



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

**ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΣΤΗ ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ.
Η ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΠΡΟΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ.**

ΑΜΑΛΙΑ Χ. ΒΑΣΣΟΥ
ΙΑΤΡΟΣ
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2010

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα.

N. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)

Ημερομηνία αίτησης της κ Βάσσου Αμαλίας: 23-5-2002

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 481^ο/25-6-2002

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Μπουραντάς Κωνσταντίνος Καθηγητής Παθολογίας –Αιματολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη:

Μπάη Μαρία Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Γεωργίου Ιωάννη Επίκουρο Καθηγητή Μαιευτικής –Γυναικολογίας με γνώσεις κλινικής γενετικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 21-1-2003

«Ανοσοφαινοτυπική και κυτταρογενετική μελέτη στην Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία: Η συμβολή τους στην πρόγνωση της νόσου»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 683^ο/11-5-2010

Ανδρονίκου Στυλιανή	Καθηγήτρια Νεογνολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Γεωργίου Ιωάννης	Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής –Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπάη Μαρία	Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπερής Αλέξανδρος	Καθηγητής Ορθοπαιδικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπουραντάς Κωνσταντίνος	Καθηγητής Παθολογίας –Αιματολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μακροδήμας Γεώργιος	Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής –Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Καψάλη Ελένη	Λέκτορα Αιματολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΕΤΑ» στις 26-5-2010

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Ιωάννης Γουδέβενος

Καθηγητής Παθολογίας- Καρδιολογίας



Η Καθηγήτρια της Σχολής

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΒΕΝΤΖΟΥΡΗ -ΖΩΗ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους συναδέλφους και συνεργάτες που με στήριξαν, συμβούλευσαν και βοήθησαν ποικιλοτρόπως κατά την εκπόνηση της διατριβής μου, ιδιαιτέρως:

Τον καθηγητή Κ.Λ.Μπουραντά

Τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής

Τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής

Τις εκλεκτές κυρίες:

Ελευθερία Χατζημιχαήλ, ιατρό

Αγγελική Δασούλα, βιολόγο

Κωνσταντίνα Ζαχαροπούλου, νοσηλεύτρια

Λαμπρινή Κεφάλα, παρασκευάστρια

Όλους τους συνεργάτες ιατρούς και το νοσηλευτικό προσωπικό της

Αιματολογικής Κλινικής, τους ασθενείς μας

και την οικογένειά μου για την βοήθεια και στήριξή τους.

ΑΦΙΕΡΩΝΕΤΑΙ

Στη μνήμη του αγαπημένου μου πατέρα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Κατά την επιστροφή μου από την διετή μετεκπαίδευση μου στην Γλασκώβη στο πεδίο των αιματολογικών κακοηθειών, είχα την τύχη να εργαστώ στην Αιματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων σε ένα περιβάλλον φιλόξενο και δημιουργικό, υπό την καθοδήγηση του Καθηγητή Παθολογίας-Αιματολογίας κ. Κ. Λ Μπουραντά. Κοινή παρατήρηση δικιά μου, των συνεργατών και του Καθηγητή Κ. Λ Μπουραντά ήταν η ετερογενής βιολογική συμπεριφορά και ποικίλλουσα κλινική πορεία των ασθενών με Χρονία Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (ΧΛΛ). Η πληθυσμιακή αυτή ομάδα αρρώστων περιελάμβανε ασθενείς με έρπουσα νόσο που διέδραμε αργά διά δεκαετιών όσο και ασθενείς που φέρουν νόσο με ταχεία εξέλιξη και δυσμενή βιολογία. Η ίδια ετερογένεια έχει περιγραφεί και ως προς την απάντηση των αρρώστων με ΧΛΛ σε θεραπευτικούς χειρισμούς. Η κατανόηση της παθοφυσιολογίας της ΧΛΛ, η μελέτη μοριακών μονοπατιών που καθορίζουν με κομβικό τρόπο την βιολογική συμπεριφορά της κακοήθειας και η ταυτοποίηση βιοδεικτών που καθορίζουν πρόγνωση και απάντηση στην θεραπεία είναι ολοφάνερα επιδιώξεις σημαντικές. Η ερευνητική δραστηριότητα της Αιματολογικής Κλινικής κατέστησε τα παραπάνω στόχους με σαφή προτεραιότητα για την καλύτερη εκτίμηση της πρόγνωσης αρρώστων με ΧΛΛ, την ανάγκη θεραπείας και προσδοκία οφέλους από αυτήν. Επιχειρήσαμε να μελετήσουμε την ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης ZAP70 η οποία αναδεικνύεται πρόσφατα ως σχετιζόμενη με την ύπαρξη μεταλλάξεων των γονιδίων των βαρέων αλύσεων ανοσοσφαιρινών στον ΧΛΛ κλώνο και να ανιχνεύσουμε την επιγενετική τροποποίηση της έκφρασης δύο κομβικών γονιδίων: Πρόκειται για τον ρυθμιστή της κυτταρικού προγράμματος απάντησης στην υποξία VHL και του τροποποιητή των μεταγραφημάτων πολλαπλών γονιδίων MEG3. Ιδιαίτερα το MEG3 γονίδιο υπόκειται σε γονιδιωματική αποτύπωση και ανήκει στην πρόσφατα ανακαλυφθείσα τάξη των γονιδίων που κωδικοποιούν όχι πρωτεΐνες αλλά microRNA. Σκεφτήκαμε επίσης να μελετήσουμε τις συσχετίσεις των βιομορίων αυτών με κλινικές και παθολογοανατομικές παραμέτρους. Πληροφορίες στους τομείς αυτούς θα έριχναν νέο φως σε ρυθμιστές της βιολογικής συμπεριφοράς της ΧΛΛ που δεν έχουν μελετηθεί ως

σήμερα, με την ελπίδα να αποτελέσουν χρήσιμους προγνωστικούς/προβλεπτικούς παράγοντες στην κλινική πράξη. Ίσως μία απώτερη ελπίδα θα ήταν και η ανάδειξη ενός ρόλου που θα τους έκανε βιομόρια-στόχους για θεραπευτική τροποποίηση με έξυπνα φάρμακα.

Τα κεφάλαια της διδακτορικής αυτής διατριβής περιγράφουν το γενικό μέρος του πρωτοκόλλου με διερεύνηση της συσσωρευθείσας γνώσης, τα χαρακτηριστικά της νόσου στον πληθυσμό των ασθενών, την ερευνητική μεθοδολογία, τα αποτελέσματα της έρευνας και την κριτική συζήτηση τους με διατύπωση ερμηνευτικών υποθέσεων.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ		ΣΕΛΙΔΑ
1.	ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ	
1.1	Ορισμός	3
1.2	Ιστορική αναδρομή	3
1.3	Επιδημιολογία	3
1.4	Αιτιολογία	4
1.5	Διάγνωση	5
1.6	Κλινικές εκδηλώσεις	9
1.7	Σταδιοποίηση	10
1.8	Προγνωστικοί παράγοντες	13
1.8.1	Κυτταρογενετικές ανωμαλίες	16
1.8.2	Μεταλλάξεις των IGVH γονιδίων	22
1.8.3	Η πρωτεΐνη ZAP-70 ως προγνωστικός δείκτης	25
1.9	Θεραπεία	35
2.	ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ	
2.1	Εισαγωγή	39
2.2	Μεθυλίωση του DNA	40
2.3	Μεθυλίωση του DNA και νεοπλασία	41
2.4	Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών	44
2.5	Επιγενετικές αλλαγές στη ΧΛΛ	45
2.6	Το γονίδιο VHL	46
2.7	Το γονίδιο MEG3	51
3.	ΣΚΟΠΟΣ	55

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.	ΜΕΘΟΔΟΙ	
4.1	Λήψη ορού αίματος	59
4.2	Λήψη οστεομυελικής βιοψίας	59
4.3	Απομόνωση DNA από δείγμα ορού	60
4.4	Απομόνωση DNA από βιοψία μυελού των οστών σε τομές παραφίνης	61
4.5	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction PCR)	62
4.6	Χημική κατεργασία με NaHSO ₃ (bisulfite modification)	65
4.7	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ειδικής της μεθυλίωσης (MSP)	67
4.8	Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης	71
4.9	Ανοσοϊστοχημεία	73
4.9.1	Γενικά	73
4.9.2	Ανοσοϊστοχημική χρώση για τη ZAP-70 πρωτεΐνη	75
5.	ΑΣΘΕΝΕΙΣ	
5.1	Χαρακτηριστικά ασθενών και όγκου	79
6.	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	87
7.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
7.1	Συνολική επιβίωση σε σχέση με τα χαρακτηριστικά ασθενών και όγκου	89
7.2	Αποτελέσματα της μελέτης της έκφρασης της ZAP-70 και συσχετίσεις	95
7.3	Αποτελέσματα της μελέτης της μεθυλίωσης του υποκινητή του VHL	101

7.4	Αποτελέσματα της μελέτης της μεθυλίωσης του υποκινητή του MEG3	109
7.5	Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις κλινικοεργαστηριακών παραμέτρων	118
8.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	
8.1	Μελέτη της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της ZAP-70 πρωτεΐνης	121
8.2	Μελέτη της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου VHL	124
8.3	Μελέτη του προτύπου μεθυλίωσης του MEG3 γονιδίου	128
9.	ΣΥΝΟΨΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	135
10.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	139
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	141
	SUMMARY IN ENGLISH	147
	ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	151
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	153

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΧΡΟΝΙΑ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ

1.1 Ορισμός

Η Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (ΧΛΛ) είναι κακοήθης κλωνική αιματολογική διαταραχή χαρακτηριζόμενη από τη συσσώρευση μικρών, ώριμων στην εμφάνιση, CD5+ λεμφοκυττάρων στο αίμα, στο μυελό των οστών, στους λεμφαδένες, στο ήπαρ και στο σπλήνα¹. Αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η λεμφαδενοπάθεια, η οργανομεγαλία, οι κυτταροπενίες και η ανοσολογική δυσπραγία².

1.2 Ιστορική Αναδρομή

Πριν εκατό έτη περίπου, το 1903, ο Turk αναγνώρισε τη ΧΛΛ ως ξεχωριστή κλινική οντότητα³. Οι Minot και Isaacs το 1924 περιέγραψαν αναλυτικά τα κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου⁴. Το 1967 οι Galton και Dameshek ανεξάρτητα, αλλά σχεδόν ταυτόχρονα, προτείνουν τον κύριο παθοφυσιολογικό μηχανισμό της νόσου, την προοδευτική συσσώρευση μη λειτουργικών μακροβιούντων λεμφοκυττάρων^{5,6}. Σήμερα γνωρίζουμε ότι η διαδικασία της συσσώρευσης οφείλεται περισσότερο στην αναστολή της απόπτωσης των λεμφοκυττάρων παρά στον αυξημένο πολλαπλασιασμό τους⁷. Η επιστημονική έρευνα τα τελευταία δεκαπέντε έτη, ανέδειξε τη βιολογική και ανοσολογική ετερογένεια της νόσου, παράμετροι που αντανακλώνται στην ανόμοια κλινική της πορεία⁸.

1.3 Επιδημιολογία

Η ΧΛΛ είναι η πιο συχνά απαντούμενη λευχαιμία των ενηλίκων στο δυτικό κόσμο, αντιστοιχεί στο 24% όλων των λευχαιμιών⁹. Στις Η.Π.Α, περίπου 7000 νέες περιπτώσεις διαγιγνώσκονται ετήσια και 4500 θάνατοι ετησίως σχετίζονται με τη νόσο⁹. Σε αντίθεση με τα παραπάνω, η νόσος απαντάται σπάνια σε Ιαπωνία, Κίνα και λοιπές ασιατικές χώρες και ο λόγος για αυτή την άνιση κατανομή είναι άγνωστος^{10,11}.

Η πλειοψηφία των ασθενών είναι ηλικιωμένοι. Μόνο το 20% των ασθενών είναι κάτω των 55 ετών¹². Η μέση ηλικία κατά τη διάγνωση είναι τα 65 έτη¹². Η επίπτωση της νόσου αυξάνεται δραματικά με την ηλικία και είναι 1,2 ανά 100.000 στα άτομα κάτω

των 65 ετών, ενώ στα άτομα άνω των 65 ετών είναι 22 ανά 100.000¹³. Η νόσος προσβάλλει συχνότερα άνδρες με αναλογία άρρεν : θήλυ 1,7:1¹⁴.

Η πλειονότητα, άνω του 95%, των περιπτώσεων ΧΛΛ έχουν φαινότυπο Β-λεμφοκυττάρου και η ΧΛΛ με φαινότυπο Τ-λεμφοκυττάρου είναι εξαιρετικά σπάνια, περίπου το 2% των περιπτώσεων¹⁵. Κατά συνέπεια, στην καθημερινή κλινική πρακτική, ο όρος ΧΛΛ ταυτίζεται με τη Β-ΧΛΛ εκτός κι αν καθορίζεται διαφορετικά².

1.4 Αιτιολογία

Δεν έχει αποδειχθεί αιτιολογική συσχέτιση με έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία ή χημικά, εκτός από την ουσία Agent Orange, που τη χρησιμοποίησε ο αμερικανικός στρατός στο Βιετνάμ και ενοχοποιήθηκε για τα κρούσματα ΧΛΛ στους βετεράνους του πολέμου¹⁶. Προς το παρόν δεν έχει απομονωθεί αιτιολογικός περιβαλλοντικός παράγοντας¹. Υπάρχουν μελέτες που συνδέουν τη νόσο με τις αγροτικές περιοχές και κατ' επέκταση με τα χημικά της αγροτικής καλλιέργειας¹⁷ και άλλες που προσπάθησαν να τη συσχετίσουν με την έκθεση στην ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία¹⁸, χωρίς όμως να υπάρχει πλήρης αποδοχή αυτών των απόψεων.

Μολονότι η πλειοψηφία των περιπτώσεων με ΧΛΛ είναι σποραδικές, έχουν περιγραφεί οικογένειες με πολλά μέλη πάσχοντα από τη νόσο¹⁹. Τα άτομα αυτών των οικογενειών, συνήθως νοσούν σε μικρότερη ηλικία σε σχέση με τις σποραδικές περιπτώσεις¹⁹. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει, ότι άγνωστοι γενετικοί παράγοντες συμβάλουν στην πρώιμη λευχαιμογένεση²⁰. Επίσης, είναι γνωστό ότι οι πρώτου βαθμού συγγενείς ασθενών με ΧΛΛ, έχουν τρεις φορές υψηλότερο κίνδυνο σε σχέση με το γενικό πληθυσμό, να αναπτύξουν ΧΛΛ ή άλλο λεμφοϋπερπλαστικό νόσημα²¹.

1.5 Διάγνωση

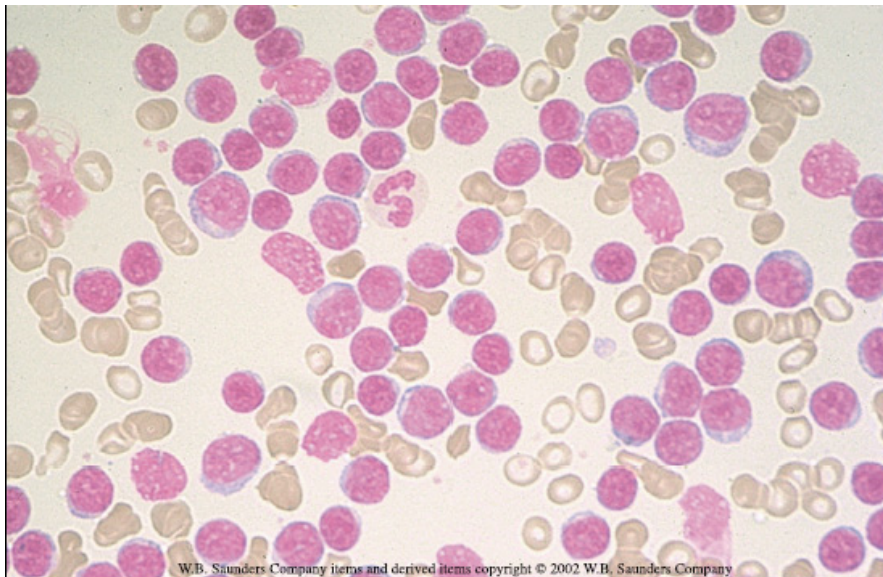
Ο τυπικός ασθενής είναι άνδρας 67 ετών περίπου, ασυμπτωματικός και ανακαλύπτει ότι πάσχει από λεμφοκυττάρωση κατά τη διάρκεια ενός προγραμματισμένου εργαστηριακού ελέγχου²². Συνήθως, ο απόλυτος αριθμός των λεμφοκυττάρων είναι $>10000 \times 10^9 / \mu\text{l}$ ²³. Τα κριτήρια που απαιτούνται για ασφαλή διάγνωση είναι^{24,25} :

α) Απόλυτη λεμφοκυττάρωση περιφερικού αίματος, διάρκειας μεγαλύτερης των 4 εβδομάδων, με αριθμό λεμφοκυττάρων ίσο ή μεγαλύτερο από $5000 \times 10^9 / \mu\text{l}$, τα οποία εμφανίζουν τους μορφολογικούς χαρακτήρες μικρού ώριμου λεμφοκυττάρου.

β) Παρουσία λεμφοκυττάρων σε ποσοστό ίσο ή μεγαλύτερο του 30% επί των εμπύρηνων κυττάρων σε κυτταροβριθή μυελό των οστών.

γ) Ύπαρξη του χαρακτηριστικού ανοσοφαινότυπου στα μονοκλωνικά νεοπλασματικά λεμφοκύτταρα.

Η εκτίμηση της μορφολογίας των λευχαιμικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα και στα μυελικά επιχρίσματα είναι η αρχική διαγνωστική προσέγγιση²⁶. Τα λεμφοκύτταρα στη ΧΛΛ είναι μικρά (μικρότερο από το μέγεθος δύο ερυθροκυττάρων) με εμφανή, αν και στενό, δακτύλιο πρωτοπλάσματος. Η αναλογία πυρήνα-πρωτοπλάσματος είναι μεγάλη, η χρωματίνη του πυρήνα χαρακτηριστικά πυκνή, με συσσωρεύσεις σκοτεινόχρωμης χρωματίνης που διακόπτονται από μικρής έκτασης ανοιχτότερες περιοχές. Πυρήνιο απουσιάζει ή σπάνια είναι δυσδιάκριτο. Τα όρια του πυρήνα και του πρωτοπλάσματος είναι συνήθως ομαλά. Το πρωτόπλασμα είναι ομοιογενές, ασθενώς βασεόφιλο και δεν παρατηρούνται κοκκία. Γενικά, η κυτταρική μορφολογία είναι πιο ομοιογενής συγκριτικά με εκείνη των φυσιολογικών λεμφοκυττάρων του αίματος. Τα θραυσμένα λεμφοκύτταρα ή πυρηνικές σκιές ή σκιές του Gumpert, είναι τεχνητό φαινόμενο των επιχρισμάτων του περιφερικού αίματος και δεν αποτελούν παθολογικό στοιχείο, αλλά χαρακτηρίζουν τη ΧΛΛ και είναι τυπικότερα και συχνότερα, όσο ο αυξάνει ο αριθμός των λεμφοκυττάρων²⁶. Επίσης, όταν σημειώνονται υψηλοί αριθμοί λεμφοκυττάρων, ένα μικρό ποσοστό των κυττάρων 1 έως 5% μπορεί να παρουσιάζει μορφολογία προλεμφοκυττάρου, με αυξημένο κυτταρικό μέγεθος, αφθονότερο πρωτόπλασμα και μικρό σχετικά εμφανές πυρήνιο²⁷. (Εικόνα 1)

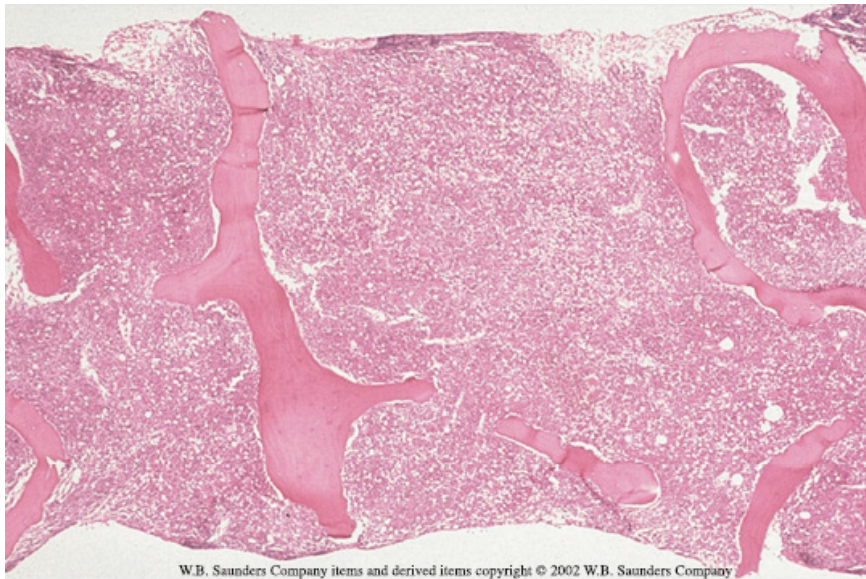


Εικόνα 1. Επίχρισμα περιφερικού αίματος με μονόμορφο πληθυσμό μικρών λεμφοκυττάρων και παρουσία πυρηνικών σκιών.

Στα επιχρίσματα από την αναρρόφηση του μυελού των οστών, διαπιστώνεται υπερκυτταρικός μυελός, με λεμφοκυτταρική διήθηση από ώριμα, όμοια μορφολογικά, λεμφοκύτταρα²⁸. Όταν η ΧΛΛ επιπλεχθεί με αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία, παρατηρείται υπερπλασία της ερυθράς σειράς και στην άνοση θρομβοπενία, υπερπλασία των μεγακαρυοκυττάρων, εφόσον υπάρχουν οι αναγκαίες εφεδρείες²⁶. Όταν συνυπάρχει απλασία ερυθράς σειράς, άνοσης αιτιολογίας, δεν παρατηρούνται πρόδρομες μορφές της ερυθράς σειράς, πέραν των προερυθροβλαστών²⁶.

Η οστεομυελική βιοψία είναι απαραίτητη, για τον καθορισμό της έκτασης και των διαφορετικών τύπων της διήθησης, της εκτίμησης του υπολειπόμενου αιμοποιητικού ιστού και για τη διαφορική διάγνωση της νόσου²⁹. Η νεοπλασματική λεμφοκυτταρική διήθηση εμφανίζει ποικίλους τύπους διάταξης. Αυτοί είναι: ο εστιακός-οζώδης (focal-nodular) με μη-παραδοκικώδη διαμόρφωση οζοειδών εστιών με ασαφές περίγραμμα, ο διάμεσος (interstitial) με ανάπτυξη λεμφικών στοιχείων μεταξύ των αιμοποιητικών χωρίς επισκίαση του λιπώδους υποστρώματος, ο διάχυτος (diffuse) με έντονη επισκίαση έως πλήρη υποκατάσταση του λιπώδους υποστρώματος και ο μικτός (mixed) που αποτελεί

συνδυασμό εστιακού και διάμεσου τύπου³⁰. Το πρότυπο διήθησης του μυελού στην οστεομυελική βιοψία, σχετίζεται με το στάδιο και έτσι με την πρόγνωση της νόσου³¹. Ο οζώδης και ο διάμεσος τύπος διήθησης ή ο συνδυασμός τους, απαντάται στα αρχικά στάδια της νόσου, ενώ ο διάχυτος στα προχωρημένα στάδια, όπου ανεπαρκεί ο μυελός των οστών³². Αρκετές μελέτες δεικνύουν, ότι ο διάχυτος τύπος σχετίζεται με επιθετική μορφή της νόσου και έτσι, ασθενείς σε αρχικό στάδιο με διάχυτο πρότυπο διήθησης του μυελού, εμφανίζουν γοργά πρόοδο της νόσου³³. Αντιθέτως, οι περιπτώσεις με οζώδες πρότυπο έχουν επί μακρόν σταθερή νόσο³⁴. Σε ποσοστό 25% περίπου των περιπτώσεων ΧΛΛ παρατηρείται και ελαφρά αύξηση των δικτυωτών ινών³⁵. (Εικόνα 2)



Εικόνα 2. Εικόνα από οστεομυελική βιοψία ασθενούς με Β-ΧΛΛ, που παρουσιάζει διάχυτη διήθηση του μυελού των οστών από τα νεοπλασματικά λεμφοκύτταρα.

Η φυσιολογική αναλογία Τ και Β λεμφοκυττάρων αναστρέφεται στη ΧΛΛ. Τα νεοπλασματικά Β-λεμφοκύτταρα αντιστοιχούν τώρα στο 90% του συνόλου των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος και έχουν χαρακτηριστικό ανοσοφαινοτυπικό προφίλ³⁶. Στην επιφάνειά τους εκφράζουν τον Τ-δείκτη CD5, αν και ασθενέστερα από τα Τ-κύτταρα. Εκφράζουν τα χαρακτηριστικά αντιγόνα επιφάνειας της Β-σειράς, όπως το

CD19 και το CD24 και ασθενώς CD20. Ο Β-δείκτης CD22, παρουσιάζει κυτταροπλασματική έκφραση και αρνητική ή ασθενέστατη επιφανειακή. Τα κύτταρα είναι θετικά στο CD23 και αρνητικά για τα FMC7, CD79b και CD10. Επίσης, εκφράζουν σε ασθενή ένταση ανοσοσφαιρίνη επιφάνειας, συνήθως IgM ή IgM και IgD, οι οποίες είναι πάντα μονοκλωνικές με έκφραση κ ή λ ελαφρών αλυσίδων³⁷. Στο 40 με 50% των περιπτώσεων, εκφράζεται το CD38, γεγονός που συνδέεται με δυσμενή πρόγνωση³⁸. Συμπερασματικά, τα νεοπλασματικά λεμφοκύτταρα συνεκφράζουν το CD5, CD19, CD23 και εκφράζουν ασθενώς το CD20 και Smlg. Επειδή κανένας από τους παραπάνω δείκτες δεν εκφράζεται αποκλειστικά στη ΧΛΛ, έχει αναπτυχθεί ένα σύστημα βαθμολόγησης με βάση τα ανοσοφαινοτυπικά αποτελέσματα από πέντε δείκτες, ώστε να είναι ευκολότερος ο διαχωρισμός της ΧΛΛ από τις άλλες Β-λεμφοϋπερπλαστικές διαταραχές^{39,40,41}. Κάθε περίπτωση βαθμολογείται με 1 βαθμό για κάθε ένα από τα παρακάτω πέντε αποτελέσματα: α) ασθενής έκφραση Smlg β) θετικό CD5 γ) θετικό CD23 δ) αρνητικό FMC7 ε) αρνητικό CD79b. Στις τυπικές περιπτώσεις ΧΛΛ το ανοσοφαινοτυπικό αποτέλεσμα βαθμολογείται με 4 ή 5.

Πίνακας 1. Ο ανοσοφαινότυπος στη διάγνωση της ΧΛΛ.

ΔΕΙΚΤΗΣ	ΧΛΛ	ΒΑΘΜΟΣ	ΛΕΜΦΟΥΪΠΕΡΠΛΑΣΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ	ΒΑΘΜΟΣ
<i>Slg</i>	ασθενώς +	1	θετικό	0
<i>CD5</i>	θετικό	1	αρνητικό*	0
<i>CD23</i>	θετικό	1	αρνητικό	0
<i>CD79b</i>	ασθενώς +	1	θετικό	0
<i>FMC7</i>	αρνητικό	1	θετικό	0
Βαθμολογία		ΧΛΛ : 4-5	Λοιπά σύνδρομα : 0-2 *εξαιρείται το λέμφωμα μανδύα	

Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό, ότι η κυτταρομετρία ροής θεωρείται πλέον απαραίτητο διαγνωστικό εργαλείο. Με την πρόοδο στην τεχνολογία της και τη σημερινή διαθεσιμότητα μεγάλου εύρους μονοκλωνικών αντισωμάτων και φθοριοχρωμάτων, παρέχει ακριβείς φαινοτυπικούς προσδιορισμούς και αυξάνει συνεχώς τη διακριτική ικανότητα στους μη φυσιολογικούς κυτταρικούς πληθυσμούς⁴².

1.6 Κλινικές Εκδηλώσεις

Οι περισσότεροι ασθενείς κατά τη διάγνωση είναι ασυμπτωματικοί, αλλά αρκετοί αναφέρουν εύκολη κόπωση, αδυναμία, νυκτερινές εφιδρώσεις, πυρετό με ή χωρίς λοίμωξη, αναζωπύρωση με ασυνήθιστη βαρύτητα ερπητικής λοίμωξης, απώλεια βάρους και αιμορραγική διάθεση⁴³.

Το συχνότερα παρατηρούμενο σημείο κατά τη φυσική εξέταση είναι η ανώδυνη λεμφαδενοπάθεια. Η διόγκωση των επιπολής λεμφαδένων σε όλες τις προσιτές περιοχές (τραχηλικοί, υπερκλείδιοι, μασχαλιαίοι, μηροβουβωνικοί) είναι συνήθως αμφοτερόπλευρη και συμμετρική. Η υφή τους είναι σκληρή, αλλά είναι ευκίνητοι, χωρίς σημεία φλεγμονής. Το μέγεθος της λεμφαδενικής διόγκωσης ποικίλει, από μικρή γύρω στα 2 εκατοστά, έως ογκώδη που προκαλεί πιεστικά φαινόμενα⁴⁴. Η ογκώδης κοιλιακή λεμφαδενοπάθεια προκαλεί σχετικά συχνά πιεστικά φαινόμενα π.χ απόφραξη ουρητήρων, ενώ είναι εξαιρετικά ασύνηθες το σύνδρομο άνω κοίλης, το οποίο εάν υπάρχει πρέπει να εγείρει υποψία συνύπαρξης δεύτερης κακοήθειας. Σπληνομεγαλία απαντάται στο 50% των περιπτώσεων, σπάνια μαζί με υπερσπληνισμό. Ηπατομεγαλία μπορεί να παρατηρηθεί, σπάνια όμως δυσλειτουργία του οργάνου από πίεση ή διήθηση. Δυνητικά τα νεοπλασματικά λεμφοκύτταρα μπορεί να διηθήσουν κάθε ανατομική δομή⁴⁵.

Οι ασθενείς με ΧΛΛ έχουν προδιάθεση για ανάπτυξη αυτοάνοσων παθήσεων⁴⁶. Οι συχνότερες αυτοάνοσες διαταραχές προκαλούνται από αυτοαντισώματα στρεφόμενα ενάντια σε αιμοποιητικά αντιγόνα που εκφράζονται σε ερυθρά αιμοσφαίρια και αιμοπετάλια. Τα αυτοαντισώματα μπορεί να παραχθούν από το νεοπλασματικό κλώνο, αλλά και από φυσιολογικά συνυπάρχοντα Β-λεμφοκύτταρα, γεγονός που καταδεικνύει τη σχετιζόμενη με τη νόσο, απορρύθμιση της ανοχής της χυμικής ανοσίας προς τα ίδια αντιγόνα. Αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία εμφανίζει περίπου το 10% των ασθενών και άνοση θρομβοπενική πορφύρα το 2%⁴⁷. Σπανιότερα, παρουσιάζεται η αμιγής απλασία της ερυθράς σειράς και η άνοση ουδετεροπενία, λόγω ανάπτυξης αυτοαντισωμάτων έναντι των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων⁴⁸.

Τυπικά, όλοι οι ασθενείς με ΧΛΛ είναι ανοσοκατεσταλμένοι⁴⁹. Στο 50% των ασθενών η υπογαμμασφαιριναιμία υπάρχει κατά τη διάγνωση της νόσου, οι υπόλοιποι θα την αναπτύξουν προοδευτικά με την πάροδο του χρόνου. Επιπρόσθετα, έχουν

χαμηλά επίπεδα συμπληρώματος, λειτουργικά ελλείματα στα T-λεμφοκύτταρα, στη γένεση των NK κυττάρων και διαταραχές στη λειτουργικότητα των κοκκιοκυττάρων. Η ανοσολογική ανεπάρκεια επιδεινώνεται από την επακόλουθη ανοσοκαταστολή της αντιλευχαιμικής θεραπείας. Συνεπώς, οι νοσούντες από ΧΛΛ είναι ευάλωτοι τόσο σε κοινές, όσο και σε ευκαιριακές λοιμώξεις⁵⁰.

1.7 Σταδιοποίηση

Η παρατήρηση ότι η ΧΛΛ άλλοτε έχει σταθερή πορεία στο χρόνο και άλλοτε εμφανίζεται ως προοδευτικά επιδεινούμενη νόσος, αναφέρθηκε από τον Galton πριν 40 έτη. Μερικοί ασθενείς παραμένουν ασυμπτωματικοί και επιζούν για περισσότερα από 20 έτη, ενώ άλλοι έχουν βαριά κλινική εικόνα από τη διάγνωση και αποβιώνουν σε 2 με 3 έτη⁵¹. Ανάμεσα στα δύο αυτά ακραία σενάρια, βρίσκεται το 50% των ασθενών με ενδιάμεση επιβίωση γύρω στα 8 έτη⁵². Οι προσπάθειες για τον προοπτικό διαχωρισμό των ασθενών σε ομάδες κλινικής συμπεριφοράς κατέληξαν πριν από 30 έτη στην πρόταση δύο κλινικών συστημάτων ταξινόμησης, που χρησιμοποιούνται έως και σήμερα. Προσφέρουν πληροφορίες για το φορτίο της νόσου στα πρώιμα στάδια και το βαθμό της μυελικής καταστολής στα προχωρημένα.

Το 1975 ο Rai και συνεργάτες, εισήγαγαν το πέντε σταδίων σύστημα ταξινόμησης, το οποίο βασίζεται στην αρχική ιδέα των Galton και Dameshek, ότι η ΧΛΛ είναι η νόσος της προοδευτικής συσσώρευσης ανίκανων λειτουργικά λεμφοκυττάρων⁵³. Στο αρχικό στάδιο, **0** του συστήματος Rai, η μόνη διαταραχή είναι η απόλυτη λεμφοκυττάρωση, πάντα πληρώντας τα διαγνωστικά κριτήρια της νόσου. Τα στάδια **I** και **II** θεωρούνται ότι σχετίζονται με την προοδευτική αύξηση του φορτίου της νόσου, όπως φαίνεται από την πρόσθεση στη λεμφοκυττάρωση της ψηλαφητής λεμφαδενοπάθειας στο στάδιο **I** και της σπληνομεγαλίας ή ηπατομεγαλίας στο στάδιο **II** αντίστοιχα. Με την ιδέα ότι η περαιτέρω αύξηση της συσσώρευσης των νεοπλασματικών λεμφοκυττάρων θα προκαλέσει μυελική καταστολή, τα στάδια **III** και **IV** ορίζονται με την πρόσθεση στη λεμφοκυττάρωση, αναιμίας και θρομβοπενίας αντίστοιχα. Δηλαδή, για το στάδιο **III** είναι απαραίτητα η μονοκλωνική λεμφοκυττάρωση και η αναμία (Hb<11gr/dl) ασχέτως της ύπαρξης λεμφαδενοπάθειας ή ηπατοσπληνομεγαλίας και για το στάδιο **IV** η

θρομβοπενία (PLT<100.000/mm³) με ή χωρίς αναιμία, λεμφανοπάθεια ή οργανομεγαλία. Κατά την αρχική διάγνωση 25% των ασθενών είναι στο στάδιο **0**, 50% στα στάδια **I** και **II** και 25% στο στάδιο **III** ή **IV**⁵⁴.

Πρέπει να τονιστεί ότι η διόγκωση των λεμφαδένων, η σπληνομεγαλία και η ηπατομεγαλία αναφέρονται σε σχέση με τα ευρήματα κατά τη φυσική εξέταση και ποτέ σε σχέση με τα απεικονιστικά ευρήματα των αξονικών τομογραφιών⁵⁵. Στην αρχική δημοσίευση της σταδιοποίησης, δε γίνεται διαχωρισμός εάν η αναιμία ή η θρομβοπενία έχουν άνοση αιτία. Αλλά, στα χρόνια που μεσολάβησαν έγινε φανερό, ότι η άνοσης αρχής αναιμία ή θρομβοπενία δεν έχουν τη δυσμενή επίπτωση στην επιβίωση, που έχουν οι κυτταροπενίες από την κατάληψη του μυελού⁵¹.

Παρατηρήθηκε ότι οι ασθενείς με νόσο σταδίου **I** και **II** είχαν παρόμοια επιβίωση όπως επίσης και οι ασθενείς σταδίου **III** και **IV**, και προς διευκόλυνση των κλινικών μελετών το 1987 τροποποιήθηκε το σύστημα Rai σε τρία στάδια, με ξεχωριστή καμπύλη επιβίωσης το καθένα⁵⁶. Στο τροποποιημένο Rai, η κατηγορία χαμηλού κινδύνου αντιστοιχεί στο στάδιο **0** και έχει τη μεγαλύτερη αναμενόμενη επιβίωση, πάνω από 13 έτη. Η σύμπτυξη των σταδίων **I** και **II** δημιούργησε την κατηγορία ενδιάμεσου κινδύνου, με αναμενόμενη επιβίωση τα 8 έτη. Τέλος, η ένωση των σταδίων **III** και **IV** αποτέλεσε την κατηγορία υψηλού κινδύνου, με μέση επιβίωση τα 2 έτη (πίνακας 2).

Πίνακας 2. Στάδια κατά Rai

Στάδιο Rai	Τροποποιημένη κατηγορία Rai	Χαρακτηριστικά	Μέση επιβίωση
0	Χαμηλού κινδύνου	Λεμφοκυττάρωση	+ 13 έτη
I	Ενδιάμεσου κινδύνου	Λεμφοκυττάρωση και λεμφαδενοπάθεια	8 έτη
II		Λεμφοκυττάρωση με σπληνομεγαλία ή και ηπατομεγαλία	
III	Υψηλού κινδύνου	Λεμφοκυττάρωση και αναιμία	2 έτη
IV		Λεμφοκυττάρωση και θρομβοπενία	

Το 1981 οι Binet και συνεργάτες, πρότειναν κριτήρια σταδιοποίησης της ΧΛΛ σε τρία στάδια A, B και C, το γνωστό σε όλους σήμερα σύστημα Binet⁵⁷. Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο, το στάδιο C περιλαμβάνει τους ασθενείς με αναιμία ($Hb < 10 \text{ gr/dl}$) ή θρομβοπενία ($PLT < 100.000/\text{mm}^3$). Οι υπόλοιποι ασθενείς διαχωρίζονται σε δύο ομάδες, στο στάδιο A εάν έχουν δύο ή λιγότερες ψηλαφητές λεμφαδενικές περιοχές και στο στάδιο B εάν έχουν τρεις ή περισσότερες ψηλαφητές λεμφαδενικές περιοχές. Το σύστημα ορίζει πέντε λεμφαδενικές περιοχές : τραχηλικοί, μασχαλιαίοι, βουβωνικοί λεμφαδένες, ήπαρ και σπλήν. Κάθε λεμφαδενική περιοχή μετράται σαν μια, ασχέτως εάν η διόγκωση είναι μονόπλευρη ή αμφοτερόπλευρη. Η μέση επιβίωση είναι 15, 5 και 3 έτη για τα στάδια A, B και C αντίστοιχα (πίνακας 3).

Πίνακας 3. Στάδια κατά Binet

Στάδιο Binet	Χαρακτηριστικά	Μέση επιβίωση
A	Hb>10gr/dl, και PLT>100000/μL, και ψηλαφητική λεμφαδενοπάθεια σε λιγότερο από 3 περιοχές*	>120 μήνες
B	Hb>10gr/dl, και PLT>100000/μL, και ψηλαφητική λεμφαδενοπάθεια σε 3 ή περισσότερες λεμφαδενικές περιοχές	61 μήνες
C	Hb<10gr/dl ή PLT<100000/μL ή αμφότερα (ανεξάρτητως λεμφαδενοπάθειας)	32 μήνες

*ορίζονται πέντε λεμφαδενικές περιοχές : τραχηλικοί, μασχαλιαίοι, βουβωνικοί (μονόπλευρα ή αμφοτερόπλευρα), σπλήν και ήπαρ

Τα στάδια Rai και Binet χρησιμοποιούνται παγκοσμίως και έχει προταθεί να γίνεται ο κλινικός συνδυασμός τους. Σε κάθε ασθενή πρέπει να αναφέρεται το στάδιο κατά Binet και το αντίστοιχο κατά Rai⁵⁸.

1.8 Προγνωστικοί παράγοντες

Η ΧΛΛ παρουσιάζει εξαιρετική ετερογένεια σε σχέση με την πρόγνωση⁵⁹. Σήμερα, η μέση επιβίωση των ασθενών έχει βελτιωθεί σε σχέση με το παρελθόν, πιθανώς επειδή πολλοί ασθενείς (πάνω από 80%) διαγιγνώσκονται σε πρώιμο στάδιο⁶⁰. Η ατομική επιβίωση όμως παρουσιάζει εξαιρετική διακύμανση⁶¹. Κλασσικά, ο σημαντικότερος προγνωστικός παράγων είναι το στάδιο της νόσου κατά τη διάγνωση⁵⁸. Όπως αναφέρθηκε, στη ΧΛΛ χρησιμοποιούνται τα κλινικά στάδια κατά Rai και Binet. Αμφότερα, διακρίνουν τη ΧΛΛ ανάλογα με τον αριθμό των λεμφαδενικών θέσεων της νόσου και την ύπαρξη κυτταροπενιών. Μολονότι η κλινική σταδιοποίηση είναι απλή, αναπαραγώγιμη και εύκολη στη χρήση, εμφανίζει πολλές αδυναμίες⁶². Για παράδειγμα, ο υπεύθυνος μηχανισμός για τις κυτταροπενίες (διήθηση μυελού, υπερσπληνισμός, άνοσος μηχανισμός) δε λαμβάνεται υπόψιν. Κατά συνέπεια, οι ασθενείς με αναιμία ή θρομβοπενία κατατάσσονται στα προχωρημένα στάδια, ανεξάρτητα από την αιτία της κυτταροπενίας, αν και υπάρχουν ενδείξεις ότι ο μηχανισμός της κυτταροπενίας

επηρεάζει την πρόγνωση⁶³. Ακόμα σημαντικότερη, είναι η προγνωστική ετερογένεια ανάμεσα στους ασθενείς του ίδιου κλινικού σταδίου⁶⁴. Κατά αυτό τον τρόπο, η κλινική σταδιοποίηση δε βοηθά στην αναγνώριση των ασθενών των πρώιμων σταδίων, όπου η νόσος θα είναι προοδευτικά επιδεινούμενη, ούτε επίσης εκείνους που θα έχουν ήπια και σταθερή πορεία στον χρόνο⁶⁵. Αυτό είναι μεγάλο μειονέκτημα, αν σκεφτούμε ότι σε ασθενείς με πρώιμο στάδιο, αλλά με μεγάλη πιθανότητα για ταχεία πρόοδο της νόσου, μπορεί είναι επωφελής η άμεση έναρξη θεραπείας. Όπως επίσης, μειονέκτημα είναι και η αβεβαιότητα σχετικά με την πρόγνωση σε άτομα καθ'όλα υγιή, που η διάγνωση έγινε στα πλαίσια ενός ελέγχου ρουτίνας. Επιπρόσθετα, αρκετοί ασθενείς προχωρημένου σταδίου έχουν ήπια πορεία, και για μακρά χρονικά διαστήματα δε χρειάζονται θεραπεία. Ούτε αυτοί οι ασθενείς αναγνωρίζονται κατά την κλινική σταδιοποίηση. Επίσης, η κατάταξη στα δύο συστήματα δε λαμβάνει υπόψιν μεταβλητές όπως η ηλικία, το φύλο και παρακλινικές παραμέτρους⁶⁶. Τα κλινικά στάδια λοιπόν, είναι απλή ανάκλαση της βιολογικής ποικιλότητας της νόσου, η ετερογένεια της οποίας διαλευκάνεται χάριν στους πρόσφατα αναγνωρισμένους γενετικούς και μοριακούς δείκτες, που είναι σημαντικοί ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες και θ'αναλυθούν στη συνέχεια.

Μολονότι η ΧΛΛ είναι ασθένεια που προσβάλλει κυρίως τον ηλικιωμένο πληθυσμό, με μέση ηλικία διάγνωσης τα 65-70 έτη, υπάρχει μια σημαντική μειοψηφία ασθενών που διαγιγνώσκονται σε νεότερη ηλικία, γύρω στα πενήντα ή ακόμα και στα σαράντα⁶⁷. Σύμφωνα με τα δεδομένα από αναδρομικές μελέτες, η μέση επιβίωση είναι γύρω στα δέκα έτη, τόσο για τους ηλικιωμένους, όσο και για τους νεότερους ασθενείς. Όμως, η αιτία θανάτου είναι απότοκος της νόσου στους νέους ασθενείς, ενώ συνήθως στους ηλικιωμένους μοιραίες είναι οι συνυπάρχουσες νοσηρές καταστάσεις. Δεν έχουν παρατηρηθεί διαφορές στα κλινικά χαρακτηριστικά εμφάνισης της νόσου ανάμεσα στις ηλικιακές ομάδες⁶⁸.

Η επίπτωση της ΧΛΛ είναι συχνότερη στους άνδρες και σε αναδρομικές μελέτες έχει παρατηρηθεί ότι οι γυναίκες με ΧΛΛ έχουν σχετικά καλύτερη επιβίωση⁶⁹. Επίσης, επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν ότι η επίπτωση της ΧΛΛ στον ανδρικό πληθυσμό κάτω των 55 ετών είναι μεγαλύτερη σε σχέση με τους άνδρες άνω των 55 ετών και η αιτιολογία του φαινομένου είναι άγνωστη⁷⁰.

Ο χρόνος διπλασιασμού των λεμφοκυττάρων (ΧΔΛ) ορίζεται ως το διάστημα που απαιτείται για το διπλασιασμό του απόλυτου αριθμού των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος, σε σχέση με την τιμή έναρξης, σε ασθενή που δε λαμβάνει κυτταροτοξική θεραπεία. Ασθενείς με ΧΔΛ μεγαλύτερο των 12 μηνών, έχουν καλύτερη πρόγνωση σε σχέση με αυτούς με βραχύτερο χρόνο διπλασιασμού. Συνεπώς, κατά τη διάρκεια της αρχικής παρατήρησης μετά τη διάγνωση της νόσου, ο μηνιαίος ή τριμηνιαίος καθορισμός του απόλυτου αριθμού των λεμφοκυττάρων προσφέρει πληροφορίες, εντός λίγων μηνών, για το εάν ο ΧΔΛ είναι βραχύς ή παρατεταμένος⁷¹.

Ο απόλυτος αριθμός των λεμφοκυττάρων (Α.Α.Λ) καθεαυτός, δεν έχει προγνωστική αξία. Όμως, όταν στο στάδιο Binet A ο απόλυτος αριθμός των λεμφοκυττάρων είναι $< 30000/\text{mm}^3$ και η $\text{Hb} > 12 \text{ gr/dl}$, η συνολική επιβίωση και η κλινική πορεία είναι σημαντικά βελτιωμένη, σε σχέση με τις περιπτώσεις που απουσιάζουν τα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά. Οι Montserrat και συνεργάτες χρησιμοποιώντας το ίδιο όριο για τον απόλυτο αριθμό των λεμφοκυττάρων όρισαν την << έρπουσα >> ΧΛΛ (smoldering CLL), σαν την υποομάδα του σταδίου Binet A με Α.Α.Λ $< 30000/\text{mm}^3$, χρόνο διπλασιασμού λεμφοκυττάρων περισσότερο των δώδεκα μηνών, $\text{Hb} > 13 \text{ gr/dl}$ και μη διάχυτο πρότυπο λεμφοκυτταρικής διήθησης στην οστεομυελική βιοψία. Οι ασθενείς με έρπουσα ΧΛΛ έχουν ίδια επιβίωση με τον γενικό πληθυσμό ίδιας ηλικίας και φύλου^{72,51}.

Το πρότυπο της λεμφοκυτταρικής διήθησης, στην οστεομυελική βιοψία των πασχόντων από ΧΛΛ, μπορεί να είναι οζώδες, ενδιάμεσο ή διάχυτο. Είναι αποδεδειγμένο ότι υπάρχει ισχυρή συσχέτιση ανάμεσα στο διάχυτο πρότυπο και στη δυσμενή πρόγνωση, ενώ η ύπαρξη οζώδους ή ενδιάμεσης διήθησης (μη-διάχυτο πρότυπο) είναι ευνοϊκός προγνωστικός παράγων^{29,31,32,33,34}.

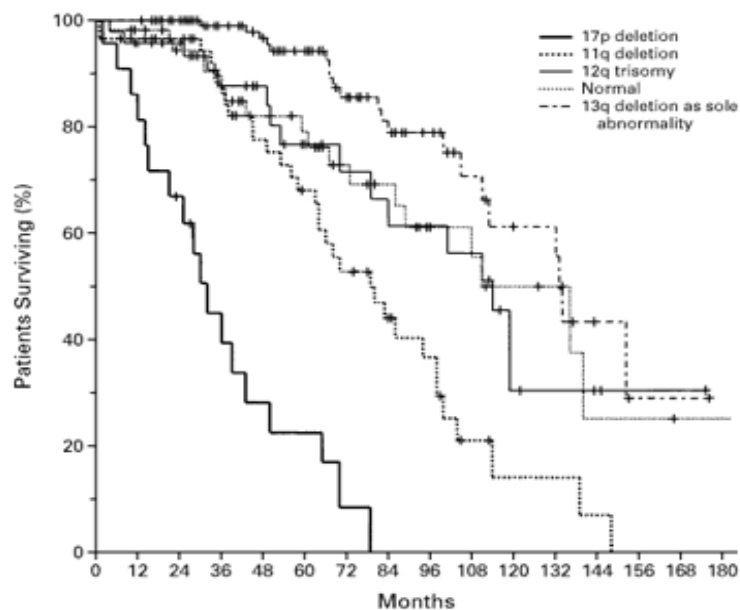
Τα επίπεδα στον ορό της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH), της β_2 -μικροσφαιρίνης, του CD23 και της κινάσης της θυμιδίνης, συσχετίζονται με την ενεργότητα της νόσου. Όμως, αυτοί οι δείκτες του φορτίου της νόσου δεν προσφέρουν καλύτερες πληροφορίες για την επιβίωση σε σχέση με τους προαναφερθέντες προγνωστικούς παράγοντες⁷³.

1.8.1 Κυτταρογενετικές ανωμαλίες

Η μελέτη του καρυοτύπου με τις κλασσικές τεχνικές, της χρώσης των χρωματοσωμικών ζωνών, κατέδειξε ότι αυτό δεν είναι πάντα δυνατό σε δείγματα περιφερικού αίματος ή μυελού των οστών από ασθενείς με ΧΛΛ, γιατί τα κλωνικά λεμφοκύτταρα θεωρείται ότι βρίσκονται στη G₀ φάση και ακόμη και με τη χρήση των κατάλληλων μιτογόνων δε λαμβάνονται αξιόπιστες μεταφάσεις. Οι κλασσικές τεχνικές ανιχνεύουν καρυοτυπικές ανωμαλίες περίπου στο 40% των ασθενών με Β-ΧΛΛ⁷⁴, ενώ με την ευαίσθητη τεχνική FISH ανιχνεύονται συγκεκριμένες χρωμοσωμικές βλάβες στο 60-80% των ασθενών⁷⁵. Η μέθοδος F.I.S.H (Fluorescence In Situ Hybridization), ο φθορίζων In Situ υβριδισμός, είναι μία μοριακή κυτταρογενετική τεχνική, η οποία χρησιμοποιεί φθορίζουσες ουσίες για τη σήμανση των ανιχνευτών DNA, οι οποίες με τη σειρά τους φθορίζουν και γίνονται ορατές σε παρατήρηση κάτω από μικροσκόπιο φθορισμού. Με τη βοήθεια της FISH χρωματίζουμε και παρατηρούμε ολόκληρα χρωμοσώματα, τμήματά τους, χρωμοσωμικές μεταθέσεις, ελλείψεις, ακόμα και πολύπλοκους χρωματοσωμικούς ανασυνδυασμούς. Με τη μέθοδο FISH καθίσταται δυνατή η ανίχνευση ειδικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών όχι μόνο σε μεταφασικούς, αλλά και σε μεσοφασικούς πυρήνες⁷⁶. Η κυτταρογενετική μελέτη της ΧΛΛ με το μεσοφασικό FISH, κατέδειξε ότι η επίπτωση των χρωμοσωμικών ανωμαλιών είχε υποτιμηθεί, γιατί ο φυσιολογικός καρυότυπος των μεταφασικών πυρήνων με τις κλασσικές τεχνικές, ήταν αυτός των μη κλωνικών T-λεμφοκυττάρων και δεν αντανάκλούσε τον καρυότυπο των κλωνικών Β-λεμφοκυττάρων⁷⁷.

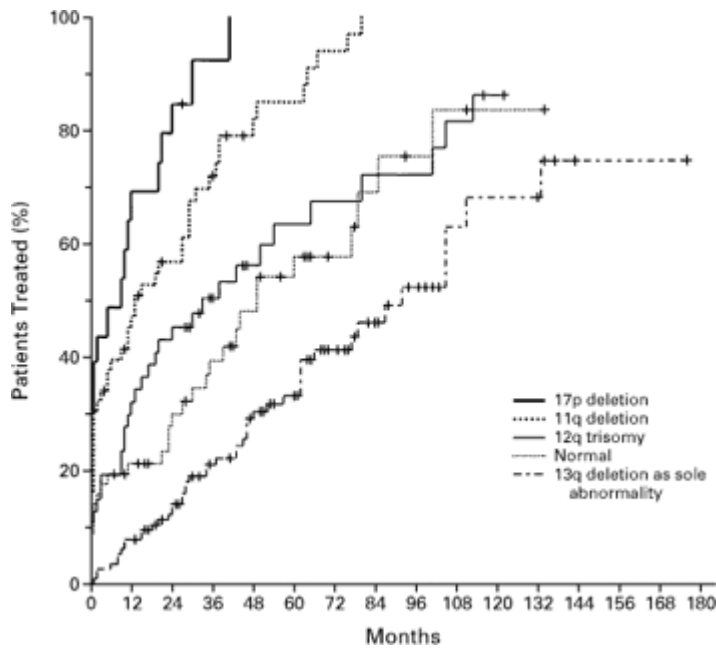
Με τη μέθοδο του μεσοφασικού FISH και χρησιμοποιώντας μια ευρεία σειρά ειδικά μελετημένων για τη ΧΛΛ DNA ανιχνευτών, η Γερμανική ομάδα μελέτης της ΧΛΛ, κατέδειξε την ύπαρξη χρωμοσωμικών ανωμαλιών στο 82% των ασθενών με ΧΛΛ. Μία μόνο χρωμοσωμική βλάβη βρέθηκε στις μισές περιπτώσεις, ενώ δύο βλάβες στο ένα πέμπτο των περιπτώσεων και περισσότερες από δύο, στο ένα δέκατο των ασθενών. Σε διαφορετικούς υποπληθυσμούς ασθενών της μελέτης π.χ έρπουσα ή επιθετική νόσος, πρώιμο ή προχωρημένο στάδιο, καταγράφηκε διαφορετικό φάσμα καρυοτυπικών αλλοιώσεων. Αναλυτικά, σε σύνολο 325 ασθενών : έλλειψη 13q14 παρατηρήθηκε στο 55%, έλλειψη 13q14 ως μοναδική βλάβη στο 36%, έλλειψη 11q22-q23 στο 18%,

τρισωμία 12q στο 16%, έλλειψη 17p13 στο 7% και φυσιολογικός καρυότυπος στο 18%. Επίσης, στην πολλαπλών παραμέτρων στατιστική ανάλυση, οι παραπάνω καρυοτυπικές ανωμαλίες ανεδείχθησαν ως ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες. Η μονήρης έλλειψη στο 13q14 σχετιζόταν με μακρά διαμέσο επιβίωση 133 μήνες, ενώ οι ελλείψεις 11q22-q23 και 17p13 με βραχεία επιβίωση, 79 και 32 μήνες αντίστοιχα. Ενδιάμεσης διάρκειας διαμέσο επιβίωση εμφάνισαν οι ασθενείς με φυσιολογικό καρυότυπο και τρισωμία 12, 111 και 114 μήνες αντίστοιχα⁷⁸ (εικόνα 3).



Εικόνα 3. Πιθανότητα επιβίωσης ασθενών με ΧΛΛ σε σχέση με την παρουσία χρωμοσωμικών βλαβών.

Η επίδραση των βλαβών του γενώματος στην επιβίωση, φαίνεται να οφείλεται στις διαφορές του ρυθμού προόδου της νόσου (εικόνα 4) και στη διαφορετική ευαισθησία στη θεραπεία, που παρουσιάζουν οι υποομάδες των ασθενών που διαμορφώνονται από τις γενετικές ανωμαλίες⁷⁸, όπως θ'αναλυθεί στη συνέχεια.



Εικόνα 4. Η πιθανότητα για πρόοδο της νόσου, όπως ορίζεται από τα μεσοδιαστήματα ελεύθερα θεραπείας στις πέντε κατηγορίες χρωμοσωμικών ανωμαλιών στη ΧΛΛ.

Η συχνότερη δομική χρωμοσωμική ανωμαλία που απαντάται στη ΧΛΛ, είναι η έλλειψη 13q14⁷⁹. Η επανεμφανιζόμενη απάλειψη μιας συγκεκριμένης χρωμοσωμικής περιοχής δεικνύει την ύπαρξη ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου, η απενεργοποίηση του οποίου προκαλείται από την απώλεια του ενός αλληλίου και την υποέκφραση του άλλου⁷⁷. Η έλλειψη στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 13 τυπικά εμφανίζεται στη περιοχή 13q14.3, που είναι τελομερικά του γονιδίου του ρετινοβλαστώματος⁸⁰. Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο του ρετινοβλαστώματος (RB1) είναι ένα από τα υποψήφια ογκοκατασταλτικά γονίδια που εδράζονται στη συγκεκριμένη περιοχή. Η απάλειψη του ενός αλληλίου του RB1 ανιχνεύθηκε με μοριακές κυτταρογενετικές τεχνικές, στο ένα τέταρτο των ασθενών με ΧΛΛ⁸¹. Όμως, η απενεργοποίηση αμφοτέρων των αλληλίων του RB1, είναι σπάνιο γεγονός στη ΧΛΛ, ένδειξη ότι μπορεί να μην είναι το RB1 το αναζητούμενο ογκοκατασταλτικό γονίδιο της περιοχής. Για τον παραπάνω λόγο, πολλές ομάδες προσπαθούν να αναγνωρίσουν νέα ογκοκατασταλτικά γονίδια της 13q14.3 περιοχής⁸². Με βάση την παρουσία τους στην περιοχή απάλειψης, τα RFP2, DLEU1, DLEU2, DLEU7, miR15 και miR16, είναι υποψήφια ογκοκατασταλτικά γονίδια για τη

ΧΛΛ⁸³. Ιδιαίτερα, τα miR15α και miR16-1 εδράζονται σε βραχεία 30-kb περιοχή, που είναι η συνήθης περιοχή απάλειψης στη ΧΛΛ⁸⁴. Τα γονίδια miR15 και miR16 κωδικοποιούν microRNA, ανήκουν σε μεγάλη οικογένεια εξελικτικά διατηρημένων μη κωδικοποιούντων γονιδίων (γονίδια που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνη, non-coding genes) και είναι διασπαρμένα στο γένωμα. Τα ενεργά microRNAs παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε διάφορους ιστούς και σε διάφορες χρονικές περιόδους⁸⁵. Η έλλειψη ή υποέκφραση των miR15 και miR16 βρέθηκε στο 68% ασθενών με ΧΛΛ και υπό το πρίσμα της απόδειξης ότι αποτελούν τους κύριους αρνητικούς ρυθμιστές της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης bcl2, πιθανολογείται ότι η απώλεια του miR15 ή και του miR16 συμβάλει στη λευχαιμογένεση και εξηγεί την αυξημένη συχνότητα εμφάνισης της έλλειψη13q14 στη ΧΛΛ⁸⁶. Κλινικά, η ΧΛΛ με έλλειψη 13q14, ως μοναδική καρυοτυπική βλάβη, χαρακτηρίζεται από ευνοϊκή πρόγνωση, με μακρά επιβίωση και βραδύ ρυθμό προόδου νόσου. Στην ομάδα αυτή των ασθενών απαντάται παρατεταμένο (92 μήνες) διαμέσο διάστημα ελεύθερο αγωγής⁸⁷. Όμως, αν συνυπάρχει πρόσθετη χρωμοσωμική ανωμαλία, χάνεται η ευμενής επίδραση της έλλειψης 13q14⁸⁸.

Οι καρυοτυπικές ανωμαλίες στην περιοχή 11q, αφορούν μια μικρή περιοχή 2 με 3 Mb στη θέση 11q22.3-q23.1. Στη μικρή περιοχή απάλειψης εδράζεται το ATM γονίδιο (Ataxia Telangiectasia Mutated). Οι αλλαγές στα αλληλία ATM, με έλλειψη ή υποέκφραση αυτών, σύμφωνα με τη θεωρία των δύο-χτυπημάτων για την απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, με χαμηλά επίπεδα έκφρασης της ATM πρωτεΐνης, έχουν αποδειχθεί στη ΧΛΛ⁸⁹. Όλες οι περιπτώσεις με ATM μετάλλαξη εμφανίζουν απουσία σωματικών υπερμεταλλάξεων των IgVH γονιδίων, ενδεικτικό γεγονός ότι το ATM παίζει ρόλο στην προ του βλαστικού κέντρου ωρίμανση των Β-λεμφοκυττάρων⁹⁰. Κλινικά, η απώλεια της περιοχής 11q22-q23, συνδέεται με επιθετική κλινική πορεία, ταχεία πρόοδο νόσου και βραχεία επιβίωση. Οι ασθενείς με ΧΛΛ και έλλειψη 11q22-q23, παρουσιάζουν χαρακτηριστική κλινική εικόνα. Παρουσιάζονται με προχωρημένο κλινικό στάδιο, προεξάρχουσα λεμφαδενοπάθεια, με ευμεγέθεις ψηλαφητές λεμφαδενικές μάζες, αλλά και διόγκωση των θωρακικών και κοιλιακών λεμφαδένων⁹¹. Η ομάδα αυτή επίσης, εμφανίζει ταχεία πρόοδο νόσου, με μέσο

διάστημα έναρξης θεραπείας από τη διάγνωση τους 13 μήνες και μικρά διαστήματα ελεύθερα θεραπείας⁹². Η δυσμενής επίδραση στην πρόγνωση αυτής της χρωμοσωμικής βλάβης, σχετίζεται με την ηλικία. Στους ασθενείς με ΧΛΛ ηλικίας κάτω των 55 ετών, η επιβίωση είναι μικρότερη όταν υπάρχει η έλλειψη 11q, σε σχέση με την επιβίωση ασθενών ίδιας ηλικίας χωρίς τη συγκεκριμένη χρωμοσωμική βλάβη. Αντίθετα, στους ασθενείς ηλικίας μεγαλύτερης των 55 ετών, η ύπαρξη της έλλειψης 11q δεν έχει την ίδια επίδραση⁹³. Επειδή η έλλειψη 11q είναι σημαντικός ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας στους νέους ασθενείς με ΧΛΛ, η ύπαρξή του μπορεί ν'αναγνωρίσει τους υποψήφιους για πειραματικές θεραπείες, όπως η αυτόλογη ή η αλλογενής μεταμόσχευση μυελού των οστών⁹⁴.

Η τρισωμία 12 έχει περιγραφεί από τις αρχές του 1980, ως η πρώτη χρωμοσωμική βλάβη στη ΧΛΛ, σε συχνότητα 10 με 25%, με τις κλασσικές-συμβατικές μεθόδους ανάλυσης του καρυοτύπου. Με τη χρήση του μεσοφασικού FISH για την ανίχνευση της μερικής τρισωμίας 12 στις Ευρωπαϊκές μελέτες η συχνότητα ανεύρεσης ήταν 10-20%⁹⁵, ενώ στις εκ' των ΗΠΑ η συχνότητα έφθανε το 30%⁹⁶. Η αναγνώριση της κρίσιμης περιοχής και των εμπλεκόμενων γονιδίων παραμένει δύσκολη, γιατί η μερική τρισωμία είναι σπάνια. Η περιοχή 12q13-q22 φαίνεται ότι είναι το μικρότερο χρωμοσωμικό διπλασιαζόμενο τμήμα στη ΧΛΛ και πολλά γονίδια με ογκογενετική δυνατότητα εδράζονται σ'αυτή την περιοχή, χωρίς ακόμη να έχει αποδειχθεί η παθογενετική σχέση κάποιου με τη νόσο⁹⁷. Στις περιπτώσεις με τρισωμία 12, τα λεμφοκύτταρα έχουν άτυπη μορφολογία ή και χαρακτηριστικά προλεμφοκυττάρου και παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση CD25,CD38 CD79b. Οι ασθενείς με τρισωμία 12 έχουν διαμέσο επιβίωση γύρω στα 8 έτη, ενώ αυτοί με φυσιολογικό καρυότυπο έχουν περίπου 14,4 έτη⁹⁸. Το ποσοστό απάντησης των ασθενών με τρισωμία 12 στη Fludarabine ως πρώτη θεραπεία δε διαφέρει σε σχέση με των ασθενών με φυσιολογικό καρυότυπο και το διαμέσο διάστημα ελεύθερο θεραπείας είναι 33 μήνες⁹⁹. Όπως αναφέρθηκε στη μελέτη του Döhner⁷⁸, η ομάδα των ασθενών με τρισωμία 12 είχε ενδιάμεση επιβίωση παρόμοια με των ασθενών χωρίς χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Όταν όμως η τρισωμία 12 συνοδεύεται και από άλλες βλάβες όπως έλλειψη 11q ή έλλειψη 17p13, τότε ισχύει η δυσμενής πρόγνωση των επιπρόσθετων βλαβών⁷⁸.

Κατά τον έλεγχο με μεσοφασικό FISH, η έλλειψη 17p13, θέση όπου εδράζεται το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53, ανεδείχθη στο 7%⁷⁸. Κλινικά, οι περιπτώσεις ΧΛΛ με μετάλλαξη του p53 χαρακτηρίζονται από υποδεέστερη έκβαση και ανθεκτικότητα στη θεραπεία. Παρουσιάζονται σε προχωρημένο στάδιο, με εκτεταμένη λεμφαδενοπάθεια, με Β-συμπτωματολογία, κυτταροπενίες, υψηλά επίπεδα LDH και χαμηλές τιμές αλβουμίνης¹⁰⁰. Σε μελέτη 480 ασθενών με ΧΛΛ, η έλλειψη 17p13 ήταν η μόνη χρωμοσωμική βλάβη με προγνωστική αξία¹⁰¹. Άλλη μελέτη με τη χρήση του μεσοφασικού FISH έδειξε ότι οι ασθενείς των οποίων τα λευχαιμικά κύτταρα εμφάνιζαν έλλειψη του p53 είχαν βραχύτερη επιβίωση σε σχέση με αυτούς που δεν είχαν τη βλάβη. Επίσης, παρουσίαζαν ταχεία πρόοδο νόσου, με βραχύ χρονικό διάστημα από τη διάγνωση ως την έναρξη θεραπείας, μόνο 9 μήνες¹⁰². Επιπρόσθετα, η παρουσία της έλλειψης 17p συνδέεται άμεσα με την ανθεκτικότητα στη θεραπεία. Η ομάδα αυτή δεν απαντά στα ανάλογα των πουργιών, όπως συμβαίνει με το 56% των ασθενών χωρίς μετάλλαξη του p53¹⁰². Παρομοίως, η ίδια ανθεκτικότητα παρουσιάζεται και στη θεραπεία με το μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-CD20 (rituximab)¹⁰³. Αντιθέτως, υπάρχουν ενδείξεις θεραπευτικής επιτυχίας, με σχετική διάρκεια, με το μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-CD52 (alemtuzumab)¹⁰⁴. Σε πολυπαραγοντική ανάλυση, αναφέρεται ότι η δυσμενής επίδραση της έλλειψης 17p13, ήταν ανεξάρτητη της παρουσίας άλλων προγνωστικών δεικτών, όπως η κατάσταση μετάλλαξης των γονιδίων IgVH και η έλλειψη 11q⁷⁸.

Οι επανεμφανιζόμενες δομικές βλάβες του χρωμοσώματος 6 αφορούν το βραχύ σκέλος του, αλλά τα μεταλλαγμένα γονίδια δεν έχουν ακόμα αναγνωρισθεί¹⁰⁵. Οι ελλείψεις είναι στις θέσεις 6q23, 6q25-27 και 6q21. Η συχνότητα της έλλειψης 6q είναι περίπου 6%⁷⁸. Οι ασθενείς με έλλειψη 6q, παρουσιάζουν αυξημένο ποσοστό προλεμφοκυττάρων, υψηλή έκφραση του CD38 και επιθετικότερη μορφή της νόσου σε σχέση με τους ασθενείς που έχουν φυσιολογικό καρυότυπο ή την ευνοϊκής πρόγνωσης έλλειψη 13q14¹⁰⁶.

Συνοπτικά, η συχνότητα των κυριότερων χρωμοσωμικών βλαβών που ανιχνεύονται με το μεσοφασικό FISH έχει ως εξής : έλλειψη 17p13 στο 7%, έλλειψη 11q22-q23 στο 13%, τρισωμία 12q στο 16%, φυσιολογικός καρυότυπος στο 18% και μονήρης έλλειψη 13q14 στο 66% . Η διαμέσος επιβίωση κάθε ομάδας είναι 32, 79,

111,114 και 133 μήνες αντίστοιχα⁷⁸. Όμως πρέπει να τονιστεί, ότι στην υπάρχουσα βιβλιογραφία το πλήθος των ασθενών που αναλύθηκε με μοριακές κυτταρογενετικές μεθόδους δεν ήταν ομοιογενές. Αρκετοί ασθενείς που περιλαμβάνονται στις παραπάνω μελέτες είχαν λάβει δύο ή περισσότερες γραμμές θεραπείας και οι γενετικές βλάβες που παρουσίαζαν μπορεί να οφείλονται σε εξέλιξη του κλώνου. Επομένως, δε γνωρίζουμε το ακριβές ποσοστό και τύπο των χρωμοσωμικών βλαβών κατά την πρώτη εμφάνιση της νόσου.

1.8.2 Μεταλλάξεις των IgVH γονιδίων

Η παρατήρηση ότι η ΧΛΛ, άλλοτε έχει σταθερή πορεία στο χρόνο και άλλοτε εμφανίζεται ως προοδευτικά επιδεινούμενη νόσος αναφέρθηκε από τον Galton πριν από 36 έτη³. Σήμερα, ένας επιπρόσθετος γενετικός δείκτης, ο οποίος σχετίζεται με το στάδιο της Β-κυτταρικής διαφοροποίησης, παρέχεται από τον ανασυνδυασμό των VDJ τμημάτων των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών και τη διαδικασία των σωματικών υπερμεταλλάξεων, η οποία φυσιολογικά λαμβάνει χώρα στο βλαστικό κέντρο¹⁰⁷. Μολονότι αρχικά θεωρούσαμε ότι τα κλωνικά λεμφοκύτταρα της ΧΛΛ αντιστοιχούν σε λεμφοκύτταρα προ του βλαστικού κέντρου, που δεν είχαν έλθει σε επαφή με αντιγόνα, τα πρόσφατα δεδομένα αναθεωρούν αυτή την αντίληψη. Σύμφωνα με τα νέα δεδομένα, το 50-70% των περιπτώσεων ΧΛΛ παρουσιάζουν σωματικές υπερμεταλλάξεις στη μεταβλητή περιοχή της βαριάς αλυσίδας των γονιδίων της ανοσοσφαιρινών (IgVH)¹⁰⁸. Άρα, αναλόγως του καθεστώτος μετάλλαξης των IgVH γονιδίων, έχουν αναγνωρισθεί δύο υποτύποι της ΧΛΛ. Ο πρώτος, δεν εμφανίζει μεταλλάξεις των IgVH γονιδίων (unmutated B-CLL) και υποθετικά προέρχεται από λεμφοκύτταρα πριν το βλαστικό κέντρο. Ο δεύτερος, παρουσιάζει στα IgVH γονίδια σωματικές υπερμεταλλάξεις (mutated B-CLL) και προέρχεται από λεμφοκύτταρα που έχουν διανύσει το στάδιο της ωρίμανσης στο βλαστικό κέντρο¹⁰⁹. Η κατάσταση της απόκτησης ή μη των σωματικών μεταλλάξεων είναι σταθερή. Δεν έχει περιγραφεί περίπτωση ΧΛΛ όπου μεταλλάξεις να έχουν χαθεί ή να έχουν αποκτηθεί από τον κλώνο των Β-λεμφοκυττάρων κατά τη διάρκεια της νόσου. Οι δύο αυτές υποομάδες της ΧΛΛ είναι διαφορετικές, δε μπορεί η μια μορφή να μεταπέσει στην άλλη και έχουν διαφορετική φυσική πορεία¹¹⁰.

Η ανάλυση της κατάστασης της μετάλλαξης των IgVH γονιδίων απαιτεί την ταυτοποίηση της αλληλουχίας των βάσεων του ανασυνδυασμένου IgVH γονιδίου στα λευχαιμικά κύτταρα. Στη συνέχεια, υπολογίζεται το ποσοστό ομοιότητας της ανευρεθείσας αλληλουχίας, σε σχέση με την περισσότερη συμφωνούσα IgVH ακολουθία της γεννητικής σειράς. Οι αλληλουχίες με λιγότερο του 98% ομολογία σε σχέση με την αντίστοιχη IgVH ακολουθία της γεννητικής σειράς, θεωρούνται ως μεταλλαγμένες. Το παραπάνω όριο είναι σχετικά αυθαίρετο και έχει προταθεί ότι εάν χρησιμοποιηθεί ως όριο το ποσοστό του 97%, επιτυγχάνεται ευκρινέστερος διαχωρισμός των δύο υποομάδων σε σχέση με την πιθανότητα επιβίωσης¹¹¹.

Η ΧΛΛ με απουσία μεταλλάξεων των IgVH γονιδίων έχει δυσμενή πορεία με ταχέως επιδεινούμενη νόσο. Αντιθέτως, η ΧΛΛ με παρουσία σωματικών υπερμεταλλάξεων των IgVH γονιδίων προοδεύει αργά και επιδεικνύει μακρά επιβίωση¹¹². Ασθενείς με ΧΛΛ σταδίου Binet A, χωρίς σωματικές μεταλλάξεις έχουν μέση επιβίωση 8 έτη, ενώ αυτοί με σωματικές μεταλλάξεις έχουν μέση επιβίωση 25 έτη¹¹³. Το καθεστώς της μετάλλαξης των IgVH γονιδίων συνδέεται και με πολλές βιολογικές, προγνωστικά σημαντικές, παραμέτρους της νόσου. Η έντονη έκφραση του CD38 είναι συχνή στην ομάδα χωρίς μεταλλάξεις των IgVH γονιδίων και η ασθενής έκφραση σ'αυτή με σωματικές μεταλλάξεις. Όμως, όπως έχει περιγραφεί από πολλές ερευνητικές ομάδες, στο ένα τρίτο των ασθενών με ΧΛΛ η έκφραση του CD38 δεν ήταν ικανή να προβλέψει την κατάσταση μετάλλαξης των IgVH γονιδίων^{111,114,115,116}.

Η συνολική επίπτωση των χρωμοσωμικών ανωμαλιών είναι παρόμοια στους δύο τύπους της ΧΛΛ. Ειδικά, η επίπτωση της τρισωμίας 12, όταν ελέγχεται με την τεχνική του μεσοφασικού FISH, είναι ισότιμη και στις δυο ομάδες, 18% στην ομάδα χωρίς μεταλλάξεις των IgVH γονιδίων και 17% στην ομάδα με μεταλλάξεις. Αντιθέτως, η καλής πρόγνωσης βλάβες, όπως η 13q14 ανευρίσκεται πολύ πιο συχνά στην ομάδα με σωματικές μεταλλάξεις¹¹¹. Η υψηλής επικινδυνότητας βλάβες όπως η έλλειψη 17p και η έλλειψη 11q ανιχνεύονται σχεδόν αποκλειστικά στην υποομάδα χωρίς μεταλλάξεις. Εν τούτοις, μόνο το ένα τρίτο των περιπτώσεων χωρίς σωματικές μεταλλάξεις εμφανίζει τις ελλείψεις 17p ή 11q^{100,117}. Η ανισότιμη κατανομή των επίκτητων γενετικών βλαβών, πιθανώς καταδεικνύει το ξεχωριστό βιολογικό υπόβαθρο των υποομάδων της ΧΛΛ, που

ορίζονται με βάση την κατάσταση μετάλλαξης των IgVH γονιδίων και ίσως εξηγεί σε κάποιο βαθμό τη διαφορετική κλινική πορεία αυτών των υποομάδων¹¹⁸.

Η κατάσταση μετάλλαξης των IgVH γονιδίων εμφανίζει υψηλό βαθμό συσχέτισης με τις κλινικές παραμέτρους. Η υποομάδα της ΧΛΛ με σωματικές μεταλλάξεις ανευρίσκεται συχνότερα σε ασθενείς σταδίου Binet A, ενώ η ομάδα χωρίς σωματικές μεταλλάξεις ανευρίσκεται στα όψιμα στάδια και εμφανίζει συχνότερα σπληνομεγαλία, λεμφαδενοπάθεια και Β-συμπτωματολογία (νυκτερινές εφιδρώσεις, απώλεια βάρους, πυρετό). Επίσης, η υποκατηγορία της ΧΛΛ χωρίς σωματικές μεταλλάξεις, παρουσιάζει χαμηλότερα επίπεδα Hb και αιμοπεταλίων, υψηλότερο αριθμό λευκών και αυξημένα επίπεδα LDH σε σχέση με την υποκατηγορία με σωματικές μεταλλάξεις. Επιπρόσθετα, τα μεσοδιαστήματα ελεύθερα θεραπείας είναι βραχύτερα στην ομάδα με απουσία σωματικών μεταλλάξεων (33μήνες), σε σχέση με την ομάδα που έχει αποκτήσει σωματικές μεταλλάξεις (105 μήνες). Η κατανομή του φύλου και της ηλικίας είναι παρόμοια και στις δύο υποομάδες της νόσου^{111,119}. Ανάμεσα στους ασθενείς σταδίου Binet A, ο δείκτης των μη-μεταλλαγμένων IgVH γονιδίων προσφέρει τη δυνατότητα αναγνώρισης του υποσυνόλου των ασθενών, που αν και είναι σε πρώιμο στάδιο θα έχει δυσμενή έκβαση. Επίσης, είναι λάθος να υποθέσουμε ότι η ΧΛΛ με μεταλλάξεις των IgVH γονιδίων ταυτίζεται με τη λανθάνουσα- smoldering Β-ΧΛΛ, αλλά συνήθως η smoldering Β-ΧΛΛ περιλαμβάνεται στην υποομάδα της ΧΛΛ με μεταλλάξεις των IgVH γονιδίων¹¹³. Όμως, όπως κάθε κανόνας έχει και την εξαίρεσή του, έτσι και στον ευνοϊκής πρόγνωσης τύπο της ΧΛΛ με παρουσία IgVH μεταλλάξεων, εάν εκφράζονται τα μεταλλαγμένα γονίδια VH3-21 η βιολογία της νόσου μεταβάλλεται. Η παρουσία των μεταλλαγμένων γονιδίων VH3-21, συνδέεται με ταχεία πρόοδο της νόσου και με πρώιμη ανάγκη για θεραπεία¹²⁰.

Οι υπεύθυνοι μηχανισμοί για τη διαφορετική κλινική συμπεριφορά των δύο υποτύπων της ΧΛΛ είναι προς το παρόν άγνωστοι. Το ερώτημα είναι εάν οι δύο αυτές μορφές είναι διαφορετικές οντότητες ή αποτελούν μέρη του ίδιου φάσματος. Η απάντηση δίνεται από τη μελέτη των δεδομένων της ανάλυσης της ΧΛΛ με τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών, όπου αναδεικνύεται ότι οι υπότυποι της ΧΛΛ εμφανίζουν κοινό πρότυπο έκφρασης γονιδίων, και έχουν διαφορετική έκφραση γονιδίων σε σχέση με τα

υπόλοιπα Β-λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα και τα φυσιολογικά Β-λεμφοκύτταρα^{121,122}. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει, ότι οι δύο υπότυποι (με παρουσία ή απουσία σωματικών υπερμεταλλάξεων των IgVH γονιδίων) συγκροτούν μια ενιαία νοσολογική οντότητα¹²³.

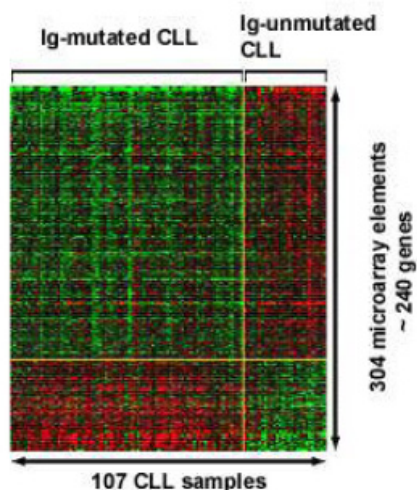
Η κατάσταση μετάλλαξης των IgVH γονιδίων και οι επίκτητες χρωμοσωμικές βλάβες φαίνεται ότι έχουν συμπληρωματικό ρόλο στον καθορισμό της πρόγνωσης στη ΧΛΛ. Οι Kröber και συνεργάτες¹¹¹ μετά από πολυπαραγοντική ανάλυση δεδομένων κατέληξαν σ'ένα μοντέλο κινδύνου που περιλαμβάνει 4 σημαντικές προγνωστικές παραμέτρους: την έλλειψη 17p, την έλλειψη 11q, την παρουσία μεταλλάξεων των IgVH γονιδίων και την απουσία μεταλλάξεων των IgVH γονιδίων. Το στάδιο της νόσου κατά το σύστημα Rai ή Binet δεν ήταν ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας στο προαναφερθέν μοντέλο¹¹¹. Για την αποσαφήνιση της προγνωστικής αξίας των γενετικών βλάβων και τη σχέση τους με πολλές παραμέτρους της νόσου όπως το στάδιο, ο χρόνος διπλασιασμού των λεμφοκυττάρων, το πρότυπο διήθησης του μυελού, η β₂ μικροσφαιρίνη, διεξάγονται αρκετές προοπτικές μελέτες.

Ο προσδιορισμός της κατάστασης μετάλλαξης των IgVH γονιδίων απαιτεί την ταυτοποίηση της αλληλουχίας των βάσεων του ανασυνδυασμένου IgVH γονιδίου. Η διαδικασία αυτή προϋποθέτει την ύπαρξη εργαστηρίου μοριακής βιολογίας με πληρέστατο τεχνικό εξοπλισμό, και είναι αποτρεπτικά πολύπλοκη για την εκτέλεση σε συμβατικό διαγνωστικό εργαστήριο. Επίσης, η παραπάνω εξέταση είναι χρονοβόρος, ακριβή και είναι αμφίβολη η καθιέρωσή της σαν προσιτή εξέταση ρουτίνας για όλους τους πάσχοντες από ΧΛΛ. Συνεπώς, αναζητούνται έμμεσοι δείκτες που να σχετίζονται με την κατάσταση μετάλλαξης των IgVH γονιδίων και ο προσδιορισμός τους να είναι σχετικά απλός και εφαρμόσιμος σε ευρεία βάση.

1.8.3 Η πρωτεΐνη ZAP-70 ως προγνωστικός δείκτης

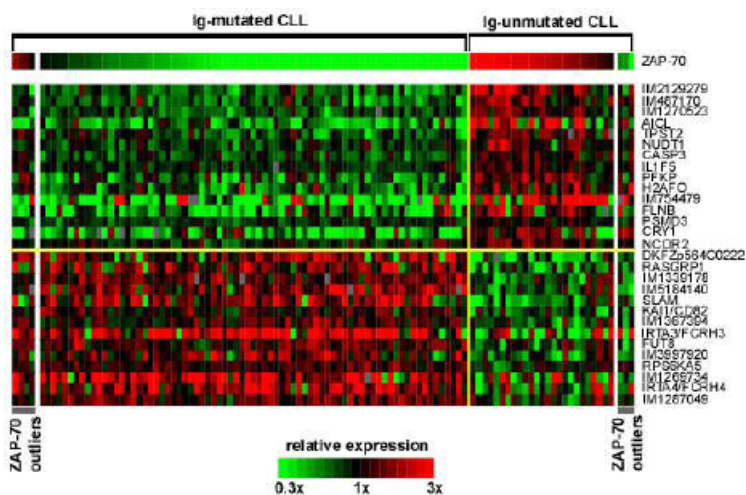
Η μελέτη της ΧΛΛ με τη μέθοδο των DNA-μικροσυστοιχιών, ανέδειξε ότι το προφίλ της έκφρασης των γονιδίων των λεμφοκυττάρων της ΧΛΛ με απουσία σωματικών μεταλλάξεων των IgVH γονιδίων, είναι παρόμοιο με αυτό των λεμφοκυττάρων της ΧΛΛ με παρουσία σωματικών μεταλλάξεων των IgVH γονιδίων, και το πρότυπο της έκφρασης των γονιδίων και των δύο υποομάδων είναι ξεχωριστό από

αυτό των άλλων λευχαιμιών και λεμφωμάτων. Μολαταύτα, οι δύο μορφές της ΧΛΛ διακρίνονται με βάση τη διαφορετική έκφραση μικρού αριθμού γονιδίων (περίπου 240). Υποθετικά, ένα ή πιο πολλά από αυτά τα γονίδια, μπορεί να ευθύνεται για την κλινική ετερογένεια της ΧΛΛ περισσότερο από την κατάσταση μετάλλαξης των IgVH γονιδίων¹²⁴ (εικόνα 5).



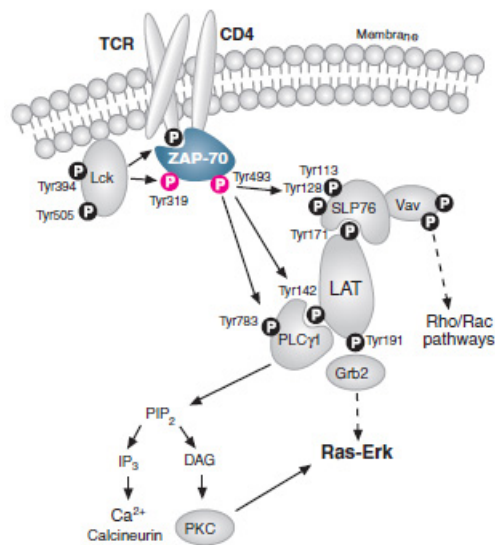
Εικόνα 5. Ανάλυση με DNA μικροσυστοιχίες, που αναγνωρίζει γονίδια με διαφορετική έκφραση ανάμεσα στους υποτύπους της ΧΛΛ. Το κόκκινο χρώμα είναι ένδειξη ισχυρής έκφρασης και το πράσινο ασθενούς έκφρασης, για κάθε δεδομένο γονίδιο. Οι κάθετες στήλες αντιστοιχούν σε περιπτώσεις ασθενών (107), οι οριζόντιες αντιπροσωπεύουν την ατομική έκφραση σ' ένα δεδομένο γονίδιο.

Τα τελευταία 8 έτη, η ZAP-70 πρωτεΐνη (Zeta chain - Associated Protein) και το αντίστοιχο γονίδιο, μετά την παρατήρηση ότι προεξάρχει ανάμεσα σε μικρό αριθμό γονιδίων, στη διαφορετική έκφρασή του στους δυο υποτύπους της ΧΛΛ¹²⁴, έγιναν αντικείμενο ενδεδειγμένης μελέτης (εικόνα 6).



Εικόνα 6 . Το ZAP-70 γονίδιο διακρίνει σαφέστερα τους δύο υποτύπους ΧΛΛ

Η ZAP-70 πρωτεΐνη είναι ενδοκυττάρια κινάση της τυροσίνης με κομβικό ρόλο στη μεταγωγή σήματος μέσω του T-λεμφοκυτταρικού υποδοχέα (TCR)¹²⁵. Ανήκει στην οικογένεια Syk τυροσινικών κινασών. Η ZAP-70 πρωτεΐνη έχει μοριακό βάρος 70 kDa, συνδέεται με την TCR ζ-αλυσίδα και φυσιολογικά εκφράζεται στα T και NK λεμφοκύτταρα. Έχει αναγνωρισθεί ως βασικό στοιχείο κατά την ενεργοποίηση των T και NK λεμφοκυττάρων¹²⁶. Το ZAP-70 γονίδιο εδράζεται στο χρωμόσωμα 2 στη θέση q11.2 και κωδικοποιεί πρωτεΐνη αποτελούμενη από τρεις λειτουργικές περιοχές. Η πρώτη λειτουργική περιοχή αποτελείται από δύο περιοχές ομολογίας Src (SH2) που διατάσσονται κατά επαναλαμβανόμενο τρόπο στο αμινοτελικό άκρο. Η δεύτερη λειτουργική περιοχή βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο και έχει δράση τυροσινικής κινάσης (TK). Η τρίτη λειτουργική περιοχή αποτελεί συνδετική περιοχή των δύο προηγούμενων (Inter-domain B, IB). Οι δύο SH2 περιοχές δρουν συνεργατικά και συνδέονται στα ενεργοποιημένα τμήματα ITAMs (Immunoreceptor Tyrosine-based Activated Motifs) της ζ-αλυσίδας του TCR (εικόνα 7). Η συνδετική περιοχή IB αναστέλει την καταλυτική δράση τυροσινικής κινάσης της ZAP-70 πρωτεΐνης¹²⁷. Πρόσφατα έχει περιγραφεί σε άωρα θυμοκύτταρα ποντικού, μια κατετμημένη μορφή της ZAP-70 πρωτεΐνης, η οποία στερείται των περιοχών SH2. Η μορφή αυτή έχει μοριακό βάρος 36kDa, διατηρεί τη δράση τυροσινικής κινάσης αλλά δεν επάγει τη μεταγωγή σήματος μέσω της ενεργοποίησης του TCR¹²⁸.



Εικόνα 7 . Λειτουργία πρωτεΐνης ZAP-70

Η ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων πραγματοποιείται, με τη σύνδεση στον TCR του συμπλέγματος αντιγόνου-πρωτεΐνης μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας MHC. Μετά τη διέγερση του TCR, ακολουθεί ενεργοποίηση των κινασών τυροσίνης της οικογένειας Src, ειδικά των Lck και Fyn. Οι Lck και Fyn τυροσινικές κινάσες φωσφορυλιώνουν υπολείμματα τυροσίνης στις περιοχές ITAMs της ζ-αλυσίδας του TCR και της ενδοκυττάριας ουράς του CD3. Ακολουθεί σύνδεση της SH2 περιοχής της πρωτεΐνης ZAP-70, στις περιοχές ITAMs της ζ-αλυσίδας του TCR. Αποτέλεσμα της σύνδεσης είναι η ενεργοποίηση της καταλυτικής δράσης τυροσινικής κινάσης στο καρβοξυτελικό άκρο της ZAP-70 και περαιτέρω μεταγωγή σήματος δια της φωσφορυλίωσης πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες LAT, SPL-76, PLCγ και Vav-1 είναι κυρίως οι ενδιάμεσοι μεταβιβαστές σήματος, που η φωσφορυλίωσή τους οδηγεί σε απελευθέρωση ασβεστίου και ενεργοποίηση κυτταρικών μονοπατιών που καταλήγουν στην ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων NFκB, AP-1 και NFAT. Τελικό αποτέλεσμα όλης της διαδικασίας είναι ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση του κυττάρου¹²⁹.

Η σπουδαιότητα της ZAP-70 πρωτεΐνης στη μεταγωγή σήματος και διαφοροποίηση του Τ-λεμφοκυττάρου σηματοδοτείται από το γεγονός ότι η έλλειψη της

ZAP-70 πρωτεΐνης εκδηλώνεται με φαινότυπο κοινής συνδυασμένης ανοσοανεπάρκειας, με απουσία CD8 και CD4 T-λεμφοκυττάρων¹³⁰.

Επιπρόσθετα, η ZAP-70 πρωτεΐνη είναι απαραίτητη για την επιτυχή μεταγωγή σήματος μέσω της χημειοκίνης CXCL12. Η CXCL12 αντιπροσωπεύει σημαντικό παράγοντα τροπισμού για τα T-λεμφοκύτταρα, που τα οδηγεί στις ιστικές θέσεις όπου θα συναντήσουν τα αντιγόνα. Με την πρόσδεση του CXCL12 στο συνδέτη του CXCR4, που βρίσκεται στην επιφάνεια του T-λεμφοκυττάρου, η ZAP-70 πρωτεΐνη φωσφορυλιώνεται και στη συνέχεια διεγείρεται ο κατωφερέστερος καταρράκτης πρωτεϊνών, με τελικό αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του ERK και Vav-1¹³¹.

Αναφορικά με τα B-λεμφοκύτταρα, η μεταγωγή σήματος από τον B-κυτταρικό υποδοχέα (BCR) γίνεται μέσω της ομόλογης, κατά 50% με τη ZAP-70, τυροσινικής κινάσης Syk. Οι πρωτεΐνες Syk και ZAP-70 εκτελούν παρόμοιες λειτουργίες. Ειδικά στα B-λεμφοκύτταρα, τη διέγερση του BCR μετά την πρόσδεση αντιγόνου, ακολουθεί η σύνδεση της Syk, με τις SH2 περιοχές της, στις θέσεις ITAMs του CD79a και του CD79b. Αποτέλεσμα της σύνδεσης είναι η ενεργοποίηση της καταλυτικής δράσης της τυροσινικής κινάσης Syk και η φωσφορυλίωση υποστρωμάτων όπως οι SLP-65/BLNK, PLCγ και η περαιτέρω επαγωγή σήματος. Σε αντίθεση με τη λειτουργία της ZAP-70, η ενεργοποίηση της Syk είναι ανεξάρτητη των Src κινασών¹³².

Στα φυσιολογικά περιφερικά B-λεμφοκύτταρα, η ποσότητα της ZAP-70 πρωτεΐνης είναι αμελητέα, όπως προκύπτει από μελέτες μέτρησης με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής και της RT-PCR¹³³. Όμως, πρόσφατα πειραματικά δεδομένα με κυτταρομετρία ροής σε φυσιολογικό ανθρώπινο σπλήνα και αμυγδαλή, κατέδειξαν ότι μικρός αριθμός CD19 θετικών B-λεμφοκυττάρων (3% στο σπλήνα και 2% στην αμυγδαλή) εκφράζουν ZAP-70 πρωτεΐνη, σε ποσότητες παρόμοιες με αυτές των T-λεμφοκυττάρων¹³⁴. Επίσης, υπάρχουν αναφορές θετικότητας στη ZAP-70 πρωτεΐνη σε CD19+/CD10+/CD20- και CD34+/CD19+ υποπληθυσμούς B-λεμφοκυττάρων φυσιολογικού μυελού¹³⁵. Πειραματικά ευρήματα σε ποντίκια έδειξαν, ότι η ZAP-70 πρωτεΐνη εκφράζεται κατά τη διάρκεια της B-λεμφοκυτταρικής ωρίμανσης και είναι ιδιαίτερα σημαντική κατά τη μετάβαση από το προγονικό στάδιο Pro-B, στο άωρο Pre-B. Τα ποντίκια με έλλειψη της τυροσινικής κινάσης Syk έδειξαν μερική αναστολή της

ωρίμανσης από το στάδιο Pro-B στο Pre-B, ενώ τα ποντίκια με έλλειμα και στις ZAP-70 και Syk τυροσινικές κινάσες, εμφάνισαν πλήρη αναστολή της ωρίμανσης των B-κυττάρων, με καθήλωση αυτών στο Pro-B στάδιο^{136,137}.

Υπάρχουν συσσωρευμένα τεκμήρια ότι η ZAP-70 πρωτεΐνη έχει σπουδαία λειτουργική σημασία στις περιπτώσεις ΧΛΛ που την εκφράζουν¹³⁸. Μελέτες με διέγερση του BCR, δια μέσω σύνδεσης αντι-IgM, σε ZAP-70 θετικές και αρνητικές περιπτώσεις, έδειξαν αύξηση της φωσφορυλίωσης πολλών κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών (όπως οι Syk, BLNK, PLCγ) και αυξημένη κινητοποίηση ασβεστίου. Οι αλλαγές ήταν επαυξημένες στις ZAP-70 θετικές ΧΛΛ περιπτώσεις, όπου συνέβαινε αυξημένη φωσφορυλίωση της ZAP-70, γεγονός ενδεικτικό της σημασίας της ZAP-70 στη μεταγωγή σήματος μετά από διέγερση του BCR¹³⁹. Ο σημαντικός ρόλος της ZAP-70 στην ανωτέρω διαδικασία υπογραμμίζεται και στα ευρήματα πειραμάτων σε ZAP-70 αρνητικές περιπτώσεις ΧΛΛ που διαμολύνθηκαν με ZAP-70. Τα επίπεδα φωσφορυλίωσης πρωτεϊνών και κινητοποίησης ασβεστίου ήταν συγκρίσιμα με αυτά των ZAP-70 θετικών ΧΛΛ^{140,141}. Η διέγερση του BCR έχει ως αποτέλεσμα τη σταθερή αποδόμησή του IκΒα, που είναι αναστολέας του NFκΒ, μόνο στις ZAP-70 θετικές περιπτώσεις ΧΛΛ. Κατά συνέπεια παρατηρείται αυξημένη μεταγραφή των γονιδίων που ρυθμίζονται από τον NFκΒ, και αυξημένη ενδοκυττάρια ροή ασβεστίου στις ZAP-70 θετικές περιπτώσεις ΧΛΛ^{142,143}.

Υπάρχουν επίσης δεδομένα, ότι η πρωτεΐνη ZAP-70 είναι απαραίτητη για την επιτυχή μεταγωγή σήματος στα κύτταρα της ΧΛΛ μέσω διέγερσης με τη χημειοκίνη CXCR4. Στις ZAP-70 θετικές περιπτώσεις ΧΛΛ, η διέγερση του CXCR4 έχει ως τελικό αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του ERK^{144,145}.

Γενικά, υπάρχει η πεποίθηση ότι η έκφραση της ZAP-70 στη ΧΛΛ, επάγει τη μεταγωγή σήματος και πιθανά ευδώνει τη μετανάστευση των κλωνικών λεμφοκυττάρων σε ευνοϊκό περιβάλλον προς μακροχρόνια επιβίωση και πολλαπλασιασμό¹⁴⁶.

Συμπερασματικά, ενώ αρχικά υπήρχε η άποψη ότι η ZAP-70 πρωτεΐνη είναι απύσαστα στα φυσιολογικά B-λεμφοκύτταρα, σήμερα υπάρχουν ενδείξεις ότι η ZAP-70 πρωτεΐνη εμπλέκεται στη B-κυτταρική διαφοροποίηση. Επίσης, περαιτέρω έρευνα κατέδειξε ότι υπάρχει έκφραση της πρωτεΐνης σε αρκετές B-λεμφοκυτταρικές

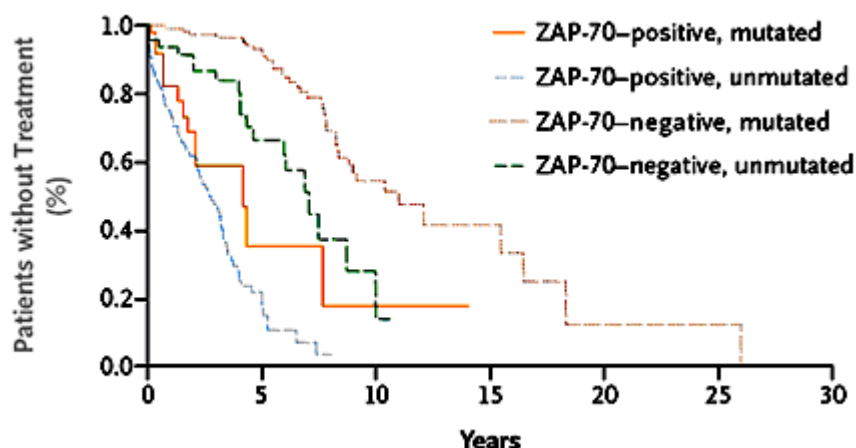
κακοήθειες, σε Β-λεμφοκυτταρικές σειρές όπως και σε υποπληθυσμούς φυσιολογικών Β-λεμφοκυττάρων¹²⁶.

Η ρύθμιση της έκφρασης του ZAP-70 γονιδίου, δεν είναι πλήρως διευκρινισμένη, αλλά πιθανολογείται συσχέτιση της μεθυλίωσης του ZAP-70 και της έκφρασής του τόσο σε φυσιολογικά Β και Τ λεμφοκύτταρα όσο και στα λεμφοκύτταρα της ΧΛΛ. Τα δύο 5' εξόνια του ZAP-70 γονιδίου, δεν περιέχουν CpG νησίδες, αλλά υπάρχει περιοχή 213bp πλούσια σε CpG νησίδες, στα όρια ιντρονίου1:εξονίου2. Στην περιοχή αυτή περιλαμβάνονται οι μη-μεθυλιωμένες κυτοσίνες στα ZAP-70 θετικά Τ-λεμφοκύτταρα, ενώ στα ZAP-70 αρνητικά Β-λεμφοκύτταρα οι συγκεκριμένες κυτοσίνες είναι μεθυλιωμένες. Ο επιγενετικός αυτός μηχανισμός, είναι δυνητικά ρυθμιστικός της έκφρασης του ZAP-70 γονιδίου. Φαίνεται ότι ο ίδιος μηχανισμός εμπλέκεται και στη ΧΛΛ, όπου η κατάσταση μεθυλίωσης της κυτοσίνης, που βρίσκεται 334 bp κατωφρέστερα του σημείου έναρξης της μεταγραφής (C-334), αντικατοπτρίζει πιστά την έκφραση του ZAP-70^{147,148}.

Όπως έγινε κατανοητό, οι πρόσφατες μελέτες αναφέρουν ότι, η έκφραση της ZAP-70 πρωτεΐνης σχετίζεται με αυξημένη μεταγωγή σήματος από τον υποδοχέα ανοσοσφαιρίνης της επιφάνειας των Β-κυττάρων της ΧΛΛ, ανεξάρτητα από την κατάσταση μετάλλαξης των IgVH γονιδίων. Μολαταύτα, παρατηρήθηκε υπερέκφραση της πρωτεΐνης στην υποομάδα με απουσία σωματικών μεταλλάξεων των IgVH γονιδίων και διερευνάται αν η ανίχνευση και μέτρηση της ZAP-70 πρωτεΐνης μπορεί να είναι ένας έμμεσος δείκτης του καθεστώτος μετάλλαξης των IgVH γονιδίων¹²⁴.

Οι Rassenti και συνεργάτες¹⁴⁹ αξιολόγησαν σε 307 ασθενείς με Β-ΧΛΛ, την έκφραση της ZAP-70 πρωτεΐνης, με την τεχνική της κυτταρομετρίας ροής και της immunoblot ανάλυσης σε κεκαθαμένα Β-κλωνικά λεμφοκύτταρα. Επίσης, συσχέτισαν την έκφραση της ZAP-70 πρωτεΐνης με την κατάσταση μετάλλαξης των IgVH γονιδίων. Προέκυψε ότι, τα επίπεδα της ZAP-70 πρωτεΐνης που ανιχνεύθηκαν με την κυτταρομετρία ροής αντιστοιχούσαν στα επίπεδα της πρωτεΐνης που ανιχνεύθηκε με την immunoblot ανάλυση. Κατά την μελέτη με την κυτταρομετρία ροής, ο ουδός του 20% θετικών κυττάρων ήταν το βέλτιστο όριο για την κατάταξη των ασθενών ως ZAP-70 θετικών ή αρνητικών. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε μεταβολή των επιπέδων της

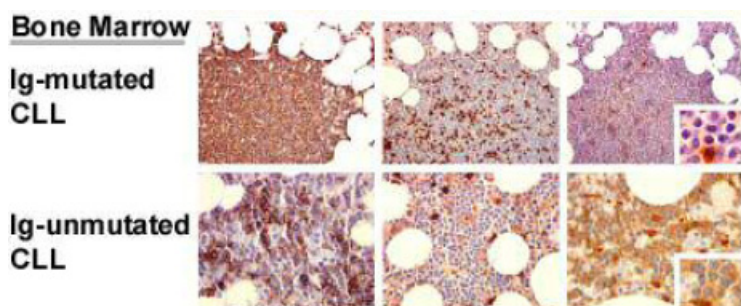
πρωτεΐνης στον χρόνο, ούτε υπήρχε διαφορά στην έκφραση της πρωτεΐνης στα κλωνικά λεμφοκύτταρα μεταξύ δειγμάτων περιφερικού αίματος ή μυελού των οστών. Το 54% των ασθενών ήταν αρνητικοί ως προς την έκφραση της ZAP-70 πρωτεΐνης και σ'αυτή την ομάδα το μέσο χρονικό διάστημα από τη διάγνωση μέχρι την έναρξη θεραπείας ήταν 9,2 έτη. Σε αντίθεση, το αντίστοιχο διάστημα στους ZAP-70 θετικούς ασθενείς ήταν σημαντικά βραχύτερο στα 2,9 έτη. Το 53% των ασθενών δεν είχε σωματικές μεταλλάξεις των IgVH γονιδίων και το μέσο χρονικό διάστημα από τη διάγνωση μέχρι την έναρξη θεραπείας ήταν 3.5 έτη, σημαντικά βραχύτερο σε σχέση με αντίστοιχο διάστημα 9.2 έτη των ασθενών με σωματικές υπερμεταλλάξεις των IgVH γονιδίων. Υπήρξε ισχυρή στατιστική συσχέτιση ($p < 0.001$) ανάμεσα στο μη-μεταλλαγμένο τύπο ΧΛΛ και στη θετικότητα στη ZAP-70 πρωτεΐνη, το 71% των ασθενών χωρίς μεταλλάξεις των IgVH γονιδίων ήταν ZAP-70 θετικοί. Κατά αναλογία το 83% των ασθενών με IgVH υπερμεταλλάξεις ήταν ZAP-70 αρνητικοί. Σε περίπου 23% του συνόλου των ασθενών παρατηρήθηκε ασυμφωνία μεταξύ κατάστασης μεταλλάξης των IgVH γονιδίων και έκφρασης ZAP-70 πρωτεΐνης. Επίσης, ο λόγος κινδύνου για την ανάγκη θεραπείας ήταν 4.9 φορές μεγαλύτερος στους ZAP-70 θετικούς ασθενείς, σε σχέση με τους ZAP-70 αρνητικούς. Με κριτήριο την παρουσία μεταλλάξεων των IgVH γονιδίων, ο λόγος κινδύνου για την ανάγκη θεραπείας ήταν 2.5 φορές μεγαλύτερος στους ασθενείς με μη-μεταλλαγμένα τα IgVH γονίδια, σε σχέση με τους ασθενείς με παρουσία μεταλλάξεων στα IgVH γονίδια. Αξιοπρόσεκτη ήταν η παρατήρηση, ότι στην ομάδα των ZAP-70 αρνητικών ασθενών, το μέσο χρονικό διάστημα από τη διάγνωση μέχρι την έναρξη θεραπείας ήταν 11 έτη όταν τα IgVH γονίδια είχαν υπερμεταλλάξεις και 7 έτη όταν δεν είχαν, διαφορά στατιστικά σημαντική ($p < 0.001$) (εικόνα 8).



Εικόνα 8. Συσχετισμός έκφρασης ZAP-70 και καθεστώτος IgVH μετάλλαξης με το χρονικό διάστημα από τη διάγνωση έως την αρχική θεραπεία.

Οι Wiestner και συνεργάτες¹²⁴ μελέτησαν ομάδα 117 ασθενών με Β-ΧΛΛ ως προς την έκφραση του ZAP-70. Προσδιορίστηκε η έκφραση του ZAP-70 mRNA με τη μέθοδο DNA μικροσυστοιχιών (DNA microarray) και ποσοτικής RT-PCR και η έκφραση της πρωτεΐνης ZAP-70 με ανοσοϊστοχημεία και Western blot. Κατά τη μελέτη των μεταλλάξεων των IgVH γονιδίων, 74% παρουσίαζαν σωματικές υπερμεταλλάξεις, ενώ στο 26% απουσίαζαν. Η έκφραση της ZAP-70 ήταν 5.54 φορές υψηλότερη στις περιπτώσεις ΧΛΛ χωρίς μεταλλάξεις των IgVH γονιδίων, σε σχέση με τις περιπτώσεις ΧΛΛ με μεταλλάξεις. Σε 7% του συνόλου των ασθενών παρατηρήθηκε ασυμφωνία μεταξύ καταστάσεως μετάλλαξης των IgVH γονιδίων και έκφρασης ZAP-70 πρωτεΐνης. Ειδικά, δύο από τους τέσσερις ασθενείς με παρουσία σωματικών μεταλλάξεων και απροσδόκητα θετική έκφραση ZAP-70, είχαν ταχεία πρόοδο νόσου και εμφάνιζαν τα μεταλλαγμένα VH3-21 γονιδιακά τμήματα, η παρουσία των οποίων συνδέεται με κακή πρόγνωση. Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού του mRNA ZAP-70, με τις μεθόδους των DNA μικροσυστοιχιών (DNA microarray) και της ποσοτικής RT-PCR, έδειξαν απόλυτη συσχέτιση μεταξύ τους, σε μεγάλο εύρος mRNA ZAP-70 επιπέδων. Επίσης, τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημείας και Western blot ήταν σε συμφωνία μεταξύ τους. Ειδικά, κατά την τεχνική της ανοσοϊστοχημείας, τα Τ-λεμφοκύτταρα εμφανίζουν ως αναμένεται έντονα θετική κυτταροπλασματική χρώση. Τα κλωνικά λεμφοκύτταρα από τις

περιπτώσεις με απουσία μεταλλάξεων εμφανίζουν έντονη χρώση όπως τα T-λεμφοκύτταρα, ενώ τα κλωνικά λεμφοκύτταρα από τις περιπτώσεις με παρουσία μεταλλάξεων εμφανίζουν ήπια ή πλήρη απουσία χρώσης (εικόνα 9).



Εικόνα 9. Ανοσοϊστοχημική χρώση σε παρασκευάσματα οστεομυελικής βιοψίας, κατά σειρά: αντι-CD20 αντίσωμα προς κατάδειξη των B-κυττάρων, αντι-CD3 προς αναγνώριση των T-κυττάρων και τέλος χρώση για ZAP-70. Η ZAP-70 χρώση είναι θετική στα κλωνικά B-κύτταρα των ΧΛΛ με μη-μεταλλαγμένα IgVH γονίδια (Ig-unmutated CLL) και στα T-κύτταρα.

Σύμφωνα με το αποτέλεσμα της έκφρασης της ZAP-70 πρωτεΐνης κατά την ανοσοϊστοχημική μελέτη, το 86% των ασθενών κατατάχθηκε σύμφωνα με την ύπαρξη ή την απουσία μεταλλάξεων. Η προβλεπτική αξία του θετικού ή του αρνητικού αποτελέσματος ήταν 75% και 100% αντίστοιχα. Και σ'αυτή τη μελέτη η έκφραση της ZAP-70 προσδιόρισε επιθετική μορφή νόσου με κλινική επιδείνωση. Κατά συνέπεια, οι ασθενείς με υψηλή έκφραση ZAP-70 είχαν μέσο διάστημα από τη διάγνωση ως τη θεραπεία 6.4 έτη, ενώ οι ασθενείς που δεν εξέφραζαν ZAP-70 είχαν μέσο διάστημα από τη διάγνωση ως τη θεραπεία περισσότερο από 10 έτη.

Σε μελέτη της Orchard¹⁵⁰ με 167 ασθενείς με Β-ΧΛΛ, παρατηρήθηκε πλήρης (97%) συμφωνία των αποτελεσμάτων του προσδιορισμού της ZAP-70 πρωτεΐνης με κυτταρομετρία ροής (ουδός για θετικότητα το 10%) και του προσδιορισμού του ZAP-70 mRNA. Το 65% των εξετασθέντων ασθενών είχαν μεταλλάξεις των IgVH γονιδίων και ήταν ZAP-70 αρνητικοί ενώ στο 28% απουσίαζαν οι μεταλλάξεις των IgVH γονιδίων και ήταν ZAP-70 θετικοί. Στο 8% του συνόλου των ασθενών παρατηρήθηκε ασυμφωνία

μεταξύ καταστάσεως μετάλλαξης των IgVH γονιδίων και έκφρασης ZAP-70 πρωτεΐνης. Το 4% των ασθενών με μετάλλαξεις των IgVH γονιδίων που ήταν απροσδόκητα ZAP-70 θετικοί, εμφάνιζαν τα VH3-21γονιδιακά τμήματα, η παρουσία των οποίων σχετίζεται με κακή πρόγνωση. Η μέση επιβίωση ήταν 24.4 έτη στους ZAP-70 αρνητικούς ασθενείς και 9.3 έτη στους θετικούς. Επίσης αναφέρεται ότι η έκφραση της ZAP-70 πρωτεΐνης ήταν αμετάβλητη κατά επαναλαμβανόμενες μετρήσεις σε 3ετή παρακολούθηση.

Γενικά, η έκφραση της ZAP-70 πρωτεΐνης είναι σταθερή στο χρόνο και αναδεικνύεται ως ισχυρός προβλεπτικός παράγοντας για την αναγκαιότητα έναρξης θεραπείας. Συνεπώς, μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατά τη διάγνωση για ν'αναγνωρίσει τους ασθενείς που βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο για ταχεία πρόοδο της νόσου. Η ανίχνευση της ZAP-70 πρωτεΐνης ή του ZAP-70 mRNA είναι ένας έμμεσος δείκτης της κατάστασης μετάλλαξης των IgVH γονιδίων, αλλά είναι όπως αποδείχθηκε και ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας^{151,152,153}.

1.9 Θεραπεία

Είναι συνετό ν'αρχίζει η ειδική κυτταροτοξική αγωγή μόνο όταν παρουσιαστούν συγκεκριμένες ενδείξεις¹⁵⁴. Αναλυτικά αυτές είναι :

1. Στάδιο κατά τη διάγνωση Rai III ή IV και Binet C.
2. Προοδευτικά επιδεινούμενη αναιμία ή θρομβοπενία.
3. Άνοσης αιτιολογίας αναιμία ή θρομβοπενία.
4. Ογκώδης, συμπτωματική, επώδυνη λεμφαδενοπάθεια, που προκαλεί αποφρακτικά φαινόμενα σε γειτονικά όργανα.
5. Μαζική σπληνομεγαλία προοδευτικά επιδεινούμενη, με φαινόμενα υπερσπληνισμού.
6. Χρόνος διπλασιασμού λεμφοκυττάρων μικρότερος των 6 μηνών ή μεγαλύτερη από 50% αύξηση σε δύο μήνες. Δεν υπάρχει αυστηρό ανώτατο όριο υπερλευκοκυττάρωσης αναγκαίο για την έναρξη θεραπείας. Όμως πολλοί θεωρούν ότι με αριθμό λεμφοκυττάρων πάνω από 150000/μL είναι συνετό ν'αρχίζει ειδική θεραπεία, γιατί το σύνδρομο υπεργλοιοτότητας λόγω υπερλευκοκυττάρωσης στη ΧΛΛ είναι σπάνιο αλλά είναι παράλληλα και βαρύτερης πρόγνωσης.

7. Αυξημένη επιρρέπεια σε λοιμώξεις.

8. Ύπαρξη β-συμπτωμάτων που σχετίζονται με τη νόσο, όπως απώλεια βάρους >10% σε 6 μήνες, πυρετός > 38°C για 15 ημέρες χωρίς σημεία λοίμωξης, νυκτερινές εφιδρώσεις, έντονη καταβολή.

Πριν την έναρξη της θεραπείας πρέπει να συνεκτιμηθούν πολλοί παράγοντες όπως α) η ηλικία, η κατάσταση ικανότητας, συνυπάρχουσες νοσηρές καταστάσεις και οι επιθυμίες του ασθενούς β) η βαρύτητα των συμπτωμάτων και η παρουσία δυσμενών προγνωστικών παραγόντων γ) ο βαθμός και η διάρκεια απάντησης σε προηγούμενες θεραπείες, αντενδείξεις και παρενέργειες συγκεκριμένων φαρμάκων. Τέλος, επιθυμητή είναι και η εξέταση των φαρμακοοικονομικών παραμέτρων¹⁵⁵.

Η φλουνταραμπίνη, είναι το ανάλογο της δεοξυαδενοσίνης με τη μεγαλύτερη δραστικότητα στη ΧΛΛ. Χορηγείται ως βραχεία ενδοφλέβια έγχυση 30 λεπτών σε δόση 25mgr/m² την ημέρα για 5 συνεχόμενες ημέρες, σε κύκλο 28 ημερών, για 6 έως 8 κύκλους συνολικά. Επίσης, μπορεί να δωθεί και ως per.os αγωγή, σε δόση 40mgr/m² στο ίδιο πρόγραμμα και με ισάξια αποτελέσματα¹⁵⁶.

Όταν χορηγήθηκε η ενδοφλέβια μορφή φλουνταραμπίνης σε ασθενείς που είχαν θεραπευθεί στο παρελθόν, επιτεύχθη συνολική απάντηση 45%, με 10% πλήρη ύφεση. Όταν χορηγήθηκε ως πρώτης γραμμής θεραπεία η συνολική απάντηση ήταν 80%, με 38% πλήρη ύφεση¹⁵⁷.

Η αποτελεσματικότητα της μονοθεραπείας με ενδοφλέβια φλουνταραμπίνη και η ανοχή σ'αυτή, μελετήθηκε σε τυχαιοποιημένη προοπτική κλινική μελέτη της Γαλλικής ομάδας¹⁵⁸. Η μονοθεραπεία με φλουνταραμπίνη 25mgr/m² d1-5 iv συγκρίθηκε με τα σχήματα CAP (Cyclo 750mgr/m² d1 iv, Adriamycin 50mgr/m² d1 iv, PDN 40 mgr/m² d1-5 pos) και ChOP (Adriamycin 25mgr/m² iv d1, VCR 1 mgr/m² iv d1, Cyclo 300mgr/m² d1-5 pos, PDN 40 mgr/m² d1-5 pos). Σ'αυτή την τριών σκελών μελέτη της Γαλλικής ομάδας συμπεριλήφθησαν 938 ασθενείς. Η μονοθεραπεία με φλουνταραμπίνη έδειξε ποσοστό συνολικής απάντησης 71% ίδιο με του ChOP (72%). Το ποσοστό πλήρους υφέσεως με τη φλουνταραμπίνη ήταν μεγαλύτερο (40%), σε σχέση με το ChOP (30%). Επίσης, η μονοθεραπεία με φλουνταραμπίνη ήταν η καλύτερα ανεκτή θεραπεία. Το ποσοστό πενταετούς επιβίωσης ήταν το ίδιο και στα τρία σκέλη της μελέτης¹⁵⁸.

Μεγάλη πολυκεντρική μελέτη με 509 ασθενείς στις Η.Π.Α συνέκρινε τη μονοθεραπεία με φλουνταραμπίνη με τη μονοθεραπεία με χλωραμβουκίλη ως πρώτης γραμμής θεραπεία¹⁵⁹. Στο σκέλος της φλουνταραμπίνης παρατηρήθηκε ποσοστό συνολικής απάντησης 63%, με καλύτερο ποσοστό πλήρους ύφεσης 20%, συγκριτικά με αυτά της χλωραμβουκίλης (37% και 4% αντίστοιχα). Οι ασθενείς στο σκέλος της φλουνταραμπίνης εμφάνισαν παρατεταμένη διάρκεια της απάντησης (25 μήνες), σε σχέση με τους ασθενείς στο σκέλος της χλωραμβουκίλης (14 μήνες). Η συνολική επιβίωση δεν εμφάνισε στατιστικώς σημαντική διαφορά, 66 μήνες για τη φλουνταραμπίνη και 56 μήνες για τη χλωραμβουκίλη.

Οι κυριώτερες ανεπιθύμητες παρενέργειες της φλουνταραμπίνης σχετίζονται με την ανοσοκαταστολή που προκαλεί. Αυξάνει τη συχνότητα των ευκαιριακών λοιμώξεων και την επίπτωση των φαινομένων αυτοανοσίας¹⁶⁰. Σε μια προσπάθεια αύξησης της αποτελεσματικότητας δοκιμάζονται οι συνδυασμοί της με πολλά φάρμακα, κυρίως με την κυκλοφωσφαμίδη και το μονοκλωνικό αντίσωμα Rituximab¹⁶¹.

Η μονοθεραπεία που έχει χρησιμοποιηθεί συχνότερα στο παρελθόν είναι η αγωγή με χλωραμβουκίλη. Συχνά συνδυάζεται με πρενιζολόνη, όμως δεν έχει αποδειχθεί ότι ο συνδυασμός υπερτερεί σε ποσοστό απάντησης ή επιβίωσης, αλλά αντιθέτως σχετίζεται με αυξημένη επίπτωση λοιμώξεων¹⁵⁴. Κατά συνέπεια, η συνταγογράφηση της πρενιζολόνης στη ΧΛΛ δικαιολογείται μόνο για την αντιμετώπιση των αυτοάνοσων επιπλοκών της νόσου. Οι υψηλές δόσεις χλωραμβουκίλης είναι αποτελεσματικότερες αλλά και τοξικότερες. Γενικά, δίνεται σε ηλικιωμένους ασθενείς όταν ο στόχος είναι η ανακούφιση των συμπτωμάτων.

Η πενταμουστίνη (bendamustine) είναι ένα παλιό φάρμακο που δοκιμάζεται με επιτυχία στη ΧΛΛ. Στις μελέτες σύγκρισης με τη χλωραμβουκίλη, έδειξε αποδεκτή τοξικότητα και ενθαρρυντικά ποσοστά αποτελεσματικότητας¹⁶².

Το χιμαιρικό μονοκλωνικό αντίσωμα Rituximab, αναγνωρίζει το CD20 αντιγόνο στην επιφάνεια των νεοπλασματικών και φυσιολογικών Β-λεμφοκυττάρων. Το αντιγόνο CD20 είναι εξαιρετικός στόχος για την εφαρμογή ανοσοθεραπείας στη ΧΛΛ, γιατί εκφράζεται σχεδόν στο 100% των νεοπλασματικών λεμφοκυττάρων. Συνήθως δίνεται σε συνδυασμό με άλλα αντινεοπλασματικά φάρμακα, γιατί όταν χορηγήθηκε ως

μονοθεραπεία τα αποτελέσματα ήταν υποδεέστερα των άλλων θεραπειών. Ως μονήρης αγωγή δίνεται για την αντιμετώπιση της αυτοάνοσης αναιμίας ή θρομβοπενίας^{163,164}.

Η χορήγηση του συνδυασμού Rituximab, φλουνταραμπίνης και κυκλωφοσφαμίδης σε 202 ασθενείς με ΧΛΛ, ως πρώτης γραμμής θεραπεία, παρουσίασε 100% συνολική απάντηση, με 68% πλήρη ύφεση¹⁶¹.

Το ανθρωποποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα alemtuzumab (Campath-1H) στρέφεται ενάντια στο CD-52 αντιγόνο, και καταστρέφει τα νεοπλασματικά λεμφοκύτταρα αλλά και τα φυσιολογικά Β και Τ-κύτταρα. Γίνεται έτσι αντιληπτό, ότι η χορήγηση alemtuzumab προκαλεί βαρύτατη ανοσοκαταστολή και συνοδεύεται από ευκαιριακές λοιμώξεις. Ενδείκνυται στη θεραπεία της ανθεκτικής στη φλουνταραμπίνη ΧΛΛ. Τα αποτελέσματα των κλινικών μελετών του alemtuzumab ως πρώτης γραμμής θεραπεία είναι ενθαρρυντικά, ιδιαίτερα στην κακής πρόγνωσης νόσο^{165,166}.

Ο ρόλος της αυτόλογης μεταμόσχευσης αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων παραμένει περιορισμένος, γιατί περίπου το 30% των ασθενών είναι κάτω των 60 ετών. Η έκβαση της μεταμόσχευσης εξαρτάται απόλυτα από την κατάσταση ύφεσης της νόσου κατά τη συλλογή των προγονικών κυττάρων. Το ποσοστό υποτροπής αγγίζει το 50% στα 4 έτη και το 80% στα 8 έτη μετά τη μεταμόσχευση¹⁶⁷.

Η αλλογενής μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, από ιστοσυμβατό αδελφό ή από ιστοσυμβατό εθελοντή μη-συγγενή δότη, απευθύνεται σε ασθενείς με ηλικία μικρότερη των 55 ετών. Μπορεί να επάγει μακροχρόνιες απαντήσεις σε ασθενείς με ανθεκτική νόσο. Στα 4 έτη μετά τη μεταμόσχευση περίπου το 50% των ασθενών παραμένουν εν ζωή και ελεύθεροι νόσου. Η μείωση της θνητότητας που σχετίζεται με την τοξικότητα της διαδικασίας είναι σημαντικός παράγοντας για τους ασθενείς με ΧΛΛ¹⁶⁸.

2. ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ

2.1 Εισαγωγή

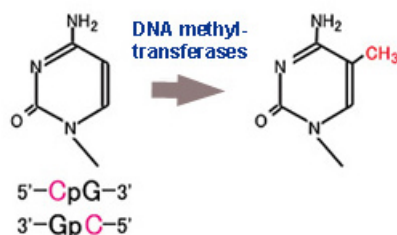
Η ογκογένεση, θεωρείται σαν τη διαδικασία κατά την οποία τα κύτταρα έχουν υποστεί αλλαγές που συνεπάγονται τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απώλεια των ρυθμιστικών μηχανισμών, τη συσσώρευση χρωμοσωμικών βλαβών και τη διαταραχή της διαφοροποίησης. Το εναρκτήριο λάκτισμα μπορεί να είναι σημειακή μετάλλαξη, απάλειψη χρωμοσωμικής περιοχής ή αντιμετάθεση γονιδίων, γεγονότα που διαταράσσουν την έκφραση ογκοκατασταλτικών γονιδίων και πρωτο-ογκογονιδίων. Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια αποσιωπούνται στα νεοπλασματικά κύτταρα και τα ογκογονίδια ενεργοποιούνται μέσω γονιδιακών μεταλλάξεων ή υπερέκφρασης ενός φυσιολογικού γονιδίου¹⁶⁹. Επίσης, στα νεοπλασματικά κύτταρα συσσωρεύονται και πλήθος επιγενετικών μεταβολών, όπως αλλαγές του επιπέδου της μεθυλίωσης του DNA, μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών και αλλαγές της δομής της χρωματίνης¹⁷⁰. Κατά συνέπεια, η νεοπλασματική μεταμόρφωση είναι μια σύνθετη πολλαπλών σταδίων διαδικασία, που περιλαμβάνει τυχαία ενεργοποίηση ογκογονιδίων ή και την αποσιώπηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων δια μέσου γενετικών ή επιγενετικών γεγονότων¹⁷¹.

Κατά την τελευταία 50ετία, το νόημα του όρου επιγενετική μετεξελίχθηκε παράλληλα με την εντυπωσιακή πρόοδο στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης. Σήμερα, ο όρος επιγενετική αναφέρεται στις κληρονομούμενες μεταβολές της γονιδιακής λειτουργίας που δεν οφείλονται σε αλλαγές της αλληλουχίας των βάσεων του DNA. Δύο βασικοί μηχανισμοί που προκαλούν επιγενετικές μεταβολές είναι η μεθυλίωση του DNA και οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών¹⁷². Η διαταραχή στην ισοροπία των επιγενετικών μηχανισμών μπορεί να έχει σημαντική επίδραση στη δομή της χρωματίνης και στη μεταγραφική δραστηριότητα. Οι επιγενετικές μεταβολές μπορούν να γεφυρώσουν την έκθεση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες και το γενετικό υπόστρωμα στη διαδικασία της ογκογένεσης¹⁷³.

Στα ανθρώπινα κύτταρα η μεγάλη πλειοψηφία των γονιδίων είναι απενεργοποιημένα, καθώς τα περισσότερα γονίδια είναι απαραίτητα σε ορισμένα μόνο κύτταρα και εκφράζονται μόνο σε αυτά. Επίσης, η μεθυλίωση διατηρεί το μεγάλο τμήμα του μη κωδικοποιούντος DNA σε αδρανή μεταγραφική κατάσταση¹⁷⁴.

2.2 Μεθυλίωση του DNA

Ο συχνότερος και αναλυτικά μελετημένος επιγενετικός μηχανισμός στον άνθρωπο, είναι η μεθυλίωση του DNA ή αλλιώς η προσθήκη μιας μεθύλ-ομάδας (CH₃) σε κυτοσίνη που προηγείται γουανίνης (5' CpG3' δινουκλεοτίδιο). Η μεθυλίωση της κυτοσίνης συμβαίνει μετά τη σύνθεση του DNA, με ενζυματική μεταφορά της μεθυλομάδας από την S-αδενοσυλομεθειονίνη στον άνθρακα της θέσης 5 του δακτυλίου της κυτοσίνης. Η ενζυματική αντίδραση εκτελείται από ένζυμο της οικογένειας των μεθυλοτρανσφερασών (DNMTs)¹⁷⁵ (εικόνα 10).



Εικόνα 10. Η προσθήκη - CH₃ στον C-5 της κυτοσίνης των CpG-νησίδων.

Η συχνότητα παρουσίας των CpG δινουκλεοτιδίων είναι πολύ μικρότερη (4-5 φορές) από την αναμενόμενη, με γνώμονα τη συχνότητα των βάσεων κυτοσίνης και γουανίνης στο DNA. Από τα υπάρχοντα CpG δινουκλεοτίδια περίπου το 60-90% είναι μεθυλιωμένα και η υψηλή συχνότητα μεθυλίωσης παρέχει την αιτιολόγηση της ελαττωμένης παρουσίας των CpG δινουκλεοτιδίων: οι κυτοσίνες του DNA υπόκεινται σε αυτόματη υδρολυτική απαμίνωση προς ουρακίλη, μια βάση που αναγνωρίζεται από τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, απομακρύνεται και αντικαθίσταται. Αντίθετα, όταν η 5'-μεθυλοκυτοσίνη υφίσταται την ίδια απαμίνωση, η βάση που προκύπτει είναι

θυμίνη, μια βάση που είναι μέρος της φυσιολογικής δομής του DNA και διαφεύγει τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς¹⁷⁶. Συνεπώς, η χαμηλή συχνότητα των CpG δινουκλεοτιδίων πιθανώς αντανάκλα τη σταδιακή τους απώλεια μέσω της περιγραφείσας διαδικασίας χημικής μετάπτωσης, που είναι ένα συχνό χαρακτηριστικό πολυμορφισμού στον άνθρωπο¹⁷⁷.

Τα περισσότερα από τα CpG δινουκλεοτίδια που έχουν διατηρηθεί είναι μεθυλιωμένα και διασκορπισμένα στο γονιδίωμα. Οι περιοχές με πολύ υψηλή συχνότητα παρουσίας CpG δινουκλεοτιδίων ονομάζονται CpG νησίδες. Πρόκειται για περιοχές του γονιδιώματος μήκους 500-2000 ζευγών βάσεων, πλούσιες σε CpG αλληλουχίες και εκτείνονται συχνά στο 5' άκρο της ρυθμιστικής περιοχής (promoter) πολλών γονιδίων. Η πλειοψηφία των CpG νησίδων σχετίζεται με γονίδια που αφορούν στη διατήρηση της κυτταρικής οργάνωσης (house-keeping genes). Στις περιοχές αυτές η συχνότητα παρουσίας των CpG δινουκλεοτιδίων είναι η αναμενόμενη σε σχέση με τη συχνότητα των βάσεων κυτοσίνης και γουανίνης, και ο λόγος CpG / GpC είναι 60%. Αυτό σημαίνει ότι στις περιοχές αυτές τα CpG δινουκλεοτίδια δεν υπέστησαν την απώλεια που συνέβη στο υπόλοιπο γονιδίωμα, που οφείλεται στο γεγονός ότι τα CpG δινουκλεοτίδια στις περιοχές αυτές δεν είναι μεθυλιωμένα, σε αντίθεση με εκείνα που βρίσκονται διασκορπισμένα στο γονιδίωμα¹⁷⁸. Εξάιρεση στον κανόνα, ότι στα φυσιολογικά κύτταρα οι CpG νησίδες είναι αμεθυλίωτες, αποτελούν οι CpG νησίδες των γονιδίων που υπόκεινται σε γονιδιωματική αποτύπωση (imprinted genes) και των γονιδίων στο αδραντοποιημένο χρωμόσωμα X. Στις δύο αυτές περιπτώσεις οι CpG νησίδες είναι κατ'εξάιρεση φυσιολογικά εξ'ολοκλήρου μεθυλιωμένες¹⁷⁹.

2.3 Μεθυλίωση του DNA και νεοπλασία

Δύο ειδών διαταραχές της μεθυλίωσης έχουν αναγνωρισθεί στα νεοπλασματικά κύτταρα από άνθρωπο: απομεθυλίωση και υπερμεθυλίωση¹⁸⁰.

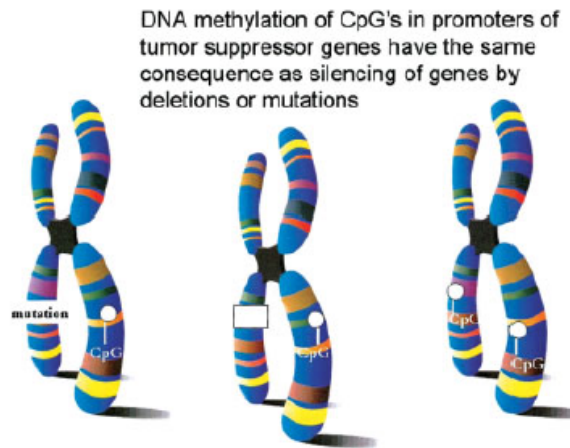
Τα χαμηλά επίπεδα της συνολικής μεθυλίωσης του DNA (global hypomethylation) στους νεοπλασματικούς ιστούς σε σχέση με τους φυσιολογικούς, ήταν από τις πρώτες επιγενετικές μεταβολές που παρατηρήθηκαν στους νεοπλασματικούς ιστούς¹⁸¹. Οι δύο πιθανές συνέπειες της απομεθυλίωσης του γονιδιώματος είναι: α) η απώλεια του

ελέγχου της μεταγραφής σε φυσιολογικά «σιωπηρές» περιοχές, που θα μπορούσε να οδηγήσει σε έκφραση ιικών και φυσιολογικά απενεργοποιημένων γονιδίων και β) η περικεντρομεριδιακή αστάθεια, καθώς οι περιοχές του κεντρομεριδίου χρειάζονται αυξημένα επίπεδα μεθυλίωσης για τη σωστή λειτουργία τους¹⁸².

Η δεύτερη μεταβολή της μεθυλίωσης του DNA που θεωρείται σημαντικό γεγονός στην ογκογένεση, είναι η υπερμεθυλίωση των CpG νησίδων της ρυθμιστικής περιοχής (promoter-υποκινητών) των ογκοκατασταλτικών γονιδίων (regional hypermethylation). Είναι μηχανισμός καταστολής της μεταγραφής και αδρανοποίησης των ογκοκατασταλτικών γονιδίων (silencing)¹⁸³.

Σύμφωνα με τη θεωρία που διατύπωσε το 1971 ο Alferd Knudson, δύο διαδοχικές γενετικές βλάβες απαιτούνται για τη μεταμόρφωση ενός φυσιολογικού κυττάρου σε νεοπλασματικό. Προϋπόθεση για τη διαταραχή της λειτουργίας ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου, είναι η απώλεια της έκφρασης και των δύο αλληλίων του γονιδίου (απώλεια ετεροζυγωτίας) διαμέσου απάλειψης ή μετάλλαξης (Knudson two-hit model)¹⁸⁴. Η υπερμεθυλίωση του υποκινητή ενός γονιδίου μπορεί να έχει το ίδιο αποτέλεσμα με μια μετάλλαξη στην κωδικοποιούσα περιοχή του γονιδίου. Ενώ οι σημειακές μεταλλάξεις σπάνια μπορούν να αποτελέσουν αιτία για την απώλεια της λειτουργίας και των δύο αλληλίων, η υπερμεθυλίωση των υποκινητών και των δύο αντιγράφων ενός γονιδίου δεν είναι σπάνια στα νεοπλασματικά κύτταρα¹⁸⁵.

Σήμερα γίνεται αντιληπτό, ότι μεταβολές σε τρία επίπεδα συμβάλλουν στην απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Μεταλλάξεις στην κωδικοποιούσα αλληλουχία, μερική ή πλήρη απώλεια γονιδίου και επιγενετική αποσιώπηση γονιδίου, μόνοι ή σε συνδυασμό είναι οι υπεύθυνοι μηχανισμοί για την απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων¹⁸⁶ (εικόνα 11).



Εικόνα 11. Η επιγενετική αποσιώπηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων διευρύνει την τρέχουσα θεωρία του Knudson.

Η υπερμεθυλίωση των υποκινητών (promoter) των γονιδίων είναι πιθανώς μια πολυσταδιακή διαδικασία, σε αντίθεση με την εμφάνιση μιας μετάλλαξης σε ένα γονίδιο. Χρειάζονται αλληπάλληλες ώσεις διαταραγμένης μεθυλίωσης, για να προκύψει τόσο έντονη υπερμεθυλίωση ικανή να προκαλέσει μεταγραφική αποσιώπηση του αντίστοιχου γονιδίου¹⁸⁷.

Σχεδόν το 50% των γονιδίων που προκαλούν οικογενείς μορφές καρκίνου και είναι μεταλλαγμένα στη γενετική σειρά, είναι γνωστό ότι υπόκεινται σε επιγενετική αποσιώπηση, μέσω υπερμεθυλίωσης των υποκινητών, στις σποραδικές μορφές καρκίνου. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τα γονίδια : VHL (von Hippel-Lindau), BRCA1 (breast cancer 1), STK11 (serine/threonine kinase 11), των οποίων οι μεταλλάξεις στη γενετική σειρά προκαλούν οικογενείς μορφές καρκίνου νεφρού, μαστού και παχέως εντέρου αντίστοιχα. Τα προαναφερθέντα γονίδια VHL, BRCA1, STK11 είναι απενεργοποιημένα λόγω υπερμεθυλίωσης των υποκινητών τους, στις σποραδικές μορφές αυτών των νεοπλασμάτων¹⁸⁸.

Επιπρόσθετα, συνεχώς αυξάνεται ο κατάλογος υποψηφίων ογκοκατασταλτικών γονιδίων, των οποίων αναστέλεται η έκφρασή τους μέσω μεθυλίωσης των υποκινητών τους, σε πληθώρα νεοπλασιών. Τα γονίδια αυτά επηρεάζουν σημαντικές κυτταρικές οδούς και η επιγενετική αποσιώπησή τους προσδίδει πλεονέκτημα επιβίωσης στο νεοπλασματικό κύτταρο. Παραδείγματα τέτοιων γονιδίων είναι: το γονίδιο MGMT (O⁶-

methylguanine-DNA-methyltransferase) που κωδικοποιεί σημαντικό γονίδιο επιδιόρθωσης του DNA¹⁸⁹, το γονίδιο του αναστολέα 2B της κινάσης που εξαρτάται από την κυκλίνη (CDKN2B) και κωδικοποιεί τη ρυθμιστική του κυτταρικού κύκλου πρωτεΐνη p15¹⁹⁰, το γονίδιο GSTP1 που συμμετέχει στο μεταβολισμό των καρκινογόνων¹⁹¹, τα γονίδια DAPK (death-associated protein kinase) και TMS1 (target of methylation-induced silencing) που είναι ρυθμιστές της απόπτωσης¹⁹².

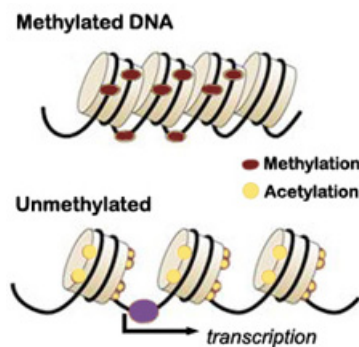
Η υπερμεθυλίωση στο 5' άκρο της ρυθμιστικής περιοχής διαφόρων ογκοκατασταλτικών micro-RNA είναι ένας ακόμη μηχανισμός ογκογένεσης¹⁹³. Τα micro-RNA είναι μικρού μεγέθους 22-νουκλεοτιδίων RNA, τα οποία δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Τα micro-RNA κωδικοποιούνται από γονίδια τα οποία μεταγράφονται από DNA, αλλά δε μεταφράζονται σε πρωτεΐνες. Ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση μέσω ειδικής πρόσδεσης στην 3' περιοχή του mRNA στόχου. Διάφορα micro-RNA ρυθμίζουν την έκφραση ενός mRNA και ένα micro-RNA ρυθμίζει περισσότερα του ενός mRNA¹⁹³. Η μεθυλίωση της ρυθμιστικής περιοχής του miR-124, η οποία προκαλεί ενεργοποίηση του ογκογονιδίου cyclinD-kinase 6 έχει περιγραφεί ως συνήθης επιγενετική μεταβολή σε αρκετά νεοπλάσματα¹⁹⁴.

2.4 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών και νεοπλασία

Φυσιολογικά, το μεγαλύτερο μέρος του γενώματος είναι οργανωμένο σε συμπυκνωμένη μορφή μεταγραφικά αδρανούς χρωματίνης, όπως ο τύπος της περικεντρομεριδιακής ετεροχρωματίνης. Η περικεντρομεριδιακή ετεροχρωματίνη εδράζεται κοντά στο κεντρομερίδιο του χρωμοσώματος, είναι συμπυκνωμένη χρωματίνη, μεταγραφικά ανενεργής. Το DNA είναι συνεπτυγμένο στα νουκλεοσώματα. Το νουκλεόσωμα, η βασική δομική μονάδα της χρωματίνης, αποτελείται από περίπου 200bp DNA και οκταμερές ιστόνης. Τα νουκλεοσώματα στις μεταγραφικά ανενεργείς περιοχές περιέχουν αποακετυλιωμένες ιστόνες, ειδικά την αποακετυλιωμένη ιστόνη H3. Η αποακετυλίωση των ιστονών καταλύεται από τις αποακετυλάσες των ιστονών (HDACs). Η κατάσταση αποακετυλίωσης των ιστονών βοηθά στη διατήρηση του νουκλεοσώματος σε συμπυκνωμένη μεταγραφικά σιωπηρή μορφή. Αντιθέτως, ένα μικρό

τμήμα του γενώματος είναι μεταγραφικά ικανό και η χρωματίνη είναι αποσυμπυκνωμένη, ενεργή μεταγραφικά ευχρωματίνη¹⁸⁸.

Η μεθυλίωση του DNA καθ'αυτή συμβάλει στη διατήρηση της μεταγραφικά αδρανούς κατάστασης της ετεροχρωματίνης. Οι πρωτεΐνες που συνδέονται με τη μεθυλοκυτοσίνη (MBPs) σχηματίζουν συμπλέγματα με τις HDACs και πιθανά έτσι οι MBPs επαξάνουν την αποακετυλίωση των ιστονών στο μεθυλιωμένο DNA στις μεταγραφικά σιωπηρές περιοχές¹⁷⁵ (εικόνα 12).



Εικόνα 12. Η απομεθυλίωση του DNA αποσυμπυκνώνει τη χρωματίνη και επιτρέπει την ακετυλίωση των ιστονών και την επακόλουθη ενεργοποίηση της μεταγραφικής μηχανής.

Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στις ιστόνες είναι σημαντική κατηγορία επιγενετικών μεταβολών. Οι τροποποιήσεις των ιστονών αφορούν προσθήκη διαφορετικών χημικών ομάδων και σε διαφορετικό βαθμό. Η γονιδιακή μεταγραφή, η επιδιόρθωση και αντιγραφή του DNA καθώς και η οργάνωση των χρωμοσωμάτων είναι μερικές από τις λειτουργίες του πυρήνα οι οποίες επηρεάζονται από τις τροποποιήσεις των ιστονών. Γενικά, η ακετυλίωση των ιστονών σχετίζεται με ενεργοποίηση της μεταγραφικής μηχανής^{195,196}.

2.5 Επιγενετικές αλλαγές στην Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία

Οι επιγενετικές μεταβολές μπορούν να γεφυρώσουν με τον καλύτερο τρόπο την έκθεση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες και το γενετικό υπόστρωμα κατά διαδικασία

της ογκογένεσης. Τα τελευταία έτη το ενδιαφέρον έχει εστιαστεί στις επιγενετικές αλλαγές που πιθανά συμβάλλουν στην ανάπτυξη της ΧΛΛ¹⁹⁷.

Όπως και σε πλήθος άλλων νεοπλασιών, έτσι και στη ΧΛΛ, έχει δειχθεί ότι το DNA των ασθενών με ΧΛΛ, έχει υποστεί γενικευμένη υπομεθυλίωση, σχετικά με το DNA περιφερικών μονοπυρήνων υγιών εθελοντών¹⁹⁸.

Όμως, όπως και σε άλλους τύπους νεοπλασιών παρατηρείται περιοχική υπερμεθυλίωση (regional hypermethylation), εξ'αιτίας της υπερμεθυλίωσης των CpG νησίδων της ρυθμιστικής περιοχής (promoter-υποκινητών) ογκοκατασταλτικών γονιδίων¹⁹⁹.

Ο Twist2, μεταγραφικός παράγοντας σημαντικός για τη διαφοροποίηση του εμβρυικού μεσοδέρματος, βρέθηκε μεταγραφικά αποσιωπημένος μέσω DNA υπερμεθυλίωσης. Επίσης, η απενεργοποίησή του συσχετίστηκε με τον επιθετικό τύπο της ΧΛΛ χωρίς υπερμεταλλάξεις στην IgVH περιοχή²⁰⁰.

Τα γονίδια CDH1, CDH13, DAPK, CRBP1 και RARβ βρέθηκαν μεθυλιωμένα σε περιπτώσεις ΧΛΛ και λεμφωμάτων, αλλά ποτέ σε φυσιολογικά κύτταρα²⁰¹.

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο DLEU7, που εδράζεται στην περιοχή συχνής απάλειψης 13q, είναι συχνά μεθυλιωμένο στη ΧΛΛ, αλλά ποτέ σε φυσιολογικά Β-λεμφοκύτταρα²⁰².

Υπερμεθυλίωση του υποκινητή του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p15 ανιχνεύθηκε στο 12% των εξετασθέντων ασθενών με ΧΛΛ ασχέτως σταδίου νόσου²⁰³.

Οι επιγενετικές μεταβολές πιθανώς, είναι ανιχνεύσιμες πριν την πλήρωση των διαγνωστικών κριτηρίων της νόσου¹⁹⁷. Η υπόθεση αυτή είναι παρόμοια με το γεγονός της ανίχνευσης των μεταλλάξεων του ATM γονιδίου, σε DNA απομονωθέν από περιφερικό αίμα 155 ασθενών, 10 έτη πριν την επίσημη διάγνωση της νόσου^{186,197}.

2.6 Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο von Hippel-Lindau (VHL)

Περίπου πριν 100 έτη, ο Γερμανός οφθαλμίατρος Eugen von Hippel περιέγραψε την οικογενή εμφάνιση αγγειωμάτων του αμφιβληστροειδή χιτώνα. Μετέπειτα, ο Σουηδός νευρολόγος Arvind Lindau αναγνώρισε ότι τα οικογενή αιμαγγειώματα του αμφιβληστροειδή χιτώνα, είναι σημείο συστηματικής οικογενούς νόσου, που προκαλεί

ανάλογες βλάβες στο κεντρικό νευρικό σύστημα και πολλαπλές σπλαγχνικές κύστεις, ειδικά στο νεφρό και το πάγκρεας. Το von Hippel-Lindau σύνδρομο κληρονομείται με τον αυτοσωμικό επικρατούντα χαρακτήρα. Τα προσβεβλημένα άτομα μετά τα είκοσι έτη ζωής, αναπτύσσουν ποικίλους όγκους, όπως αιμαγγειοβλαστώματα αμφιβληστροειδή, παρεγκεφαλίδας, νωτιαίου μυελού, νεφρικό καρκίνο, φαιοχρωμοκύττωμα, λεμφαγγειοσάρκωμα έσω ωτός, νησιδιακούς όγκους του παγκρέατος, κυσταδενώματα επιδιδυμίδας²⁰⁴.

Όπως συμβαίνει στις περισσότερες οικογενείς μορφές καρκίνου, έτσι και η von Hippel-Lindau νόσος συνδέεται με την απενεργοποίηση ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου, στην προκειμένη περίπτωση του γονιδίου VHL. Το γονίδιο VHL εδράζεται στο χρωμόσωμα 3 στην περιοχή 3p26-25. Οι ασθενείς με VHL νόσο έχουν κληρονομήσει ένα αδρανές αλληλίο VHL από τον προσβεβλημένο γονέα. Η ογκογένεση στη νόσο συνδέεται με την αδρανοποίηση ή την απώλεια του άλλου υγιούς VHL αλληλίου, που οδηγεί στην απώλεια της VHL πρωτεΐνης (pVHL)²⁰⁵.

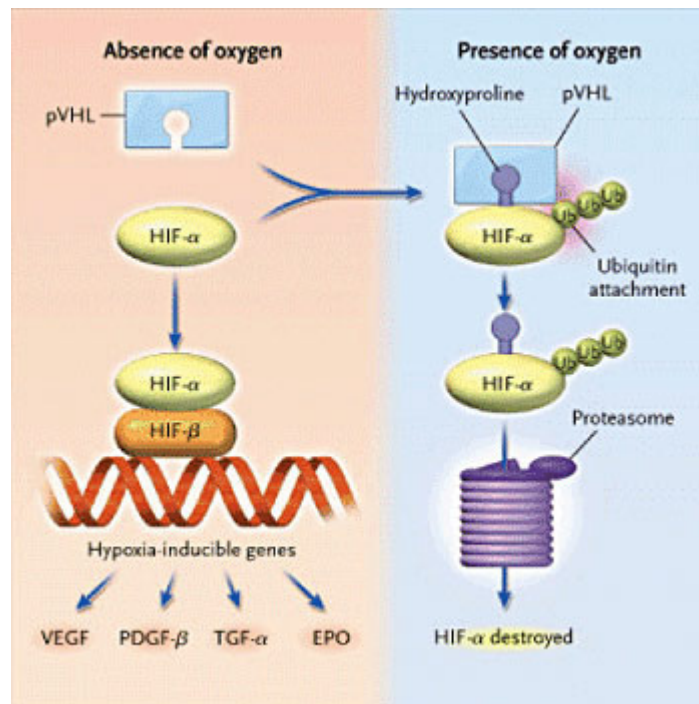
Τα γονίδια που ενέχονται στις οικογενείς μορφές καρκίνου, κατέχουν σημαντικό ρόλο και στις σποραδικές μορφές αυτών των νεοπλασμάτων. Το VHL γονίδιο είναι συχνά απενεργοποιημένο εξ' αιτίας μετάλλαξης ή επιγενετικής αποσιώπησης σε σποραδικό νεφρικό καρκίνο και αιμαγγειοβλάστωμα. Προφανώς, στη σποραδική μορφή οι βλάβες του VHL γονιδίου ανιχνεύονται στα σωματικά και όχι στα γεννητικά κύτταρα²⁰⁶.

Η VHL πρωτεΐνη (pVHL) είναι ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη, παρούσα κυρίως στο κυτταρόπλασμα και εμφανίζει πολλαπλές δράσεις. Συμμετέχει στο σύστημα ουμπικουϊνίνης-πρωτεασώματος που ρυθμίζει το μεταβολισμό πλήθους πρωτεϊνών²⁰⁷.

Το σύστημα ουμπικουϊνίνης-πρωτεασώματος αποδομεί μη-φυσιολογικές πρωτεΐνες από το κυτταρόπλασμα, τον πυρήνα και το ενδοπλασματικό δίκτυο. Ελέγχει τα κυτταρικά επίπεδα πρωτεϊνών με βραχεία ζωή, οι οποίες ρυθμίζουν πολλαπλές κυτταρικές λειτουργίες. Η διαδικασία περιλαμβάνει ενζυματικό καταρράκτη διαμέσου του οποίου, συνδέονται στην πρωτεΐνη- στόχο πολλαπλά μόρια ουμπικουϊνίνης (πολυουμπικουϊνίνωση). Το μόριο ουμπικουϊνίνης αποτελείται από 76 αμινοξέα και η διαδικασία πολυουμπικουϊνίνωσης είναι τριών σταδίων. Η προσθήκη ουμπικουϊνίνης ξεκινά με τη σύνδεση του ενζύμου E1 που ενεργοποιεί την ουμπικουϊνίνη (E1ubiquitin

activated enzyme) και με τη διαδοχική δράση των E2 (E2ubiquitin-conjugating enzyme) και E3 (E3 ubiquitin-lingase) ενζύμων καταλύεται η μεταφορά και η σύνδεση της ουμπικουϊνής στην ε-αμινομάδα ενός υπολείμματος λυσίνης της πρωτεΐνης-στόχου. Η σημαδεμένη, με τα μόρια ουμπικουϊνής, πρωτεΐνη-στόχος μεταφέρεται στο πρωτεάσωμα για μεταβολισμό από το σύμπλεγμα 26S. Το πρωτεάσωμα είναι κυλινδρικό οργανύλιο που αναγνωρίζει τις πρωτεΐνες που έχουν υποστεί πολυουμπικουϊνίωση, τις αποικοδομεί και ανακυκλώνει την ουμπικουϊνή^{208,209}.

Η πρωτεΐνη pVHL είναι μέρος του συμπλέγματος πρωτεϊνών VCB-CUL2, που έχει δράση λιγκάσης της ουμπικουϊνής, ανάλογης με το ένζυμο E3 (E3 ubiquitin-lingase). Παρουσία οξυγόνου, το παραπάνω σύμπλεγμα στοχεύει προς πολυουμπικουϊνίωση και αποδόμηση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-a (hypoxia-inducible factor alpha). Προϋπόθεση όμως, για την αλληλεπίδραση της pVHL και του HIF-a, είναι η υδροξυλίωση του HIF-a από τις οξυγονοεξαρτώμενες προλυλυδροξυλάσες της οικογένειας PHD. Συνεπώς, ο αδιάκοπα παραγόμενος από το κύτταρο HIF, σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνωσης υδροξυλιώνεται και τότε αναγνωρίζεται από το σύμπλεγμα λιγκάσης της ουμπικουϊνής, όπου συμμετέχει η pVHL και στη συνέχεια μέσω πολυουμπικουϊνίωσης, αποδομείται στο πρωτεάσωμα²¹⁰ (εικόνα 13).



Εικόνα 13. Σε συνθήκες φυσιολογικής συγκέντρωσης οξυγόνου, ο HIF μέσω της pVHL αδρανοποιείται στο πρωτεάσωμα, ενώ σε συνθήκες υποξίας ή δυσλειτουργίας της pVHL, ο ενεργός HIF επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων που ελέγχει.

Ο μεταγραφικός παράγων HIF, ελέγχει τη μεταγραφική ενεργοποίηση περίπου 200 γονιδίων. Τα γονίδια αυτά προάγουν την προσαρμογή του κυττάρου σε συνθήκες υποξίας²¹⁰. Συνθήκες υποξίας παρατηρούνται στους συμπαγείς όγκους και στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών. Στις νεοπλασίες με απώλεια της έκφρασης του VHL γονιδίου, το πρόγραμμα μεταγραφής του HIF αποσυνδέεται από τη διαθεσιμότητα του οξυγόνου και επάγεται προάγοντας την ανάπτυξη του όγκου²¹¹. Πολλά από τα γονίδια που στοχεύει ο HIF εμπλέκονται στη διαδικασία της ογκογένεσης. Σ'αυτά, συμπεριλαμβάνονται γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που ελέγχουν την αγγειογένεση: όπως ο VEGFA (vascular endothelial growth factor A γνωστός και ως VEGF), ο PDGF (platelet-derived growth factor B), ο CTGF (connective tissue growth factor), γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που ελέγχουν τη δημιουργία και το μεταβολισμό της εξωκυττάριας ουσίας όπως : ο MMP1 (matrix metalloproteinase 1), τον

κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση όπως : ο TGF α (transforming growth factor- α), ο EGFR (epidermal growth factor receptor)²¹⁰.

Μολονότι ο HIF ήταν το επίκεντρο της έρευνας γύρω από τις δράσεις του VHL, γίνεται ολοένα και σαφέστερο, ότι η pVHL έχει και λειτουργίες ανεξάρτητες του HIF²¹².

Η σύνδεση της pVHL με τους μικροσωληνίσκους του κυττάρου είναι αναγκαία για να διατηρηθεί μια ειδική δομική κατασκευή του κυττάρου, που ονομάζεται « πρωτογενής βλεφαρίδα » (primary cilium). Η προσεκβολή αυτή, είναι ειδική δομή της κυτταρικής επιφάνειας, με σημαίνοντα ρόλο στη μεταγωγή χημικών (π.χ αυξητικών παραγόντων) και μηχανικών εξωτερικών σημάτων²¹³. Η απώλεια της δραστηριότητας της pVHL, οδηγεί σε απώλεια της πρωτογενούς βλεφαρίδας²¹⁴. Ο μηχανισμός ρύθμισης της ακεραιότητας της συγκεκριμένης προσεκβολής από την pVHL, δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος. Πιθανά, να σχετίζεται με τη σύνδεση της pVHL στην κινεσίνη2 και την επακόλουθη σταθεροποίηση των κυτταρικών μικροσωληνίσκων^{215,216}. Η αξιοπερίεργη αυτή κυτταρική δομή, είναι φανερό ότι κατέχει οργανωτικό ρόλο στη μεταγωγή σήματος των σχετικών με την ογκογένεση μορίων, όπως του smoothen και της β -κατενίνης²¹⁷.

Η pVHL με πολλές και σύνθετες δράσεις ρυθμίζει την οργάνωση της εξωκυττάριας ουσίας²¹⁸. Συνδέεται με τη φιμπρονεκτίνη και το υδροξυλιωμένο κολλαγόνο IV και τα κύτταρα με έλλειψη της pVHL αποτυγχάνουν στη δημιουργία κατάλληλης εξωκυττάριας ουσίας²¹⁹. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την αύξηση των επιπέδων του VEGF (δράση μέσω HIF) συνεισφέρει στην αγγειογένεση και ογκογένεση²²⁰.

Επιπρόσθετη, ανεξάρτητη του HIF, δράση της pVHL είναι η επίδραση σε μόρια ρυθμιστές της απόπτωσης όπως ο NF κ B (nuclear factor κ B) και η p53. Η pVHL δρα υποβοηθητικά στην προαγωγή της φωσφορυλίωσης του CARD9, που είναι αγωνιστής του NF κ B, μειώνοντας έτσι τη δραστηριότητα του NF κ B²²¹. Επίσης, η pVHL συνδέεται με την p53 επαυξάνοντας την σταθερότητά της και τη δραστηριότητά της στα βλαπτικά για το γένωμα ερεθίσματα. Τα μειωμένα επίπεδα της pVHL, συνεπάγονται αυξημένα επίπεδα NF κ B και ασταθή p53²²².

Η pVHL συνδέεται στον μεταγραφικό παράγοντα SP1, αναστέλλοντας τη μεταγραφή αρκετών εξαρτώμενων από τον SP1 γονιδίων²²³. Επίσης, επηρεάζει τη

σταθερότητα συγκεκριμένων mRNAs, όπως του VEGF, μέσω σύνδεσης με το μόριο HuR²²⁴. Πρόσφατη μελέτη αναφέρει, ότι η pVHL μέσω του SP1 και HuR μειώνει τα επίπεδα του υποδοχέα του IGF1 (insulin-like growth factor 1)²²⁵. Όλες οι παραπάνω δράσεις είναι ανεξάρτητες της συγκέντρωσης του HIF.

Συνοπτικά, η αδρανοποίηση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου VHL, έχει σαν επακόλουθο την άρση της λειτουργίας της pVHL, που είναι μέρος του συμπλέγματος της E3 λιγκάσης της ουμπικουιίνης, η οποία στοχεύει τον HIFα για να επάγει την αποδόμησή του παρουσία οξυγόνου. Ανάλογα, τα νεοπλασματικά κύτταρα με έλλειψη της pVHL, υπερπαράγουν τα πρωτεϊνικά προϊόντα των γονιδίων που στοχεύει ο HIF, τα οποία εμπλέκονται στον κυτταρικό μεταβολισμό, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην αγγειογένεση²¹⁰.

2.7 Το γονίδιο με γονιδιωματική αποτύπωση MEG3 (MEG3 imprinted gene)

Τα θηλαστικά είναι διπλοειδικοί οργανισμοί, τα κύτταρα των οποίων κατέχουν δύο αλληλία από κάθε χρωμόσωμα. Ένα κληρονομείται από τη μητέρα και ένα από τον πατέρα. Δηλαδή, υπάρχουν δύο αντίγραφα κάθε γονιδίου. Φυσιολογικά, και το μητρικό και το πατρικό αντίγραφο ενός συγκεκριμένου γονιδίου, έχουν την ίδια πιθανότητα ενεργοποίησης σε κάθε κύτταρο²²⁶.

Η γονιδιωματική αποτύπωση είναι επιγενετικός μηχανισμός, που μεταβάλλει αυτή τη δυναμική, γιατί περιορίζει τη γονιδιακή έκφραση σ'ένα γονεϊκό αλληλόμορφο. Είναι ένα φαινόμενο που εκδηλώνεται σε μερικές εκατοντάδες γονίδια, από τα περίπου 25000 γονίδια που συνιστούν το ανθρώπινο γονιδίωμα. Το φαινόμενο της γονιδιωματικής αποτύπωσης δεν έχει σχέση με το φύλο, συμβαίνει σ'άνδρες και γυναίκες κατά όμοιο τρόπο. Δηλαδή, στην περίπτωση ενός γονιδίου που υφίσταται γονιδιωματική αποτύπωση και είναι ενεργό το μητρικά κληρονομούμενο αλληλίο, θα είναι ενεργά τα μητρικά κληρονομούμενα αλληλία και ανενεργά τα πατρικά κληρονομούμενα αλληλία, τόσο στους άνδρες όσο στις γυναίκες²²⁶.

Το 1991 αναγνωρίστηκε αυτή η νέα τάξη γονιδίων^{227,228}. Τα γονίδια που υπόκεινται σε γονιδιωματική αποτύπωση δε βρίσκονται ομοιόμορφα καταμεμημένα στο γονιδίωμα, αλλά σχηματίζουν συσσωματώματα (clusters)²²⁹. Η κατανομή αυτή

αντανακλά τη συντονισμένη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων του συσσωματώματος. Ένα κέντρο γονιδιωματικής αποτύπωσης (Imprinting Centre) δρα in cis και ελέγχει τοπικά την εγκατάσταση και τη διατήρηση των γονιδιωματικών σημάτων. Τα γονεϊκά αλληλόμορφα των γονιδίων που υφίστανται γονιδιωματική αποτύπωση παρουσιάζουν διαφορετικά πρότυπα μεθυλίωσης και οι περιοχές αυτές καλούνται περιοχές με διαφορετική μεθυλίωση (DMRs – Differentially Methylated Regions). Οι αλληλουχίες των DMRs περιοχών περιέχουν σε αυξημένη αναλογία CpG δινουκλεοτίδια και ομοιάζουν με τις CpG νησίδες των υποκινητών των γονιδίων. Δηλαδή, η γονιδιακή έκφραση ενός μόνο αλληλόμορφου εξασφαλίζεται με μια σειρά επιγενετικών τροποποιήσεων, όπως η μεθυλίωση των κυτοσινών²³⁰. Οι DMRs περιοχές διακρίνονται σε πρωτογενείς ή γαμετικές, όπου η εγκατάσταση της μεθυλίωσης γίνεται κατά τη γαμετογένεση και διατηρείται σταθερή στα σωματικά κύτταρα και είναι σημάδι αποτύπωσης. Συνήθως, στις πρωτογενείς DMRs περιλαμβάνονται τα κέντρα γονιδιωματικής αποτύπωσης. Στις δευτερογενείς ή σωματικές DMRs, η εγκατάσταση της μεθυλίωσης συμβαίνει κατά την εμβρυογένεση και προσφέρει στη διατήρηση της ειδικής γονεϊκής αποσιώπησης²³¹.

Καθένα από τα συσσωματώματα των γονιδίων με γονιδιωματική αποτύπωση εκφράζει πολλά mRNA και τουλάχιστον ένα non-coding RNA. Στα τέσσερα καλώς αναγνωρισμένα συμπλέγματα γονιδίων όπως Igf2r, Kcnq1, Igf2 και Dlk1 παρατηρείται το ίδιο πρότυπο κατά το οποίο το χρωμόσωμα που φέρει τη γαμετική μεθυλιωμένη DMR (περιλαμβάνει το IC, είναι σημάδι αποτύπωσης, δεν περιλαμβάνει κατ'ανάγκη τους υποκινητές των γονιδίων) εκφράζει mRNA αλλά δεν εκφράζει ncRNA. Το χρωμόσωμα που φέρει την γαμετική μη μεθυλιωμένη DMR παρουσιάζει το αντίστροφο πρότυπο, καταστολή στην έκφραση mRNA και έκφραση του ncRNA. Έχει παρατηρηθεί ότι ενώ η απώλεια της γαμετικής μεθυλιωμένης DMR δεν είχε αξιοσημείωτα αποτελέσματα, η απώλεια της γαμετικής μη μεθυλιωμένης DMR ανέστρεφε πλήρως την ειδική γονεϊκή έκφραση, χανόταν η έκφραση του ncRNA και η έκφραση του mRNA προερχόταν και από τα δύο αλληλόμορφα²³².

Πρόσφατα, στη χρωμοσωμική περιοχή 14q32, τυποποιήθηκε η παρουσία ζεύγους, στενά συνδεδεμένων, γονιδίων με γονιδιωματική αποτύπωση. Είναι τα DLK1/MEG3 γονίδια, που εδράζονται στη θέση 14q32 σε απόσταση 90kb μεταξύ τους. Το

DLK1 (delta drosophila homolog-like 1) βρίσκεται ανοδικά (upstream) του MEG3 (Maternally Expressed 3). Η προγενέστερη ονομασία του MEG3 ήταν GTL2. Το αλληλόμορφο του DLK1 που εκφράζεται είναι πάντα το πατρικό και του MEG3 το μητρικό αλληλόμορφο^{233,234}.

Πάντοτε, στο DLK1 γονίδιο είναι ενεργό το πατρικά κληρονομούμενο αλληλίο του γονιδίου. Κωδικοποιεί προϊόν μοριακού βάρους 45-60Kd, που είναι διαμεμβρανική πρωτεΐνη, ανήκει στην οικογένεια επιδερμικών αυξητικών παραγόντων (Epidermal Growth Factor-like protein) που περιλαμβάνει τους Notch υποδοχείς και συνδέτες. Η DLK1 πρωτεΐνη εμπλέκεται στη διαδικασία κυτταρικής διαφοροποίησης, κυτταρικής σηματοδότησης και της μεταγωγής κυτταρικού σήματος. Είναι σημαντική για τη διαφοροποίηση: της μυελώδους μοίρας των επινεφριδίων, των λιποκυττάρων, των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων και των οστεοβλαστών²³⁵. Αναφέρεται η υπερέκφραση της DLK1 πρωτεΐνης στο νευροβλάστωμα, σε μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονος, νευροενδοκρινικούς όγκους, όγκους εγκεφάλου και λεμφώματα^{236,237}.

Το γονίδιο MEG3 (Maternally Expressed 3) δεν κωδικοποιεί πρωτεΐνη και παράγει μη-κωδικοποιούν RNA (non-coding RNA). Εκφράζεται πάντα το μητρικά κληρονομούμενο αλληλίο²³⁸. Η DMR περιοχή, που περιλαμβάνει τον υποκινητή του γονιδίου, στο πατρικό αλληλίο του MEG3 είναι μεθυλιωμένη, ενώ το μητρικό αλληλίο που εκφράζεται φυσιολογικά, έχει αμεθυλίωτη την περιοχή DMR²³⁹. Το γονίδιο MEG3 θεωρείται ογκοκατασταλτικό γονίδιο και σχετίζεται με την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού²³⁸. Έχει αναφερθεί, ισχυρή έκφραση του MEG3 στους φυσιολογικούς ανθρώπινους ιστούς, ιδιαίτερα στην υπόφυση και στον εγκέφαλο²⁴⁰. Επίσης είναι γνωστό, ότι το mRNA του MEG3 δεν ανιχνεύεται στην πλειονότητα των αδενωμάτων της υπόφυσης και σε πολλές σειρές καρκινικών κυττάρων²⁴⁰. Ιδιαίτερα, η ισομορφή MEG3α, μετάγραφο του MEG3, δρα κατασταλτικά στην κυτταρική ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό σε κυτταρικές σειρές ταχέως πολλαπλασιαζόμενων τραχηλικών νεοπλασμάτων (σειρά HeLa), αδενοκαρκινωμάτων μαστού (σειρά MCF-7) και νευρογλοιώματος (σειρά H4)²⁴⁰. Επιπρόσθετα, βλάβες της περιοχής 14q32.3, όπου εδράζεται το γονίδιο, έχουν αναφερθεί στο 50% των επιθετικών μηνιγγιωμάτων²⁴¹, σε ρινοφαρυγγικό καρκίνο²⁴², σε καρκίνο του παχέος εντέρου²⁴³ και σε T-

λευχαιμία/λέμφωμα των ενηλίκων²⁴⁴. Αναφέρεται ότι η ογκοκατασταλτική δράση του MEG3 ασκείται από μηχανισμούς εξαρτώμενους από την πρωτεΐνη p53 αλλά και από ανεξάρτητους της p53 δρόμους²⁴⁵.

Επιγραμματικά, η γονιδιωματική αποτύπωση είναι η επιλεκτική ή αποκλειστική έκφραση ενός γονιδίου που προέρχεται μόνο από το ένα γονεϊκό αλληλόμορφο. Η διαδικασία αυτή εξασφαλίζεται με μια σειρά επιγενετικών διαδικασιών. Το MEG3 θεωρείται ογκοκατασταλτικό γονίδιο, που κωδικοποιεί non-coding RNA, υπόκειται σε γονιδιωματική αποτύπωση και εκφράζεται πάντα το μητρικό αλληλίο²³⁸.

3. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός στην παρούσα διατριβή ήταν να μελετηθούν :

α) η κατάσταση μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου VHL, σε γενωμικό DNA απομονωθέν από τομές παραφίνης οστεομυελικής βιοψίας και από ορό. Το γονίδιο VHL είναι ρυθμιστής του κυτταρικού μεταβολισμού, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της αγγειογένεσης και της απόπτωσης. Η μεθυλίωση του VHL δεν έχει μελετηθεί στη ΧΛΛ

β) η κατάσταση μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου MEG3, σε γενωμικό DNA απομονωθέν από τομές παραφίνης οστεομυελικής βιοψίας και από ορό. Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο MEG3 έχει μελετηθεί σε λεμφώματα, δεν έχει μελετηθεί προς το παρόν στη ΧΛΛ. Πιθανολογείται ότι ογκοκατασταλτική του δράση σχετίζεται με την p53, εκτενώς μελετημένη πρωτεΐνη στη ΧΛΛ.

γ) η ανίχνευση με ανοσοϊστοχημικές τεχνικές της έκφρασης της πρωτεΐνης ZAP-70 στα νεοπλασματικά κύτταρα σε τομές παραφίνης οστεομυελικής βιοψίας.

δ) η συσχέτιση της κατάστασης μεθυλίωσης του υποκινητή των υπό μελέτη γονιδίων με κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους της νόσου και την έκφραση της ZAP-70.

ε) η ύπαρξη διαφορών στην κατάσταση μεθυλίωσης του υποκινητή των υπό μελέτη γονιδίων στο γενωμικό DNA της οστεομυελικής βιοψίας και του ορού.

Η επιλογή του ορού για απομόνωση νεοπλασματικού DNA, έγινε έχοντας ως δεδομένο τις παρατηρήσεις που υποδηλώνουν ότι ο ορός είναι μια πολύτιμη πηγή νεοπλασματικού DNA²⁴⁶. Είναι γνωστό από δεκαετίας, ότι ελεύθερο ειδικό του όγκου DNA απομονώνεται στον ορό ή στο πλάσμα καρκινοπαθών ασθενών^{247,248,249}. Επίσης, διαλυτό ελεύθερο νεοπλασματικό DNA από δείγματα ορού και πλάσματος, έχει απομονωθεί και αναλυθεί σε ασθενείς με Β-λεμφοϋπερπλαστικά σύνδρομα²⁵⁰. Σε μελέτη 110 ασθενών με Β non-Hodgkin λέμφωμα και Β-οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία, απομονώθηκε από δείγματα ορού και πλάσματος ελεύθερο κλωνοτυπικό DNA κατά τη διάγνωση, στο 86% των ασθενών²⁵¹. Η ύπαρξη ελεύθερου νεοπλασματικού DNA έχει δειχθεί κατά τη διάγνωση στον ορό ασθενών με λέμφωμα Hodgkin²⁵². Πρόσφατα, ανακοινώθηκε ότι το φορτίο του ελεύθερου κλωνοτυπικού DNA, απομονωθέν από

πλάσμα, κατά τη διάγνωση, σε ασθενείς με Β-μη Hodgkin λέμφωμα (διάχυτο από μεγάλα Β-κύτταρα, οζώδες και λέμφωμα μανδύα), λέμφωμα Hodgkin σχετίζεται με τις κλινικές παραμέτρους, την πρόγνωση της νόσου και αντανακλά λειτουργικά χαρακτηριστικά της νόσου όπως ο πολλαπλασιασμός, η νέκρωση και η απόπτωση²⁵³.

Σε νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με ΧΛΛ, μετά από λεπτομερή καταγραφή του ιστορικού και των ευρημάτων της κλινικής εξέτασης γινόταν τα κάτωθι :

1. πλήρης ανοσοφαινότυπος λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος με το πλήρες panel συμπεριλαμβανομένου του CD38
2. Οστεομυελική βιοψία και ανοσοϊστοχημική χρώση για ZAP-70 μαζί με το Β-δείκτη CD20 και ένα Τ-ειδικό δείκτη όπως το CD3, ώστε να διακρίνεται η παρουσία Τ λεμφοκυττάρων
3. Καρυότυπος μυελού με κλασσικές τεχνικές, όπου μπορεί να ληφθεί ανάλογο δείγμα
4. Φύλαξη ορού κατά τη διάγνωση, πριν την έναρξη αγωγής.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4. ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 Λήψη ορού αίματος

Από περιφερική φλέβα του ασθενούς, λαμβάνονται κάτω από άσηπτες συνθήκες 5ml φλεβικού αίματος. Το δείγμα αίματος εισάγεται σε σωληνάριο Wasserman Vacutainer Becton-Dickinson με προπηκτική γέλη SST. Στη συνέχεια, το σωληνάριο φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία δωματίου, σε 3000 στροφές ανά λεπτό (rpm) για 20 λεπτά χωρίς φρένο. Συλλέγεται το υπερκείμενο και αποθηκεύεται σε αποστειρωμένα σωληνάρια Eppendorf στους -30° .

4.2 Λήψη οστεομυελικής βιοψίας

Προκειμένου να προβούμε στην παρακέντηση-βιοψία μυελού των οστών, ζητάμε από τον ασθενή να κατακληθεί πρηνηδόν και επιλέγουμε μία από τις δύο (αριστερά ή δεξιά) οπίσθιες άνω λαγόνιες άκανθες. Μετά τον εντοπισμό του σημείου της οπίσθιας άνω λαγόνιας άκανθας το οποίο θα επιλέξουμε για την παρακέντηση, προχωρούμε στη διήθηση του δέρματος και του περιεστώματος με επαρκή ποσότητα διαλύματος 1% ξυλοκαΐνης (συνήθως 5ml). Εάν κρίνεται αναγκαίο, ακολουθεί μικρή τομή με χειρουργικό νυστέρι, ώστε να είναι ευχερής η διέλευση της ειδικής βελόνας οστεομυελικής βιοψίας. Αναμένουμε το αναισθητικό αποτέλεσμα της ξυλοκαΐνης, και με σταθερή ελαφρώς συστροφική σπειροειδή κίνηση, εισάγουμε τη βελόνα βιοψίας Jamshidi (εικόνα 14), διαμέσου του δέρματος και του υποδόριου στο περίοστεο. Όταν η βελόνα βιοψίας διεισδύσει στον οστικό φλοιό, απομακρύνεται ο οδηγός και η βελόνα προωθείται αργά με εναλλαγή δεξιόστροφων και αριστερόστροφων συστροφικών κινήσεων. Μετά από επαρκή διείσδυση στο οστόν (περίπου 4cm), η βελόνα περιστρέφεται επανειλημμένα σε διαφορετικά βάθη. Στο τέλος, η βελόνα αποσύρεται αργά με αντίρροπες συστροφικές κινήσεις. Το επαρκές μήκος του οστικού κυλίνδρου είναι 4-6 cm.



Εικόνα 14. Η ειδική βελόνα βιοψίας μυελού των οστών Jamshidi

4.3 Απομόνωση DNA από δείγμα ορού

Για την απομόνωση γενωμικού DNA από δείγματα ορών, χρησιμοποιήθηκε το QIAamp DNA mini kit (Qiagen). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την απομόνωση του DNA από τον ορό, είναι παρόμοια με αυτή που προτείνεται από το εγχειρίδιο της κατασκευάστριας εταιρείας για την απομόνωση DNA από δείγμα περιφερικού αίματος. Αναλυτικά: 20μl πρωτεϊνάσης τοποθετήθηκαν σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο των 1.5ml, ενώ στη συνέχεια προστέθηκαν 200 μl του δείγματος και 200 μl του διαλύματος λύσης buffer AL. Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση σε vortex για 15 περίπου δευτερόλεπτα και επώαση στους 56⁰C για 10 λεπτά. Μετά από προσθήκη 200 μl απόλυτης αιθανόλης (τερματίζεται η διαδικασία της δράση της πρωτεϊνάσης) και ταχεία ανάδευση, τα διαλύματα τοποθετούνταν σε ειδικές κολώνες καθαρισμού, που παρέχονται από την εταιρεία και ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 8.000 rpm για 1 λεπτό (κατακράτηση του DNA στον ηθμό). Ακολούθησε εκ νέου προσθήκη 500 μl διαλύματος έκπλυσης AW1 και νέα φυγοκέντρηση στις 8.000 rpm για 1 λεπτό και μετά προσθήκη 500 μl διαλύματος έκπλυσης AW2 και φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm για 3 λεπτά. Στη συνέχεια, κάθε στήλη τοποθετούνταν σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο των 1.5 ml και μετά από προσθήκη 200 μl διαλύματος έκλουσης buffer AE ή απεσταγμένου νερού ddH₂O γινόταν νέα φυγοκέντρηση στις 8.000 rpm για 1 λεπτό, οπότε στο υποκείμενο διάλυμα εκλούονταν το γενωμικό DNA. Οι φυγοκεντρήσεις πραγματοποιήθηκαν στην φυγόκεντρο

τύπου Eppendorf, Centrifuge 5424. Τα διαλύματα DNA φυλάσσονται στους -20°C για μήνες.

4.4 Απομόνωση DNA από βιοψία μυελού των οστών και λεμφαδένα σε τομές παραφίνης

Για την απομόνωση του γενωμικού DNA από βιοψίες μυελού των οστών σε τομές παραφίνης, χρησιμοποιήθηκε το QIAamp DNA mini kit (Qiagen) με ορισμένες τροποποιήσεις. Όλες οι διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν σε περιβάλλον ελεύθερου RNA. Αρχικά, τομές πάχους 20mm κόπηκαν από βιοψίες μυελού των οστών σε κύβους παραφίνης με την χρήση μικροτόμου. Τρεις τομές από κάθε περίπτωση ασθενούς, τοποθετήθηκαν μέσα σε αποστειρωμένο μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο των 1.5 ml. Προστέθηκαν 980 μl διαλύματος ξυλόλης και τα δείγματα αναδεύθηκαν έντονα σε vortex. Ακολούθησε φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου στις 8.000 rpm για 5 λεπτά. Απόρριψη της ξυλόλης και ξέπλυμα του ιζήματος δύο φορές με διάλυμα απόλυτης αιθανόλης σε θερμοκρασία δωματίου. Τα ιζήματα για κάθε περίπτωση ασθενούς, αφέθηκαν να στεγνώσουν στους 37°C για περίπου 15-30 λεπτά.

Στη συνέχεια προστέθηκαν 20 μl πρωτεάσης και 200 μl διαλύματος ATL και ακολούθησε πολύ καλή ανάδευση σε vortex. Τα δείγματα επώαστηκαν στους 56°C για τουλάχιστον 16 ώρες μέχρι πλήρους λύσεως του ιστού, ενώ ανά τακτά διαστήματα κατά τη διάρκεια της πέψης μεσολαβούσε ανάδευση σε vortex. Ακολούθησε προσθήκη 200 μl διαλύματος λύσης buffer AL, ισχυρή ανάδευση σε vortex και επώαση στους 70°C για περίπου 10 λεπτά. Η αντίδραση τερματίστηκε με την προσθήκη 200 μl απόλυτης αιθανόλης, ισχυρή ανάδευση σε vortex και μεταφορά του διαλύματος σε ειδικές κολώνες καθαρισμού που παρέχονται από την εταιρεία. Η διαδικασία ξεπλυμάτων και τελικής έκλουσης του DNA είναι παρόμοια με εκείνη που περιγράφηκε νωρίτερα για την απομόνωση DNA από δείγματα ορών. Τα τελικά διαλύματα DNA φυλάσσονται στους -20°C για μήνες.

4.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction PCR)

Προκειμένου να αναλυθεί η δομή και η λειτουργία ενός συγκεκριμένου τμήματος του DNA, είναι απαραίτητο να παραχθεί ένας μεγάλος αριθμός αντιγράφων του τμήματος αυτού. Με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, καθίσταται δυνατή η παραγωγή πολλαπλών αντιγράφων ενός επιλεγμένου τμήματος της αλληλουχίας του DNA, έτσι ώστε να διευκολυνθεί η μελέτη του. Η μέθοδος αναπτύχθηκε το 1984 από τον Kary Mullis²⁵⁴, ο οποίος τιμήθηκε με Nobel χημείας το 1993.

Η αρχή της μεθόδου της PCR βασίζεται στην ιδιότητα ενζύμων, γνωστών ως DNA πολυμεράσες, να αντιγράφουν το DNA ξεκινώντας από αφετηριωμένες αλυσίδες που περιέχουν υδροξύλιο στο 3' άκρο τους. Δύο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια μεγέθους 15-30 βάσεων με δομή συμπληρωματική ως προς τις δύο αλυσίδες της αλληλουχίας-στόχου είναι απαραίτητα για την αντίδραση. Αυτά χρησιμεύουν ως αφετηρίες ή εκκινητές (primers) για τη DNA πολυμεράση, η οποία προσθέτει αλληλοδιαδόχως νουκλεοτίδια στο 3' άκρο του κάθε εκκινητή χρησιμοποιώντας σαν μήτρα την άλλη αλυσίδα²⁵⁵.

Για τις αντιδράσεις χρησιμοποιείται ένα θερμοάντοχο ένζυμο, το οποίο προέρχεται από βακτήριο *Thermus aquaticus* που έχει απομονωθεί σε θερμές πηγές και ονομάζεται Taq DNA πολυμεράση. Απαραίτητη για την αντίδραση είναι επίσης, η προσθήκη τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs) και ιόντων μαγνησίου²⁵⁶.

Η αντίδραση PCR περιλαμβάνει τρία στάδια :

1^ο στάδιο:μετουσίωση του DNA (denaturation): το στάδιο αυτό πραγματοποιείται σε υψηλές θερμοκρασίες (92-96^οC για 30-60 sec) προκειμένου να επιτευχθεί η διάσπαση των δεσμών υδρογόνου που συνδέουν τις δύο αλυσίδες της διπλής έλικας του DNA και να επιτευχθεί η αποδιάταξη του δίκλωνου DNA και η μετατροπή του σε μονόκλωνο.

2^ο στάδιο:υβριδισμός των εκκινητών (annealing): οι θερμοκρασίες που απαιτούνται για το στάδιο αυτό καθορίζονται από το T_m (melting temperature) των εκκινητών (είναι συνήθως 5^οC κάτω από το T_m). Ο υβριδισμός λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία 50-65^οC για 20-40 sec. Οι εκκινητές (primers) είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, μήκους 18-30 βάσεων, τα οποία αφορίζουν την αλληλουχία του DNA που πρόκειται να πολλαπλασιασθεί. Οι εκκινητές αποτελούνται από διαφορετικές, μη συμπληρωματικές

μεταξύ τους αλληλουχίες, για να μην υβριδίζονται μεταξύ τους, αλλά να υβριδίζονται με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA. Κατά συνέπεια, ανάλογα με τη νουκλεοτιδική τους σύσταση, οι εκκινητές αναγνωρίζουν συμπληρωματικές θέσεις στις αποδιαταγμένες αλυσίδες DNA όπου και υβριδίζονται.

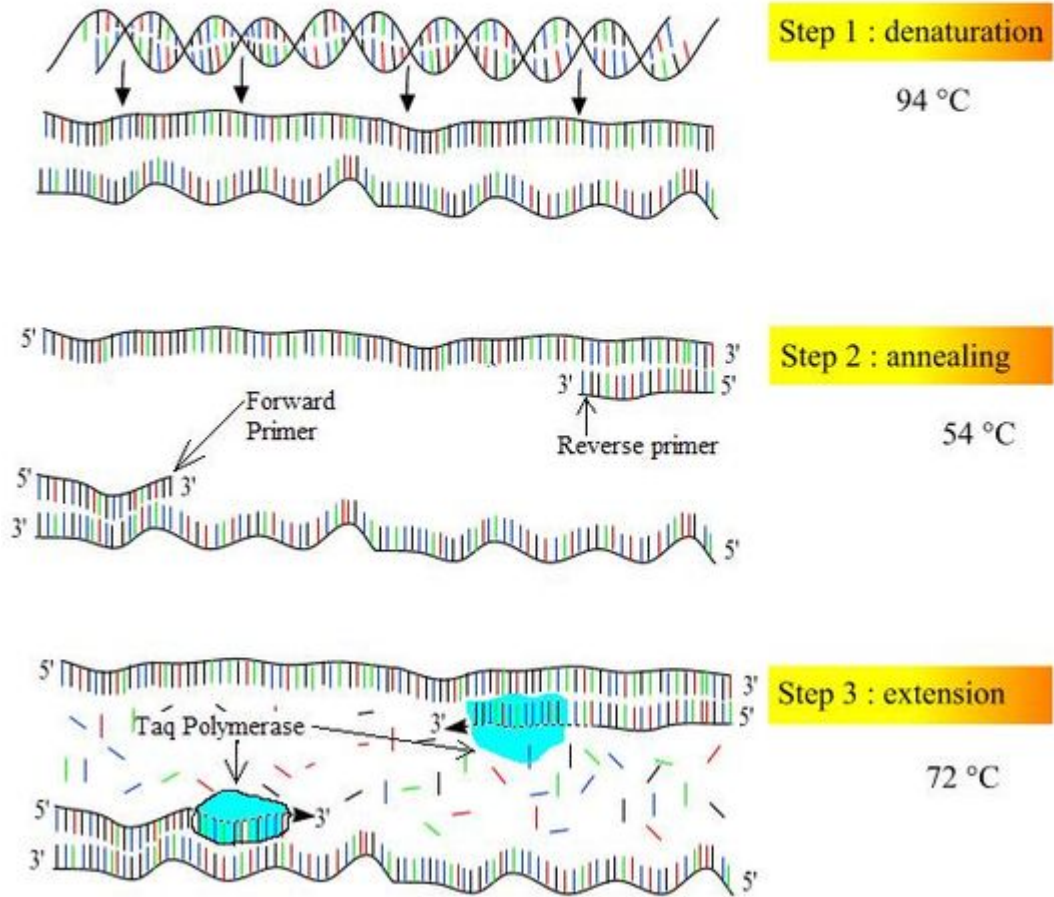
3^ο στάδιο: σύνθεση και επιμήκυνση των αλυσίδων (extension): στο βήμα αυτό, που πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες 70-75^οC για 60-180 sec, συμβαίνει η σύνθεση των συμπληρωματικών κλώνων του DNA. Με τη δράση της DNA πολυμεράσης, προστίθενται συμπληρωματικές βάσεις δεοξυριβονουκλεοτιδίων στο 3' άκρο κάθε αφετηρίας, με αποτέλεσμα τη σύνθεση νέων αλυσίδων DNA σε κατεύθυνση 5' προς 3', συμπληρωματικές προς αυτές του αρχικού DNA μορίου.

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε διάλυμα που περιέχει το επιλεγμένο προς πολλαπλασιασμό DNA, το κατάλληλο ζεύγος εκκινητών, ισομοριακό μίγμα των τεσσάρων τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) σε περίσσεια, ιόντα μαγνησίου και Taq πολυμεράση με το ρυθμιστικό της διάλυμα για βέλτιστες συνθήκες²⁵⁷.

Σε μια τυπική ανάλυση PCR ο κύκλος αποδιάταξης, υβριδισμού και σύνθεσης DNA μπορεί να επαναληφθεί συνήθως 30 - 40 φορές. Η αύξηση του αριθμού των αντιγράφων της αλληλουχίας-στόχου είναι εκθετική, γιατί τα αντίγραφα κάθε κύκλου χρησιμεύουν ως πρότυπα για τον επόμενο. Τοιουτοτρόπως, στο πέρας της αντίδρασης λαμβάνουμε περισσότερα από 2³⁶ δηλαδή 68 εκατομμύρια αντίγραφα του αρχικού τμήματος-στόχου DNA²⁵⁸.

Οι ειδικές συσκευές μέσα στις οποίες πραγματοποιούνται οι αντιδράσεις PCR είναι πλήρως αυτοματοποιημένες και ονομάζονται «θερμικοί κυκλοποιητές» (Thermocyclers). Τα τελικά προϊόντα της PCR ανιχνεύονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.

PCR : Polymerase Chain Reaction

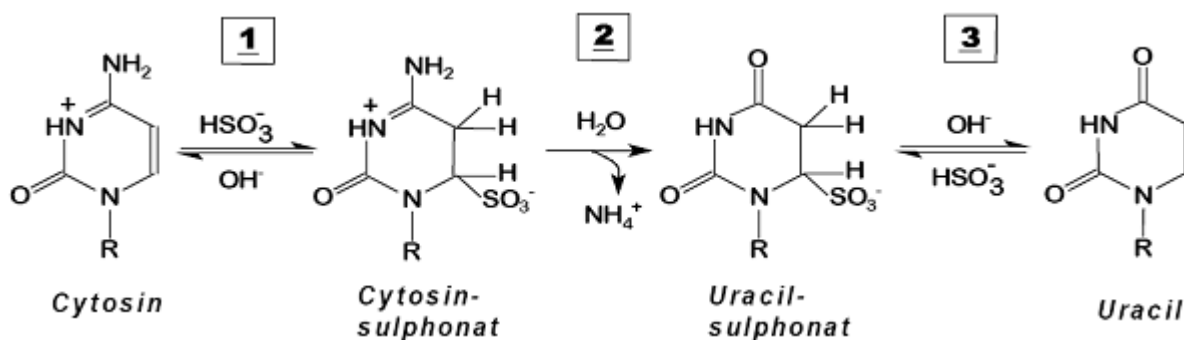


Εικόνα 15. Αρχή της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

4.6 Χημική κατεργασία με NaHSO₃ (bisulfite modification)

Η εισαγωγή της χημικής μετατροπής του DNA με όξινο θειώδες νάτριο (NaHSO₃), επέφερε επανάσταση στη μεθοδολογία της ανάλυσης της μεθυλίωσης του γενωμικού DNA. Η χρησιμότητα της τεχνικής, σε συνδυασμό με PCR ενίσχυση και αλληλούχιση, αναδείχθηκε από τους M.Fromer και συνεργάτες, έγινε καθολικά αποδεκτή και υιοθετήθηκε παγκοσμίως²⁵⁹.

Η τεχνική βασίζεται στη μετατροπή από το NaHSO₃ των κυτοσινών σε ουρακίλες, σε μονόκλωνο DNA, ενώ οι 5-μεθυλοκυτοσίνες παραμένουν αμετάβλητες. Οι αμεθυλιώτες κυτοσίνες μετατρέπονται σε ουρακίλες μέσω σουλφονυλιώσεων και απαμινώσεων (εικόνα 16).



Εικόνα 16. 1^οβήμα: σουλφονυλίωση, 2^οβήμα: υδρολυτική απαμίνωση, 3^οβήμα: αλκαλική αποσουλφονυλίωση. Η μετατροπή της κυτοσίνης σε ουρακίλη με τη δράση του όξινου θειώδους ιόντος γίνεται σε αλκαλικό διάλυμα.

Η πλήρης χημική μετατροπή των κυτοσινών είναι κρίσιμη και επειδή μόνο οι κυτοσίνες του μονόκλωνου DNA είναι ευαίσθητες στην αντίδραση, γίνεται αντιληπτή η σημασία της αποδιάταξης (denaturation) της διπλής έλικας του DNA. Επίσης, σημαντικοί παράμετροι της επιτυχίας της αντίδρασης, είναι η θερμοκρασία και η συγκέντρωση άλατος.

Το EZ DNA Methylation™ kit (Zymo Research, USA), που χαρακτηρίζεται από απλοποιημένες και εκσυγχρονισμένες διαδικασίες και ελαχιστοποιεί την απώλεια DNA κατά την κατεργασία, χρησιμοποιήθηκε για την τροποποίηση με NaHSO₃ του γενωμικού DNA.

Αναλυτικά η πειραματική πορεία είχε ως εξής:

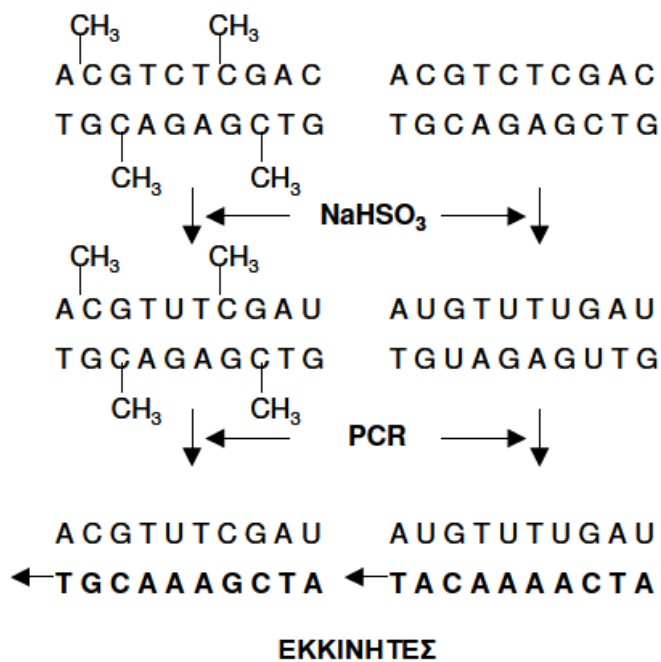
1. Προσθέτουμε 5μl M-Dilution Buffer σε 500ng από το DNA του δείγματος, συμπληρώνουμε με αποστειρωμένο νερό μέχρι τα 50 μl και αναδεύουμε το μείγμα.
2. Επώαση στους 37⁰ C για 15 λεπτά.
3. Μετά, προσθέτουμε 100μl CT Conversion Reagent και αναδεύουμε ελαφρά.
4. Ακολουθεί επώαση σε υδατόλουτρο στους 50⁰ C, στο σκοτάδι, διάρκειας 12-16 ωρών (το συστατικό στοιχείο του CT Conversion Reagent είναι φωτοευαίσθητο)
5. Επώαση των δειγμάτων στους 0⁰-4⁰ C (π.χ σε πάγο) για 10 λεπτά.
6. Προσθέτουμε 400μl από το M-Binding Buffer και αναδεύουμε.
7. Μετεφέρουμε τα δείγματα στα ειδικά σωληνάκια με ενσωματωμένο ηθμό (Zymo-SpinTM IC Columns), τα οποία εναποθέτουμε εντός μικροφυγοκεντρικών σωληναρίων των 1,5ml.
8. Φυγοκεντρούμε στις 1000 x g για 1 λεπτό και ακολουθεί απόρριψη του υπολείμματος της εκροής, που έχει συλλεγεί στο σωληνάριο.
9. Προσθέτουμε στη στήλη 100μl M-Wash Buffer, φυγοκεντρούμε όπως προηγουμένως και απορρίπτουμε το υπόλειμμα.
10. Ακολουθεί πρόσθεση στη στήλη 200μl M-Desulphonation Buffer και μετά από παραμονή για 20 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, φυγοκεντρούμε με τις ίδιες συνθήκες.
11. Προσθέτουμε 200μl M-Wash Buffer, φυγοκεντρούμε στις ίδιες συνθήκες και απορρίπτουμε το υπόλειμμα. Τέλος, προσθέτουμε 100μl ddH₂O, ακολουθεί φυγοκέντρηση και συλλέγεται το DNA δι' εκπλύσεως στη βάση του μικροφυγοκεντρικού σωληναρίου. Το τελικό διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία -20⁰ C.

Συγχρόνως με τα προς ανάλυση δείγματα, υφίσταται χημική τροποποίηση με NaHSO₃ και δείγμα ανθρώπινου DNA ολικά μεθυλιωμένου (CpG GenomeTM Universal Methylated, Chemicon International), το οποίο χρησιμοποιείται σαν θετικός μάρτυρας κατά την ηλεκτροφόρηση.

4.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ειδικής της μεθυλίωσης (Methylation-specific PCR - MSP)

Η ειδική της μεθυλίωσης αντίδραση PCR (MSP) αναπτύχθηκε και παρουσιάστηκε από τους Stephen Baylin και James Herman το 1996, στο Ιατρικό ίδρυμα Johns Hopkins²⁶⁰. Είναι ειδική και ευαίσθητη μέθοδος για την ανίχνευση της μεθυλίωσης των CpG νησίδων σε γενωμικό DNA.

Αρχικά, όπως περιγράφηκε το DNA υφίσταται χημική κατεργασία με όξινο θειώδες νάτριο, διαδικασία που μετατρέπει τις αμεθυλιώτες βάσεις της κυτοσίνης σε βάσεις ουρακίλης, οι οποίες αναγνωρίζονται από τους εκκινητές της PCR ως βάσεις θυμίνης. Οι 5-μεθυλοκυτοσίνες ανθίστανται σ' αυτή τη μεταβολή και παραμένουν ως κυτοσίνες. Στη συνέχεια, λαμβάνουν χώρα δύο αντιδράσεις PCR με το χημικά τροποποιημένο DNA. Χρησιμοποιούνται ειδικά σχεδιασμένα ζεύγη εκκινητών, για το διαχωρισμό των μεθυλιωμένων από τα μη μεθυλιωμένα αλληλόμορφα. Δηλαδή, το ένα ζεύγος εκκινητών αναγνωρίζει τις αλληλουχίες DNA με τις κυτοσίνες και πολλαπλασιάζεται έτσι το μεθυλιωμένο DNA, ενώ το άλλο ζεύγος εκκινητών αναγνωρίζει τις αλληλουχίες με τις ουρακίλες και πολλαπλασιάζεται έτσι το μη μεθυλιωμένο DNA (εικόνα 17).



Εικόνα 17. Αρχή της τεχνικής MSP : Το DNA απαμινώνεται με όξινο θειώδες νάτριο και στη συνέχεια οι διαφορετικές αλληλουχίες που προκύπτουν μπορούν να πολλαπλασιασθούν ξεχωριστά με διαφορετικούς εκκινητές.

Η MSP αντίδραση απαιτεί μικρή ποσότητα DNA, είναι ευαίσθητη μέθοδος και ανιχνεύει μεθυλιωμένα αλληλία σε ποσοστό 0,1% σε μια δεδομένη περιοχή CpG νησίδων. Επιπρόσθετα, επιτελείται σε DNA απομονωθέν από δείγματα ιστών σε παραφίνη.

Για την αντίδραση MSP χρησιμοποιήθηκε το HotStarTaq Master Mix kit της Qiagen. Η PCR αντίδραση έλαβε χώρα σε τελικό όγκο 25μl, που περιείχε: HotStarTaq Master Mix (τελική συγκέντρωση 1X PCR buffer, 2.5 μονάδες HotStarTaq DNA πολυμεράση, 200mM καθενός dNTP και 1.5mM MgCl₂), 0.4μM των κατάλληλων εκκινητών και 30ng χημικά τροποποιημένου DNA.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της μεθυλίωσης των γονιδίων VHL, MEG3 και οι συνθήκες της ειδικής της μεθυλίωσης αντίδρασης PCR αναγράφονται λεπτομερώς στον πίνακα 4. Οι εκκινητές είναι σύμφωνοι με τις διεθνείς βιβλιογραφικές αναφορές^{261,239}. Οι αντιδράσεις PCR έλαβαν χώρα σε θερμικό κυκλοποιητή Engine Peltier (Biorad). Σε κάθε δείγμα ασθενούς για το υπό εξέταση γονίδιο, αντιστοιχούσαν

δύο αντιδράσεις. Μία αντίδραση με εκκινητές σχεδιασμένους για την περίπτωση που η υπό μελέτη περιοχή είναι μεθυλιωμένη και μία αντίδραση με εκκινητές σχεδιασμένους για την περίπτωση που η υπό μελέτη περιοχή δεν είναι μεθυλιωμένη.

Για κάθε αντίδραση PCR παράλληλα με τα υπό μελέτη δείγματα εξετάζονταν και ένα δείγμα χωρίς DNA προς έλεγχο ύπαρξης επιμολύνσεων. Το προαναφερθέν δείγμα λειτουργούσε ως τυφλό (blank). Επίσης, ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ολικά μεθυλιωμένο ανθρώπινο DNA, που διατίθεται στο εμπόριο (CpG Genome™ Universal Methylated, Chemicon International).

Όλα τα προαναφερθέντα πειράματα (απομόνωση DNA, χημική κατεργασία με NaSOH του DNA, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ειδική της μεθυλίωσης) έλαβαν χώρα στο Ερευνητικό Εργαστήριο της Αιματολογικής Κλινικής υπό τη διεύθυνση του Καθηγητή κ. Κ.Λ. Μπουραντά.

Πίνακας 4. Αναφράφονται οι αλληλουχίες των εκκινητών, οι PCR συνθήκες και προϊόντα για τα υπό μελέτη γονίδια.
(όπου M-MSP: methylated primers, U-MSP: un methylated primers)

Γονίδιο	Εκκινητές	M-MSP εκκινητές 5´-3´	Μέγεθος προϊόντος PCR σε bp	U-MSP εκκινητές 5´-3´	Μέγεθος προϊόντος PCR σε bp	Κύκλοι	Συνθήκες PCR
VHL	forward	GTTGGATTTTTTGTGTAT GT	158	TGGAGGATTTTTTGGGTACGC	165	35	95 ^o C:30sec 60 ^o C:30sec 72 ^o C:30sec
	reverse	CCCAAACCAACACCCACA AA		GAACCGAACGCCCGGAA			
MEG3/ DLK1	forward	GTTAGTAATCGGGTTTGT CGGC	160	GAGGATGGTTAGTTATTGGGGT	120		
	reverse	AATCATAACTCCGAACAC CCGCG		CCACCATAAACCAACCCCTATAATCA CA		5	94 ^o C:3min 94 ^o C:30sec 70 ^o C:30sec 72 ^o C:30sec
						5	94 ^o C:30sec 65 ^o C:30sec 73 ^o C:30sec
						30	94 ^o C:30sec 60 ^o C:30sec 72 ^o C:30sec
							72 ^o C:5min

4.8 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης επιτρέπει το διαχωρισμό, το χαρακτηρισμό και την απομόνωση τμημάτων DNA. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο γεγονός ότι τα μόρια DNA υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, λόγω του αρνητικού φορτίου του φωσφορικού σκελετού, θα μετακινηθούν προς το θετικό πόλο. Τα δίκλινα γραμμικά τμήματα DNA που κινούνται στο πήκτωμα αγαρόζης, διανύουν απόσταση η οποία είναι αντιστρόφως ανάλογη του δεκαδικού λογάριθμου του μοριακού τους βάρους ή του αριθμού των βάσεων τους.

Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των μορίων DNA στο πήκτωμα αγαρόζης επηρεάζεται, από τη συγκέντρωση της αγαρόζης στη γέλη, την στερεοδιαμόρφωση του DNA και την εφαρμοζόμενη τάση. Αναφορικά με τη διαφορά τάσης του ηλεκτρικού πεδίου, το εύρος διαχωρισμού στο πήκτωμα αγαρόζης μειώνεται όσο αυξάνεται η εφαρμοζόμενη διαφορά δυναμικού.

Το ρυθμιστικό διάλυμα βοηθά στην διατήρηση της σταθερότητας του pH και παρέχει τα απαραίτητα ιόντα για την αύξηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας. Απουσία ιόντων η ηλεκτρική αγωγιμότητα είναι ελάχιστη και το DNA μετακινείται ελάχιστα ή καθόλου.

Προκειμένου οι ζώνες του DNA να γίνουν ορατές, στο πήκτωμα προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο (ethidium bromide). Το βρωμιούχο αιθίδιο λόγω της επίπεδης διαμόρφωσής του, έχει την ικανότητα να παρεμβάλεται μεταξύ διαδοχικών ζευγών βάσεων και να δεσμεύεται κατά αυτό τον τρόπο με το DNA. Το βρωμιούχο αιθίδιο έχει την ιδιότητα να διεγείρεται με υπεριώδη ακτινοβολία και να φθορίζει στο ορατό φάσμα. Έτσι, οι ζώνες του DNA στο πήκτωμα αγαρόζης οπτικοποιούνται μετά από την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Η παρουσία των προϊόντων της PCR αντίδρασης ανιχνεύθηκε με οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης 2,5% σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X TBE (0.089M Tris base, 0.089M Boric acid, 0.002M EDTA pH=8). Κατά την παρασκευή της αγαρόζης προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο σε αναλογία 5μl/100ml πηκτώματος. Το διάλυμα αγαρόζης μεταφέρεται σε εκμαγείο στο οποίο έχουν τοποθετηθεί οι ειδικές κτένες, για το

σχηματισμό πηγαδιών στη γέλη και στη συνέχεια εμβαπτίζεται σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει 1X TBE.

Η πορεία της ηλεκτροφόρησης για την ανίχνευση των προϊόντων της PCR είναι η ακόλουθη:

1. Προσθήκη στα 25μl του δείγματος (προϊόντος της PCR), 2 μl μπλέ χρωστικής βρωμοφαινόλης (loading buffer), ανάδευση και έγχυση 12μl του δείγματος DNA στις ειδικές θέσεις υποδοχής του πηκτώματος.
2. Ταυτόχρονα με τα PCR προϊόντα ηλεκτροφορείται ο μάρτυρας μοριακών βαρών (100bp DNA ladder της Invitrogen), που συμβάλει στην εκτίμηση των αποτελεσμάτων, γιατί το μήκος του προϊόντος συγκρίνεται με το γνωστό μήκος του μάρτυρα. Τα αναμενόμενα προϊόντα έχουν συγκεκριμένα μοριακά βάρη, τα οποία είναι γνωστά με βάση τους εκκινητές που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση PCR.
3. Παράλληλα με τα μελετούμενα δείγματα, ηλεκτροφορούνται ο θετικός μάρτυρας και το τυφλό δείγμα.
4. Η ηλεκτροφόρηση διαρκεί περίπου 20 λεπτά και σταματά όταν η χρωστική διανύσει περίπου τα 4/5 του μήκους του πηκτώματος.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης Fisherbrand, με τροφοδοτικό Fisher Scientific Power 3000, Electroforesis Power Supply. Μετά την ηλεκτροφόρηση η πηκτή μεταφέρεται σε τράπεζα υπεριώδους φωτός για την παρατήρηση και φωτογράφιση των αποτελεσμάτων. Το DNA γίνεται ορατό με έντονο πορτοκαλί χρώμα φθορισμού, που απελευθερώνει το βρωμιούχο αιθίδιο.

4.9 Ανοσοϊστοχημεία

4.9.1 Γενικά

Ανοσοϊστοχημεία ονομάζουμε την εργαστηριακή τεχνική, που συνδυάζει την ιστοπαθολογία με την ανοσολογία και τη χημεία. Ένα αντίσωμα κατευθύνεται προς ένα ειδικό αντιγόνο-στόχο και μια χημική αντίδραση λαμβάνει χώρα για να καταστήσει ορατό το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος, εφόσον είναι παρόν²⁶².

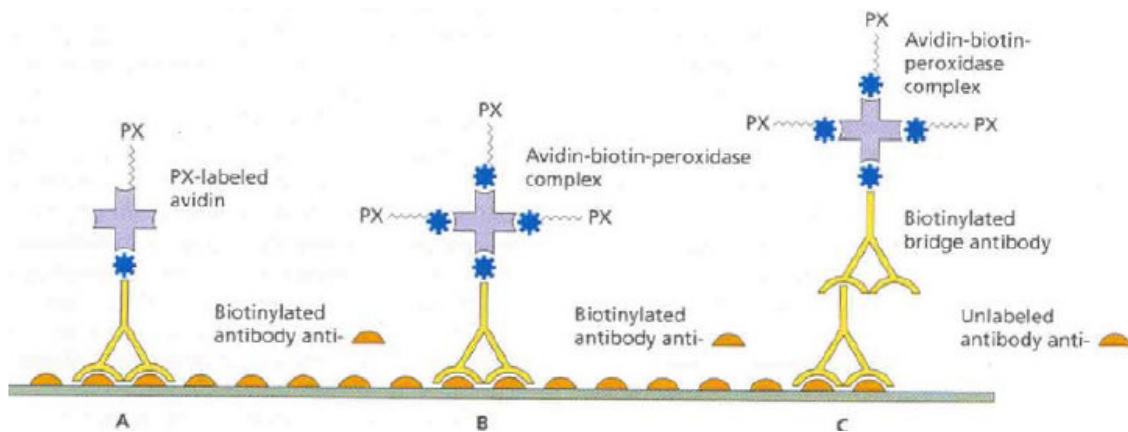
Επομένως, ο όρος ανοσοϊστοχημεία περιλαμβάνει ομάδα ανοσοοσημασμένων τεχνικών, που επιτυγχάνουν να καταστήσουν ορατά διάφορα αντιγόνα σε ιστούς και κύτταρα. Οι τεχνικές αυτές βασίζονται στην ικανότητα των ειδικών αντισωμάτων να εντοπίζουν και να συνδέονται με το αντίστοιχο αντιγόνο. Η σήμανση του αντισώματος με την κατάλληλη ουσία-ετικέτα καθιστά το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος ορατό. Ανάλογα με τη φύση της ανοσοϊστοχημικής τεχνικής και το είδος του ιχνηθέτη που χρησιμοποιούμε, η αντίδραση ελέγχεται με κοινό, φθορίζον ή ηλεκτρονικό μικροσκόπιο²⁶³.

Η εισαγωγή των μονοκλωνικών αντισωμάτων έφερε επαναστατικές αλλαγές στη μέθοδο και πρόσφερε μια ανεξάντλητη πηγή ειδικών αντιδραστηρίων μεγάλης εξειδίκευσης για την ανίχνευση διαφόρων αντιγόνων σε ιστούς και κύτταρα.

Η ανοσοϊστοχημεία διαθέτει ικανοποιητική ευαισθησία, επαναληψιμότητα, δυνατότητα εφαρμογής σε αρχειακό υλικό και συσχέτισης με τις μορφολογικές παραμέτρους²⁶⁴.

Οι πλέον χρησιμοποιούμενες τεχνικές για την ανοσοϊστοχημική ανίχνευση αντιγόνων είναι η τεχνική ανοσοσυμπλέγματος υπεροξειδάσης- αντιυπεροξειδάσης και της ανοσοενζυμικής τεχνικής βιοτίνης-αβιδίνης.

Στη μέθοδο βιοτίνης-αβιδίνης εκμεταλλευόμαστε τον υψηλό βαθμό συγγένειας μεταξύ βιοτίνης και αβιδίνης. Με χημική διαδικασία συνδέεται η βιοτίνη με το πρωτοταγές αντίσωμα σχηματίζοντας σύμπλοκη ένωση. Με την τοποθέτηση της ένωσης αυτής στον ιστό, γίνεται σύνδεσή της με το προς εξέταση αντιγόνο, όπου αυτό εδράζεται. Κατόπιν, προστίθεται η αβιδίνη η οποία έχει σημανθεί με υπεροξειδάση. Η αβιδίνη εντοπίζει το σύμπλοκο βιοτίνης-αντισώματος με το οποίο ενώνεται σταθερά, μεταφέροντας την υπεροξειδάση στη θέση όπου βρίσκεται το αντιγόνο²⁶⁵ (εικόνα 18).



Εικόνα 18. Ανοσοενζυμικές τεχνικές βιοτίνης-αβιδίνης. Χρωματιστό ημικύκλιο:αντιγόνο, PX:υπεροξειδάση, * :βιοτίνη, σταυρός:αβιδίνη. A:μέθοδος πρωτοταγούς αντισώματος συνδεδεμένου με βιοτίνη. B:μέθοδος υπεροξειδάσης συνδεδεμένης με βιοτίνη. C:μέθοδος συμπλόκου βιοτίνης-αβιδίνης-υπεροξειδάσης.

Μειονέκτημα της μεθόδου, αποτελεί το γεγονός ότι μερικοί ιστοί διαθέτουν σημαντικές ποσότητες ενδογενούς βιοτίνης, με αποτέλεσμα να συνδέουν άμεσα το σύμπλοκο αβιδίνης- υπεροξειδάσης, δίνοντας ψευδώς θετικό αποτέλεσμα.

Το πρόβλημα αυτό επιλύεται με τη χρήση στρεπταβιδίνης αντί αβιδίνης. Η στρεπταβιδίνη είναι τετραμερές ανάλογο της αβιδίνης που απομονώθηκε από το βακτήριο *streptomyces avidinii* και έχει την ιδιότητα να συνδέεται με τη βιοτίνη με πολύ υψηλή συγγένεια. Η συγγένεια της βιοτίνης με τη στρεπταβιδίνη, παρέχει ανίχνευση της σύνδεσης αντιγόνου-αντισώματος με αυξημένη ειδικότητα. Το μόριο στρεπταβιδίνης δεν περιέχει υδατάνθρακες, γεγονός που εμποδίζει την μη ειδική σύνδεση με μόρια ανάλογα των λεκτινών που βρίσκονται σε αρκετούς ιστούς (π.χ νεφρός, ήπαρ, εγκέφαλος, σιτευτικά κύτταρα)²⁶⁵.

Σημαντική εξέλιξη στην ανοσοϊστοχημεία ήταν η επινόηση τεχνικών που ενισχύουν την ευαισθησία της. Ο στόχος των τεχνικών αυτών είναι να αποκαλύψουν επιτόπους (αντιγονικές θέσεις) που κανονικά είναι καλυμμένοι, γι'αυτό και ονομάστηκαν μέθοδοι αποκάλυψης ή επανάκτησης αντιγόνου. Η πέψη του ιστού με πρωτεολυτικά ένζυμα, η επεξεργασία του με μικροκύματα και η έκθεση του ιστού σε υψηλή θερμοκρασία και υψηλή πίεση συγχρόνως²⁶⁶. Στην προσπάθεια να αυξηθεί η

ευαισθησία της ανοσοϊστοχημείας, έχουν επινοηθεί διάφοροι συνδυασμοί των παραπάνω μεθόδων και κυκλοφορούν στο εμπόριο συσκευασίες που αυξάνουν τη σταθερότητα των αποτελεσμάτων, αφού μειώνουν σημαντικά τις πιθανότητες λάθους στην αραίωση των αντιδραστηρίων ή στη σειρά των σταδίων της τεχνικής. Η παράλληλη ανάπτυξη συσκευών και οργάνων επιτρέπει την αυτοματοποίηση της μεθόδου και την καθιστά οικονομικά συμφέρουσα, λιγότερο χρονοβόρα και περισσότερο αξιόπιστη.

Σήμερα η πλειοψηφία των παραγόμενων αντισωμάτων χρησιμοποιείται στην ανίχνευση αντιγόνων που εκφράζονται στα νεοπλασματικά κύτταρα. Τα αντιγόνα αυτά είναι πρωτεΐνες που εντοπίζονται στον πυρήνα, το κυτταρόπλασμα ή την κυτταρική μεμβράνη. Η ακριβής γνώση της εντόπισης του κάθε αντιγόνου καθώς και η ιδιαίτερη ποιότητα της θετικής έκφρασής του, είναι προαπαιτούμενα για την σωστή εκτίμηση του τελικού αποτελέσματος²⁶⁷.

4.9.2 Ανοσοϊστοχημική χρώση για τη ZAP-70 πρωτεΐνη

Η ιστολογική και ανοσοϊστοχημική μελέτη των οστεομυελικών βιοψιών και των βιοψιών λεμφαδένος, έγινε στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Στην παρούσα εργασία, το μονοκλωνικό αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της κυτταροπλασματικής έκφρασης του ZAP-70 ήταν το 2F3.2 mouse (Cell Marque). Επίσης, ελέγχθηκε η ανοσοϊστοχημική έκφραση των CD3, CD20, CD5 και CD23 στα δείγματα της οστεομυελικής βιοψίας και της βιοψίας λεμφαδένος (όταν ήταν διαθέσιμη) των ασθενών.

Η μονιμοποίηση των δειγμάτων των οστεομυελικών βιοψιών έγινε σε διάλυμα ουδέτερης φορμόλης 10% και κατόπιν με εισαγωγή του υλικού σε κύβους παραφίνης. Από τους κύβους παραφίνης προετοιμάστηκαν τομές πάχους 4μm σε αντικειμενοφόρους πλάκες super frost.

Συνοπτικά η μέθοδος περιλαμβάνει : αποπαραφίνωση, επεξεργασία με μικροκύματα για την αποκάλυψη αντιγονικών θέσεων, εξουδετέρωση της ενδογενούς υπεροξειδάσης, επώαση με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του αντιγόνου- στόχου (ZAP-70, CD3, CD20, CD5, CD23), επώαση με αντι-αντίσωμα συνδεδεμένο με βιοτίνη,

προσθήκη στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης, προσθήκη χρωμογόνου, μονιμοποίηση, κάλυψη με καλυπτρίδα και τέλος εκτίμηση στο οπτικό μικροσκόπιο.

Αναλυτικά :

- Τοποθέτηση των αντικειμενοφόρων πλακών με τις τομές σε κλίβανο στους 37⁰ C για 18 ώρες και κατόπιν στους 56⁰ C για 1 ώρα (ώστε να λιώσει η παραφίνη)
- Εμβάπτιση των τομών σε διάλυμα ξυλόλης 100% για 5 λεπτά σε θερμοκρασία 37⁰C, τρεις φορές διαδοχικά (αποπαραφίνωση)
- Εμβάπτιση των τομών σε διαδοχικά διαλύματα αιθανόλης 100% για 15 λεπτά 3 φορές, αιθανόλης 96% για 5 λεπτά 3 φορές, αιθανόλης 80% για 5 λεπτά και αιθανόλης 70% για 5 λεπτά (ενυδάτωση)
- Εμβάπτιση των τομών σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS για 5 λεπτά (προετοιμασία)
- Τοποθέτηση των τομών σε διάλυμα κιτρικών pH 6 και επεξεργασία σε φούρνο μικροκυμάτων 750W για 5 λεπτά 3 φορές, για την αποκάλυψη των αντιγονικών θέσεων
- Έκπλυση με απεσταγμένο H₂O
- Εμβάπτιση σε διάλυμα H₂O₂ 1% σε μεθανόλη υπό ανάδευση για 10 λεπτά, για την εξουδετέρωση της ενδογενούς υπεροξειδάσης
- Έκπλυση με απεσταγμένο H₂O
- Έκπλυση σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS για 5 λεπτά υπό ανάδευση
- Εφαρμογή του μονοκλωνικού αντισώματος ποντικού, IgG_{2a} έναντι της πρωτεΐνης ZAP-70 (κλώνος 2F3.2 του οίκου Cell Marque), διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7.4, που περιέχει πρωτεϊνική βάση.
- Ακολουθεί επώαση για 1 ώρα
- Έκπλυση σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS
- Προσθήκη διαλύματος που περιέχει αντι-αντίσωμα κονίκλου συνδεδεμένου με βιοτίνη
- Προσθήκη διαλύματος στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης
- Έκπλυση σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS

- Προσθήκη χρωμογόνου και επώαση για 1 λεπτό
- Έκπλυση των τομών με απεσταγμένο H₂O
- Εμβάπτιση των τομών σε διάλυμα αιματοξυλίνης 10% για 2 λεπτά
- Έκπλυση με άφθονο νερό βρύσης
- Μονιμοποίηση και κάλυψη με υάλινη καλυπτρίδα με μη υδατοδιαλυτή κόλλα
- Εκτίμηση της χρώσης στο οπτικό μικροσκόπιο

Το αποτέλεσμα της ανοσοϊστοχημείας εκτιμήθηκε ως θετικό για την πρωτεΐνη ZAP-70, όταν κυτταροπλασματική χρώση εμφάνιζε ποσοστό λεμφοκυττάρων μεγαλύτερο ή ίσο του 25%. Η επιλογή του παραπάνω ορίου (25%) έγινε σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα¹²⁴. Η ένταση της χρώσης διαβαθμίστηκε από 0 έως 3 (όπου 0:αρνητικό, 1:ασθενώς θετική, 2:θετική μέτριας έντασης, 3: έντονα θετική). Η έντονη θετική χρώση των T-λεμφοκυττάρων αποτελούσε τον ενδογενή θετικό μάρτυρα με έντονη χρώση. Οι παράμετροι του ποσοστού των θετικών κυττάρων και η ένταση της θετικότητας συνδυάστηκαν σε ημιποσοτικό σύστημα βαθμολόγησης. Το ποσοστό των θετικών κυττάρων σε 50 οπτικά πεδία, σε μεγέθυνση x 40, πολλαπλασιαζόταν με την ένταση της χρώσης και προέκυπτε βαθμολόγηση (Z-score) από 0-300.

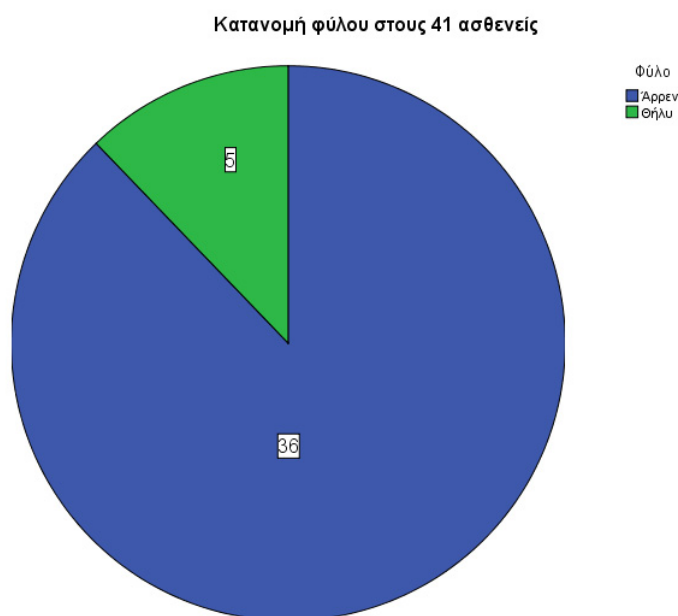
5. ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Μελετήθηκαν ασθενείς με Β-Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία, οι οποίοι διαγιγνώσθηκαν, παρακολουθήθηκαν και έλαβαν θεραπεία στο Αιματολογικό Εξωτερικό Ιατρείο και στην Αιματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Η διάγνωση της νόσου έγινε τη χρονική περίοδο από το 2000-2005 και η παρακολούθηση ολοκληρώθηκε στις 31 Δεκεμβρίου του 2007.

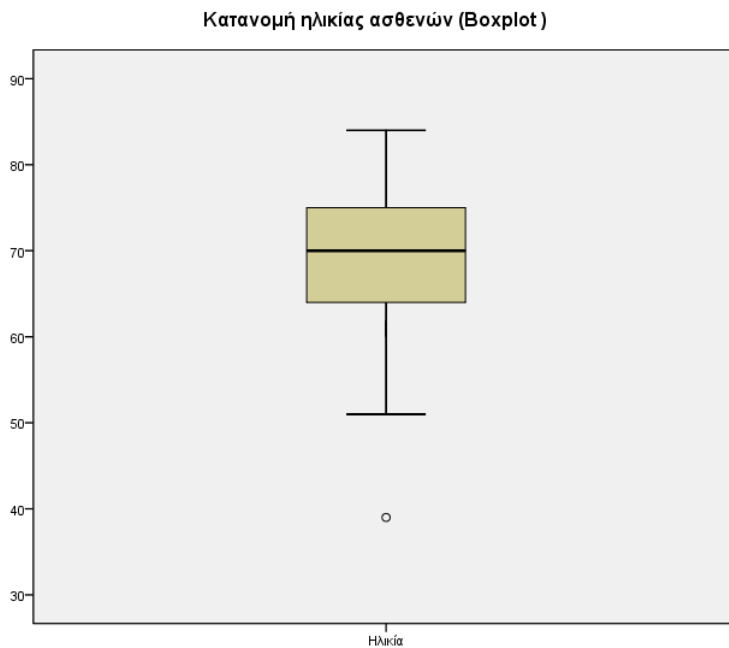
Όλα τα δείγματα των ασθενών που μελετήθηκαν, ορός, οστεομελική βιοψία και βιοψία λεμφαδένος, ελήφθησαν κατά τη διάγνωση της νόσου. Επίσης, οι παρακλινικές παράμετροι που μελετήθηκαν αναφέρονται κατά τη διάγνωση της νόσου.

5.1 Χαρακτηριστικά ασθενών και όγκου

Οι 41 ασθενείς που μελετήθηκαν ήταν ελληνικής καταγωγής. 36 ήταν άνδρες (88%) και 5 γυναίκες (12%) (εικόνα 19). Η ηλικία τους κυμάνθηκε από 39 έως 84 έτη, με διάμεση ηλικία τα 70 έτη (95% CI 65-71) (διάγραμμα 2).



Εικόνα 19. Κατανομή φύλου στους 41 ασθενείς

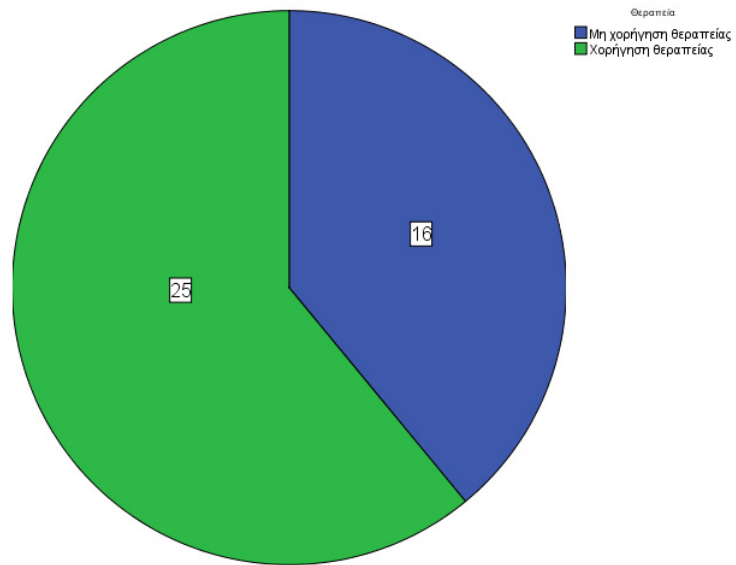


Διάγραμμα 1. Κατανομή ηλικίας των 41 ασθενών.

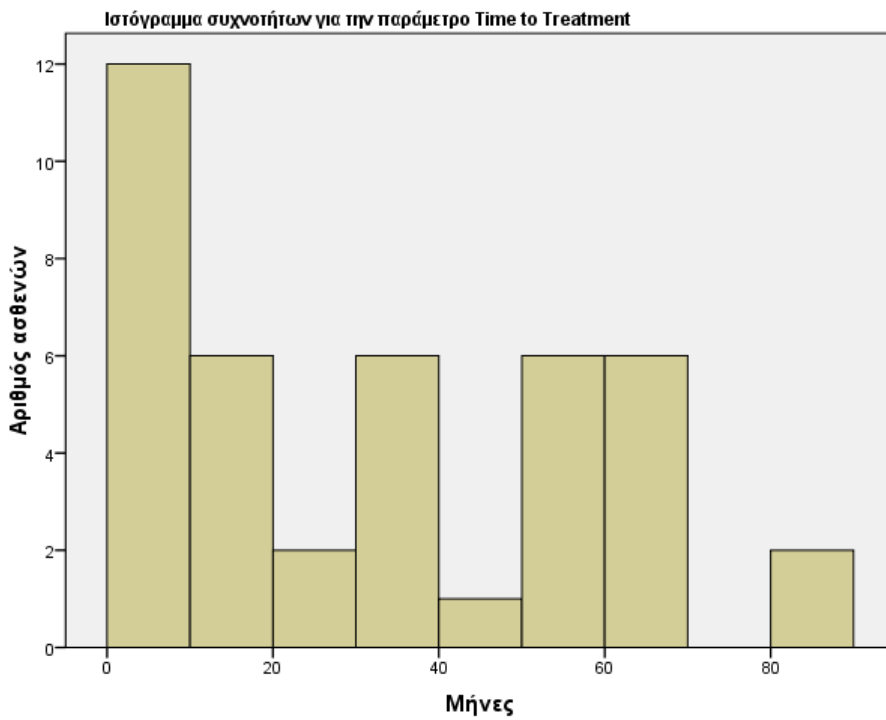
Από τους 41 ασθενείς της μελέτης, 40 δέχθηκαν να υποβληθούν σε οστεομυελική βιοψία. Από τα 40 δείγματα οστεομυελικής βιοψίας τα 3 εξαντλήθηκαν κατά τη διαδικασία της διάγνωσης. Δείγμα ορού ανακτήθηκε από 38 ασθενείς.

Στην πορεία της νόσου έλαβαν θεραπεία 25 ασθενείς (61%), ενώ 16 (39%) ασθενείς δεν έλαβαν θεραπεία μέχρι την ολοκλήρωση της παρακολούθησης (εικόνα 20). Ο διάμεσος χρόνος ως την έναρξη θεραπείας ήταν 33 μήνες, εύρος 1-84 μήνες (95% CI 23-40) (διάγραμμα 2). Από τους 25 ασθενείς που έλαβαν αγωγή ως πρώτη γραμμή θεραπείας πήραν: 6 μονοθεραπεία με φλουνταραμπίνη, 6 μονοθεραπεία με χλωραμβουκίλη, 8 συνδυασμό χλωραμβουκίλης με πρενδιζολόνη και 4 μονοθεραπεία με ριτουξιμάβη.

Χορήγηση ανπιεοπλασματικής θεραπείας στους 41 ασθενείς της μελέτης

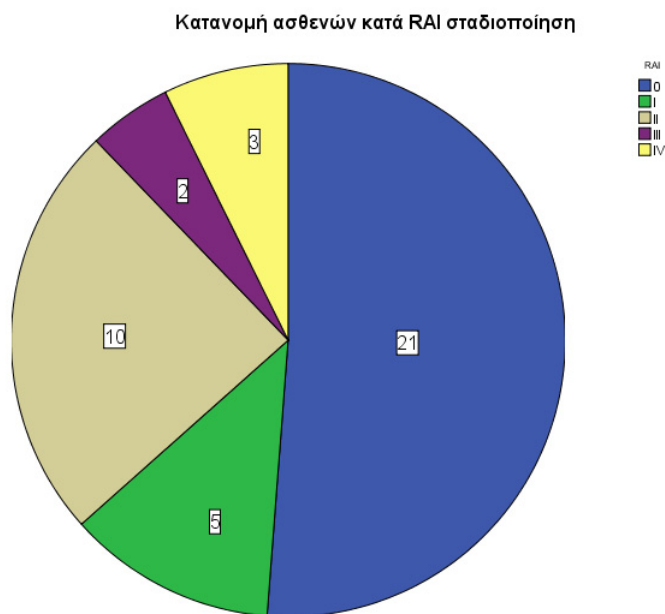


Εικόνα 12. Στο σύνολο των 41 ασθενών έλαβαν θεραπεία 25 ασθενείς.



Διάγραμμα 2. Ο διάμεσος χρόνος για την έναρξη θεραπείας ήταν 33 μήνες.

Σύμφωνα με το σύστημα σταδιοποίησης κατά Rai, 21 ασθενείς ανήκαν στο στάδιο 0, 5 στο στάδιο I, 10 στο στάδιο II, 2 στο στάδιο III και 3 στο στάδιο IV (εικόνα 13).



Εικόνα 13. Κατανομή ασθενών σύμφωνα με το σύστημα Rai.

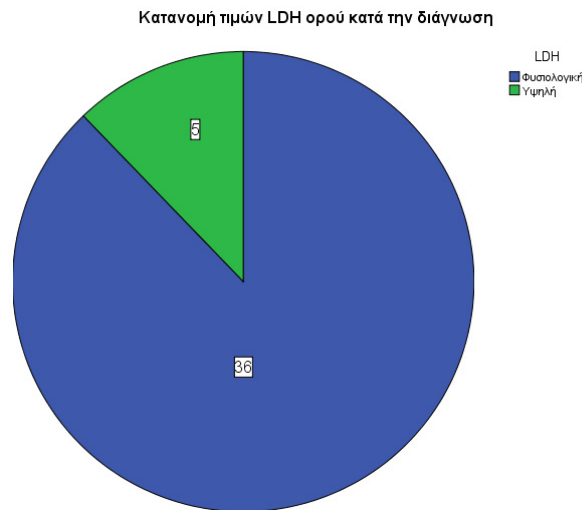
Κατά το τροποποιημένο Rai, 21 (51%) ασθενείς ανήκαν στην κατηγορία χαμηλού κινδύνου, 15 (37%) στην κατηγορία ενδιάμεσου κινδύνου και 5 (12%) στην κατηγορία υψηλού κινδύνου. Σύμφωνα με το σύστημα σταδιοποίησης κατά Binet, 23 ασθενείς (56%) ήταν σε στάδιο A, 13 (32%) σε στάδιο B και 5 (12%) σε στάδιο C. Συνοπτικά η σταδιοποίηση καταγράφεται στον πίνακα 5.

Πίνακας 5. Σταδιοποίηση των 41 ασθενών της μελέτης

Στάδιο Rai	Χαμηλού κινδύνου	Ενδιάμεσου κινδύνου	Υψηλού κινδύνου
Ασθενείς	21 (51%)	15 (37%)	5 (12%)

Στάδιο Binet	Στάδιο A	Στάδιο B	Στάδιο C
Ασθενείς	23 (56%)	13 (32%)	5 (12%)

Τα επίπεδα της LDH (γαλακτική αφυδρογονάση) ορού ήταν εντός φυσιολογικών ορίων σε 36 ασθενείς (88%) και αυξημένα (1,5 έως 3 φορές του ανώτερου φυσιολογικού) σε 5 ασθενείς (12%) (εικόνα 14).



Εικόνα 14. Κατανομή τιμών LDH ορού.

Οι τιμές ορού της β_2 -μικροσφαιρίνης, ήταν εντός των φυσιολογικών ορίων σε 36 ασθενείς (88%) και αυξημένες (1,5 έως 3 φορές του ανώτερου φυσιολογικού) σε 5 ασθενείς (12%) (εικόνα 15).

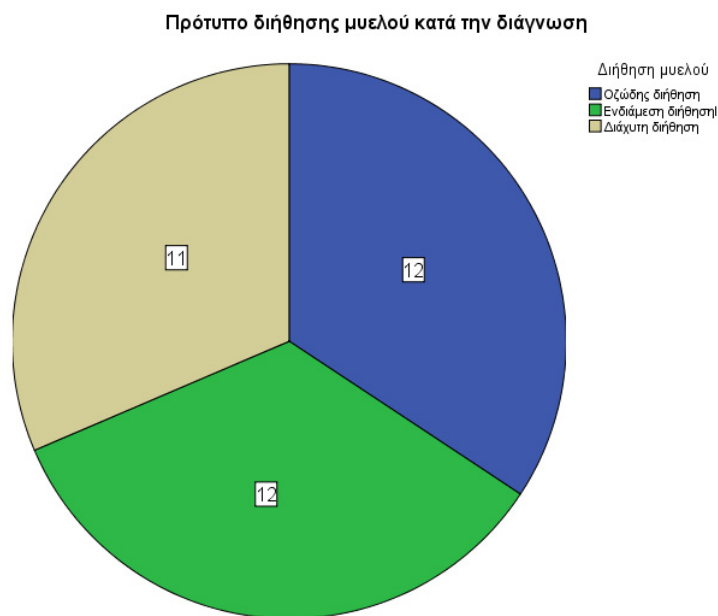


Εικόνα 15. Κατανομή των τιμών ορού της β_2 -μικροσφαιρίνης.

Η παρουσία του επιφανειακού αντιγόνου CD38, δεν ανιχνεύθηκε σε 21 ασθενείς (51%), ενώ 20 ασθενείς (49%) εξέφραζαν το CD38 αντιγόνο επιφάνειας στα νεοπλασματικά λεμφοκύτταρα.

Υπογαμμασφαιριναιμία κατά τη διάγνωση, με επίπεδα IgG και IgM κάτωθεν του κατώτερου φυσιολογικού ορίου, παρατηρήθηκε σε 21 ασθενείς (51%). Φυσιολογικά επίπεδα ανοσοσφαιρινών είχαν 20 ασθενείς (49%).

Το πρότυπο της νεοπλασματικής διήθησης του μυελού στην οστεομυελική βιοψία, ήταν οζώδες σε 12 ασθενείς (34%), διάμεσο σε 12 (34%) και διάχυτο σε 11 ασθενείς (32%) (εικόνα 16).



Εικόνα 16. Κατανομή προτύπου διήθησης μυελού των οστών.

Ένας ασθενής εμφάνισε θετική την αντίδραση της άμεσης Coombs κατά τη διάγνωση της νόσου. Στους υπόλοιπους η αντίδραση της άμεσης Coombs ήταν αρνητική.

Καρυότυπος, από δείγμα μυελού των οστών με κλασική κυτταρογενετική ανάλυση, ήταν διαθέσιμη σε 12 ασθενείς. Η ύπαρξη ξηράς αναρρόφησης οδηγούσε συχνά σε έλλειψη δείγματος μυελού. Έλεγχος της ύπαρξης έλλειψης 17p13 και της

έλλειψης 11q22-q23 με τη μέθοδο του μεσοφασικού F.I.S.H, έγινε σε δείγμα περιφερικού αίματος σε 8 ασθενείς και ήταν αρνητικός. Στα ίδια δείγματα έγινε ανάλυση της κατάστασης μετάλλαξης των IgVH γονιδίων και σε 5 από τα 8 τα γονίδια IgVH ήταν μεταλλαγμένα.

Από τους 41 ασθενείς, 5 νόσησαν από διηθητική μυκητιασική λοίμωξη. Οι 4 εμφάνισαν διηθητική πνευμονική ασπεργίλλωση και μία ασθενής ασπεργίλλωση ιγμορίων. Τρεις εξ'αυτών είχαν πάρει θεραπεία με φλουνταραμπίνη.

3 από τους 41 ασθενείς εμφάνισαν δεύτερη κακοήθεια (2 αδενοκαρκίνωμα παγκρέατος και ένας μεταστατικό αδενοκαρκίνωμα νεφρού).

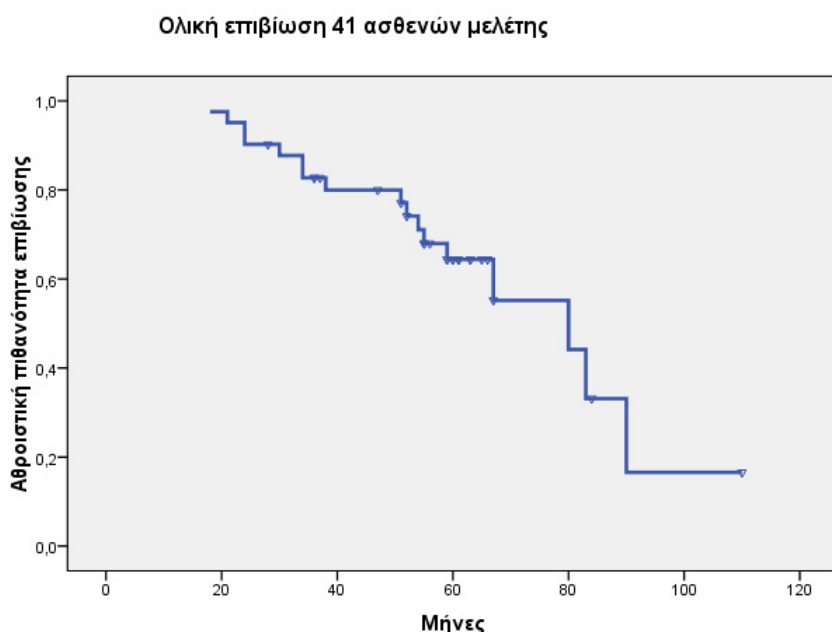
6. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Λόγω του μικρού μεγέθους του μελετώμενου δείγματος (N=41 ασθενείς) και της υπαρκτής πιθανότητας οι μελετώμενες παράμετροι να μην ακολουθούν την κανονική κατανομή, ο έλεγχος για την ύπαρξη συσχετίσεων μεταξύ παραμέτρων έγινε τόσο με τη μέθοδο Pearson όσο και με τη μέθοδο Spearman. Η περιγραφική μελέτη των μεταβολών μιας μελετώμενης παραμέτρου σε συνάρτηση με άλλη παράμετρο έγινε με την κατασκευή πινάκων συνάφειας και με την εφαρμογή του Chi-square test (χ^2). Ο προσδιορισμός της ολικής επιβίωσης έγινε από την ημερομηνία διάγνωσης ως τον θάνατο ή την τελευταία επίσκεψη του ασθενούς με τη μέθοδο Kaplan-Meier. Ο προσδιορισμός του χρόνου μέχρι την έναρξη της θεραπείας (Time to Treatment, TTT) έγινε από την ημερομηνία διάγνωσης ως την ημερομηνία έναρξης αντινεοπλασματικής κυτταροτοξικής θεραπείας ή σε περίπτωση που δεν έλαβαν ακόμα τέτοια θεραπεία, την ημερομηνία της τελευταίας επίσκεψης. Η σύγκριση των καμπυλών επιβίωσης έγινε με τη δοκιμασία Logrank Cox-Mantel. Η στατιστική σημαντικότητα προσδιορίζεται σε όλες τις ανωτέρω δοκιμασίες από αμφίπλευρο $p < 0,05$. Η ανάλυση των μελετώμενων παραμέτρων για προγνωστική ή προβλεπτική σημασία έγινε με την εφαρμογή μονοπαραγοντικής Cox παλινδρόμησης. Ο έλεγχος για την ύπαρξη ανεξάρτητης προγνωστικής ή προβλεπτικής σημασίας έγινε με την εφαρμογή πολυπαραγοντικής Cox παλινδρόμησης και χρησιμοποιώντας τη μέθοδο εισαγωγής μεταβλητών Backward Stepwise (Wald). Για την στατιστική ανάλυση και τα γραφικά χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS16.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

7.1 Συνολική επιβίωση σε σχέση με τα χαρακτηριστικά ασθενών και όγκου

Η διάμεσος επιβίωση των 41 ασθενών που μελετήθηκαν ήταν 70 μήνες (5,8 έτη) (διάγραμμα 3). Με διάμεσο χρόνο παρακολούθησης τους 61 μήνες, στην ομάδα των 41 ασθενών σημειώθηκαν 17 θάνατοι (41,5%), ενώ 24 ήταν ζωντανοί στο τέλος της παρακολούθησης. Η ετήσια, 2ετής, 3ετής και 5ετής επιβίωση ήταν 97%, 90%, 80% και 64% αντίστοιχα.



Διάγραμμα 3. Καμπύλη ολικής επιβίωσης.

Η ηλικία είχε στατιστικά σημαντική επίδραση στην επιβίωση ($p= 0.049$). Ασθενείς με ηλικία άνω των 65 ετών είχαν διάμεση επιβίωση 67 μήνες (95% CI 51-83), ενώ οι ασθενείς με ηλικία μικρότερη των 65 ετών, 90 μήνες (95% CI 39-140) (διάγραμμα 4).

Στους 36 άνδρες καταγράφηκαν 14 θάνατοι (60%), ενώ ανάμεσα στις 5 γυναίκες 3 θάνατοι (60%). Η διάμεση επιβίωση των ανδρών ήταν 80 μήνες (95% CI 61-99) και των γυναικών 34 μήνες (95% CI 25-42). Η διαφορά της επιβίωσης σε σχέση με το φύλο παρουσίαζε τάση για στατιστική σημαντικότητα, ($p= 0.08$), αλλά δεν ήταν στατιστικά

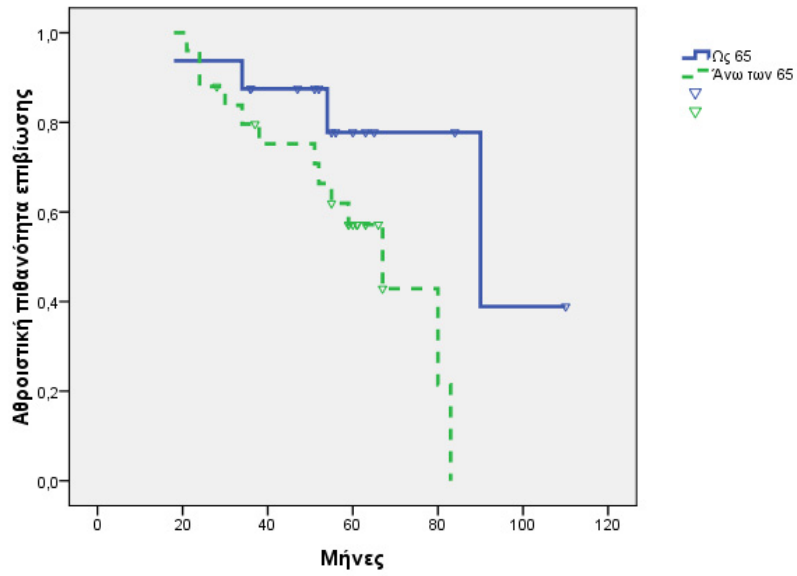
σημαντική, πιθανώς γιατί το δείγμα των ασθενών περιελάμβανε μικρό αριθμό γυναικών (διάγραμμα 5).

Στο υποσύνολο των 25 ασθενών που έλαβαν θεραπεία καταγράφηκαν 14 θάνατοι (56%), ενώ στην ομάδα των 16 ασθενών που δεν έλαβαν θεραπεία σημειώθηκαν 3 θάνατοι (19%). Η διάμεση επιβίωση των ασθενών που έλαβαν θεραπεία ήταν 67 μήνες (95% CI 48-86). Στην ομάδα των ασθενών που δεν έλαβαν θεραπεία η διάμεση επιβίωση δεν έχει επιτευχθεί ακόμα. Η διαφορά δεν παρουσίαζε στατιστική σημαντικότητα ($p= 0.1$).

Ο διαχωρισμός σε πρώιμο στάδιο Rai (0 και I) και σε προχωρημένο (II έως IV) επιδρά στατιστικώς σημαντικά στην επιβίωση. Στο σύνολο των 41 ασθενών, 26 ασθενείς ανήκαν στα αρχικά στάδια και σ'αυτούς παρατηρήθηκαν 8 θάνατοι (31%), ενώ στους 15 ασθενείς των προχωρημένων σταδίων 9 θάνατοι (60%). Η διάμεση επιβίωση των ασθενών στα πρώιμα στάδια ήταν 83 μήνες (95% CI 77-89) και στα προχωρημένα στάδια ήταν 54 μήνες (95% CI 46-62). Το πρώιμο στάδιο Rai είχε στατιστικά σημαντική επίδραση στην επιβίωση ($p= 0.014$) (διάγραμμα 6).

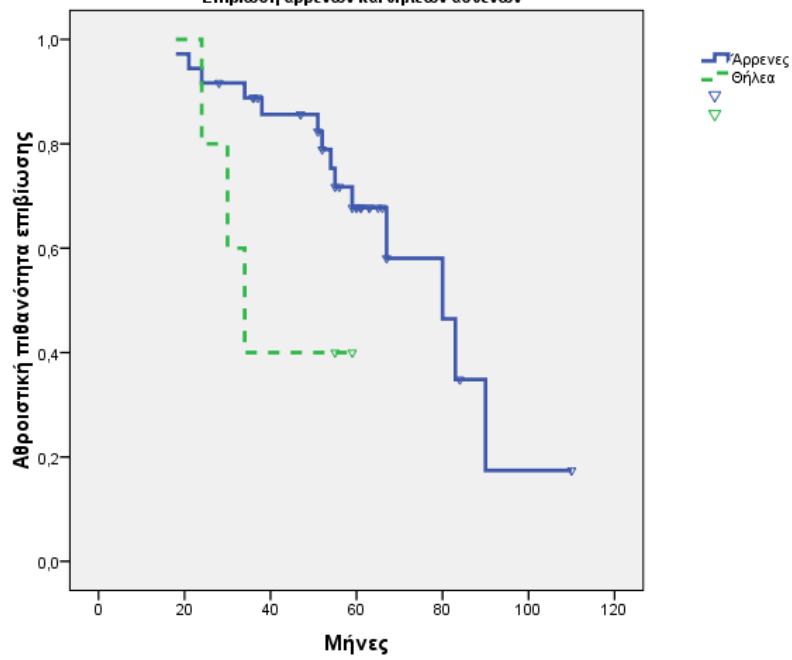
Το στάδιο κατά Binet επιδρά στατιστικώς σημαντικά στην επιβίωση. Στο σύνολο των 41 ασθενών, 23 ασθενείς ανήκαν στο A στάδιο και σ'αυτούς παρατηρήθηκαν 7 θάνατοι (31%), 13 ασθενείς στο B στάδιο και σημειώθηκαν 7 θάνατοι (54%) και από τους 5 ασθενείς που ανήκαν στο στάδιο C απεβίωσαν οι 3 (60%). Η διάμεση επιβίωση των ασθενών στο A στάδιο ήταν 83 μήνες (95% CI 77-89), στο B στάδιο ήταν 67 μήνες (95% CI 50-84) και στο στάδιο C 54 μήνες (95% CI 7-60). Η σταδιοποίηση κατά Binet είχε στατιστικά σημαντική επίδραση στην επιβίωση ($p= 0.046$) (διάγραμμα 7).

Επιβίωση σε ασθενείς άνω και κάτω των 65 ετών

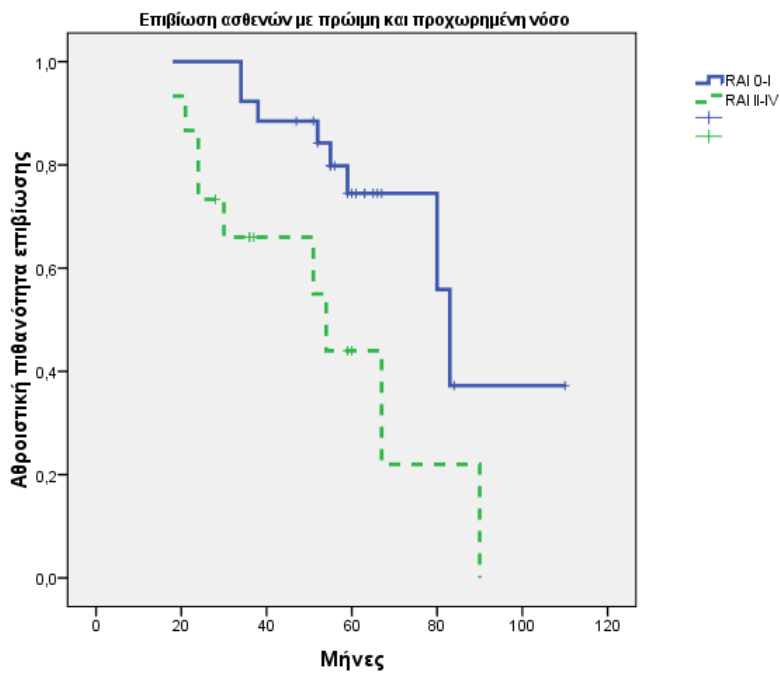


Διάγραμμα 4. Καμπύλη επιβίωσης σε σχέση με την ηλικία.

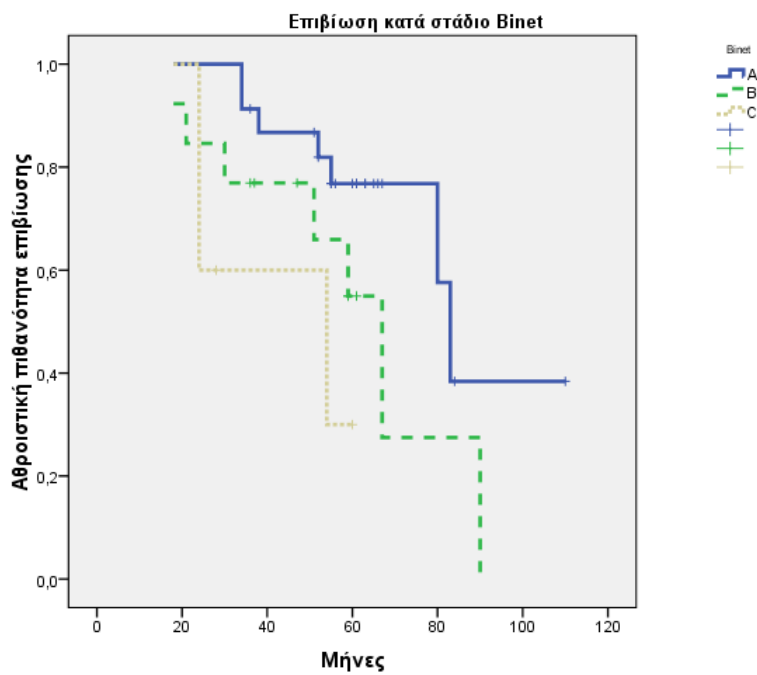
Επιβίωση άρρενων και θήλεων ασθενών



Διάγραμμα 5. Καμπύλη επιβίωσης σε σχέση με το φύλο.



Διάγραμμα 6. Καμπύλη επιβίωσης σε σχέση με πρώιμο και προχωρημένο Rai

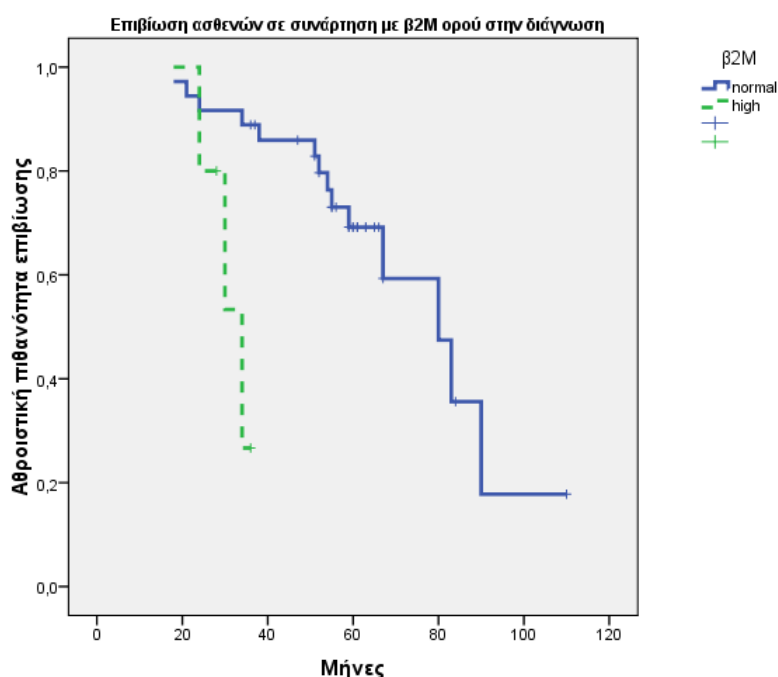


Διάγραμμα 7. Επιβίωση σε σχέση με το στάδιο Binet.

Η ύπαρξη υπογαμμασφαιριναιμίας δεν επιδρά στατιστικώς σημαντικά στην επιβίωση ($p= 0.43$). Στους 20 ασθενείς που δεν είχαν υπογαμμασφαιριναιμία παρατηρήθηκαν 7 θάνατοι (35%), ενώ στους 21 ασθενείς με υπογαμμασφαιριναιμία 10 θάνατοι (48%). Η διάμεση επιβίωση των ασθενών χωρίς υπογαμμασφαιριναιμία ήταν 80 μήνες (95% CI 60-99) και των ασθενών με υπογαμμασφαιριναιμία μήνες 83 (95% CI 45-120).

Οι τιμές της γαλακτικής αφυδρογονάσης LDH (εντός ορίων ή αυξημένες) δεν επιδρούν στατιστικώς σημαντικά στην επιβίωση ($p= 0.24$). Στους 36 ασθενείς που είχαν κατά τη διάγνωση φυσιολογικά επίπεδα LDH παρατηρήθηκαν 15 θάνατοι (42%), ενώ στους 5 ασθενείς με αυξημένα επίπεδα 2 θάνατοι (40%). Η διάμεση επιβίωση των ασθενών φυσιολογικά επίπεδα LDH ήταν 80 μήνες (95% CI 61-99) και των ασθενών με αυξημένα 82 μήνες (95% CI 60-100).

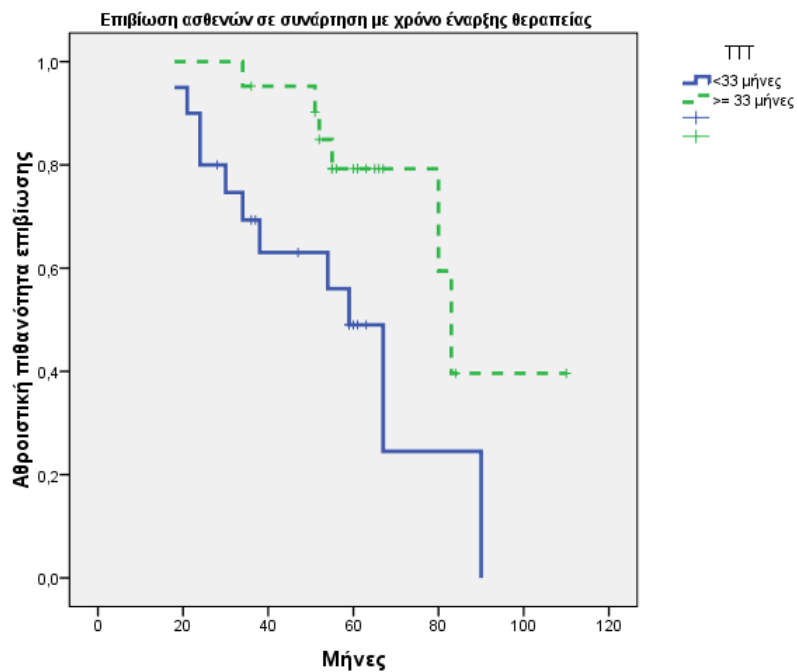
Οι τιμές ορού της β_2 -μικροσφαιρίνης επιδρούν στατιστικώς σημαντικά στην επιβίωση ($p= 0.003$). Στους 36 ασθενείς που είχαν κατά τη διάγνωση τιμές β_2M εντός των φυσιολογικών ορίων παρατηρήθηκαν 14 θάνατοι (39%), ενώ στους 5 ασθενείς με τιμές άνω του φυσιολογικού ορίου 3 θάνατοι (60%). Η διάμεση επιβίωση των ασθενών με φυσιολογικά επίπεδα β_2M ήταν 80 μήνες (95% CI 61-99) ενώ των ασθενών με αυξημένα 34 μήνες (95% CI 25-42) (διάγραμμα 8).



Διάγραμμα 8. Καμπύλη επιβίωσης σε σχέση με τις τιμές β₂-μικροσφαιρίνης.

Η έκφραση του CD38 δεν επιδρά στατιστικώς σημαντικά στην επιβίωση ($p=0.94$). Στους 21 ασθενείς που δεν εξέφραζαν το CD38 σημειώθηκαν 9 θάνατοι (43%) και στους 20 ασθενείς που είχαν θετική έκφραση του CD38 σημειώθηκαν 8 θάνατοι (40%). Η διάμεση επιβίωση των ασθενών με αρνητικό το CD38 ήταν 83 μήνες (95% CI 41-125) και των ασθενών με θετική έκφραση 67 μήνες (95% CI 47-87).

Το χρονικό διάστημα από τη διάγνωση έως την έναρξη θεραπείας επιδρά στατιστικώς σημαντικά στην επιβίωση ($p=0.023$). Στην ομάδα των 20 ασθενών που η πρώτη θεραπευτική αγωγή χορηγήθηκε νωρίτερα από τους 33 μήνες (33 μήνες ήταν η διάμεση τιμή της παραμέτρου Time to Treatment) σημειώθηκαν 11 θάνατοι (55%), ενώ στους 21 ασθενείς όπου η θεραπευτική αγωγή χορηγήθηκε αργότερα από 33 μήνες, σημειώθηκαν 6 θάνατοι (29%). Η διάμεση επιβίωση της ομάδας με πρώιμη έναρξη θεραπείας ήταν 59 μήνες (95% CI 49-68) και των ασθενών με απώτερη έναρξη ήταν 83 μήνες (95% CI 77-89) (διάγραμμα 9).

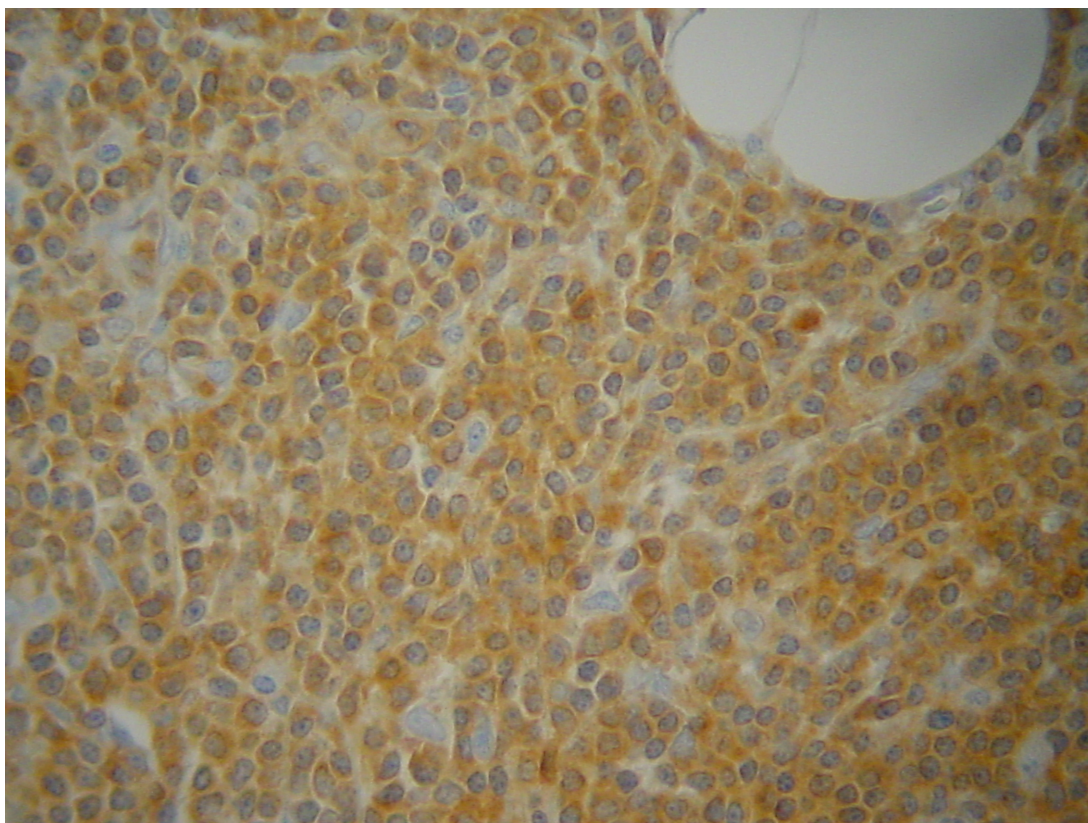


Διάγραμμα 9. Καμπύλη επιβίωσης σε σχέση με το χρόνο έναρξης αγωγής.

Το πρότυπο διήθησης του μυελού των οστών δεν επιδρά στατιστικώς σημαντικά στην επιβίωση ($p= 0.15$). Στην ομάδα των 24 ασθενών με οζώδες ή διάμεσο πρότυπο διήθησης μυελού σημειώθηκαν 9 θάνατοι (38%) και στους 11 ασθενείς με διάχυτο πρότυπο σημειώθηκαν 6 θάνατοι (55%). Η διάμεση επιβίωση των ασθενών με οζώδες ή διάμεσο πρότυπο ήταν 83 μήνες (95% CI 55-111) και των ασθενών με διάχυτο πρότυπο 67 μήνες (95% CI 21-113).

7.2 Αποτελέσματα της μελέτης της έκφρασης της ZAP-70 και συσχετίσεις αυτής.

Η ανοσοϊστοχημική μελέτη για την έκφραση του ZAP-70 έγινε σε 37 δείγματα οστεομυελικών βιοψιών. Θετική έκφραση είχαν 21 ασθενείς (57%) (εικόνα 17) και αρνητική 16 (43%).



Εικόνα 17. Ισχυρά θετική ανοσοϊστοχημική έκφραση ZAP-70.

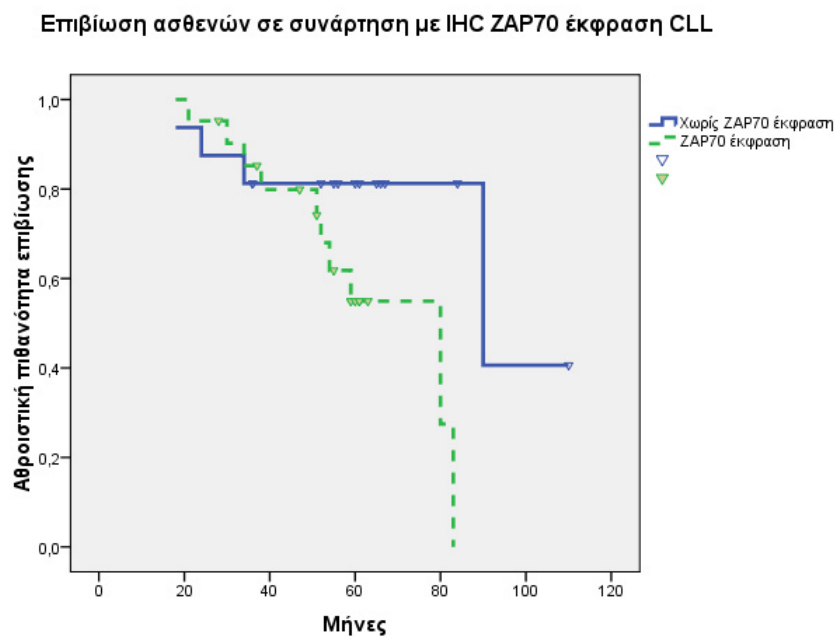
Στην ομάδα των ασθενών με θετική έκφραση σημειώθηκαν 10 θάνατοι (48%) και στους 16 ασθενείς με αρνητική έκφραση 4 θάνατοι (25%). Η διάμεση επιβίωση των ασθενών με θετική έκφραση ZAP-70 ήταν 80 μήνες (95% CI 50-110) και των ασθενών με αρνητική 90 μήνες (95% CI 11-168), με $p=0.07$ αναδεικνύεται τάση για στατιστική σημαντικότητα (διάγραμμα 10).

Μελετώντας την έκφραση της ZAP-70 πρωτεΐνης με το ημιποσοτικό σύστημα βαθμολόγησης, Z-score, παρατηρήσαμε ότι η διάμεσος τιμή ήταν το 150. Η 25^η εκατοστιαία θέση του Z-score ήταν 7 (δηλαδή 25% των μελετώμενων περιπτώσεων είχαν Z-score ≤ 7). Η 75^η εκατοστιαία θέση του Z-score ήταν 275 (δηλαδή 25% των μελετώμενων περιπτώσεων είχαν Z-score > 275) (διάγραμμα 11).

Όταν διαχωρίσουμε τους ασθενείς με βάση τη διάμεσο τιμή του Z-score, που είναι το 150 (95% CI 90-177), 17 ασθενείς (46%) παρουσιάζουν Z-score >150 και 20

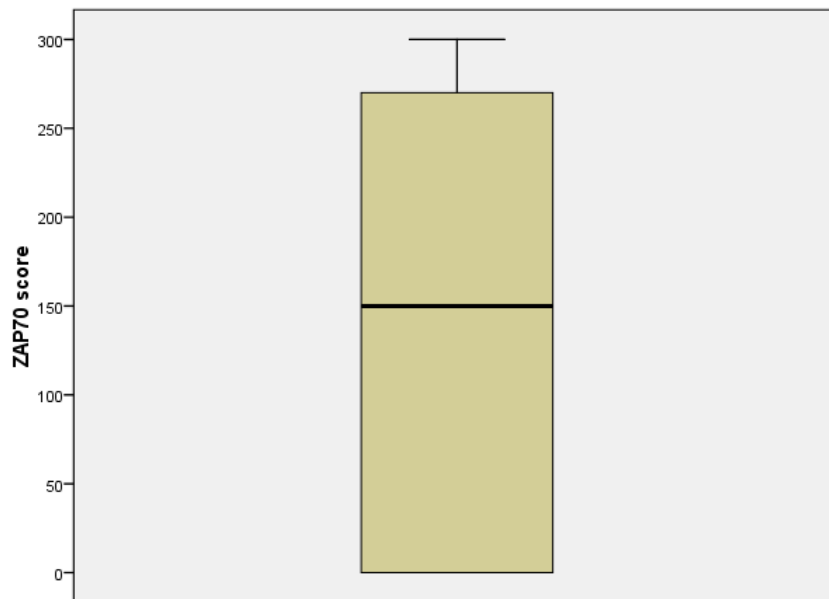
ασθενείς (54%) έχουν Z-score μικρότερο ή ίσο του 150. Στους 17 ασθενείς με Z-score >150 σημειώθηκαν 9 θάνατοι (53%) και στους 20 με Z-score ≤150 παρατηρήθηκαν 5 θάνατοι (25%).

Η διάμεση επιβίωση των ασθενών Z-score >150 ήταν 80 μήνες (95% CI 51-109) και των ασθενών με Z-score ≤150 ήταν 90 μήνες (95% CI 15-163). Η παρουσία Z-score μεγαλύτερου του 150, επιδρά στατιστικώς σημαντικά στην επιβίωση ($p= 0.05$) (διάγραμμα 12).

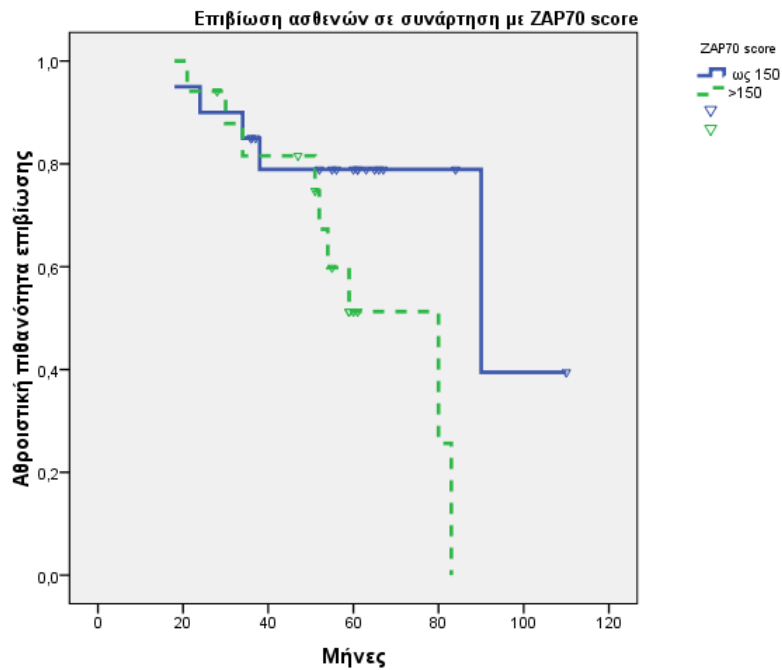


Διάγραμμα 10. Καμπύλη επιβίωσης σε σχέση με την ανοσοϊστοχημική έκφραση ZAP-70.

Κατανομή τιμών ZAP70 score (Boxplot)



Διάγραμμα 11. Κατανομή τιμών ανοσοϊστοχημικού Z-score.

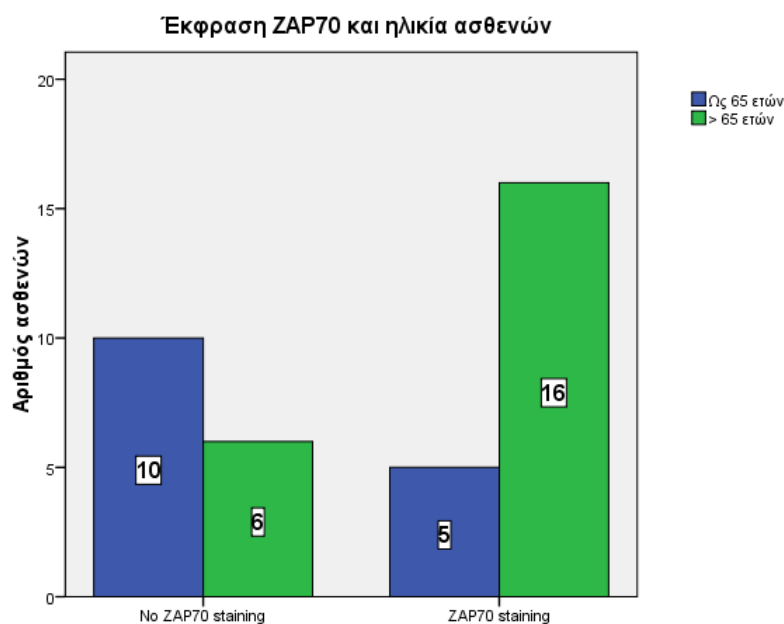


Διάγραμμα 12. Καμπύλη επιβίωσης σε σχέση με το Z-score, το αυξημένο Z-score >150 επιδρά αρνητικά στην επιβίωση.

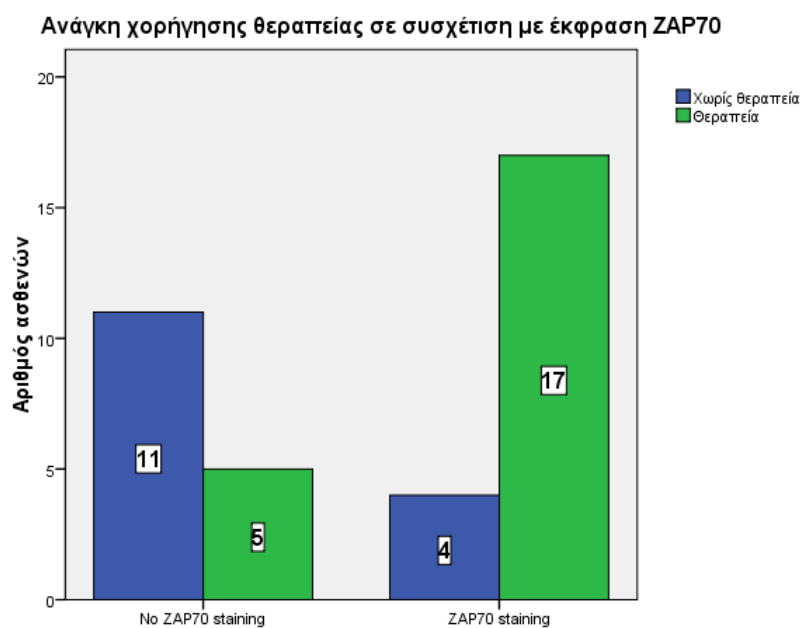
Όταν διαχωρίσουμε τους ασθενείς ανάλογα με την ηλικία τους και με όριο τα 65 έτη, οι ασθενείς άνω των 65 ετών έχουν θετική ανοσοϊστοχημική έκφραση ZAP-70 σε ποσοστό 73% (θετική έκφραση στους 16 από τους 22), ενώ οι ασθενείς κάτω των 65 εκφράζουν τη ZAP-70 πρωτεΐνη σε ποσοστό 33% (θετική έκφραση στους 5 από τους 15). Η προχωρημένη ηλικία συσχετίζεται με την έκφραση ZAP-70 πρωτεΐνης ($p= 0.017$ με Pearson $R:0.39$) (διάγραμμα 13).

Η έκφραση ZAP-70 πρωτεΐνης συσχετίζεται με την ανάγκη χορήγησης θεραπείας ($p= 0.002$ Pearson $R:0.5$). Από τους 21 ασθενείς με θετική έκφραση ZAP-70 πρωτεΐνης 17 (84%) έλαβαν θεραπεία, ενώ από τους 16 ασθενείς με αρνητική έκφραση 5 (31%) πήραν θεραπεία (διάγραμμα 14).

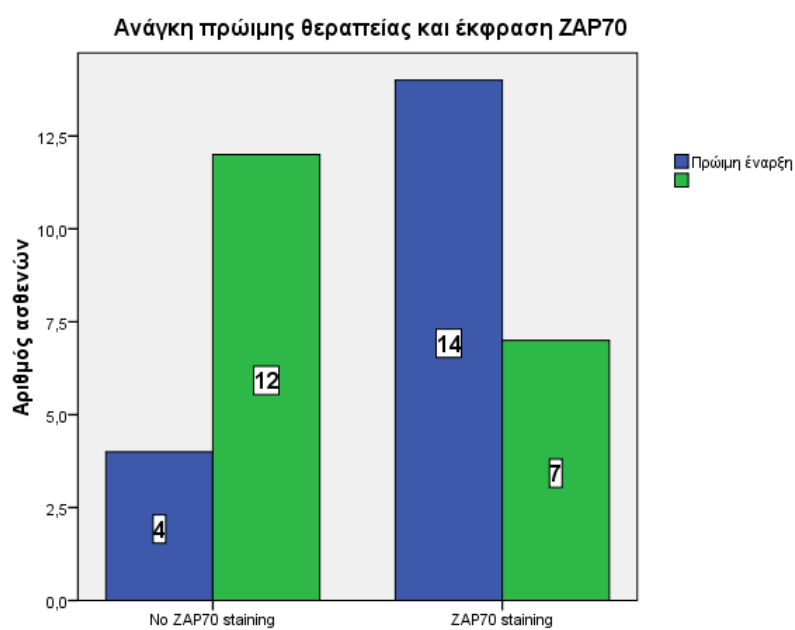
Η έκφραση ZAP-70 πρωτεΐνης συσχετίζεται με την πρώιμη έναρξη θεραπείας ($p= 0.012$ Pearson $R:-0.41$). Από τους 21 ασθενείς με θετική έκφραση στους 14 (67%) η πρώτη θεραπευτική αγωγή χορηγήθηκε νωρίτερα από τους 33 μήνες και από τους 16 ασθενείς με αρνητική μόνο σε 4 (25%) δώθηκε θεραπεία νωρίτερα από τους 33 μήνες (διάγραμμα 15).



Διάγραμμα 13. Η έκφραση ZAP-70 πρωτεΐνης συσχετίζεται με προχωρημένη ηλικία.



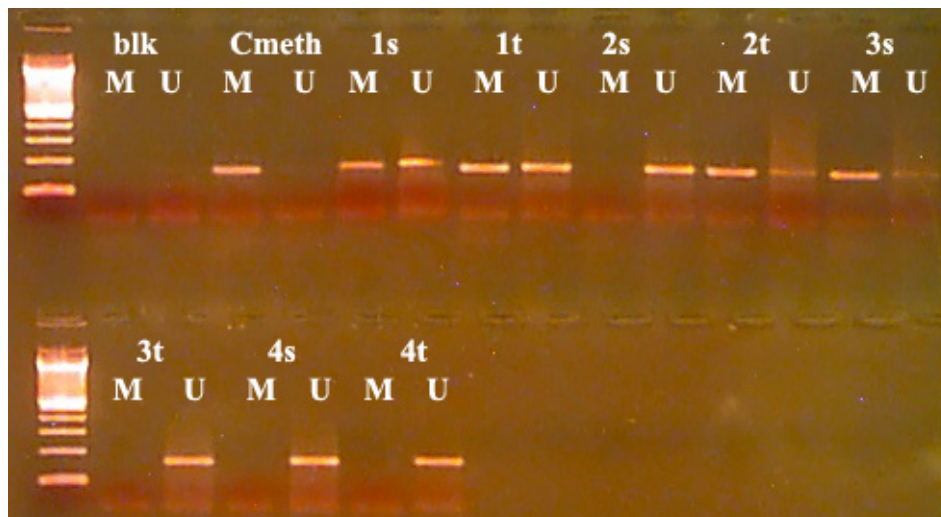
Διάγραμμα 14. Η έκφραση ZAP-70 πρωτεΐνης συσχετίζεται με την ανάγκη χορήγησης θεραπείας.



Διάγραμμα 15. Η έκφραση ZAP-70 πρωτεΐνης συσχετίζεται με την πρώιμη έναρξη θεραπείας.

7.3 Αποτελέσματα της μελέτης της κατάστασης μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου VHL .

Η κατάσταση μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου VHL, μελετήθηκε σε 38 δείγματα ορού ασθενών με ΧΛΛ, 37 δείγματα οστεομυελικής βιοψίας και σε 5 δείγματα βιοψίας λεμφαδένος. Φυσιολογικά ο υποκινητής του γονιδίου VHL είναι αμεθυλίωτος και στη MSP αντίδραση λαμβάνεται προϊόν μεγέθους 165bp. Αντιθέτως στην περίπτωση που ο υποκινητής είναι μεθυλιωμένος θα ανιχνευθεί στη MSP αντίδραση και προϊόν μεγέθους 158bp. Μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου VHL ανιχνεύθηκε σε 7 δείγματα ορού (7 από 38), ποσοστό 18%. Σε 12 από τα 37 δείγματα οστεομυελικής βιοψίας που εξετάσθηκαν παρατηρήθηκε μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου VHL (ποσοστό 32%) (εικόνα 18). Από τα 5 δείγματα βιοψίας λεμφαδένος που εξετάσθηκαν σ'ένα ανιχνεύθηκε μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου VHL (20%). Στα δείγματα των 5 υγιών φυσιολογικών μαρτύρων που χρησιμοποιήθηκαν δεν ανιχνεύθηκε μεθυλίωση του VHL.



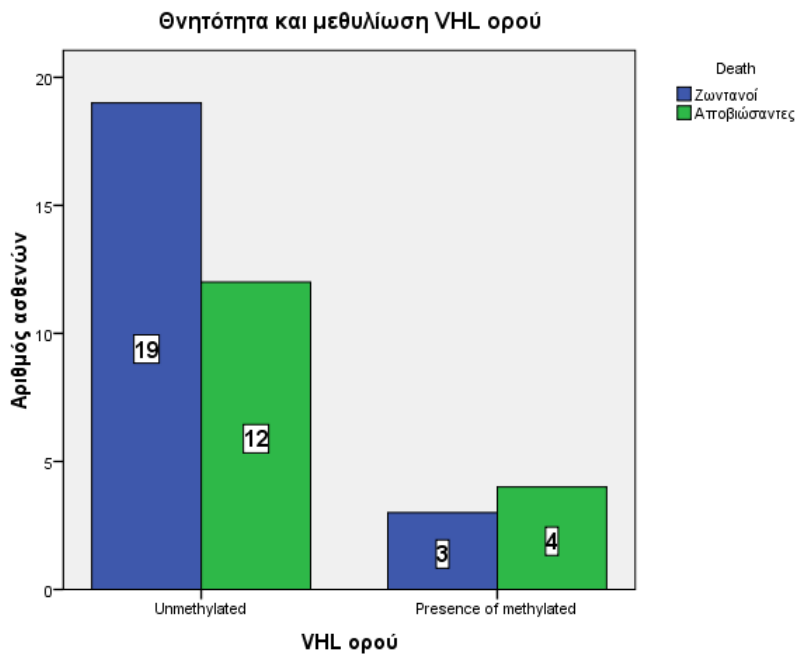
Εικόνα 18. Παρατήρηση των προϊόντων της MSP αντίδρασης. Όπου M: η αντίδραση με τα ειδικά ζεύγη εκκινητών για την περίπτωση που ο υποκινητής του γονιδίου VHL είναι μεθυλιωμένος με προϊόν 158bp, U: η αντίδραση με τα ειδικά ζεύγη εκκινητών για την περίπτωση που ο υποκινητής του γονιδίου VHL δεν είναι μεθυλιωμένος με προϊόν 165bp, blk: τυφλό δείγμα, Cmeth: θετικός μάρτυρας DNA (ολικά μεθυλιωμένο DNA). Όπου 1s, 2s, 3s, και 4s: DNA απομονωθέν από τον ορό τεσσάρων ασθενών, όπου 1t, 2t, 3t, και 4t: DNA απομονωθέν από την οστεομυελική βιοψία των ίδιων ασθενών. Στον ασθενή 1 ανιχνεύθηκε μεθυλίωση στα δείγματα ορού και μυελού. Στον ασθενή 2 μεθυλίωση ανιχνεύθηκε μόνο στο δείγμα μυελού, ενώ στον ασθενή 3 μεθυλίωση ανιχνεύθηκε μόνο στον ορό. Τα δείγματα του ασθενή 4 είναι μη μεθυλιωμένα.

Η μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου VHL σε δείγμα ορού μελετήθηκε σε 38 περιπτώσεις ασθενών. Στην ομάδα των 7 ασθενών που εμφάνισαν μεθυλίωση σημειώθηκαν 4 θάνατοι (58%), ενώ στους 31 ασθενείς με απουσία μεθυλίωσης παρατηρήθηκαν 12 θάνατοι (39%) (διάγραμμα 16). Η διάμεση επιβίωση των ασθενών με μεθυλιωμένο τον υποκινητή του γονιδίου VHL στον ορό ήταν 67 μήνες (95% CI 47-87) και των ασθενών με απουσία μεθυλίωσης 80 μήνες (95% CI 59-103), $p = 0.38$ χωρίς στατιστική σημαντικότητα πιθανά λόγω του μικρού αριθμού ασθενών (διάγραμμα 17).

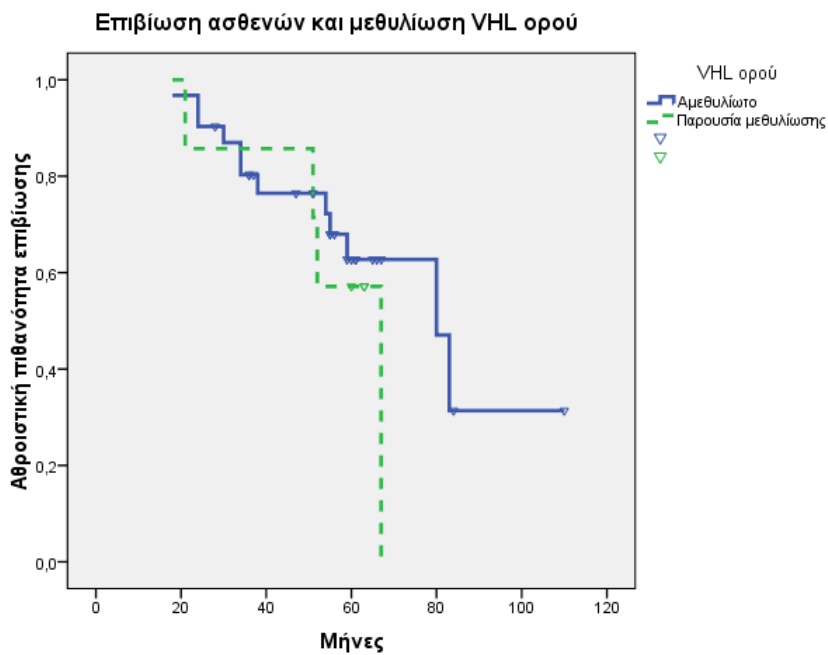
Η μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου VHL σε δείγμα οστού μελετήθηκε σε 37 περιπτώσεις ασθενών. Στους 12 ασθενείς που εμφάνισαν μεθυλίωση σημειώθηκαν 5

θάνατοι (42%), ενώ στους 25 ασθενείς με απουσία μεθυλίωσης παρατηρήθηκαν 10 θάνατοι (40%) (διάγραμμα 18). Η διάμεση επιβίωση των ασθενών με μεθυλιωμένο τον υποκινητή του γονιδίου VHL στο δείγμα οστού ήταν 90 μήνες (95% CI 38-142) και των ασθενών με απουσία μεθυλίωσης 80 μήνες (95% CI 44-116), (διάγραμμα 19).

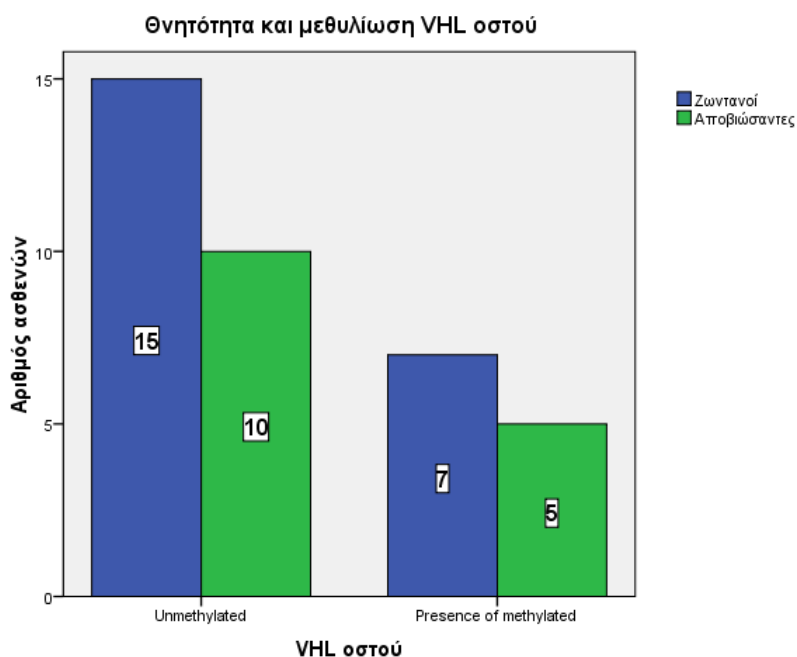
Όταν αναλύθηκαν τα αποτελέσματα για την απουσία μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου VHL σε όλα τα δείγματα, ορού, οστού και λεμφαδένα, καταγράφηκε η ύπαρξη τάσης για ανώτερη επιβίωση στους ασθενείς που είχαν αμεθυλιωτά όλα τα δείγματά τους (ορό, οστό και λεμφαδένα). Η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0.34$) πιθανώς γιατί ο αριθμός των ασθενών ήταν μικρός. Στην ανάλυση αυτή, για την απουσία μεθυλίωσης σε όλα τα είδη των δειγμάτων, μπορούσαν να συμπεριληφθούν 37 περιπτώσεις ασθενών. Σε 20 ασθενείς όπου απουσίαζε μεθυλίωση σημειώθηκαν 7 θάνατοι (35%), ενώ στους 17 ασθενείς με παρουσία μεθυλίωσης παρατηρήθηκαν 9 θάνατοι (53%) (διάγραμμα 20). Η διάμεση επιβίωση των ασθενών με απουσία μεθυλίωσης για τον υποκινητή του γονιδίου VHL ήταν 80 μήνες (95% CI 59-100) και των ασθενών με παρουσία μεθυλίωσης 67 μήνες (95% CI 47-87) (διάγραμμα 21).



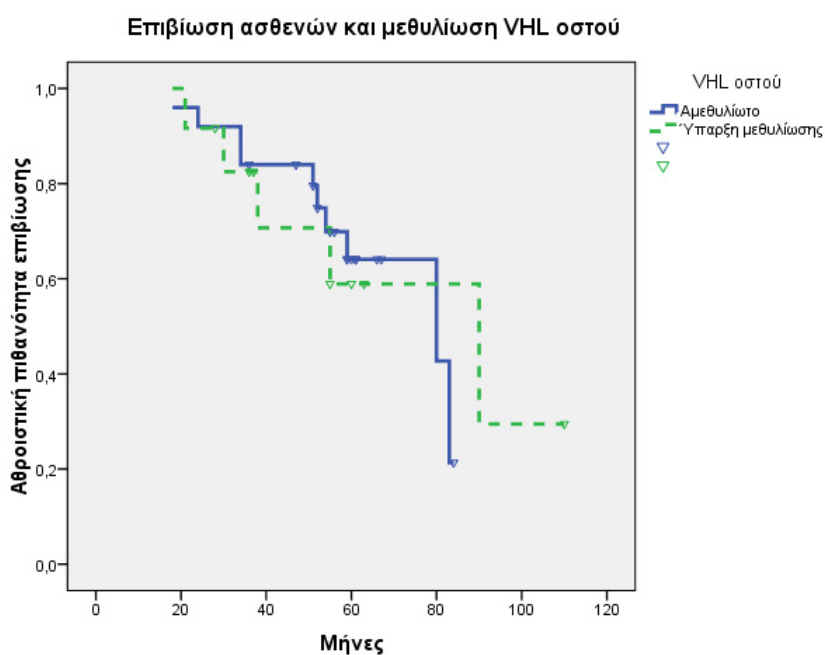
Διάγραμμα 16. Θνητότητα σε σχέση με τη μεθυλίωση του υποκινητή του VHL σε δείγμα ορού.



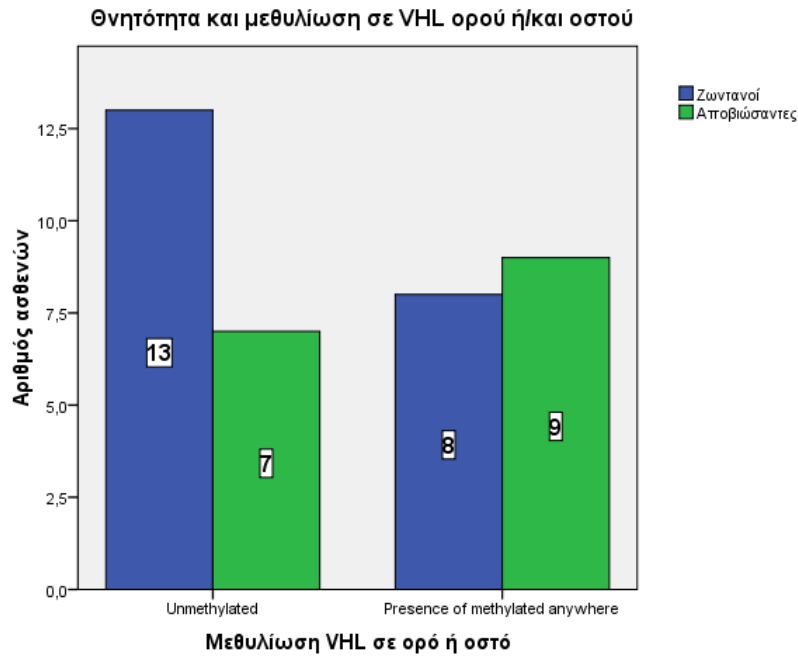
Διάγραμμα 17. Επιβίωση σε σχέση με τη μεθυλίωση του υποκινητή του VHL σε δείγμα ορού.



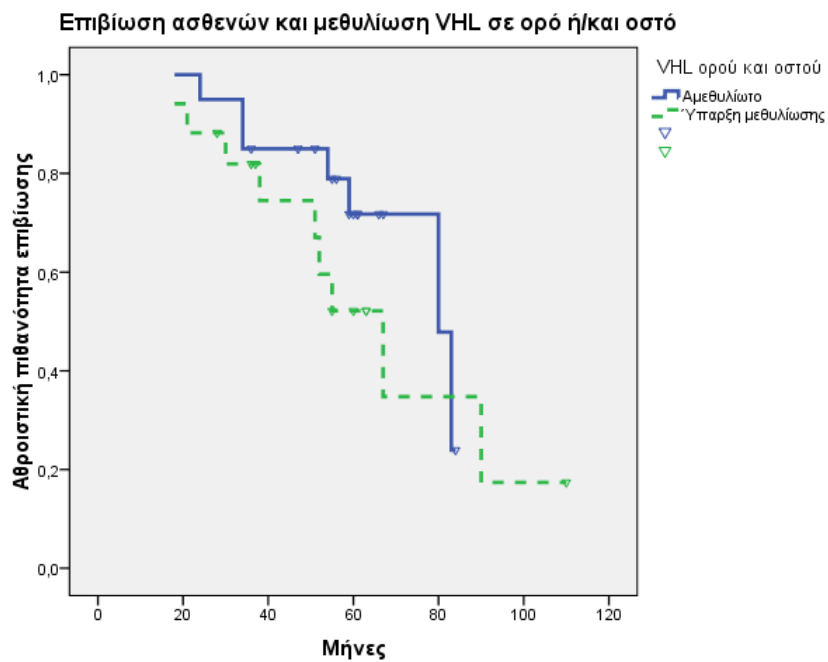
Διάγραμμα 18. Θνητότητα σε σχέση με τη μεθυλίωση του υποκινητή του VHL σε δείγμα οστού.



Διάγραμμα 19. Επιβίωση σε σχέση με τη μεθυλίωση του υποκινητή του VHL σε δείγμα οστού.



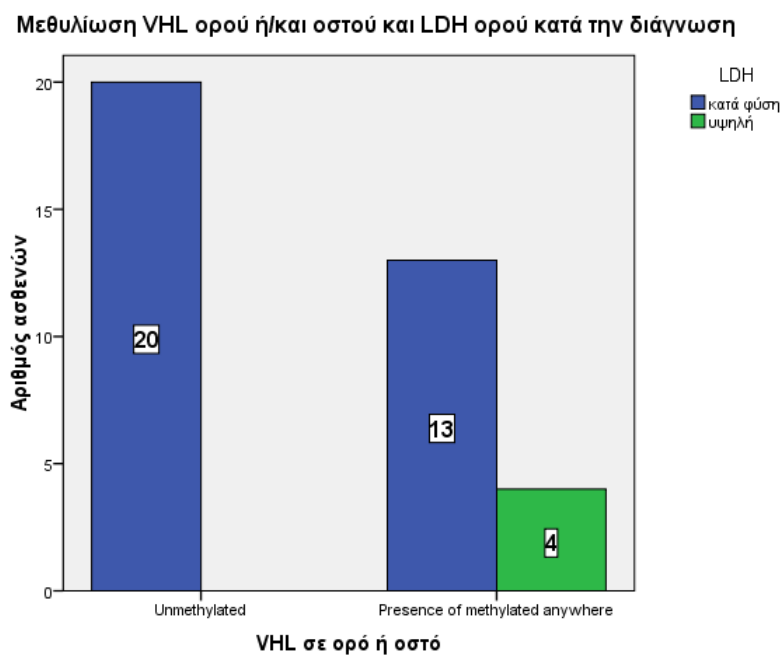
Διάγραμμα 20. Θνητότητα σε σχέση με τη μεθυλίωση του υποκινητή του VHL σε όλα τα είδη των δειγμάτων.



Διάγραμμα 21. Επιβίωση σε σχέση με τη μεθυλίωση του υποκινητή του VHL σε όλα τα είδη των δειγμάτων.

Η παρουσία μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου VHL σε ορό, μυελό και σε οποιοδήποτε από τα αναλυθέντα δείγματα, μελετήθηκε για ύπαρξη στατιστικά σημαντικής συσχέτισης με τις κάτωθι κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους: ηλικία, φύλο, θεραπεία, χρόνος έναρξης θεραπείας, κλινικά στάδια Rai και Binet, υπογαμμασφαιριναιμία, πρότυπο διήθησης μυελού, επίπεδα LDH, επίπεδα β_2 μικροσφαιρίνης, έκφραση CD38 και έκφραση ZAP 70 (πίνακας 6).

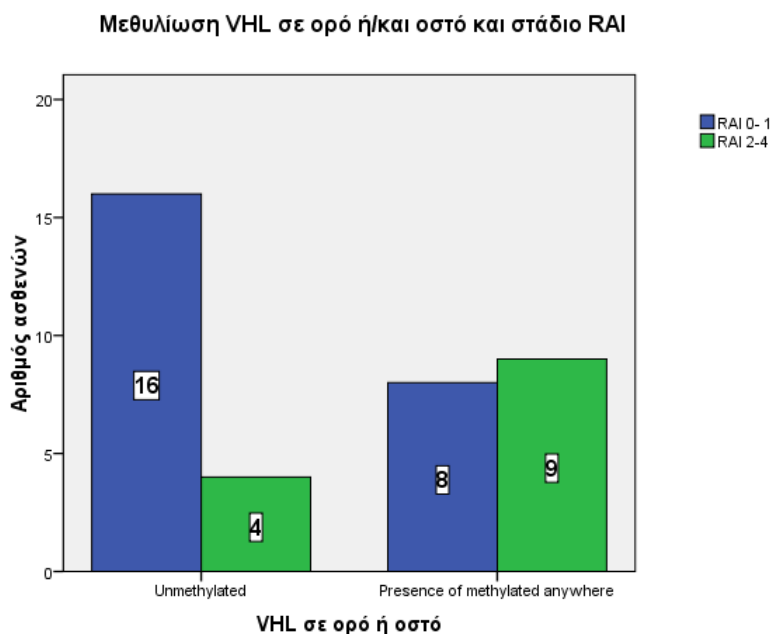
Πρόέκυψε ότι, συσχετίζονται με στατιστική σημαντικότητα η απουσία μεθυλίωσης σε όλα τα δείγματα (ορός, οστό και λεμφαδένας) με τα επίπεδα της LDH ($p= 0.02$ με Pearson $R:0,38$). Από τους 20 ασθενείς με απουσία μεθυλίωσης υποκινητή του γονιδίου VHL κανένας δεν παρουσίαζε αυξημένα επίπεδα LDH ορού, ενώ στους 17 ασθενείς με παρουσία μεθυλίωσης 4 (24%) εμφάνιζαν αύξηση των επιπέδων της LDH (1,5 έως 3 φορές του ανώτερου φυσιολογικού ορίου) και κατ'επέκταση αυξημένο φορτίο νόσου (διάγραμμα 22).



Διάγραμμα 22. Η ύπαρξη μεθυλίωσης συσχετίζεται με αυξημένα επίπεδα LDH.

Επίσης, η στατιστική ανάλυση έδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της απουσίας μεθυλίωσης σε όλα τα δείγματα (ορός, οστό και λεμφαδένας) με την

κατηγοροποίηση των Rai (0/I και II/IV) σταδίων της νόσου ($p=0.036$ με Pearson $R:0,34$). Από τους 20 ασθενείς με απουσία μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου VHL 16 (80%) ανήκαν στα 0 ή I στάδιο Rai και 4 (20%) στα στάδια II έως IV. Αντιθέτως, από τους 17 ασθενείς με παρουσία μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου VHL 8 (47%) ανήκαν στα 0 ή I στάδιο Rai και 9 (53%) στα στάδια II έως IV (διάγραμμα 23). Η παρουσία μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου VHL συσχετίζεται με προχωρημένο στάδιο Rai νόσου.

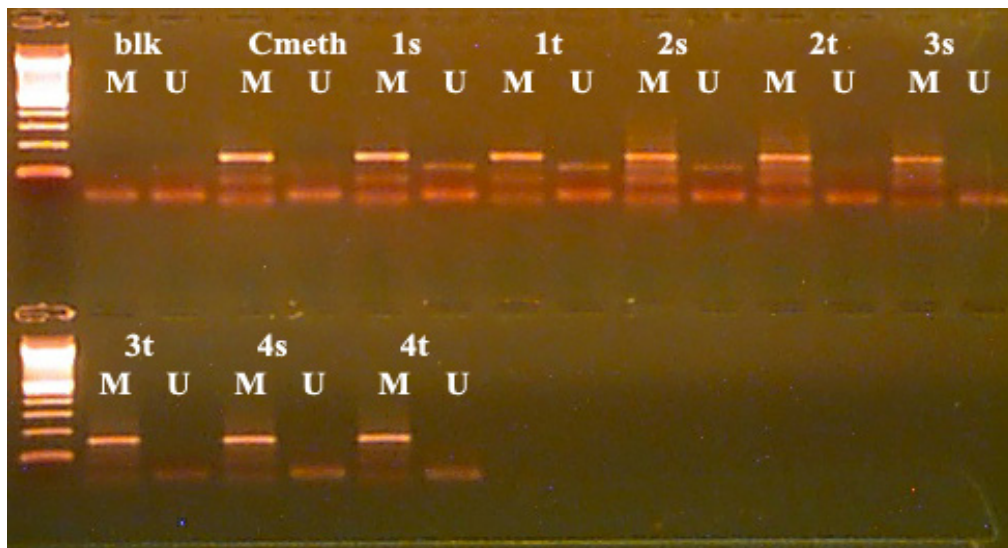


Διάγραμμα 23. Η παρουσία μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου VHL συσχετίζεται με προχωρημένο Rai στάδιο νόσου.

7.4 Αποτελέσματα της μελέτης της κατάστασης μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου MEG3

Όπως αναλύθηκε στο γενικό μέρος, το ογκοκατασταλτικό γονίδιο MEG3, που κωδικοποιεί microRNA υπόκειται σε γονιδιωματική αποτύπωση και εκφράζεται πάντα το μητρικό αλληλίο. Η κατάσταση μεθυλίωσης της DMR ρυθμιστικής περιοχής του γονιδίου MEG3 (που περιλαμβάνει τον υποκινητή του γονιδίου), μελετήθηκε σε 38 δείγματα ορού, 37 δείγματα οστεομυελικής βιοψίας και σε 5 δείγματα βιοψίας λεμφαδένων ασθενών με ΧΛΛ. Το φυσιολογικό πρότυπο μεθυλίωσης της DMR του MEG3 συνίσταται από παρουσία δύο ταινιών (αλληλίων), μία αντιστοιχεί στο μεθυλιωμένο πατρικό αλληλίο (μέγεθος 160bp) και μία αντιστοιχεί στο αμεθυλιωμένο μητρικό αλληλίο (μέγεθος 120bp). Στα παθολογικά μεθυλιωμένα δείγματα ανιχνεύεται μόνο η μεθυλιωμένη DMR του πατρικού (μεθυλιωμένου) αλληλίου (μέγεθος 160bp), ενώ το αμεθυλιωμένο μητρικό αλληλίο δεν ανιχνεύεται διότι έχει παθολογικά μεθυλιωθεί. Παθολογικό πρότυπο μεθυλίωσης της DMR του γονιδίου MEG3 ανιχνεύθηκε σε 8 δείγματα ορού ασθενών (8 από 38), ποσοστό 21%. Σε 13 από τα τα 37 δείγματα οστεομυελικής βιοψίας ασθενών που εξετάστηκαν παρατηρήθηκε παθολογικό πρότυπο μεθυλίωσης της DMR του γονιδίου MEG3, ποσοστό 35% (εικόνα 19). Από τα 5 δείγματα βιοψίας λεμφαδένων που εξετάστηκαν σ'ένα ανιχνεύθηκε παθολογικό πρότυπο μεθυλίωσης της DMR του γονιδίου MEG3 (20%).

Στα δείγματα των 5 υγιών φυσιολογικών μαρτύρων που χρησιμοποιήθηκαν ανιχνεύθηκε το φυσιολογικό πρότυπο μεθυλίωσης της DMR του γονιδίου MEG3.

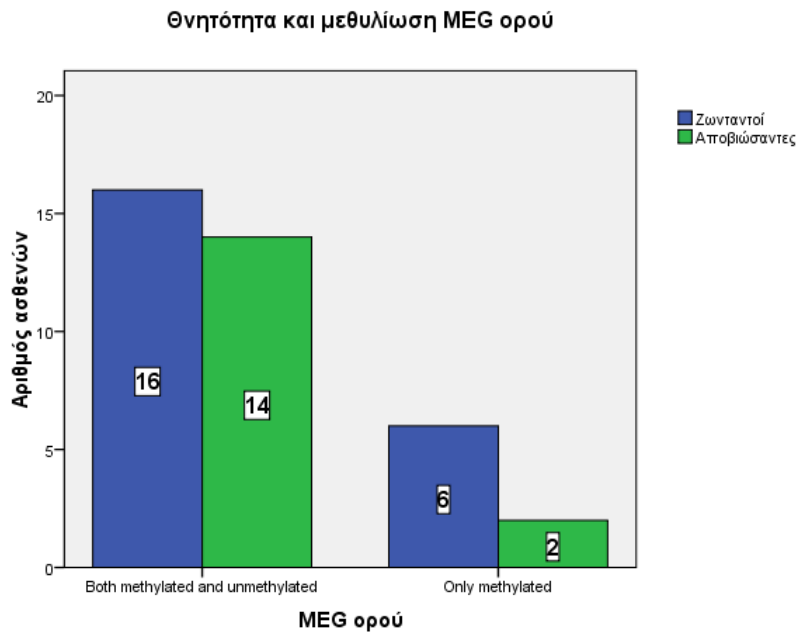


Εικόνα 19. Παρατήρηση των προϊόντων της MSP αντίδρασης. Όπου M: η αντίδραση με το ζεύγος εκκινητών για την ανίχνευση της μεθυλιωμένης DMR του γονιδίου MEG3 με προϊόν 160bp, U: η αντίδραση με το ζεύγος εκκινητών για την ανίχνευση της αμεθυλιωτής κατάστασης της DMR του γονιδίου MEG3 με προϊόν 120bp, blk: τυφλό δείγμα, Cmeth: θετικός μάρτυρας (ολικά μεθυλιωμένο DNA). Όπου 1s, 2s, 3s, και 4s: DNA απομονωθέν από τον ορό τεσσάρων ασθενών, όπου 1t, 2t, 3t, και 4t: DNA απομονωθέν από την οστεομυελική βιοψία των ίδιων ασθενών. Ο ασθενής 1 παρουσιάζει το φυσιολογικό πρότυπο μεθυλίωσης στο δείγμα ορού και στο δείγμα μυελού (M και U). Στον ασθενή 2 ανιχνεύθηκε παθολογικό πρότυπο (M) μόνο στο δείγμα μυελού. Στους ασθενείς 3 και 4 ανιχνεύθηκε παθολογικό πρότυπο (M) στο δείγμα ορού και οστού.

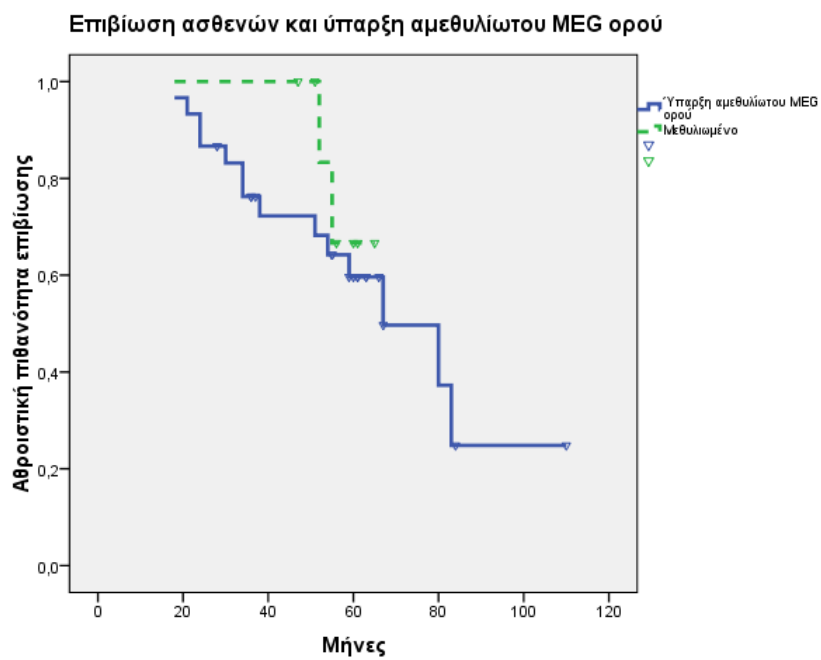
Το πρότυπο μεθυλίωσης της DMR του γονιδίου MEG3 σε δείγμα ορού μελετήθηκε σε 38 περιπτώσεις ασθενών. Στους 30 ασθενείς που εμφάνισαν φυσιολογικό πρότυπο μεθυλίωσης, σημειώθηκαν 14 θάνατοι (47%), ενώ στους 8 ασθενείς με παθολογικό πρότυπο και με μεθυλιωμένο το MEG3 παρατηρήθηκαν 2 θάνατοι (25%) (διάγραμμα 24). Η διάμεση επιβίωση των 30 ασθενών με αμεθυλιωτο το γονίδιο MEG3 σε δείγμα ορού ήταν 67 μήνες (95% CI 45-89) και των ασθενών με μεθυλιωμένο δεν έχει επιτευχθεί ακόμα ($p=0.47$) (διάγραμμα 25).

Το πρότυπο μεθυλίωσης της DMR του γονιδίου MEG3 σε δείγμα οστού μελετήθηκε σε 37 περιπτώσεις ασθενών. Στους 24 ασθενείς που εμφάνισαν φυσιολογικό πρότυπο μεθυλίωσης σημειώθηκαν 11 θάνατοι (46%), ενώ στους 13 ασθενείς με παθολογικό πρότυπο και μεθυλιωμένο το MEG3 παρατηρήθηκαν 4 θάνατοι (31%) (διάγραμμα 26). Η διάμεση επιβίωση των 24 ασθενών με αμεθυλιωτο το γονίδιο MEG3 σε δείγμα οστού ήταν 83 μήνες (95% CI 40-126) και των ασθενών με μεθυλιωμένο ήταν 80 μήνες (95% CI 44-116) ($p=0.36$) (διάγραμμα 27).

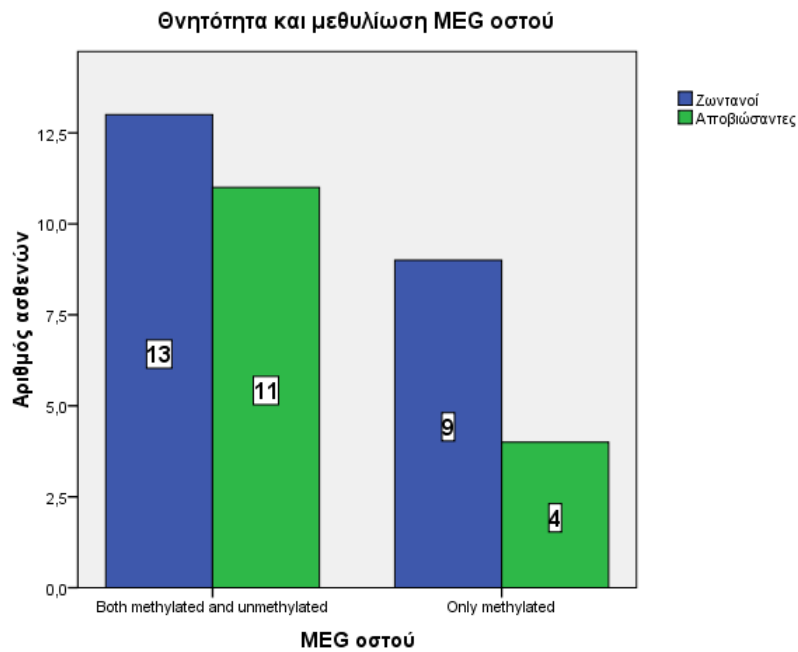
Η ανάλυση των αποτελεσμάτων για την παρουσία παθολογικής μεθυλίωσης του MEG3 γονιδίου έστω και σ'ένα τύπο δείγματος (ορού, οστού ή λεμφαδένα) ανά ασθενή, προσδίδει την εντύπωση τάσης για μικρότερη θνητότητα στους ασθενείς που εμφανίζουν παθολογική μεθυλίωση σε κάποιο δείγμα. Η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0.15$) γιατί ο αριθμός των ασθενών ήταν μικρός και η παρατήρηση δεν μπορεί να επιβεβαιωθεί. Στην ανάλυση αυτή, για την παρουσία παθολογικής μεθυλίωσης τουλάχιστον σ'ένα είδος δείγματος, μπορούσαν να συμπεριληφθούν 35 περιπτώσεις ασθενών. Στους 19 ασθενείς με φυσιολογικό πρότυπο μεθυλίωσης καταγράφηκαν 9 θάνατοι (48%), ενώ στους 16 ασθενείς με παθολογικά μεθυλιωμένο το MEG3 παρατηρήθηκαν 5 θάνατοι (32%) (διάγραμμα 28). Η διάμεση επιβίωση των ασθενών με φυσιολογικό πρότυπο μεθυλίωσης ήταν 83 μήνες (95% CI 32-130) και των ασθενών με παθολογικά μεθυλιωμένο MEG3 80 μήνες (95% CI 50-110) (διάγραμμα 29).



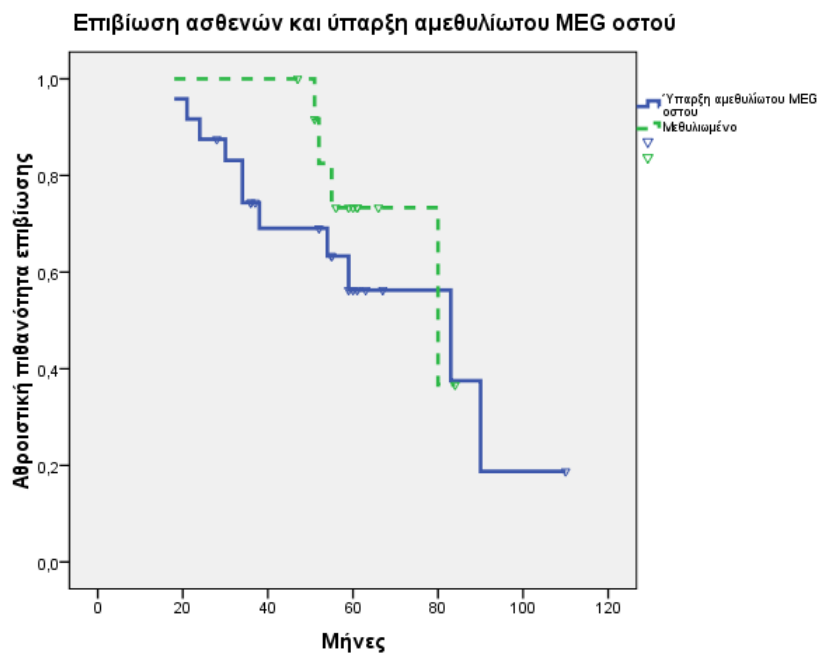
Διάγραμμα 24. Θνητότητα σε σχέση με τη μεθυλίωση του γονιδίου MEG3 σε δείγμα ορού.



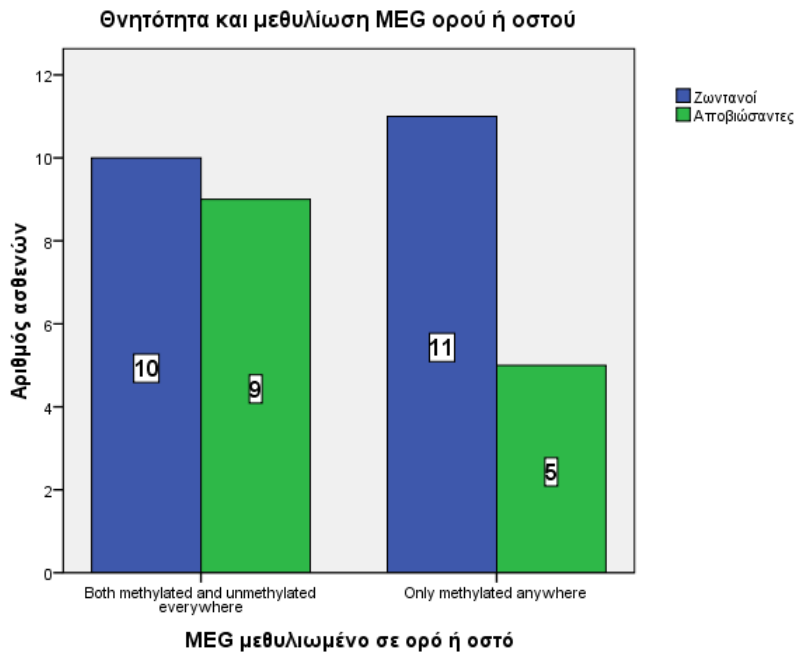
Διάγραμμα 25. Καμπύλη επιβίωσης σε σχέση με τη μεθυλίωση του γονιδίου MEG3 σε δείγμα ορού.



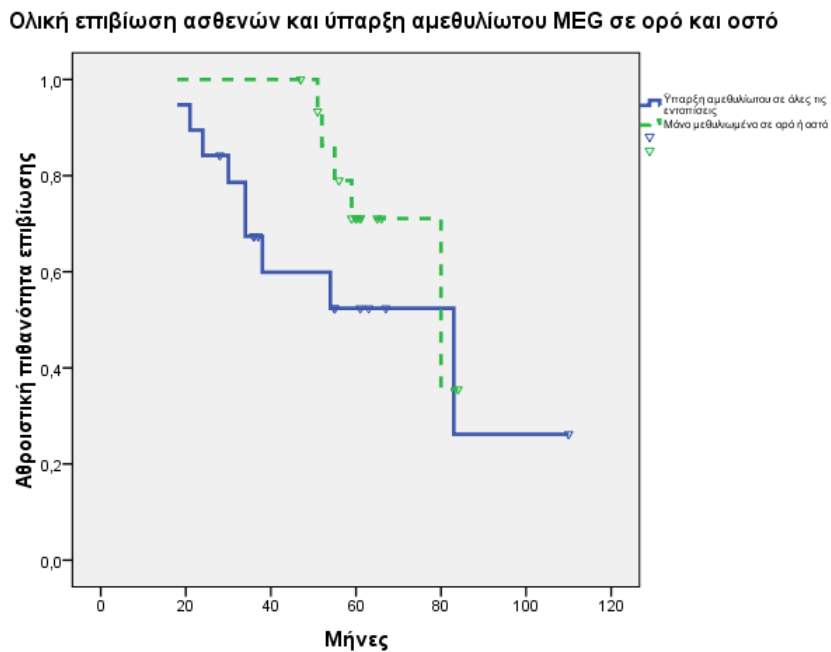
Διάγραμμα 26. Θνητότητα σε σχέση με τη μεθυλίωση του γονιδίου MEG3 σε δείγμα οστού.



Διάγραμμα 27. Καμπύλη επιβίωσης σε σχέση με τη μεθυλίωση του γονιδίου MEG3 σε δείγμα οστού.



Διάγραμμα 28. Θνητότητα σε σχέση με τη μεθυλίωση του γονιδίου MEG3 σε οποιοδήποτε τύπο δείγματος.



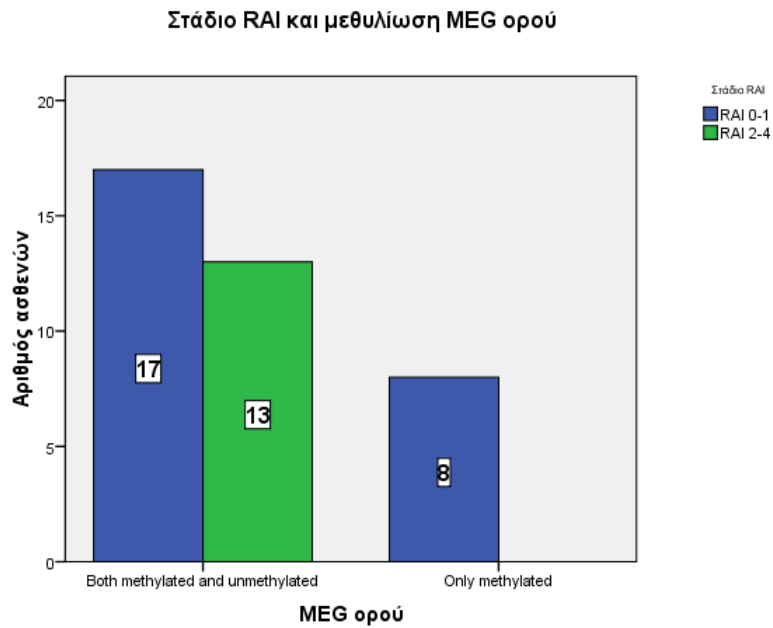
Διάγραμμα 27. Καμπύλη επιβίωσης σε σχέση με τη μεθυλίωση του γονιδίου MEG3 σε οποιοδήποτε τύπο δείγματος.

Το παθολογικό πρότυπο μεθυλίωσης της DMR του γονιδίου MEG3 σε ορό, μυελό και σε οποιοδήποτε από τα αναλυθέντα δείγματα, μελετήθηκε για ύπαρξη στατιστικά σημαντικής συσχέτισης με τις κάτωθι κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους: ηλικία, φύλο, θεραπεία, χρόνος έναρξης θεραπείας, κλινικά στάδια Rai και Binet, υπογαμμασφαιριναιμία, πρότυπο διήθησης μυελού, επίπεδα LDH, επίπεδα β_2 μικροσφαιρίνης, έκφραση CD38 και έκφραση ZAP 70 (πίνακας 6).

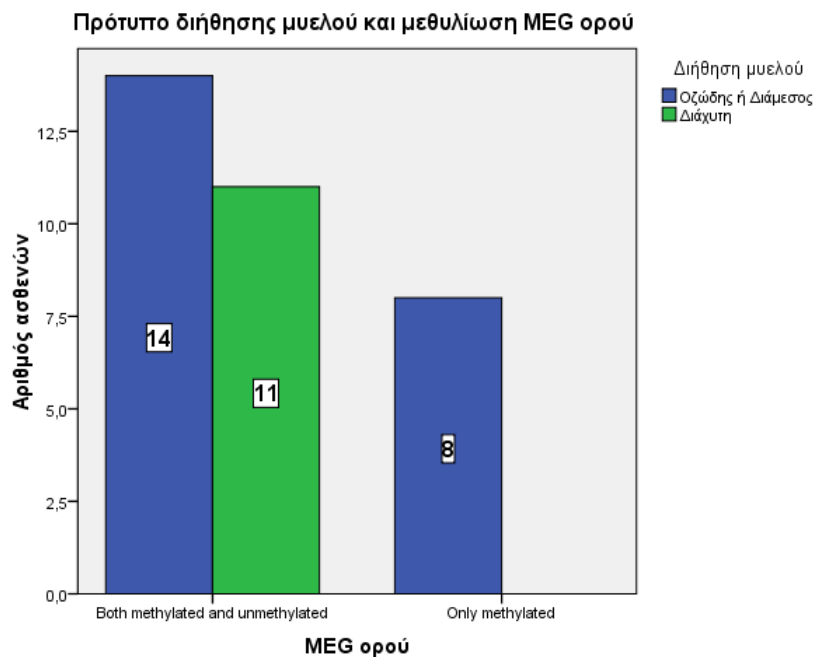
Η ανώμαλη μεθυλίωση του γονιδίου MEG3 στο δείγμα ορού, εμφανίζει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την κατηγοροποίηση των Rai (0/I και II/IV) σταδίων της νόσου ($p=0.022$ με Pearson $R:0.37$). Από τους 30 ασθενείς με φυσιολογικό πρότυπο μεθυλίωσης της DMR του γονιδίου MEG3 17 (57%) ανήκαν στα 0 ή I στάδιο Rai και 13 (43%) στα στάδια II έως IV. Αντιθέτως, οι 8 ασθενείς με υπερμεθυλίωση του γονιδίου MEG3 ανήκαν όλοι (100%) στα αρχικά στάδια Rai 0 ή I (διάγραμμα 28). Η παρουσία υπερμεθυλίωσης του γονιδίου MEG3 συσχετίζεται με πρώιμο στάδιο Rai νόσου.

Επίσης, η υπερμεθυλίωση του γονιδίου MEG3 στο δείγμα ορού, εμφανίζει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το πρότυπο διήθησης του μυελού των οστών από τα κλωνικά λεμφοκύτταρα ($p=0.022$ με Pearson $R:0.4$). Από τους 25 ασθενείς με φυσιολογικό πρότυπο μεθυλίωσης της DMR του γονιδίου MEG3 14 (56%) παρουσίαζαν οζώδη ή διάμεση διήθηση του μυελού των οστών και 11 (44%) διάχυτη διήθηση. Αντιθέτως, οι 8 ασθενείς με υπερμεθυλίωση του γονιδίου MEG3 εμφάνισαν όλοι (100%) οζώδη ή διάμεση διήθηση (διάγραμμα 29). Η παρουσία υπερμεθυλίωσης του γονιδίου MEG3 συσχετίζεται με οζώδες ή διάμεσο πρότυπο διήθησης μυελού των οστών.

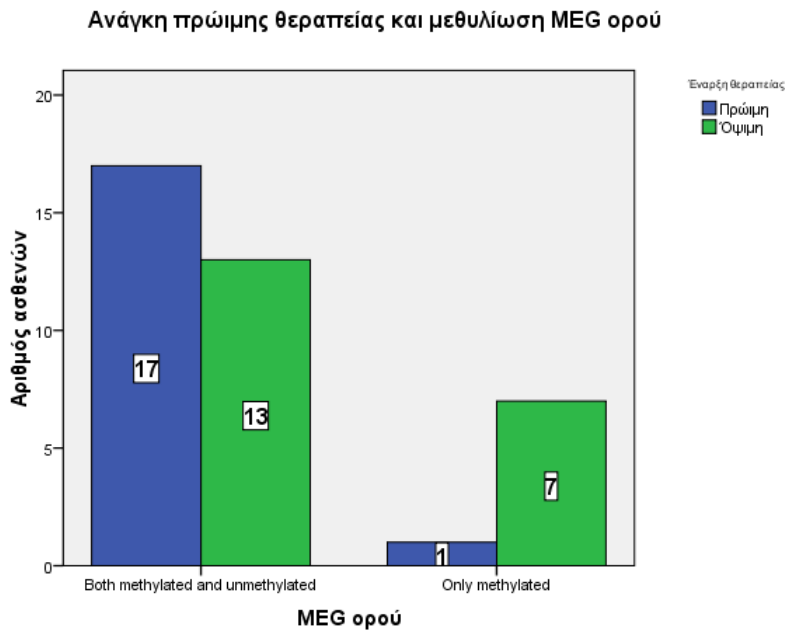
Η υπερμεθυλίωση του γονιδίου MEG3 στο δείγμα ορού, εμφανίζει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την όψιμη έναρξη θεραπείας ($p= 0.026$ με Pearson $R:0.36$). Από τους 30 ασθενείς με φυσιολογικό πρότυπο μεθυλίωσης της DMR του γονιδίου MEG3, στους 17 (57%) η πρώτη θεραπευτική αγωγή χορηγήθηκε νωρίτερα από τους 33 μήνες και από τους 8 ασθενείς με υπερμεθυλίωση του γονιδίου MEG3 μόνο σε 1 (12,5%) δόθηκε θεραπεία νωρίτερα από τους 33 μήνες (διάγραμμα 30). Η παρουσία υπερμεθυλίωσης του γονιδίου MEG3 συσχετίζεται με όψιμη έναρξη θεραπείας.



Διάγραμμα 28. Η παρουσία μεθυλίωσης του γονιδίου *MEG3* συσχετίζεται με πρώιμο στάδιο Rai νόσου.



Διάγραμμα 29. Η παρουσία μεθυλίωσης του γονιδίου *MEG3* συσχετίζεται με οζώδες ή διάμεσο πρότυπο διήθησης μυελού των οστών.



Διάγραμμα 30. Η παρουσία μεθυλίωσης του γονιδίου MEG3 συσχετίζεται με όψιμη έναρξη θεραπείας.

Η υπερμεθυλίωση του γονιδίου MEG3 στο δείγμα οστού, εμφανίζει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την όψιμη έναρξη θεραπείας ($p= 0.022$ με Pearson R:0.38). Από τους 24 ασθενείς με φυσιολογικό πρότυπο μεθυλίωσης της DMR του γονιδίου MEG3, στους 15 (62,5%) η πρώτη θεραπευτική αγωγή χορηγήθηκε νωρίτερα από τους 33 μήνες και από τους 13 ασθενείς με υπερμεθυλίωση του γονιδίου MEG3 σε 3 (23%) δώθηκε θεραπεία νωρίτερα από τους 33 μήνες. Η παρουσία υπερμεθυλίωσης του γονιδίου MEG3 στο δείγμα οστού συσχετίζεται με όψιμη έναρξη θεραπείας.

Ως επιβεβαίωση των παρατηρήσεων μας για τη μεθυλίωση του υποκινητή του VHL σε δείγματα ορού και μυελού, δεν υπήρχε στενή συσχέτιση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης μεθυλίωσης της DMR του γονιδίου MEG3 σε ορό και με τα αποτελέσματα της ανάλυσης στο οστό. Μολονότι ήταν στατιστικά σημαντική $p= 0.004$, η συσχέτιση της μεθυλίωσης του γονιδίου MEG σε ορό και MEG οστού είχε Pearson R:0.5, δηλαδή συμφωνούσε μόνο στο 50% των περιπτώσεων.

7.5 Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ κλινικών και εργαστηριακών παραμέτρων.

Στην παρούσα μελέτη αναδείχθηκαν και οι ακόλουθες συσχετίσεις :

- Η ηλικία >65 ετών συσχετίζεται με την ανάγκη χορήγησης αντινεοπλασματικής θεραπείας ($p= 0.0013$ με Pearson R:0.38).
- Η ηλικία >65 ετών συσχετίζεται με την έκφραση του CD38 ($p= 0.0014$ με Pearson R:0.38)
- Το προχωρημένο στάδιο κατά Rai (II-IV) συσχετίζεται με πρώιμη έναρξη θεραπείας (νωρίτερα από 33 μήνες) ($p= 0.0005$ με Pearson R:-0.58)
- Το προχωρημένο στάδιο κατά Binet συσχετίζεται με πρώιμη έναρξη θεραπείας (νωρίτερα από 33 μήνες) ($p= 0.0005$ με Pearson R:-0.78)
- Η πρώιμη έναρξη θεραπείας (νωρίτερα από 33 μήνες) συσχετίζεται με αυξημένα επίπεδα β_2 μικροσφαιρίνης ($p= 0.014$ με Pearson R:-0.38)
- Η πρώιμη έναρξη θεραπείας (νωρίτερα από 33 μήνες) συσχετίζεται με διάχυτο πρότυπο διήθησης του μυελού ($p= 0.001$ με Pearson R:0.68)
- Το προχωρημένο στάδιο κατά Rai (II-IV) συσχετίζεται με την ανάγκη χορήγησης αντινεοπλασματικής θεραπείας ($p= 0.01$ με Pearson R:0.4)
- Το προχωρημένο στάδιο κατά Binet συσχετίζεται με την ανάγκη χορήγησης αντινεοπλασματικής θεραπείας ($p= 0.0005$ με Pearson R:0.57)
- Η παρουσία υπογαμμασφαιριναιμίας συσχετίζεται με την ανάγκη χορήγησης αντινεοπλασματικής θεραπείας ($p= 0.006$ με Pearson R:0.42)
- Η έκφραση του CD38 συσχετίζεται με την ανάγκη χορήγησης αντινεοπλασματικής θεραπείας ($p= 0.001$ με Pearson R:0.48)
- Το διάχυτο πρότυπο διήθησης του μυελού συσχετίζεται με την ανάγκη χορήγησης αντινεοπλασματικής θεραπείας ($p= 0.0005$ με Pearson R:0.68)
- Το προχωρημένο στάδιο κατά Rai (II-IV) συσχετίζεται με παρουσία αυξημένων επιπέδων LDH ($p= 0.032$ με Pearson R:0.34)
- Το προχωρημένο στάδιο κατά Rai (II-IV) συσχετίζεται με αυξημένα επίπεδα β_2 μικροσφαιρίνης ($p= 0.032$ με Pearson R:0.34)

- Το διάχυτο πρότυπο διήθησης του μυελού συσχετίζεται με προχωρημένο στάδιο κατά Rai (II-IV) ($p= 0.0005$ με Pearson R:0.68)
- Το προχωρημένο στάδιο κατά Binet συσχετίζεται με αυξημένα επιπέδα β_2 μικροσφαιρίνης ($p= 0.04$ με Pearson R:0.32)
- Το προχωρημένο στάδιο κατά Binet συσχετίζεται με την έκφραση του CD38 ($p= 0.03$ με Pearson R:0.33)
- Το προχωρημένο στάδιο κατά Binet συσχετίζεται με διάχυτο πρότυπο διήθησης του μυελού ($p= 0.0005$ με Pearson R:0.7)
- Η παρουσία υπογαμμασφαιριναιμίας συσχετίζεται με την έκφραση του CD38 ($p= 0.018$ με Pearson R:0.37)
- Η παρουσία υπογαμμασφαιριναιμίας συσχετίζεται με το διάχυτο πρότυπο διήθησης του μυελού ($p= 0.014$ με Pearson R:0.41)
- Η παρουσία αυξημένων επιπέδων LDH συσχετίζεται με αυξημένα επιπέδα β_2 μικροσφαιρίνης ($p= 0.04$ με Pearson R:0.32)
- Η παρουσία αυξημένων επιπέδων LDH συσχετίζεται με το διάχυτο πρότυπο διήθησης του μυελού ($p= 0.04$ με Pearson R:0.34)
- Η έκφραση του CD38 συσχετίζεται με το διάχυτο πρότυπο διήθησης του μυελού ($p= 0.007$ με Pearson R:0.45)
- Η χορήγηση θεραπείας συσχετίζεται με αυξημένη θνητότητα ($p= 0.018$ με Pearson R:0.37)

Όλες οι αναλύσεις συσχετίσεων των υπό μελέτη γονιδίων VHL, MEG3, της πρωτεΐνης ZAP70 και των κλινικοπαθολογοανατομικών παραμέτρων απέδωσαν τα ίδια ευρήματα στατιστικής σημαντικότητας με τα αναφερθέντα αποτελέσματα στις παραγράφους 7.2, 7.3, 7.4 κατά την εκτέλεση της μη παραμετρικής δοκιμασίας Spearman Rho.

Πολλές από τις παραπάνω συσχετίσεις είναι γνωστές και κλασσικές της νόσου, γεγονός που επιβεβαιώνει την αξιοπιστία της στατιστικής ανάλυσης του υλικού της παρούσας διατριβής.

8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

8.1 Μελέτη της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της ZAP-70 πρωτεΐνης

Η ανοσοϊστοχημική μελέτη, σε τομές οστεομυελικών βιοψιών, για την έκφραση της ZAP-70 πρωτεΐνης, ανέδειξε θετική έκφραση σε 21 ασθενείς (57%) και αρνητική σε 16 (43%). Η θετική έκφραση ZAP-70 ήταν συχνότερη σε ασθενείς ηλικίας μεγαλύτερης των 65 ετών. Επίσης, η θετική έκφραση ZAP-70 βρέθηκε ότι συσχετίζεται τόσο με την ανάγκη χορήγησης θεραπείας ($p= 0.002$), όσο και με την πρώιμη έναρξη θεραπείας ($p= 0.012$). Επιπρόσθετα, η ποσοτικοποίηση της έκφρασης της ZAP-70 πρωτεΐνης, το Z-score, πρόσφερε ένα ευαίσθητο δείκτη με στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την επιβίωση. Τιμή Z-score μεγαλύτερη του 150, επιδρούσε αρνητικά στην επιβίωση ($p= 0.05$).

Τα βιβλιογραφικά δεδομένα σε σχέση με την συχνότητα της θετικότητας της ZAP-70 στη ΧΛΛ είναι αμφιλεγόμενα. Οι I.Hus και συνεργάτες αναφέρουν ποσοστά θετικής έκφρασης 36,5%, σε πληθυσμό 156 ασθενών, με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής σε δείγμα περιφερικού αίματος και ουδό θετικότητας το 20% των λεμφοκυττάρων¹⁵². Υψηλότερα ποσοστά έκφρασης ανίχνευσαν οι C.Bogner και συνεργάτες, όπου κεκαθαρμένα Β-λεμφοκύτταρα εξετάστηκαν με κυτταρομετρίας ροής και immunoblot ανάλυση. Αναφέρουν θετική έκφραση στο 51,7% από τους 60 ασθενείς που μελέτησαν²⁶⁸. Οι L.Rassenti και συνεργάτες, ανίχνευαν την έκφραση της ZAP-70 σε 307 ασθενείς, με κυτταρομετρίας ροής σε δείγμα περιφερικού αίματος και σε κεκαθαρμένα Β-λεμφοκύτταρα με ανάλυση immunoblot. Προέκυψε ότι, το 46% των ασθενών παρουσίαζαν έντονα θετική έκφραση ZAP-70, το 14% ασθενώς θετική και 40% ήταν αρνητικοί¹⁴⁹.

Το εύρημα της παρούσης μελέτης ότι η έκφραση της ZAP-70 πρωτεΐνης συνδέεται με την ανάγκη χορήγησης θεραπείας, επιβεβαιώνεται και από άλλες μελέτες. Οι I.Hus και συνεργάτες¹⁵² καταδεικνύουν συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της ZAP-70 (ανιχνευθείσα με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής) και της θεραπευτικής αναγκαιότητας ($p= 0.032$). Επίσης, συσχέτισαν και τη θεραπευτική απάντηση με τη ZAP-70 έκφραση. Οι ασθενείς που απάντησαν στην θεραπεία πρώτης γραμμής με ανάλογα

των πουρινών, εξέφρασαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα ZAP-70 πρωτεΐνης σε σχέση με τους ασθενείς που ήταν ανθεκτικοί στην ίδια θεραπεία ($p= 0.008$). Η σημαντική μελέτη της L.Rassenti επικυρώνει την συσχέτιση της έκφρασης της ZAP-70 πρωτεΐνης με την ανάγκη για πρώιμη έναρξη θεραπείας¹⁴⁹ ($p< 0.001$). Η ίδια μελέτη ανέδειξε τη ZAP-70 ισχυρότερο προβλεπτικό παράγοντα ως προς τη θεραπευτική αναγκαιότητα, από την κατάσταση μετάλλαξης των γονιδίων IgVH.

Πολλές είναι οι βιβλιογραφικές αναφορές για τη συσχέτιση της έκφρασης της ZAP-70 με την κατάσταση μετάλλαξης των γονιδίων IgVH. Η ανίχνευση της ZAP-70 με διάφορες μεθόδους έχει συσχετισθεί με την απουσία σωματικών μεταλλάξεων των γονιδίων IgVH (unmutated CLL). Στη μελέτη της L.Rassenti¹⁴⁹ το 71% των ασθενών με απουσία μεταλλάξεων των IgVH ήταν ZAP-70 θετικοί και το 83% των ασθενών με υπερμεταλλάξεις των IgVH ήταν ZAP-70 αρνητικοί. Υπήρχε ασυμφωνία μόνο στο 23% του συνόλου των 307 ασθενών που μελετήθηκαν. Οι M.Crespo και συνεργάτες¹⁵¹ αναφέρουν υψηλότερα ποσοστά συμφωνίας μεταξύ των ευρημάτων έκφρασης ZAP-70 με τη μετάλλαξη των IgVH. Μελέτησαν 56 ασθενείς και στους 32 με θετικότητα στη ZAP-70 απουσίαζαν οι μεταλλάξεων των IgVH, ενώ στους 24 με αρνητική τη ZAP-70 υπερμεταλλάξεις των IgVH εμφάνιζαν οι 21. Η μελέτη E.Sabattini²⁶⁹ έδειξε σύμπτωση κατά 85% ανάμεσα στην ανοσοϊστοχημική έκφραση, σε τομές οστεομυελικής βιοψίας, της ZAP-70 και της μετάλλαξης των IgVH. Επίσης, οι H.Admirand²⁷⁰ αναφέρουν τα ίδια υψηλά ποσοστά 85% συμφωνίας μεταξύ της ανοσοϊστοχημικής ανίχνευσης της ZAP-70 (μολονότι έκαναν χρήση διαφορετικού μονοκλωνικού αντισώματος) και της κατάστασης μετάλλαξης των IgVH. Οι A.Wiestner και συνεργάτες¹²⁴ παρατήρησαν ότι, σε ποσοστό 93% η ZAP-70 έκφραση προσδιορίζει σωστά την κατάσταση μετάλλαξης των IgVH. Όταν υπήρχε ασυμφωνία και ασθενείς με παρουσία σωματικών μεταλλάξεων είχαν απροσδόκητα θετική έκφραση ZAP-70 συχνά εμφάνιζαν τα μεταλλαγμένα VH3-21 γονιδιακά τμήματα, η παρουσία των οποίων συνδέεται με κακή πρόγνωση και ταχεία πρόοδο νόσου. Επίσης, αναφέρουν 86% ποσοστό συμφωνίας μεταξύ της ανοσοϊστοχημικής ανίχνευσης της ZAP-70 σε τομές παραφίνης οστεομυελικής βιοψίας και κατάταξης ανάλογα με τις IgVH μεταλλάξεις, με 100% προγνωστική αξία του αρνητικού αποτελέσματος της ανοσοϊστοχημείας. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρει η

J. Orchard¹⁵⁰ σε 167 ασθενείς, όπου μόνο στο 8% των ασθενών παρατηρήθηκε ασυμφωνία μεταξύ κατάστασεως μεταλλάξης των IgVH γονιδίων και έκφρασης ZAP-70 πρωτεΐνης και στο 4% των ασθενών με μεταλλάξεις των IgVH γονιδίων που ήταν ZAP-70 θετικοί, εμφάνιζαν τα VH3-21γονιδιακά τμήματα.

Από τα βιβλιογραφικά δεδομένα προκύπτει ότι, τα αποτελέσματα του προσδιορισμού της ZAP-70 με διάφορες τεχνικές, της DNA μικροσυστοιχιών, της ποσοτικής RT-PCR, της Western blot, της κυτταρομετρίας και της ανοσοϊστοχημείας γενικά ήταν σε συμφωνία μεταξύ τους. Οι J. Orchard και συνεργάτες¹⁵⁰ παρατήρησαν ποσοστό 97% συμφωνίας των αποτελεσμάτων του προσδιορισμού της ZAP-70 πρωτεΐνης με κυτταρομετρία ροής (ουδός για θετικότητα το 10%) και του προσδιορισμού του ZAP-70 m-RNA. Οι μέθοδοι ανίχνευσης Western blot και ανοσοϊστοχημείας σε τομές παραφίνης συμφωνούσαν στα αποτελέσματα κατά 82,6% στη μελέτη της E.Sabattini²⁶⁹. Εναρμονισμένα αποτελέσματα μέτρησης mRNA ZAP-70 με την ανοσοϊστοχημική ZAP-70 έκφραση, αναφέρεται από τους A.Wiestner και συνεργάτες¹²⁴.

Ο ανοσοϊστοχημικός προσδιορισμός της ZAP-70 πρωτεΐνης σε τομές παραφίνης οστεομυελικής βιοψίας, με τα διαθέσιμα μονοκλωνικά αντισώματα, είναι τεχνική απλή, αξιόπιστη, με ικανοποιητική ευαισθησία, ειδικότητα και επαναληψιμότητα. Είναι εύκολα εφαρμόσιμη ακόμα και σε αρχιακό υλικό, με δυνατότητα συσχέτισης με τις μορφολογικές παραμέτρους. Δεν προϋποθέτει τη λήψη κεκαθαμένων κλωνικών λεμφοκυττάρων, όπως η ποσοτική RT-PCR και η Western blot, τεχνικές στις οποίες μπορεί να υπερεκτιμηθούν τα επίπεδα της ZAP-70 εξ'αιτίας της παρουσίας T-λεμφοκυττάρων στο αναλυόμενο δείγμα. Στην ανοσοϊστοχημική ανίχνευση της ZAP-70 πρωτεΐνης, υπάρχει ταυτόχρονα θετικός μάρτυρας το T-λεμφοκύτταρο και αρνητικός το κύτταρο της μυελικής σειράς²⁷¹. Αναφέρεται ότι, στις περιπτώσεις ΧΛΛ με παρουσία υπερμεταλλάξεων των IgVH γονιδίων, στα λευχαιμικά κύτταρα η χρώση είναι απούσα ή έχει ασθενή ένταση, ενώ στις περιπτώσεις ΧΛΛ με απουσία υπερμεταλλάξεων των IgVH γονιδίων, στα λευχαιμικά κύτταρα η χρώση είναι έντονη²⁶⁹. Από τη φύση της η μέθοδος είναι ημιποσοτική και γι'αυτό η κατανομή σε μεταλλαγμένο ή μη τύπο ΧΛΛ δεν είναι πάντοτε επιτυχής στις περιπτώσεις με ενδιάμεση έκφραση²⁷¹. Όμως, έχει αναφερθεί ότι η ένταση της έκφρασης της ZAP-70 πρωτεΐνης στα λευχαιμικά κύτταρα είναι σημαντική

παράμετρος. Για ν'αξιολογηθεί η παραπάνω υπόθεση σχεδιάστηκε το Z-score, ώστε να υπάρξει ποσοτικοποίηση της έκφρασης της ZAP-70 πρωτεΐνης και προέκυψε ένας ευαίσθητος δείκτης που συσχετίστηκε με την επιβίωση.

Τα επίπεδα της ZAP-70 έκφρασης αναφέρεται ότι δεν παρουσιάζουν διαφορές ανάλογα με το είδος του εξεταζόμενου δείγματος (περιφερικό αίμα ή μυελός)¹²⁴. Επίσης, η έκφραση φαίνεται να είναι σταθερή στο χρόνο, όμως δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα για την επίδραση της αντινεοπλασματικής θεραπείας στην έκφραση της πρωτεΐνης στα λευχαιμικά κύτταρα¹⁵⁰.

Η ZAP-70 πρωτεΐνη είναι ισχυρός προβλεπτικός παράγοντας για την αναγκαιότητα έναρξης θεραπείας και μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατά τη διάγνωση για ν'αναγνωρίσει τους ασθενείς που βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο για ταχεία πρόοδο της νόσου¹⁴⁹. Αναφέρεται ότι είναι και ισχυρός ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας¹⁴⁹. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι η έκφραση ZAP-70 απεικονίζει την ενεργότητα του νεοπλασματικού κλώνου, που κατά συνέπεια επάγει την πρόοδο της νόσου²⁷². Πρόσφατα έχει δειχθεί ότι, η ZAP-70 συμμετέχει στη μεταγωγή σήματος μετά από διέγερση του BCR και η επακόλουθη αύξηση της ενδοκυττάριας επαγωγής σήματος μπορεί να ευωδώνει την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των λευχαιμικών κυττάρων, οδηγώντας τη νόσο σε εξέλιξη^{138,150,273}.

8.2 Μελέτη της μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου VHL

Η μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου VHL ανιχνεύθηκε σε 7 δείγματα ορού (7 από 38), ποσοστό 18% και σε 12 από τα τα 37 δείγματα οστεομυελικής βιοψίας που εξετάστηκαν (ποσοστό 32%).

Η παρουσία μεθυλίωσης στο γενωμικό DNA που απομονώθηκε από δείγμα ορού, δεν συσχετίστηκε με στατιστική σημαντικότητα με την επιβίωση ή άλλες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους. Αν και η επιβίωση των ασθενών με μεθυλιωμένο τον υποκινητή του VHL στον ορό ήταν 13 μήνες μικρότερη, η διαφορά δεν επέτυχε στατιστική σημαντικότητα πιθανά λόγω του μικρού αριθμού των μελετηθέντων ασθενών.

Όταν αναζητήθηκε η ύπαρξη συσχέτισης της παρουσίας μεθυλίωσης σε οποιοδήποτε δείγμα ασθενούς με τις κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους, προέκυψε ότι

η ύπαρξη μεθυλίωσης του υποκινητή του VHL συσχετίζεται με αυξημένα επίπεδα LDH και προχωρημένο στάδιο κατά Rai. Συσχετίστηκε δηλαδή, η μεθυλίωση του γονιδίου με δυσμενείς προγνωστικούς παράγοντες που φανερώνουν επιθετικότερη βιολογία νόσου.

Στην παρούσα διατριβή απομονώθηκε γενωμικό DNA από ορό, οστό και λεμφαδένα από κάθε ασθενή, όταν αυτό ήταν δυνατό. Παρατηρήθηκε ότι η παρουσία μεθυλίωσης στο γενωμικό DNA του ορού ήταν ευαίσθητος και ισχυρός δείκτης σε συσχετίσεις. Πιθανολογούμε ότι οι ερμηνείες της παρατήρησης αυτής είναι πολλές. Κατ'αρχήν, είναι γνωστό ότι η ΧΛΛ εμφανίζει ένα μοναδικό ιστοπαθολογικό χαρακτηριστικό <<τα κέντρα πολλαπλασιασμού>> ή ψευδοοζώδη κέντρα, που είναι εστιακές αθροίσεις Β-ώριμων αδρανών νεοπλασματικών λεμφοκυττάρων, παρανοσοβλαστών που είναι Β-πολλαπλασιαζόμενα νεοπλασματικά λεμφοκύτταρα και βοηθητικών κυττάρων κυρίως αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και CD4 Τ-λεμφοκυττάρων²⁷⁴. Τα τελευταία διαδραματίζουν σημαντικό τροφικό ρόλο προσφέροντας ερεθίσματα που προάγουν την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των νεοπλασματικών λεμφοκυττάρων²⁷⁵. Έτσι, όταν απομονώθηκε DNA από το μυελό των οστών ή το λεμφαδένα αν και η κύρια ποσότητα προερχόταν από τα λεμφοκύτταρα της Β-ΧΛΛ (λόγω του μεγάλου ποσοστού διήθησης), υπήρχε και ποσότητα DNA από τα υπόλοιπα παρόντα κύτταρα. Το απομονωθέν DNA από τον ορό πιθανά αντικατοπτρίζει το DNA που απελευθερώνεται από ασταθή, ταχύτερα πολλαπλασιαζόμενο, επιθετικό ΧΛΛ κλώνο που μπορεί να αντιπροσωπεύεται σε χαμηλό βαθμό στον μυελό των οστών. Κατά την πορεία της ΧΛΛ μπορεί να υπάρξει κλωνική ετερογένεια με έκπτυξη διαφορετικών κυτταρικών κλώνων¹²⁴. Οι κλώνοι μπορεί να παρουσιάζουν διαφορετική γενετική αστάθεια και να αποδίδουν πιο εύκολα ή πιο δύσκολα ελεύθερο DNA στον ορό. Έτσι, η παράμετρος της απουσίας μεθυλίωσης σε οποιοδήποτε δείγμα ασθενούς, πιθανώς συλλαμβάνει εκείνες τις περιπτώσεις κατά τις οποίες το VHL γονίδιο είναι αμεθυλίωτο σ'όλους τους κυτταρικούς ΧΛΛ κλώνους.

Η ανάπτυξη των νεοπλασματικών κυττάρων, δημιουργεί συνθήκες υποξίας στο μικροπεριβάλλον και επάγει την ενεργοποίηση των μηχανισμών προσαρμογής από τα νεοπλασματικά κύτταρα, όπως οι εξαρτώμενοι από το μεταγραφικό παράγοντα HIF-1a δρόμοι και η αγγειογένεση²⁷⁶. Ο HIF-1a είναι κύριος μεταγραφικός παράγοντας του VEGF (vascular endothelial growth factor). Είναι γνωστό ότι, τα Β-κύτταρα στη ΧΛΛ

παρουσιάζουν ενδογενώς αυξημένα επίπεδα mRNA του VEGF και έχουν την ικανότητα να εκκρίνουν αυτόματα VEGF ακόμα και σε μη υποξικές συνθήκες²⁷⁷. Εύλογα, συμπεραίνεται ότι υψηλός βαθμός νεοαγγειογένεσης που παρουσιάζεται στους λεμφαδένες και στο μυελό των οστών στη ΧΛΛ έχει σχέση με τα αυξημένα επίπεδα VEGF^{278,279}. Επίσης, στη ΧΛΛ τα αυξημένα επίπεδα VEGF έχουν συσχετιστεί με προχωρημένο στάδιο νόσου²⁸⁰. Επιπλέον, η ικανότητα του VEGF να αυξάνει την αντίσταση στην απόπτωση των B- κυττάρων της ΧΛΛ συνδέεται με την έκφραση των υποδοχέων του VEGF: VEGF-R1, VEGF-R2 και νευροπιλίνης-1 που ανιχνεύονται στα ΧΛΛ κύτταρα^{281,282}.

Έχει δειχθεί ότι ο HIF-1a υπερεκφράζεται στα B-κύτταρα της ΧΛΛ ακόμα και σε φυσιολογικές συνθήκες παροχής οξυγόνου. Περιγράφεται η θετική πυρηνική ανοσοϊχνημική έκφραση του HIF-1a σε ομάδες B-λεμφοκυττάρων στο μυελό των οστών ασθενών με ΧΛΛ και με την τεχνική Western blot τα αυξημένα επίπεδα HIF-1a και VEGF πρωτεϊνών σε B-κύτταρα ΧΛΛ από περιφερικό αίμα²⁸³.

Ποιός όμως είναι ο υπεύθυνος μηχανισμός για τη σταθερή αύξηση των επιπέδων του HIF-1a; Όταν προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της pVHL με την τεχνική Western blot σε B-λεμφοκύτταρα ΧΛΛ βρέθηκε ότι ήταν αξιοσημείωτα χαμηλά σε σχέση με τα φυσιολογικά B-λεμφοκύτταρα²⁸³. Η pVHL είναι ο φυσιολογικός ρυθμιστής της HIF-1a δραστηριότητας, υποβοηθώντας την αποδόμησή του στο πρωτεάσωμα. Οι A.Ghosh και συνεργάτες²⁸³ ερεύνησαν την ύπαρξη των συνηθέστερων μεταλλάξεων των εξονίων 1,2 και 3 του VHL γονιδίου και βρήκαν την απουσία μεταλλάξεων. Πρότειναν ότι το miR-92-1, που υπερεκφράζεται στη ΧΛΛ, στοχεύει τα μετάγραφα pVHL και καταστέλει την έκφρασή τους. Η αποσιώπηση του VHL γονιδίου μέσω μεθυλίωσης, που παρουσιάστηκε στην παρούσα εργασία, θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει εναλλακτικό μηχανισμό ερμηνείας των μειωμένων επιπέδων pVHL στα B-κύτταρα της ΧΛΛ και της επακόλουθης απορρύθμισης του HIF-1a και της υπερέκφρασης των γονιδίων που στοχεύονται από τον HIF-1a.

Μέρος των γονιδίων που ελέγχονται από τον HIF-1a κωδικοποιούν θεμελιώδους σημασίας πρωτεΐνες για τη δημιουργία και το μεταβολισμό της εξωκυττάριας ουσίας και τη διατήρηση της φυσιολογικής αρμονίας στο ιστικό μικροπεριβάλλον^{284,285}. Αλλά και

ανεξάρτητα του HIF, η pVHL με πολύπλοκες δράσεις ρυθμίζει την οργάνωση της εξωκυττάριας ουσίας^{286,287}. Η απώλεια της ισορροπίας στη ρύθμιση βασικών συστατικών του μικροπεριβάλλοντος, μέσω της αποσιώπησης του VHL μπορεί να διευκολύνει την αλληλεπίδραση των B-κλωνικών λεμφοκυττάρων με τα στρωματικά κύτταρα. Ο καίριος ρόλος του μικροπεριβάλλοντος στην επιβίωση των λευχαιμικών κυττάρων αναδεικνύεται από το γεγονός ότι τα κύτταρα αποπίπτουν ταχέως με την απομάκρυνσή τους από τους ασθενείς^{288,289}. Υποθέτουμε ότι, η έλλειψη της pVHL, λόγω μεθυλίωσης του υποκινητή του VHL γονιδίου, μπορεί να επιφέρει αλλαγές στο ιστικό μικροπεριβάλλον προς όφελος της επιβίωσης των λευχαιμικών κυττάρων.

Ο ακρογωνιαίος λίθος της κακοήθους εκτροπής των μη-δισαιρούμενων λευχαιμικών κυττάρων της Β-ΧΛΛ, που έχουν χαμηλό μιτωτικό δείκτη και βρίσκονται στη G₀/G₁ φάση ηρεμίας του κυτταρικού κύκλου, είναι η υπερέκφραση των αντιαποπτωτικών BCL-2 πρωτεϊνών και η επακόλουθη αναστολή του κυτταρικού θανάτου και η παρατεταμένη επιβίωση των λευχαιμικών κυττάρων²⁹⁰. Αρκετές οδοί αντιαποπτωτικού σήματος επάγονται στα λευχαιμικά κύτταρα και ιδιαίτερα η οδός του NFκB, η ενεργοποίηση του οποίου αναφέρεται ως προγνωστικός παράγων της ΧΛΛ^{291,292,293}. Η καταστολή της έκφρασης του VHL γονιδίου μέσω μεθυλίωσης, επάγει τη δραστηριότητα του NFκB γιατί απουσιάζει η pVHL που βοηθά στη φωσφορυλίωση του αγωνιστή CARD9 του NFκB που προκαλεί μείωση της δραστηριότητας του NFκB²²¹.

Η πρωτεΐνη p53 είναι μεταγραφικός παράγοντας, ο οποίος εμπλέκεται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, συμμετέχει στην επιδιόρθωση του DNA και παίζει κεντρικό ρόλο στο φαινόμενο της απόπτωσης²⁹⁴. Η αντιαποπτωτική δράση της p53 ασκείται με την συμμετοχή της σε πολλαπλές οδούς²⁹⁵. Είναι γνωστό ότι, η pVHL συνδέεται με την p53 επαυξάνοντας την σταθερότητά της και τη δραστηριότητά της στα βλαπτικά για το γένωμα ερεθίσματα²⁹⁶. Πιθανά, τα μειωμένα επίπεδα της pVHL, λόγω μεθυλίωσης του υποκινητή του VHL γονιδίου συνεπάγονται ασταθή p53.

Πολλά δεδομένα συνηγορούν ότι η pVHL είναι ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη^{297,298,299}. Η μεθυλίωση των CpG νησίδων του VHL γονιδίου έχει μελετηθεί σε αρκετούς τύπους νεοπλασμάτων^{300,301,302,303,304}. Έχει περιγραφεί μεθυλίωση στο 13% στο οισοφαγικό πλακώδες καρκίνωμα²⁶¹, στο 19% των αδενοκαρκινωμάτων του

νεφρού³⁰⁵. Υψηλό ποσοστό (41%) μεθυλίωσης του VHL έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα και η παρουσία μεθυλίωσης συσχετίστηκε με αυξημένη επίπτωση εκτεταμένης οστικής νόσου³⁰⁶. Η ύπαρξη μεθυλίωσης του VHL στη ΧΛΛ και η συσχέτιση αυτής με δυσμενείς προγνωστικούς παράγοντες περιγράφεται για πρώτη φορά.

Αναφέρεται ότι, η έκφραση της pVHL σε περιπτώσεις νεφρικού καρκίνου ευαισθητοποιεί τα νεοπλασματικά κύτταρα στην επίδραση του bortezomib, μέσω εξαρτώμενου από τον NFκB μηχανισμό^{307,308,309}. Το bortezomib αποτελεί θεραπευτική στρατηγική υπό δοκιμή, σε ανθεκτικές στα ανάλογα της πουργίνης περιπτώσεις ΧΛΛ^{310,311}. Το bortezomib επάγει την απόπτωση των λευχαιμικών κυττάρων³¹² και η πληροφορία για την ύπαρξη μεθυλιωμένου VHL γονιδίου, θα μπορούσε να διαχωρίσει τους ασθενείς με αναμενόμενη ανθεκτικότητα στο φάρμακο.

8.3 Μελέτη του προτύπου μεθυλίωσης του MEG3 γονιδίου

Αναφέρθηκε ότι στην περιοχή 14q32, τυποποιήθηκε η παρουσία του ζεύγους γονιδίων DLK1/MEG3 που είναι λειτουργικά συνδεδεμένα και ελέγχονται από τον μηχανισμό της γονιδιωματικής αποτύπωσης. Το MEG3 θεωρείται ογκοκατασταλτικό γονίδιο, φυσιολογικά εκφράζεται πάντα το μητρικό αλληλίο και κωδικοποιεί non-coding RNA. Μελετήθηκε η κατάσταση μεθυλίωσης της DMR ρυθμιστικής περιοχής (του υποκινητή) του MEG3 γονιδίου σε γενωμικό DNA από ορό και μυελό των οστών. Παθολογικό πρότυπο μεθυλίωσης της DMR του γονιδίου MEG3 ανιχνεύθηκε σε 8 δείγματα ορού ασθενών (8 από 38), ποσοστό 21% και σε 13 από τα 37 δείγματα οστεομυελικής βιοψίας, ποσοστό 35%.

Η παρουσία υπερμεθυλίωσης της DMR περιοχής του γονιδίου MEG3 σε γενωμικό DNA απομονωθέν στον ορό, συσχετίστηκε με πρώιμο στάδιο νόσου κατά Rai, με οζώδες ή διάμεσο πρότυπο διήθησης μυελού των οστών και με όψιμη έναρξη θεραπείας. Συσχετίστηκε δηλαδή, με ευνοϊκούς προγνωστικούς παράγοντες. Οι παραπάνω συσχετίσεις επιβεβαίωσαν ότι η παρουσία μεθυλίωσης στο γενωμικό DNA του ορού είναι ευαίσθητος και ισχυρός σε συσχετίσεις δείκτης.

Υπερμεθυλίωση του υποκινητή του MEG3 γονιδίου έχει περιγραφεί στο νευροβλάστωμα σε ποσοστό 25%, όπου περιγράφεται και μεταγραφική καταστολή του MEG3²³⁷. Επίσης, υπερμεθυλίωση του MEG3 αναφέρεται στο φαιοχρωμοκύττωμα σε ποσοστό 10% και στο 2.5% των όγκων του Wilms²³⁷. Σε περιπτώσεις νεφρικού καρκίνου παρατηρήθηκε υπερμεθυλίωση της DMR περιοχής του γονιδίου MEG3 στο 50% και συνδυαζόταν με απώλεια της έκφρασης του DLK1³¹³. Στα μη λειτουργικά αδενώματα της υπόφυσης δεν ανιχνεύονται MEG3 μεταγγραφα, ενώ αντιθέτως στο φυσιολογικό ιστό της υπόφυσης σημειώνεται υψηλή έκφραση^{314,315}. Υψηλό ποσοστό υπερμεθυλίωσης 57% παρατηρήθηκε σε ασθενείς με πολλαπλό μύελωμα και στον υπότυπο του IgG μυελώματος αναφέρθηκε ποσοστό 67%³¹⁶. Στην οξεία μυελογενή λευχαιμία αναφέρθηκε παρουσία μεθυλίωσης του MEG3 σε ποσοστό 47% και στο 41% σε ομάδα ασθενών με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο³¹⁷. Η προαναφερθείσα εργασία συνδέει την ανώμαλη υπερμεθυλίωση του MEG3 στην οξεία μυελογενή λευχαιμία με δυσμενή επίπτωση στην ολική επιβίωση. Η παρούσα μελέτη παρουσιάζει για πρώτη φορά δεδομένα σχετικά με την υπερμεθυλίωση του MEG3 στη ΧΛΛ.

Πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα θεωρούν ότι, το MEG3 κωδικοποιεί μη-κωδικοποιόν RNA (non-coding RNA), που έχει ογκοκατασταλτικές ιδιότητες και ότι η μεθυλίωση της DMR περιοχής του DLK1/MEG3 γονιδιακού συσσωματώματος ενέχεται στην απώλεια της έκφρασης του MEG3 στα νεοπλασματικά κύτταρα²³⁸. Ο σύνδεσμος μεταξύ της έκφρασης του MEG3 και της ογκογένεσης ήταν η παρατήρηση ότι το cDNA του MEG3 καταστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε αρκετές νεοπλασματικές κυτταρικές σειρές³¹⁴. Ιδιαίτερα σημαντική ήταν η παρατήρηση ότι το cDNA του MEG3 είναι ικανό να επάγει την εξαρτώμενη από την p53 μεταγραφή πολλών γονιδίων, να οδηγεί στην κυτταρική συσσώρευση της p53 και στην εκλεκτική ενεργοποίηση κατωφερέστερων γονιδίων-στόχων του p53²⁴⁵. Υποθέτουμε ότι, ο προαναφερθείς μηχανισμός είναι εξαιρετικά σημαντικός για τη ΧΛΛ, γιατί είναι γνωστό ότι η p53 έχει τη δυνατότητα να επάγει την απόπτωση συμμετέχοντας σε πολλαπλές οδούς και η αναστολή της απόπτωσης είναι θεμελιώδες γεγονός στη ΧΛΛ³¹⁸. Η αναστολή της έκφρασης του MEG3 λόγω υπερμεθυλίωσης της περιοχής του υποκινητή του, θα οδηγούσε σε μερική διαταραχή τη λειτουργία της σημαντικής ογκοκατασταλτικής p53

πρωτεΐνης. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι η ογκοκατασταλτική δράση του MEG3 είναι εξαρτώμενη από το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος (RB1) και ότι το MEG3 πιθανά να κατέχει σημαντικό ογκοκατασταλτικό ρόλο στις κυτταρικές οδούς που εξαρτώνται από το RB1²⁴⁵.

Τα μη-κωδικοποιώντα RNA (non-codingRNAs) είναι τα RNAs που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Η κατηγορία των μη-κωδικοποιώντων γονιδίων (non-coding genes), είναι εξελικτικά διατηρημένα γονίδια διασπαρμένα στο γένωμα και περιλαμβάνει τα γονίδια που κωδικοποιούν τα micro-RNAs (miRNAs) και τα μη-κωδικοποιώντα υπερδιατηρημένα γονίδια (UCGs noncoding Ultraconserved genes)³¹⁹. Τα miRNAs είναι βραχέα τμήματα RNA αποτελούμενα από 19-25 νουκλεοτίδια και προκύπτουν από τα Pri-miRs μετά από πολύπλοκη διαδικασία ωρίμανσης. Υπολογίζεται ότι το ανθρώπινο γένωμα περιέχει περισσότερα από 1000 miRNAs, τα οποία καταστέλλουν την έκφραση της πλειονότητας των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες³²⁰. Έχει προταθεί ότι περίπου το 30% των γονιδίων ελέγχονται από τουλάχιστον ένα miRNA³²⁰. Η 5' άκρη του miRNA συνδέεται μέσω των πρώτων 2-8 νουκλεοτιδίων της, στην 3' UTR περιοχή του αγγελιοφόρου RNA, βλάπτοντας τη σταθερότητά του και τη μετάφρασή του, με απώτερο αποτέλεσμα την αναστολή της πρωτεϊνικής έκφρασης³²¹. Τα miRNAs εμπλέκονται σε πολλές και κρίσιμες βιολογικές διαδικασίες όπως η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, η διαδικασία της κυτταρικής διαφοροποίησης, η απόπτωση, η απάντηση στα στρεσογόνα ερεθίσματα και τη γήρανση³²¹. Η έκφραση των miRNAs μπορεί να μεταβληθεί κατά την ογκογένεση, με την απώλεια χρωμοσωμικού υλικού, τις μεταλλάξεις και με επιγενετικές αλλαγές όπως η μεθυλίωση του DNA³²⁰. Η εκτενής μελέτη των γενωμικών αλληλουχιών των miRNA γονιδίων κατέδειξε ότι στα μισά περίπου υπήρχαν CpG νησίδες, γεγονός υποδηλωτικό της πιθανής ρύθμισης της έκφρασης αυτών από επιγενετικούς μηχανισμούς³²². Πειραματικά δεδομένα αποδεικνύουν ότι, η αλλαγή της κατάστασης μεθυλίωσης είναι υπεύθυνη για την απορύθμιση της έκφρασης των miRNA στη νεοπλασία^{323,324,325}. Η αλληλεπίδραση επιγενετικών μηχανισμών και miRNA γίνεται πολυπλοκότερη γνωρίζοντας ότι, τα miRNA είναι ρυθμιστές βασικών συνισταμένων του επιγενετικού μηχανισμού³²⁰ π.χ η οικογένεια των miRNA-29 στοχεύει τις μεθυλοτρανσφεράσες DNMT-3A και -3B³²⁶.

Υπάρχουν πειραματικά δεδομένα ότι το MEG3 δρα ως micro-RNA (miRNA)²⁴⁵. Ανήκει σε μία από τις μεγαλύτερες ομάδες miRNAs που έχουν ταυτοποιηθεί έως σήμερα. Η ομάδα αυτή εδράζεται στο χρωμόσωμα 14q32. Σ' αυτή την περιοχή εδράζεται το 10% των αναγνωρισμένων, επί του παρόντος, miRNAs στον άνθρωπο³²⁷. Στην περιοχή DLK1/MEG3 κωδικοποιούνται περίπου 40 miRNAs που εκφράζονται πάντα από το μητρικό αλληλίο (όπως τα: Gtl2/MEG3, anti-Rtl1, Rian/MEG8, Mirg)^{328,329}. Ερευνητικά αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι, τα miRNAs της 14q32 περιοχής δε ρυθμίζουν συγκεκριμένο σύνολο γονιδίων, αλλά φαίνεται ότι αναστέλλουν την έκφραση ποικιλίας γονιδίων^{327,330}. Συνεπώς, αποτελούν δομικό συστατικό του δικτύου των miRNA, που ρυθμίζει την έκφραση του γενώματος³²⁷.

Πειράματα σε κυτταρικές σειρές καρκινικών κυτάρων, MCF7 και HeLa, κατέδειξαν ότι, η υπερμεθυλίωση της περιοχής του υποκινητή του MEG3 ήταν ο υπεύθυνος επιγενετικός μηχανισμός για την απώλεια της έκφρασης του MEG3 και στη συνέχεια η κατεργασία με τον απομεθυλιωτικό παράγοντα 5-αζα-2-δεοξυκυτιδίνη, αποκαθιστούσε την έκφραση του MEG3 RNA³¹⁴. Ειδικά η υπερμεθυλίωση του MEG3, έχει μελετηθεί εκτενώς στα μη-λειτουργικά αδενώματα της υπόφυσης και θεωρείται ότι είναι ο παθογενετικός μηχανισμός της αποσιώπησης του MEG3³³¹. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι, στους βραδέως αναπτυσσόμενους όγκους, οι επιγενετικοί μηχανισμοί πιθανώς είναι κρισιμότεροι παθογενετικοί μηχανισμοί σε σχέση τις γενετικές βλάβες³¹⁵.

Τα τελευταία επτά έτη αναδείχθησαν ενδιαφέροντα στοιχεία της παθογένειας της ΧΛΛ και κυρίως της σύνδεσης της νόσου με τα miRNAs³³². Στη συχνότερη και ευνοϊκής πρόγνωσης, δομική χρωμοσωμική ανωμαλία της νόσου την έλλειψη του 13q14, φαίνεται ότι χάνεται η δράση των ογκοκατασταλτικών miRNA15α και miRNA16-1, που άμεσα στοχεύουν και καταστέλλουν την αντιαποπτωτική πρωτεΐνη BCL2 και έμμεσα ενεργοποιούν το ενδογενές αποπτωτικό πρόγραμμα του κυττάρου³³³. Οι περισσότεροι ασθενείς με ήπια, έρπουσα μορφή ΧΛΛ φέρουν τις ελλείψεις των miRNA15α/miRNA16-1 της 13q14 περιοχής και θεωρείται ότι η απώλεια των miRNA15α/miRNA16-1 είναι ένα από τα αρχικά παθογενετικά γεγονότα της ΧΛΛ³²¹.

Στην παρούσα διατριβή αναδείχθηκε ότι η υπερμεθυλίωση του MEG3 ογκοκατασταλτικού ncRNA συσχετίστηκε με ευνοϊκούς προγνωστικούς παράγοντες στη

ΧΛΛ. Σε πρώτη ανάγνωση το παραπάνω αποτέλεσμα είναι οξύμωρο και αντιφατικό. Πώς η επιγενετική καταστολή της έκφρασης ενός ογκοκατασταλτικού miRNA μπορεί να συνδέεται με ευνοϊκή πρόγνωση στη ΧΛΛ; Αρκετές υποθέσεις μπορεί να διατυπωθούν.

Είναι γνωστό ότι ένα miRNA συνδέει και καταστέλλει έως και 200 διαφορετικά mRNA⁸⁵. Κατά συνέπεια, η δράση ενός miRNA είναι δύσκολο να προβλεφθεί, είναι διαχεόμενη σε πολλά mRNA και πιθανώς εξαρτάται από παράγοντες δυσχερώς προσδιορίσιμους όπως η συγκέντρωσή του, η συγκέντρωση άλλων miRNA και των mRNA- στόχων, το ιστικό μικροπεριβάλλον και τον ιστολογικό τύπο της κακοήθειας¹⁹⁴. Υπάρχουν δεδομένα ότι το ίδιο miRNA μεταγράφεται με διαφορετικό ρυθμό και ρυθμίζει εκλεκτικά ποικίλα mRNA σε διάφορους ιστούς³³⁴. Κατά συνέπεια, τα πειραματικά δεδομένα της υπερμεθυλίωσης του MEG3 σε άλλους ιστούς και κακοήθειες δεν ισχύουν αναγκαστικά στη ΧΛΛ.

Υπάρχουν γονίδια που δρουν ως ογκοκατασταλτικά σε προκαρκινωματώδη στάδια ή πρωιμότερα βιολογικά στάδια καρκίνου αλλά στην συνέχεια κατά την κλωνική έκπτυξη και εκτροπή της κακοήθειας συμπεριφέρονται ως ογκοπροαγωγά (όπως ο TGFβ)³³⁵. Η μεταβολή της δράσης του γονιδίου οφείλεται σε επιπρόσθετες γενετικές βλάβες στο νεοπλασματικό κύτταρο που μεταβάλλουν την απόπτωση, τη διόρθωση των βλαβών DNA και τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου³³⁶. Επίσης, ευθύνονται μεταβολές της λειτουργίας του νεοπλασματικού μικροπεριβάλλοντος. Κατά συνέπεια, το MEG3 μπορεί να είναι αρχικά ογκοκατασταλτικό αλλά πιθανά να συμπεριφέρεται ως ογκοπροαγωγό κατά την κλωνική εξέλιξη της ΧΛΛ. Έτσι, η αποσιώπησή του μέσω μεθυλίωσης θα συνδέεται με ευνοϊκούς προγνωστικούς παράγοντες.

Αναφέρεται η ύπαρξη γονιδίων χωρίς ομοφωνία ως προς την ογκοκατασταλτική ή ογκοπροαγωγό δράση. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι το γονίδιο Kiss1, όπου υπάρχουν αντιφατικά βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με το εάν είναι γονίδιο κατασταλτικό ή προαγωγό των μεταστάσεων^{337,338}. Ανάλογη διχογνωμία υπάρχει και για το γονίδιο MET για το εάν καταστέλλει ή διεγείρει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό^{339,340}. Οι παραπάνω διαφορές μπορεί να ερμηνεύονται από διαφορετικές εργαστηριακές τεχνικές ή μελετώμενους στόχους (μελέτη πρωτεΐνης έναντι mRNA, εφαρμογή PCR έναντι ανοσοϊστοχημείας έναντι Western Blot), από διαφορετικές εργαστηριακές

συνθήκες (προτυποποίηση PCR, IHC, μάρτυρες) ή από χρήση διαφορετικών αντιδραστηρίων (αντισώματα διαφορετικής ειδικότητας σε IHC, PCR primers που αναγνωρίζουν διαφορετικά τμήματα γονιδίου). Επιπροσθέτως όμως οι ερμηνείες της έλλειψης ομοφωνίας δυνατόν να μην περιορίζονται σε μεθοδολογικές δυσκολίες αλλά να έχουν και αληθή βιολογική υφή. Διάκριτα ιστικά μικροπεριβάλλοντα, στάδια κακοήθειας και έκφραση άλλων αλληλεπιδρώντων γονιδίων πιθανολογείται ότι τροποποιεί την έκφραση και λειτουργικό ρόλο των γονιδίων όπως τα KiSS1, MEG3 για τα οποία υπάρχουν αντικρουόμενες αναφορές.

Η μελέτη της επιγενετικής αποσιώπησης του MEG3, που είναι μη-κωδικοποιόν γονίδιο, γίνεται για πρώτη φορά στη ΧΛΛ και η καταστολή της έκφρασής του συσχετίστηκε με ευνοϊκούς προγνωστικούς παράγοντες.

Διαφαίνεται ότι τα miRNAs ενέχονται στην έναρξη και στην πρόοδο της ΧΛΛ και στο μέλλον όταν διευρυνθούν οι γνώσεις μας για τον ακριβή ρόλο τους, θα μπορεί ν'αξιοποιηθούν στη διάγνωση, στον καθορισμό της πρόγνωσης και στη θεραπεία της νόσου.

9. ΣΥΝΟΨΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν οι κλινικοεργαστηριακές παραμέτροι 41 ασθενών με ΧΛΛ, κατά τη διάγνωση της νόσου. Μετά από διάμεσο χρόνο παρακολούθησης τους 61 μήνες, προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα :

- Η διάμεσος επιβίωση των 41 ασθενών ήταν 70 μήνες (5,8 έτη).
- Η ηλικία είχε στατιστικά σημαντική επίδραση στην επιβίωση ($p=0.049$).
- Το πρώιμο στάδιο Rai είχε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με καλύτερη επιβίωση ($p=0.014$).
- Η σταδιοποίηση κατά Binet είχε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με καλύτερη επιβίωση ($p=0.046$).
- Το χρονικό διάστημα από τη διάγνωση έως την έναρξη θεραπείας αποτελεί έμμεσο δείκτη της βιολογίας της νόσου. Η διάμεση επιβίωση των ασθενών με πρώιμη έναρξη θεραπείας ήταν 59 μήνες και των ασθενών με αψώτερη έναρξη ήταν 83 μήνες.
- Θετική ανοσοϊστοχημική έκφραση έκφραση ZAP-70, σε τομές οστεομυελικής βιοψίας, είχαν 21 ασθενείς (57%) και αρνητική 16 (43%).
- Η διάμεση επιβίωση των ασθενών Z-score >150 ήταν 80 μήνες και των ασθενών με Z-score ≤ 150 ήταν 90 μήνες.
- Οι ασθενείς άνω των 65 ετών έχουν θετική ανοσοϊστοχημική έκφραση ZAP-70 σε ποσοστό 73%, ενώ οι ασθενείς κάτω των 65 εκφράζουν τη ZAP-70 πρωτεΐνη σε ποσοστό 33%.
- Η προχωρημένη ηλικία συσχετίζεται θετικά με την έκφραση ZAP-70 πρωτεΐνης ($p=0.017$).
- Η έκφραση ZAP-70 πρωτεΐνης συσχετίζεται θετικά με την ανάγκη χορήγησης θεραπείας ($p=0.002$).
- Η έκφραση ZAP-70 πρωτεΐνης συσχετίζεται με την πρώιμη έναρξη θεραπείας ($p=0.012$).
- Μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου VHL ανιχνεύθηκε σε 7 δείγματα γενωμικού DNA απομονωθέν από ορό ασθενών με ΧΛΛ (7 από 38), ποσοστό 18%.

- Μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου VHL παρατηρήθηκε σε 12 από τα 37 δείγματα γενωμικού DNA απομονωθέν από τομές παραφίνης οστεομυελικής βιοψίας ασθενών με ΧΛΛ, ποσοστό 32%.
- Η διάμεση επιβίωση των ασθενών με μεθυλιωμένο τον υποκινητή του γονιδίου VHL στο γενωμικό DNA του ορού ήταν 67 μήνες και των ασθενών με απουσία μεθυλίωσης 80 μήνες.
- Η απουσία μεθυλίωσης του VHL σε όλους τους τύπους των δειγμάτων του γενωμικού DNA κάθε ασθενούς, παρουσίασε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τα επίπεδα της LDH ($p=0.02$) και τα στάδια Rai της νόσου ($p=0.036$).
- Το 24% των ασθενών που είχε μεθυλιωμένο VHL σε τουλάχιστον ένα δείγμα DNA, εμφάνιζε αυξημένα επίπεδα LDH, και κατ'επέκταση αυξημένο φορτίο νόσου.
- Η παρουσία μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου VHL σε τουλάχιστον ένα δείγμα DNA, συσχετίσθηκε με προχωρημένο στάδιο Rai νόσου.
- Ανιχνεύθηκε υπερμεθυλίωση της DMR περιοχής του υποκινητή του γονιδίου MEG3 σε 8 δείγματα γενωμικού DNA απομονωθέντα από ορό ασθενών με ΧΛΛ (8 από 38) ποσοστό 21%.
- Ανιχνεύθηκε υπερμεθυλίωση της DMR περιοχής του υποκινητή του γονιδίου MEG3 σε 13 από τα 37 δείγματα γενωμικού DNA που απομονώθηκε από τομές οστεομυελικής βιοψίας ασθενών με ΧΛΛ, ποσοστό 35%.
- Στους ασθενείς με ΧΛΛ που εμφάνισαν φυσιολογικό πρότυπο μεθυλίωσης στο γενωμικό DNA του ορού η θνητότητα ήταν 47%, ενώ στους ασθενείς με παθολογικό πρότυπο και υπερμεθυλιωμένο το MEG3 στο γενωμικό DNA ορού ήταν 25%.
- Η παρουσία υπερμεθυλίωσης του γονιδίου MEG3 στο γενωμικό DNA ορού ασθενών με ΧΛΛ, συσχετίζεται με πρώιμο στάδιο νόσου κατά Rai ($p=0.022$).
- Η παρουσία υπερμεθυλίωσης του γονιδίου MEG3 στο γενωμικό DNA ορού ασθενών με ΧΛΛ, συσχετίζεται με το οζώδες ή το διάμεσο πρότυπο διήθησης του μυελού των οστών από τη νόσο ($p=0.022$).

- Η παρουσία υπερμεθυλίωσης του γονιδίου MEG3 στο γενωμικό DNA ορού ασθενών με ΧΛΛ, συσχετίζεται με όψιμη έναρξη θεραπείας ($p=0.026$).

10. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Η παρουσία Z-score μεγαλύτερου του 150, σχετίζεται με δυσμενή έκβαση των ασθενών κατά στατιστικά σημαντικό τρόπο ($p=0.05$).
- Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης της ZAP-70 πρωτεΐνης με το Z-score, πρόσφερε ένα ευαίσθητο δείκτη με στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την επιβίωση.
- Η ZAP-70 πρωτεΐνη είναι ισχυρός προβλεπτικός παράγοντας για την αναγκαιότητα έναρξης θεραπείας και μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατά τη διάγνωση για να αναγνωρίσει τους ασθενείς που βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο για ταχεία πρόοδο της νόσου.
- Ο ανοσοϊστοχημικός προσδιορισμός της ZAP-70 πρωτεΐνης σε τομές οστεομυελικής βιοψίας, με τα διαθέσιμα μονοκλωνικά αντισώματα, είναι τεχνική απλή, αξιόπιστη, με ικανοποιητική ευαισθησία και ειδικότητα.
- Η επιγενετική αποσιώπηση του γονιδίου VHL μέσω μεθυλίωσης του υποκινητή του, μελετήθηκε πρώτη φορά στη ΧΛΛ και συσχετίστηκε με δυσμενείς προγνωστικούς παράγοντες που φανερώνουν επιθετικότερη βιολογία νόσου.
- Το πρότυπο μεθυλίωσης της DMR του γονιδίου MEG3 μελετήθηκε για πρώτη φορά στη ΧΛΛ και η υπερμεθυλίωση του γονιδίου MEG3 στο γενωμικό DNA ορού ασθενών με ΧΛΛ, συσχετίστηκε με ευνοϊκούς προγνωστικούς παράγοντες.
- Παρατηρήθηκε ότι η παρουσία μεθυλίωσης στο γενωμικό DNA του ορού ήταν ευαίσθητος και ισχυρός δείκτης σε συσχετίσεις.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Υπόβαθρο

Η Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (ΧΛΛ) είναι κακοήθης κλωνική αιματολογική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση μικρών, ώριμων στην εμφάνιση CD5+ λεμφοκυττάρων, στο αίμα, στο μυελό των οστών, στους λεμφαδένες, στο ήπαρ και στο σπλήνα. Αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η λεμφαδενοπάθεια, η οργανομεγαλία, οι κυτταροπενίες και η ανοσολογική δυσπραγία. Η ΧΛΛ είναι η συχνότερη λευχαιμία των ενηλίκων στο δυτικό ημισφαίριο. Μολονότι η νόσος αφορά κυρίως ηλικιωμένους, δεν πρέπει να παραβλέπεται το γεγονός ότι το 30% των προσβεβλημένων ασθενών έχει ηλικία κάτω των 55 ετών. Η πρόγνωση της νόσου είναι εξαιρετικά ετερογενής, με διάμεση επιβίωση που κυμαίνεται από λίγους μήνες ως δεκαετίες. Τα κλινικοπαθολογικά συστήματα ταξινόμησης προβλέπουν τη βιολογική συμπεριφορά της νόσου μόνο μερικώς. Οι προγνωστικοί παράγοντες περιλαμβάνουν κυρίως την παρουσία κυτταρογενετικών ανωμαλιών, την παρουσία ή μη σωματικών μεταλλάξεων στη μεταβλητή περιοχή του γονιδίου της βαρειάς αλυσού των ανοσοσφαιρινών IgVH, την έκφραση της ZAP-70 πρωτεΐνης από τα κλωνικά B-λεμφοκύτταρα και πληθώρα άλλων παραγόντων.

Στην παρούσα διατριβή επιχειρείται η μελέτη της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της ZAP-70 πρωτεΐνης και η μελέτη μοριακών παραμέτρων όπως: η κατάσταση μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου VHL και το πρότυπο μεθυλίωσης της DMR ρυθμιστικής περιοχής που περιλαμβάνει τον υποκινητή του γονιδίου DLK1/MEG3, που είναι γονίδιο υποκείμενο στο μηχανισμό της γονιδιωματικής αποτύπωσης. Ερευνήθηκε εάν οι παραπάνω παράμετροι είναι δυνητικά προγνωστικοί παράγοντες της νόσου και μελετήθηκαν οι στατιστικές τους συσχετίσεις με τα κλινικοεργαστηριακά χαρακτηριστικά της νόσου. Η ανίχνευση της μεθυλίωσης των υπό μελέτη γονιδίων έγινε σε γενωμικό DNA που απομονώθηκε από ορό και από τομές οστεομυελικής βιοψίας. Ο ορός επιλέχθηκε γιατί συνδυάζει απλή και εύκολη λήψη και γιατί σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα είναι πολύτιμη πηγή ελεύθερου νεοπλασματικού DNA.

Μέθοδοι

Γενωμικό DNA απομονώθηκε από δείγματα ορού και δείγματα οστεομυελικής βιοψίας από 41 ασθενείς με ΧΛΛ. Για την απομόνωση γενωμικού DNA από δείγματα ορών, χρησιμοποιήθηκε το QIAamp DNA mini kit (Qiagen) και στην απομόνωση του γενωμικού DNA από βιοψίες μυελού των οστών σε τομές παραφίνης, χρησιμοποιήθηκε η ίδια μέθοδος με ορισμένες τροποποιήσεις. Η μελέτη της μεθυλίωσης των υποκνηιτών των υπό μελέτη γονιδίων (VHL και MEG3) έγινε με την τεχνική της ειδικής της μεθυλίωσης αντίδρασης PCR (Methylation-specific PCR - MSP). Αρχικά το DNA υπέστη χημική κατεργασία με NaHSO_3 , χρησιμοποιήθηκε το EZ DNA Methylation™ kit (Zymo Research, USA). Για την αντίδραση MSP χρησιμοποιήθηκε το HotStarTaq Master Mix kit της Qiagen. Η PCR αντίδραση έλαβε χώρα σε τελικό όγκο 25μl, που περιείχε: HotStarTaq Master Mix (τελική συγκέντρωση 1X PCR buffer, 2.5 μονάδες HotStarTaq DNA πολυμεράση, 200Mm καθενός dNTP και 1.5mM MgCl_2), 0.4μM των κατάλληλων εκκινητών και 30ng χημικά τροποποιημένου DNA. Για κάθε αντίδραση PCR παράλληλα με τα υπό μελέτη δείγματα εξετάζονταν και ένα δείγμα χωρίς DNA που λειτουργούσε ως τυφλό και ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ολικά μεθυλιωμένο DNA, που διατίθεται στο εμπόριο. Η παρουσία των προϊόντων της PCR αντίδρασης ανιχνεύθηκε με οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης 2,5%.

Η ανοσοϊστοχημική μελέτη των οστεομυελικών βιοψιών έγινε με την κλασσική τεχνική στρεπταβιδίνης-βιοτίνης. Το μονοκλωνικό αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της κυτταροπλασματικής έκφρασης του ZAP-70 ήταν το 2F3.2 mouse (Cell Marque). Επίσης, ελέγχθηκε η ανοσοϊστοχημική έκφραση των CD3, CD20, CD5 και CD23.

Λόγω του μικρού μεγέθους του δείγματος των ασθενών (41), ο έλεγχος για την ύπαρξη συσχετίσεων μεταξύ παραμέτρων έγινε τόσο με τη μέθοδο Pearson όσο και με τη μέθοδο Spearman. Η περιγραφική μελέτη των μεταβολών μιας μελετούμενης παραμέτρου σε συνάρτηση με άλλη παράμετρο έγινε με την κατασκευή πινάκων συνάφειας και με την εφαρμογή του Chi-square test (χ^2). Ο προσδιορισμός της ολικής επιβίωσης έγινε από την ημερομηνία διάγνωσης ως τον θάνατο ή την τελευταία επίσκεψη του ασθενούς με τη μέθοδο Kaplan-Meier.

Χαρακτηριστικά ασθενών

Μελετήθηκαν 41 ασθενείς με ΧΛΛ, 36 άνδρες και 5 γυναίκες, με διάμεση ηλικία τα 70 έτη. Όλα τα δείγματα των ασθενών ορός, οστεομυελική βιοψία ή και βιοψία λεμφαδένος, ελήφθησαν κατά τη διάγνωση της νόσου. Συλλέχθηκαν 38 δείγματα ορών, 37 δείγματα οστεομυελικής βιοψίας και 5 δείγματα βιοψίας λεμφαδένος. Το 61% των ασθενών έλαβαν θεραπεία μέχρι την ολοκλήρωση της παρακολούθησης. Σύμφωνα με την κατά Rai σταδιοποίηση, 21 ασθενείς (51%) ανήκαν στην κατηγορία χαμηλού, 15 (37%) στην κατηγορία ενδιάμεσου και 5 (12%) στην κατηγορία υψηλού κινδύνου. Παρόμοια ήταν και η κατάταξη κατά Binet, 23 ασθενείς (56%) ήταν σε στάδιο A, 13 (32%) σε στάδιο B και 5 (12%) σε στάδιο C. 12% των ασθενών παρουσίαζε αυξημένες τιμές LDH και β_2 μικροσφαιρίνης ορού. Το 49% των ασθενών εξέφραζαν στα κλωνικά B-λεμφοκύτταρα το επιφανειακό αντιγόνο CD38, 51% εμφάνιζαν υπογαμμασφαιριναιμία και 32% παρουσίαζε διάχυτο πρότυπο διήθησης του μυελού των οστών από τα λευχαιμικά B-λεμφοκύτταρα.

Αποτελέσματα

Με διάμεσο χρόνο παρακολούθησης τους 61 μήνες, η ετήσια, 2ετής, 3ετής και 5ετής επιβίωση ήταν 97%, 90%, 80% και 64% αντίστοιχα. Στατιστικά σημαντική επίδραση στην επιβίωση είχαν: η ηλικία ($p=0.049$), το Rai στάδιο νόσου ($p=0.014$), το Binet στάδιο νόσου ($p=0.046$), η αυξημένη τιμή β_2 μικροσφαιρίνης ($p=0.003$) και το χρονικό διάστημα από τη διάγνωση έως την έναρξη θεραπείας ($p=0.023$).

Θετική ανοσοϊστοχημική έκφραση έκφραση ZAP-70, σε τομές οστεομυελικής βιοψίας, είχαν 21 ασθενείς (57%) και αρνητική 16 (43%). Οι παράμετροι του ποσοστού των θετικών κυττάρων και της έντασης της θετικότητας συνδυάστηκαν σε ημιποσοτικό σύστημα βαθμολόγησης, το Z-score με διακύμανση από 0-300. Η παρουσία Z-score μεγαλύτερου του 150, επιδρά δυσμενώς στην επιβίωση ($p=0.005$). Οι ασθενείς άνω των 65 ετών έχουν θετική ανοσοϊστοχημική έκφραση ZAP-70 σε ποσοστό 73%, ενώ οι ασθενείς κάτω των 65 εκφράζουν τη ZAP-70 πρωτεΐνη σε ποσοστό 33%. Η προχωρημένη ηλικία συσχετίζεται θετικά με την έκφραση ZAP-70 πρωτεΐνης ($p=0.017$).

Επίσης η έκφραση ZAP-70 πρωτεΐνης συσχετίστηκε θετικά με την ανάγκη χορήγησης θεραπείας ($p=0.002$) και με την πρώιμη έναρξη θεραπείας ($p=0.012$).

Μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου VHL ανιχνεύθηκε σε 7 δείγματα γενωμικού DNA απομονωθέν από ορό ασθενών με ΧΛΛ (7 από 38), ποσοστό 18%. Μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου VHL παρατηρήθηκε σε 12 από τα 37 δείγματα γενωμικού DNA απομονωθέν από τομές παραφίνης οστεομυελικής βιοψίας ασθενών με ΧΛΛ, ποσοστό 32%. Υπενθυμίζεται ότι όταν ο υποκινητής του γονιδίου VHL ήταν μεθυλιωμένος το προϊόν της MSP αντίδρασης ήταν μεγέθους 158bp, και στην περίπτωση που ο υποκινητής του γονιδίου VHL δεν ήταν μεθυλιωμένος το προϊόν είχε μέγεθος 165bp. Η διάμεση επιβίωση των ασθενών με μεθυλιωμένο τον υποκινητή του γονιδίου VHL στο γενωμικό DNA του ορού ήταν 67 μήνες και των ασθενών με απουσία μεθυλίωσης 80 μήνες. Η απουσία μεθυλίωσης του VHL σε όλους τους τύπους των δειγμάτων του γενωμικού DNA κάθε ασθενούς, παρουσίασε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τα επίπεδα της LDH ($p=0.02$) και τα στάδια Rai της νόσου ($p=0.036$). Το 24% των ασθενών που είχε μεθυλιωμένο VHL σε τουλάχιστον ένα δείγμα DNA, εμφάνιζε αυξημένα επίπεδα LDH, και κατ'επέκταση αυξημένο φορτίο νόσου. Επίσης η παρουσία μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου VHL σε τουλάχιστον ένα δείγμα DNA, συσχετίστηκε με προχωρημένο στάδιο Rai νόσου.

Παθολογικό πρότυπο μεθυλίωσης της ρυθμιστικής DMR περιοχής που περιλαμβάνει τον υποκινητή του γονιδίου MEG3, ανιχνεύθηκε σε 8 δείγματα γενωμικού DNA απομονωθέντα από ορό ασθενών με ΧΛΛ (8 από 38), ποσοστό 21% και σε 13 από τα 37 δείγματα γενωμικού DNA που απομονώθηκε από τομές οστεομυελικής βιοψίας ασθενών με ΧΛΛ, ποσοστό 35%. Υπενθυμίζεται ότι το φυσιολογικό πρότυπο μεθυλίωσης της DMR του MEG3 συνίσταται από παρουσία δύο ταινιών (αλληλίων), μία αντιστοιχεί στο μεθυλιωμένο πατρικό αλληλίο (μέγεθος 160bp) και μία αντιστοιχεί στο αμεθυλίωτο μητρικό αλληλίο (μέγεθος 120bp), και αυτό γιατί το MEG3 υπόκειται στο μηχανισμό της γονιδιωματικής αποτύπωσης και εκφράζεται πάντα το μητρικό αλληλίο. Στα παθολογικώς υπερμεθυλιωμένα δείγματα ανιχνεύεται μόνο η μεθυλιωμένη DMR του πατρικού (μεθυλιωμένου) αλληλίου (μέγεθος 160bp), ενώ το αμεθυλίωτο μητρικό αλληλίο δεν ανιχνεύεται γιατί έχει παθολογικώς μεθυλιωθεί. Στους ασθενείς με ΧΛΛ που

εμφάνισαν φυσιολογικό πρότυπο μεθυλίωσης στο γενωμικό DNA του ορού η θνητότητα ήταν 47%, ενώ στους ασθενείς με παθολογικό πρότυπο και με μεθυλιωμένο το MEG3 στο γενωμικό DNA ορού ήταν 25%. Η παρουσία υπερμεθυλίωσης του γονιδίου MEG3 στο γενωμικό DNA ορού ασθενών με ΧΛΛ, συσχετίζεται με ευνοϊκούς παράγοντες, και ειδικά με πρώιμο στάδιο νόσου κατά Rai ($p=0.022$), το οζώδες ή το διάμεσο πρότυπο διήθησης του μυελού των οστών από τη νόσο ($p=0.022$), και με όψιμη έναρξη θεραπείας ($p=0.026$).

Συζήτηση

Η ZAP-70 πρωτεΐνη είναι ισχυρός προβλεπτικός παράγοντας για την αναγκαιότητα έναρξης θεραπείας και μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατά τη διάγνωση για ν'αναγνωρίσει τους ασθενείς που βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο για ταχεία πρόοδο της νόσου. Ο ανοσοϊστοχημικός προσδιορισμός της ZAP-70 πρωτεΐνης σε τομές οστεομυελικής βιοψίας, με τα διαθέσιμα μονοκλωνικά αντισώματα, είναι τεχνική απλή, αξιόπιστη, με ικανοποιητική ευαισθησία και ειδικότητα. Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης της ZAP-70 πρωτεΐνης με το Z-score, πρόσφερε ένα ευαίσθητο δείκτη με στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την επιβίωση.

Η επιγενετική αποσιώπηση του γονιδίου VHL μέσω μεθυλίωσης του υποκινητή του, μελετήθηκε πρώτη φορά στη ΧΛΛ και συσχετίστηκε με δυσμενείς προγνωστικούς παράγοντες που φανερώνουν επιθετικότερη βιολογία νόσου.

Το πρότυπο μεθυλίωσης της DMR του γονιδίου MEG3 μελετήθηκε για πρώτη φορά στη ΧΛΛ και η υπερμεθυλίωση του γονιδίου MEG3 στο γενωμικό DNA ορού ασθενών με ΧΛΛ, συσχετίστηκε με ευνοϊκούς προγνωστικούς παράγοντες.

Το απομονωθέν DNA από τον ορό πιθανά αντικατροπτίζει το DNA που απελευθερώνεται από ασταθή, ταχύτερα πολλαπλασιαζόμενο, επιθετικό ΧΛΛ κλώνο που μπορεί να αντιπροσωπεύεται σε χαμηλό βαθμό στον μυελό των οστών. Παρατηρήθηκε ότι η παρουσία μεθυλίωσης στο γενωμικό DNA του ορού ήταν ευαίσθητος και ισχυρός δείκτης σε συσχετίσεις.

Συμπεράσματα

1. Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης της ZAP-70 πρωτεΐνης με το Z-score, πρόσφερε ένα ευαίσθητο δείκτη με στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την επιβίωση.
2. Η επιγενετική αποσιώπηση του γονιδίου VHL μέσω μεθυλίωσης του υποκινητή του συσχετίστηκε με δυσμενείς προγνωστικούς παράγοντες που φανερώνουν επιθετικότερη βιολογία νόσου.
3. Η υπερμεθυλίωση του γονιδίου MEG3 στο γενωμικό DNA ορού ασθενών με ΧΛΛ, συσχετίστηκε με ευνοϊκούς προγνωστικούς παράγοντες.
4. Παρατηρήθηκε ότι η παρουσία μεθυλίωσης στο γενωμικό DNA του ορού ήταν ευαίσθητος και ισχυρός δείκτης σε συσχετίσεις.

Immunophenotypic and cytogenetic study in Chronic Lymphocytic Leukemia. Contribution to disease prognosis.

Amalia Vassou

ABSTRACT

Background. Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) is a malignant clonal hematological disorder characterised by the accumulation of small mature CD5 expressing lymphocytes in bone marrow, blood, lymph nodes, liver and spleen. The disorder results in lymphadenopathy, organomegaly, cytopenias and immune dysfunction and is the most common leukemia affecting adults in the Western hemisphere. Although patients are mostly elderly, almost 30% are aged less than 55 years. Prognosis is quite variable with median survival ranging from a few months to several decades. The clinicopathologic classification systems can only partially predict the biology of CLL cases, the most validated prognostic factors being the presence of cytogenetic abnormalities, somatic mutations of genes encoding for the immunoglobulin heavy chain variable region (IgVH), the expression of ZAP-70 protein in clonal B-lymphocytes and others.

In the present research work we sought to study the immunohistochemical expression of ZAP-70 protein and molecular aberrations such as the methylation status of the Von Hippel Lindau (VHL) gene promoter and the methylation pattern of the DMR region encompassing the DLK1/MEG3 gene promoter. The latter gene is subject to an imprinted gene regulation pattern. The normal methylation pattern of MEG3 gene consists of 2 bands, one corresponding to the methylated paternal allele with a 160bp PCR product and an unmethylated maternal allele with a 120bp PCR product. We also investigated if the aforementioned parameters are of prognostic significance for patient outcome and whether they are correlated to clinical, pathologic and laboratory characteristics of the disease in a statistically significant way. The detection of methylation status of genes under study was performed in genomic DNA isolated from serum and bone marrow biopsy specimens.

Methods. Genomic DNA was isolated from serum specimens and bone marrow biopsies from 41 CLL patients. The QIAamp DNA mini kit (Qiagen) was used for the extraction of DNA from both serum and formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) bone marrow biopsies, with some modifications. The study of methylation status of gene promoters (VHL και MEG3) was done with the Methylation-specific Polymerase Chain Reaction (MSP) technique. Initially, DNA was chemically processed with NaHSO₃ using the EZ DNA Methylation™ kit (Zymo Research, USA), while for the MSP reaction the HotStarTaq Master Mix kit from Qiagen was used. The Polymerase Chain Reaction (PCR) took place in a final volume of 25µl that contained: HotStarTaq Master Mix (final concentration 1X PCR buffer, 2.5 units HotStarTaq DNA polymerase, 200mM dNTP και 1.5mM MgCl₂), 0.4µM of specific primers and 30ng of chemically modified DNA. In each PCR reaction a specimen not containing DNA and a commercially available specimen containing totally methylated DNA served as blind negative and positive controls, respectively. The presence of PCR products was detected by means of horizontal electrophoresis in 2,5% agarose gel.

The immunohistochemical study of bone marrow biopsy sections was done according to the classical streptavidine-avidine-biotin technique. The monoclonal antibody used for study of cytoplasmic ZAP-70 expression was the mouse clone 2F3.2 (Cell Marque). Moreover, we studied the immunohistochemical expression of CD3, CD20, CD5 and CD23.

Due to the small sample size, the statistical analysis of correlations between molecular and clinicopathologic parameters was performed by means of Pearson parametric and Spearman non-parametric techniques. Descriptive studies of parameter correlations were undertaken by constructing contingency tables and application of the Chi-square test (χ^2). Overall survival analyses were computed from the date of diagnosis to date of death or last follow-up with the Kaplan-Meier product limit method.

Patient Characteristics. Forty-one CLL patients (36 males, 5 females) with a median age of 70 years were accrued in the study protocol, with all serum and bone marrow biopsy specimens being collected at the time of diagnosis. We managed to

collect 38 serum, 37 bone marrow biopsy and 5 lymph node biopsy samples. 61% of patients received therapy until completion of study follow-up. According to Rai staging, 21 (51%) patients belonged in the low risk category, 15 (37%) in the intermediate risk and 5 (12%) in the high risk category, while 23 (56%) belonged to Binet stage A, 13 (32%) to stage B and 5 (12%) to stage C. Abnormally elevated LDH and β_2 microglobulin serum levels were seen in 12% of patients, 49% of them expressed CD38 in peripheral blood lymphocytes while 51% had hypogammaglobulinemia and 32% were affected by CLL diffusely infiltrating the bone marrow.

Results. At a median follow up time of 61 months, patient survival rates at 1, 2, 3 and 5 years were 97%, 90%, 80% and 64% respectively. Patient age ($p=0.049$), disease stage ($p=0.014$), abnormal serum β_2 microglobulin ($p=0.003$) and time interval from diagnosis to therapy ($p=0.023$) were parameters with statistically significant impact on patient survival. A positive immunohistochemical bone marrow expression of ZAP-70 was seen in 21 patients (57%). The percentage of ZAP-70 expressing cells and intensity of cytoplasmic staining were combined in the semiquantitative grading scale, the Z-score (potential range 0-300). The presence of $Z\text{-score} > 150$ was associated with poor patient survival ($p=0.005$), constituting a sensitive and reliable prognosticator. Patients older than 65 years had ZAP-70 expressing tumours in 73% of cases, in contrast to 33% of those younger than 65 years. ZAP-70 protein tumoural expression was significantly correlated to advanced age ($p=0.017$), need for therapy ($p=0.002$) and early therapy initiation ($p=0.012$).

VHL gene promoter methylation was found in genomic DNA isolated from serum of 7/38 patients (18%) and in genomic DNA isolated from FFPE bone marrow specimens in 12/37 patients (32%). The median survival of patients with VHL gene promoter methylation in serum was 67 months while that of patients without VHL methylation 80 months ($p=NS$). The absence of VHL gene promoter methylation in both serum and bone marrow-derived genomic DNA was significantly associated with normal serum LDH levels ($p=0.02$) and early disease Rai stage ($p=0.036$).

An abnormal methylation pattern of MEG3 gene promoter in the DMR region (identification only one band corresponding to the methylated paternal allele 160bp PCR product) was found in serum-derived genomic DNA from 8/38 CLL patients (21%) and in bone marrow-derived genomic DNA from 13/37 patients (35%). CLL patients with normal methylation pattern of MEG3 gene promoter in the serum had a mortality rate of 47%, in contrast to those with an abnormal MEG3 gene promoter serum methylation pattern who had a mortality rate of only 25% ($p=NS$). The presence of MEG3 promoter hypermethylation in the serum of CLL patients was significantly correlated to favourable prognostic factors such as early Rai stage of disease ($p=0.022$), nodular or mixed bone marrow infiltration pattern ($p=0.022$) and no need for early therapy ($p=0.026$).

Conclusions. ZAP-70 tumoural protein expression is a powerful prognosticator predicting for need to start antineoplastic therapy early, being able to identify those patients who harbour CLL with aggressive biology and are at risk for rapid disease progression. The epigenetic silencing of the VHL tumour-suppressor gene via promoter methylation was studied for the first time in CLL and was found to be significantly associated with unfavourable prognostic factors, hinting for its implication in aggressive disease biology. Moreover, the methylation pattern of the DMR region of the MEG3 gene was studied for the first time and its hypermethylation in serum-derived genomic DNA was unexpectedly correlated to favourable prognostic factors in a statistically significant way. Isolated serum DNA probably mostly consists of tumoural DNA released from genetically unstable, aggressive and proliferative CLL clones that contribute to bone marrow-derived DNA to a lesser extent, in view of the abundance of other cellular populations present there.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής ανακοινώθηκαν στο 14^ο Πανευρωπαϊκό Συνέδριο Αιματολογίας τον Ιούνιο 2009 με τις κάτωθι ανακοινώσεις:

IMMUNOHISTOCHEMICAL DETERMINATION OF ZAP-70 PROTEIN IN BONE MARROW BIOPSIES IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA (CLL) PATIENTS

A.Vassou¹, N.Simou², E.Hatzimichael¹, D.Bogdanos¹, K.Zaharopoulou¹, M.Efthimiou¹, M.Bai², K.Bourantas¹

Haematology Department¹, Departement of Pathology², University Hospital of Ioannina, Ioannina, Greece

EPIGENETIC ALTERATION IN DLK1/MEG3 IMPRINTING GENES IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA (CLL)

A.Vassou, A.Dasoula, L.Benetatos, E.Hatzimichael, L.Kefala, K.Zaharopoulou, K.Bourantas

Haematology Department, University Hospital of Ioannina , Ioannina, Greece

METHYLATION OF VON HIPPEL-LINDAU GENE IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA (CLL)

A.Vassou, E.Hatzimichael, A.Dasoula, L.Benetatos, K.Zaharopoulou, L.Kefala, K.Bourantas

Haematology Department, University Hospital of Ioannina, Ioannina, Greece

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia and related diseases. Williams Hematology 7th ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2006. p.1343
2. Patel DV, Rai KR. Chronic lymphocytic leukemia. Hematology Basic Principles and Practice 4th ed. Philadelphia: Elsevier;2005. p.1437
3. Hamblin T. Historical aspects of of chronic lymphocytic leukemia. Br J Haematol 2000; 111(4):1023-34.
4. Minot GR, Isaacs R. Lymphatic leukemia: age incidence, duration and benefit derived from irradiation. Boston Med Surg Jour 1924;191:1-10
5. Galton DAG. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. Canadian Medical Association Journal 1966;94:1005-1010.
6. Dameshek W. Chronic lymphocytic leukemia: an accumulative disease of immunologically incompetent lymphocytes. Blood 1967;24:566-584.
7. Hamblin T. Is Chronic lymphocytic leukemia one disease? Hematologica 2002;87(12):1235-1238.
8. Zenz T, Mertens D, Küppers R, Döhner H, Stilgenbauer S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukemia. Nature Reviews Cancer 2009;10:37-50.
9. Jermal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics. CA Cancer J Clin 2008;58(2):71-96.
10. Yanagihara ET, Blaisdell RK, Hayashi T, Lukes RJ. Malignant lymphoma in Hawai-Japanese: A retrospective morphology survey. Hematol Oncol 1989;7(3):219-233.
11. Tamura K, Sawada H, Izumi Y, Fukuda T et al. Chronic lymphocytic leukemia is rare, but the proportion of T-CLL is high in Japan. Eur J Haematol 2001;67(3):152-157.
12. Dighiero G, Hamblin TJ. Chronic lymphocytic leukemia. Lancet 2008;371(9617): 1017-1029.

13. Hamblin TJ. Just exactly how common is CLL? *Leuk Res* 2009;33(11):1452-1453.
14. Cartwright RA, Gurney KA, Moorman AV. Sex ratios and the risks of hematological malignancies. *Br J Haematol* 2002; 118(4):1071-1077.
15. Zwiebel JA, Cheson BD. Chronic lymphocytic leukemia: Staging and Prognostic Factors. *Seminars in Oncology* 1998; 25(1):42-59.
16. Marwick C. News Round-up: Link found between Agent Orange and chronic lymphocytic leukemia. *Br Med J* 2003; 326(7383):242.
17. Waterhouse D, Carman WJ, Schottenfeld D, Gridley G et al. Cancer incidence in the rural community of Tecumseh, Michigan: A pattern of increased lymphopoietic neoplasms. *Cancer* 1996;77(4):763-770.
18. Floderus B, Persson T, Stenlund C, Wennberg A et al. Occupational exposure to electromagnetic fields in relation to leukemia and brain tumors: A case-control study in Sweden. *Cancer Causes Control* 1993;4(5):465-476.
19. Catovsky D. Definition and diagnosis of sporadic and familiar chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin N Am* 2004;18(4):783-794.
20. Houlston RS, Sellick G, Yullie M, Matutes E, Catovsky D. Causation of chronic lymphocytic leukemia: insights from familiar disease. *Leuk Res* 2003;27:871-876.
21. Cuttner J. Increased incidence of hematologic malignancies in first-degree relatives of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Invest* 1992;10(2):103-109.
22. Rai K, Chiorazzi N. Determining the clinical course and outcome in chronic lymphocytic leukemia. *NEJM* 2003;348(18):1797-1799.
23. Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia and related diseases. *Williams Hematology* 7th ed. New York :McGraw-Hill Medical; 2006. p.1349
24. Cheson BD, Bennet JM, Rai KR, Grever MR, Kay NE, Schiffer CA et al. Guidelines for clinical protocols for CLL: recommendations of the NCI-sponsored working group. *Am J Hematol* 1988;29:152-163.

25. Cheson BD, Bennet JM, Grever MR, Kay NE, Keating MJ, O'Brien S et al. NCI-sponsored working group guidelines for CLL: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* 1996;87:4990-4997.
26. Bain BJ, Clark DM, Lampert IA, Wilkins BS. *Bone Marrow Pathology*. 3rd ed. Oxford Blackwell Science; 2001.p 241-244.
27. Müller-Hermelink HK, Catovsky D, Montserrat E, Harris NL. Chronic lymphocytic leukemia/Small lymphocytic lymphoma. In:Pathology and Genetics: Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Jaffe ES, Harris NL, Vardiman JW editors. World Health Organization classification of tumors. Lyon IARC Press;2001. p127-130.
28. Rosman C, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia. *NEJM* 1995;333(16):1052-1057.
29. Montserrat E, Villamor N, Reverter JC, BrugesRM et al. Bone marrow assessment in B-cell chronic lymphocytic leukemia: aspirate or biopsy? A comparative study in 258 patients. *Br J Haematol* 1996;93(1):111-116.
30. Pileri SA, Sabattini E, Agostinelli C, Bodega L, Rossi M, Zinzani L, Marafioti T. Histopathology of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin N Am* 2004;18(4):807-826.
31. C. Rozman, L. Hernandez-Nieto, E. Montserrat, R. Bruges. Prognostic Significance of Bone-Marrow Patterns in Chronic Lymphocytic Leukaemia. *Br J Haematol* 1981;47(4): 529-537.
32. Pangalis GA, Roussou PA, Kittas C, Kokkinou S, Fessas P. B-chronic lymphocytic leukemia. Prognostic implication of bone marrow histology in 120 patients experience from a single hematology unit. *Cancer* 1987;59(4): 767-771.
33. Pangalis GA, Roussou PA, Kittas C, Mitsoulis-Mentzikoff C, Matsouka-Alexandridis P, Anagnostopoulos N, Rombos I, Fessas P. Patterns of bone marrow involvement in chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic (well differentiated) non-hodgkin's lymphoma. Its clinical significance in relation to their differential diagnosis and prognosis. *Cancer* 1984;54(4):702-708.

34. Montserrat E, Marques-Pereira JP, Gallart MT, Rozman C. Bone marrow histopathologic patterns and immunologic findings in B-chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1984;54(3):447-451.
35. Brunning RD, McKenna. *Atlas of Tumor Pathology. Tumors of the Bone Marrow*. Armed forces Institute of Pathology. Rosai J editor. 1994. p261.
36. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, Hillmen P, Keating MJ, Montserrat E, Rai KR, Kipps TJ. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute–Working Group 1996 guidelines. *Blood* 2008; 111(12): 5446-5446.
37. Matutes E, Wotherspoon A, Catovsky D. Differential diagnosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 2007;20(3):367-384.
38. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Thomas PW, Stevenson FK, Oscier DG. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease *Blood* 2002;99(3): 1023-1029.
39. Matutes E, Owusu-Ankomah KA, Morrila R et al. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia* 1994;8(10):1640-1645.
40. Moreau EJ, Matutes E, A'Hern PR, Morrila AM, Morrila RM, Owusu-Ankomah KA et al. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody CD79b. *Am J Clin Pathol* 1997;108:378-382.
41. Delgano J, Matutes E, Morrila AM, Morrila RM, Owusu-Ankomah KA, Rafiq-Mohammed F, et al. Diagnostic significance of CD20 and FMC7 expression in B-cell disorders. *Am J Clin Pathol* 2003;120:754-759.

42. Matutes E, Polliack A. Morphological and immunophenotypic features of chronic lymphocytic leukaemia. *Reviews in Clinical and Experimental Hematology* 2000;4:22-47.
43. Johnston JB. CLL. In :Wintrobe's Clinical Hematology. 11th edition. Lippincott Williams& Wilkins 2004. Vol 2. p.2436-2437.
44. Patel DV, Rai KR. Chronic lymphocytic leukemia. *Hoffman's Hematology Basic Principles and Practice* 4th ed. Philadelphia: Elsevier;2005. p.1441.
45. Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia and related diseases. *Williams Hematology* 7th ed. New York :McGraw-Hill Medical; 2006. p.1348-1349.
46. Hamblin TJ. Non-hemic autoimmunity in CLL. *Leuk Res* 2009;33:366-367.
47. Borthakur G, O'Brien S, Wierda WG, Thomas DA, Cortes JE, Giles FJ, Kantarjian HM, Lerner S, Keating MJ. Immune anaemias in patients with chronic lymphocytic leukaemia treated with fludarabine, cyclophosphamide and rituximab – incidence and predictors. *Br J Haematol* 2007;136(6): 800-805.
48. Dearden C. Disease-specific complications of chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2008:450-456.
49. Hamblin AD, Hamblin TJ. The immunodeficiency of chronic lymphocytic leukemia. *Br Med Bull* 2008;87(1):49-62.
50. Elter T, Vehreschild JJ, Gribben J, Cornely OA, Engert A, Hallek M. Management of infections in patients with chronic lymphocytic leukemia treated with alemtuzumab. *Ann Hematol* 2009;88(2):121-132.
51. Rai KR, Wasil T, Iqbal U, Driscoll N, Patel D, Janson D, Mehrotra B. Clinical staging and prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin N Am* 2004;18(4):794-805.
52. Montserrat E. Classical and new prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia: Where to now? *The Hematology Journal* 2002;3(1):7-9.
53. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975;46(2):219-234.
54. Gribben JG. How I treat CLL up front. *Blood* 2010;115(2):187-197.

55. Muntañola A, Bosch F, Arguis P et al. Abdominal computed tomography predicts progression in patients with Rai stage 0 chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2007;25(12):1576-1580.
56. Rai KR. A critical analysis of staging in CLL. In:Gale RP,Rai KR. *CLL recent progress and future directions. UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology* 1987;59:253-264.
57. Binet JL, Auquier, G. Dighiero, C. Chastang, H. Piguet, J. Goasguen, G. Vaugier, G. Potron, P. Colona, F. Oberling, M. Thomas, G. Tchernia, C. Jacquillat, P. Boivin, C. Lesty, M. T. Duault, M. Monconduit, S. Belabbes, F. Gremy. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981;48(1):198-206.
58. Chronic lymphocytic leukemia: Recommendations for Diagnosis, Staging, and Response Criteria. International Workshop on Chronic lymphocytic leukemia. *Annals of Internal Medicine* 1989;110(3):236-238.
59. Shanafelt TD. Predicting clinical outcome in CLL: how and why. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009:421-429.
60. Eichhorst E, Goede V, Hallek M. Treatment of elderly patients with Chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma* 2009;50(2):171-178.
61. Abbot BL. Chronic lymphocytic leukemia: Recent advances in Diagnosis and Treatment. *The Oncologist* 2006;11:21-30.
62. Gribben JG. Molecular Profiling in CLL. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009:444-449.
63. Mauro FR, Foa R, Cerretti R, Giannarelli D, Coluzzi S, Mandelli F, Girelli G. Autoimmune hemolytic anemia in chronic lymphocytic leukemia: clinical, therapeutic, and prognostic features. *Blood* 2000;95(9): 2786-2792.
64. Guarini A, Gaidano G, Mauro FR, Capello D, Mancini F, De Propris MS, Mancini M, Orsini E, Gentile M, Breccia M, Cuneo A, Castoldi G, Foa R. Chronic lymphocytic leukemia patients with highly stable and indolent disease show distinctive phenotypic and genotypic features. *Blood* 2003 102(3): 1035-1041.

65. Boelens J, Lust S, Vanhoecke B, Offner F. Chronic lymphocytic leukaemia
Anticancer Res. 2009;29(2):605-15.
66. Hamblin TJ. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. Best Pract
Res Clin Haematol 2007;20(3):455-468.
67. Montserrat E, Gomis F, Vallespi T, Rios A, Romero A, Soler J, Alcalá A, Morey
M, Ferran C, Diaz-Mediavilla J. Presenting features and prognosis of chronic
lymphocytic leukemia in younger adults. Blood 1991;78(6): 1545-1551.
68. Mauro FR, Foa R. Young patients with chronic lymphocytic leukemia. In: Faguet
GB Contemporary Hematology: chronic lymphocytic leukemia-molecular
genetics, biology, diagnosis and management. Totowa NJ Humana Press
2004.p.401-413.
69. Cartwright RA, Gurney KA, Moorman AV. Sex ratios and the risks of
haematological malignancies. Br J Haematol 2002;118(4):1071-1077.
70. Catovsky D, Fooks J, Richards J. Prognostic factors in chronic lymphocytic
leukaemia: the importance of age, sex and response to treatment in survival : A
REPORT FROM THE MRC CLL 1 TRIAL. Br J Haematol 1989;72(2): 141-149.
71. Vinolas N, Reverter JC, Ubrano-Ispizua A, Montserrat E, Rozman C.
Lymphocyte doubling time in CLL: an update of its prognostic significance.
Blood Cells 1987;12:457-470.
72. Montserrat E, Vinolas N, Reverter JC, Rozman C. Natural history of CLL on the
progression and prognosis of early stages. Nouv Rev Fr Hematol 1988;30:359-
361.
73. Hamblin T. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. Leuk Lymphoma
2006;47(11):2261-2262.
74. Juliusson G, Merup M. Cytogenetics in chronic lymphocytic leukemia. Seminars
in Oncology 1998;25(1):19-26.
75. Bannerji R, Byrd JC. Update on biology of chronic lymphocytic leukemia.
Current Opinion in Oncology 2000;12:22-29.

76. Amiel A, Elis A, Sherker S, Gaber E, Manor Y, Fejgin MD. The influence of cytogenetic aberrations on gene replication in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2001;125:81-86.
77. Stilgenbauer S, Döhner H. CLL. Molecular genetics and its clinical relevance. *Hematol Oncol Clin N Am* 2004;18(4):827-848.
78. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, Döhner K, Bentz M, Lichter P. Genomic Aberrations and Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. *NEJM* 2000;343(26):1910-1916.
79. Kröber A, Seiler T, Benner A, Bullinger L, Brückle E, Lichter P, Döhner H, Stilgenbauer S. V_H mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;100(4): 1410-1416.
80. Starostic P, O'Brien S, Chuhg CY, Haidar M, Manshoury T, Kantarjian H, Freireich E, Keating M, Albitar M. The prognostic significance of 13q14 deletions in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 1999; 23(9): 777-854.
81. Hogan WJ, Tefferi A, Borell TJ. Prognostic relevance of monosomy at the 13q14 locus detected by fluorescence In situ hybridization in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1999;110:77-81.
82. Austen B, Powell JE, Alvi A, Edwards I, Hooper L, Starczynski J, Taylor AMR, Fegan C, Moss P, Stankovic T. Mutations in the *ATM* gene lead to impaired overall and treatment-free survival that is independent of *IGVH* mutation status in patients with B-CLL. *Blood* 2005;106(9): 3175-3182.
83. Kipps J. Chronic lymphocytic leukemia. *Current Opinion in Hematology* 2000;7(4):223-234.
84. Galin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldle H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes *miR15* and *miR16* at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(24):15524-15529

85. Wiemer E.A.C. The role of microRNAs in cancer: No small matter. *European Journal of Cancer* 2007;43:1529-1544.
86. Cimmino A, Galin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu SG, Kipps TG, Negrini M, Croce CM. *miR-15* and *miR-16* induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(39):13944-13949.
87. Caporaso N, Goldin L, Plass C, Calin G, Marti G, Bauer S, Raveche E, McMaster ML, Ng D, Landgren O, Slager S. Chronic lymphocytic leukaemia genetics overview. *Br J Hematol* 2007;139(5): 630-634.
88. Mertens D, Philippen A, Ruppel M, et al. Chronic lymphocytic leukemia and 13q14: miRs and more. *Leuk Lymphoma*. 2009; 50(3):502-505.
89. Döhner H, Stilgenbauer S, James MR, Benner A, Weilguni T, Bentz M, Fischer K, Hunstein W, Lichter P. 11q Deletions Identify a New Subset of B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Characterized by Extensive Nodal Involvement and Inferior Prognosis. *Blood*. 1997;89(7): 2516-2522.
90. Stankovic T, Stewart GS, Fegan C, Biggs P, Last J, Byrd PJ, Keenan RD, Moss PA, Taylor AM. Ataxia telangiectasia mutated-deficient B-cell chronic lymphocytic leukemia occurs in pregerminal center cells and results in defective damage response and unrepaired chromosome damage. *Blood*. 2002;99(1): 300-309.
91. Dewald GW, Brockman SR, Paternoster SF, Bone ND, O'Fallon JR, Allmer C, James CD, Jelinek DF, Tschumper RC, Hanson CA, Pruthi RK, Witzig TA, Call TG, Kay EN. Chromosome anomalies detected by interphase fluorescence *in situ* hybridization: correlation with significant biological features of B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Hematol* 2003;121(2):287-295.
92. Bullrich F, Rasio D, Kitada S, Starostic P, Kipps T, Keating M, Abitar M, Reed JC, Croce CM. ATM mutations in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Res*. 1999;59:24-27.

93. Neilson JR, Auer R, White D, Bienz N, Waters JJ, Whittaker JA, Milligan DW, Fegan CD. Deletions at 11q identify a subset of patients with typical CLL who show consistent disease progression and reduced survival. *Leukemia*. 1997;11(11):1929-1932.
94. Dreger P, Stilgenbauer S, Benner A, Ritgen M, Kröber A, Kneba M, Schmitz N, Döhner H. The prognostic impact of autologous stem cell transplantation in patients with chronic lymphocytic leukemia: a risk-matched analysis based on the V_H gene mutational status. *Blood*. 2004;103(7): 2850-2858.
95. Liso V, Capalbo S, Lapietra A, Pavone V, Guarini A, Specchia G. Evaluation of trisomy 12 by fluorescence in situ hybridization in peripheral blood, bone marrow and lymph nodes of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 1999;84(3):212-217.
96. Anastasi J, Le Beau MM, Vardiman JM, Fernald AA, Larson RA, Rowley JD. Detection of trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia by fluorescence in situ hybridization to interphase cells: a simple and sensitive method. *Blood* 1992;79(7): 1796-1801.
97. Losada AP, Wessman M, Tiainen M, Hopman AH, Willard HF, Sole F, Caballin MR, Woessner S, Knuutila S. Trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia: an interphase cytogenetic study. *Blood*. 1991;78(3): 775-779.
98. Matutes E, Oscier D, Garcia-Marco J, Ellis J, Copplestone A, Gillingham R, Hamblin T, Lens D, Swansbury GJ, Catovsky D. Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients. *Br J Hematol*. 1996;92(2):382-388.
99. Hamblin TJ. Trisomy 12 in CLL revisited. *Leuk Res* 1997;21:1025-1026.
100. Oscier DG, Gardiner AC, Mould SJ, Glide S, Davis ZA, Ibbotson RE, Corcoran MM, Chapman RM, Thomas PW, Copplestone AJ, Orchard JA, and Hamblin TJ. Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, *IGVH* gene mutational status, and loss or mutation of the *p53* gene are independent prognostic factors. *Blood* 2002; 100(4): 1177-1184.

101. Geisler CH, Philip P, Christensen E, Hou-Jensen K, Pedersen NT, Jensen OM, Thorling, E. Andersen, H. S. Birgens, A. Drivsholm, J. Ellegaard, Larsen JK, Plesner T, Brown P, Andersen KP, Hansen MM. In B-cell chronic lymphocytic leukaemia chromosome 17 abnormalities and not trisomy 12 are the single most important cytogenetic abnormalities for the prognosis: A cytogenetic and immunophenotypic study of 480 unselected newly diagnosed patients. *Leuk Res* 1997;21(11):1011-1023.
102. Döhner H, Fischer K, Bentz M, Hansen K, Benner A, Cabot G, Diehl D, Schlenk R, Coy J, Stilgenbauer S. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood*. 1995;85(6): 1580-1589.
103. Byrd JC, Smith L, Hackbarth MR, Flinn IW, Young D, Proffitt JH, Heerema NA. Interphase Cytogenetic Abnormalities in Chronic Lymphocytic Leukemia May Predict Response to Rituximab. *Cancer Res* 2003;63(1):36-38.
104. Rawstron AC, Kennedy B, Moreton P, Dickinson AJ, Cullen MJ, Richards SJ, Jack AS, Hillmen P. Early prediction of outcome and response to alemtuzumab therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2004;103(6): 2027-2031.
105. Cuneo A, Roberti MG, Bigoni R, Minotto C, Bardi A, Milani R, Tieghi A, Campioni D, Cavazzini F, De Angeli C, Negrini M, Castoldi G. Four novel non-random chromosome rearrangements in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: 6p24–25 and 12p12–13 translocations, 4q21 anomalies and monosomy 21. *Br J Hematol* 2000;108(3):559-564.
106. Cuneo A, Rigolin GM, Bigoni R, De Angeli C, Veronese A, Cavazzini F, Bardi A, Roberti MG, Tammiso E, Agostini P, Ciccone M, Porta MD, Tieghi A, Cavazzini L, Negrini M Castoldi G. Chronic lymphocytic leukemia with 6q- shows distinct hematological features and intermediate prognosis. *Leukemia*2004;18(3): 476-483.

107. Ghia P, Scielzo C, Frenquelli M, Muzio M, Caligaris-Cappio F. From normal to clonal B cells: Chronic lymphocytic leukemia (CLL) at the crossroad between neoplasia and autoimmunity. *Autoimmune Rev* 2007;7(2):127-131.
108. Oscier D. Biology and prognostic factors in CLL. *Hematology* 2005;10(Sup1):197-199.
109. Hablin T. Chronic lymphocytic leukemia: one disease or two? *Ann Hematol* 2002;81(6):299-303.
110. Dighiero G. Perspectives in Chronic lymphocytic leukemia biology and management. *Hematol Oncol Clin N Am* 2004;18(4):927-943.
111. Kröber A, Seiler T, Benner A, Bullinger L, Brückle E, Lichter P, Döhner H, Stilgenbauer S. V_H mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;100(4):1410-1416.
112. Maloum k, Davi F, Merle-Béral H, Pritsch O, Magnac C, Vuillier F, Dighiero G, Troussard X, Mauro FF, Bénichou J. Expression of unmutated V_H genes is a detrimental prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2000;96(1):377-379.
113. Vasconcelos Y, Davi F, Levy V, Oppezso P, Magnac C, Michel A, Yamamoto M, Pritsch O, Merle-Béral H, Maloum K, Ajchenbaum-Cymbalista F, Dighiero G. Binet's Staging System and V_H Genes Are Independent but Complementary Prognostic Indicators in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Clin Oncol* 2003;21(21):3928-3932.
114. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V_H Genes Are Associated With a More Aggressive Form of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* 1999;94(6): 1848-1854
115. Thunberg U, Johnson A, Roos G, Thörn I, Tobin G, Sällström J, Sundström C, Rosenquist R, Fais F, Ghiotto F, Damle R, Wasil T, Chiorazzi N, Zupo S, Ferrarini M. CD38 expression is a poor predictor for V_H gene mutational status and prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001;97(6): 1892- 1894.

116. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Thomas PW, Stevenson FK , Oscier DJ. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood* 2002;99(3): 1023-1029.
117. Lin K, Sherrington PD, Dennis M, Matrai Z, Cawley JC, Pettitt AR. Relationship between p53 dysfunction, CD38 expression, and *IgV_H* mutation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;100(4):1404-1409.
118. Predicting clinical outcome in CLL: how and why. *Hematology* 2009. Am Soc Hematol Educ Program 2009:421-429.
119. Guarini A, Gaidano G, Mauro FR, Capello D, Mancini F, De Propris MS, Mancini M, Orsini E, Gentile M, Breccia M, Cuneo A, Castoldi G, Foa R. Chronic lymphocytic leukemia patients with highly stable and indolent disease show distinctive phenotypic and genotypic features. *Blood* 2003; 102(3): 1035-1041.
120. Tobin G, Thunberg U, Johnson A, Thörn I, Söderberg O, Hultdin M, Botling J, Enblad G, Sällström J, Sundström C, Roos G, Rosenquist R. Somatically mutated *Ig V_H3-21* genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;99(6): 2262-2264.
121. Rosenwald A, Alizadeh A, Widhopf G, Simon R, Davis ER, Yu X, Yang L, Pickeral OK, Rassenti LZ, Powell J, Botstein D, Byrd JC, Grever MR, Cheson BC, Chiorazzi N, Wilson WH, Kipps TJ, O. Brown P, Staudt LM. Relation of Gene Expression Phenotype to Immunoglobulin Mutation Genotype in B Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *J. Exp. Med.* 2001; 194(11):1639-1648.
122. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Mattioli M, Cattoretti G, Husson H, Freedman A, Inghirami G, Cro L, Baldini L, Neri A, Califano A, Dalla-Favera R. Gene Expression Profiling of B Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Reveals a Homogeneous Phenotype Related to Memory B Cells. *J. Exp. Med.* 2001;194(11):1625-1638.

123. Montserrat E. Assessing prognosis in patients with Chronic Lymphocytic Leukemia a quarter of a century after Rai and Binet staging systems. *Annals of Oncology* 2004;15:1450-1451.
124. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis ER, Henrickson SE, Zhao H, Ibbotson RE, Orchard JA, Davis Z, Stetler-Stevenson M, Raffeld M, Arthur DC, Marti GE, Wilson WH, Hamblin TJ, Oscier DG, Staudt LM. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood*. 2003;101(12):4944-4951.
125. Liu X, Adams A, Wildt KF, Aronow B, Feigenbaum L, Bosselut R. Restricting Zap70 Expression to CD4⁺CD8⁺ Thymocytes Reveals a T Cell Receptor–dependent Proofreading Mechanism Controlling the Completion of Positive Selection. *J. Exp. Med.* 2003;197(3): 363-373.
126. Orchard J, Ibbotson R, Best G, Parker A, Oscier D. ZAP-70 in B-cell malignancies. *Leukemia & Lymphoma* 2005;46(12):1689-1698.
127. Brdicka T, Kadlecik TA, Roose JP, Pastuszak AW, Weiss A. Intramolecular Regulatory Switch in ZAP-70: Analogy with Receptor Tyrosine Kinases. *Mol. Cell. Biol.* June 2005;25(12): 4924-4933.
128. Kuroyama H, Ikeda T, Kasai M, Yamasaki S, Tatsumi M, Utsuyama M, Saito T, Hirokawa K. Identification of a novel isoform of ZAP-70, truncated ZAP kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;315(4):935-941.
129. Tomlinson MG, Lin J, Weiss A. Lymphocytes with a complex: adapter proteins in antigen receptor signaling. *Immunol Today* 2000;21(11):584-591.
130. Elder ME, Skoda-Smith S, Kadlecik TA, Wang F, Wu J, Weiss A. Distinct T Cell Developmental Consequences in Humans and Mice Expressing Identical Mutations in the DLAARN Motif of ZAP-70. *J Immunol* 2001;166(1): 656-661.
131. Tichioni M, Charvet C, Noraz N, Lamy L, Steinberg M, Bernard A, Deckert M. Signaling through ZAP-70 is required for CXCL12-mediated T-cell transendothelial migration. *Blood* 2002; 99(9): 3111-3118.

132. Steinberg M, Adjali O, Swainson L, Merida P, Di Bartolo V, Pelletier L, Taylor N, Noraz N. T-cell receptor–induced phosphorylation of the ζ chain is efficiently promoted by ZAP-70 but not Syk. *Blood* 2004;104(3): 760-767.
133. Dürig J, Nückel H, Cremer M, Führer A, Halfmeyer K, Fandrey J, Möröy T, Klein-Hitpass L, Dührsen U. ZAP-70 expression is a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2003;17(12):2426-2434.
134. Nolz JC, Tschumper RC, Pittner BT, Darce JR, Kay NE, Jelinek DF. ZAP-70 is expressed by a subset of normal human B-lymphocytes displaying an activated phenotype. *Leukemia* 2005;19(6): 1018-1024.
135. Crespo M, Villamor N, Gine E, Colomer D, Marafioti T, Campo E, Montserrat E, Bosch F. ZAP-70 Expression in Human B cells: Analysis of Normal Cells and Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) Cells with Pro/Pre B Phenotype. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2004;104: Abstract 4443.
136. Schweighoffer E, Vanes L, Mathiot A, Nakamura T, Tybulewicz VJ. Unexpected Requirement for ZAP-70 in Pre-B Cell Development and Allelic Exclusion. *Immunity* 2003;18(4):523-533.
137. Meade J, Tybulewicz VJ, Turner M. The tyrosine kinase Syk is required for light chain isotype exclusion but dispensable for the negative selection of B cells. *Eur J Immunol* 2004;34(4):1102-1110.
138. Chen L, Widhopf G, Huynh L, Rassenti L, Rai KR, Weiss A, Kipps TJ. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;100(13):4609-4614.
139. Chen I, Apgar J, Huynh L, Dicker F, Giago-McGahan T, Rassenti L, Weiss A, Kipps TJ. ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2005;105(5):2036-2041.
140. Vallat L, Pionneau C, Jacob F, Davi F, Leblond V, Gribben JG, Merle-Beral H. Temporal Proteomic Analysis of CLL B Cell Response to Antigen Receptor Stimulation. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2007;110: Abstract 1134.

141. Vallat L, Park Y, Rassenti L, Gribben JG. Temporal Gene Expression after BCR-Crosslinking Based upon Zap70 Related Genomic Features. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2004 104: Abstract 2795.
142. Castro JE, Prada CE, Loria O, Kamal A, Chen L, Burrows FJ, Kipps TJ. ZAP-70 is a novel conditional heat shock protein 90 (Hsp90) client: inhibition of Hsp90 leads to ZAP-70 degradation, apoptosis, and impaired signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2005;106(7):2506-2512.
143. Castro JE, Prada CE, Jose JM, Jung SA, Chen LG, Meraz GA Kipps TG. Expression of ZAP-70 in B Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Is Associated with a Greater Capacity To Activate NF κ B Following Ligation of Surface Immunoglobulin. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2004 104: Abstract 2812.
144. Lust S, Boelens J, Janssens A, Philippé J, Bracke M, Offner F. CXCL-12 Induces Prolonged Erk-Phosphorylation in Zap-70 Positive B-CLL. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2004 104: Abstract 1902.
145. Boelens J, Lust S, Van Bockstaele F, Van Gele M, Janssens A, Derycke L, Vanhoecke B, Philippé J, Bracke M, Offner F. Steroid effects on ZAP-70 and SYK in relation to apoptosis in poor prognosis chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 2009;33(10):1335-1343.
146. Boelens J, Lust S, Vanhoecke B, Offner F. Chronic lymphocytic leukemia. *Anticancer Res.* 2009;29(2):605-15.
147. Kienle D, Benner A, Läuflé C, Winkler D, Schneider C, Bühler A, Zenz T, Habermann A, Jäger U, Lichter P, Dalla-Favera R, Döhner H, Stilgenbauer S. Gene expression factors as predictors of genetic risk and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Hematologica.* 2010;95(1):102-109.
148. Corcoran M, Parker A, Orchard J, Davis Z, Wirtz M, Schmitz OJ, Oscier D. ZAP-70 methylation status is associated with ZAP-70 expression status in chronic lymphocytic leukemia *Haematologica* 2005;90(8): 1078-1088.

149. Rassenti LR, Huynh L, Toy L, Chen L, Keating MJ, Gribben JG, Neuberg SD, Flinn IW, Rai KR, Byrd JC, Kay NE, Greaves A, Weiss A, Kipps TJ. ZAP-70 Compared with Immunoglobulin Heavy-Chain Gene Mutation Status as a Predictor of Disease Progression in Chronic Lymphocytic Leukemia. *NEJM* 2004;351(9):893-901.
150. Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Wiestner A, Rosenwald A, Thomas PW, Hamblin TJ, Staudt LM, Oscier DG. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 2004;363(9403):105-111.
151. Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, Marcé S, López-Guillermo A, Campo E, Montserrat E. ZAP-70 Expression as a Surrogate for Immunoglobulin-Variable-Region Mutations in Chronic Lymphocytic Leukemia. *NEJM* 2003;348(18):1764-1775.
152. Hus, M. Podhorecka, A. Bojarska-Junak, J. Rolinski, M. Schmitt, M. Sieklucka, E. Wasik-Szczepanek, and A. Dmoszynska. The clinical significance of ZAP-70 and CD38 expression in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Ann Oncol* 2006;17(4): 683-690.
153. Catherwood MA, Matthews C, Niblock R, Dobbin E, Morris TC, Alexander HD. ZAP-70 mRNA quantification in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Haematol.* 2006;76(4):294-298.
154. Ferrajoli A, Keating MJ. Current guidelines in defining therapeutic strategies. *Hematol Oncol Clin N Am* 2004;18(4):881-893.
155. Oscier D, Fegan C, Hillmen P, Illidge T, Johnson S, Maguire P, Matutes E, Milligan D. Guidelines on the diagnosis and management of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2004;125(3):294-317.
156. Anderson VR, Perry CM. Fludarabine: A Review of its Use in Non-Hodgkin's Lymphoma. *Drugs* 2007;(11):1633-1655.
157. Keating MJ, O'Brien S, Lerner S, Koller C, Beran M, Robertson LE, Freireich EJ, Estey E, Kantarjian H. Long-Term Follow-Up of Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) Receiving Fludarabine Regimens as Initial Therapy. *Blood* 1998;92(4): 1165-1171.

158. Leparrier M, Chevret S, Cazin B, Boudjerra N, Feugier P, Desablens B, Rapp MJ, Jaubert J, Autrand C, Divine M, Dreyfus B, Maloum K, Travade P, Dighiero G, Binet JL, Chastang C. Randomized comparison of fludarabine, CAP, and ChOP in 938 previously untreated stage B and C chronic lymphocytic leukemia patients. *Blood* 2001;98(8): 2319-2325.
159. Rai KR, Peterson BL, Appelbaum FR, Kolitz J, Elias L, Shepherd L, Hines J, Threatte GA, Larson RA, Cheson B, Schiffer CA. Fludarabine Compared with Chlorambucil as Primary Therapy for Chronic Lymphocytic Leukemia. *NEJM* 2000;343(24):1750-1757.
160. Boogaerts MA. Oral fludarabine therapy in chronic lymphocytic leukemia-increased convenience. *Hematol J.* 2004;5 Suppl 1:S31-7.
161. Tam CS, O'Brien S, Wierda W, Kantarjian H, Wen S, Do KA, Thomas DA, Cortes J, Lerner S, Keating MJ. Long-term results of the fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab regimen as initial therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008;112(4):975-980.
162. Dennie TW, Kolesar JM. Bendamustine for the treatment of chronic lymphocytic leukemia and rituximab-refractory, indolent B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Clin Ther.* 2009;31(2):2290-2311.
163. Faderl S, O'Brien S, Keating MJ. Monoclonal antibody combinations in CLL: evolving strategies. *Best Pract Res Clin Haematol* 2006;19:781-793.
164. Quintas-Cardama A, O'Brien S. Target therapy for chronic lymphocytic leukemia. *Target Oncol* 2009;4:11-21.
165. Gribben JG, Hallek M. Rediscovering alemtuzumab: current and emerging therapeutic roles. *Br J Haematol* 2009;144(6):818-831.
166. Ravandi F, O'Brien S. Alemtuzumab in CLL and other lymphoid neoplasms. *Cancer Invest* 2006;24:718-725.
167. Gribben JG. Stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;15:53-58.

168. Delgado J, Milligan DW, Dreger P. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia: ready for prime time? *Blood* 2009;114(13): 2581-2588.
169. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100(1):57-70.
170. Verma M, Srivastava S. Epigenetics in cancer: implications for early detection and prevention. *Lancet Oncol* 2002;3(12):755-763.
171. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *NEJM* 2003;349(21):2042-2054.
172. Galm O, Herman JG, Baylin SB. The fundamental role of epigenetics in hematopoietic malignancies. *Blood Rev* 2006;20(1):1-13.
173. Esteller M. Relevance of DNA methylation in the management of cancer. *Lancet Oncol* 2003;4(6):351-358.
174. Ramasahoye BH, Davis CS, Mills KI. DNA methylation: biology and significance. *Blood Rev* 1996;10(4):249-261.
175. Taylor SM. p 53 and deregulation of DNA methylation in cancer. *Cellscience* 2006;2(3):82-94.
176. Laird PW, Jaenisch R. DNA methylation and cancer. *Hum Mol Genet* 1994;3(Review Issue 1):1487-1495.
177. Holliday R, Grigg GW. DNA methylation and mutation. *Mutat Res* 1993;285(1):61-67.
178. Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 1986;321(6067):209-213.
179. Laird PW. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer* 2003;3(4):253-266.
180. Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 2002;21(35):5427-5440.
181. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 1983;301(5895):89-92.
182. Dunn BK. Hypomethylation: one side of a larger picture. *Ann NY Acad Sci* 2003;983:28-42

183. Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG. Abberant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet* 2001;10(7):687-692.
184. Knudson AG. Two genetic hit (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer* 2001;1(2):157-162.
185. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation, *NEJM* 2003;349(21):2042-2054.
186. Esteller M. DNA methylation and cancer therapy: New developments and expectations. *Curr Opin Oncol* 2005;17:55-60.
187. Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 1999;21(2):163-167.
188. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002;3(6):415-428.
189. Esteller M, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, Capella G, Peinado MA, Watkins DN, Issa JP, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA Repair Gene *O*⁶-Methylguanine-DNA Methyltransferase by Promoter Hypermethylation Is Associated with G to A Mutations in *K-ras* in Colorectal Tumorigenesis. *Cancer Res* 2000;60(9): 2368-2371.
190. Herman JG, Civin CI, Issa JP, Collector MI, Sharkis SJ, Baylin SB. Distinct Patterns of Inactivation of *p15^{INK4B}* and *p16^{INK4A}* Characterize the Major Types of Hematological Malignancies. *Cancer Res* 1997;57(5): 837-841.
191. Bastian PJ, Palapattu GS, Lin X, Yegnasubramanian S, Mangold LA, Trock B, Eisenberger MA, Partin AW, Nelson WG. Preoperative Serum DNA *GSTP1* CpG Island Hypermethylation and the Risk of Early Prostate-Specific Antigen Recurrence Following Radical Prostatectomy. *Clin Cancer Res* 2005;11(11):4037-4043.
192. Moriai R, Tsuji N, Kobayashi D, Yagihashi A, Namiki Y, Takahashi H, Watanabe N. A proapoptotic caspase recruitment domain protein gene, *TMS1*, is hypermethylated in human breast and gastric cancers. *Anticancer Res.* 2002;22(6C):4163-4168.

193. Chen K, Rajewsky N. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Nat Rev Genet* 2007;8(2):93-103.
194. Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, Fraga MF, Cerrato C, Setién F, Casado S, Suarez-Gauthier A, Sanchez-Cespedes M, Gitt A, Spiteri I, Das PP, Caldas C, Miska E, Esteller M. Genetic Unmasking of an Epigenetically Silenced microRNA in Human Cancer Cells. *Cancer Res* 2007;67(4):1424-1429.
195. Fuks F, Burgers WA, Brehm A, Hughes-Davies L, Kouzarides T. DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nature Genet.* 2000;24(1):88-91.
196. Robertson KD, Ait-Si-Ali S, Yokochi T, Wade PA, Jones PL, Wolffe PA. DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nature Genet.* 2000;25(3):338 – 342.
197. Yu MK. Epigenetics and Chronic Lymphocytic Leukemia. *Am J Hematol.* 2006;81(11):864-869.
198. Wahlfors J, Hiltunen H, Heinonen K, Hamalainen E, Alhonen L, Janne J. Genomic hypomethylation in human chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1992;80(8): 2074-2080.
199. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(2):143-153.
200. Raval A, Lucas DM, Matkovic JJ, Bennett KL, Liyanarachchi S, Young DC, Rassenti L, Kipps TJ, Grever MR, Byrd JC, Plass C. *TWIST2* Demonstrates Differential Methylation in Immunoglobulin Variable Heavy Chain Mutated and Unmutated Chronic Lymphocytic Leukemia. *JCO* 2005;23(17):3877-3885.
201. Takahasi T, Shivapurkar N, Reddy J, Shigematsu H, Miyajima K, Suzuki M, Toyooka S, Gazdar AF. DNA methylation Profiles of Lymphoid and Hematopoietic Malignancies. *Clin Cancer Res.* 2004;10(9):2928-2935.
202. Hammarsund M, Corcoran MM, Wilson W, Zhu C, Einhorn S, Sangfelt O, Grandér D. Characterization of a novel B-CLL candidate gene--DLEU7--located in the 13q14 tumor suppressor locus *FEBS Lett.* 2004;556(1-3):75-80.

203. Papageorgiou SG, Lambropoulos S, Pappa V, Economopoulou C, Kontsioti F, Papageorgiou E, Tsirigotis P, Dervenoulas J, Economopoulos T. Hypermethylation of the *p15^{INK4B}* gene promoter in B-chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol* 2007;82(9):824-825.
204. Maher ER, Kaelin WG Jr. von Hippel-Lindau disease. *Medicine (Baltimore)*. 1997;76(6):381-391.
205. Sgambati MT, Stolle C, Choyke PL, Walther MM, Zbar B, Linehan MW, Glenn GM. Mosaicism in von Hippel–Lindau Disease: Lessons from Kindreds with Germline Mutations Identified in Offspring with Mosaic Parents. *Am J Hum Genet* 2000;66(1):84-91.
206. Ushijima T. Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cell. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(3):223-231.
207. Groulx I, Lee S. Oxygen-Dependent Ubiquitination and Degradation of Hypoxia-Inducible Factor Requires Nuclear-Cytoplasmic Trafficking of the von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein. *Mol. Cell. Biol.* 2002;22(15):5319-5336.
208. Reed SI. The ubiquitin-proteasome pathway in cell cycle control. *Results Probl Cell Differ.* 2006;42:147-181.
209. Shah IM, Di Napoli M. The ubiquitin-proteasome system and proteasome inhibitors in central nervous system diseases. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2007;7(4):250-273.
210. Kaelin WG Jr. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein: O₂ sensing and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(11):865-873.
211. Kim WY, Kaelin WG. Role of *VHL* Gene Mutation in Human Cancer. *JCO* 2004;22(24):4991–5004.
212. Kaelin WG Jr. The von Hippel-Lindau Gene, Kidney, Cancer, and Oxygen sensing. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(11):2703-2711.
213. Lutz MS, Burk RD. Primary Cilium Formation Requires von Hippel-Lindau Gene Function in Renal-Derived Cells. *Cancer Res*. 2006;66(14):6903-6907.

214. Esteban MA, Harten SK, Tran MG, Maxwell PH. Formation of Primary Cilia in the Renal Epithelium Is Regulated by the von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(7):1801-1806.
215. Lolkema MP, Mans DA, Snijckers CM, van Noort M, van Beest M, Voest EE, Giles RH. The von Hippel-Lindau tumour suppressor interacts with microtubules through kinesin-2. *FEBS Lett.* 2007;581(24):4571-4576.
216. Mans DA, Lolkema MP, van Beest M, Daenen LG, Voest EE, Giles RH. Mobility of the von Hippel-Lindau tumour suppressor protein is regulated by kinesin-2. *Exp Cell Res.* 2008;314(6):1229-1236.
217. Singla V, Reiter JF. The primary cilium as the cell's antenna: signaling at a sensory organelle. *Science.* 2006;313(5787):629-633.
218. Grosfeld A, Stolze IP, Cockman ME, Pugh CW, Edelmann M, Kessler B, Bullock AN, Ratcliffe PJ, Masson N. Interaction of hydroxylated collagen IV with the von hippel-lindau tumor suppressor. *J Biol Chem.* 2007;282(18):13264-13269.
219. Kurban G, Duplan E, Ramlal N, Hudon V, Sado Y, Ninomiya Y, Pause A. Collagen matrix assembly is driven by the interaction of von Hippel-Lindau tumor suppressor protein with hydroxylated collagen IV alpha 2. *Oncogene.* 2008;27(7):1004-1012.
220. Kurban G, Hudon V, Duplan E, Ohh M, Pause A. Characterization of a von Hippel Lindau pathway involved in extracellular matrix remodeling, cell invasion, and angiogenesis. *Cancer Res.* 2006;66(3):1313-1319.
221. Yang H, Minamishima YA, Yan Q, Schlisio S, Ebert BL, Zhang X, Zhang L, Kim WY, Olumi AF, Kaelin WG Jr. pVHL acts as an adaptor to promote the inhibitory phosphorylation of the NF-kappaB agonist Card9 by CK2. *Mol Cell.* 2007;28(1):15-27.
222. Roe JS, Kim H, Lee SM, Kim ST, Cho EJ, Youn HD. p53 stabilization and transactivation by a von Hippel-Lindau protein. *Mol Cell.* 2007;28(1):15-27.

223. Rafty LA, Khachigian LM. von Hippel-Lindau tumor suppressor protein represses platelet-derived growth factor B-chain gene expression via the Sp1 binding element in the proximal PDGF-B promoter. *J Cell Biochem* 2002;85(3):490-5.
224. Datta K, Mondal S, Sinha S, Li J, Wang E, Knebelmann B, Karumanchi SA, Mukhopadhyay D. Role of elongin-binding domain of von Hippel Lindau gene product on HuR-mediated VPF/VEGF mRNA stability in renal cell carcinoma. *Oncogene*. 2005;24(53):7850-8.
225. Yuen JS, Cockman ME, Sullivan M, Protheroe A, Turner GD, Roberts IS, Pugh CW, Werner H, Macaulay VM. The VHL tumor suppressor inhibits expression of the IGF1R and its loss induces IGF1R upregulation in human clear cell renal carcinoma. *Oncogene*. 2007;26(45):6499-508.
226. Barlow DP, Bartolomei MS. Genomic Imprinting in Mammals. Allis DC, Jenuwein Th, Reinberg D, Caparros ML. *Epigenetics*. 1st ed. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press;2007.
227. Barlow DP, Stöger R, Herrman BG, Saito K, Schweifer N. The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the *Tme* locus. *Nature* 1991;349(6304):84-87.
228. DeChiara TM, Robertson EJ, Efstratiadis A. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell*. 1991;64(4):849-859.
229. Verona RI, Mann MR, Bartolomei MS. Genomic imprinting: intricacies of epigenetic regulation in clusters. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2003;19:237-59.
230. Spahn L, Barlow DP. An ICE pattern crystallizes. *Nat Genet* 2003;35(1):11-12.
231. Pauler FM, Barlow DP. Imprinting mechanisms--it only takes two. *Genes Dev*. 2006;20(10):1203-6.
232. Sleutels F, Barlow DP. The origins of genomic imprinting in mammals. *Adv Genet*. 2002;46:119-63.
233. Schmidt JV, Matteson PG, Jones BK, Guan XJ, Tilghman SM. The *Dlk1* and *Gtl2* genes are linked and reciprocally imprinted. *Genes Dev*. 2000;14(16):1997-2002.

234. Miyoshi N, Wagatsuma H, Wakana S, Shiroishi T, Nomura M, Aisaka K, Kohda T, Surani MA, Kaneko-Ishino T, Ishino F. Identification of an imprinted gene, Meg3/Gtl2 and its human homologue MEG3, first mapped on mouse distal chromosome 12 and human chromosome 14q. *Genes Cells*. 2000;5(3):211-220.
235. Fukuzawa R, Heathcott RW, Morison IM, Reeve AE. Imprinting, expression, and localisation of DLK1 in Wilms tumours. *J Clin Pathol*. 2005;58(2):145-150
236. Yin D, Xie D, De Vos S, Liu G, Miller CW, Black KL, Koeffler HP. Imprinting status of DLK1 gene in brain tumors and lymphomas. *Int J Oncol*. 2004;24(4):1011-1015.
237. Astuti D, Latif F, Wagner K, Gentle D, Cooper WN, Catchpole D, Grundy R, Ferguson-Smith AC, Maher ER. Epigenetic alteration at the DLK1-GTL2 imprinted domain in human neoplasia: analysis of neuroblastoma, pheochromocytoma and Wilms' tumour. *Br J Cancer*. 2005;92(8):1574-1580.
238. Zhang X, Rice K, Wang Y, Chen W, Zhong Y, Nakayama Y, Zhou Y, Klibanski A. Maternally Expressed Gene 3 (MEG3) Noncoding Ribonucleic Acid: Isoform Structure, Expression, and Functions. *Endocrinology*. 2010;151(3):939-947.
239. Murphy SK, Wylie AA, Coveler KJ, Cotter PD, Papenhausen PR, Sutton VR, Shaffer LG, Jirtle RL. Epigenetic detection of human chromosome 14 uniparental disomy. *Hum Mutat*. 2003;22(1):92-97.
240. Zhang X, Zhou Y, Mehta KR, Danila DC, Scolavino S, Johnson SR, Klibanski A. A pituitary-derived MEG3 isoform functions as a growth suppressor in tumor cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(11):5119-5126.
241. Menon AG, Rutter JL, von Sattel JP, Synder H, Murdoch C, Blumenfeld A, Martuza RL, von Deimling A, Gusella JF, Houseal TW. Frequent loss of chromosome 14 in atypical and malignant meningioma: identification of a putative 'tumor progression' locus. *Oncogene*. 1997;14(5):611-616.
242. Mutirangura A, Pornthanakasem W, Sriuranpong V, Supiyaphun P, Voravud N. Loss of heterozygosity on chromosome 14 in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer*. 1998 5;78(2):153-156.

243. Bando T, Kato Y, Ihara Y, Yamagishi F, Tsukada K, Isobe M. Loss of heterozygosity of 14q32 in colorectal carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 1999;111(2):161-165.
244. Itoyama T, Chaganti RS, Yamada Y, Tsukasaki K, Atogami S, Nakamura H, Tomonaga M, Ohshima K, Kikuchi M, Sadamori N. Cytogenetic analysis and clinical significance in adult T-cell leukemia/lymphoma: a study of 50 cases from the human T-cell leukemia virus type-1 endemic area, Nagasaki. *Blood.* 2001;97(11):3612-3620.
245. Zhou Y, Zhong Y, Wang Y, Zhang X, Batista DL, Gejman R, Ansell PJ, Zhao J, Weng C, Klibanski A. Activation of p53 by MEG3 non-coding RNA. *J Biol Chem.* 2007 Aug 24;282(34):24731-24742.
246. Zeerleder S. The struggle to detect circulating DNA. *Crit Care.* 2006;10(3):142-144.
247. Chan AK, Chiu RW, Lo YM; Clinical Sciences Reviews Committee of the Association of Clinical Biochemists. Cell-free nucleic acids in plasma, serum and urine: a new tool in molecular diagnosis. *Ann Clin Biochem.* 2003;40(Pt 2):122-130.
248. Tong YK, Lo YM. Diagnostic developments involving cell-free (circulating) nucleic acids. *Clin Chim Acta.* 2006;363(1-2):187-196.
249. Tsang JC, Lo YM. Circulating nucleic acids in plasma/serum. *Pathology.* 2007 Apr;39(2):197-207.
250. Gocke CD, Kopreski MS, Benko FA, Sternas L, Kwak LW. Serum BCL2/IGH DNA in follicular lymphoma patients: a minimal residual disease marker. *Leuk Lymphoma.* 2000;39(1-2):165-172.
251. Frickhofen N, Müller E, Sandherr M, Binder T, Bangerter M, Wiest C, Enz M, Heimpel H. Rearranged Ig heavy chain DNA is detectable in cell-free blood samples of patients with B-cell neoplasia. *Blood.* 1997;90(12):4953-4960.

252. Kornacker M, Jox A, Vockerodt M, Tesch H, Bohlen H, Diehl V, Wolf J. Detection of a Hodgkin/Reed-Sternberg cell specific immunoglobulin gene rearrangement in the serum DNA of a patient with Hodgkin's disease. *Br J Haematol.* 1999;106(2):528-531.
253. Hohaus S, Giachelia M, Massini G, Mansueto G, Vannata B, Bozzoli V, Criscuolo M, D'Alò F, Martini M, Larocca LM, Voso MT, Leone G. Cell-free circulating DNA in Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas *Ann Oncol.* 2009;20(8):1408-1413.
254. Bartlett JM, Stirling D. A short history of the polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol.* 2003;226:3-6.
255. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987;155:335-350.
256. Bell J. The polymerase chain reaction. *Immunol Today.* 1989;10(10):351-355.
257. Rapley R, Theophilus BD, Bevan IS, Walker MR. Fundamentals of the polymerase chain reaction: a future in clinical diagnostics? *Med Lab Sci.* 1992;49(2):119-128.
258. Templeton NS. The polymerase chain reaction. History, methods, and applications. *Diagn Mol Pathol.* 1992;1(1):58-72.
259. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL. 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.
260. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(18):9821-9826.
261. Kuroki T, Trapasso F, Yendamuri S, Matsuyama A, Alder H, Mori M, Croce CM. Allele loss and promoter hypermethylation of VHL, RAR-beta, RASSF1A, and FHIT tumor suppressor genes on chromosome 3p in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2003;63(13):3724-3728.

262. Chan JK. Advances in immunohistochemistry: impact on surgical pathology practice. *Sem Diagn Pathol.* 2000;17(3):170-177.
263. Rosai & Akerman's Surgical Pathology. Mosby 2004. 9th edition. Vol 1, p:37-89.
264. Chan JK. Advances in immunohistochemical techniques: toward making things simpler, cheaper, more sensitive, and more reproducible. *Adv Anat Pathol.* 1998;5(5):314-325.
265. Dabbs DJ. *Diagnostic Immunohistochemistry.* Churchill Livingstone 2002. p:3-44.
266. Gown A, de Weber N, Battifora H. Microwave-based antigenic unmasking. A revolutionary new technique for routine immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem.* 1993;1:256-266.
267. Silverberg SG. *Principles and Practice of surgical Pathology.* Churchill Livingstone. 2nd edition.1990
268. Bogner C, Sandherr M, Perker M, Weick K, Ringshausen I, Peschel C, Decker T. Cyclin E but not bcl-2, bax or mcl-1 is differentially expressed in ZAP 70-positive and ZAP 70-negative B-CLL cells. *Ann Hematol.* 2006;85(7):458-462.
269. Sabattini E, Orduz R, Campidelli C, Zinzani PL, Callea V, Zupo S, Cutrona G, Morabito F, Ferrarini M, Pileri S. B cell chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma: role of ZAP70 determination on bone marrow biopsy specimens. *J Clin Pathol.* 2007;60(6):627-632.
270. Admirand JH, Rassidakis GZ, Abruzzo LV, Valbuena JR, Jones D, Medeiros LJ. Immunohistochemical detection of ZAP-70 in 341 cases of non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma. *Mod Pathol.* 2004;17(8):954-961.
271. Carreras J, Villamor N, Colomo L, Moreno C, Ramón y Cajal S, Crespo M, Tort F, Bosch F, López-Guillermo A, Colomer D, Montserrat E, Campo E. Immunohistochemical analysis of ZAP-70 expression in B-cell lymphoid neoplasms. *J Pathol.* 2005;205(4):507-513.
272. Bosch F, Muntañola A, Giné E, Carrió A, Villamor N, Moreno C, Crespo M, Montserrat E. Clinical implications of ZAP-70 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom.* 2006 Jul;70(4):214-217.

273. Lanham S, Hamblin T, Oscier D, Ibbotson R, Stevenson F, Packham G. Differential signaling via surface IgM is associated with VH gene mutational status and CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2003;101(3):1087-1093.
274. Burger JA, Ghia P, Rosenwald A, Caligaris-Cappio F. The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood*. 2009 Oct 15;114(16):3367-3375.
275. Burger JA, Gandhi V. The lymphatic tissue microenvironments in chronic lymphocytic leukemia: in vitro models and the significance of CD40-CD154 interactions. *Blood*. 2009 Sep 17;114(12):2560-2561.
276. Ribatti D, Vacca A, Nico B, Fanelli M, Roncali L, Dammacco F. Angiogenesis spectrum in the stroma of B-cell non-Hodgkin's lymphomas. An immunohistochemical and ultrastructural study. *Eur J Haematol*. 1996;56(1-2):45-53.
277. Chen H, Treweeke AT, West DC, Till KJ, Cawley JC, Zuzel M, Toh CH. In vitro and in vivo production of vascular endothelial growth factor by chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*. 2000;96(9):3181-3187.
278. Kay NE, Bone ND, Tschumper RC, Howell KH, Geyer SM, Dewald GW, Hanson CA, Jelinek DF. B-CLL cells are capable of synthesis and secretion of both pro- and anti-angiogenic molecules. *Leukemia*. 2002;16(5):911-919.
279. Kini AR, Kay NE, Peterson LC. Increased bone marrow angiogenesis in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2000;14(8):1414-1418.
280. Molica S, Vitelli G, Levato D, Gandolfo GM, Liso V. Increased serum levels of vascular endothelial growth factor predict risk of progression in early B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 1999;107(3):605-610.
281. Lee YK, Bone ND, Strege AK, Shanafelt TD, Jelinek DF, Kay NE. VEGF receptor phosphorylation status and apoptosis is modulated by a green tea component, epigallocatechin-3-gallate (EGCG), in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2004;104(3):788-94.

282. Lee YK, Shanafelt TD, Bone ND, Strege AK, Jelinek DF, Kay NE. VEGF receptors on chronic lymphocytic leukemia (CLL) B cells interact with STAT 1 and 3: implication for apoptosis resistance. *Leukemia*. 2005;19(4):513-23.
283. Ghosh AK, Shanafelt TD, Cimmino A, Taccioli C, Volinia S, Liu CG, Calin GA, Croce CM, Chan DA, Giaccia AJ, Secreto C, Wellik LE, Lee YK, Mukhopadhyay D, Kay NE. Aberrant regulation of pVHL levels by microRNA promotes the HIF/VEGF axis in CLL B cells. *Blood*. 2009;113(22):5568-5574.
284. Petrella BL, Lohi J, Brinckerhoff. Identification of membrane type-1 matrix metalloproteinase as a target of hypoxia-inducible factor-2 alpha in von Hippel-Lindau renal cell carcinoma. *Oncogene*. 2005;24(6):1043-1052
285. Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, Dornhöfer N, Kong C, Le QT, Chi JT, Jeffrey SS, Giaccia AJ. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature*. 2006;440(7088):1222-1226.
286. Ohh M, Yauch RL, Lonergan KM, Whaley JM, Stemmer-Rachamimov AO, Louis DN, Gavin BJ, Kley N, Kaelin WG Jr, Iliopoulos O. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is required for proper assembly of an extracellular fibronectin matrix. *Mol Cell*. 1998;1(7):959-68.
287. Tang N, Mack F, Haase VH, Simon MC, Johnson RS. pVHL function is essential for endothelial extracellular matrix deposition. *Mol Cell Biol*. 2006;26(7):2519-2530.
288. Burger JA, Tsukada N, Burger M, Zvaifler NJ, Dell'Aquila M, Kipps TJ. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood*. 2000;96(8):2655-2663.
289. Lagneaux L, Delforge A, Bron D, De Bruyn C, Stryckmans P. Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. *Blood*. 1998;91(7):2387-2396.

290. Kitada S, Andersen J, Akar S, Zapata JM, Takayama S, Krajewski S, Wang HG, Zhang X, Bullrich F, Croce CM, Rai K, Hines J, Reed JC. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. *Blood*. 1998;91(9):3379-3389.
291. Pepper C, Hewamana S, Brennan P, Fegan C. NF-kappaB as a prognostic marker and therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Future Oncol*. 2009;5(7):1027-1037.
292. Hewamana S, Lin TT, Rowntree C, Karunanithi K, Pratt G, Hills R, Fegan C, Brennan P, Pepper C. Rel a is an independent biomarker of clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2009;27(5):763-769.
293. Hewamana S, Lin TT, Jenkins C, Burnett AK, Jordan CT, Fegan C, Brennan P, Rowntree C, Pepper C. The novel nuclear factor-kappaB inhibitor LC-1 is equipotent in poor prognostic subsets of chronic lymphocytic leukemia and shows strong synergy with fludarabine. *Clin Cancer Res*. 2008;14(24):8102-8111.
294. Schuler M, Green DR. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans*. 2001;29(Pt 6):684-688.
295. Wang L, Wu Q, Qiu P, Mirza A, McGuirk M, Kirschmeier P, Greene JR, Wang Y, Pickett CB, Liu S. Analyses of p53 target genes in the human genome by bioinformatic and microarray approaches. *J Biol Chem*. 2001 Nov 23;276(47):43604-43610.
296. Roe JS, Youn HD. The positive regulation of p53 by the tumor suppressor VHL. *Cell Cycle*. 2006;5(18):2054-2056.
297. Haase VH. The VHL tumor suppressor: master regulator of HIF. *Curr Pharm Des*. 2009;15(33):3895-3903.
298. Frew IJ, Krek W. Multitasking by pVHL in tumour suppression. *Curr Opin Cell Biol*. 2007;19(6):685-690.
299. Kaelin WG Jr. The von hippel-lindau tumor suppressor protein: an update. *Methods Enzymol*. 2007;435:371-383

300. McDonald FE, Morris MR, Gentle D, Winchester L, Baban D, Ragoussis J, Clarke NW, Brown MD, Kishida T, Yao M, Latif F, Maher ER. CpG methylation profiling in VHL related and VHL unrelated renal cell carcinoma. *Mol Cancer*. 2009;8:31.
301. Melnikov AA, Scholtens D, Talamonti MS, Bentrem DJ, Levenson W. Methylation profile of circulating plasma DNA in patients with pancreatic cancer. *J Surg Oncol*. 2009;99(2):119-122.
302. Xu XL, Yu J, Zhang HY, Sun MH, Gu J, Du X, Shi DR, Wang P, Yang ZH, Zhu JD. Methylation profile of the promoter CpG islands of 31 genes that may contribute to colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol*. 2004;10(23):3441-3454.
303. Cao Z, Song JH, Kim CJ, Cho YG, Kim SY, Nam SW, Lee JY, Park WS. Genetic and epigenetic analysis of the VHL gene in gastric cancers. *Acta Oncol*. 2008;47(8):1551-1556.
304. Liu Z, Zhao J, Chen XF, Li W, Liu R, Lei Z, Liu X, Peng X, Xu K, Chen J, Liu H, Zhou QH, Zhang HT. CpG island methylator phenotype involving tumor suppressor genes located on chromosome 3p in non-small cell lung cancer *Lung Cancer*. 2008 Oct;62(1):15-22.
305. Dulaimi E, Ibanez de Caceres I, Uzzo RG, Al-Saleem T, Greenberg RE, Polascik TJ, Babb JS, Grizzle WE, Cairns P. Promoter hypermethylation profile of kidney cancer. *Clin Cancer Res*. 2004;10(12 Pt 1):3972-3979.
306. Hatzimichael E, Dranitsaris G, Dasoula A, Benetatos L, Stebbing J, Crook T, Bourantas KL. Von Hippel-Lindau methylation status in patients with multiple myeloma: a potential predictive factor for the development of bone disease. *Clin Lymphoma Myeloma*. 2009;9(3):239-242.
307. Cowey CL, Rathmell WK. VHL gene mutations in renal cell carcinoma: role as a biomarker of disease outcome and drug efficacy. *Curr Oncol Rep*. 2009;11(2):94-101.

308. 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.
309. An J, Sun Y, Fisher M, Rettig MB. Maximal apoptosis of renal cell carcinoma by the proteasome inhibitor bortezomib is nuclear factor-kappaB dependent. *Mol Cancer Ther*. 2004;3(6):727-736.
310. Faderl S, Rai K, Gribben J, Byrd JC, Flinn IW, O'Brien S, Sheng S, Esseltine DL, Keating MJ. Phase II study of single-agent bortezomib for the treatment of patients with fludarabine-refractory B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 2006;107(5):916-924.
311. Kelley TW, Alkan S, Srkalovic G, Hsi ED. Treatment of human chronic lymphocytic leukemia cells with the proteasome inhibitor bortezomib promotes apoptosis. *Leuk Res*. 2004;28(8):845-850.
312. Pahler JC, Ruiz S, Niemer I, Calvert LR, Andreeff M, Keating M, Faderl S, McConkey DJ. Effects of the proteasome inhibitor, bortezomib, on apoptosis in isolated lymphocytes obtained from patients with chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res*. 2003;9(12):4570-4577.
313. Kawakami T, Chano T, Minami K, Okabe H, Okada Y, Okamoto K. Imprinted DLK1 is a putative tumor suppressor gene and inactivated by epimutation at the region upstream of GTL2 in human renal cell carcinoma. *Hum Mol Genet*. 2006;15(6):821-830.
314. Zhao J, Dahle D, Zhou Y, Zhang X, Klibanski A. Hypermethylation of the promoter region is associated with the loss of MEG3 gene expression in human pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(4):2179-286.
315. Gejman R, Batista DL, Zhong Y, Zhou Y, Zhang X, Swearingen B, Stratakis CA, Hedley-Whyte ET, Klibanski A. Selective loss of MEG3 expression and intergenic differentially methylated region hypermethylation in the MEG3/DLK1 locus in human clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(10):4119-4125.

316. Benetatos L, Dasoula A, Hatzimichael E, Georgiou I, Syrrou M, Bourantas KL. Promoter hypermethylation of the MEG3 (DLK1/MEG3) imprinted gene in multiple myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma*. 2008;8(3):171-175.
317. Benetatos L, Hatzimichael E, Dasoula A, Dranitsaris G, Tsiara S, Syrrou M, Georgiou I, Bourantas KL. CpG methylation analysis of the MEG3 and SNRPN imprinted genes in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 2010;34(2):148-153.
318. Steele AJ, Prentice AG, Hoffbrand AV, Yogashangary BC, Hart SM, Nacheva EP, Howard-Reeves JD, Duke VM, Kottaridis PD, Cwynarski K, Vassilev LT, Wickremasinghe RG. p53-mediated apoptosis of CLL cells: evidence for a transcription-independent mechanism. *Blood*. 2008;112(9):3827-3834.
319. Calin GA, Liu CG, Ferracin M, Hyslop T, Spizzo R, Sevignani C, Fabbri M, Cimmino A, Lee EJ, Wojcik SE, Shimizu M, Tili E, Rossi S, Taccioli C, Pichiorri F, Liu X, Zupo S, Herlea V, Gramantieri L, Lanza G, Alder H, Rassenti L, Volinia S, Schmittgen TD, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. Ultraconserved regions encoding ncRNAs are altered in human leukemias and carcinomas. *Cancer Cell*. 2007;12(3):215-229.
320. Iorio MV, Croce CM. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. *J Clin Oncol*. 2009;27(34):5848-5856.
321. Calin GA, Croce CM. Chronic lymphocytic leukemia: interplay between noncoding RNAs and protein-coding genes. *Blood*. 2009;114(23):4761-4770.
322. Weber B, Stresemann C, Brueckner B, Lyko F. Methylation of human microRNA genes in normal and neoplastic cells. *Cell Cycle*. 2007;6(9):1001-1005.
323. Saito Y, Liang G, Egger G, Friedman JM, Chuang JC, Coetzee GA, Jones PA. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell*. 2006;9(6):435-443.
324. Lehmann U, Hasemeier B, Christgen M, Müller M, Römermann D, Länger F, Kreipe H. Epigenetic inactivation of microRNA gene hsa-mir-9-1 in human breast cancer. *J Pathol*. 2008;214(1):17-24.

325. Toyota M, Suzuki H, Sasaki Y, Maruyama R, Imai K, Shinomura Y, Tokino T. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer. *Cancer Res.* 2008;68(11):4123-4132.
326. Garzon R, Liu S, Fabbri M, Liu Z, Heaphy CE, Callegari E, Schwind S, Pang J, Yu J, Muthusamy N, Havelange V, Volinia S, Blum W, Rush LJ, Perrotti D, Andreeff M, Bloomfield CD, Byrd JC, Chan K, Wu LC, Croce CM, Marcucci G. MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1. *Blood.* 2009;113(25):6411-6418.
327. Kircher M, Bock C, Paulsen M. Structural conservation versus functional divergence of maternally expressed microRNAs in the Dlk1/Gtl2 imprinting region. *BMC Genomics.* 2008;9:346-365.
328. Davis E, Caiment F, Tordoir X, Cavaillé J, Ferguson-Smith A, Cockett N, Georges M, Charlier C. RNAi-mediated allelic trans-interaction at the imprinted Rtl1/Peg11 locus. *Curr Biol.* 2005;15(8):743-749.
329. Seitz H, Royo H, Bortolin ML, Lin SP, Ferguson-Smith AC, Cavaillé J. A large imprinted microRNA gene cluster at the mouse Dlk1-Gtl2 domain. *Genome Res.* 2004;14(9):1741-1748.
330. Seitz H, Royo H, Lin SP, Youngson N, Ferguson-Smith AC, Cavaillé J. Imprinted small RNA genes. *Biol Chem.* 2004;385(10):905-911.
331. Zhao J, Zhang X, Zhou Y, Ansell PJ, Klibanski A. Cyclic AMP stimulates MEG3 gene expression in cells through a cAMP-response element (CRE) in the MEG3 proximal promoter region. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38(10):1808-1820.
332. Calin GA, Liu CG, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, Dumitru CD, Shimizu M, Cimmino A, Zupo S, Dono M, Dell'Aquila ML, Alder H, Rassenti L, Kipps TJ, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(32):11755-11760.

333. Nicoloso MS, Kipps TJ, Croce CM, Calin GA. MicroRNAs in the pathogeny of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2007;139(5):709-716.
334. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs — microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006;6:259-269.
335. Bierie B, Moses HL. TGF: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006;6:506-520.
336. Siegel PM, Massagué J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF in homostasis and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003;3:807-820.
337. Nash KT, Welch DR. The KISS1 metastasis suppressor: mechanistic insights and clinical utility. *Front Biosci.* 2006;11:647-659.
338. Martin TA, Watkins G, Jiang WG. KiSS-1 expression in human breast cancer. *Clinical & Experimental Metastasis.* 2005;22: 503–511.

