**Πτυχιακή Εργασία**

Μελέτη γενετικών παραλλαγών σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες

Ονοματεπώνυμο: Αναστασιάδου Αναστασία

**Περίληψη**

Τα Β λεμφοκύτταρα είναι εξειδικευμένος κυτταρικός πληθυσμός του ανοσοποιητικού συστήματος του ανθρώπου, υπεύθυνα για την εκτέλεση των δράσεων της χυμικής άνοσης απάντησης στο πλαίσιο της προσαρμοστικής ανοσίας. Κατά τη χυμική ανοσία, όταν ένα Β λεμφοκύτταρο αλληλεπιδράσει για πρώτη φορά με ένα διαλυτό αντιγόνο που αναγνωρίζει ο υποδοχέας του, θα πολλαπλασιαστεί και θα διαφοροποιηθεί σε Β κύτταρο μνήμης (memory B cell) και σε πλασματοκύτταρο (plasma cell). Τα Β λεμφοκύτταρα μνήμης μπορούν να αναγνωρίσουν αντιγόνα τα οποία έχουν ήδη αντιμετωπίσει στο παρελθόν και ενεργοποιούν μια πιο ισχυρή και άμεση άνοση απάντηση. Από την άλλη, τα πλασματοκύτταρα δεν εκφράζουν μεμβρανικό αντίσωμα, αλλά παράγουν και εκκρίνουν τα αντισώματα.

Οι αιματολογικές κακοήθειες ανήκουν στα νοσήματα του αιμοποιητικού ιστού και αποτελούν περίπου το 10% του συνόλου των καρκίνων. Στις αιματολογικές κακοήθειες ανήκουν οι λευχαιμίες, τα λεμφώματα, τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα και το πολλαπλούν μυέλωμα. Επιπλέον, οι λευχαιμίες υποδιαιρούνται σε χρόνιες και οξείες, ανάλογα με την κλινική πρόοδο της νόσου, όσο και σε λεμφικές και μυελικές, ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου που επηρεάζουν.

Μια από τις πιο κοινές λευχαιμίες είναι η Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (ΧΛΛ). Η ΧΛΛ αποτελεί την πιο κοινή μορφή λευχαιμίας στο Δυτικό ημισφαίριο, εμφανίζεται με σχεδόν διπλάσια συχνότητα (1,7:1) στους άντρες απ’ ό,τι στις γυναίκες και η διάμεση ηλικία των ασθενών κατά τη διάγνωση είναι τα 72 έτη. Χαρακτηρίζεται από τον πολλαπλασιασμό και την συσσώρευση Β κυττάρων στο αίμα, στον μυελό των οστών, στο σπλήνα και στους λεμφαδένες.

Η εξέλιξη της νόσου είναι αργή και διακρίνεται από μεγάλη κλινική ετερογένεια. Η διάγνωση της ασθένειας συνήθως πραγματοποιείται μετά από τυχαίο εργαστηριακό έλεγχο καθώς οι περισσότεροι ασθενείς είναι ασυμπτωματικοί κατά τη διάγνωση. Λόγω της μεγάλης κλινικής ετερογένειας, για να είναι εφικτή η διαχείριση της νόσου χρειάστηκε να αναζητηθούν προγνωστικοί παράγοντες, όπως είναι η κατάσταση σωματικής υπερμεταλλαξιγένεσης των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών (IGHV), αλλά επίσης και μεταλλάξεις γονιδίων, όπως οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *TP53*.

Το γονίδιο *TP53* (Tumor suppressor p53) είναι ογκοκατασταλτικό γονίδιο που μεταλλάσσεται συχνά σε διάφορους καρκίνους, όπως ο καρκίνος του πνεύμονα, οι οξείες λευχαιμίες αλλά και η ΧΛΛ. Φυσιολογικά εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα και η έκφρασή του αυξάνεται όταν υπάρχει κυτταρικό στρες. Η πρωτεΐνη p53, που παράγεται από το συγκεκριμένο γονίδιο, έχει χαρακτηριστεί ως ‘Guardian of the genome’ και λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο. Εάν ενεργοποιηθεί η έκφραση του γονιδίου και αυξηθεί η παραγωγή της πρωτεΐνης, η p53 στη συνέχεια θα οδηγήσει σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου. Έτσι, το κύτταρο θα έχει τον απαραίτητο χρόνο ώστε να επιδιορθώσει την βλάβη. Σε περίπτωση που δεν επιδιορθωθεί η βλάβη, τότε η p53 προάγει την απόπτωση του κυττάρου. Εφόσον όμως υπάρχει μετάλλαξη στο γονίδιο *TP53*, η πρωτεΐνη που θα παραχθεί δεν θα είναι λειτουργική. Το γεγονός αυτό είναι πιθανό να οδηγήσει σε ογκογένεση, αφού σε ενδεχόμενη βλάβη του DNA το κύτταρο δε σταματά την ανάπτυξή του.

Ένας από του βιοδείκτες που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην διαχείριση της ΧΛΛ είναι οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *TP53*, οι οποίες έχουν συσχετιστεί με δυσμενή έκβαση της ασθένειας, λόγω αντίστασης στη χημειοθεραπεία. Οι διαταραχές του γονιδίου *TP53* (έλλειψη στο χρωμόσωμα 17p όπου εντοπίζεται το γονίδιο ή μεταλλάξεις) ανιχνεύονται σε ποσοστό χαμηλότερο του 10-15% των ασθενών πριν τη χορήγηση θεραπείας.

Η ανίχνευση των διαταραχών του γονιδίου *TP53* στην κλινική ρουτίνα πραγματοποιείται με ποικίλες διαγνωστικές μεθόδους. Η έλλειψη τμήματος ή όλου του γονιδίου ανιχνεύεται κυρίως με φθορίζοντα in situ υβριδισμό (Fluorescent in situ hybridization, FISH). Ωστόσο, σημαντικό ποσοστό ασθενών με διαταραχές του γονιδίου *TP53* φέρουν σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο, οι οποίες μέχρι πρόσφατα ανιχνεύονταν κυρίως με αλληλούχιση κατά Sanger (μεθοδολογία χαμηλής ευαισθησίας με όριο ανίχνευσης: 15-20%). Η ανάπτυξη της μεθοδολογίας αλληλούχισης νέας γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS) που χαρακτηρίζεται από αυξημένη ευαισθησία καθώς και η διαθεσιμότητα εργαλείων και λογισμικών ικανών να αναλύσουν δεδομένα μεγάλης κλίμακας καθιστούν δυνατή την αξιόπιστη ανίχνευση μεταλλάξεων με συχνότητα εμφάνισης αλληλομόρφου (Variant Allele Frequency, VAF) έως και 2% σε υπο-κλώνους (minor subclones) λευχαιμικών Β κυττάρων.

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της ύπραξης *TP53-*μεταλλαγμένων μικροκλώνων με χρήση της μεθοδολογίας αλληλούχισης NGS σε ομάδα ασθενών με ΧΛΛ. Η ανίχνευση και αξιολόγηση των μεταλλάξεων χαμηλής συχνότητας μεταλλαγμένου αλληλομόρφου έως και 2% σε υπο-κλώνους λευχαιμικών Β κυττάρων που συνυπάρχουν με τον κυρίαρχο κλώνο του γονιδίου *TP53* συμβάλλει στη καλύτερη κλινική διαχείριση των ασθενών δίνοντας νέα δυναμική στον τομέα της μοριακής διαγνωστικής.

Στην παρούσα μελέτη, αναλύθηκαν 151 ασθενείς ΧΛΛ με πρόοδο νόσου, οι οποίοι ήταν αρνητικοί για *TP53* μικροκλώνους έπειτα από αλληλούχιση κατά Sanger. Διερευνήσαμε την ύπαρξη *TP53*-μεταλλαγμένων μικροκλώνων με χρήση μεθοδολογίας αλληλούχισης νέας γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS). Έπειτα από την αλληλούχιση NGS, στο 28,5% των περιπτώσεων ανιχνεύθηκαν παραλλαγές στο γονίδιο ΤΡ53 με VAF κυμαινόμενο μεταξύ 11,3% και 0,9% (υποκλωνική υποομάδα). Ακόμη, έπειτα από την συσχέτιση με την ολική επιβίωση (Overall Survival, OS) και την χρονική περίοδο έως την πρώτη γραμμή θεραπείας (time-to-first-treatment, TTFT) , παρατηρήθηκε ότι οι ασθενείς με μεταλλάξεις με χαμηλή συχνότητα μεταλλαγμένου αλληλομόρφου παρουσίασαν μικρότερη ολική επιβίωση, ενώ εμφάνισαν μεγαλύτερο TTFT σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν εμφάνισαν υποκλωνικές μεταλλάξεις.

Συνεπώς, η αλληλούχιση με NGS εμφανίζει μεγαλύτερη ακρίβεια και ειδικότητα, καθώς επίσης η παρουσία μεταλλάξεων *TP53* με χαμηλή συχνότητα αλληλομόρφου αποτελεί δυσμενή προγνωστικό παράγοντα στην εξέλιξη της νόσου. Χάρη στην υψηλή ευαισθησία της νέας αυτής τεχνικής καθίσταται εφικτό η ανεύρεση μικρών μεταλλαγμένων υποκλώνων. Έτσι, η αλληλούχιση νέας γενιάς θεωρείται ένα χρήσιμο εργαλείο για την ολοκληρωμένη εκτίμηση του ασθενούς.