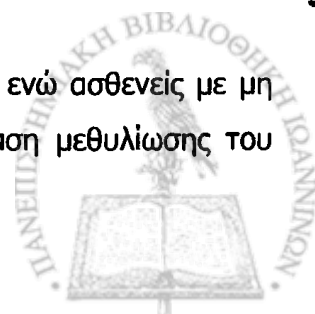


Εικόνα 9.16 Κατάσταση μεθυλίωσης του CDKN2A ανάλογα με το στάδιο της νόσου κατά Durie-Salmon σε ασθενείς με Πολλαπλό Μυέλωμα

9.7 Μελέτη της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου του Snk/Plk2 σε ασθενείς με μονοκλωνικές γαμμαπάθειες και συσχέτιση με κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους

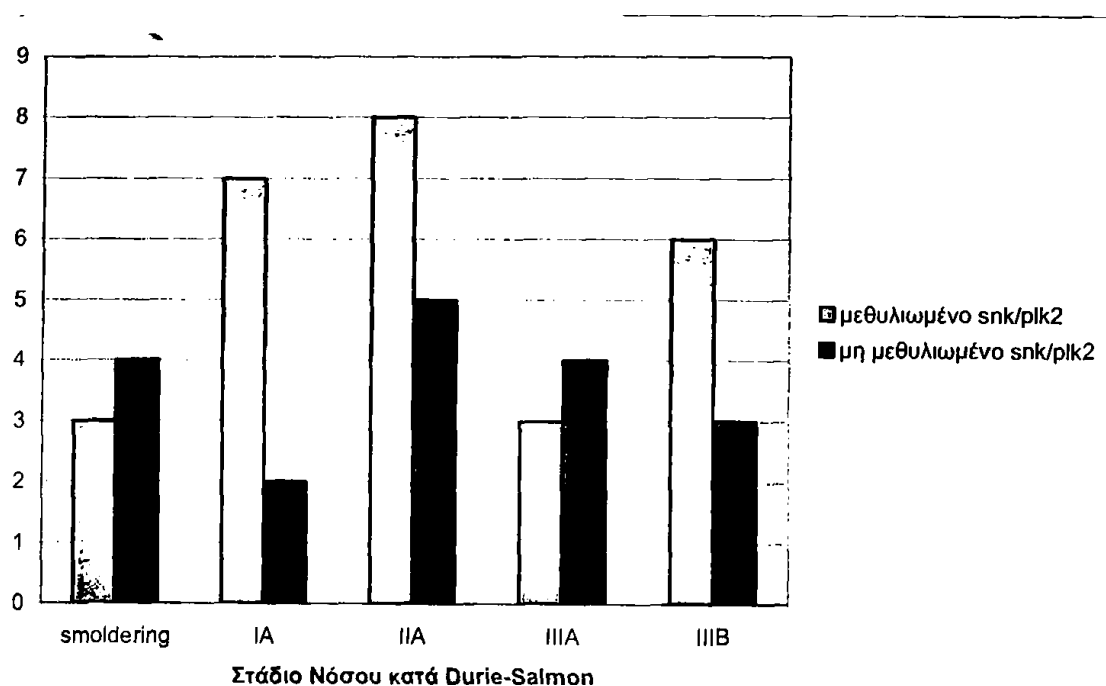
Η κατάσταση μεθυλίωσης του Snk/plk2 μελετήθηκε σε 45 ασθενείς με ΠΜ, 3 ασθενείς με ΜΓΑΣ και 4 με ΜW. Ο υποκινητής του γονιδίου Snk/Plk2 βρέθηκε μεθυλωμένος σε 27/45 ασθενείς (60%) με ΠΜ, σε 3/4 ασθενείς με ΜW (75%) αλλά σε κανένα ασθενή με ΜΓΑΣ. Δεν παρατηρήθηκε μεθυλίωση του γονιδίου σε κανέναν από τους μάρτυρες, ενώ το ολικά μεθυλωμένο DNA που χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας σε κάθε ζεύγος αντιδράσεων ήταν πάντα θετικό.

Ασθενείς με μεθυλωμένο το Snk/plk2 είχαν διάμεση επιβίωση 7,1 έτη, ενώ ασθενείς με μη μεθυλωμένο το Snk/plk2 είχαν διάμεση επιβίωση 8,8 έτη. Η κατάσταση μεθυλίωσης του



Snk/plk2 δεν ήταν προγνωστικός δείκτης της συνολικής επιβίωσης (HR=0.6, $p=0.5$). Επίσης δε βρέθηκε συσχέτιση με την οστική νόσο (OR=0.56, $p=0.3$), την εξωμυελική νόσο (OR=0.3, $p=0.1$), την αναιμία (OR=0.5, $p=0.3$) ή το προχωρημένο στάδιο νόσου (OR=0.8, $p=0.7$).

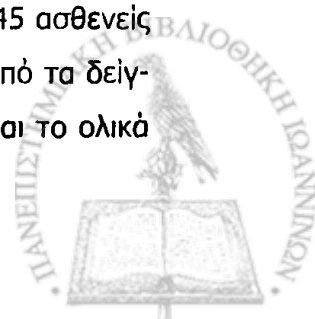
Όσον αφορά τις βιοχημικές παραμέτρους δε βρέθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ της κατάστασης μεθυλίωσης του γονιδίου και των τιμών της β_2M του ορού ($p=0.8$) και της αλβουμίνης του ορού ($p=0.3$). Στην εικόνα 9.17 φαίνεται η μεθυλίωση του Snk/Plk2 ανάλογα με το στάδιο νόσου κατά Durie και Salmon σε ασθενείς με ΠΜ.



Εικόνα 9.17 Κατάσταση μεθυλίωσης του snk/plk2 ανάλογα με το στάδιο της νόσου κατά Durie-Salmon σε ασθενείς με ΠΜ

9.8 Μελέτη της μεθυλίωσης του υποκινητή του VHL σε ασθενείς με μονοκλωνικές γαμμαπάθειες και συσχέτιση με κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους

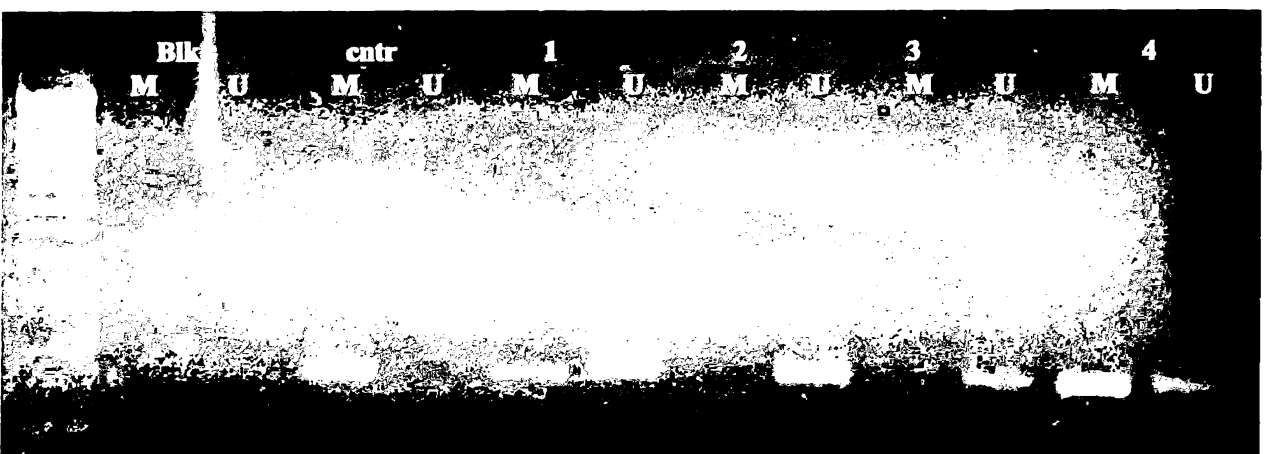
Η κατάσταση μεθυλίωσης του VHL μελετήθηκε σε 45 ασθενείς με ΠΜ, 3 ασθενείς με ΜΓΑΣ και 4 με ΜW. Μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου VHL παρατηρήθηκε σε 15/45 ασθενείς με ΠΜ (33,3%) κατά τη διάγνωση και σε 4/4 ασθενείς με ΜW (100%). Κανένα από τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες δεν παρουσίασε μεθυλίωση του VHL και το ολικό



μεθυλιωμένο DNA που χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας σε κάθε ζεύγος αντιδράσεων ήταν πάντα θετικό (Εικόνα 9.18).

Ιδιαίτερα ενδιαφέρον εύρημα ήταν ότι 3 ασθενείς που δεν ήταν μεθυλιωμένοι για το συγκεκριμένο γονίδιο κατά τη διάγνωση, βρέθηκαν μεθυλιωμένοι κατά την πρόοδο νόσου που και στους 3 ασθενείς χαρακτηριζόταν από βαριά οστική και εξωμυελική νόσο.

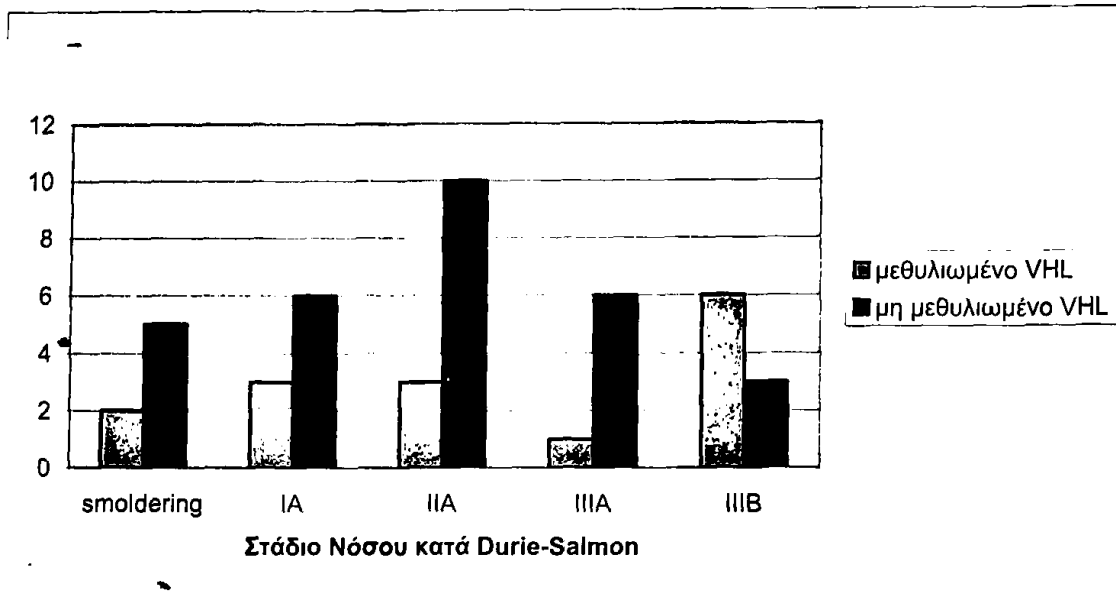
Η διάμεση επιβίωση των ασθενών που βρέθηκαν μεθυλιωμένοι ήταν 7,1 έτη, ενώ για τους ασθενείς που δεν ήταν μεθυλιωμένοι 8,8 έτη. Οι ασθενείς με μεθυλιωμένο υποκινητή του VHL ήταν 1,3 φορές πιο πιθανό να καταλήξουν σε σχέση με τους ασθενείς με μη μεθυλιωμένο τον υποκινητή ($p=0.6$). Οι ασθενείς με μεθυλιωμένο τον υποκινητή του VHL ήταν 7,5 φορές πιο πιθανό να έχουν οστική νόσο, διαφορά στατιστικώς σημαντική ($p=0.018$), 2 φορές πιο πιθανό να έχουν αναιμία ($OR=2.0$, $p=0.2$), 2,3 φορές πιο πιθανό να έχουν εξωμυελική νόσο ($OR=2.3$, $p=0.228$), ενώ δεν είχαν πιο αυξημένο κίνδυνο να έχουν προχωρημένο στάδιο νόσου ($OR=1.1$, $p=0.82$) (Εικόνα 9.19).



Εικόνα 9.18 Παρατήρηση των προϊόντων αντίδρασης PCR για τη κατάσταση μεθυλίωσης του γονιδίου VHL από 4 ασθενείς (# 1, 2, 3, 4,) με ΠΜ μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 2,5%. Χρησιμοποιήθηκαν ζεύγη εκκινητών ειδικά σχεδιασμένων για την περίπτωση που η περιοχή είναι μεθυλιωμένη (M) και για την περίπτωση που δεν είναι μεθυλιωμένη (U). Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκε ολικά μεθυλιωμένο DNA το οποίο λειτουργούσε ως θετικός μάρτυρας (cntr meth). Και οι ασθενείς #1 και #4 βρέθηκαν μεθυλιωμένοι.

Δε βρέθηκε στατιστικώς σημαντική σχέση με τα επίπεδα $\beta 2 M$ ($p=0.56$) ορού ή της αλβουμίνης ορού ($p=0.46$).





Εικόνα 9.19 Κατάσταση μεθυλίωσης του VHL ανάλογα με το στάδιο της νόσου κατά Durie- Salmon σε ασθενείς με ΠΜ

9.9 Μελέτη συσχέτισης μεταξύ των γονιδίων

Το Pearson's χ^2 test χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο συσχέτισης μεταξύ των γονιδίων, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 8.4. Δε βρέθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση ($p=0.4$). Ωστόσο, ασθενείς με μεθυλιωμένο το VHL ήταν 1,5 φορές πιο πιθανό να έχουν μεθυλιωμένο και το p16 ($p=0.4$).

	VHL	P16	Snk/plk2	P15
VHL	1.0			
P16	0.09666	1.0		
Snk/plk2	-0,0366	0.1021	1.0	
P15	0.085	0.09	0.3	1.0

Pearson $\chi^2(1) = 0.4958$ Pr = 0.481

Πίνακας 8.4 Συσχέτιση των γονιδίων που βρέθηκαν μεθυλιωμένα σε ασθενείς με ΠΜ (Pearson χ^2 test, $p=0.4$)



10. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

10.1 Μελέτη της έκφρασης και της κλινικής σημασίας των κυκλινών τύπου D σε ασθενείς με ΠΜ

Τα μυελωματικά κύτταρα σπάνια πολλαπλασιάζονται. Έτσι, η άθροισή τους στο μυελό των οστών οφείλεται κυρίως σε διαταραχές απόπτωσης. Τα μυελωματικά κύτταρα πιστεύεται ότι αποτελούν το κακόηθες ομόλογο των πλασματοκυττάρων επειδή η έκκριση ανοσοσφαιρίνης είναι ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό αυτής της κακοήθειας. Η ικανότητα για έκκριση ανοσοσφαιρίνης βέβαια, ποικίλει από ασθενή σε ασθενή, και ορισμένα μυελωματικά κύτταρα μοιάζουν με άωρα πλασματοκύτταρα. Μέσα στον πληθυσμό των μυελωματικών κυττάρων στο μυελό των οστών, έχει βρεθεί ότι ένα μικρό ποσοστό των κυττάρων μπορεί να αυτοανανεώνεται και να διαφοροποιείται προς πλασματοκύτταρο. Αυτά τα κύτταρα έχει προταθεί ότι αποτελούν τα προγονικά μυελωματικά κύτταρα. Η ικανότητα τους να πολλαπλασιάζονται υποδηλώνει ότι βρίσκονται υπό τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και διαταραχές του ελέγχου του κυτταρικού κύκλου μπορεί να οδηγήσουν σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό τους.

Οι πρώτες μελέτες που ανέφεραν υπερέκφραση των κυκλινών, και πιο συγκεκριμένα της κυκλίνης D1, ήταν στις αρχές της δεκαετίας του '90 και αφορούσαν κυρίως Β λεμφοκυτταρικές υπερπλασίες. Η πρώτη αναφορά υπερέκφρασης της κυκλίνης D1 στο ΠΜ, έγινε από τον Kobayashi και συν, το 1995 σε ένα ασθενή που είχε τη μετάθεση t(11;14)(q13;q32) (259). Μελέτες που ακολούθησαν συσχέτισαν την υπερέκφραση των κυκλινών της οικογένεια D με την παθογένεια του ΠΜ (260-262). Φάνηκε επίσης, ότι διαταραχές της έκφρασης των κυκλινών D μπορεί να οφείλονται σε μεταθέσεις που συμβαίνουν στην περιοχή της βαριάς αλυσίδας (IgH) ή να συμβαίνουν ανεξάρτητα από αυτές (263).

Στην παρούσα διατριβή, παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση των κυκλινών τύπου D σε ασθενείς με ΠΜ. Η έκφραση της κυκλίνης D1 ήταν υψηλότερη σε σχέση με την έκφραση της κυκλίνης D2, και στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη από την κυκλίνη D3, εύρημα που έχει επιβεβαιωθεί και από άλλες μελέτες. Αν και οι ασθενείς με αυξημένη έκφραση κυκλίνης D1 είχαν την τάση να έχουν υψηλότερες τιμές β_2M -η οποία φαίνεται να αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα κινδύνου- και να εμφανίζουν οστική νόσο, δε βρέθηκε διαφορά όσον αφορά το στάδιο της νόσου και τη συνολική επιβίωση. Όσον αφορά την έκφραση της κυκλίνης D2, παρατηρήθηκε ότι ασθενείς με αυξημένη έκφραση της κυκλίνης D2 είχαν την τάση



να έχουν προχωρημένο στάδιο νόσου και οστική νόσο. Ασθενείς με υψηλή έκφραση D3 είχαν την τάση να έχουν πιο προχωρημένο στάδιο νόσου. Παρόλο που η αυξημένη έκφραση 2 από τις 3 κυκλίνες παρατηρήθηκε κυρίως σε ασθενείς με προχωρημένο στάδιο νόσου, δεν παρατηρήσαμε διαφορά ως προς τη συνολική επιβίωση.

Αν και αρχικά η υπερέκφραση των κυκλινών, ιδιαίτερα τύπου D, είχε συσχετισθεί με δυσμενή πρόγνωση, με το πέρασμα του χρόνου και την πιο λεπτομερή γονιδιακή και μοριακή μελέτη των ασθενών αναγνωρίστηκαν υπο-ομάδες ασθενών με αυξημένη έκφραση κυκλινών και ευνοϊκή πρόγνωση. Επιπλέον, παραδόξως η υπερέκφραση των κυκλινών D δεν έχει συσχετισθεί με αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των μυελωματικών κυττάρων.

Αρχικές μελέτες είχαν δείξει ότι η ενίσχυση του γονιδίου της κυκλίνης D1 ή η παρουσία της μετάθεσης t(11;14) συνιστούσαν δυσμενείς προγνωστικούς παράγοντες (264,265). Άλλες μελέτες έδειξαν ότι η μετάθεση t(11;14) δεν έχει σχέση με την επιβίωση ή την απόκριση στη θεραπεία (266,267). Πρόσφατα η παρουσία της κυκλίνης D1 βρέθηκε να είναι ευνοϊκός προγνωστικός παράγοντας (268). Συγκεκριμένα, σε ασθενείς με ΠΜ και μετάθεση t(11;14) ή τρισωμία 11 (με επακόλουθη υπερέκφραση της κυκλίνης D1 και στις δύο περιπτώσεις) παρατηρήθηκε καλύτερη συνολική επιβίωση, καλύτερη απόκριση στην εντατική χημειοθεραπεία και μεγαλύτερη διάρκεια ύφεσης μετά από αυτόλογη μεταμόσχευση (198,269,270). Αυτές οι παρατηρήσεις βρίσκονται σε καλή συσχέτιση με το γεγονός ότι μυελωματικά κύτταρα που εκφράζουν την κυκλίνη D1 έχουν χαμηλότερο δείκτη πολλαπλασιασμού. Έτσι, η υπόθεση ότι η υπερέκφραση της κυκλίνης D1 οδηγεί σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των πλασματοκυττάρων δεν υποστηρίζεται από τα προαναφερθέντα κλινικά ευρήματα. Αυτή η φανερή ασυμφωνία μεταξύ του υποτιθέμενου ρόλου της κυκλίνης D1 στην ευόδωση του πολλαπλασιασμού και της μη-διαιρετικής κατάστασης των μυελωματικών κυττάρων που εκφράζουν την κυκλίνη D1, έχει ενισχυθεί από πρόσφατες μελέτες σε ασθενείς με ΜΓΑΣ και συστηματική αμυλοειδωση από ελαφρές αλύσους (AL). Αν και τα μυελωματικά κύτταρα είναι κύτταρα με χαμηλό δείκτη πολλαπλασιασμού, το ποσοστό της φάσης S είναι υψηλότερο από αυτό των φυσιολογικών πλασματοκυττάρων (271). Αντίθετα, σε ασθενείς με ΜΓΑΣ και AL, το ποσοστό των παθολογικών πλασματοκυττάρων που βρίσκονται στη φάση S είναι συγκρίσιμο με αυτό των φυσιολογικών πλασματοκυττάρων, και οι μεταθέσεις της περιοχής IgH είναι συχνές, ιδιαίτερα οι t(11;14)(q13;32).



Όσον αφορά την κυκλίνη D2, η προγνωστική και κλινική της αξία δεν έχει πλήρως διευκρινισθεί. Υψηλή της έκφραση έχει συσχετισθεί με δυσμενή πρόγνωση μόνο σε ασθενείς που ταυτόχρονα υπερέκφραζουν ένα από τα γονίδια c-MAF, FGFR3/MMSET ή MAFB.

Αν και η κυκλίνη D1 θεωρείται ως πρωτο-ογκογονίδιο (272), ενδείξεις υπάρχουν ότι δεν είναι ογκογενετικό γονίδιο per se σε Β λεμφοκύτταρα in vivo. Μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια κυκλίνης D1 (Em-cyclin D1) έδειξαν σχεδόν καμία αλλαγή της υπερπλαστικής ικανότητας των Β λεμφοκυττάρων του μυελού των οστών και κανένα από δεν εμφάνισε Β λεμφοειδείς νεοπλασίες (273). Ωστόσο η κυκλίνη D1 μπορεί σε συνεργασία με άλλα ογκογονίδια να οδηγεί σε ανάπτυξη λεμφοειδούς ή άλλης υπερπλασίας (274). Είναι επίσης πιθανό, η υπερέκφραση της κυκλίνης D1 από μόνη της, χωρίς αντίστοιχη αύξηση των CDK4 και CDK6 να είναι ανεπαρκής για την ευόδωση του κυτταρικού κύκλου.

Συνοψίζοντας, όσον αφορά στις κυκλίνες, στην παρούσα διατριβή, επιβεβαιώσαμε την αυξημένη έκφραση των κυκλινών τύπου D σε ασθενείς με ΠΜ και δείξαμε ότι ασθενείς με υψηλή έκφραση κυκλίνης D2 και D3 είχαν την τάση να έχουν πιο προχωρημένο στάδιο νόσου. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μας ανέδειξε ενδιαφέρουσες τάσεις χωρίς όμως να τεκμηριωθεί ότι υπάρχει ιδιαίτερη προγνωστική αξία για κάποια από τις κυκλίνες τύπου D. Έτσι, τόσο από τα δικά μας αποτελέσματα όσο και από τις προαναφερθείσες μελέτες, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι οι κυκλίνες τύπου D δεν είναι από μόνες τους ισχυρά ογκογονίδια, αλλά απαιτούν την παρουσία και άλλων ογκογονιδίων για να οδηγήσουν σε υπερπλασία της Β σειράς. Ο καθορισμός της προγνωστικής τους αξίας απαιτεί και άλλες μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών, αφού πολλά από τα μέχρι τώρα κλινικά αποτελέσματα είναι αντιφατικά, όπως έχει προαναφερθεί.

10.2 Μελέτη της μεθυλίωσης γονιδίων ρυθμιστικών του κυτταρικού κύκλου

Η αδρανοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων στην νεοπλασία συχνά συμβαίνει λόγω ελλείψεων ή μεταλλάξεων. Έχει όμως πλέον αναγνωρισθεί ότι η επιγενετική αδρανοποίηση μέσω μεθυλίωσης των CpG νησίδων, σε ρυθμιστικές για τη μεταγραφή περιοχές των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, είναι τουλάχιστον το ίδιο συχνή με αυτές τις γενετικές αλλαγές. Μια πληθώρα επιγενετικών συμβάντων έχει περιγραφεί στις αιματολογικές κακοήθειες. Τα περισσότερα από τα αποσιωπούμενα γονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες που παίζουν σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και των κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση. Στην παρούσα



διατριβή μελετήθηκε η κατάσταση μεθυλίωσης των υποκινητών γονιδίων που έχουν μελετηθεί επαρκώς (P15, p16), λίγο (p73, p57) ή καθόλου (VHL, Snk/Plk2) στις μονοκλωνικές γαμμαπάθειες.

10.2.1 Μελέτη της μεθυλίωσης του γονιδίου p57 (CDKN1C)

Η πρώτη αναφορά μεθυλίωσης του υποκινητή του p57 (CDKN1C) στις αιματολογικές κακοήθειες ήταν από τους Li και συν το 2002 (136). Σε αυτήν τη μελέτη παρατηρήθηκε μεθυλίωση στο 54,9% των ασθενών με διάχυτο λέμφωμα από Β μεγάλα κύτταρα (DLBCL), στο 44% των ασθενών με οζώδες λέμφωμα, και στο 33% των ασθενών με χρόνια λεμφογενή λευχαιμία (ΧΛΛ). Το ποσοστό μεθυλίωσης σε ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία (ΟΜΛ) και μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (ΜΔΣ) ήταν 0 και 3% αντίστοιχα (136). Μια χρονιά αργότερα, ο Shen και συν. μελέτησαν τη μεθυλίωση του p57 (CDKN1C), του TP73 και του p15 (CDKN2B) σε ασθενείς με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ΟΛΛ) (275). Το ποσοστό μεθυλίωσης του p57 (CDKN1C) σε ασθενείς με νεοδιαγνωσθείσα ΟΛ άγγιξε το 50% και το ξεπέρασε στις περιπτώσεις με υποτροπή (53%). Στην ίδια μελέτη αναφέρεται ότι ασθενείς με ΟΛ αρνητική για το χρωμόσωμα Ph και διαταραγμένο το μονοπάτι p57/p73/p15 είχαν και δυσμενέστερη πρόγνωση. Το χαμηλό ποσοστό μεθυλίωσης στην ΟΜΛ και τα ΜΔΣ επιβεβαιώθηκε και από άλλους ερευνητές (222), ενώ αντίθετα το υψηλό ποσοστό μεθυλίωσης που παρατηρήθηκε από τους Li και συν. στους ασθενείς με οζώδες λέμφωμα δε βρέθηκε σε άλλες μελέτες (276). Σε μία μελέτη 56 ασθενών με ΧΛΛ, μεθυλίωση του p57 (CDKN1C) βρέθηκε μόνο στο 7,1 % των ασθενών (277). Έχει επίσης προταθεί ότι η μεθυλίωση αυτού του γονιδίου μπορεί να συμβάλλει στην κακοήγη πρόοδο του γαστρικού MALT (mucosa-associated lymphoid tissue) λεμφώματος (278).

Στην παρούσα διατριβή μελετήσαμε για πρώτη φορά την κατάσταση μεθυλίωσης του CDKN1C σε 52 ασθενείς με μονοκλωνικές γαμμαπάθειες. Παρατηρήθηκε απουσία μεθυλίωσης σε όλους τους ασθενείς της παρούσας μελέτης, ενώ μελετήσαμε επιπλέον 32 ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία και 26 ασθενείς με μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα, στους οποίους επίσης δε παρατηρήθηκε μεθυλίωση (257). Ο πληθυσμός που μελετήθηκε συμπεριλάμβανε ασθενείς με ΠΜ όλων των σταδίων και με ποικίλες κυτταρογενετικές διαταραχές. Αφού οι μεταλλάξεις και οι ελλείψεις αυτού του γονιδίου είναι επίσης σπάνιες σε ασθενείς με ΠΜ, τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι το p57 (CDKN1C) δεν αποτελεί στόχο ούτε γενετικής ούτε και επιγενετικής αδρανισμού σε αυτή την ομάδα ασθενών.



10.2.2 Μελέτη της μεθυλίωσης του γονιδίου TP73

Το TP73 είναι το τρίτο μέλος της οικογένειας p53, μαζί με το p63. Παρουσιάζει σημαντικό βαθμού ομολογία στην αλληλουχία και λειτουργική αλληλοεπικάλυψη με το p53. Η μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων του, επάγει τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου και/ή την απόπτωση (234). Δοθείσης της λειτουργικής ομοιότητας μεταξύ του p53 και του TP73, λογικό είναι να υποθέσει κανείς ότι το TP73 είναι ένα επίσης σημαντικό γονίδιο για την αναστολή της ανάπτυξης του καρκίνου. Ωστόσο, παρά τις ομοιότητες με το p53, το TP73 παρουσιάζει και σημαντικές διαφορές όσον αφορά τη ρύθμιση και τη λειτουργία. Έτσι, εν αντιθέσει με τους επίμους που δεν εκφράζουν το p53, TP73 +/- επίμους δεν παρουσιάζουν αυξημένη προδιάθεση για καρκινογένεση (279). Επιπλέον, το γονίδιο του TP73 μέσω διαφορετικού ματίσματος (splicing) δίνει γένεση σε δύο διαφορετικές πρωτεΐνες, η μία με προ-αποπτωτικούς χαρακτήρες και μία με αντι-αποπτωτικούς χαρακτήρες (234).

Τα τελευταία χρόνια, πολλές μελέτες έχουν γίνει για την κατάσταση του TP73 σε συμπαγείς κυρίως όγκους. Επί του συνόλου των κακοηθειών, απώλεια της ετεροζυγωτίας του TP73 έχει παρατηρηθεί στο 20% των ασθενών, ενώ οι μεταλλάξεις είναι πολύ σπάνιες (0.6%) (280). Όσον αφορά την κατάσταση μεθυλίωσης του TP73, μία πρόσφατη μελέτη, με νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία δεν έδειξε μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου (281). Επιπλέον, οι Εκμεκci και συν. ανέφεραν μεθυλίωση του TP73 σε ποσοστό 10% νεοδιαγνωσθέντων ασθενών με ΟΜΛ (205). Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι η μεθυλίωση του TP73 είναι σπάνια στους ασθενείς με ΟΜΛ και άρα αυτό το επιγενετικό φαινόμενο δε φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου. Αντίθετα σε ασθενείς με λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα, η μεθυλίωση του TP73 φαίνεται να είναι πιο συχνή. Αποσιώπηση του γονιδίου λόγω μεθυλίωσης έχει αναφερθεί στο 1/3 μιας σειράς ασθενών με λέμφωμα Burkitt, στο 28% και στο 43% κυτταρικών σειρών Β και Τ κυτταρικής αντίστοιχα (282), (282,283), και αξιοσημείωτα στο 94% λεμφωμάτων από NK (natural killer) κύτταρα, μία συχνότητα που είναι η υψηλότερη από όσες έχουν αναφερθεί για τις ανθρώπινες κακοήθειες (284). Υπάρχουν επίσης ενδείξεις ότι η μεθυλίωση αυτού του γονιδίου έχει και προγνωστική αξία. Ο Garcia-Manero και συν. ανέφεραν μεθυλίωση του γονιδίου στο 21% των ασθενών με de novo ΟΜΛ, παράμετρος που συσχετίστηκε και με πτωχή πρόγνωση (142). Οι παρατηρήσεις αυτές επιβεβαιώθηκαν και σε μία μεγαλύτερη μελέτη με 251 ασθενείς όπου παρατηρήθηκε εκ νέου η προγνωστική αξία του TP73 στους ασθενείς με ΟΜΛ (148).



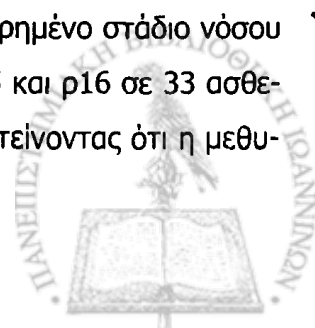
Σχετικά με την υπερμεθυλίωση του TP73 υπάρχουν ορισμένες αναφορές στους ασθενείς με μονοκλωνικές γαμμαπάθειες. Σε μία μελέτη με 13 μόνο ασθενείς με ΠΜ δεν παρατηρήθηκε μεθυλίωση (285). Αντίθετα σε μία άλλη μελέτη μεθυλίωση παρατηρήθηκε στο 40% των κυτταρικών σειρών και στο 12,5 % των ασθενών με ΠΜ. Σε μία μεγαλύτερη μελέτη με 142 ασθενείς με ΠΜ και ΜΓΑΣ μεθυλίωση παρατηρήθηκε στο 15% και 21% αντίστοιχα.

Στην παρούσα εργασία δε βρέθηκε μεθυλίωση σε κανέναν από τους 45 ασθενείς με ΠΜ, ενώ για πρώτη φορά μελετήθηκαν ασθενείς με ΜW, όπου και πάλι δεν παρατηρήσαμε μεθυλίωση. Οι διαφορές στα ποσοστά μεθυλίωσης μπορεί να οφείλονται στη χρήση διαφορετικών ζευγών εκκινήτων, στο διαφορετικό αριθμό ασθενών αλλά και σε διαφορές όσον αφορά το στάδιο νόσου των ασθενών και τις κυτταρογενετικές ανωμαλίες. Ωστόσο από τα στοιχεία μας προκύπτει ωστόσο ότι το TP73 δε φαίνεται να παίζει ιδιαίτερο ρόλο στην παθογένεια των πλασματοκυτταρικών νεοπλασμάτων.

10.2.3 Μελέτη της μεθυλίωσης των γονιδίων p15 (CDKN2B) και p16 (CDKN2A)

Τόσο το p15 όσο και το p16, είναι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από γονίδια που βρίσκονται στο χρωμόσωμα 9p21, και είναι αναστολείς των κινασών που εξαρτώνται από τις κυκλίνες (CDK4/6). Στις αιματολογικές κακοήθειες, έλλειψη του p15/p16 locus παρατηρείται κυρίως στις λεμφοειδείς κακοήθειες, κυρίως της Β σειράς, με εξαίρεση το ΠΜ. Μεθυλίωση του p15 και του p16 παρατηρήθηκε αρχικά σε κυτταρικές σειρές λευχαιμίας και αργότερα σε ασθενείς με οξεία λευχαιμία και μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα.

Στην πρώτη εργασία που δημοσιεύθηκε σχετικά με την κατάσταση μεθυλίωσης των p15/p16 στο ΠΜ, είχαν μελετηθεί 12 ασθενείς και μεθυλίωση και των δύο γονιδίων παρατηρήθηκε στο 67% των ασθενών, χωρίς να έχει παρατηρηθεί έλλειψη ή μετάλλαξη (282,286). Η υπερμεθυλίωση σχετίσθηκε με επιθετική νόσο και την ανάπτυξη πλασματοκυττωμάτων. Μια χρονιά αργότερα, ο Tasaka και συν. επιβεβαίωσαν τη μεθυλίωση του p16 σε τρεις κυτταρικές σειρές και 16 ασθενείς με ΠΜ, αναφέροντας ποσοστό μεθυλίωσης στους ασθενείς 50% (287). Οι Mateos και συν. βρήκαν μεθυλίωση σε 41 από 98 περιπτώσεις με ΠΜ και 4 από 5 περιπτώσεις με πλασματοκυτταρική λευχαιμία, αλλά σε καμία περίπτωση με ΜΓΑΣ, υποστηρίζοντας ότι η μεθυλίωση του p16 σχετίζεται με πρόοδο νόσου και προχωρημένο στάδιο νόσου (288). Αντίθετα, οι Guillerm και συν. μελέτησαν τη μεθυλίωση του p15 και p16 σε 33 ασθενείς με ΠΜ και ΜΓΑΣ αντίστοιχα και δε βρήκαν ιδιαίτερες διαφορές, προτείνοντας ότι η μεθυ-



λίωση αυτών των γονιδίων είναι ένα πρώιμο εύρημα και δε σχετίζεται με την μετάπτωση από ΜΓΑΣ σε ΠΜ (135). Αργότερα, ο Gonzalez και συν. σε μία μελέτη που περιελάμβανε 101 ασθενείς με ΠΜ και 5 ασθενείς με πλασματοκυτταρική λευχαιμία, ανέφεραν ποσοστό μεθυλίωσης 40,5 % για το ΠΜ και 80% για την πλασματοκυτταρική λευχαιμία, καθιερώνοντας έτσι τη μεθυλίωση του p16 ως μηχανισμό που συμμετέχει στην παθογένεια του ΠΜ (141).

Στην παρούσα διατριβή, μεθυλίωση του υποκινητή του p16 παρατηρήθηκε σε 14 από τους 45 ασθενείς με ΠΜ σε ποσοστό δηλαδή 31%, παρόμοιο με αυτό που αναφέρεται και στη διεθνή βιβλιογραφία. Ασθενείς με μεθυλιωμένο το p16 είχαν την τάση να έχουν προχωρημένο στάδιο νόσου και αναιμία κατά τη διάγνωση. Η διάμεση επιβίωση των ασθενών με μεθυλιωμένο τον υποκινητή του γονιδίου ήταν 7,1 έτη έναντι 8,8 έτη αυτών που δεν ήταν μεθυλιωμένοι, και ο κίνδυνος να καταλήξουν ήταν 1,9 φορές πιο μεγάλος για τους ασθενείς με μεθυλιωμένο p16, η διαφορά όμως δεν ήταν στατιστικώς σημαντική. Από την στατιστική ανάλυση προέκυψε επίσης ότι η μεθυλίωση του p16 δεν είναι προγνωστικός δείκτης ανάπτυξης οστικής ή εξωμυελικής νόσου. Παρόμοια ευρήματα αναφέρονται και από τους Gonzalez-Paz και συν. (210) σε μία μελέτη με 439 ασθενείς, όπου παρατηρήθηκε επίσης μεθυλίωση του P16 σε ασθενείς πιο προχωρημένου σταδίου, αλλά δε βρέθηκε σημαντική συσχέτιση με κλινικές παραμέτρους, όπως η συνολική επιβίωση, η επιβίωση ελεύθερης προόδου νόσου και οι κυτταρογενετικές ανωμαλίες. Αντίθετα, σχέση της μεθυλίωσης με δυσμενή πρόγνωση έχει αναφερθεί από προηγούμενους ερευνητές σε μικρότερες σειρές ασθενών (212, 289, 290).

Η μεταγραφική αποσιώπηση του p15 λόγω μεθυλίωσης είναι μία από τις πιο συχνές μοριακές ανωμαλίες που αναφέρονται στα ΜΔΣ. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι το 50% όλων των ασθενών με ΜΔΣ παρουσιάζουν αυτό το φαινόμενο (291-293). Η μεθυλίωση του p15 φαίνεται να είναι ένα ειδικό γεγονός στα ΜΔΣ, καθώς οι ασθενείς δεν παρουσιάζουν ταυτόχρονα μεθυλίωση του παρακείμενου γονιδίου p16. Οι Quesnel και συν. (1998) έδειξαν ότι η υπερμεθυλίωση του p15 εμφανίζεται σχεδόν σε όλους τους ασθενείς με ποσοστό βλαστών πάνω από 10% στον μυελό των οστών., υποστηρίζοντας ότι η μεθυλίωση σχετίζεται με αυξημένο αριθμό βλαστών (294). Αν και η σημασία της μεθυλίωσης του p15 στα ΜΔΣ είναι καλά αναγνωρισμένη, ο ρόλος της μεθυλίωσης στις μονοκλωνικές γαμμαπάθειες παραμένει αδιευκρίνιστος.

Όσον αφορά την κατάσταση μεθυλίωσης του υποκινητή του p15 στην παρούσα διατριβή παρατηρήθηκε στο 28% των ασθενών με ΠΜ, και αυτοί ήταν κυρίως αρχικού σταδίου. Ασθενείς



με μεθυλιωμένο το p15 είχαν την τάση να έχουν αναιμία κατά τη διάγνωση, αλλά δε βρέθηκε συσχέτιση με την παρουσία εξωμυελικής ή οστικής νόσου ή τη συνολική επιβίωση. Στη διεθνή βιβλιογραφία τα ποσοστά μεθυλίωσης του p15 σε ασθενείς με ΠΜ έχουν πολύ μεγάλο εύρος, και κυμαίνονται από 1,8% (149) έως και 67% (286). Σε μία μελέτη, η μεθυλίωση του p15 σχετίστηκε με χειρότερη επιβίωση και χειρότερη απόκριση στη θεραπεία, ενώ αντίθετα ο Guillerm και συν. δε βρήκαν διαφορά στην επιβίωση, παρ' όλο που στους ίδιους ασθενείς, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η μεθυλίωση του p16 σχετίστηκε με χειρότερη πρόγνωση (290).

Σύμφωνα με τα παραπάνω, θα μπορούσε να υποστηρίξει κανείς ότι η μεθυλίωση τόσο του p16 όσο και του p15 είναι ένας δείκτης του συνόλου των επιγενετικών αλλαγών που συμβαίνουν κατά την πρόοδο της νόσου, χωρίς να έχει εμφανείς άμεσες βιολογικές ή κλινικές επιπτώσεις.

10.2.4 Μελέτη της μεθυλίωσης του γονιδίου VHL

Το γονίδιο VHL κωδικοποιεί μία ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη η οποία λειτουργεί ως λιγκάση της ουμπικουΐτινης που, παρουσία οξυγόνου, συνδέεται με τον HIF-1α για αποδόμησή του από το πρωτεάσωμα. Η αλληλεπίδραση μεταξύ του VHL και του HIF-1α ρυθμίζεται από τη μεταμεταγραφική προλυλ-υδροξυλίωση του HIF-1α από ένζυμα που ανήκουν στην οικογένεια Egl-nine (EGLN) (252). Επί απουσίας του VHL, λόγω μεταλλάξεων ή μεθυλίωσης, ο HIF-1α δεν αποδομείται και έτσι επάγεται η συνεχής έκφραση των γονιδίων που αυτός ρυθμίζει.

Μεθυλίωση του εκκινητή του VHL έχει περιγραφεί κυρίως στους συμπαγείς όγκους (254,295). Ωστόσο, στις αιματολογικές κακοήθειες, έρευνες της κλινικής μας αλλά και άλλων ερευνητών δεν έδειξαν μεθυλίωση αυτού του γονιδίου σε ασθενείς με οξείες λευχαιμίες και ΜΔΣ (143,296). Στο ΠΜ, η μεθυλίωση του VHL έχει μελετηθεί μόνο σε μία μικρή ομάδα, που περιλάμβανε 13 ασθενείς (8 κατά τη διάγνωση και 5 στη φάση plateau) και σε κανένα από αυτούς δε παρατηρήθηκε μεθυλίωση για το γονίδιο αυτό (285). Στη παρούσα διατριβή, το ποσοστό των ασθενών με ΠΜ στους οποίους παρατηρήθηκε μεθυλίωση του υποκινητή του VHL ήταν 41%. Η ετερογένεια στη μεθοδολογία (διαφορετικό ζεύγος εκκινητών κατά την MSP) και στον αριθμό των ασθενών θα μπορούσαν να δικαιολογήσουν αυτή τη διαφορά.



Ένα πολύ σημαντικό εύρημα, που προέκυψε από τη μελέτη μας, ήταν ο αυξημένος κίνδυνος (κατά 6,5 φορές) εμφάνισης οστικής νόσου στους ασθενείς που παρατηρήθηκε μεθυλίωση για το γονίδιο VHL. Όπως αναφέρθηκε και στο γενικό μέρος, στο ΠΜ σημαντικά μηνύματα πολλαπλασιασμού και ανάπτυξης μεταβιβάζονται μέσω των οδών PI3/AKT, STAT3, RAS/MAPK και του NF-κB (168). Ενεργοποίηση της οδού NF-κB συμβάλλει στην παθογένεια της οστικής νόσου, οδηγώντας σε διαφοροποίηση των οστεοκλαστών και οστική απορρόφηση. Οι An και συν. έδειξαν ότι η απώλεια του VHL οδηγεί σε αυξημένη δραστηριότητα του NF-κB (297). Έτσι, αποσιώπηση του VHL μέσω μεθυλίωσης και επακόλουθη ενεργοποίηση του VHL, μπορεί να είναι μία πιθανή μηχανιστική εξήγηση για το εύρημα μας ότι ασθενείς με μεθυλιωμένο VHL έχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης οστικής νόσου.

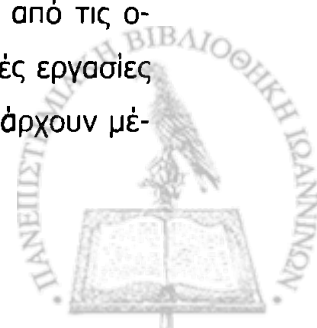
Σε πειράματα σε ποντίκια, έχει παρατηρηθεί ότι η αύξηση της αγγειογένεσης προηγείται της πρόοδου νόσου στο ΠΜ, σε αναλογία με τους συμπαγείς όγκους (253). Η αποσιώπηση του VHL γονιδίου μέσω μεθυλίωσης και η επακόλουθη αύξηση έκφρασης των γονιδίων που εξαρτώνται από τον HIF-1α θα μπορούσε να επίσης να συμβάλει στην αγγειογένεση και στην πρόοδο νόσου. Ένα εύρημά μας που στηρίζει αυτήν την πιθανότητα είναι ότι τρεις ασθενείς με ΠΜ στους οποίους το VHL δεν ήταν μεθυλιωμένο κατά τη διάγνωση, βρέθηκε να είναι μεθυλιωμένο όταν σημειώθηκε πρόοδος νόσου, η οποία συνοδευόταν από βαριά οστική και εξωμυελική νόσο.

Έχει επίσης αναφερθεί ότι έκφραση του γονιδίου VHL συνοδεύεται από ιδιαίτερα αυξημένη ευαισθησία στην ανασταλτική δράση του bortezomib *in vitro* (298). Έτσι μελέτη της έκφρασης και της μεθυλίωσης του VHL θα μπορούσε να οδηγήσει στην αναγνώριση ασθενών που είναι ευαίσθητοι στο bortezomib (Velcade®). Αντίθετα, ασθενείς με μεθυλιωμένο τον εκκινητή του γονιδίου θα μπορούσαν να ωφεληθούν από τη χορήγηση απομεθυλιωτικών παραγόντων (Vidaza®, Dacogen®).

Παρατηρήσαμε επίσης για πρώτη φορά ότι το γονίδιο VHL βρίσκεται μεθυλιωμένο και στη ΜW. Μεθυλίωση παρατηρήθηκε και στους 4 ασθενείς που μελετήθηκαν.

10.2.5 Μελέτη της μεθυλίωσης του γονιδίου Snk/Plk2

Οι Ρόλο-like κινάσες (Plks) είναι μια οικογένεια κινασών του κυτταρικού κύκλου, από τις οποίες 4 μέλη έχουν αναγνωρισθεί στον ανθρώπινο οργανισμό (244). Αν και πολλές εργασίες υποστηρίζουν τον ογκογενετικό ρόλο της Plk1 στη νεοπλασία, λίγες αποδείξεις υπάρχουν μέ-



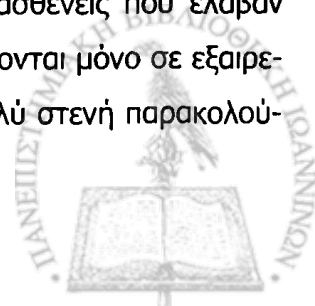
χρι σήμερα που να υποστηρίζουν τη συμμετοχή και των υπόλοιπων μελών στις ανθρώπινες κακοήθειες. Τόσο η Plk2 όσο και η Plk3 συμμετέχουν σε μονοπάτια επιδιόρθωσης βλαβών του DNA (246). Η Plk2 είναι γονίδιο στόχος του p53 και επιβάλλει ένα G2 σημείο ελέγχου (80).

Η πρώτη και μοναδική εργασία που αφορά στη μεθυλίωση του snk/plk2 στις αιματολογικές κακοήθειες είναι από τους Syed και συν. (248,251) οι οποίοι έδειξαν μειωμένη έκφραση λόγω μεθυλίωσης του snk/plk2 (και όχι του plk3), σε μία πληθώρα B-λεμφοϋπερπλαστικών νοσημάτων και ιδιαίτερα σε Burkitt λεμφώματα. Ανάλυση κυτταρικών σειρών καρκίνου του μαστού και καρκίνου κεφαλής και τραχήλου, αλλά και πρωτοπαθών όγκων έδειξε απουσία μεθυλίωσης και έκφραση της αντίστοιχης πρωτεΐνης σε όλες τις περιπτώσεις, προτείνοντας έτσι ότι το snk/plk2 είναι ιδιαίτερα σημαντικό στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση της B-λεμφικής σειράς.

Στην παρούσα διατριβή, μελετήσαμε για πρώτη φορά την κατάσταση μεθυλίωσης του snk/plk2 σε ασθενείς με μονοκλωνικές γαμμαπάθειες. Μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου παρατηρήθηκε σε ποσοστό 60% σε ασθενείς με ΠΜ. Ασθενείς με μεθυλιωμένο το snk/plk2 είχαν διάμεση επιβίωση 7,1 έτη, ενώ ασθενείς με μη μεθυλιωμένο το snk/plk2 είχαν διάμεση επιβίωση 8,8 έτη. Αν και η κατάσταση μεθυλίωσης του snk/plk2 δεν ήταν προγνωστικός δείκτης της συνολικής επιβίωσης, ή άλλων σχετικών κλινικών παραμέτρων όπως η οστική νόσος, η αναιμία και η εξωμυελική νόσος, το ποσοστό που αναφέρουμε είναι ιδιαίτερα υψηλό και επιβεβαιώνει την υπόθεση των Syed και συν. ότι το snk/plk2 είναι ένα γονίδιο που παίζει σημαντικό ρόλο στα νεοπλάσματα B-κυτταρικής αρχής. Επιπλέον, περιγράφουμε για πρώτη φορά μεθυλίωση του Snk/Plk2 σε ασθενείς με ΜW, ενισχύοντας περισσότερο την προαναφερθείσα υπόθεση, ενώ μεθυλίωση δεν παρατηρήθηκε σε κανένα από τους ασθενείς με ΜΓΑΣ, υποδηλώνοντας ότι είναι δεν είναι ένα πρώιμο επιγενετικό γεγονός.

10.3 Περιορισμοί

Θα πρέπει όμως να αναγνωρίσουμε ότι υπάρχουν και ορισμένοι περιορισμοί στην παρούσα μελέτη. Έτσι, αν και παρατηρήσαμε όπως προαναφέρθηκε μεγαλύτερη επιβίωση από αυτή που αναφέρουν τα κλασσικά συγγράμματα, αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι συμπεριλήφθηκαν ασθενείς με καλύτερη κλινική κατάσταση (performance status), ασθενείς που έλαβαν φάρμακα νεώτερης γενιάς, που στο εξωτερικό κυρίως λόγω κόστους δίνονται μόνο σε εξαιρετικές περιπτώσεις, και επίσης στο γεγονός ότι οι ασθενείς μας έχουν πολύ στενή παρακολού-



θηση και επί εμφάνισης συμπτωμάτων γίνεται έγκαιρη εισαγωγή στην κλινική για αντιμετώπιση. Αν και κατά τη στατιστική ανάλυση παρατηρήθηκαν πολύ ενδιαφέρουσες τάσεις συσχέτισης εργαστηριακών και κλινικών παραμέτρων, αυτές δεν ήταν πάντα στατιστικώς σημαντικές κυρίως λόγω του σχετικά μικρού αριθμού ασθενών που προκύπτει από τις υποκατηγοριοποιήσεις. Επιπλέον, θα πρέπει να σημειωθεί ότι η μελέτη της μεθυλίωσης έγινε σε δείγματα αναρρόφησης μυελού των οστών, όπου συμπεριλαμβάνονταν όλες οι κυτταρικές σειρές και όχι σε καθαρό πληθυσμό μυελωματικών κυττάρων, όπως θα μπορούσε να γίνει εάν είχε προηγηθεί κυτταρικός διαχωρισμός (cell sorting). Έτσι στη μελέτη μας, δείγματα με χαμηλό ποσοστό πλασματοκύτταρων θα μπορούσαν να δώσουν και ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα.



Επίλογος

Η ζωή ενός κυττάρου είναι κυκλική. Το ανθρώπινο κύτταρο καταναλώνει το μεγαλύτερο μέρος της ζωής του στο να εκτελέσει μία συγκεκριμένη λειτουργία. Όμως, για πολλά κύτταρα, όπως αυτά του δέρματος και του αίματος, έρχεται μία στιγμή που πρέπει να διαιρεθούν. Ο μηχανισμός της αντιγραφής κινητοποιείται, με σκοπό το διπλασιασμό του DNA, σχηματίζοντας ένα μοναδικό και πανομοιότυπο αντίγραφο. Κάθε θυγατρικό κύτταρο που προκύπτει θέτει το DNA του σε λειτουργία και επιστρέφει στη φυσιολογική του ζωή. Όλη αυτή η διαδικασία πρέπει να είναι «χορογραφημένη» στην εντέλεια, εξασφαλίζοντας ότι κάθε εργασία θα ολοκληρωθεί τη σωστή στιγμή και με τη σωστή σειρά. Αυτή είναι και η λειτουργία των κυκλικών. Τα επίπεδα τους αυξομειώνονται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Όταν αυξάνονται πυροδοτούν την έναρξη μίας λειτουργίας και όταν αυτή ολοκληρώνεται αποδομούνται, για να δώσουν τη θέση τους στην επόμενη λειτουργία. Η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου δεν είναι βέβαια τόσο απλή. Πολυάριθμες πρωτεΐνες ευοδώνουν ή αναστέλλουν τη λειτουργία των κυκλικών ανάλογα με τις εκάστοτε συνθήκες, σε ένα πολύπλοκο δίκτυο αλληλεπιδράσεων.

Η μελέτη της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου στις αιματολογικές κακοήθειες είναι ιδιαίτερα σημαντική και μέχρι σήμερα έχουν αναγνωρισθεί πληθώρα γενετικών, αλλά και επιγενετικών αλλαγών που προκαλούν υπερδραστηριότητα των κυκλικών και των κινασών που εξαρτώνται από αυτές (CDK), ενώ αναστολή τους μπορεί να οδηγήσει σε παύση του κυτταρικού κύκλου και απόπτωση.

Η πλήρης κατανόηση του ρόλου των κυκλικών, των κινασών που εξαρτώνται από αυτές (CDK) και των ανασταλτών τους (CDKI) στις αιματολογικές κακοήθειες γίνεται όλο και πιο επιτακτική, αφού υπάρχουν ενδείξεις ότι έχουν παθολογική αξία (όπως η κυκλίνη D στα λεμφώματα του μανδύα), προγνωστική αξία (TC ταξινόμηση στο πολλαπλό μυέλωμα) αλλά και θεραπευτική αξία. Έτσι, πρόσφατα αναπτύχθηκαν αναστολείς των CDK, που είτε είναι παν-αναστολείς, αναστέλλοντας όλες ανεξαιρέτως τις CDK (όπως η flavopyridol), είτε αναστέλλουν εκλεκτικά ομάδες CDK (όπως η seliciclib).

Η σύμβολή της μεθυλίωσης στην ογκογένεση μελετάται με ιδιαίτερα εντατικούς ρυθμούς τόσο στους συμπαγείς όγκους όσο και στις αιματολογικές κακοήθειες. Εκτός από την ποιοτική μελέτη μεθυλίωσης γονιδίων με τη μέθοδο MSP, είναι πλέον εφικτή και η ποσοτική μέτρηση



μεθυλίωσης γονιδίων (qMSP, quantitative MSP), ενώ έχουν επιπλέον σχεδιαστεί μικροσυστοιχίες με τις οποίες είναι δυνατόν να μελετηθεί η κατάσταση μεθυλίωσης ως και 64 γενωμικών περιοχών (Epigenomics, methylation microarrays). Η αναγνώριση της σημασίας των επιγενετικών αλλαγών, έχει οδηγήσει επιπρόσθετα, στην όλο και πιο ευρεία χρήση των απομεθυλιωτικών παραγόντων (Vidaza , Pharmion, Boulder, Colorado και Dacogentrad; SuperGen Inc, Dublin, California και MGI Pharma Inc, Bloomington, Minnesota), σε όλο το φάσμα των αιματολογικών κακοηθειών. Στο μέλλον, ο καθορισμός, όχι μόνο του γονοτύπου, αλλά και του «μεθυλότυπου» του κάθε ασθενούς θα ανοίξει το δρόμο στην πλήρη στοχευμένη και εξατομικευμένη θεραπεία με μέγιστα οφέλη και τις λιγότερο δυνατές παρενέργειες.



Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε ότι κλινικοί παράμετροι όπως η οστική νόσος, το προχωρημένο στάδιο νόσου, η εξωμυελική νόσος και η σημαντική αναιμία σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο θανάτου, αν και οι διαφορές δεν ήταν στατιστικώς σημαντικές. Επίσης παρατηρήθηκε αυξημένη, σε σχέση με την αναφερόμενη στη βιβλιογραφία, επιβίωση (7,2 έτη έναντι 3,5 έτη), και αυτό πιθανά να οφείλεται στο ότι συμπεριλήφθηκαν ασθενείς με καλύτερη κλινική κατάσταση (performance status), στο ότι στους ασθενείς μας χορηγήθηκαν και νεώτερης γενιάς φάρμακα, που στο εξωτερικό κυρίως λόγω κόστους δίνονται μόνο σε εξαιρετικές περιπτώσεις, και επίσης στο ότι οι ασθενείς μας έχουν πολύ στενή παρακολούθηση και επί εμφάνισης συμπτωμάτων γίνεται έγκαιρη εισαγωγή στην κλινική για αντιμετώπιση.

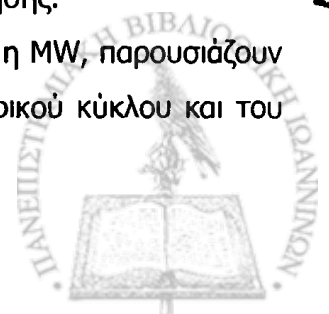
Επιπλέον,

1. Επιβεβαιώθηκε ότι σε ασθενείς με ΠΜ παρατηρείται αυξημένη έκφραση των κυκλινών D1, D2, D3.
2. Οι τιμές της κυκλίνης D1 ήταν στατιστικώς σημαντικό υψηλότερες σε σχέση με τις τιμές της κυκλίνης D2 ($p=0.01$) και τις τιμές της D3 ($p=0.004$).
3. Στατιστική ανάλυση της σχέσης των κυκλινών με κλινικές παραμέτρους ανέδειξε ενδιαφέρουσες τάσεις, χωρίς όμως να βρεθεί ιδιαίτερη προγνωστική αξία για κάποια από τις κυκλίνες τύπου D, επιβεβαιώνοντας τη θεωρία ότι δεν αποτελούν ισχυρά ογκογονίδια, αλλά απαιτούν την παρουσία και άλλων ογκογονιδίων για να οδηγήσουν σε υπερπλασία της B σειράς.
4. Επιβεβαιώθηκε η παρουσία μεθυλίωσης του p15 (CDKN2B) και p16 (CDKN2A) σε ασθενείς με ΠΜ, σε ποσοστό 28% και 31% αντίστοιχα, παρόμοια με αυτά που αναφέρονται διεθνώς.
5. Ασθενείς με μεθυλιωμένο το p16 είχαν την τάση να έχουν προχωρημένο στάδιο νόσου και αναιμία κατά τη διάγνωση και ο κίνδυνος να καταλήξουν ήταν 1,9 φορές πιο μεγάλος, διαφορά όμως που δεν ήταν σημαντική. Η μεθυλίωση του p16 δε βρέθηκε να είναι προγνωστικός δείκτης ανάπτυξης οστικής ή εξωμυελικής νόσου.
6. Ασθενείς με μεθυλιωμένο το p15 είχαν την τάση να έχουν αναιμία κατά τη διάγνωση, αλλά δε βρέθηκε συσχέτιση με την παρουσία εξωμυελικής ή οστικής νόσου ή τη συνολική επιβίωση.



Τα νέα δεδομένα που προκύπτουν από την παρούσα διατριβή και δεν έχουν ανακοινωθεί από άλλους ερευνητές είναι τα ακόλουθα:

1. Η απουσία μεθυλίωσης του υποκινητή του p57 (CDKN1C) χαρακτηρίζει όχι μόνο τις μυελικές νεοπλασίες, αλλά και τις μονοκλωνικές γαμμαπάθειες, όπως το πολλαπλό μυέλωμα, η μακροσφαιριναιμία Waldenström και η μονοκλωνική γαμμαπάθεια αδιευκρίνιστης σημασίας.
2. Οι μονοκλωνικές γαμμαπάθειες, όπως το πολλαπλό μυέλωμα, η μακροσφαιριναιμία Waldenström και η μονοκλωνική γαμμαπάθεια αδιευκρίνιστης σημασίας δε χαρακτηρίζονται από μεθυλίωση του υποκινητή του TP73.
3. Μελετήθηκε για πρώτη φορά η μεθυλίωση του υποκινητή του VHL σε ένα τόσο μεγάλο ποσοστό ασθενών. Το ποσοστό των ασθενών με ΠΜ που βρέθηκαν μεθυλιωμένοι ήταν 41%.
4. Αναφέρουμε για πρώτη φορά μεθυλίωση του υποκινητή του VHL σε ασθενείς με μακροσφαιριναιμία Waldenström.
5. Ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα και μεθυλιωμένο το VHL βρέθηκε να έχουν στατιστικά σημαντικά αυξημένο κίνδυνο (κατά 6,5 φορές) εμφάνισης οστικής νόσου ($p=0.018$). Άρα η κατάσταση μεθυλίωσης του VHL μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός δείκτης ανάπτυξης οστικής νόσου σε αυτούς τους ασθενείς.
6. Οι ασθενείς με μεθυλιωμένο υποκινητή του VHL είχαν μεγαλύτερο κίνδυνο να καταλήξουν ($OR=1.3$, $p=0.6$), να έχουν αναιμία ($OR=2.0$, $p=0.2$), να έχουν εξωμυελική νόσο ($OR=2.3$, $p=0.228$), ενώ δεν εμφάνιζαν πιο αυξημένο κίνδυνο να έχουν προχωρημένο στάδιο νόσου ($OR=1.1$, $p=0.82$).
7. Αναφέρουμε για πρώτη φορά μεθυλίωση του snk/plk2 σε ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα. Μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου παρατηρήθηκε στο 60% αυτών των ασθενών.
8. Αναφέρουμε για πρώτη φορά μεθυλίωση του snk/plk2 σε ασθενείς με μακροσφαιριναιμία Waldenström.
9. Αν και η κατάσταση μεθυλίωσης του snk/plk2 δεν ήταν προγνωστικός δείκτης της συνολικής επιβίωσης, ή άλλων σχετικών κλινικών παραμέτρων όπως η οστική νόσος, η αναιμία και η εξωμυελική νόσος σε ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα, το ποσοστό που αναφέρουμε είναι ιδιαίτερα υψηλό και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.
10. Οι μονοκλωνικές γαμμαπάθειες, όπως το πολλαπλό μυέλωμα και η MW, παρουσιάζουν μεθυλίωση γονιδίων που σχετίζονται με τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και του



μικροπεριβάλλοντος. Ενδιαφέρουσες τάσεις συσχέτισης της κατάστασης μεθυλίωσης και κλινικοεργαστηριακών παραμέτρων χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης για να διευκρινιστεί και να καθοριστεί η προγνωστική τους αξία. Στο μέλλον, ο καθορισμός όχι μόνο του γονοτύπου, αλλά και του «μεθυλότυπου» του κάθε ασθενούς θα ανοίξει το δρόμο στην πλήρη στοχευμένη και εξατομικευμένη θεραπεία με μέγιστα οφέλη και τις λιγότερο δυνατές παρενέργειες.



Μελέτη της έκφρασης και της κλινικής σημασίας των κυκλινών και της μεθυλίωσης των ανασταλών τους στις αιματολογικές κακοήθειες

Ελευθερία Χατζημιχαήλ

Περίληψη

Βασική προϋπόθεση για την ανάπτυξη ενός νεοπλάσματος είναι η διαταραχή της ισορροπίας ανάμεσα στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, μέσω του μηχανισμού της απόπτωσης. Ειδικότερα, σε ένα δεδομένο κυτταρικό πληθυσμό ο αριθμός των κυττάρων που παράγονται υποσκελίζει τον αριθμό των κυττάρων που καταστρέφονται κατά την ίδια χρονική περίοδο. Ο κυτταρικός κύκλος ελέγχεται από μία σειρά ρυθμιστικών μηχανισμών, καθένας από τους οποίους εξαρτάται από την ολοκλήρωση μίας προηγούμενης διαδικασίας, με αποτέλεσμα η διαταραχή ενός μηχανισμού να οδηγήσει σε μία σειρά απορυθμίσεων του κυτταρικού κύκλου. Σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου παίζουν οι κυκλίνες, οι οποίες εξασφαλίζουν ότι κάθε εργασία θα ολοκληρωθεί τη σωστή στιγμή και με τη σωστή σειρά. Η κατανόηση του ρυθμού ανάπτυξης και της κινητικής του κυττάρου έχει αποτελέσει τελευταία αντικείμενο εντατικής μελέτης στην Αιματολογία.

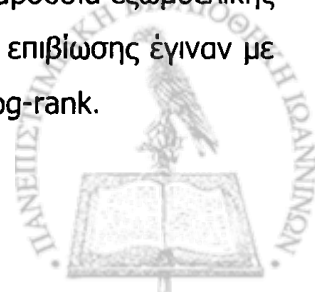
Η αυξημένη επίπτωση του καρκίνου με την πρόοδο της ηλικίας έχει από καιρό θεωρηθεί ότι οφείλεται σε πολλαπλές γενετικές αλλαγές, όπως μεταλλάξεις, μεταθέσεις ή αλλαγές στην πλοειδία, που πολλές φορές αφορούν σε γονίδια που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Η κλασσική γενετική ωστόσο από μόνη της δε μπορεί να εξηγήσει την πληθώρα των φαινοτύπων σε ένα δεδομένο πληθυσμό, ούτε γιατί οργανισμοί με πανομοιότυπες αλληλουχίες DNA, όπως τα μονοζυγωτικά δίδυμα, παρουσιάζουν διαφορετικό φαινότυπο και διαφορετική επιρρέπεια σε νόσους. Οι επιγενετικές αλλαγές (epigenetics) μπορούν να προσφέρουν μια μερική εξήγηση αυτών των φαινομένων. Με τον όρο επιγενετική εννοούμε την κληρονομικότητα πληροφορίας που βασίζεται σε αλλαγή της γονιδιακής έκφρασης χωρίς να συμβαίνει αλλαγή στη γονιδιακή αλληλουχία. Ο πιο συχνός επιγενετικός μηχανισμός στον άνθρωπο είναι η μεθυλίωση του DNA, η οποία σχετίζεται με μεταγραφική αποσιώπηση των γονιδίων. Διαταραχές στο πρότυπο μεθυλίωσης του DNA έχει βρεθεί σε μία πλειάδα αιματολογικών κακοηθειών.

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν να μελετηθούν γονίδια που συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, αλλά και οι επιγενετικές αλλαγές, μέσω μεθυλίωσης που αυτά μπορεί να έχουν υποστεί. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η έκφραση και η κλινική σημασία των



κυκλινών D1, D2 και D3, ενώ επιπλέον μελετήθηκε και η μεθυλίωση γονιδίων που συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (p15INK4B, p16INK4A, p57KIP2, TP73, Snk/pIk2, VHL) σε ασθενείς με μονοκλωνικές γαμμαπάθειες.

Ασθενείς και Μέθοδοι. Μελετήθηκαν 45 ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα (ΠΜ), 21 γυναίκες και 24 άνδρες με μέση ηλικία 66,4 έτη (μέση τιμή± σταθερά διακύμανσης, 66,4 ± 12,4), 4 ασθενείς με Μακροσφαιριναιμία του Waldenström (MW), 2 άνδρες και 2 γυναίκες, με μέση ηλικία 68 έτη (μέση τιμή± σταθερά διακύμανσης, 68± 8,1) και 3 ασθενείς με μονοκλωνική γαμμαπάθεια αδιευκρίνιστης σημασίας (ΜΓΑΣ) που ήταν άνδρες ηλικίας 67, 80 και 69 ετών. Η σταδιοποίηση των ασθενών με ΠΜ σύμφωνα με το σύστημα Durie-Salmon είχε ως εξής: στάδιο IA 9/45 ασθενείς, στάδιο IIA στάδιο IIA 13/45, στάδιο IIIA 7/45 ασθενείς, IIIB 9/45 ασθενείς και έρπον μυέλωμα 7/45 ασθενείς. Η σταδιοποίηση των ασθενών με το σύστημα ISS είχε ως εξής: στάδιο I 17/45, στάδιο II 14/45, στάδιο III 12/45. Η μελέτη της έκφρασης των κυκλινών τύπου D έγινε με τη μέθοδο RT-PCR, χρησιμοποιώντας ειδικούς ανιχνευτές για κάθε κυκλίνη, σε ολικό RNA που απομονώθηκε από βιοψίες μυελού των οστών χρησιμοποιώντας το RecoverALL™ kit (Ambion). Η μελέτη της μεθυλίωσης των υποκινητών των γονιδίων έγινε με MSP (methylation specific PCR). Αρχικά έγινε απομόνωση του γενωμικού DNA από μυελό των οστών με τη χρήση του QIAamp DNA mini kit (Qiagen, BioAnalytica, Athens Greece), το οποίο στη συνέχεια υπέστη χημική κατεργασία με NaSO₃, με τη χρήση του EZ DNA Methylation kit (Zymo Research, CA, USA), και ακολούθησε αντίδραση PCR με εκκινητές ειδικά σχεδιασμένους για τη μεθυλιωμένη και τη μη μεθυλιωμένη περιοχή. Σε κάθε πείραμα συμπεριλαμβανόταν ανθρώπινο DNA ολικά μεθυλιωμένο που διατίθεται στο εμπόριο (Intergen Company, Purchase, NY) ως θετικός μάρτυρας. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR έγινε σε ηλεκτροφόρηση 2% και πολυακρυλαμιδίου 14%, ανάλογα με το γονίδιο. Για λόγους στατιστικής ανάλυσης ασθενείς με ΠΜ και στάδιο νόσου ≥ IIA κατά Durie και Salmon θεωρούνταν ότι έχουν προχωρημένο στάδιο νόσου ενώ ως αναιμία ορίστηκαν τιμές αιμοσφαιρίνης (Hb) ≤ 10 g/dl. Για τη σύγκριση μέσων τιμών (βιοχημικών παραμέτρων και τιμών κυκλινών) μεταξύ υποομάδων των ασθενών χρησιμοποιήθηκε το μη-παραμετρικό στατιστικό τεστ Mann-Whitney. Λόγω του σχετικά μικρού δείγματος ασθενών χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση απλής λογιστικής παλινδρόμησης (simple logistic regression analysis), όπου η κατάσταση μεθυλίωσης του κάθε γονιδίου υπό μελέτη χρησιμοποιούνταν ως μοναδική προγνωστική μεταβλητή για να εκτιμηθεί η συσχέτιση με κλινικές παραμέτρους, όπως η αναιμία, το στάδιο νόσου, η παρουσία εξωμυελικής ή/και οστικής νόσου (εξαρτώμενες μεταβλητές). Οι καμπύλες εκτίμησης επιβίωσης έγιναν με τη χρήση της μεθόδου Kaplan Meier και η σύγκρισή τους με τη μέθοδο log-rank.



Αποτελέσματα. Στους ασθενείς με πολλαπλό μύελωμα παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση των κυκλινών D1, D2, D3. Οι τιμές της κυκλίνης D1 ήταν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερες σε σχέση με τις τιμές της κυκλίνης D2 ($p=0.01$) και τις τιμές της D3 ($p=0.004$). Στατιστική ανάλυση της σχέσης των κυκλινών με κλινικές παραμέτρους ανέδειξε ενδιαφέρουσες τάσεις, χωρίς όμως να βρεθεί ιδιαίτερη προγνωστική αξία για κάποια από τις κυκλίνες τύπου D. Μεθυλίωση του p15 (CDKN2B) και p16 (CDKN2A) παρατηρήθηκε σε ασθενείς με ΠΜ, σε ποσοστό 28% και 31% αντίστοιχα. Ασθενείς με μεθυλιωμένο το p16 είχαν την τάση να έχουν προχωρημένο στάδιο νόσου και αναιμία κατά τη διάγνωση και ο κίνδυνος να καταλήξουν ήταν 1,9 φορές πιο μεγάλος, διαφορά όμως στατιστικώς μη σημαντική. Η μεθυλίωση του p16 δε βρέθηκε να είναι προγνωστικός δείκτης ανάπτυξης οστικής ή εξωμυελικής νόσου. Ασθενείς με μεθυλιωμένο το p15 είχαν την τάση να έχουν αναιμία κατά τη διάγνωση, αλλά δε βρέθηκε συσχέτιση με την παρουσία εξωμυελικής ή οστικής νόσου ή τη συνολική επιβίωση. Επιπλέον, για πρώτη φορά αναφέρουμε ότι η απουσία μεθυλίωσης του υποκινητή του p57 (CDKN1C) χαρακτηρίζει όχι μόνο τις μυελικές νεοπλασίες, αλλά και τις μονοκλωνικές γαμμαπάθειες, όπως το ΠΜ, η ΜW και η ΜΓΑΣ. Παρομοίως, το ΠΜ, η ΜW και η ΜΓΑΣ δε χαρακτηρίζονται από μεθυλίωση του υποκινητή του TP73. Επίσης, αναφέρουμε για πρώτη φορά μεθυλίωση του υποκινητή του VHL σε ασθενείς με ΜW και ΠΜ. Το ποσοστό των ασθενών με ΠΜ που βρέθηκε να έχει μεθυλίωση για το VHL ήταν 41%. Οι ασθενείς με μεθυλιωμένο υποκινητή του VHL είχαν μεγαλύτερο κίνδυνο να καταλήξουν ($HR=1.3$, $p=0.6$), να έχουν αναιμία ($OR=2.0$, $p=0.2$), να έχουν εξωμυελική νόσο ($OR=2.3$, $p=0.228$), ενώ δεν εμφάνιζαν πιο αυξημένο κίνδυνο να έχουν προχωρημένο στάδιο νόσου ($OR=1.1$, $p=0.82$). Ασθενείς με ΠΜ και μεθυλιωμένο το VHL βρέθηκε να έχουν στατιστικώς σημαντικά αυξημένο κίνδυνο (κατά 6,5 φορές) εμφάνισης οστικής νόσου ($p=0.018$). Άρα η κατάσταση μεθυλίωσης του VHL μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός δείκτης ανάπτυξης οστικής νόσου σε αυτούς τους ασθενείς. Περιγράφουμε επίσης, για πρώτη φορά μεθυλίωση του *snk/plk2* σε ασθενείς με ΠΜ και ΜW. Μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου παρατηρήθηκε στο 60% και 75% αυτών των ασθενών αντίστοιχα. Αν και η κατάσταση μεθυλίωσης του *snk/plk2* δεν ήταν προγνωστικός δείκτης της συνολικής επιβίωσης, ή άλλων σχετικών κλινικών παραμέτρων όπως η οστική νόσος, η αναιμία και η εξωμυελική νόσος σε ασθενείς με ΠΜ, το ποσοστό που αναφέρουμε είναι ιδιαίτερα υψηλό και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Συμπεράσματα. Οι κυκλίνες παρουσιάζουν υπερέκφραση στο πολλαπλό μύελωμα, αλλά δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερη προγνωστική αξία επιβεβαιώνοντας τη θεωρία ότι δεν αποτελούν ισχυρά ογκογονίδια, αλλά απαιτούν την παρουσία και άλλων ογκογονιδίων για να οδηγήσουν σε υπερπλασία της Β σειράς. Οι μονοκλωνικές γαμμαπάθειες, όπως το πολλαπλό μύελωμα και



η MW, παρουσιάζουν μεθυσία γονιδίων που σχετίζονται με τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και του μικροπεριβάλλοντος. Ενδιαφέρουσες τάσεις συσχέτισης της κατάστασης μεθυσίας και κλινικοεργαστηριακών παραμέτρων χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης για να διευκρινιστεί και να καθοριστεί η προγνωστική τους αξία. Στο μέλλον, ο καθορισμός όχι μόνο του γονοτύπου, αλλά και του «μεθυλότυπου» του κάθε ασθενούς θα ανοίξει το δρόμο στην πλήρη στοχευμένη και εξατομικευμένη θεραπεία με μέγιστα οφέλη και τις λιγότερο δυνατές παρενέργειες.



Study of the expression and clinical significance of cyclins and the methylation status of their inhibitors in haematological malignancies

Eleftheria Hatzimichael

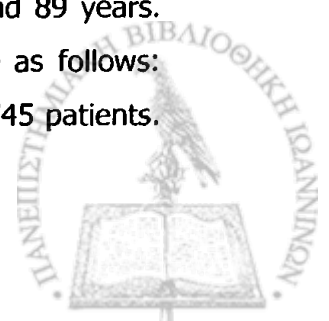
Abstract

Background: Neoplasia is the result of a disruptive balance between cell proliferation and apoptosis. In particular, in a given cell population the number of proliferative cells exceeds the number of apoptotic cells within a certain time frame. The cell cycle is a critical regulator of the processes of cell proliferation and growth as well as of cell division after DNA damage. It must be choreographed to perfection, ensuring that each task occurs at the proper time and in the proper order. Key components of cell cycle regulation are the cyclin proteins. The understanding of tumor growth and cell kinetics has recently become a major area of research in Haematology.

The increased incidence of cancer as a function of age has long been interpreted to suggest that multiple genetic changes –such as mutations, translocations or ploidy changes- affecting often cell cycle related genes are required for tumorigenesis. Classic genetics alone cannot explain the diversity of phenotypes within a population. Nor does classic genetics explain how, despite their identical DNA sequences, monozygotic twins or cloned animals can have different phenotypes and different susceptibilities to a disease. The concept of epigenetics offers a partial explanation of these phenomena. Epigenetics is defined as heritable changes in gene expression that are not due to any alteration in the DNA sequence. The best-known epigenetic marker in humans is DNA methylation that leads to gene transcriptional silencing. A broad spectrum of alterations in DNA methylation patterns has been found in hematopoietic malignancies.

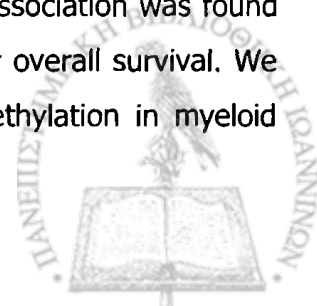
Aim of this study was to study the expression of type D cyclins and the methylation status of genes that are involved in cell cycle regulation pathways (p15INK4B, p16INK4A, p57KIP2, TP73, Snk/plk2, VHL) in patients with plasma cell dyscrasias.

Patients and methods: We studied 45 patients with multiple myeloma (MM), 21 female and 24 male, mean age 66.4 years (66.4 ± 12.4), 4 patients with Waldenström's macroglobulinemia (WM), 2 male and 2 female, mean age 68 years, and 3 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), ages 67, 80 and 89 years. Using the Durie and Salmon staging system MM patients' disease stages were as follows: smoldering MM 7/45, IA 9/45, IIA 13/45 patients, IIIA 7/45 patients and IIIB 9/45 patients.



Quantitative RT-PCR was employed for the cyclin expression, using sequence specific probes for each D type cyclin and GAPDH (PE applied Biosystems). Total cellular RNA was isolated from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue using the RecoverAll™ kit (Ambion) with some modifications. Genomic DNA from bone marrow aspirates was isolated and bisulphate modification was performed using commercially available kits (QIAmp DNA mini kit, Qiagen and EZ DNA methylation kit, Zymo Research respectively). Methylation status of each gene was analysed by methylation-specific PCR (MSP), using specific probes for each gene promoter. Amplified products of MSP were resolved on 2.5% agarose or 14% polyacrylamide gels, stained with ethidium bromide and visualized under ultraviolet illumination (UV) directly. Control methylated (CpG Genome™ Universal Methylated, Chemicon International) and unmethylated genomic DNAs were included in each experiment together with negative control DNA from donors with no haematological malignancies. For the statistical analysis, patients with Durie and Salmon (DS) stage disease \geq IIA were considered to have advanced stage disease and anemia was defined as patients with a hemoglobin (Hb) levels \leq 10 g/dl. Due to our limited sample size, a simple Logistic regression analysis where gene methylation status at diagnosis was used as a single predictor variable to measure associations with the development of anemia, advanced stage disease, extramedullary disease and bone disease (all as the dependent variables). Survival curves were generated using the method of Kaplan-Meier and compared with the log-rank test. In an exploratory analysis the relative risk of death between various subgroups was estimated using Cox Proportional Hazard regression with only a single predictor variable remaining in the final model. All of the statistical analyses were performed using Stata, release 9.0 (Stata Corp., College Station, Texas, USA).

Results: Increased expression of D type cyclins was noted in MM patients. Cyclin D1 levels were significantly higher to cyclin D2 levels ($p=0.01$) and cyclin-D3 ($p=0.004$). Interesting associations were noted between cyclin expression levels and relevant clinical parameters but no significant prognostic value was found. Methylation of the p15 (CDKN4B) and p16 (CDKN4A) was found in 28% and 31% of MM patients respectively. Patients methylated for p16 were more likely to have advanced stage disease and anemia at diagnosis and had an increased risk of death, but p values did not reach significance. Methylation of p16 was not found to be a predictor of bone or extramedullary disease. Patients methylated for the p15 promoter were more likely to have anemia at diagnosis ($p>0.05$). No association was found between p15 methylation status and bone or extramedullary disease or overall survival. We report for the first time that absence of p57 (CDKN1C) promoter methylation in myeloid



malignancies also characterizes plasma cell neoplasms. Similarly, we report absence of TP73 methylation in plasma cell neoplasms. We also report for the first time methylation of the VHL promoter in patients with MM and WM. Methylation of the VHL promoter was found in 41% of MM patients. Patients methylated for VHL showed an increased risk of death (HR=1.3, p=0.6), anemia (OR=2, p=0.2), extramedullary disease (OR=2.3, p=0.22), but not advanced stage disease (OR=1.1, p=0.82). The presence of the VHL promoter was significantly associated with the development of lytic bone disease (OR =6.5, p=0.029). We also demonstrate for the first time methylation of snk/plk2 in MM and WM. Snk/plk2 methylation was noted in 60% and 75% of MM and WM patients respectively. Although no significant association was found between snk/plk2 methylation and clinical parameters, the increased frequency that we report merits additional study.

In summary, cyclins are overexpressed in MM, but they do not hold a significant prognostic value, confirming the theory that cyclins are not strong oncogenes, but rather need the presence of other oncogenes in order to promote B cell proliferation. Genes involved in cell cycle regulation are found to be methylated in MM and WM. Several interesting trends were noted between the genes methylation status and relevant clinical parameters. These findings warrant further evaluation in a larger sample of patients in order to enhance our statistical power and better define the prognostic value of each gene's methylation status in these diseases. In the future, defining not only the genotype but also the "methylotype" of patients will lead the way to targeted and individualized therapy with maximum efficacy and minimal toxicity.



Κατά την εκπόνηση της παρούσας διατριβής προέκυψαν οι ακόλουθες δημοσιεύσεις

1. **Hatzimichael E**, Dasoula A, Benetatos L, Makis A, Stebbing J, Crook T, Syrrou M, Bourantas KL. The absence of *CDKN1C* (p57KIP2) promoter methylation in myeloid malignancies also characterizes plasma cell neoplasms. *Br J Haematol* 2008 May;141(4):557-8
- 2* **Hatzimichael E**, Dranitsaris G, Dasoula A, Benetatos L, Tsiara St., Georgiou I, Syrrou M, Stebbing J, Crook T, Bourantas KL. Absence of epigenetic silencing in TP73 irrespective of CDKN2A methylation status in plasma cell neoplasia. *Leuk Res* (accepted)
3. **Hatzimichael E**, Dasoula A, Benetatos L, Stebbing J, Crook T, Dranitsaris G, Bourantas KL. VHL Methylation status in patients with multiple myeloma: A potential predictive factor for the development of bone disease. *Clin Lymphoma Myeloma* (under review)

Και οι ακόλουθες ανακοινώσεις σε συνέδρια

1. **Hatzimichael E**, Dasoula A, Makis A, Syrrou M, Bourantas KL. Methylation status of the p57KIP2 gene in patients with plasma cell dyscrasias. 11th Meeting of the European Haematology Association, Amsterdam, The Netherlands, 15-18 June 2006
2. **Hatzimichael E**, Dasoula A, Benetatos L, Makis A, Vassou A, Voulgaris E, Zacharopoulou K, Syrrou M, Bourantas KL. Study of the methylation status of the p57kip2 gene in patients with monoclonal gammopathies. 17th Meeting of the Hellenic Society of Haematology, 22-26 November 2006, Athens, Greece
3. **Hatzimichael E**, Dasoula A, Benetatos L, Kapsali E, Skandalis K, Georgiou I, Syrrou M, Bourantas KL. Methylation of the cyclin dependent kinase inhibitor p57KIP2 is infrequent in patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. 17th Congress of the Hellenic Society of Haematology, 22-26 November 2006, Athens, Greece
4. **Hatzimichael E**, Dasoula A, Benetatos L, Vassou A, Georgiou I, Syrrou M, Bourantas KL. Methylation status of p57KIP2 and p16INK4 in patients with plasma cell neoplasms.



12th Congress of the European Hematology Association Vienna, Austria, June 7 - 10, 2007

5. **Hatzimichael E.**, Benetatos L, Dasoula A, Skandalis K, Makis A, Vassou A, Kapsali E, Syrrou M, Bourantas KL. Methylation of the Von Hippel Lindau tumor suppressor gene is a frequent event in plasma cell neoplasias. 14-17 November 2007, Thessaloniki, Greece
6. **Hatzimichael E**, Maki K, Dasoula A, Benetatos L, Lambri E, Vassou A, Syrrou M, Bourantas KL. Methylation of the Von Hippel Lindau (VHL) tumor suppressor gene is a frequent event in plasma cell neoplasias. 13th Congress of the European Haematology Association, June 12-15, 2008, Copenhagen, Denmark
7. **Hatzimichael E**, Dasoula A, Benetatos L, Stebbing J, Dranitsaris G, Bourantas KL. VHL Methylation Status in Patients with Multiple Myeloma: A Potential Predictive Factor for the Development of Bone Disease. Lymphoma & Myeloma 2008, an International Congress on Haematologic Malignancies. The Waldorf=Astoria October 16 2008 - October 18 2008
8. **Hatzimichael E**, Dasoula A, Benetatos L, Tsiara ST, Georgiou I, Stebbing J, Dranitsaris G, Bourantas KL. Absence of TP73 promoter methylation in patients with multiple myeloma and Waldenström's macroglobulinemia. Lymphoma & Myeloma 2008, an International Congress on Haematologic Malignancies. The Waldorf=Astoria October 16 2008 - October 18 2008
9. **Hatzimichael E**, Dasoula A, Benetatos L, Tsiara S, Georgiou I, Stebbing J, Dranitsaris G, Bourantas KL. Absence of TP73 promoter methylation in patients with multiple myeloma and Waldenström's macroglobulinemia 19th Meeting of the Hellenic Society of Haematology, 19-22 November 2008



Βιβλιογραφία

- (1) Schwartz GK, Shah MA. Targeting the Cell Cycle: A New Approach to Cancer Therapy. *J Clin Oncol*. 2005;23(36):9408-9421.
- (2) Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet*. 1993;9(4):138-141.
- (3) Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE et al. Allelotype of colorectal carcinomas. *Science*. 1989;244(4901):207-211.
- (4) Nowell PC. Fifty years in cancer research. *Cancer Biol Ther*. 2002;1(6):715-717.
- (5) Fishel R, Lescoe MK, Rao MR et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell*. 1993;75(5):1027-1038.
- (6) Klein G, Klein E. Evolution of tumours and the impact of molecular oncology. *Nature*. 1985;315(6016):190-195.
- (7) Nowell PC. Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res*. 1986;46(5):2203-2207.
- (8) Holliday R, Jeggo PA. Mechanisms for changing gene expression and their possible relationship to carcinogenesis. *Cancer Surv*. 1985;4(3):557-581.
- (9) Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science*. 1994;266(5192):1821-1828.
- (10) Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992;358(6381):15-16.
- (11) Fraga MF, Ballestar E, Paz MF et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(30):10604-10609.
- (12) Humpherys D, Eggan K, Akutsu H et al. Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. *Science*. 2001;293(5527):95-97.
- (13) Waddington CH. Preliminary Notes on the Development of the Wings in Normal and Mutant Strains of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1939;25(7):299-307.
- (14) Holliday R. The inheritance of epigenetic defects. *Science*. 1987;238(4824):163-170.
- (15) Dexter TM, Spooner E. Growth and differentiation in the hemopoietic system. *Annu Rev Cell Biol*. 1987;3:423-441.
- (16) Rich IN, Riedel W, Brackmann I et al. The initiation of the hemopoietic system. The response of embryonic cells to growth factors and expression of erythropoietin and erythroid-relevant genes during murine development. *Ann N Y Acad Sci*. 1994;718:147-162.



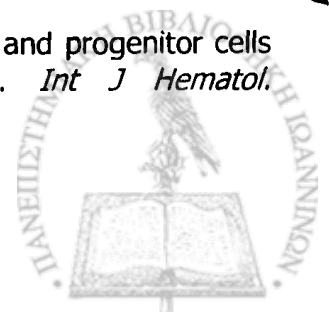
- (17) Brenner MK. Hematological malignancies. *FASEB J.* 1997;11(8):640-648.
- (18) Macintyre EA, Delabesse E. Molecular approaches to the diagnosis and evaluation of lymphoid malignancies. *Semin Hematol.* 1999;36(4):373-389.
- (19) Boultonwood J, Wainscoat JS. Clonality in the myelodysplastic syndromes. *Int J Hematol.* 2001;73(4):411-415.
- (20) Chen GL, Prchal JT. X-linked clonality testing: interpretation and limitations. *Blood.* 2007;110(5):1411-1419.
- (21) Gale RE. Evaluation of clonality in myeloid stem-cell disorders. *Semin Hematol.* 1999;36(4):361-372.
- (22) Swierczek SI, Agarwal N, Nussenzweig RH et al. Hematopoiesis is not clonal in healthy elderly women. *Blood.* 2008.
- (23) Hotta T. Clonality in hematopoietic disorders. *Int J Hematol.* 1997;66(4):403-412.
- (24) Dick JE. Human stem cell assays in immune-deficient mice. *Curr Opin Hematol.* 1996;3(6):405-409.
- (25) Kreipe H, Jaquet K, Felgner J, Parwaresch MR. Clonal analysis of agnogenic myeloid metaplasia. *Leuk Lymphoma.* 1992;8(6):459-464.
- (26) Blanchard KL, Gilliland DG, Bunn HF. Clonality in myeloproliferative disorders. *Am J Med Sci.* 1992;304(2):125-130.
- (27) Kuppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med.* 1999;341(20):1520-1529.
- (28) Shaffer AL, Rosenwald A, Staudt LM. Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(12):920-932.
- (29) Barille-Nion S, Barlogie B, Bataille R et al. Advances in biology and therapy of multiple myeloma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2003;248-278.
- (30) Chng WJ, Glebov O, Bergsagel PL, Kuehl WM. Genetic events in the pathogenesis of multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2007;20(4):571-596.
- (31) Rowley PT, Skuse GR. Oncogene expression in myelopoiesis. *Int J Cell Cloning.* 1987;5(4):255-266.
- (32) Jordan CT. Unique molecular and cellular features of acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia.* 2002;16(4):559-562.
- (33) Greaves MF, Wiemels J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(9):639-649.
- (34) Carroll WL, Bhojwani D, Min DJ et al. Childhood acute lymphoblastic leukemia in the age of genomics. *Pediatr Blood Cancer.* 2006;46(5):570-578.



- (35) Maserati E, Aprili F, Vinante F et al. Trisomy 8 in myelodysplasia and acute leukemia is constitutional in 15-20% of cases. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002;33(1):93-97.
- (36) Uozumi K, Ohno N, Shimotakahara S et al. Trisomy 8 in essential thrombocythemia in leukemic transformation. *Cancer Genet Cytogenet*. 2000;116(1):84-86.
- (37) Sessarego M, Fugazza G, Balleari E et al. High frequency of trisomy 8 in acute promyelocytic leukemia: a fluorescence in situ hybridization study. *Cancer Genet Cytogenet*. 1997;97(2):161-164.
- (38) Furitsu T, Tsujimura T, Tono T et al. Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *J Clin Invest*. 1993;92(4):1736-1744.
- (39) Lim KH, Pardanani A, Tefferi A. KIT and mastocytosis. *Acta Haematol*. 2008;119(4):194-198.
- (40) Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*. 2002;100(5):1532-1542.
- (41) Bergsagel PL, Kuehl WM. Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2005;23(26):6333-6338.
- (42) Kawamura M, Ohnishi H, Guo SX et al. Alterations of the p53, p21, p16, p15 and RAS genes in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*. 1999;23(2):115-126.
- (43) Morris SM. A role for p53 in the frequency and mechanism of mutation. *Mutat Res*. 2002;511(1):45-62.
- (44) Esteller M, Fraga MF, Paz MF et al. Cancer epigenetics and methylation. *Science*. 2002;297(5588):1807-1808.
- (45) Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*. 2008;358(11):1148-1159.
- (46) Vucic EA, Brown CJ, Lam WL. Epigenetics of cancer progression. *Pharmacogenomics*. 2008;9(2):215-234.
- (47) Claus R, Lubbert M. Epigenetic targets in hematopoietic malignancies. *Oncogene*. 2003;22(42):6489-6496.
- (48) Galm O, Herman JG, Baylin SB. The fundamental role of epigenetics in hematopoietic malignancies. *Blood Rev*. 2006;20(1):1-13.
- (49) Abreu PA, Dellamora-Ortiz G, Leao-Ferreira LR et al. DNA methylation: a promising target for the twenty-first century. *Expert Opin Ther Targets*. 2008;12(8):1035-1047.



- (50) Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S et al. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet.* 1999;21(1):103-107.
- (51) Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J et al. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell.* 1983;33(2):389-396.
- (52) Painter RB, Young BR. Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia: a new explanation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980;77(12):7315-7317.
- (53) Murray AW, Kirschner MW. Dominoes and clocks: the union of two views of the cell cycle. *Science.* 1989;246(4930):614-621.
- (54) Sherr CJ. The Pezcoller Lecture: Cancer Cell Cycles Revisited. *Cancer Res.* 2000;60(14):3689-3695.
- (55) Baserga R, Rubin R. Cell cycle and growth control. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 1993;3(1):47-61.
- (56) Pardee AB. A Restriction Point for Control of Normal Animal Cell Proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1974;71(4):1286-1290.
- (57) BASERGA R. THE RELATIONSHIP OF THE CELL CYCLE TO TUMOR GROWTH AND CONTROL OF CELL DIVISION: A REVIEW. *Cancer Res.* 1965;25:581-595.
- (58) Dash BC, El Deiry WS. Cell cycle checkpoint control mechanisms that can be disrupted in cancer. *Methods Mol Biol.* 2004;280:99-161.
- (59) Crompton NE, Saydan N. Control of the cell cycle. *J Neurooncol.* 1994;22(3):255-259.
- (60) Grana X, Reddy EP. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene.* 1995;11(2):211-219.
- (61) Boulikas T. Phosphorylation of transcription factors and control of the cell cycle. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 1995;5(1):1-77.
- (62) Farooq A, Zhou MM. Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cell Signal.* 2004;16(7):769-779.
- (63) Harper JW. Cyclin dependent kinase inhibitors. *Cancer Surv.* 1997;29:91-107.
- (64) Marone M, Bonanno G, Rutella S et al. Survival and cell cycle control in early hematopoiesis: role of bcl-2, and the cyclin dependent kinase inhibitors P27 and P21. *Leuk Lymphoma.* 2002;43(1):51-57.
- (65) Cheng T, Scadden DT. Cell cycle entry of hematopoietic stem and progenitor cells controlled by distinct cyclin-dependent kinase inhibitors. *Int J Hematol.* 2002;75(5):460-465.



- (66) Dai Y, Grant S. Cyclin-dependent kinase inhibitors. *Curr Opin Pharmacol*. 2003;3(4):362-370.
- (67) Fischer PM, Gianella-Borradori A. Recent progress in the discovery and development of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs*. 2005;14(4):457-477.
- (68) Peter M. The regulation of cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Prog Cell Cycle Res*. 1997;3:99-108.
- (69) Tsihlias J, Kapusta L, Slingerland J. The prognostic significance of altered cyclin-dependent kinase inhibitors in human cancer. *Annu Rev Med*. 1999;50:401-423.
- (70) Chevalier S, Blow JJ. Cell cycle control of replication initiation in eukaryotes. *Curr Opin Cell Biol*. 1996;8(6):815-821.
- (71) Makumbres M, Barbacid M. Milestones in cell division : To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001;1(3):222-231.
- (72) Pelech SL, Charest DL. MAP kinase-dependent pathways in cell cycle control. *Prog Cell Cycle Res*. 1995;1:33-52.
- (73) Bartek J, Bartkova J, Lukas J. The retinoblastoma protein pathway in cell cycle control and cancer. *Exp Cell Res*. 1997;237(1):1-6.
- (74) Shapiro GI. Cyclin-Dependent Kinase Pathways As Targets for Cancer Treatment. *J Clin Oncol*. 2006;24(11):1770-1783.
- (75) Ford HL, Pardee AB. The S phase: beginning, middle, and end: a perspective. *J Cell Biochem Suppl*. 1998;30-31:1-7.
- (76) Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*. 2000;408(6811):433-439.
- (77) Falck J, Petrini JH, Williams BR et al. The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways. *Nat Genet*. 2002;30(3):290-294.
- (78) Falck J, Mailand N, Syljuasen RG et al. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature*. 2001;410(6830):842-847.
- (79) Hagan IM, Bridge AJ, Morpew M, Bartlett R. Cell cycle control and the mitotic spindle. *Br J Cancer*. 1999;80 Suppl 1:6-13.
- (80) Dai W, Huang X, Ruan Q. Polo-like kinases in cell cycle checkpoint control. *Front Biosci*. 2003;8:d1128-d1133.
- (81) Shapiro GI, Harper JW. Anticancer drug targets: cell cycle and checkpoint control. *J Clin Invest*. 1999;104(12):1645-1653.
- (82) Altieri DC. Survivin in apoptosis control and cell cycle regulation in cancer. *Prog Cell Cycle Res*. 2003;5:447-452.



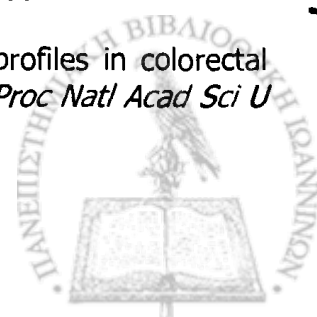
- (83) Clurman BE, Roberts JM, Groudine M. Deregulation of cell cycle control in hematologic malignancies. *Curr Opin Hematol*. 1996;3(4):315-320.
- (84) Baserga R, Porcu P, Sell C. Oncogenes, growth factors and control of the cell cycle. *Cancer Surv*. 1993;16:201-213.
- (85) Caldon CE, Daly RJ, Sutherland RL, Musgrove EA. Cell cycle control in breast cancer cells. *J Cell Biochem*. 2006;97(2):261-274.
- (86) Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
- (87) Intini D, Agnelli L, Ciceri G et al. Relevance of Ras gene mutations in the context of the molecular heterogeneity of multiple myeloma. *Hematol Oncol*. 2007;25(1):6-10.
- (88) Carter TL, Terry P, Gottardo N et al. Deletion of one copy of the p16INK4A tumor suppressor gene is implicated as a predisposing factor in pediatric leukemia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;318(4):852-855.
- (89) Maloney KW, McGavran L, Odom LF, Hunger SP. Different patterns of homozygous p16INK4A and p15INK4B deletions in childhood acute lymphoblastic leukemias containing distinct E2A translocations. *Leukemia*. 1998;12(9):1417-1421.
- (90) Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*. 2002;3(6):415-428.
- (91) Malfoy B. The revival of DNA methylation. *J Cell Sci*. 2000;113 (Pt 22):3887-3888.
- (92) Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*. 2002;16(1):6-21.
- (93) Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol*. 1987;196(2):261-282.
- (94) Constancia M, Pickard B, Kelsey G, Reik W. Imprinting mechanisms. *Genome Res*. 1998;8(9):881-900.
- (95) Cedar H. DNA methylation and gene activity. *Cell*. 1988;53(1):3-4.
- (96) Richards EJ, Elgin SC. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell*. 2002;108(4):489-500.
- (97) Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*. 1983;301(5895):89-92.
- (98) Frommer M, McDonald LE, Millar DS et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(5):1827-1831.
- (99) Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res*. 1994;22(15):2990-2997.



- (100) Gonzalgo ML, Jones PA. Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE). *Nucleic Acids Res.* 1997;25(12):2529-2531.
- (101) Sadri R, Hornsby PJ. Rapid analysis of DNA methylation using new restriction enzyme sites created by bisulfite modification. *Nucleic Acids Res.* 1996;24(24):5058-5059.
- (102) Galm O, Rountree MR, Bachman KE et al. Enzymatic regional methylation assay: a novel method to quantify regional CpG methylation density. *Genome Res.* 2002;12(1):153-157.
- (103) Corn PG, Smith BD, Ruckdeschel ES et al. E-cadherin expression is silenced by 5' CpG island methylation in acute leukemia. *Clin Cancer Res.* 2000;6(11):4243-4248.
- (104) Corn PG, Heath EI, Heitmiller R et al. Frequent hypermethylation of the 5' CpG island of E-cadherin in esophageal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 2001;7(9):2765-2769.
- (105) Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med.* 2000;343(19):1350-1354.
- (106) Galm O, Yoshikawa H, Esteller M et al. SOCS-1, a negative regulator of cytokine signaling, is frequently silenced by methylation in multiple myeloma. *Blood.* 2003;101(7):2784-2788.
- (107) Cameron EE, Baylin SB, Herman JG. p15(INK4B) CpG island methylation in primary acute leukemia is heterogeneous and suggests density as a critical factor for transcriptional silencing. *Blood.* 1999;94(7):2445-2451.
- (108) Cairns P. Detection of promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in urine from kidney cancer patients. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1022:40-43.
- (109) Cairns P, Esteller M, Herman JG et al. Molecular detection of prostate cancer in urine by GSTP1 hypermethylation. *Clin Cancer Res.* 2001;7(9):2727-2730.
- (110) Stebbing J, Bower M, Syed N et al. Epigenetics: an emerging technology in the diagnosis and treatment of cancer. *Pharmacogenomics.* 2006;7(5):747-757.
- (111) Feinberg AP, Gehrke CW, Kuo KC, Ehrlich M. Reduced genomic 5-methylcytosine content in human colonic neoplasia. *Cancer Res.* 1988;48(5):1159-1161.
- (112) Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene.* 2002;21(35):5427-5440.
- (113) Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med.* 2003;349(21):2042-2054.
- (114) Baylin SB, Herman JG, Graff JR et al. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res.* 1998;72:141-196.



- (115) Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*. 2004;429(6990):457-463.
- (116) Knudson AG. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001;1(2):157-162.
- (117) Watts GS, Pieper RO, Costello JF et al. Methylation of discrete regions of the O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) CpG island is associated with heterochromatinization of the MGMT transcription start site and silencing of the gene. *Mol Cell Biol*. 1997;17(9):5612-5619.
- (118) Viswanathan M, Tsuchida N, Shanmugam G. Promoter hypermethylation profile of tumor-associated genes p16, p15, hMLH1, MGMT and E-cadherin in oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2003;105(1):41-46.
- (119) Hesson LB, Cooper WN, Latif F. The role of RASSF1A methylation in cancer. *Dis Markers*. 2007;23(1-2):73-87.
- (120) Kim WY, Kaelin WG. Role of VHL gene mutation in human cancer. *J Clin Oncol*. 2004;22(24):4991-5004.
- (121) Karlan BY. Defining cancer risks for BRCA germline mutation carriers: implications for surgical prophylaxis. *Gynecol Oncol*. 2004;92(2):519-520.
- (122) Nkondjock A, Ghadirian P. Epidemiology of breast cancer among BRCA mutation carriers: an overview. *Cancer Lett*. 2004;205(1):1-8.
- (123) Lim W, Olschwang S, Keller JJ et al. Relative frequency and morphology of cancers in STK11 mutation carriers. *Gastroenterology*. 2004;126(7):1788-1794.
- (124) Wei M, Xu J, Dignam J et al. Estrogen receptor alpha, BRCA1, and FANCF promoter methylation occur in distinct subsets of sporadic breast cancers. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;111(1):113-120.
- (125) Herman JG, Latif F, Weng Y et al. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(21):9700-9704.
- (126) Trojan J, Brieger A, Raedle J et al. 5'-CpG island methylation of the LKB1/STK11 promoter and allelic loss at chromosome 19p13.3 in sporadic colorectal cancer. *Gut*. 2000;47(2):272-276.
- (127) Birgisdottir V, Stefansson OA, Bodvarsdottir SK et al. Epigenetic silencing and deletion of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2006;8(4):R38.
- (128) Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M et al. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(15):8681-8686.
- (129) Toyota M, Ohe-Toyota M, Ahuja N, Issa JP. Distinct genetic profiles in colorectal tumors with or without the CpG island methylator phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(2):710-715.



- (130) Esteller M. Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005;45:629-656.
- (131) Issa JP, Baylin SB, Herman JG. DNA methylation changes in hematologic malignancies: biologic and clinical implications. *Leukemia.* 1997;11 Suppl 1:S7-11.
- (132) Takahashi T, Shivapurkar N, Reddy J et al. DNA methylation profiles of lymphoid and hematopoietic malignancies. *Clin Cancer Res.* 2004;10(9):2928-2935.
- (133) Esteller M. Profiling aberrant DNA methylation in hematologic neoplasms: a view from the tip of the iceberg. *Clin Immunol.* 2003;109(1):80-88.
- (134) Chim CS, Liang R, Leung MH, Kwong YL. Aberrant gene methylation implicated in the progression of monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma. *J Clin Pathol.* 2007;60(1):104-106.
- (135) Guillemin G, Gyan E, Wolowiec D et al. p16(INK4a) and p15(INK4b) gene methylations in plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood.* 2001;98(1):244-246.
- (136) Li Y, Nagai H, Ohno T et al. Aberrant DNA methylation of p57(KIP2) gene in the promoter region in lymphoid malignancies of B-cell phenotype. *Blood.* 2002;100(7):2572-2577.
- (137) Esteller M, Gaidano G, Goodman SN et al. Hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine DNA methyltransferase and survival of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94(1):26-32.
- (138) Rossi D, Capello D, Gloghini A et al. Aberrant promoter methylation of multiple genes throughout the clinico-pathologic spectrum of B-cell neoplasia. *Haematologica.* 2004;89(2):154-164.
- (139) Rossi D, Berra E, Cerri M et al. Aberrant somatic hypermutation in transformation of follicular lymphoma and chronic lymphocytic leukemia to diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica.* 2006;91(10):1405-1409.
- (140) Ng MH, Wong IH, Lo KW. DNA methylation changes and multiple myeloma. *Leuk Lymphoma.* 1999;34(5-6):463-472.
- (141) Gonzalez M, Mateos MV, Garcia-Sanz R et al. De novo methylation of tumor suppressor gene p16/INK4a is a frequent finding in multiple myeloma patients at diagnosis. *Leukemia.* 2000;14(1):183-187.
- (142) Garcia-Manero G, Daniel J, Smith TL et al. DNA methylation of multiple promoter-associated CpG islands in adult acute lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res.* 2002;8(7):2217-2224.
- (143) Chim CS, Liang R, Kwong YL. Hypermethylation of gene promoters in hematological neoplasia. *Hematol Oncol.* 2002;20(4):167-176.



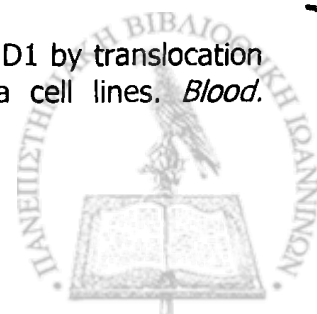
- (144) Chim CS, Liang R, Tam CY, Kwong YL. Methylation of p15 and p16 genes in acute promyelocytic leukemia: potential diagnostic and prognostic significance. *J Clin Oncol.* 2001;19(7):2033-2040.
- (145) Hideshima T, Bergsagel PL, Kuehl WM, Anderson KC. Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood.* 2004;104(3):607-618.
- (146) Grimwade D, Walker H, Oliver F et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood.* 1998;92(7):2322-2333.
- (147) Wong IH, Lo YM, Johnson PJ. Epigenetic tumor markers in plasma and serum: biology and applications to molecular diagnosis and disease monitoring. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;945:36-50.
- (148) Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Castillejo JA et al. Promoter hypermethylation of cancer-related genes: a strong independent prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2004;104(8):2492-2498.
- (149) Galm O, Wilop S, Reichelt J et al. DNA methylation changes in multiple myeloma. *Leukemia.* 2004;18(10):1687-1692.
- (150) Mateos MV, Gonzalez M, Balanzategui A et al. Status of methylation of p16 gene in multiple myeloma: a comparative study of three methods for its detection. *Clin Biochem.* 2000;33(5):415-418.
- (151) Kramer A, Schultheis B, Bergmann J et al. Alterations of the cyclin D1/pRb/p16(INK4A) pathway in multiple myeloma. *Leukemia.* 2002;16(9):1844-1851.
- (152) Ng MH, To KW, Lo KW et al. Frequent death-associated protein kinase promoter hypermethylation in multiple myeloma. *Clin Cancer Res.* 2001;7(6):1724-1729.
- (153) Stirzaker C, Millar DS, Paul CL et al. Extensive DNA methylation spanning the Rb promoter in retinoblastoma tumors. *Cancer Res.* 1997;57(11):2229-2237.
- (154) Esteller M, Corn PG, Urena JM et al. Inactivation of glutathione S-transferase P1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia. *Cancer Res.* 1998;58(20):4515-4518.
- (155) Jones PA, Taylor SM. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell.* 1980;20(1):85-93.
- (156) Paz MF, Fraga MF, Avila S et al. A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell lines. *Cancer Res.* 2003;63(5):1114-1121.
- (157) Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL et al. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol.* 2002;20(10):2429-2440.



- (158) Kantarjian HM, O'Brien S, Cortes J et al. Results of decitabine (5-aza-2'-deoxycytidine) therapy in 130 patients with chronic myelogenous leukemia. *Cancer*. 2003;98(3):522-528.
- (159) Issa JP, Garcia-Manero G, Giles FJ et al. Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies. *Blood*. 2004;103(5):1635-1640.
- (160) Kyle RA. The monoclonal gammopathies. *Clin Chem*. 1994;40(11 Pt 2):2154-2161.
- (161) Jaffe E, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (editors). Plasma cell neoplasms, in Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. World Health Organization Classification of tumours, Lyon, 2001, pp142
- (162) Alexander DD, Mink PJ, Adami HO et al. Multiple myeloma: a review of the epidemiologic literature. *Int J Cancer*. 2007;120 Suppl 12:40-61.
- (163) Kyle RA. Sequence of testing for monoclonal gammopathies. *Arch Pathol Lab Med*. 1999;123(2):114-118.
- (164) Mitsiades CS, McMillin DW, Klippel S et al. The role of the bone marrow microenvironment in the pathophysiology of myeloma and its significance in the development of more effective therapies. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2007;21(6):1007-viii.
- (165) Caers J, Van Valckenborgh E, Menu E et al. Unraveling the biology of multiple myeloma disease: cancer stem cells, acquired intracellular changes and interactions with the surrounding micro-environment. *Bull Cancer*. 2008;95(3):301-313.
- (166) Hideshima T, Podar K, Chauhan D, Anderson KC. Cytokines and signal transduction. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2005;18(4):509-524.
- (167) Gilmore TD. Multiple myeloma: lusting for NF-kappaB. *Cancer Cell*. 2007;12(2):95-97.
- (168) De Raeve HR, Vanderkerken K. The role of the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. *Histol Histopathol*. 2005;20(4):1227-1250.
- (169) Greer J, Foerster, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas, Glader B. Multiple Myeloma in Wintrobe's Clinical Hematology. 11th edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2004, pp2589-2609
- (170) Kyle RA. Multiple myeloma: how did it begin? *Mayo Clin Proc*. 1994;69(7):680-683.
- (171) Kyle RA. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood Rev*. 1994;8(3):135-141.
- (172) Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV et al. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med*. 2002;346(8):564-569.



- (173) Rosinol L, Blade J, Esteve J et al. Smoldering multiple myeloma: natural history and recognition of an evolving type. *Br J Haematol*. 2003;123(4):631-636.
- (174) Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer*. 1975;36(3):842-854.
- (175) Rajkumar SV, Buadi F. Multiple myeloma: new staging systems for diagnosis, prognosis and response evaluation. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2007;20(4):665-680.
- (176) Kyle RA, Anderson KC. A tribute to Jan Gosta Waldenstrom. *Blood*. 1997;89(12):4245-4247.
- (177) Johnson SA. Waldenstrom's macroglobulinemia. *Rev Clin Exp Hematol*. 2002;6(4):421-434.
- (178) Dimopoulos MA, Anagnostopoulos A. Waldenstrom's macroglobulinemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2005;18(4):747-765.
- (179) Treon SP, Hatjiharissi E, Merlini G. Waldenstrom's macroglobulinemia/lymphoplasmacytic lymphoma. *Cancer Treat Res*. 2008;142:211-242.
- (180) Singhal N, Bapsy PP, Babu KG, Sahoo TP. Waldenstrom's macroglobulinemia. *J Assoc Physicians India*. 2004;52:981-985.
- (181) Stone MJ, Merlini G, Pascual V. Autoantibody activity in Waldenstrom's macroglobulinemia. *Clin Lymphoma*. 2005;5(4):225-229.
- (182) Kuehl WM, Bergsagel PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(3):175-187.
- (183) Rajkumar SV, Fonseca R, Dewald GW et al. Cytogenetic abnormalities correlate with the plasma cell labeling index and extent of bone marrow involvement in myeloma. *Cancer Genet Cytogenet*. 1999;113(1):73-77.
- (184) Fonseca R, Debes-Marun CS, Picken EB et al. The recurrent IgH translocations are highly associated with nonhyperdiploid variant multiple myeloma. *Blood*. 2003;102(7):2562-2567.
- (185) Avet-Loiseau H, Facon T, Grosbois B et al. Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features, and clinical presentation. *Blood*. 2002;99(6):2185-2191.
- (186) Shou Y, Martelli ML, Gabrea A et al. Diverse karyotypic abnormalities of the c-myc locus associated with c-myc dysregulation and tumor progression in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(1):228-233.
- (187) Chesi M, Bergsagel PL, Brents LA et al. Dysregulation of cyclin D1 by translocation into an IgH gamma switch region in two multiple myeloma cell lines. *Blood*. 1996;88(2):674-681.



- (188) Chesi M, Nardini E, Brents LA et al. Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet.* 1997;16(3):260-264.
- (189) Chesi M, Bergsagel PL, Shonukan OO et al. Frequent dysregulation of the c-maf proto-oncogene at 16q23 by translocation to an Ig locus in multiple myeloma. *Blood.* 1998;91(12):4457-4463.
- (190) Shaughnessy J, Jr., Gabrea A, Qi Y et al. Cyclin D3 at 6p21 is dysregulated by recurrent chromosomal translocations to immunoglobulin loci in multiple myeloma. *Blood.* 2001;98(1):217-223.
- (191) Fonseca R, Oken MM, Harrington D et al. Deletions of chromosome 13 in multiple myeloma identified by interphase FISH usually denote large deletions of the q arm or monosomy. *Leukemia.* 2001;15(6):981-986.
- (192) Triet G, Barlogie B, Jagannath S et al. Poor prognosis in multiple myeloma is associated only with partial or complete deletions of chromosome 13 or abnormalities involving 11q and not with other karyotype abnormalities. *Blood.* 1995;86(11):4250-4256.
- (193) Smadja NV, Bastard C, Brigaudeau C et al. Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood.* 2001;98(7):2229-2238.
- (194) Smadja NV, Leroux D, Soulier J et al. Further cytogenetic characterization of multiple myeloma confirms that 14q32 translocations are a very rare event in hyperdiploid cases. *Genes Chromosomes Cancer.* 2003;38(3):234-239.
- (195) Bergsagel PL, Kuehl WM, Zhan F et al. Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood.* 2005;106(1):296-303.
- (196) Bergsagel PL, Kuehl WM. Critical roles for immunoglobulin translocations and cyclin D dysregulation in multiple myeloma. *Immunol Rev.* 2003;194:96-104.
- (197) Fonseca R, Blood E, Rue M et al. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood.* 2003;101(11):4569-4575.
- (198) Moreau P, Facon T, Leleu X et al. Recurrent 14q32 translocations determine the prognosis of multiple myeloma, especially in patients receiving intensive chemotherapy. *Blood.* 2002;100(5):1579-1583.
- (199) Obaya AJ, Sedivy JM. Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59(1):126-142.
- (200) Batova A, Diccianni MB, Yu JC et al. Frequent and selective methylation of p15 and deletion of both p15 and p16 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.* 1997;57(5):832-836.
- (201) Drexler HG. Review of alterations of the cyclin-dependent kinase inhibitor INK4 family genes p15, p16, p18 and p19 in human leukemia-lymphoma cells. *Leukemia.* 1998;12(6):845-859.



- (202) Chim CS, Wong AS, Kwong YL. Epigenetic inactivation of INK4/CDK/RB cell cycle pathway in acute leukemias. *Ann Hematol.* 2003;82(12):738-742.
- (203) Feng XH, Lin X, Derynck R. Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15(Ink4B) transcription in response to TGF-beta. *EMBO J.* 2000;19(19):5178-5193.
- (204) Graf EH, Taube T, Hartmann R et al. Deletion analysis of p16(INKa) and p15(INKb) in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2002;99(12):4629-4631.
- (205) Ekmekci CG, Gutierrez MI, Siraj AK et al. Aberrant methylation of multiple tumor suppressor genes in acute myeloid leukemia. *Am J Hematol.* 2004;77(3):233-240.
- (206) Teofili L, Martini M, Luongo M et al. Hypermethylation of CpG islands in the promoter region of p15(INK4b) in acute promyelocytic leukemia represses p15(INK4b) expression and correlates with poor prognosis. *Leukemia.* 2003;17(5):919-924.
- (207) Chen W, Zhu J, Liu J, Tan S. Methylation of p16 gene in hematological malignancies. *Chin Med J (Engl.)*. 1998;111(11):1028-1030.
- (208) Sanchez-Beato M, Saez AI, Navas IC et al. Overall survival in aggressive B-cell lymphomas is dependent on the accumulation of alterations in p53, p16, and p27. *Am J Pathol.* 2001;159(1):205-213.
- (209) Chen W, Wu Y, Zhu J et al. Methylation of p16 and p15 genes in multiple myeloma. *Chin Med Sci J.* 2002;17(2):101-105.
- (210) Gonzalez-Paz N, Chng WJ, McClure RF et al. Tumor suppressor p16 methylation in multiple myeloma: biological and clinical implications. *Blood.* 2007;109(3):1228-1232.
- (211) Chiusolo P, Farina G, Putzulu R et al. Analysis of MTHFR polymorphisms and P16 methylation and their correlation with clinical-biological features of multiple myeloma. *Ann Hematol.* 2006;85(7):474-477.
- (212) Mateos MV, Garcia-Sanz R, Lopez-Perez R et al. Methylation is an inactivating mechanism of the p16 gene in multiple myeloma associated with high plasma cell proliferation and short survival. *Br J Haematol.* 2002;118(4):1034-1040.
- (213) Algar E, Brickell S, Deeble G et al. Analysis of CDKN1C in Beckwith Wiedemann syndrome. *Hum Mutat.* 2000;15(6):497-508.
- (214) Cerrato F, Sparago A, Di M, I et al. The two-domain hypothesis in Beckwith-Wiedemann syndrome: autonomous imprinting of the telomeric domain of the distal chromosome 7 cluster. *Hum Mol Genet.* 2005;14(4):503-511.
- (215) Diaz-Meyer N, Day CD, Khatod K et al. Silencing of CDKN1C (p57KIP2) is associated with hypomethylation at KvDMR1 in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Med Genet.* 2003;40(11):797-801.



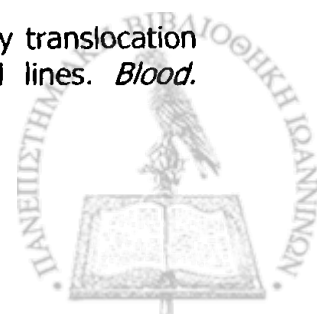
- (216) Lai S, Goepfert H, Gillenwater AM et al. Loss of imprinting and genetic alterations of the cyclin-dependent kinase inhibitor p57KIP2 gene in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2000;6(8):3172-3176.
- (217) Higashimoto K, Soejima H, Saito T et al. Imprinting disruption of the CDKN1C/KCNQ1OT1 domain: the molecular mechanisms causing Beckwith-Wiedemann syndrome and cancer. *Cytogenet Genome Res.* 2006;113(1-4):306-312.
- (218) Feinberg AP. The two-domain hypothesis in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Clin Invest.* 2000;106(6):739-740.
- (219) Scandura JM, Boccuni P, Massague J, Nimer SD. Transforming growth factor beta-induced cell cycle arrest of human hematopoietic cells requires p57KIP2 up-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(42):15231-15236.
- (220) Kuang SQ, Ling X, Sanchez-Gonzalez B et al. Differential tumor suppressor properties and transforming growth factor-beta responsiveness of p57KIP2 in leukemia cells with aberrant p57KIP2 promoter DNA methylation. *Oncogene.* 2007;26(10):1439-1448.
- (221) Hatada I, Ohashi H, Fukushima Y et al. An imprinted gene p57KIP2 is mutated in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nat Genet.* 1996;14(2):171-173.
- (222) Brakensiek K, Langer F, Kreipe H, Lehmann U. Absence of p21(CIP 1), p27(KIP 1) and p 57(KIP 2) methylation in MDS and AML. *Leuk Res.* 2005;29(11):1357-1360.
- (223) Kikuchi T, Toyota M, Itoh F et al. Inactivation of p57KIP2 by regional promoter hypermethylation and histone deacetylation in human tumors. *Oncogene.* 2002;21(17):2741-2749.
- (224) Kaghad M, Bonnet H, Yang A et al. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell.* 1997;90(4):809-819.
- (225) Melino G. p73, the "assistant" guardian of the genome? *Ann N Y Acad Sci.* 2003;1010:9-15.
- (226) Ceskova P, Valik D, Vojtesek B. What we currently know about the structure and function of the p53 homologue - p73 protein: facts, hypotheses and expectations. *Folia Biol (Praha).* 2003;49(1):1-8.
- (227) Coates PJ. Regulating p73 isoforms in human tumours. *J Pathol.* 2006;210(4):385-389.
- (228) Dobbstein M, Strano S, Roth J, Blandino G. p73-induced apoptosis: a question of compartments and cooperation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;331(3):688-693.
- (229) Jacobs WB, Walsh GS, Miller FD. Neuronal survival and p73/p63/p53: a family affair. *Neuroscientist.* 2004;10(5):443-455.



- (230) Yang A, Kaghad M, Caput D, McKeon F. On the shoulders of giants: p63, p73 and the rise of p53. *Trends Genet.* 2002;18(2):90-95.
- (231) De L, V, Melino G. Evolution of functions within the p53/p63/p73 family. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;926:90-100.
- (232) Ichimiya S, Nakagawara A, Sakuma Y et al. p73: structure and function. *Pathol Int.* 2000;50(8):589-593.
- (233) Melino G. p73, the "assistant" guardian of the genome? *Ann N Y Acad Sci.* 2003;1010:9-15.
- (234) Melino G, Lu X, Gasco M et al. Functional regulation of p73 and p63: development and cancer. *Trends Biochem Sci.* 2003;28(12):663-670.
- (235) Oberst A, Rossi M, Salomoni P et al. Regulation of the p73 protein stability and degradation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;331(3):707-712.
- (236) Ohtsuka T, Ryu H, Minamishima YA et al. Modulation of p53 and p73 levels by cyclin G: implication of a negative feedback regulation. *Oncogene.* 2003;22(11):1678-1687.
- (237) Ikawa S, Nakagawara A, Ikawa Y. p53 family genes: structural comparison, expression and mutation. *Cell Death Differ.* 1999;6(12):1154-1161.
- (238) Corn PG, Kuerbitz SJ, van Noesel MM et al. Transcriptional silencing of the p73 gene in acute lymphoblastic leukemia and Burkitt's lymphoma is associated with 5' CpG island methylation. *Cancer Res.* 1999;59(14):3352-3356.
- (239) Garcia-Manero G, Daniel J, Smith TL et al. DNA methylation of multiple promoter-associated CpG islands in adult acute lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res.* 2002;8(7):2217-2224.
- (240) Lindstrom MS, Wiman KG. Role of genetic and epigenetic changes in Burkitt lymphoma. *Semin Cancer Biol.* 2002;12(5):381-387.
- (241) Pluta A, Nyman U, Joseph B et al. The role of p73 in hematological malignancies. *Leukemia.* 2006;20(5):757-766.
- (242) van de Weerd BC, Medema RH. Polo-like kinases: a team in control of the division. *Cell Cycle.* 2006;5(8):853-864.
- (243) Carmena M, Riparbelli MG, Minestrini G et al. Drosophila polo kinase is required for cytokinesis. *J Cell Biol.* 1998;143(3):659-671.
- (244) Golsteyn RM, Lane HA, Mundt KE et al. The family of polo-like kinases. *Prog Cell Cycle Res.* 1996;2:107-114.
- (245) Nigg EA. Polo-like kinases: positive regulators of cell division from start to finish. *Curr Opin Cell Biol.* 1998;10(6):776-783.



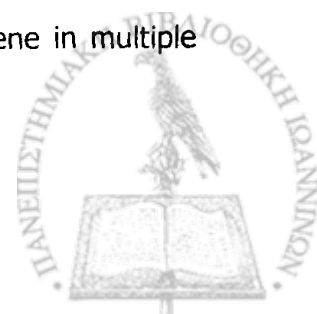
- (246) Smith P, Syed N, Crook T. Epigenetic inactivation implies a tumor suppressor function in hematologic malignancies for Polo-like kinase 2 but not Polo-like kinase 3. *Cell Cycle*. 2006;5(12):1262-1264.
- (247) Ma S, Charron J, Erikson RL. Role of Plk2 (Snk) in mouse development and cell proliferation. *Mol Cell Biol*. 2003;23(19):6936-6943.
- (248) Syed N, Smith P, Sullivan A et al. Transcriptional silencing of Polo-like kinase 2 (SNK/PLK2) is a frequent event in B-cell malignancies. *Blood*. 2006;107(1):250-256.
- (249) Reed SI. The ubiquitin-proteasome pathway in cell cycle control. *Results Probl Cell Differ*. 2006;42:147-181.
- (250) Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin pathway for the degradation of intracellular proteins. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1986;33:19-56, 301.
- (251) Ohh M. Ubiquitin pathway in VHL cancer syndrome. *Neoplasia*. 2006;8(8):623-629.
- (252) del Peso L, Castellanos MC, Temes E et al. The von Hippel Lindau/hypoxia-inducible factor (HIF) pathway regulates the transcription of the HIF-proline hydroxylase genes in response to low oxygen. *J Biol Chem*. 2003;278(49):48690-48695.
- (253) Asosingh K, De Raeve H, de Ridder M et al. Role of the hypoxic bone marrow microenvironment in 5T2MM murine myeloma tumor progression. *Haematologica*. 2005;90(6):810-817.
- (254) Xu XL, Yu J, Zhang HY et al. Methylation profile of the promoter CpG islands of 31 genes that may contribute to colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol*. 2004;10(23):3441-3454.
- (255) Frommer M, McDonald LE, Millar DS et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(5):1827-1831.
- (256) Herman JG, Jen J, Merlo A, Baylin SB. Hypermethylation-associated inactivation indicates a tumor suppressor role for p15INK4B. *Cancer Res*. 1996;56(4):722-727.
- (257) Hatzimichael E, Dasoula A, Benetatos L et al. The absence of CDKN1C (p57KIP2) promoter methylation in myeloid malignancies also characterizes plasma cell neoplasms. *Br J Haematol*. 2008;141(4):557-558.
- (258) Hatzimichael E, Dasoula A, Benetatos L et al. Methylation status of p57KIP2 and p16INK4 in patients with plasma cell neoplasms. *Haematologica-the Hematology Journal*. 2007;92:398.
- (259) Kobayashi H, Saito H, Kitano K et al. Overexpression of the PRAD1 oncogene in a patient with multiple myeloma and t(11;14)(q13;q32). *Acta Haematol*. 1995;94(4):199-203.
- (260) Chesi M, Bergsagel PL, Brents LA et al. Dysregulation of cyclin D1 by translocation into an IgH gamma switch region in two multiple myeloma cell lines. *Blood*. 1996;88(2):674-681.



- (261) Gabrea A, Bergsagel PL, Chesi M et al. Insertion of excised IgH switch sequences causes overexpression of cyclin D1 in a myeloma tumor cell. *Mol Cell.* 1999;3(1):119-123.
- (262) Shaughnessy J, Jr., Gabrea A, Qi Y et al. Cyclin D3 at 6p21 is dysregulated by recurrent chromosomal translocations to immunoglobulin loci in multiple myeloma. *Blood.* 2001;98(1):217-223.
- (263) Bergsagel PL, Kuehl WM. Chromosome translocations in multiple myeloma. *Oncogene.* 2001;20(40):5611-5622.
- (264) Hoechtlen-Vollmar W, Menzel G, Bartl R et al. Amplification of cyclin D1 gene in multiple myeloma: clinical and prognostic relevance. *Br J Haematol.* 2000;109(1):30-38.
- (265) Fonseca R, Witzig TE, Gertz MA et al. Multiple myeloma and the translocation t(11;14)(q13;q32): a report on 13 cases. *Br J Haematol.* 1998;101(2):296-301.
- (266) Markovic O, Marisavljevic D, Cemerikic V et al. Immunohistochemical analysis of cyclin D1 and p53 in multiple myeloma: relationship to proliferative activity and prognostic significance. *Med Oncol.* 2004;21(1):73-80.
- (267) Rasmussen T, Knudsen LM, Johnsen HE. Frequency and prognostic relevance of cyclin D1 dysregulation in multiple myeloma. *Eur J Haematol.* 2001;67(5-6):296-301.
- (268) Cook JR, Hsi ED, Worley S et al. Immunohistochemical analysis identifies two cyclin D1+ subsets of plasma cell myeloma, each associated with favorable survival. *Am J Clin Pathol.* 2006;125(4):615-624.
- (269) Soverini S, Cavo M, Cellini C et al. Cyclin D1 overexpression is a favorable prognostic variable for newly diagnosed multiple myeloma patients treated with high-dose chemotherapy and single or double autologous transplantation. *Blood.* 2003;102(5):1588-1594.
- (270) Avet-Loiseau H, Daviet A, Brigaudeau C et al. Cytogenetic, interphase, and multicolor fluorescence in situ hybridization analyses in primary plasma cell leukemia: a study of 40 patients at diagnosis, on behalf of the Intergroupe Francophone du Myelome and the Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique. *Blood.* 2001;97(3):822-825.
- (271) San Miguel JF, Garcia-Sanz R, Gonzalez M et al. A new staging system for multiple myeloma based on the number of S-phase plasma cells. *Blood.* 1995;85(2):448-455.
- (272) Bates S, Peters G. Cyclin D1 as a cellular proto-oncogene. *Semin Cancer Biol.* 1995;6(2):73-82.
- (273) Bodrug SE, Warner BJ, Bath ML et al. Cyclin D1 transgene impedes lymphocyte maturation and collaborates in lymphomagenesis with the myc gene. *EMBO J.* 1994;13(9):2124-2130.



- (274) Lovec H, Grzeschiczek A, Kowalski MB, Moroy T. Cyclin D1/bcl-1 cooperates with myc genes in the generation of B-cell lymphoma in transgenic mice. *EMBO J*. 1994;13(15):3487-3495.
- (275) Shen L, Toyota M, Kondo Y et al. Aberrant DNA methylation of p57KIP2 identifies a cell-cycle regulatory pathway with prognostic impact in adult acute lymphocytic leukemia. *Blood*. 2003;101(10):4131-4136.
- (276) Hayslip J, Montero A. Tumor suppressor gene methylation in follicular lymphoma: a comprehensive review. *Mol Cancer*. 2006;5:44.
- (277) Chim CS, Fung TK, Wong KF et al. Methylation of INK4 and CIP/KIP families of cyclin-dependent kinase inhibitor in chronic lymphocytic leukaemia in Chinese patients. *J Clin Pathol*. 2006;59(9):921-926.
- (278) Min KO, Seo EJ, Kwon HJ et al. Methylation of p16(INK4A) and p57(KIP2) are involved in the development and progression of gastric MALT lymphomas. *Mod Pathol*. 2006;19(1):141-148.
- (279) Yang A, Walker N, Bronson R et al. p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature*. 2000;404(6773):99-103.
- (280) Ryan BM, McManus R, Daly JS et al. A common p73 polymorphism is associated with a reduced incidence of oesophageal carcinoma. *Br J Cancer*. 2001;85(10):1499-1503.
- (281) Chim CS, Wong SY, Kwong YL. Aberrant gene promoter methylation in acute promyelocytic leukaemia: profile and prognostic significance. *Br J Haematol*. 2003;122(4):571-578.
- (282) Corn PG, Kuerbitz SJ, van Noesel MM et al. Transcriptional silencing of the p73 gene in acute lymphoblastic leukemia and Burkitt's lymphoma is associated with 5' CpG island methylation. *Cancer Res*. 1999;59(14):3352-3356.
- (283) Gutierrez MI, Siraj AK, Bhargava M et al. Concurrent methylation of multiple genes in childhood ALL: Correlation with phenotype and molecular subgroup. *Leukemia*. 2003;17(9):1845-1850.
- (284) Siu LL, Chan JK, Wong KF, Kwong YL. Specific patterns of gene methylation in natural killer cell lymphomas : p73 is consistently involved. *Am J Pathol*. 2002;160(1):59-66.
- (285) Chim CS, Kwong YL, Fung TK, Liang R. Methylation profiling in multiple myeloma. *Leuk Res*. 2004;28(4):379-385.
- (286) Ng MH, Chung YF, Lo KW et al. Frequent hypermethylation of p16 and p15 genes in multiple myeloma. *Blood*. 1997;89(7):2500-2506.
- (287) Tasaka T, Asou H, Munker R et al. Methylation of the p16INK4A gene in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 1998;101(3):558-564.



- (288) Mateos MV, Garcia-Sanz R, Lopez-Perez R et al. p16/INK4a gene inactivation by hypermethylation is associated with aggressive variants of monoclonal gammopathies. *Hematol J*. 2001;2(3):146-149.
- (289) Uchida T, Kinoshita T, Ohno T et al. Hypermethylation of p16INK4A gene promoter during the progression of plasma cell dyscrasia. *Leukemia*. 2001;15(1):157-165.
- (290) Guillerm G, Depil S, Wolowiec D, Quesnel B. Different prognostic values of p15(INK4b) and p16(INK4a) gene methylations in multiple myeloma. *Haematologica*. 2003;88(4):476-478.
- (291) Uchida T, Kinoshita T, Nagai H et al. Hypermethylation of the p15INK4B gene in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997;90(4):1403-1409.
- (292) Uchida T, Kinoshita T, Hotta T, Murate T. High-risk myelodysplastic syndromes and hypermethylation of the p15Ink4B gene. *Leuk Lymphoma*. 1998;32(1-2):9-18.
- (293) Quesnel B, Fenaux P. P15INK4b gene methylation and myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma*. 1999;35(5-6):437-443.
- (294) Quesnel B, Guillerm G, Vereecque R et al. Methylation of the p15(INK4b) gene in myelodysplastic syndromes is frequent and acquired during disease progression. *Blood*. 1998;91(8):2985-2990.
- (295) Dulaimi E, Ibanez dC, I, Uzzo RG et al. Promoter hypermethylation profile of kidney cancer. *Clin Cancer Res*. 2004;10(12 Pt 1):3972-3979.
- (296) Benetatos L, Dasoula A, Syed N et al. Methylation analysis of the von Hippel-Lindau gene in acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2008;22(6):1293-1295.
- (297) An J, Rettig MB. Mechanism of von Hippel-Lindau protein-mediated suppression of nuclear factor kappa B activity. *Mol Cell Biol*. 2005;25(17):7546-7556.
- (298) An J, Fisher M, Rettig MB. VHL expression in renal cell carcinoma sensitizes to bortezomib (PS-341) through an NF-kappaB-dependent mechanism. *Oncogene*. 2005;24(9):1563-1570.

