

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ *RASSF1A* ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΧΡΟΝΙΑΣ ΜΥΕΛΟΓΕΝΟΥΣ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑΣ

Αβραμούλη Α.¹, Τσόχας Σ.¹, Λουλές Γ.¹, Καλαλά Φ.¹, Μπραϊμη Μ.², Μανδαλά Ε.³, Κατωδρύτου Ε.⁴, Παπαδάκης Ε.², Καρτάσης Ζ.⁵, Σπελέτας Μ.¹

(1) Εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, (2) Αιματολογικό Τμήμα, Νοσοκομείο Παπαγεωργίου, Θεσσαλονίκη, (3) Δ' Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική, ΑΠΘ, Ιπποκράτειο Νοσοκομείο, Θεσσαλονίκη, (4) Αιματολογική Κλινική, Θεαγένειο Αντικαρκινικό Ινστιτούτο, Θεσσαλονίκη, (5) Αιματολογικό Τμήμα, Γενικό Νοσοκομείο Χαλκίδας

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το γονίδιο *RASSF1A* εμπλέκεται σε κύρια μονοπάτια για τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (όπως του *ras*), εκφράζεται σε όλα τα αιμοποιητικά κύτταρα, ενώ η υπερμεθυλίωση του υποκινητή του είναι ένα συχνό εύρημα σε συμπαγείς όγκους. Μέχρι τώρα τα επίπεδα μεθυλίωσης του *RASSF1A* δεν έχουν μελετηθεί στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία (ΧΜΛ). Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να αναλυθεί η κατάσταση μεθυλίωσης του *RASSF1A* σε ασθενείς με χρόνια μυελογενή λευχαιμία, τόσο στη χρόνια φάση όσο και κατά την εξέλιξη της νόσου σε επιταχυνόμενη φάση και βλαστική κρίση, για να εκτιμηθεί η αξία του ως προγνωστικού και δυνητικά θεραπευτικού στόχου.

ΥΛΙΚΑ

Μυελός των οστών και περιφερικό αίμα συλλέχθηκε από 42 ασθενείς (άνδρες/γυναίκες: 21/21, μέση ηλικία: 58,5, εύρος: 28-80 έτη) από τους οποίους 41 έπασχαν από ΧΜΛ σε διάφορα στάδια της νόσου, καθώς από μία ασθενή με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία που ήταν θετική στο χρωμόσωμα της Φιλαδέλφειας. Από τους ασθενείς με ΧΜΛ 20 έφεραν τον ανασυνδυασμό b2a2-*BCR-ABL*, 17 τον b3a2-*BCR-ABL*, 2 ταυτόχρονα τον b3a2 και τον b2a2 και ένας τον σπάνιο c3a2 (e19a2). Κατά τη βλαστική κρίση μία ασθενής εμφάνισε μονοσωμία 7, ενώ ένας ακόμα ασθενής κατά την ύφεση της νόσου (αιματολογική, πλήρη κυτταρογενετική και μείζονα μοριακή) εμφάνισε απώλεια του Y χρωμοσώματος.

Αναλυτικά 32 ασθενείς μελετήθηκαν κατά τη διάγνωση της νόσου (ανάμεσά τους 10 μελετήθηκαν ξανά: 8 κατά την ύφεση και 2 κατά την εξέλιξη της νόσου σε βλαστική κρίση), 1 ασθενής μελετήθηκε μόνο κατά την επιταχυνόμενη φάση και 10 ασθενείς μελετήθηκαν μόνο στη βλαστική κρίση.

Παράλληλα αναλύθηκε και η νεοπλασματική σειρά K562 (ερυθρολευχαιμίας), η οποία φέρει τον ανασυνδυασμό b3a2-*BCR-ABL*. Ως θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες της πειραματικής διαδικασίας, χρησιμοποιήθηκαν ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου με γνωστά επίπεδα μεθυλίωσης (από ερευνητικό πρωτόκολλο που τρέχει παράλληλα στο εργαστήριό μας).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μεθυλίωση του *RASSF1A* δεν ανιχνεύτηκε σε κανέναν ασθενή με χρόνια μυελογενή λευχαιμία στην χρόνια φάση, κατά την ύφεση της νόσου, ή κατά την εξέλιξη σε επιταχυνόμενη φάση ή βλαστική κρίση. Επίσης, ο ασθενής με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία έδειξε μηδενικό επίπεδο μεθυλίωσης. Ωστόσο, η καρκινική κυτταρική σειρά ερυθρολευχαιμίας K562 βρέθηκε ότι είναι μεθυλιωμένη. Παραδείγματα του επιπέδου μεθυλίωσης των ασθενών της μελέτης, καθώς και της νεοπλασματικής σειράς K562, παρουσιάζονται στην εικόνα 1.

ΜΕΘΟΔΟΙ

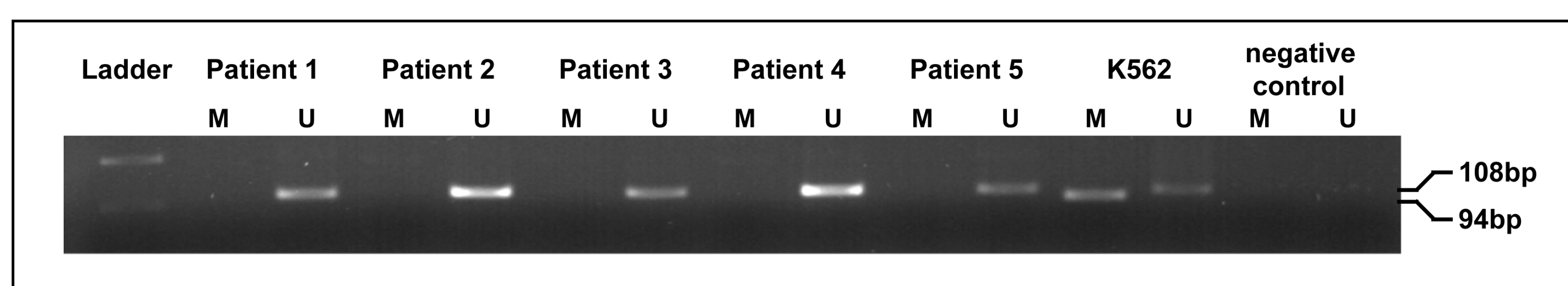
DNA απομονώθηκε από μυελό των οστών ή περιφερικό αίμα (QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen), καθώς και από βιοψίες οστού σε παραφίνη (QIAamp DNA FFPE Tissue Kit, Qiagen). Το επίπεδο μεθυλίωσης του *RASSF1A* μελετήθηκε μετά από επίδραση στο γενωμικό DNA με όξινο θειώδες νάτριο -bisulfite treatment- (EZ DNA Methylation Gold Kit™, ZYMO Research), που ακολουθείται από ειδική, για την ανάλυση της μεθυλίωσης, PCR (Methylation Specific PCR). Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να δίνουν προϊόντα ανάλογα αν το DNA είναι μεθυλιωμένο ή όχι στις 94 και στις 108 βάσεις, αντίστοιχα. Αναλυτικά οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- M1 (forward) 5'-GTGTTAACGCGTTGCGTATC-3'
- M2 (reverse) 5'-AACCCCGCGAACTAAAAACGA-3'
- U1 (forward) 5'-TTTGGTTGGAGTGTGTTAATGTG-3'
- U2 (reverse) 5'-CAAACCCACAACTAAAAACAA-3'

Η PCR ενίσχυσε 100ng τροποποιημένου DNA σε μία αντίδραση 25 μl που περιείχε 62.5 μM από κάθε τριφωσφορικό νουκλεοτίδιο, 20 pmoles από τον κάθε εκκινητή, 3.0 mM MgCl₂ και 0.8 U του ενζύμου Taq πολυμεράση (Qiagen). Οι συνθήκες της PCR ήταν: 5 min στους 94°C ακολουθούμενη από 37 κύκλους (94°C για 30 sec, 60°C για 30 sec, 72°C για 30 sec), και τέλος 4 min στους 72°C. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στο μηχάνημα PTC-200, MJ-Research (Watertown-Massachusetts) και τα προϊόντα PCR αναλύθηκαν σε γέλη αгарόζης 3% TBE.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Παρά το γεγονός ότι το *RASSF1A* είναι μεθυλιωμένο στους περισσότερους συμπαγείς όγκους, εκφράζεται σε όλα τα αιμοποιητικά κύτταρα, και έχει βρεθεί μεθυλιωμένο στο 0-20% των ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία και μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα, τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι πιθανώς δεν εμπλέκεται στην παθογένεση και εξέλιξη της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Donninger H, Vos MD, Clark GJ. The *RASSF1A* tumor suppressor. *J Cell Sci* 2007; 120:3163-3172.
2. Harada K, Toyooka S, Maitra A, Maruyama R, Toyooka KO, Timmons CF, Tomlinson GE, Mastrangelo D, Hay RJ, Minna JD and Gazdar AF. Aberrant promoter methylation and silencing of the *RASSF1A* gene in pediatric tumors and cell lines. *Oncogene* 2002, 21, 4345-4349.
3. Johan MF, Bowen DT, Frew ME, Goodeve AC, Reilly JT. Aberrant methylation of the negative regulators *RASSF1A*, *SHP-1* and *SOCS-1* in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2005; 129:60-65.