

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΘΕΜΑ:

**«Εκτέλεση Ποσοτικής PCR για την ανίχνευση του υβριδικού
γονιδίου BCR/ABL σε ασθενείς με Χρόνια Μυελογενή
Λευχαιμία (ΧΜΛ)»**

Ρουμελιώτη Μαρία
ΑΜ: 1802147

Σεπτέμβριος 2007

- BB
07
0Y

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΘΕΜΑ:

**«Εκτέλεση Ποσοτικής PCR για την ανίχνευση του υβριδικού
γονιδίου BCR/ABL σε ασθενείς με Χρόνια Μυελογενή
Λευχαιμία (ΧΜΛ)»**

Ρουμελιώτη Μαρία
ΑΜ: 1802147

Σεπτέμβριος 2007



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 5875/1
Ημερ. Εισ.: 02-07-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2007
ΡΟΥ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087217

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Παναγιωτίδης Παναγιώτης, Επίκουρος Καθηγητής Αιματολογίας-Ανοσολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Κουρέτας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Μαμούρης Ζήσης, Αναπληρωτής Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ:

1. Πρόλογος	σελ. 5
2. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	6
3. Εισαγωγή	6
4. Επιδημιολογία και Αιτιολογία της ΧΜΛ	6
5. Κλινικά χαρακτηριστικά της ΧΜΛ	7
6. Μοριακή ανάλυση της νόσου	7
- Η αμοιβαία μετάθεση t(9;22)	7
- Δομή του υβριδικού γονιδίου bcr-abl και της υβριδικής πρωτεΐνης Bcr-Abl	9
- Απορρύθμιση της φυσιολογικής δράσης της Abl τυροσινικής κινάσης	12
- Βιολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων που εκφράζουν την υβριδική πρωτεΐνη Bcr-Abl	12
1) Ενεργοποίηση μιτωτικών μονοπατιών και αναστολή της απόπτωσης	12
2) Μειωμένη ικανότητα προσκόλλησης στο στρώμα του μυελού των οστών	14
7. Διάγνωση και εργαστηριακή παρακολούθηση των ασθενών με ΧΜΛ	15
- Καρυότυπος	15
- Τεχνική FISH	17
- PCR και RT-PCR	18
- Ποσοτική (Quantitative) PCR ή Q-PCR	22
1) Real time PCR με TagMan Probe	23
2) Ιχνηθέτες Hyprobe (Adjacent Hybridization)	24
3) Molecular Beacon	24
4) SYBR Green	25
8. Θεραπεία της ΧΜΛ	27
- Συμβατική θεραπεία	27
- Σύγχρονη μοριακή θεραπεία	28
9. Μοριακοί μηχανισμοί ανάπτυξης αντοχής στο imatinib mesylate	33
10. Συμπέρασμα	35

11. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	36
12. Απομόνωση RNA	36
13. RT (Reverse Transcriptase) – Ανάστροφη μεταγραφή RNA σε cDNA	40
14. Ποσοτική (Qualitative) PCR – Real Time PCR	41
15. Ασθενείς	46
16. Αποτελέσματα	47
17. Συμπεράσματα	49
18. Βιβλιογραφία	50

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Όπως σε όλες τις νεοπλασίες, έτσι και στις λευχαιμίες υπάρχουν επίκτητες γενετικές βλάβες, οι οποίες ευθύνονται για την δημιουργία της λευχαιμίας. Οι γενετικές αυτές βλάβες ανευρίσκονται μόνο στα λευχαιμικά κύτταρα του ασθενούς αλλά όχι στα υπόλοιπα φυσιολογικά του κύτταρα και μπορούν να ανιχνευθούν με μια ποικιλία μεθόδων:

- Καρυότυπος

Μοριακές τεχνικές:

- FISH (fluorescence in situ hybridization)
- Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) σε DNA ή σε RNA που παρασκευάζεται από δείγμα αίματος ή μυελού ασθενών με αιματολογική κακοήθεια
- Ποσοτική PCR, δηλαδή μέτρηση με ειδική PCR του "φορτίου" της υπό έλεγχο γονιδιακής βλάβης

Οι μοριακές τεχνικές αποτελούν τμήμα της καθημερινής πρακτικής στην εκτίμηση των αιματολογικών νοσημάτων. Ο εντυπωσιακός όγκος πληροφοριών που συλλέγονται παγκοσμίως από τις τεχνικές αυτές δημιουργούν τις προϋποθέσεις για την ανακάλυψη των μοριακών παθογενετικών μηχανισμών των λευχαιμιών. Πολλές από τις ανακαλύψεις που έχουν γίνει τα τελευταία χρόνια σε μοριακό επίπεδο μεταφράζονται σε εργαστηριακές δοκιμασίες και χρησιμοποιούνται στη διάγνωση, στον καθορισμό της πρόγνωσης και στην παρακολούθηση της πορείας των νοσημάτων ή της ανταπόκρισης στη θεραπεία.

Οι λευχαιμίες διαιρούνται στις οξείες (οξεία μυελογενής και οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία) και στις χρόνιες (χρόνια μυελογενής και χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία). Η παρούσα εργασία θα ασχοληθεί με τη Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία καθώς και την εφαρμογή της μοριακής τεχνικής της Ποσοτικής PCR για την ποσοτική μέτρηση του υβριδικού γονιδίου που είναι υπεύθυνο για τη δημιουργία της νόσου και τη σημασία αυτής της μέτρησης.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή

Η Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία (ΧΜΛ) είναι ένα αιματολογικό νόσημα που χαρακτηρίζεται από λευκοκυττάρωση, άωρες μορφές στο περιφερικό αίμα, βασεοφιλία, ηωσινοφιλία, θρομβοκυττάρωση και σπληνομεγαλία. Πρόκειται για ένα κλωνικό νόσημα που προέρχεται από ένα πολυδύναμο αιμοποιητικό κύτταρο. Τα παθολογικά κύτταρα της Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας παρουσιάζουν μια ειδική κυτταρογενετική ανωμαλία – το χρωμόσωμα Φιλαδέλφειας (Ph). Η ΧΜΛ αποτελεί το καλύτερα μελετημένο μοριακό μοντέλο λευχαιμίας. Με την βοήθεια δε της αλματώδους προόδου στις βιοϊατρικές επιστήμες και την βιοτεχνολογία έχουν αναπτυχθεί ικανές στοχευμένες μοριακές θεραπείες για την νόσο αυτή.

Επιδημιολογία και Αιτιολογία της ΧΜΛ

Η επίπτωση της νόσου είναι 1-2 περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα κάθε χρόνο. Η μέση ηλικία έναρξης της νόσου είναι τα 50 έτη, ενώ 12-30% των ασθενών με ΧΜΛ είναι άνω των 60 ετών. Σαφής διαφορά στη συχνότητα της νόσου ανάμεσα στα δυο φύλα δεν υπάρχει. Το 85% των περιπτώσεων με ΧΜΛ διαγιγνώσκεται στη χρόνια φάση της νόσου και περίπου στο 50% η διαγνωστική προσέγγιση ξεκινά από ευρήματα σε τυχαίο έλεγχο ρουτίνας. (βιβλιογραφία 1,2,3,4)

Στην πλειονότητα των περιπτώσεων δεν υπάρχει σαφές αίτιο της νόσου, ωστόσο σε μερικές περιπτώσεις έχει ενοχοποιηθεί η ιονίζουσα ακτινοβολία. Επιδημιολογικές μελέτες μετά την έκρηξη ατομικών βομβών στην Ιαπωνία το 1945 καθώς και σε άτομα με αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα τα οποία έλαβαν ακτινοθεραπεία, κατέδειξαν αυξημένη συχνότητα ΧΜΛ, συσχετίζοντας την ιονίζουσα ακτινοβολία με την ΧΜΛ. (1,2)

Κλινικά χαρακτηριστικά της ΧΜΛ

Αρκετοί ασθενείς είναι συνήθως ασυμπτωματικοί στη διάγνωση και παρουσιάζουν σε τυχαίο εργαστηριακό έλεγχο λευκοκυττάρωση (μέχρι και >200.000/μl) που μπορεί να συνδυάζεται με ήπια αναιμία και θρομβοπενία ή θρομβοκυττάρωση. Η συμπτωματολογία μπορεί να περιλαμβάνει αδυναμία, απώλεια βάρους και χαμηλή πυρετική κίνηση. Κατά την κλινική εξέταση συχνά ανευρίσκεται σπληνομεγαλία. (1,2)

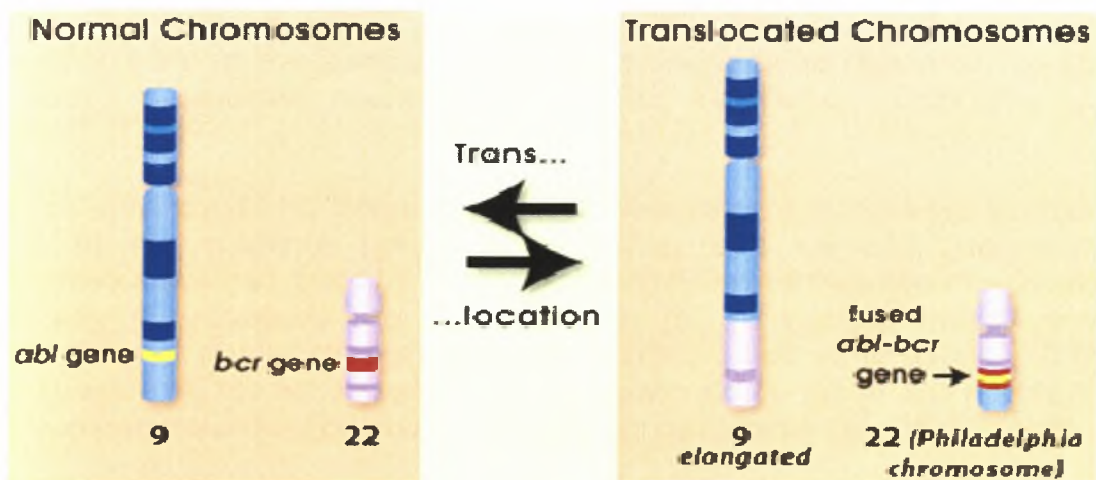
Η διάγνωση γίνεται συνήθως στη χρόνια φάση της νόσου η οποία χαρακτηρίζεται από ήπια συμπτώματα. Χωρίς ειδική θεραπευτική αγωγή και μετά πάροδο 3 έως 8 ετών από τη διάγνωση ακολουθεί μια οξεία φάση που χαρακτηρίζεται από σημαντική αύξηση βλαστικών, άωρων κυττάρων στην κυκλοφορία (5,6) (βλαστική κρίση), διαρκεί μερικούς μήνες και καταλήγει σε θάνατο (7). Συχνά μεταξύ χρόνιας φάσης και βλαστικής κρίσης υπάρχει μια σύντομη επιταχυνόμενη φάση που χαρακτηρίζεται από σταδιακή αύξηση βλαστικών κυττάρων του περιφερικού αίματος, προοδευτική επιδείνωση της αναιμίας, θρομβοπενία και αυξανόμενη σπληνομεγαλία. Η μέση επιβίωση χωρίς ειδική θεραπεία είναι 3-5 χρόνια. (1,2)

Μοριακή ανάλυση της νόσου

Η αμοιβαία μετάθεση t(9;22)

Οι Nowell και Hungerford έθεσαν το 1960 τη μοριακή βάση της ΧΜΛ με την σημαντική ανακάλυψη του χρωμοσώματος Φιλαδέλφειας (Philadelphia-Ph) (5). Το χρωμόσωμα Ph αποτελεί το κύριο κυτταρογενετικό στοιχείο της νόσου (6). Προκύπτει από αμοιβαία μετάθεση μεταξύ των μακρών σκελών των χρωμοσωμάτων 9 και 22 [t(9;22)(q34;q11)] (7) (εικόνα 1) με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός μικρότερου σε μέγεθος χρωμοσώματος 22 (χρωμόσωμα Φιλαδέλφεια) και ενός επιμηκυσμένου χρωμοσώματος 9. Τα σημεία τομής της μετάθεσης βρίσκονται στο χρωμόσωμα 9 στην περιοχή 9q34 όπου εδράζεται το γονίδιο Abelson (abl) και στο χρωμόσωμα 22 στην περιοχή 22q11 όπου εδράζεται το γονίδιο bcr (breakpoint cluster region) (6-9). Το φυσιολογικό γονίδιο abl κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια των κινασών τυροσίνης. Η πρωτεΐνη Abl εκφράζεται ευρέως από όλα τα κύτταρα και παίζει ρόλο στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (10), στην κυτταρική απάντηση σε βλάβη DNA (11) και την μεταβίβαση πληροφορίας από τον εξωκυττάριο στον ενδοκυττάριο χώρο μέσω του συστήματος σηματοδότησης των ιντεγκρινών (12).

Η αντιμετάθεση t(9;22) έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός χιμαιρικού γονιδίου που λέγεται bcr/abl. Το χιμαιρικό αυτό γονίδιο μεταγράφεται σε RNA και στη συνέχεια μεταφράζεται σε πρωτεΐνη, τη χιμαιρική πρωτεΐνη Bcr/Abl που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και έχει δραστηριότητα κινάσης τυροσίνης.



Εικόνα 1 : Η αμοιβαία μετάθεση t(9;22)(q34;q11). Σχηματική αναπαράσταση.

Το Bcr πρωτεϊνικό τμήμα στη χιμαιρική πρωτεΐνη Bcr-Abl, που προκύπτει από την αντιμετάθεση, προάγει τον διμερισμό της, έτσι ώστε τα δύο πλέον πρωτεϊνικά μόρια Bcr-Abl αλληλοφωσφορυλιώνονται σε περιοχές τυροσίνης (13,14). Η φωσφορυλίωση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα τη συνεχή ενεργοποίηση της χιμαιρικής πρωτεΐνης, η οποία είναι πλέον ικανή να προκαλεί κακοήθη μετασχηματισμό του κυττάρου μέσω διακοπής προσκόλλησης των πρόδρομων αιμοποιητικών κυττάρων στο στρώμα του μυελού των οστών, μέσω ενεργοποίησης μιτωτικών μονοπατιών καθώς και αναστολής της απόπτωσης (9,13-15). Η χιμαιρική αυτή πρωτεΐνη λειτουργεί έτσι σαν μια ογκοπρωτεΐνη με λευχαιμογόνο δράση (14) .

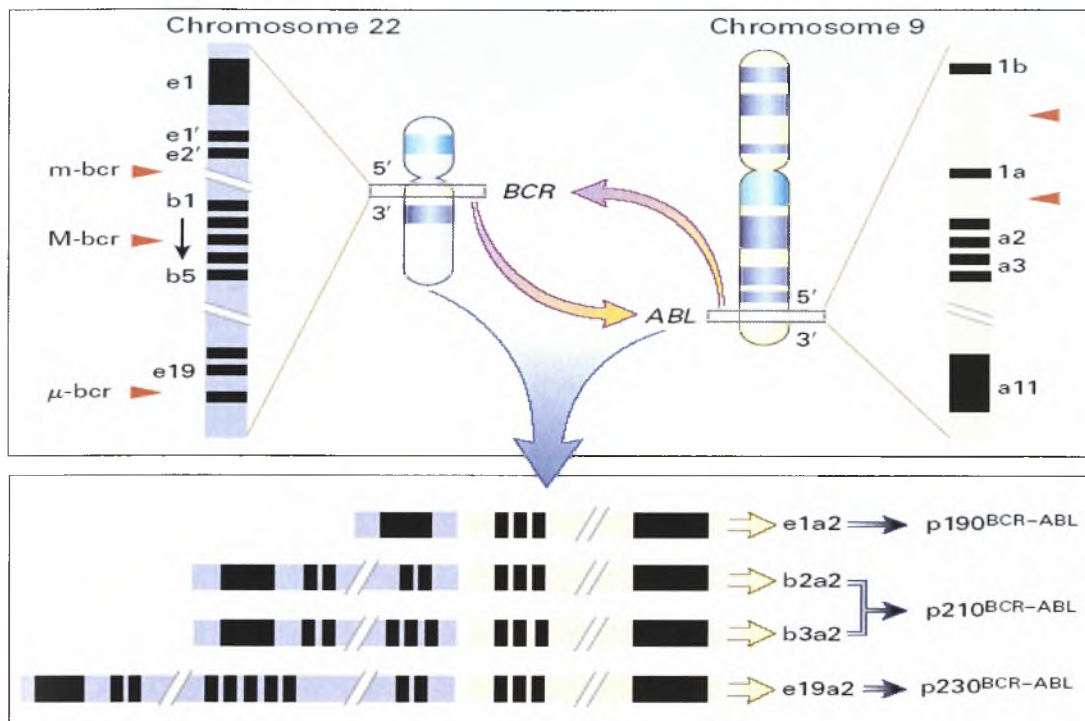
Δομή του χιμαιρικού γονιδίου *bcr-abl* και της χιμαιρικής πρωτεΐνης *Bcr-Abl*

Τα σημεία τομής στα γονίδια *abl* και *bcr* (εικόνα 2) ποικίλουν με αποτέλεσμα από το χιμαιρικό γονίδιο *bcr-abl* να παράγονται διαφορετικά μετάγραφα που ακολούθως κωδικοποιούν διαφορετικές σε μέγεθος πρωτεΐνες. Η αλληλουχία του *bcr* συντήκεται σχεδόν πάντα στο εξώνιο a2 του *abl*. Το σημείο τομής στο γονίδιο *bcr* ενδέχεται να βρίσκεται στις εξής περιοχές(3,17-19):

α) Στην περιοχή m-*bcr* (minor breakpoint cluster region), η οποία έχει μέγεθος 54kb. Το χιμαιρικό mRNA που προκύπτει σε αυτήν την περίπτωση έχει μέγεθος 7 kb, με το εξώνιο e1 του *bcr* να ενώνεται με το εξώνιο a2 του *abl* (e1a2). Η χιμαιρική πρωτεΐνη έχει μέγεθος 190kDa και αναφέρεται ως p190^{BCR-ABL}(17).

β) Στην περιοχή M-*bcr* (Major breakpoint cluster region), η οποία έχει μέγεθος 5.8 kb και εκτείνεται μεταξύ των εξωνίων e12 και e16 (παλιότερα αναφερόμενα ως b1 έως b5). Το σημείο τομής βρίσκεται ανάμεσα στα εξώνια 13 και 14 ή ανάμεσα στα εξώνια 14 και 15. Το χιμαιρικό mRNA που προκύπτει σε αυτήν την περίπτωση έχει μέγεθος 8.5kb, με το εξώνιο e13 (ή το εξώνιο e14) του *bcr* να ενώνεται με το εξώνιο a2 του *abl* (e13a2 ή e14a2). Η χιμαιρική πρωτεΐνη έχει μέγεθος 210kDa και αναφέρεται ως p210^{BCR-ABL}(8).

γ) Στην περιοχή μ-*bcr* (micro breakpoint cluster region) η οποία βρίσκεται στο 3' άκρο του *bcr*. Η χιμαιρική πρωτεΐνη (e19a2) στην περίπτωση αυτή έχει μέγεθος 230kDa και αναφέρεται ως p230^{BCR-ABL} (19).



Εικόνα 2 : Σχηματική αναπαράσταση των διαφορετικών χιμαιρικών γονιδίων bcr-abl που προκύπτουν ανάλογα με τα σημεία τομής στα γονίδια bcr και abl (βλ. κείμενο για επεξηγήσεις) Τα εξώνια b1 έως b5 αναφέρονται πλέον ως e12 έως e16 αντίστοιχα. (3)

Ανεξάρτητα με τον τύπο της χιμαιρικής πρωτεΐνης που προκύπτει κάθε φορά, η πρωτεΐνη Bcr-Abl φέρει, όπως φαίνεται στην εικόνα 3:

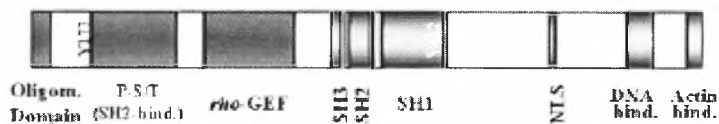
A) στο τμήμα Bcr

1. μια περιοχή ολιγομερισμού (Oligomerization domain),
2. την τυροσίνη 177 (Y177) που αποτελεί θέση πρόσδεσης της πρωτεΐνης Grb-2,
3. μια περιοχή πλούσια σε φωσφο-σερίνη/θερονίνη (P-S/T) που αποτελεί θέση πρόσδεσης SH2 περιοχών άλλων πρωτεϊνών και
4. μια rho-GEF περιοχή,

B) στο τμήμα Abl

1. τις περιοχές SH3 και SH2 (src-homology 3 και 2),
2. την περιοχή SH1 (περιοχή κινάσης) με την κύρια θέση αυτοφωσφορύλιωσης (Y412),
3. την περιοχή NLS (nuclear localization signal) και
4. την περιοχή σύνδεσης με το DNA και με την ακτίνη.

Αρκετές από αυτές της περιοχές μπορεί να αποτελέσουν θεραπευτικούς στόχους για την καταστολή της λευχαιμογόνου δράσης της πρωτεΐνης Bcr-Abl. (13,15)



Εικόνα 3 : Σχηματική αναπαράσταση των λειτουργικών περιοχών της πρωτεΐνης Bcr-Abl. (15)

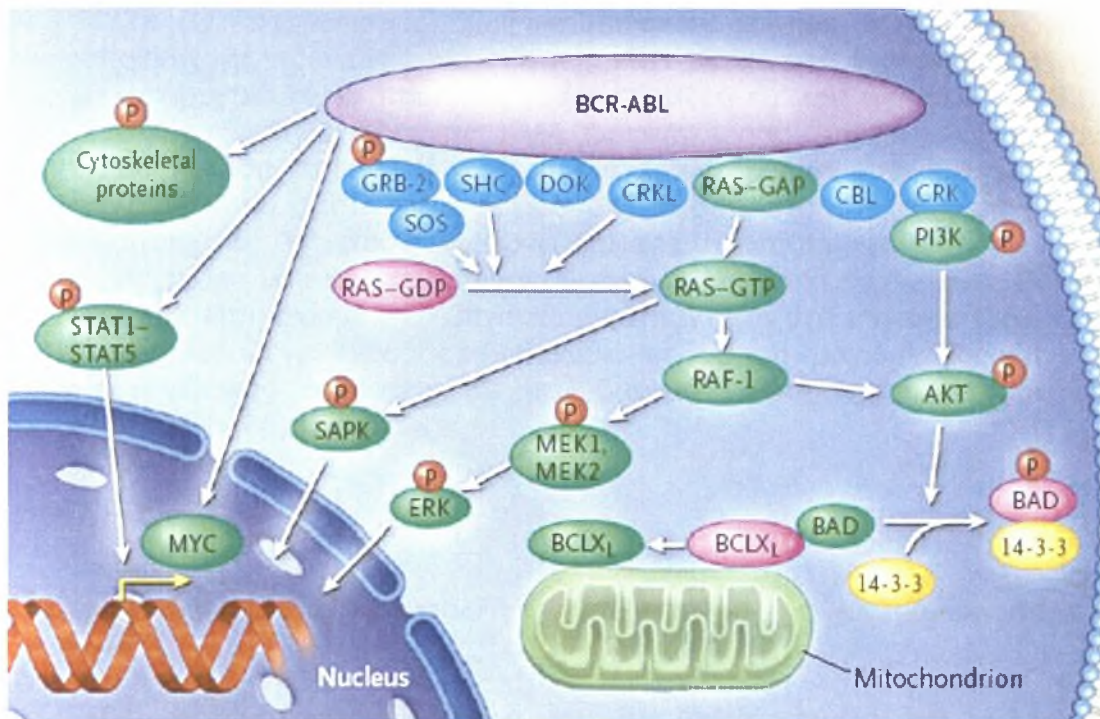
Απορρύθμιση της φυσιολογικής δράσης της Abl τυροσινικής κινάσης

Το ογκογόνο δυναμικό του bcr-abl γονιδίου οφείλεται στην ικανότητα της χιμαιρικής Bcr-Abl πρωτεΐνης να επηρεάζει διάφορα μονοπάτια μεταγωγής σήματος στο κύτταρο προκαλώντας αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, εξασθενημένη κυτταρική απάντηση στα αποπτωτικά μηνύματα-ερεθίσματα και μειωμένη ικανότητα προσκόλλησης στο στρώμα του μυελού των οστών (13-15). Στο φυσιολογικό κύτταρο κάτω από φυσιολογικές συνθήκες υπάρχει πολύ λεπτή και αυστηρή ρύθμιση της δραστηριότητας της Abl κινάσης. Στα λευχαιμικά όμως κύτταρα που φέρουν το χρωμόσωμα Ph, σύντηξη του γονιδίου bcr στο 5' άκρο του γονιδίου abl οδηγεί σε συνεχή και ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση αυτής της κινάσης τυροσίνης. Όπως ήδη έχει αναφερθεί η παρουσία της Bcr προάγει τον ολιγομερισμό της Bcr-Abl πρωτεΐνης, έτσι ώστε τα μόρια σχηματίζουν διμερή και μπορούν να αυτό- και αλληλο-φωσφορυλιώνονται σε περιοχές κινάσης τυροσίνης και έτσι να ενισχύεται η δραστηριότητα της κινάσης (14,15,27). Η συνεχής ενεργοποίηση των πολλαπλών μονοπατιών μεταγωγής σήματος που έπονται οδηγεί στη κακοήγη μεταμόρφωση των κυττάρων που φέρουν το χρωμόσωμα Ph, και τη δημιουργία της Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας.

Βιολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων που εκφράζουν τη χιμαιρική πρωτεΐνη Bcr-Abl

A) Ενεργοποίηση μιτωτικών μονοπατιών και αναστολή της απόπτωσης

Στα λευχαιμικά κύτταρα ατόμων με ΧΜΛ πολλά μιτωτικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος ανευρίσκονται ενεργοποιημένα (εικόνα 4). Η πρωτεΐνη Bcr-Abl έχει θέσεις σύνδεσης για τις SH2 περιοχές άλλων πρωτεϊνών, όπως οι Grb-2, Shc και Crkl31. Μετά την πρόσδεσή τους στη χιμαιρική πρωτεΐνη, φωσφορυλιώνονται, ενεργοποιούνται και με τη σειρά τους ενεργοποιούν το μονοπάτι μεταγωγής σήματος της πρωτεΐνης Ras. Η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη Ras στρατολογεί κοντά στην κυτταρική μεμβράνη την κινάση σερίνης/θρεονίνης Raf-1, η οποία ενεργοποιεί την οδό των MAP κινασών (MAPK mitogen-activated protein kinase) (28). Υπάρχουν τέσσερις διαφορετικές ομάδες κινάσης MAPK που εμπλέκονται σε αυτή την οδό, οι ERK 1 και 2 (extracellular signal-related kinases), οι JNK 1,2 και 3 (Jun amino-terminal kinases), οι πρωτεΐνες p38 (p38α/β/γ/δ) και MEK 1 και 2. Τα τελικά μόρια αυτού του μονοπατιού εισέρχονται στον πυρήνα, προσδένονται σε περιοχές του DNA, όπου ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό, τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση (29).



Εικόνα 4 : Σχηματική αναπαράσταση των βιοχημικών μονοπατιών μεταγωγής σήματος που επηρεάζονται από την πρωτεΐνη Bcr-Abl. (13) (για λεπτομέρειες βλ. κείμενο)

Στα κύτταρα της ΧΜΛ υπάρχει αναστολή της απόπτωσης αλλά ο ακριβής μηχανισμός με το οποίο τα λευχαιμικά κύτταρα διαφεύγουν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο μέσω της Bcr-Abl χιμαιρικής πρωτεΐνης δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί (9). In vitro πειράματα σε κυτταρικές σειρές που εκφράζουν την Bcr-Abl, δείχνουν ότι τα κύτταρα αυτά, ακόμη και αν στερηθούν αυξητικούς παράγοντες ή εκτεθούν σε παράγοντες βλάβης του DNA, έχουν αυξημένη αντίσταση στην απόπτωση (37-39). Η πρωτεΐνη Bcr-Abl φαίνεται ότι εμποδίζει την απελευθέρωση κυτοχρώματος C από τα μιτοχόνδρια και την ενεργοποίηση της κασπάσης-3. Αποτέλεσμα αυτού είναι τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος της Ras και της PI-3K να ενεργοποιούν την Bcl-2, η οποία με τη σειρά της απενεργοποιεί την αποπτωτική πρωτεΐνη Bad (40, 41) κάτι που οδηγεί σε μειωμένη απόπτωση (Εικόνα 4).

Επιπλέον, η Bcr-Abl σχηματίζει σύμπλοκα με τις πρωτεΐνες Crk, Cbl, Crkl και PI-3K, που επηρεάζουν και αποσυντονίζουν το μονοπάτι της κινάσης PI-3 (32). Ο σχηματισμός των συμπλόκων αυτών καταλήγει στην ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Akt, η οποία είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης που μπλοκάρει μια κύρια πρωτεΐνη του κυτταρικού κύκλου την p27Kip1 (33). Έτσι τα λευχαιμικά κύτταρα της ΧΜΛ διαφεύγουν το σημείο ελέγχου του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1, τα κύτταρα μπαίνουν στη φάση S και πολλαπλασιάζονται με αυξημένο ρυθμό (34). Ακόμη, στο μονοπάτι της PI-3K η ενεργοποιημένη Akt φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί την Bad, η οποία πλέον δεν μπορεί να απενεργοποιήσει τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-xL και Bcl-2, και έτσι έχουμε αντι-αποπτωτική απάντηση στα κύτταρα (35). Τα παραπάνω δεδομένα έχουν επιβεβαιωθεί με χρήση μικροσυστοιχιών σε μελέτες γονιδιακής έκφρασης σε πολυδύναμα κύτταρα που φέρουν το χρωμόσωμα Ph (36) (Εικόνα 4).

B) Μειωμένη ικανότητα προσκόλλησης στο στρώμα του μυελού των οστών (14,42,43)

Τα κύτταρα που εκφράζουν την Bcr-Abl παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα προσκόλλησης στο στρώμα του μυελού των οστών και γενικά τον εξωκυττάριο σκελετό, πιθανόν λόγω διαταραχής στο σύστημα των πρωτεϊνών που ανήκουν στην οικογένεια των ιντεγκρινών και οι οποίες έχουν να κάνουν με την κυτταρική προσκόλληση και επικοινωνία με την εξωκυττάρια ουσία (42,43). Έτσι στερούνται τα απαραίτητα ερεθίσματα ανάπτυξης που φυσιολογικά παρέχονται στα φυσιολογικά προσκολλημένα στο στρώμα του μυελού προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα. Είναι προφανές λοιπόν πως τα λευχαιμικά κύτταρα της ΧΜΛ, που έχουν πλέον χάσει την ικανότητα προσκόλλησης στο μυελό των οστών, εισέρχονται στην κυκλοφορία σαν ανώριμα κύτταρα.

Διάγνωση και εργαστηριακή παρακολούθηση των ασθενών με ΧΜΛ

Η διάγνωση και παρακολούθηση των ασθενών με Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία γίνεται με:

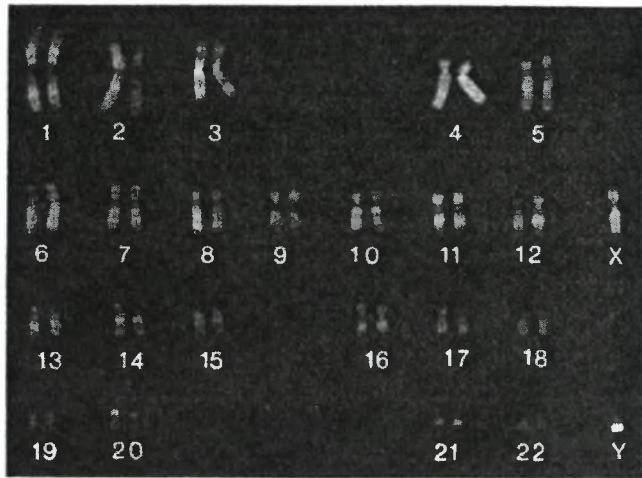
A. Καρυότυπο

B. FISH (fluorescence in situ hybridization)

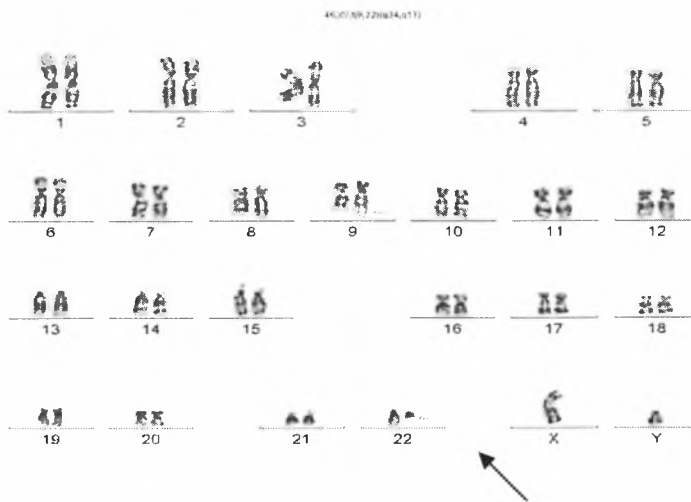
Γ. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) και ποσοτική PCR (quantitative, Q-PCR), δηλαδή μέτρηση με ειδική PCR του "φορτίου" της νόσου. Η Q-PCR, αποτελεί σήμερα το κύριο εργαλείο για την μοριακή παρακολούθηση της νόσου και την ανταπόκριση στις σύγχρονες μοριακές θεραπείες.

A) Καρυότυπος

Ποσότητα μυελού των οστών προστίθεται σε υλικό κυτταρικής καλλιέργειας και καλλιεργείται για 24-72 ώρες. Στη συνέχεια προστίθενται αναστολείς των μικροσωληνίσκων όπως κολχικίνη που σταματούν τα διαιρεμένα κύτταρα στην φάση της μετάφασης. Παρασκευάσματα μεταφασικών χρωμοσωμάτων χρωματίζονται με κατάλληλες χρωστικές και αναλύονται σε μικροσκόπιο για τυχόν αλλαγές στον αριθμό και τη δομή τους (εικόνα 5α, 5β).



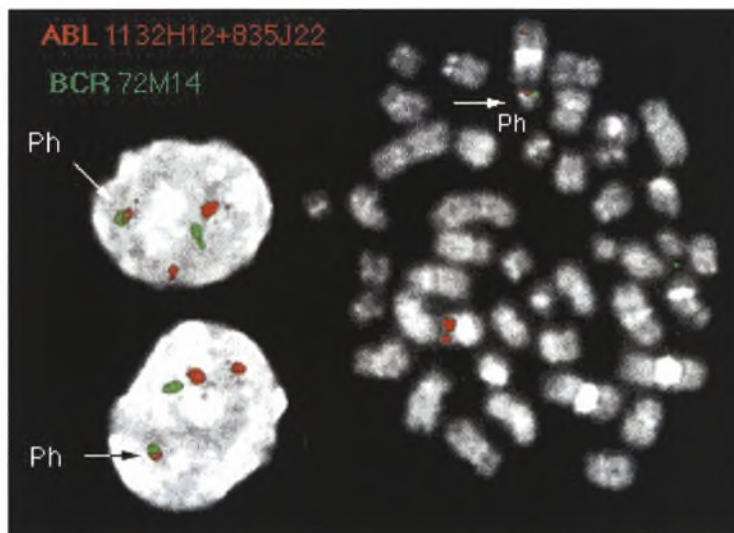
Εικόνα 5α : Φυσιολογικός καρύοτυπος (46 XY)



Εικόνα 5β : Καρύοτυπος ασθενούς που φέρει την κυτταρογενετική βλάβη t(9;22) (βέλος)

B) Τεχνική FISH

Η FISH είναι πολλή χρήσιμη στην ανίχνευση συγκεκριμένων χρωμοσωμικών ανωμαλιών, μπορεί να γίνει σε δείγμα αίματος, μυελού των οστών, εντυπώματα, βιολογικά υγρά και σε τομές παραφίνης. Η FISH υπερνικά ένα κλασσικό πρόβλημα της κυτταρογενετικής ανάλυσης, την ανάγκη ύπαρξης μεταφάσεων, καθώς μπορεί να εκτελεστεί σε κύτταρα που βρίσκονται σε μετάφαση ή σε μεσόφαση. Στη FISH, DNA ιχνηθέτες σημασμένοι με φθοριόχρωμα, χρησιμοποιούνται στην ανίχνευση χρωμοσωμικών αντιμεταθέσεων, απάλειψης τμημάτων χρωμοσωμάτων και στην ανίχνευση έλλειψης ή περίσσειας χρωμοσωμάτων. Η FISH είναι ιδιαίτερα χρήσιμη σε περιπτώσεις που χρωμοσωμικές μεταθέσεις δεν μπορούν να ανιχνευθούν με PCR.



Εικόνα 6 : Στην εικόνα φαίνεται με την χρήση του υβριδισμού ο εντοπισμός του γονιδίου ABL (κόκκινο) και του γονιδίου BCR (πράσινο) καθώς και του υβριδικού γονιδίου στο ανώμαλο χρωμόσωμα Φιλαδέλφεια (πράσινο και κόκκινο).

γ) PCR και RT – PCR

Η PCR (Polymerase Chain Reaction-Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης) είναι η τεχνική που χρησιμοποιείται περισσότερο στην καθημερινή πρακτική των διαγνωστικών και ερευνητικών εργαστηρίων, λόγω των πλεονεκτημάτων που παρουσιάζει:

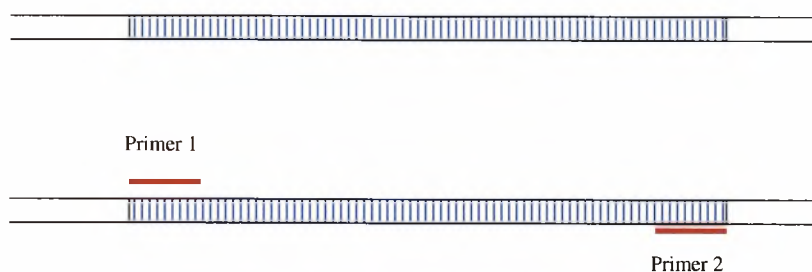
- Απαιτείται λίγος χρόνος για την εκτέλεσή της.
- Μπορεί να χρησιμοποιηθεί DNA ή RNA
- Απαιτείται μικρή ποσότητα δείγματος
- Μπορεί να χρησιμοποιηθεί αρχειακό υλικό.

Στην αντίδραση PCR, χρησιμοποιείται μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση (όπως είναι η πολυμεράση Taq- που προέρχεται από το βακτήριο *Thermus aquaticus*) για να πολλαπλασιαστεί ένα συγκεκριμένο τμήμα DNA, που περιλαμβάνεται μεταξύ δύο περιοχών των οποίων οι αλληλουχίες είναι γνωστές (εικόνα 7). Οι DNA πολυμεράσες αντιγράφουν μια έλικα προσθέτοντας νουκλεοτίδια σε ένα προϋπάρχον 3' άκρο και παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη ενζυμική τους δραστηριότητα σε συγκεκριμένες θερμοκρασίες (η Taq πολυμεράση στους 72⁰C).



Εικόνα 7: Σύνθεση DNA

Σε μια αντίδραση PCR το 3' άκρο παρέχεται με τη χρησιμοποίηση συνθετικών, βραχέων ολιγονουκλεοτιδίων (primers) μονής έλικας, μήκους συνήθως 20-25 βάσεων, που είναι συμπληρωματικά των περιοχών του DNA που βρίσκονται στα δύο άκρα του τμήματος του DNA που θα πολλαπλασιαστεί με την αντίδραση (εικόνα 8):

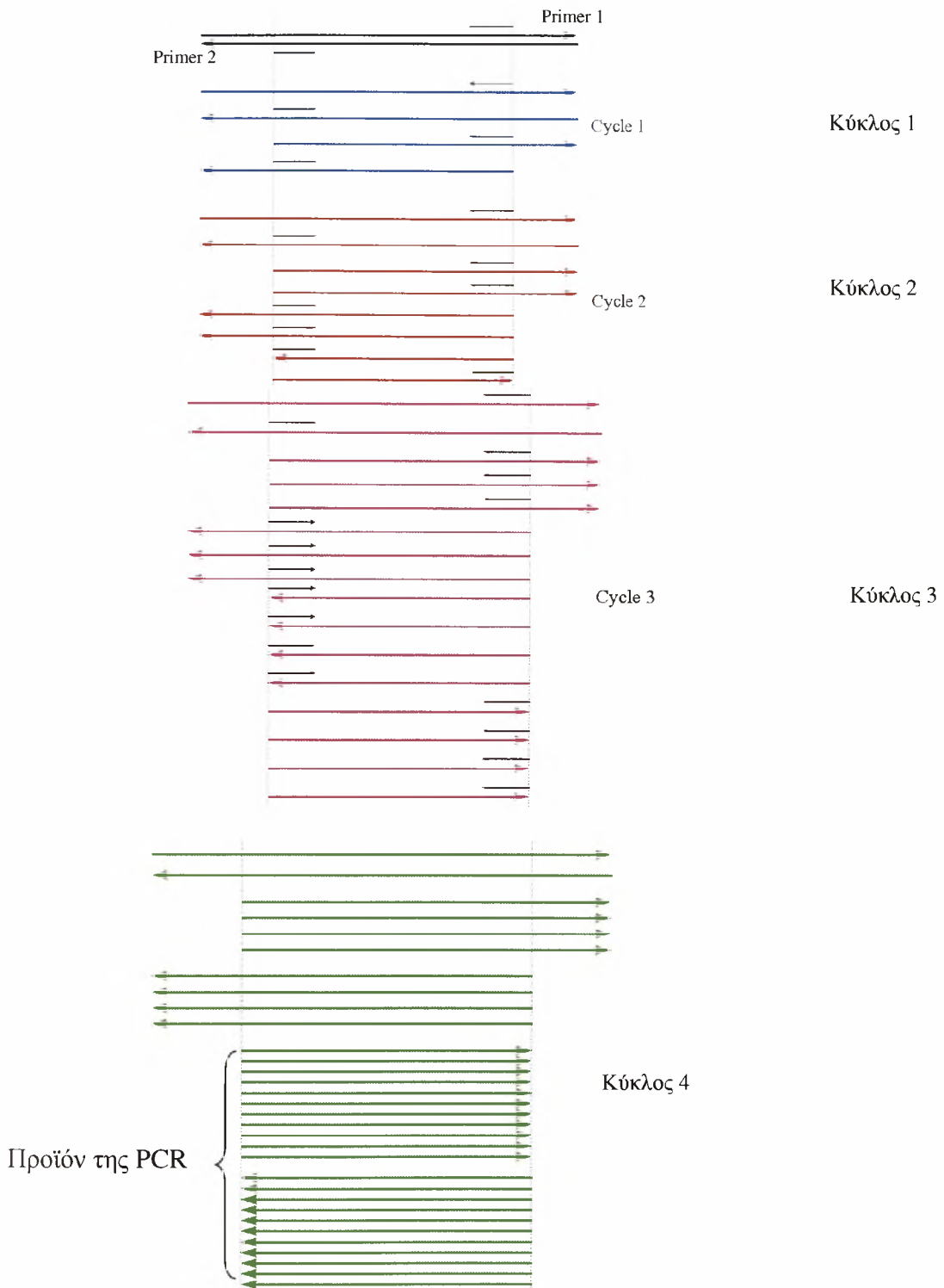


Εικόνα 8: Επιλογή κατάλληλων primers για πολλαπλασιασμό του επιθυμητού τμήματος DNA

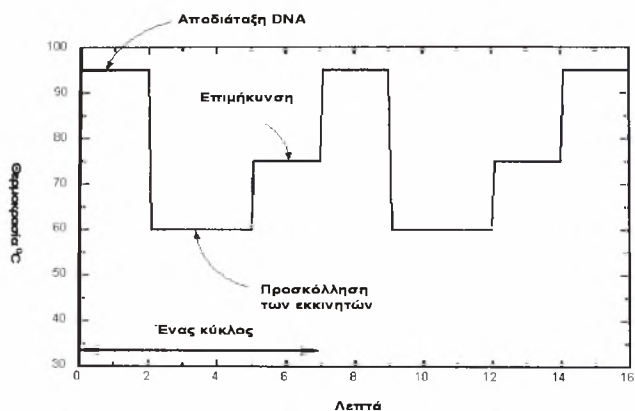
Η σχεδίαση και επιλογή των primers είναι από τα πιο σημαντικά στοιχεία στην PCR: πρέπει να μην παρουσιάζουν ομολογία με άλλες περιοχές του DNA και να μην είναι συμπληρωματικοί μεταξύ τους. Κάθε κύκλος στην PCR αντίδραση αποτελείται από 3 βήματα:

1. αποδιάταξη του DNA σε δύο μονές έλικες (denaturing), σε θερμοκρασία 95°C
2. πρόσδεση των primers στο DNA (annealing)
3. επιμήκυνση των primers (extension), με τη βοήθεια της πολυμεράσης (στους 72°C στην περίπτωση της Taq).

Ο κύκλος αυτός επαναλαμβάνεται 30 με 40 φορές.



Εικόνα 9: Κύκλοι και Προϊόντα PCR



Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση των γεγονότων που συμβαίνουν σε μια PCR αντίδραση

Κλασσικά η PCR είναι μια ποιοτική τεχνική, ανιχνεύοντας την παρουσία, απουσία ή τη μεταβολή μεγέθους μιας συγκεκριμένης DNA αλληλουχίας. Διάφορες παραλλαγές της κλασσικής PCR έχουν αναπτυχθεί και βρίσκονται σε χρήση. Στην RT-PCR (reverse-transcription PCR), το ένζυμο ανάστροφη μεταγραφάση (RT) δημιουργεί συμπληρωματικό DNA αντίγραφο (complementary DNA (cDNA) από ολικό mRNA που απομονώνεται από τα προς εξέταση κύτταρα. Το cDNA αυτό χρησιμοποιείται σαν υπόστρωμα στη συνέχεια σε PCR αντίδραση. Η RT – PCR έχει την δυνατότητα να εντοπίζει RNA μετάγραφα με τόσο ευαισθησία ώστε μπορεί να ανιχνευθεί ένα λευχαιμικό κύτταρο ανάμεσα σε 10^5 μη λευχαιμικά κύτταρα.



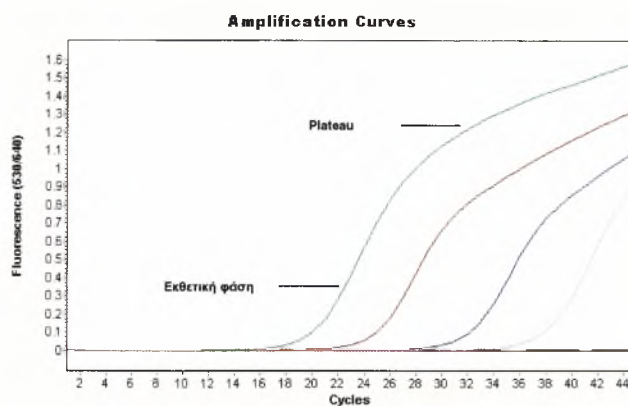
Εικόνα 11: Συσκευές που χρησιμοποιούνται σε εργαστήρια για την πραγματοποίηση της PCR

Δ) Ποσοτική (Quantitative) PCR ή Q-PCR

Μια παραλλαγή της κλασσικής PCR, η ποσοτική PCR σε «πραγματικό χρόνο» (real-time PCR), χρησιμοποιείται στην εκτίμηση του αριθμού αντιγράφων φυσιολογικών και παθολογικών γονιδίων (πχ χιμαιρικών γονιδίων) ή της έκφρασης mRNA αυτών των γονιδίων. Η Real-time PCR διευκολύνει την αξιόπιστη ανίχνευση και μέτρηση των προϊόντων που παράγονται κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου της PCR που είναι σε άμεση αναλογία με το ποσό του αρχικού αριθμού αντιγράφων στο δείγμα. Αυτό επιτυγχάνεται με μια μέθοδο στην οποία ανιχνεύονται τα προϊόντα που παράγονται σε πραγματικό χρόνο (real time) και στην οποία χρησιμοποιούνται φθορίζοντες ιχνηθέτες και μια συσκευή PCR που προσαρμόζεται στο να καταγράφει τα αποτελέσματα κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου PCR.

Η Real-time PCR είναι η προτιμώμενη τεχνολογία για ποσοτική PCR επειδή καταγράφει τη συσσώρευση προϊόντων κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης του πολλαπλασιασμού. (προτιμότερο από τη μέτρηση του τελικού προϊόντος στη φάση πλατώ).

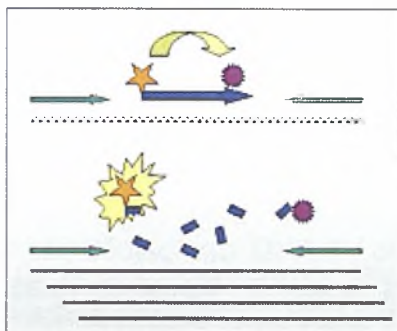
Εφόσον σε κάθε πείραμα περιλαμβάνονται γνωστές συγκεντρώσεις των αλληλουχιών στόχων, κατασκευάζεται μια σταθερή καμπύλη και υπολογίζεται ποσοτικά η ύπαρξη των αλληλουχιών στόχων σε ένα εξεταζόμενο δείγμα. Στις περισσότερες περιπτώσεις υπολογίζεται και η συγκέντρωση ενός σταθερά εκφραζόμενου γονιδίου (γονίδιο αναφοράς) και η ύπαρξη ενός μετάγραφου γονιδίου δίδεται ως λόγος μετάγραφου / μετάγραφο γονιδίου αναφοράς (εικόνα 12).



Εικόνα 12: Real-time PCR. Ο αριθμός των κύκλων της PCR βρίσκεται στον άξονα χ και η εκπεμπόμενη φθορίζουσα ακτινοβολία στον άξονα ψ. Ο κύκλος στον οποίο ανιχνεύεται για πρώτη φορά εκπεμπόμενο σήμα εξαρτάται από την ποσότητα του ανιχνευόμενου υποστρώματος (cDNA) στο δείγμα υπό εξέταση.

Στην PCR σε πραγματικό χρόνο (real-time) χρησιμοποιούνται διαφορετικές τεχνολογίες που το κοινό τους χαρακτηριστικό είναι η μέτρηση εκπεμπόμενου φθορισμού από μόρια τα οποία προσκολλώνται στο DNA. Η εκπεμπόμενη φθορίζουσα ακτινοβολία από τα μόρια αυτά είναι περισσότερη όσο περισσότερο ειδικό προϊόν σχηματίζεται κατά τη φάση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

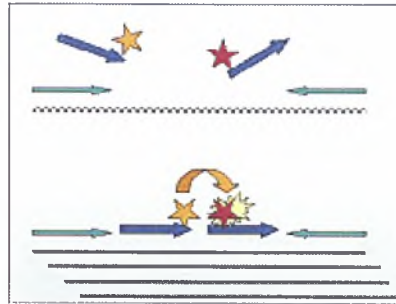
1. Real-time PCR με TaqMan probe.



Εικόνα 13: Ιχνηθέτης TaqMan, τρόπος δράσης του.

Οι ιχνηθέτες TaqMan είναι ολιγονουκλεοτίδια μονής έλικας που περιέχουν ένα φθοριόχρωμα (reporter) και ένα αναστολέα (quencher) σε απόσταση 3 με 30 βάσεων. Ο ιχνηθέτης TaqMan υβριδίζεται στο προς εξέταση παραγόμενο PCR προϊόν, που καθορίζεται από τους χρησιμοποιούμενους εκκινητές, έχοντας ως υπόστρωμα DNA ή cDNA. Κατά τη διάρκεια του αντιγραφής της αλυσίδας DNA αρχίζοντας από το 5' άκρο της, ο ιχνηθέτης υδρολύεται από τη δράση της πολυμεράσης Taq με αποτέλεσμα τον αποχωρισμό του reporter από τον quencher και την εκπομπή φθορισμού. Ο εκλούμενος φθορισμός ανιχνεύεται μετά κάθε κύκλο πολλαπλασιασμού, καταγράφεται και αναλύεται με ειδικό λογισμικό.

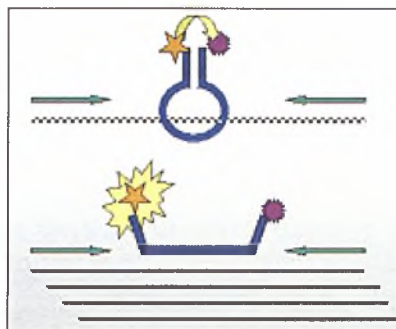
2. Ιχνηθέτες HybProbe (Adjacent Hybridization).



Εικόνα 14: Ιχνηθέτες HybProbe

Μια άλλη τεχνολογία που χρησιμοποιείται στην ποσοτική PCR είναι η χρήση δύο ιχνηθετών που φέρουν φθοριόχρωμα. Οι ιχνηθέτες προσκολλώνται σε γειτονικές θέσεις στο DNA (ή cDNA): "kissing probes" ή HybProbe. Η μεταφερόμενη ενέργεια (FRET= Fluorescence resonance energy transfer) από τον ένα ιχνηθέτη στον άλλο έχει σαν αποτέλεσμα την εκπομπή φθορισμού από τον τελευταίο η οποία προσμετράται από τη συσκευή ποσοτικής PCR (εικόνα 14).

3. Molecular Beacon



Εικόνα 15: Ιχνηθέτες Molecular Beacon

Μια παραλλαγή της παραπάνω τεχνικής είναι οι Molecular Beacons. Τα άκρα των ιχνηθετών είναι συμπληρωματικά και ενωμένα με φθοριόχρωμα και αναστολέα φθορισμού (quencher) αντίστοιχα. Σε απουσία συμπληρωματικής αλληλουχίας αυτά τα μόρια διπλώνουν σε σχηματισμό “θηλιάς” και η εκπομπή φθορισμού καταστέλλεται από τον quencher. Όταν κατά την δειάρκεια της PCR παράγεται συμπληρωματική αλληλουχία, ο molecular beacon υβριδίζεται σε αυτήν, και η αυξημένη απόσταση των δύο άκρων έχει σαν αποτέλεσμα την εκπομπή φθορισμού (εικόνα 15).

4. SYBR Green



Εικόνα 16: Χρωστική Sybr green

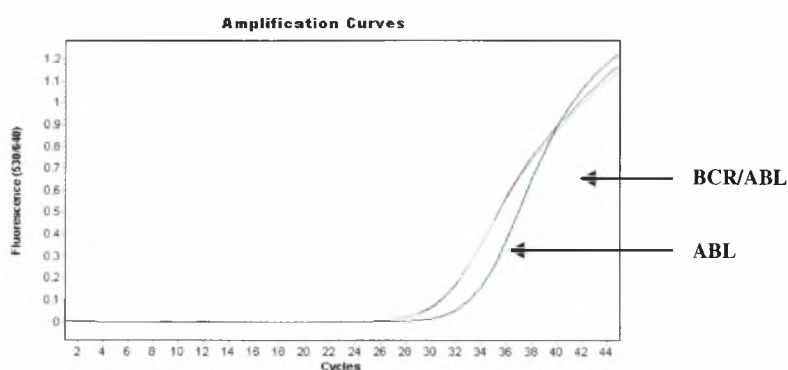
Η χρωστική Sybr green προσκολλάται μόνο σε διπλή έλικα DNA και ο εκπεμπόμενος φθορισμός είναι ανάλογος της ποσότητας του DNA που υπάρχει. Σε κάθε κύκλο PCR, εφόσον παράγεται PCR προϊόν, ο εκπεμπόμενος φθορισμός θα είναι και περισσότερος και καταγράφεται από τη συσκευή ποσοτικής PCR (εικόνα 16). Η τεχνική αυτή έχει το μειονέκτημα ότι και μη ειδικά PCR προϊόντα μεγέθους διαφορετικού από τα αναμενόμενα, δίδουν φθορισμό. Αναλόγως του μεγέθους του PCR προϊόντος, οι δύο έλικες DNA αποδιατάσσονται σε διαφορετική θερμοκρασία, πράγμα που επιτρέπει την ανάλυση του ανιχνευόμενου φθορισμού αναλόγως του μεγέθους των PCR προϊόντων που παράγονται σε μια PCR αντίδραση (melting curve analysis). Γνωρίζοντας εξ'αρχής το μέγεθος του αναμενόμενου PCR προϊόντος της αντίδρασης, αναλύεται αντίστοιχα ο από αυτό το μέγεθος προϊόντος παραγόμενος φθορισμός.



Εικόνα 17: Συσσκευή Ποσοτικής PCR LightCycler 2 (Roche)

Η Ποσοτική PCR αποτελεί σήμερα το κύριο εργαλείο για τη μοριακή παρακολούθηση ασθενών με ΧΜΛ. Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται η ποσοτική μέτρηση των μεταγράφων του χιμαιρικού γονιδίου *bcr-abl*. Τα επίπεδα των μεταγράφων κυμαίνονται σε υψηλά επίπεδα κατά την πρωτοδιάγνωση ενώ αναμένεται σταδιακή πτώση τους μετά τη λήψη ειδικής θεραπείας. Πιθανή διατήρηση των υψηλών επιπέδων των μεταγράφων παρά τη χορήγηση ειδικής θεραπευτικής αγωγής υποδεικνύει ανοχή του ασθενούς στη συγκεκριμένη θεραπεία και καθίσταται αναγκαία η εφαρμογή εναλλακτικής θεραπείας.

Η διαδικασία περιλαμβάνει την απομόνωση RNA από δείγμα αίματος ή μυελού του ασθενούς και την ανάστροφη μεταγραφή του σε cDNA από όπου γίνεται και η ανίχνευση των *bcr-abl* μεταγράφων με Real Time PCR. Τα μετάγραφα *bcr-abl* συγκρίνονται με τα μετάγραφα ενός γονιδίου που φυσιολογικά εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα όπως το *abl*. Μια καμπύλη αναφοράς (*standard curve*) σχηματίζεται με βάση διαδοχικές αραιώσεις *bcr-abl* μεταγράφων γνωστής συγκέντρωσης και το ποσό των *bcr-abl* μεταγράφων στο δείγμα υπολογίζεται με βάση αυτή την καμπύλη. Τα πλεονεκτήματα της Real Time PCR σε σχέση με την ποιοτική PCR για την ανίχνευση BCR/ABL είναι ο μικρός χρόνος που απαιτείται για την εκτέλεσή της, η μικρή πιθανότητα επιμόλυνσης (ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων), δυνατότητα ανάλυσης πολλών δειγμάτων ταυτόχρονα και η δυνατότητα συλλογής ποσοτικών στοιχείων.



Εικόνα 18: Παρακολούθηση της ανταπόκρισης με ποσοτική PCR. Παράδειγμα ποσοτικής μέτρησης μεταγράφων bcr-abl με real time PCR χρησιμοποιώντας την τεχνολογία TaqMan, σε συσκευή LightCycler2 . Υπολογίζεται ο λόγος bcr-abl προς abl.

Θεραπεία της ΧΜΛ

Μέχρι το 2000 η μόνη θεραπεία που μπορούσε να οδηγήσει σε πλήρη ίαση της ΧΜΛ στη χρόνια φάση της νόσου ήταν η αλλογενής μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων του μυελού των οστών. Όμως αφενός μεν η θεραπεία αυτή σχετίζεται με υψηλή νοσηρότητα και θνητότητα, αφετέρου μόνο το 20% των ασθενών πληρούν τα κριτήρια για να κάνουν μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Η επιτυχία της θεραπείας εξαρτάται από την ηλικία του ασθενή, την HLA-συμβατότητα μεταξύ δότη και δέκτη και την βαρύτητα της νόσου μοσχεύματος κατά του ξενιστή (GVHD-graft versus host disease) που εμφανίζεται στον ασθενή μετά την μεταμόσχευση (44,46,47).

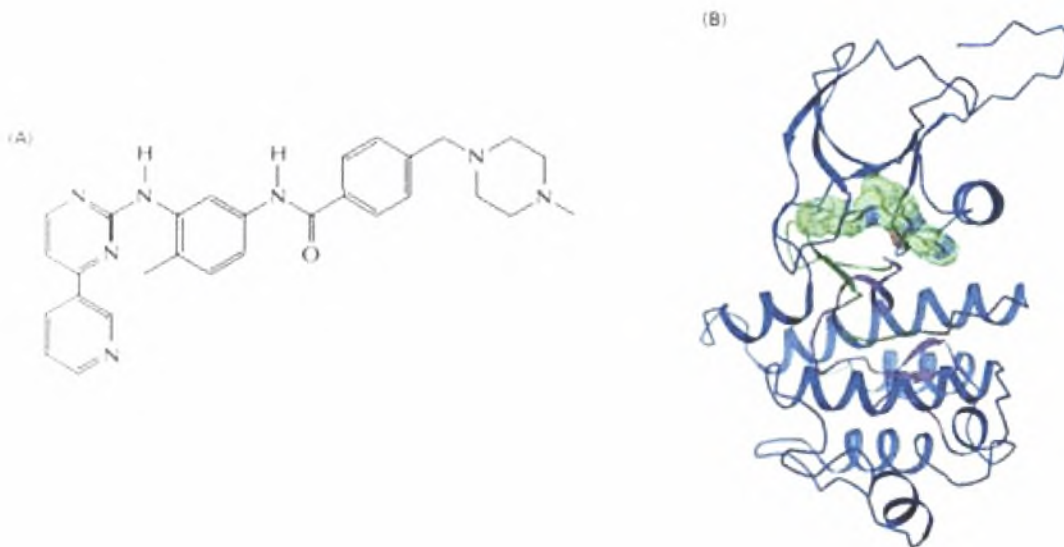
A) Συμβατική Θεραπεία

Μέχρι το 2000 η συμβατική αντιμετώπιση της ΧΜΛ περιελάμβανε χημειοθεραπευτικές ουσίες, όπως είναι η υδροξυουρία, οι οποίες στοχεύουν κάθε ενεργά πολλαπλασιαζόμενο κυτταρικό πληθυσμό και έτσι καταστρέφουν τόσο φυσιολογικά όσο και λευχαιμικά κύτταρα. Κάτω από αυτή τη χημειοθεραπεία οι περισσότεροι ασθενείς παρουσιάζουν αιματολογική ύφεση (επιστροφή των λευκοκυττάρων, των αιμοπεταλίων σε φυσιολογικές τιμές), ωστόσο δεν υπάρχει κυτταρογενετική ύφεση, δηλαδή δεν εξαφανίζονται τα παθολογικά κύτταρα που φέρουν το χρωμόσωμα Ph και οι ασθενείς σύντομα καταλήγουν σε βλαστική κρίση (44) και θάνατο.

Στα μέσα τις δεκαετίας 1980-1990 εισήλθε στη θεραπευτική της ΧΜΛ η ιντερφερόνη-α (INFα), που έγινε η θεραπεία εκλογής για την ΧΜΛ. Η INFα οδηγούσε σε αιματολογική ύφεση στο 80% και παρέτεινε την επιβίωση σε σχέση με την υδροξυουρία αλλά δεν οδηγούσε σε ίαση (45,46).

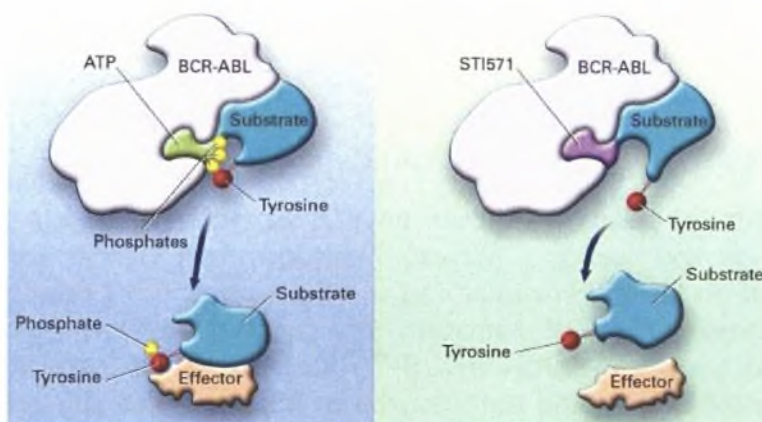
B) Σύγχρονη Μοριακή Θεραπεία

Η αποκάλυψη της τριτοταγούς δομής της ογκοπρωτεΐνης Bcr-Abl και η κατανόηση του μοριακού μηχανισμού με τον οποίο δρα στην ΧΜΛ οδήγησε στην ανακάλυψη μιας φαρμακευτικής ουσίας, που αναστέλλει τη δραστικότητα κινάσης της πρωτεΐνης Bcr-Abl. Η ουσία αυτή ονομάζεται Imatinib mesylate (γνωστή ως STI571, Glivec ή Gleevec). Πρόκειται για μια φαινυλαμινοπυριδιμιδίνη (εικόνα 19α) η οποία δρα ως ειδικός αναστολέας κατά των εξής κινασών τυροσίνης: της Abl, των PDGFRα και β (platelet-derived growth factor receptor α και β), της KIT και της Arg.



Εικόνα 19 : α) Η χημική δομή του imatinib. β) Το imatinib (πράσινη περιοχή) στην καταλυτική περιοχή της κινάσης Abl όπως αποκαλύπτεται με κρυσταλλογραφία (48)

Η ανάλυση - με κρυσταλλογραφία - της δομής της καταλυτικής περιοχής της κινάσης Abl με την συνδεδεμένη ουσία imatinib (εικόνα 19β) έδειξε ότι το imatinib συνδέεται με την απενεργοποιημένη μορφή της Bcr-Abl και καταλαμβάνει την περιοχή όπου συνδέεται η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP). Έτσι, ο αναστολέας αυτός διατηρεί την Bcr-Abl πρωτεΐνη σε «κλειστή» και ανενεργή μορφή, αφού το ATP δεν μπορεί να παρέχει φωσφορικές ομάδες στην κινάση προκειμένου αυτή να μπορεί να φωσφορυλιώσει τα υποστρώματα της και να ακολουθήσει η ενεργοποίηση των βιοχημικών μονοπατιών που έπονται (εικόνα 20), (48-50).



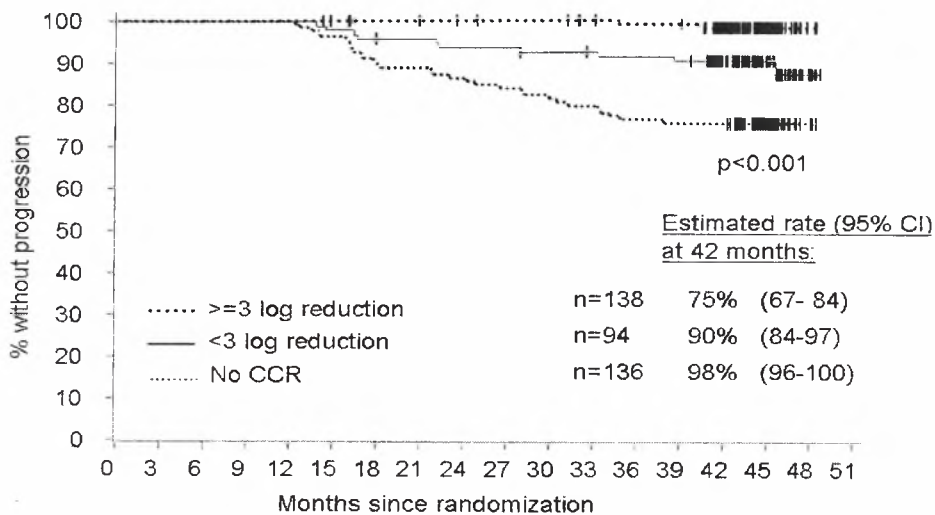
Εικόνα 20: Μορφή Bcr-Abl πρωτεΐνης, δράση imatinib

Οι ανεπιθύμητες ενέργειες του imatinib είναι ήπιες και το φάρμακο είναι γενικά καλά ανεκτό. Στις περισσότερες περιπτώσεις ασθενών με ΧΜΛ, η χορήγηση imatinib έχει σαν αποτέλεσμα την αιματολογική και κυτταρογενετική ύφεση (52) (εικόνα 21). Το imatinib αποτελεί πλέον το φάρμακο εκλογής σε ασθενείς με ΧΜΛ (52-55).

	Glivec	Ιντερφερόνη+Αρασιτίνη
Πλήρης αιματολογική ανταπόκριση	96%	67%
Μείζων κυτταρογενετική ανταπόκριση	83%	20%
Πλήρης κυτταρογενετική ανταπόκριση	68%	7%

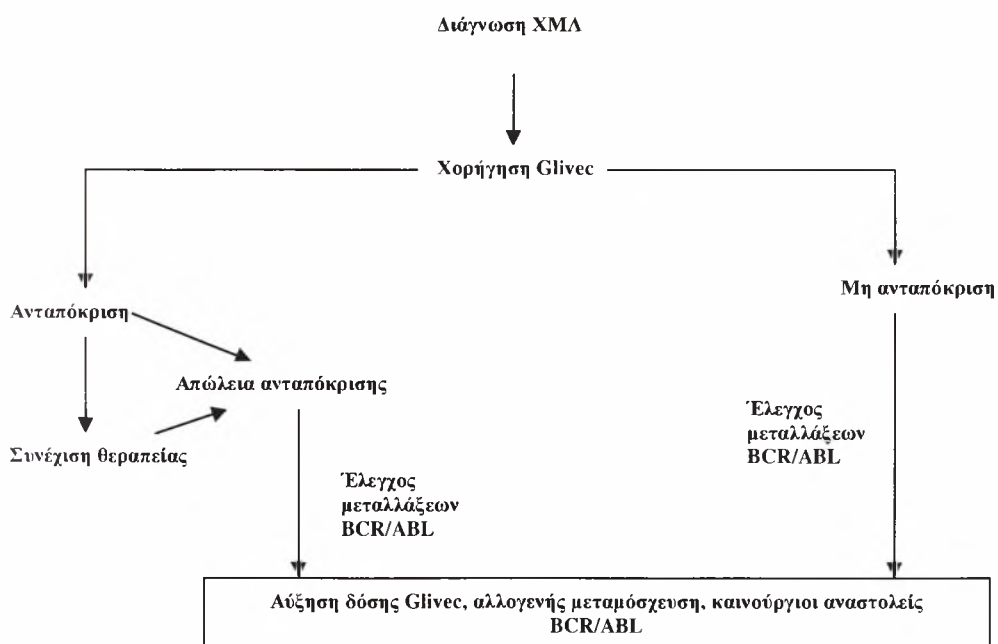
Εικόνα 21 : Πλήρης κυτταρογενετική ανταπόκριση είναι η απουσία μεταφάσεων με την αναδιάταξη t(9;22).

Στόχος της θεραπείας με Glivec είναι η πλήρης αιματολογική και κυτταρογενετική ύφεση και η μέγιστη δυνατή μοριακή ύφεση της νόσου, δηλαδή η διατήρηση του ποσοστού των μεταγράφων bcr-abl σε πολύ χαμηλά επίπεδα (όπως προσδιορίζεται με την ποσοτική PCR) ή η εξαφάνισή τους (όπως πιστοποιείται με τη nested RT-PCR). Ασθενείς στους οποίους δεν ανιχνεύονται bcr-abl μετάγραφα ή τα ανιχνεύσιμα μετάγραφα διατηρούνται σε πολύ μικρό ποσοστό, έχουν εξαιρετικά καλή κλινική πορεία. Αντίθετα οι ασθενείς που εξακολουθούν να έχουν μεγάλο ποσοστό μεταγράφων σε ορισμένο χρονικό διάστημα μετά την έναρξη της θεραπείας με Glivec ή που αυξάνουν τα επίπεδα αυτά, έχουν χειρότερη κλινική πορεία με επανεμφάνιση της νόσου σε άλλοτε άλλο χρονικό διάστημα.



Εικόνα 22

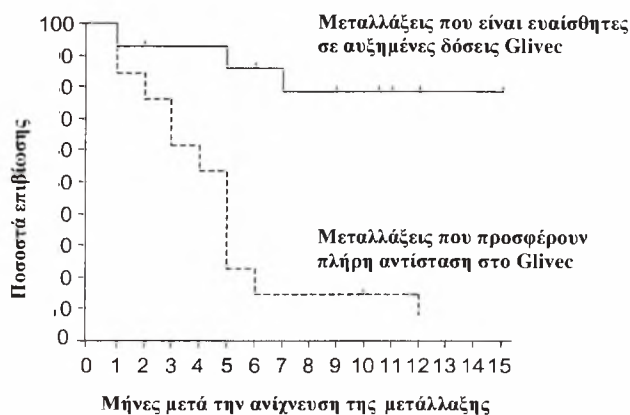
Η εισαγωγή του Glivec στη θεραπεία της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας και η δυνατότητα παρακολούθησης της ανταπόκρισης στη θεραπεία με ευαίσθητες μοριακές τεχνικές έδωσε τη δυνατότητα δημιουργίας ενός νέου θεραπευτικού αλγόριθμου για τους ασθενείς που πάσχουν από ΧΜΛ (εικόνα 22).



Εικόνα 23

Είναι αναγκαία η συνεχής παρακολούθηση των ασθενών που λαμβάνουν Glivec με καρυότυπο και ποσοτική PCR για τον έλεγχο ανταπόκρισης στη θεραπεία ή την απώλεια ανταπόκρισης. Η μη ανταπόκριση στη θεραπεία ή η απώλεια της ανταπόκρισης οφείλεται συχνά σε σημειακές μεταλλάξεις της πρωτεΐνης Bcr-Abl.

Μερικές από αυτές τις μεταλλάξεις προσφέρουν αντίσταση της χιμαιρικής πρωτεΐνης Bcr-Abl στις συνήθεις χορηγούμενες δόσεις Glivec, ενώ άλλες παρέχουν πλήρη αντίσταση. Η ανίχνευση αυτών των μεταλλάξεων με PCR και ανάλυση αλληλουχίας βάσεων του γονιδίου bcr-abl, βοηθάει στη έγκαιρη λήψη θεραπευτικών αποφάσεων (αύξηση της χορηγούμενης δόσης Glivec, χορήγηση άλλου αναστολέα της χιμαιρικής πρωτεΐνης ή αλλογενής μεταμόσχευση), (εικόνα 24).



Εικόνα 24

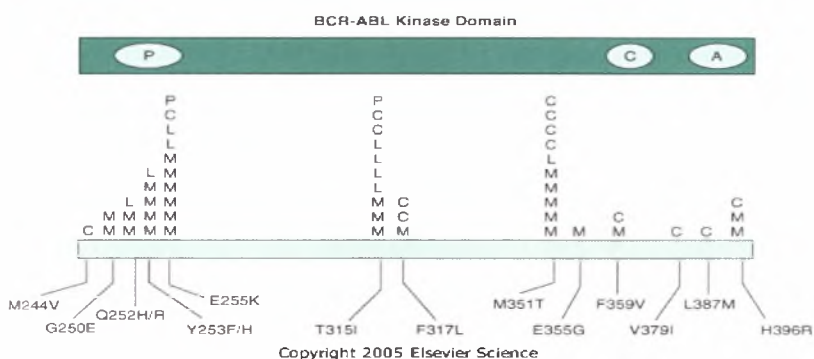
Μοριακοί μηχανισμοί ανάπτυξης αντοχής στο imatinib mesylate

Παρά τα ιδιαίτερα ενθαρρυντικά αποτελέσματα της χρήσης του imatinib για τη αντιμετώπιση της ΧΜΛ, παρατηρήθηκε ήδη ότι αρκετοί ασθενείς αναπτύσσουν αντοχή στο φάρμακο και παρουσιάζουν υποτροπή της νόσου. Η αντοχή που αναπτύσσεται προκύπτει με διάφορους μηχανισμούς (56). Πρωτογενής αντοχή παρατηρείται σε ασθενείς που δεν έχουν λάβει προηγουμένως το φάρμακο και δεν δείχνουν καμία ανταπόκριση στο φάρμακο. Δευτερογενής αντοχή αναπτύσσεται σε ασθενείς που υποτροπιάζουν, ενώ έχουν δείξει προηγουμένως ικανή αιματολογική και κυτταρογενετική ανταπόκριση στο φάρμακο. Η αντοχή, όπως φαίνεται και στην εικόνα 26, δύναται να οφείλεται σε κάποιον από τους ακόλουθους μηχανισμούς:

α) Εμφάνιση σημειακών μεταλλάξεων που οδηγούν στην αντικατάσταση αμινοξέων στην περιοχή κινάσης της υβριδικής ογκοπρωτεΐνης Bcr-Abl (εικόνα 25, 26α). Έχουν εντοπιστεί περισσότερες από 40 σημειακές μεταλλάξεις. Δύναται να συμβούν σε μια από τις εξής 4 περιοχές της κινάσης:

- i) στην αγκύλη ενεργοποίησης,
- ii) στην αγκύλη σύνδεσης των φωσφορικών ομάδων του ATP (P-loop),
- iii) στην καταλυτική αγκύλη (C-loop), και
- iv) στην περιοχή όπου το imatinib συνδέεται με την κινάση με δεσμούς υδρογόνου ή δεσμούς Van der Waal.

Οι μεταλλάξεις εμποδίζουν την σύνδεση του imatinib είτε επειδή αλλάζει η περιοχή όπου σχηματίζει δεσμούς το φάρμακο με την κινάση, είτε λόγω αλλαγής της τριτοταγούς δομής τη κινάσης. Από τις μεταλλάξεις αυτές που συμβαίνουν στην περιοχή P-loop είναι οι περισσότερο συχνές και σχετίζονται με κακή πρόγνωση και ταχεία επιδείνωση της νόσου. (52,55-59)



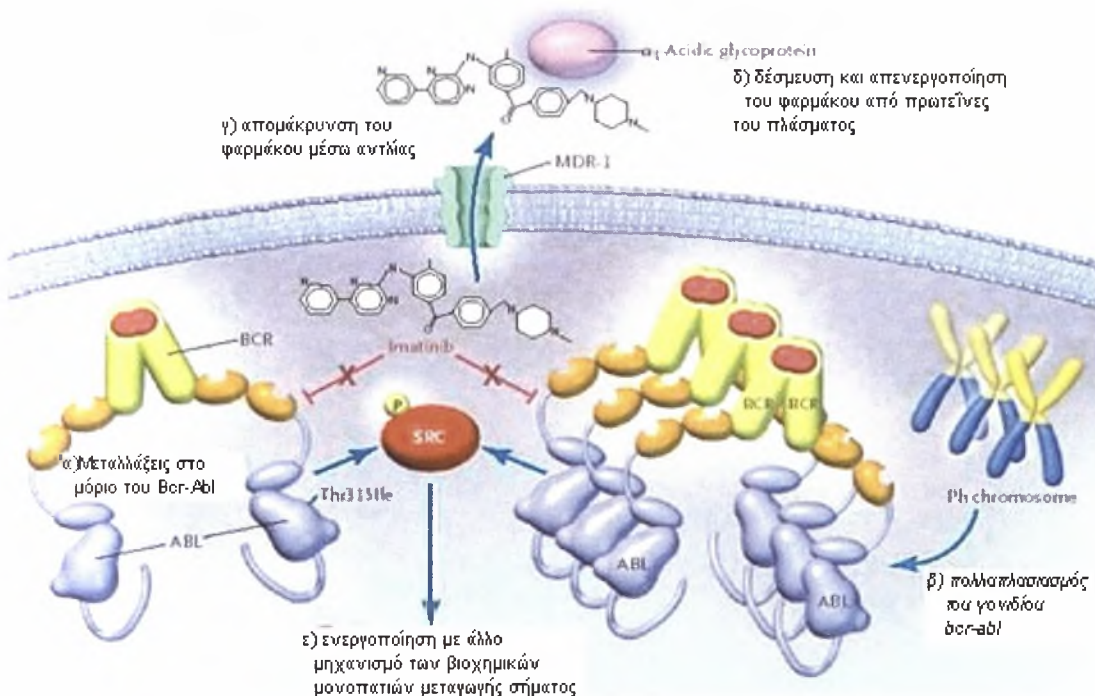
Εικόνα 25 : Μεταλλάξεις της χιμαιρικής πρωτεΐνης Bcr-Abl

β) Πολλαπλασιασμός του γονιδίου bcr-abl ή/και υπερέκφρασή του (εικόνα 26β). Τα λευχαιμικά κύτταρα προσπαθούν να ανταγωνιστούν το imatinib, παράγοντας μεγαλύτερες ποσότητες υβριδικής πρωτεΐνης έτσι ώστε η ποσότητα του φαρμάκου να μην είναι ικανή να μπλοκάρει τις αυξημένες πλέον ποσότητες της κινάσης. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης οφείλεται συνήθως σε πολλαπλασιασμό του γονιδίου. Ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι γνωστός ωστόσο πιστεύεται ότι συμβαίνει χρωμοσωμική θραύση σε εύθραυστες περιοχές που ακολουθείτε από σύντηξη των θραυσμάτων. Πολλαπλασιασμός μπορεί να συμβεί ακόμη μέσω διπλασιασμού του χρωμοσώματος Ph ή ακόμη μέσω άνισης χιασματυπίας μεταξύ των αδελφών χρωματίδων. Ακόμη έχει παρατηρηθεί υπερέκφραση της πρωτεΐνης χωρίς πολλαπλασιασμό του γονιδίου, γεγονός που πιθανόν οφείλεται σε μεταγραφικούς, μεταφραστικούς ή μετα-μεταφραστικούς μηχανισμούς, οι οποίοι όμως δεν έχουν μελετηθεί καλά. (52, 56, 60-66)

γ) Απομάκρυνση-έξοδος του φαρμάκου από το κυτταρόπλασμα λόγω υπερέκφρασης της γλυκοπρωτεΐνης P (Permeability-glycoprotein ή απλά P-gp) (εικόνα 26γ). Πρόκειται για μια πρωτεΐνη μεταφορέα που ανήκει σε υπεροικογένεια πρωτεϊνών MDR (multi-drug resistance) που σχετίζονται με την ανάπτυξη αντοχής σε διάφορες φαρμακευτικές ουσίες, και οι οποίες κωδικοποιούνται από τα γονίδια *mdr 1* και *2*. Σε πολλές μορφές καρκίνου και λευχαιμίας υπάρχει υπερέκφραση των πρωτεϊνών αυτών. Η P-gp λειτουργεί σαν μια ATP-εξαρτώμενη αντλία, η οποία όταν υπερεκφράζεται αντλεί το imatinib εκτός κυτταροπλάσματος, έτσι ώστε αυτό να μην μπορεί να φτάσει στον κυτταρικό του στόχο. (52, 56, 62, 67-69)

δ) Άμεση απενεργοποίηση του φαρμάκου στο πλάσμα του αίματος από συγκεκριμένες πρωτεΐνες του αίματος όπως είναι η α1-οξική γλυκοπρωτεΐνη (α2-acid glycoprotein ή απλά AGP) (εικόνα 14δ). Η AGP κυκλοφορεί στο πλάσμα και συνδέεται με βασικά μόρια, όπως το imatinib, και κατ' επέκταση δεν τους επιτρέπει να φτάσουν στο βιολογικό στόχο τους. Μελέτες έχουν δείξει ότι ασθενείς με ΧΜΛ που έχουν αυξημένα επίπεδα AGP αναπτύσσουν γρήγορα αντοχή στο imatinib και ότι ασθενείς υπό imatinib που υποτροπιάζουν παρουσιάζουν αύξηση των επιπέδων AGP στο πλάσμα. (52, 56, 70, 71)

ε) Ενεργοποίηση εναλλακτικών βιοχημικών μονοπατιών, που δεν έχουν διαλευκανθεί πλήρως ακόμη, και τα οποία οδηγούν σε εξέλιξη της νόσου ανεξάρτητα από την χιμαιρική πρωτεΐνη Bcr-Abl (εικόνα 26ε). (52)



Εικόνα 26: Μοριακοί μηχανισμοί ανάπτυξης αντοχής στο imatinib mesylate (για επεξηγήσεις βλ.κείμενο). (52)

Λόγω της ανάπτυξης αντοχής στο imatinib, έχουν παραχθεί αναστολείς δεύτερης γενεάς κινάσης Abl (πχ nilotinib, dasatinib). Οι αναστολείς αυτοί έχουν λιγότερες απαιτήσεις προκειμένου να συνδεθούν στην κινάση και φαίνεται ότι μπορεί να αναστέλλουν ακόμη και Abl κινάσες που φέρουν μεταλλάξεις σχετιζόμενες με αντοχή στο imatinib (72).

Συμπέρασμα

Είναι γεγονός πως έχουν συμβεί μεγάλα βήματα στην κατανόηση της βιολογίας της ΧΜΛ και στην αντιμετώπισή της. Η διαλεύκανση του μηχανισμού που προκαλεί την κυτταρογενετική βλάβη, αλλά και η πλήρης κατανόηση του μηχανισμού με τον οποίο η απορύθμιση των βιοχημικών μονοπατιών μεταγωγής σήματος από την Bcr-Abl κάνει τον λευχαιμικό κλώνο που φέρει το χρωμόσωμα Ph, παραμένουν στο πεδίο της βιοϊατρικής έρευνας και μπορεί να αποκαλύψουν νέους μοριακούς στόχους για θεραπεία. Η ανάπτυξη αντοχής στο imatinib ώθησε στην παραγωγή νέων αναστολέων της Bcr-Abl κινάσης.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

- Απομόνωση RNA από δείγμα αίματος ή μυελού των οστών
- RT (Reverse Transcriptase), αντίστροφη μεταγραφή για μετατροπή του RNA σε cDNA
- Ποσοτική PCR (Real Time PCR) για ποσοτικοποίηση του χιμαιρικού γονιδίου bcr-abl

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA

Για την απομόνωση του RNA από δείγμα αίματος ή μυελού των οστών χρησιμοποιήθηκε το kit *QIAamp RNA Blood Mini* (QIAGEN)

Αντιδραστήρια:

- Στήλες QIAamp
- Στήλες QIAshredder
- Tubes 2 ml
- Tubes 1.5 ml
- Διάλυμα EL
- Διάλυμα RLT (στο οποίο έχουμε προσθέσει β-Μερκαπτοαιθανόλη, 10μl β-ME για κάθε 1ml Buffer RLT)
- Διάλυμα RW1
- Διάλυμα RPE (στο οποίο έχουμε προσθέσει αιθανόλη, 4 όγκους αιθανόλη για κάθε όγκο RPE)
- Νερό (Rnase-free water)

Εξοπλισμός:

- Πιπέτες 1000 μl και 100 μl και αντίστοιχα tips
- Falcons 50 ml
- Φυγόκεντρος ειδική για διατήρηση θερμοκρασίας στους 4°C, κατάλληλη για falcons 50 ml
- Φυγόκεντρος κατάλληλη για tubes 2 ml
- Αιθανόλη 100%
- Αιθανόλη 70%
- 14.3 M β-Μερκαπτοαιθανόλη (β-ME)

Διαδικασία:

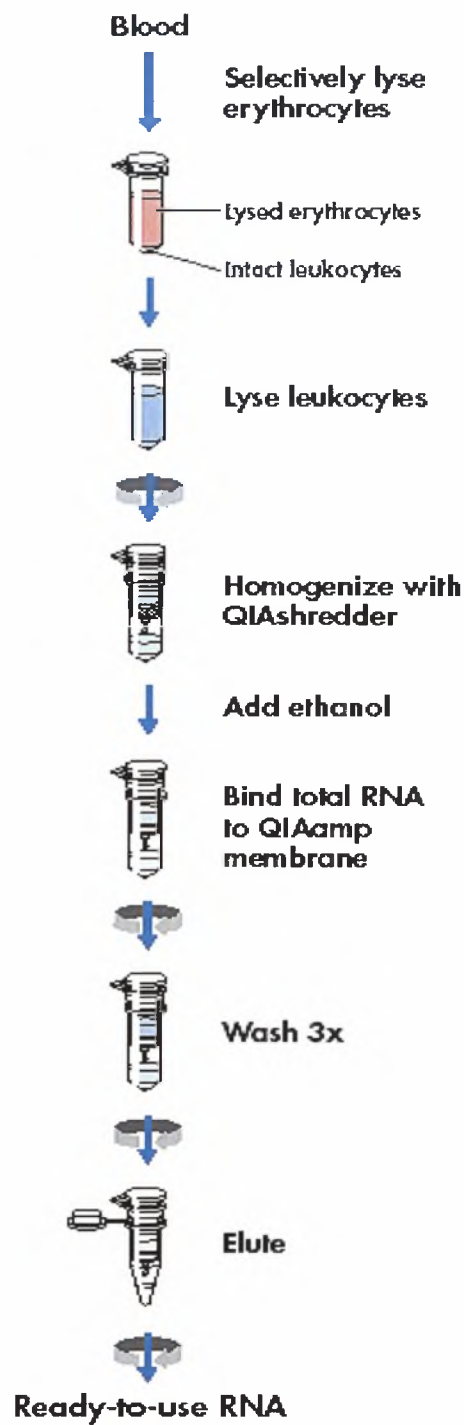
- Ανάμιξη 1 όγκου αίματος με 5 όγκους διαλύματος EL, σε κατάλληλου μεγέθους falcon, για τη λύση των ερυθρών κυττάρων παρουσία του υποτονικού διαλύματος.

Τα ερυθρά κύτταρα είναι απύρρηνα επομένως δεν περιέχουν RNA για αυτό το λόγο είναι απαραίτητη η απομάκρυνση τους από το δείγμα. Το RNA, όταν το δείγμα είναι αίμα, απομονώνεται από τα λευκοκύτταρα.

- Παραμονή του διαλύματος στους 4⁰C για 15-20 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση διαλύματος σε 1410 rpm για 10 λεπτά στους 4⁰C και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- Επαναδιάλυση του κυτταρικού ιζήματος με πρόσθεση διαλύματος EL (2 όγκους Buffer EL για κάθε αρχικό όγκο αίματος που χρησιμοποιήσαμε).
- Φυγοκέντρηση διαλύματος σε 1410 rpm για 10 λεπτά στους 4⁰C και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- Επαναδιάλυση του κυτταρικού ιζήματος με προσθήκη 600 μl διαλύματος RLT.
- Μεταφορά του διαλύματος σε tube 2 ml που περιέχει ειδική στήλη QIAshredder και φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα. Απομάκρυνση της στήλης και φύλαξη του tube με το ομογενοποιημένο διάλυμα.
- Προσθήκη 600 μl αιθανόλη 70% στο tube με το ομογενοποιημένο διάλυμα και καλή ανάδευση με την πιπέτα.
- Μεταφορά του διαλύματος σε tube 2 ml που περιέχει ειδική στήλη QIAamp spin column, φυγοκέντρηση για 15 δευτερόλεπτα στη μέγιστη ταχύτητα και απομάκρυνση του υποκείμενου διαλύματος που περιέχεται στο tube.
- Επανάληψη του προηγούμενου βήματος για φυγοκέντρηση του διαλύματος που περίσσευσε.
- Μεταφορά της στήλης σε νέο tube 2ml, προσθήκη 700 μl διαλύματος RW1 και φυγοκέντρηση για 15 δευτερόλεπτα στη μέγιστη ταχύτητα. Απομάκρυνση του tube με το υποκείμενο διάλυμα.

- Μεταφορά της στήλης σε νέο tube 2 ml, προσθήκη 500 μl διαλύματος και φυγοκέντρηση για 15 δευτερόλεπτα στη μέγιστη ταχύτητα. Απομάκρυνση του tube με το υποκείμενο διάλυμα.
- Επανάληψη του προηγούμενου βήματος με φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα. Απομάκρυνση του tube με το υποκείμενο διάλυμα.
- Μεταφορά της στήλης σε νέο tube 2ml και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στη μέγιστη ταχύτητα για απομάκρυνση τυχόν υπολλειμάτων RPE.
- Μεταφορά της στήλης σε tube 1.5 ml, προσθήκη 80 μl νερό (Rnase free water) και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στη μέγιστη ταχύτητα.
- Απομάκρυνση στήλης και φύλαξη του tube με το RNA στους -80 °C, μέχρι τη χρησιμοποίησή του.

QIAamp RNA Blood Mini Procedure



Εικόνα 27 : Απομόνωση RNA

RT (Reverse Transcriptase) – Ανάστροφη μεταγραφή RNA σε cDNA

Για την ανάστροφη μεταγραφή RNA σε cDNA χρησιμοποιήθηκε το kit *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche)*.

Με χρήση του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης πραγματοποιείται η μετατροπή του RNA σε μονόκλωνο cDNA το οποίο μπορεί στη συνέχεια να χρησιμοποιηθεί σε PCR εφαρμογές.

Αντιδραστήρια:

- Αντίστροφη μεταγραφάση
- Διάλυμα αντίδρασης (Reaction Buffer)
- Αναστολέας RNAασών
- Διάλυμα δεοξυνουκλεοτιδίων
- Ειδικό εκκινητές (Random Hexamer Primer)
- Νερό
- RNA

Εξοπλισμός:

- Πιπέτες και αντίστοιχα tips
- Tubes 1.5 ml
- Tubes 200 μl
- Μηχάνημα για PCR

Διαδικασία:

Δημιουργία master mix το οποίο περιέχει όλα τα παραπάνω αντιδραστήρια πλην του RNA, σε ποσότητα που υπολογίζουμε ανάλογα με τον αριθμό των RNA που θα υποστούν αντίστροφη μεταγραφή. Στο κάθε δείγμα αντιστοιχεί 12 μl από το master mix και 8μl από το RNA. Μοιράζουμε από 12 μl από το master mix σε αριθμημένα tubes και προσθέτουμε στο καθένα το RNA που του αντιστοιχεί.

Master mix:

- | | |
|---|-------|
| - Αντίστροφη μεταγραφάση | 0.5μl |
| - Διάλυμα αντίδρασης (Reaction Buffer) | 4μl |
| - Αναστολέας RNAασων | 0.5μl |
| - Διάλυμα δεοξυνουκλεοτιδίων | 2μl |
| - Ειδικός εκκινητής (Random Hexamer Primer) | 2μl |
| - Νερό | 3μl |
| - RNA | 8μl |

Σύνολο: 20μl τελικός όγκος διαλύματος

Συνθήκες αντίδρασης ανάστροφης μεταγραφής:

- 25⁰C για 10 λεπτά
- 50⁰C για 1 ώρα
- 85⁰C για 5 λεπτά

Ποσοτική (Qualitative) PCR – Real Time PCR

Για την Ποσοτική PCR χρησιμοποιήθηκαν τα κιτ *LightCycler TaqMan Master (Roche)* και *M-bcr FusionQuant Kit (Ipsogen)*

Σημείωση: Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται για τα b3a2 M-bcr μετάγραφα που αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες p210Bcr-Abl.

Με την Ποσοτική PCR πραγματοποιείται ποσοτική μέτρηση των μεταγράφων του abl γονιδίου καθώς και του bcr-abl χιμαιρικού γονιδίου σε πραγματικό χρόνο με μέτρηση της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας, που προκύπτει από ειδικούς προς τις αλληλουχίες σημασμένους probes. Το αποτέλεσμα εμφανίζεται σε μορφή γραφήματος και υπολογίζεται ως λόγος [bcr-abl] / [abl].

LightCycler TaqMan Master (Roche):

Αντιδραστήρια:

- 1a – Ένζυμο
- 1b – Διάλυμα αντίδρασης
- 2 – Νερό

Απαιτείται ανάμειξη 10μl από το 1a στο 1b. Το τελικό προϊόν περιέχει FastStart Taq DNA Polymerase, διάλυμα αντίδρασης, MgCl₂ και διάλυμα dNTPs (με dUTP αντί για dTTP)

M-bcr FusionQuant Kit (Ipsogen):

- PPC-ABL 25X (περιέχει τους primers για το abl γονίδιο και τον ειδικό probe FAM-TAMRA)
 - PPF-M-bcr 25X (περιέχει τους primers για το M-bcr γονίδιο και τον ειδικό probe FAM-TAMRA)
 - C1-ABL FusionQuant (10³ αντίγραφα/5 μl)
 - C2-ABL FusionQuant (10⁴ αντίγραφα/5 μl)
 - C3-ABL FusionQuant (10⁵ αντίγραφα/5 μl)
- (Περιέχουν cDNA με συγκεκριμένες συγκεντρώσεις του abl γονιδίου για έλεγχο και δημιουργία καμπύλης αναφοράς)
- F1-BCR-ABL b3a2 M-bcr (10¹ αντίγραφα/5 μl)
 - F2-BCR-ABL b3a2 M-bcr (10² αντίγραφα/5 μl)
 - F3-BCR-ABL b3a2 M-bcr (10³ αντίγραφα/5 μl)
 - F4-BCR-ABL b3a2 M-bcr (10⁵ αντίγραφα/5 μl)
 - F5-BCR-ABL b3a2 M-bcr (10⁶ αντίγραφα/5 μl)

(Περιέχουν cDNA με συγκεκριμένες συγκεντρώσεις του χιμαιρικού γονιδίου bcr-abl για έλεγχο και δημιουργία καμπύλης αναφοράς)

Εξοπλισμός:

- Μηχάνημα για ποσοτική PCR (πραγματικού χρόνου PCR), (LightCycler II, Carousel-Based System (εικόνα 28))
- LightCycler Capillaries 20μl
- Cooler όπου τοποθετούμε τα capillaries (εικόνα 29)
- Πιπέτες και αντίστοιχα tips
- Tubes για προετοιμασία των master mix
- Φυγόκεντρο με βάσεις ειδικές για capillaries



Εικόνα 28: Carousel-Based System, Capillaries

Διαδικασία:

Δημιουργία 2 master mix τα οποία περιέχουν το διάλυμα 1a+1b, νερό και το διάλυμα PPC-ABL 25X και PPF-M-bcr 25X με τους primers και τους probes αντίστοιχα στο καθένα. Η ποσότητα των αντιδραστηρίων υπολογίζεται ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων, των θετικών controls (3 για το ABL και 5 για το BCR-ABL, τα οποία χρησιμοποιούμε για τις καμπύλες αναφοράς) καθώς και του αρνητικού control δηλαδή του νερού το οποίο διασφαλίζει ότι δεν έχουμε πιθανή επιμόλυνση. Να σημειώσουμε ότι οι μετρήσεις γίνονται εις διπλούν δηλαδή το κάθε δείγμα τοποθετείται δύο φορές για μεγαλύτερη αξιοπιστία και ασφάλεια των αποτελεσμάτων, ενώ ο τελικός υπολογισμός προκύπτει από το μέσο όρο.

Master Mix 1 για ανίχνευση των abl γονιδίων για 5 δείγματα ασθενών:

- 1α+1β (4 μl)	64 μl
- PPC-ABL 25X (0.8 μl)	12.8 μl
- Νερό (10.2 μl)	163.2 μl

Master Mix 2 για ανίχνευση των bcr-abl γονιδίων για 5 δείγματα ασθενών:

- 1α+1β (4 μl)	72 μl
- PPF-M-bcr 25X (0.8 μl)	14.4 μl
- Νερό (10.2 μl)	183.6 μl

Τοποθετούμε τα capillaries σε ειδική βάση (cooler) και καταγράφουμε το δείγμα που αντιστοιχεί στο καθένα σύμφωνα με την αρίθμηση που υπάρχει στη βάση.



Εικόνα 29: Cooler

Μοιράζουμε τα 2 Master Mix στα capillaries που τους αντιστοιχούν, από 15 μl στο καθένα (Master Mix 1 σε capillaries 1-14 και Master Mix 2 σε capillaries 15-30). Στη συνέχεια προσθέτουμε 5 μl από το νερό (αρνητικό control) στα capillaries με τον αντίστοιχο αριθμό σύμφωνα με την καταγραφή που έχουμε κάνει (capillaries 4, 20). Συνεχίζουμε με προσθήκη 5 μl από τα δείγματά μας (τα οποία έχουμε αραιώσει με 30 μl νερό) (capillaries 5-14 και 15-30) και τέλος των θετικών controls abl (capillaries 1-3) και bcr-abl (capillaries 15-19). Φροντίζουμε μετά την προσθήκη του δείγματος στο κάθε capillary να το κλείνουμε με το ειδικό του 'κούμπωμα' ώστε να ελαχιστοποιήσουμε την πιθανότητα επιμόλυνσης.

Μια τυπική αντίδραση αποτελείται από τα παρακάτω:

1. C1-ABL FusionQuant (10^3 αντίγραφα/5 μl) – Θετικό control
2. C2-ABL FusionQuant (10^4 αντίγραφα/5 μl) – Θετικό control
3. C3-ABL FusionQuant (10^5 αντίγραφα/5 μl) – Θετικό control
4. Νερό – Αρνητικό control
5. Δείγμα 1
6. Δείγμα 1
7. Δείγμα 2
8. Δείγμα 2
9. Δείγμα 3
10. Δείγμα 3
11. Δείγμα 4
12. Δείγμα 4
13. Δείγμα 5
14. Δείγμα 5
15. F1-BCR-ABL b3a2 M-bcr (10^1 αντίγραφα/5 μl) – Θετικό control
16. F2-BCR-ABL b3a2 M-bcr (10^2 αντίγραφα/5 μl) – Θετικό control
17. F3-BCR-ABL b3a2 M-bcr (10^3 αντίγραφα/5 μl) – Θετικό control
18. F4-BCR-ABL b3a2 M-bcr (10^5 αντίγραφα/5 μl) – Θετικό control
19. F5-BCR-ABL b3a2 M-bcr (10^6 αντίγραφα/5 μl) – Θετικό control
20. Νερό – Αρνητικό control
21. Δείγμα 1
22. Δείγμα 1
23. Δείγμα 2
24. Δείγμα 2
25. Δείγμα 3
26. Δείγμα 3
27. Δείγμα 4
28. Δείγμα 4
29. Δείγμα 5
30. Δείγμα 5

Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία τοποθετούμε τα capillaries στην φυγόκεντρο για μια γρήγορη φυγοκέντρωση (quick spin) ώστε να συγκεντρωθεί το διάλυμα στη βάση.

Τέλος μεταφέρουμε τα capillaries στο μηχάνημα της Ποσοτικής PCR, LightCycler2 (Roche). Τα τοποθετούμε στο εσωτερικό και αποθηκεύουμε τις ρυθμίσεις και τα ονόματα των ασθενών των δειγμάτων με την αρίθμηση που τους αντιστοιχεί, στο πρόγραμμα που είναι εγκατεστημένο στο συνδεδεμένο υπολογιστή. Επιλέγουμε την έναρξη της διαδικασίας ποσοτικής μέτρησης (run), η οποία απαιτεί 75 λεπτά για την ολοκλήρωσή της οπότε και παίρνουμε και τα αποτελέσματα.

Συνθήκες Ποσοτικής PCR:

1 κύκλος

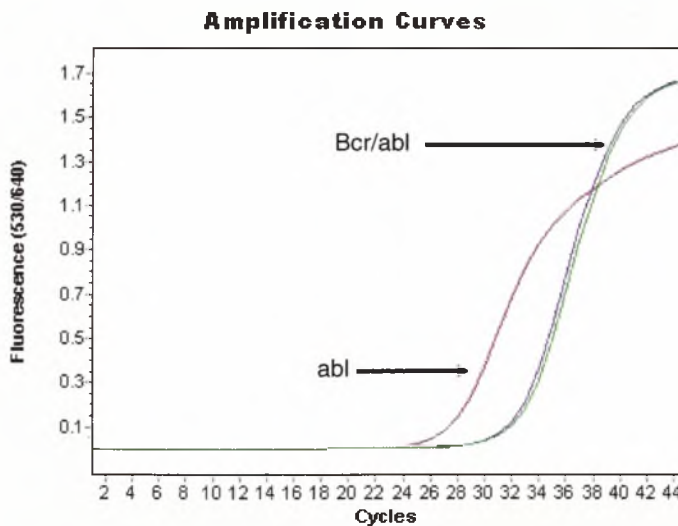
- 95°C για 10 λεπτά

45 κύκλοι

- 95°C για 10 δευτερόλεπτα
- 60°C για 1 λεπτό

1 κύκλος

- 45°C για 1 λεπτό



Ασθενής 1

Εικόνα 30: Καμπύλες αποτελεσμάτων bcr-abl και abl.

Ασθενείς

Κατά τη χρονική περίοδο Οκτώβρης 2006-Απρίλιος 2007 πραγματοποιήθηκαν 20 αντιδράσεις ποσοτικής PCR, για συνολικά 100 δείγματα από 30 ασθενείς. Τα δείγματα αφορούσαν ήδη διαγνωσθέντες με ΧΜΛ ασθενείς οι οποίοι βρίσκονται σε τακτική παρακολούθηση και οι οποίοι ελάμβαναν όλοι θεραπεία με Glivec. Η ηλικία των ασθενών κυμαινόταν από 20 έως 80 ετών. (πίνακας 1)

Ασθενής	Φύλο	Ηλικία	Χρόνος από την έναρξη θεραπείας με Imatinib πριν την πρώτη μέτρηση
1	A	35	3 έτη
2	A	52	1 έτος
3	A	44	2 έτη
4	Θ	50	2 έτη
5	Θ	60	3 έτη
6	A	40	3 έτη
7	Θ	60	6 μήνες
8	Θ	50	3 έτη
9	A	35	4 έτη
10	A	26	4 έτη
11	A	20	2 έτη
12	Θ	55	3 έτη
13	A	38	2 έτη
14	A	55	2 έτη
15	A	62	1 μήνας
16	Θ	40	1 έτος
17	A	20	3 έτη
18	A	70	6 μήνες
19	Θ	65	1 έτος
20	A	45	2 έτη
21	Θ	50	2 έτη
22	Θ	35	2 έτη
23	Θ	45	1 έτος
24	Θ	48	1 μήνας
25	A	50	6 μήνες
26	Θ	36	1 μήνας
27	Θ	50	3 έτη
28	Θ	80	4 έτη
29	Θ	60	5 έτη
30	A	53	2 έτη

Πίνακας 1

Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα υπολογισμού του λόγου bcr-abl/abl των 30 ασθενών σε 3 διαδοχικές ανεξάρτητες μετρήσεις με διαφορά 3 μηνών φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. (πίνακας 2)

Ασθενής	Μήνας 1 bcr-abl/abl	Μήνας 3 bcr-abl/abl	Μήνας 6 bcr-abl/abl
1	0,0051	0,0047	0,0405
2	0,229	0,268	0,6
3	1,73x10 ⁻²	neg	neg
4	0,0019	0,01267	0,0013
5	neg	neg	neg
6	neg	neg	neg
7	0,26	0,042	0,034
8	neg	0,000344	neg
9	neg	neg	neg
10	neg	neg	neg
11	0,03219	0,136	0,039
12	neg	neg	neg
13	0,00026	0,001	neg
14	0,769	0,61	0,506
15	0,3768	0,4589	0,002536
16	0,00425	0,00173	0,00157
17	neg	neg	neg
18	0,019	0,000082	0,000172
19	0,000408	0,00077	neg
20	neg	neg	0,00012
21	0,015	0,10158	0,0073
22	0,000311	neg	neg
23	0,0132	0,00411	0,00166
24	0,451	0,298	0,137
25	0,9	0,9	0,025
26	0,8546	0,0322	0,00218
27	neg	neg	neg
28	neg	neg	neg
29	neg	neg	neg
30	0,000327	0,0003636	0,0002597

Πίνακας 2

Στόχος της θεραπείας με Glivec, όπως αναφέρθηκε είναι η πλήρης αιματολογική και κυτταρογενετική ύφεση και η μέγιστη δυνατή μοριακή ύφεση της νόσου. Διατήρηση του λόγου bcr-abl/abl σε επίπεδα < 0,001 σε χρονικό διάστημα εντός 18 μηνών από την έναρξη της θεραπείας με Glivec, εξασφαλίζει όπως δείχνουν τα διεθνή κλινικά δεδομένα, εξαιρετικά καλή κλινική πορεία.

Με βάση αυτά για τους ασθενείς 1, 2, 4, 11, 14, 20, 21, 25 (πίνακας 2) λόγω παραμονής του λόγου σε υψηλά επίπεδα ή αύξησής του, έγινε αναπροσαρμογή της δόσης του Glivec με βάση τις μετρήσεις που έγιναν αντίστοιχα στους μήνες 6, 6, 3, 3, 1, 6, 3, 3 (πίνακας 2). Μετά την αναπροσαρμογή της δόσης οι ασθενείς συνεχίζουν να παρακολουθούνται σε μοριακό επίπεδο για τον έλεγχο της ανταπόκρισης.

Οι ασθενείς 3, 5, 6, 8, 9, 10, 12, 17, 22, 27, 28, 29 (πίνακας 2) παραμένουν με μη ανιχνεύσιμη νόσο στην ποσοτική PCR και συνεχίζουν την αγωγή ως έχει και την τρίμηνη μοριακή παρακολούθηση.

Στους ασθενείς 7, 15, 18, 24, 26 (πίνακας 2) με διάγνωση της νόσου σε χρονικό διάστημα <6 μηνών από την πρώτη μέτρηση, παρατηρείται προοδευτική μείωση του λόγου bcr-abl/abl και συνεχίζουν τη θεραπευτική τους αγωγή.

Συμπεράσματα

Η διάγνωση και παρακολούθηση της πορείας των αιματολογικών νοσημάτων βασίζεται στη συνδυασμένη χρήση της μορφολογίας, των κυτταροχημικών χρώσεων, της ιστολογίας, του ανοσοφαινότυπου, του κυτταρογενετικού ελέγχου και των μοριακών τεχνικών. Είναι σαφές ότι το πιο σημαντικό στοιχείο στην αιτιοπαθογένεια και τον καθορισμό της πρόγνωσης των αιματολογικών νοσημάτων είναι η υποκείμενη γενετική βλάβη(ες). Η μοριακή βλάβη καθορίζει τη βιολογία, την πρόγνωση και συχνά τη χρήση συγκεκριμένης θεραπείας σε ένα αιματολογικό νόσημα. Οι γενετικές διεργασίες που συμβαίνουν σε μοριακό επίπεδο στα αιματολογικά νοσήματα, έχουν επιβάλλει την ανάπτυξη μιας πληθώρας τεχνικών που χρησιμοποιούνται στην κατάταξη και διάγνωση αιματολογικών νοσημάτων με βάση τους μοριακούς παθογενετικούς μηχανισμούς και στο σχεδιασμό στοχευμένων θεραπευτικών χειρισμών. Οι μοριακές τεχνικές έχουν γίνει αναπόσπαστο στοιχείο της καθημερινής κλινικής πρακτικής στην Αιματολογία, ενώ αρκετές είναι ακόμη σε ερευνητική χρήση μόνο. Ο εντυπωσιακός όγκος πληροφοριών που συλλέγονται από τις τεχνικές αυτές δημιουργεί τις προϋποθέσεις για την κατανόηση της βιολογίας αρκετών νοσημάτων, αλλά ταυτόχρονα σταδιακά επιβάλλει την ανάγκη συνδυασμένης προσέγγισης των νοσημάτων αυτών με βάση κλινικά, εργαστηριακά και μοριακά δεδομένα.

Παράδειγμα εφαρμογής αυτών των γνώσεων στη θεραπεία και παρακολούθηση των ασθενών, αποτελεί η Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία. Η χορήγηση ειδικής στοχευμένης θεραπείας (Glivec) έχει αλλάξει τη φυσική πορεία της νόσου. Η στενή και συχνή παρακολούθηση των ασθενών με κύριο εργαλείο τον ποσοτικό έλεγχο των επιπέδων της νόσου με ποσοτική PCR, εξασφαλίζει τη μέγιστη θεραπευτική ανταπόκριση και ταυτόχρονα την έγκαιρη λήψη θεραπευτικών αποφάσεων για εκείνους τους ασθενείς που η ανταπόκριση στη χορηγούμενη θεραπεία δεν είναι η αναμενόμενη. Διατήρηση του λόγου $bcr-abl/abl$ σε χαμηλά επίπεδα εξασφαλίζει μακρά ή και φυσιολογική επιβίωση, ενώ έγκαιρη ανακάλυψη της αύξησης των επιπέδων βοηθάει στην αποτελεσματική παρέμβαση με αναπροσαρμογή της δόσης ή αλλαγή της στοχευμένης θεραπείας.

Στο άμεσο μέλλον προβλέπεται η ανεύρεση πιο εξελιγμένων και στοχευμένων μορφών θεραπείας καθώς και η κατανόηση των μηχανισμών δράσης των βιοχημικών μονοπατιών που σχετίζονται με τη νόσο. Ο ρόλος της ποσοτικής PCR αποτελεί αναπόσπαστο μέρος και της ερευνητικής διαδικασίας για την αποτελεσματικότητα των νέων φαρμάκων.

Βιβλιογραφία

- (1) Richard T. Silver 128. Chronic Myeloid Leukemia Section 34. Hematopoietic System in Cancer Medicine, 6th edition, BC Decker Inc, 2003
- (2) Enright H, Mcglave P. Chronic Myeloid Leukemia Chapter 62 in Hoffmann et al Hematology: Basic principles and Practice, 3rd Edition, Philadelphia: WB Saunders, 2000
- (3) Faderl S, Talpaz M, Estrov Z et al. The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 1999;341:164-172.
- (4) Lee SJ. Chronic myelogenous leukaemia. *Br J Haematol.* 2000;111:993-1009.
- (5) Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science.* 1960;132:1497.
- (6) Wong S, Witte ON. The BCR-ABL story: bench to bedside and back. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:247-306.
- (7) Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature.* 1973;243:290-293.
- (8) Cortes J, Kantarjian HM, Giralt S, Talpaz M. Natural history and staging of chronic myelogenous leukaemia. *Baillieres Clin Haematol.* 1997;10:277-290.
- (9) Barnes DJ, Melo JV. Cytogenetic and molecular genetic aspects of chronic myeloid leukaemia. *Acta Haematol.* 2002;108:180-202.
- (10) Kipreos ET, Wang JY. Cell cycle-regulated binding of c-Abl tyrosine kinase to DNA. *Science.* 1992;256:382-385.
- (11) Yuan ZM, Shioya H, Ishiko T et al. p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nature.* 1999;399:814-817.
- (12) Lewis JM, Schwartz MA. Integrins regulate the association and phosphorylation of paxillin by c-Abl. *J Biol Chem.* 1998;273:14225-14230.
- (13) Goldman JM, Melo JV. Chronic Myeloid Leukemia - advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med.* 2003;349:1451-1464.
- (14) Melo JV, Hughes TP, Apperley JF. Chronic myeloid leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program).* 2003;132-152.
- (15) Kantarjian H, Melo JV, Tura S, Giralt, Talpaz M. Chronic myelogenous leukaemia: Diseases biology and current and future therapeutic strategies. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program).* 2000;90-109.
- (16) Melo JV, Gordon DE, Tuszynski A et al. Expression of the ABL-BCR fusion gene in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1993;81:2488-2491.
- (17) Ravandi F, Cortes J, Albitar M et al. Chronic myelogenous leukaemia with p185(BCR/ABL) expression: characteristics and clinical significance. *Br J Haematol.* 1999;107:581-586.
- (18) Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N et al. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell.* 1984;36:93-99.

- (19) Pane F, Frigeri F, Sindona M et al. Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). *Blood*. 1996;88:2410-2414.
- (20) Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000;96:3343-3356.
- (21) Kantarjian HM, Talpaz M, Dhingra K et al. Significance of the P210 versus P190 molecular abnormalities in adults with Philadelphia chromosome-positive acute leukemia. *Blood*. 1991;78:2411-2418.
- (22) Martiat P, Mecucci C, Nizet Y et al. P190 BCR/ABL transcript in a case of Philadelphia-positive multiple myeloma. *Leukemia*. 1990;4:751-754.
- (23) Melo JV, Myint H, Galton DA, Goldman JM. P190BCR-ABL chronic myeloid leukaemia: the missing link with chronic myelomonocytic leukaemia? *Leukemia*. 1994;8:208-211.
- (24) Kurzrock R, Shtalrid M, Gutterman JU et al. Molecular analysis of chromosome 22 breakpoints in adult Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 1987;67:55-59.
- (25) Mitani K, Sato Y, Tojo A et al. Philadelphia chromosome positive B-cell type malignant lymphoma expressing an aberrant 190 kDa bcr-abl protein. *Br J Haematol*. 1990;76:221-225.
- (26) Wilson G, Frost L, Goodeve A et al. BCR-ABL transcript with an e19a2 (c3a2) junction in classical chronic myeloid leukemia. *Blood*. 1997;89:3064.
- (27) Zhao X, Ghaffari S, Lodish H, Malashkevich VN, Kim PS. Structure of the Bcr-Abl oncoprotein oligomerization domain. *Nat Struct Biol*. 2002;9:117-120.
- (28) Marais R, Light Y, Paterson HF, Marshall CJ. Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. *EMBO J*. 1995;14:3136-3145.
- (29) Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. 2001;410:37-40.
- (30) Ilaria RL, Jr., Van Etten RA. P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. *J Biol Chem*. 1996;271:31704-31710.
- (31) Horita M, Andreu EJ, Benito A et al. Blockade of the Bcr-Abl kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-xL. *J Exp Med*. 2000;191:977-984.
- (32) Sattler M, Salgia R, Okuda K et al. The proto-oncogene product p120CBL and the adaptor proteins CRKL and c-CRK link c-ABL, p190BCR/ABL and p210BCR/ABL to the phosphatidylinositol-3' kinase pathway. *Oncogene*. 1996;12:839-846.
- (33) Gesbert F, Sellers WR, Signoretti S, Loda M, Griffin JD. BCR/ABL regulates expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 through the phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT pathway. *J Biol Chem*. 2000;275:39223-39230.
- (34) Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell*. 1997;88:435-437.
- (35) Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell*. 1996;87:619-628.

- (36) Ohmine K, Ota J, Ueda M et al. Characterization of stage progression in chronic myeloid leukemia by DNA microarray with purified hematopoietic stem cells. *Oncogene*. 2001;20:8249-8257.
- (37) Daley GQ, Baltimore D. Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210bcr/abl protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85:9312-9316.
- (38) Sirard C, Laneuville P, Dick JE. Expression of bcr-abl abrogates factor-dependent growth of human hematopoietic M07E cells by an autocrine mechanism. *Blood*. 1994;83:1575-1585.
- (39) Bedi A, Barber JP, Bedi GC et al. BCR-ABL-mediated inhibition of apoptosis with delay of G2/M transition after DNA damage: a mechanism of resistance to multiple anticancer agents. *Blood*. 1995;86:1148-1158.
- (40) Amarante-Mendes GP, Naekyung KC, Liu L et al. Bcr-Abl exerts its antiapoptotic effect against diverse apoptotic stimuli through blockage of mitochondrial release of cytochrome C and activation of caspase-3. *Blood*. 1998;91:1700-1705.
- (41) Neshat MS, Raitano AB, Wang HG, Reed JC, Sawyers CL. The survival function of the Bcr-Abl oncogene is mediated by Bad- dependent and -independent pathways: roles for phosphatidylinositol 3- kinase and Raf. *Mol Cell Biol*. 2000;20:1179-1186.
- (42) Gordon MY, Dowding CR, Riley GP, Goldman JM, Greaves MF. Altered adhesive interactions with marrow stroma of haematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature*. 1987;328:342-344.
- (43) Verfaillie CM, Hurley R, Lundell BI, Zhao C, Bhatia R. Integrin-mediated regulation of hematopoiesis: do BCR/ABL-induced defects in integrin function underlie the abnormal circulation and proliferation of CML progenitors? *Acta Haematol*. 1997;97:40-52.
- (44) Sawyers CL. Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 1999;340:1330-1340.
- (45) Berger U, Engelich G, Reiter A, Hochhaus A, Hehlmann R. Imatinib and beyond--the new CML study IV. A randomized controlled comparison of imatinib vs imatinib/interferon-alpha vs imatinib/low-dose AraC vs imatinib after interferon-alpha failure in newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia. *Ann Hematol*. 2004;83:258-264.
- (46) Druker BJ, Sawyers CL, Capdeville R et al. Chronic myelogenous leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*. 2001;87-112.
- (47) Salesse S, Verfaillie CM. BCR/ABL: from molecular mechanisms of leukemia induction to treatment of chronic myelogenous leukemia. *Oncogene*. 2002;21:8547-8559.
- (48) Cancer treatment: Present and future, in Chapter 23: Cancer, in Alberts et al *Molecular biology of the cell*. 4th edition GarlandScience, 2002
- (49) Schindler T, Bornmann W, Pellicena P et al. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science*. 2000;289:1938-1942.
- (50) Nagar B, Bornmann WG, Pellicena P et al. Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). *Cancer Res*. 2002;62:4236-4243.
- (51) Kaelin WG, Jr. Gleevec: prototype or outlier? *Sci STKE*. 2004;2004:e12.

- (52) Krause DS, VanEtten RA. Tyrosine kinases as targets to cancer therapy. *N Engl J Med.* 2005;353:172-187.
- (53) Jones RJ, Matsui WH, Smith BD. Cancer stem cells: are we missing the target? *J Natl Cancer Inst.* 2004;96:583-585.
- (54) National Institute for Clinical Excellence. Final appraisal determination-imatinib for chronic myeloid leukaemia. 1-8-0003.
Ref Type: Report
- (55) Goldman JM. Chronic myeloid leukemia-still a few questions. *Exp Hematol.* 2004;32:2-10.
- (56) Gambacorti-Passerini CB, Gunby RH, Piazza R et al. Molecular mechanisms of resistance to imatinib in Philadelphia-chromosome-positive leukaemias. *Lancet Oncol.* 2003;4:75-85.
- (57) Hochhaus A, Kreil S, Corbin AS et al. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia.* 2002;16:2190-2196.
- (58) Branford S, Rudzki Z, Walsh S et al. Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood.* 2003;102:276-283.
- (59) Corbin AS, Buchdunger E, Pascal F, Druker BJ. Analysis of the structural basis of specificity of inhibition of the Abl kinase by STI571. *J Biol Chem.* 2002;277:32214-32219.
- (60) Kreil S, Müller MC, Lahaye T et al. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance in CML patients after STI571 (Glivec) therapy [abstract]. *Blood.* 2002;98:435a.
- (61) Kreuzer KA, le Coutre P, Landt O et al. Preexistence and evolution of imatinib mesylate-resistant clones in chronic myelogenous leukemia detected by a PNA-based PCR clamping technique. *Ann Hematol.* 2003;82:284-289.
- (62) Mahon FX, Deininger MW, Schultheis B et al. Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood.* 2000;96:1070-1079.
- (63) le Coutre P, Tassi E, Varella-Garcia M et al. Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI571 in human leukemic cells through gene amplification. *Blood.* 2000;95:1758-1766.
- (64) Kuo MT, Vyas RC, Jiang LX, Hittelman WN. Chromosome breakage at a major fragile site associated with P-glycoprotein gene amplification in multidrug-resistant CHO cells. *Mol Cell Biol.* 1994;14:5202-5211.
- (65) Herens C, Baron F, Croisiau C, Tassin F, Bours V. Clonal chromosome aberrations in Philadelphia-negative cells from chronic myelocytic leukemia patients treated with imatinib mesylate: report of two cases. *Cancer Genet Cytogenet.* 2003;147:78-80.
- (66) Collins S, Coleman H, Groudine M. Expression of bcr and bcr-abl fusion transcripts in normal and leukemic cells. *Mol Cell Biol.* 1987;7:2870-2876.
- (67) Arceci RJ. Clinical significance of P-glycoprotein in multidrug resistance malignancies. *Blood.* 1993;81:2215-2222.

(68) Illmer T, Schaich M, Platzbecker U et al. P-glycoprotein-mediated drug efflux is a resistance mechanism of chronic myelogenous leukemia cells to treatment with imatinib mesylate. *Leukemia*. 2004;18:401-408.

(69) Ferrao PT, Frost MJ, Siah SP, Ashman LK. Overexpression of P-glycoprotein in K562 cells does not confer resistance to the growth inhibitory effects of imatinib (STI571) in vitro. *Blood*. 2003;102:4499-4503.

(70) Gambacorti-Passerini C, Barni R, le Coutre P et al. Role of alpha1 acid glycoprotein in the in vivo resistance of human BCR-ABL(+) leukemic cells to the abl inhibitor STI571. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92:1641-1650.

(71) le Coutre P, Kreuzer KA, Na IK et al. Determination of alpha-1 acid glycoprotein in patients with Ph+ chronic myeloid leukemia during the first 13 weeks of therapy with STI571. *Blood Cells Mol Dis*. 2002;28:75-85.

(72) Talpaz M, Shah NP, Kantarjian H, Donato N, Nicoll J, Paquette R, Cortes J, O'Brien S, Nicaise C, Bleickardt E, Blackwood-Chirchir MA, Iyer V, Chen TT, Huang F, Decillis AP, Sawyers CL. Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med*. 2006; 354(24):2531-2541

