

## ΣΗΜΕΙΑΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ N-RAS ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΜΥΕΛΟΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ

**Δρ. Ρέγκλη Αρετή**

Βιολόγος, Αιματολογικό τμήμα, Νοσοκομείο Παμμακάριστος  
e-mail: goumasj@otenet.gr

### Περίληψη

Η διερεύνηση της συχνότητας και της προγνωστικής σημασίας των σημειακών μεταλλάξεων στα κωδικόνια 12,13 και 61 του γονιδίου N-RAS σε ασθενείς με Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα(ΜΔΣ).

**Λέξεις κλειδιά:** Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα, σημειακή μετάλλαξη, ελληνικός πληθυσμός.

### Εισαγωγή

Περισσότερα από 20 πρωτο-ογκογονίδια έχουν ταυτοποιηθεί κυρίως από την παρουσία τους σε ογκογόνους ρετροϊούς. Η αρχική πρόβλεψη ότι αυτά θα είναι γονίδια που σχετίζονται με την προώθηση της αύξησης έχει ως τώρα επαληθευθεί σε αρκετές περιπτώσεις.1.

Αν και τα πρωτοογκογονίδια αντιπροσωπεύουν αλληλουχίες απαραίτητες για τη φυσιολογική κυτταρική ανάπτυξη διάφορα γεγονότα είναι υπεύθυνα για την ενεργοποίησή τους και την μετέπειτα απώλεια ελέγχου π.χ. σημειακές μεταλλαγές, γονιδιακή ενίσχυση, χρωμοσωμικές ανωμαλίες κλπ. Το γονίδιο ras που τροποποιήθηκε από κύτταρα ανθρώπινου καρκινώματος της ουροδόχου κύστεως ήταν στην αρχή ένα αίνιγμα. Καμμία μεγάλη ανακατάταξη αυτού του γονιδίου δεν ήταν προφανής όταν συγκρινόταν με το φυσιολογικό του ανάλογο σε μη καρκινικά κύτταρα.1.

Η ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου αποκάλυψε μια εκπληκτικά λεπτή ανωμαλία, δηλαδή μια σημειακή μεταλλαγή στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου που μετατρέπει τη γλυκίνη σε βαλίνη. Η ανάλυση ενός μεγάλου αριθμού καρκίνων του πνεύμονα και του παχέος εντέρου, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο διαμόλυνσης των κυττάρων 3T3 ποντικού είχε σαν αποτέλεσμα τη κλωνοποίηση ενεργοποιημένων γονιδίων H-ras, K-ras και N-ras γονιδίων τα οποία είναι σχετιζόμενα μέλη της ίδιας γονιδιακής οικογένειας.1.

Αξιοσημείωτο είναι ότι όλα αυτά τα ενεργοποιημένα γονίδια περιείχαν σημειακές μεταλλαγές είτε στο κωδικόνιο 12 είτε στο κωδικόνιο 13 είτε στο κωδικόνιο 61 του γονιδίου ras, γεγονός που υποδηλώνει ότι αυτές οι θέσεις πρέπει να είναι εξαιρετικά σημαντικές για το φυσιολογικό έλεγχο της κυτταρικής αύξησης. Πρόσφατες μελέτες

έδειξαν ότι το πρωτεϊνικό προϊόν του *ras* υπάρχει σε μια ενεργή μορφή που προσδένει το GTP και σε μια ανενεργή μορφή που προσδένει το GDP. Προφανώς, αυτές οι σημειακές μεταλλάξεις εμποδίζουν την αυτομετραπή της πρωτεΐνης του *ras* από την ενεργή στην ανενεργή μορφή της έτσι ώστε να επιτρέπουν μια χωρίς ρύθμιση αύξηση.

Σκοπός της παρούσης εργασίας είναι η διερεύνηση της συχνότητας και της προγνωστικής σημασίας των σημειακών μεταλλάξεων στα κωδικόνια 12,13 και 61 του γονιδίου N-RAS σε ασθενείς με Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (ΜΔΣ).

### Υλικά και μέθοδοι

Μελετήθηκαν 61 ασθενείς με ΜΔΣ, 19 με ανθεκτική αναιμία (RA), 10 με ανθεκτική αναιμία με δακτυλιοειδείς ερυθροβλάστες (RARS), 16 με ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών (RAEB), 7 με ανθεκτική αναιμία με περίσσεια βλαστών σε μετατροπή (RAEB-t) και 9 ασθενείς με χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία (CMML), σύμφωνα με την κατά FAB ταξινόμηση. Απομόνωση DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος.

Ενίσχυση των εξονίων 1 και 2 που περιλαμβάνουν τα κωδικόνια 12,13 και 61 του N-RAS γονιδίου με την τεχνική της “φωλιασμένης” αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (nested PCR). Πέψη των προϊόντων PCR με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού BstNI και MboI και διαχωρισμό των προϊόντων με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή γαρόζης για ανίχνευση μεταλλάξεων στα κωδικόνια 12 και 13 αντίστοιχα.

Ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων PCR για την ανίχνευση μεταλλάξεων στις περιοχές των εξονίων 1 (κωδικόνιο 12 και 13) και 2 (κωδικόνιο 61). Η στατιστική επεξεργασία έγινε στο EMPI και χρησιμοποιήθηκε το Mann Whitney test και ο συντελεστής συσχέτισης Spearman.

### Αποτελέσματα

Μεταλλάξεις του γονιδίου ανιχνεύθηκαν στο 8% των ασθενών με υποτύπο RAEB και CMML. Ο συχνότερος τύπος μετάλλαξης (75%) στον ελληνικό πληθυσμό είναι αντικατάσταση της γουανίνης από αδενίνη, στην πρώτη θέση του κωδικονίου 12 και 25% αντικατάσταση της γουανίνης από κυτοσίνη στην πρώτη θέση του κωδικονίου 12. Στο 40% των ασθενών με μεταλλάξεις στο γονίδιο N-RAS και στο 15% των μη φερόντων τη μετάλλαξη η νόσος εξελίχθηκε σε λευχαιμία.

ΜΔΣ					
ΥΠΟΤΥΠΟΙ	RA	RARS	RAEB	RAEB-t	CMML
ΑΣΘΕΝΕΙΣ	19	10	16	7	9
N-RAS POINT MUTATION	--	--	2	--	3

## Συζήτηση

Τα ΜΔΣ είναι μια ομάδα κλωνικών νοσημάτων. Αποτελούν μια ετερογενή ομάδα διαταραχών του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου που χαρακτηρίζεται από μη αποτελεσματική αιμοποίηση, προοδευτική κυτταροπενία και διαφόρου βαθμού κίνδυνο εκτροπής σε οξεία λευχαιμία.(6). Πειραματικά δεδομένα έχουν δείξει ότι ο μυελός των οστών και τα T λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος αρρώστων με ΜΔΣ έχουν ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη των CFU-E(5). Άλλη ομάδα έδειξε ότι σε ένα ποσοστό αρρώστων με ΜΔΣ ο πληθυσμός των κατασταλτικών T- λεμφοκυττάρων δρα κατασταλτικά στην ανάπτυξη των CFU-GM. Πολλές μελέτες έχουν στραφεί στις γονιδιακές μεταλλάξεις που απαντώνται στους διαφόρους υποτύπους ΜΔΣ. (4) Το γονίδιο *gas* που τροποποιήθηκε από κύτταρα ανθρώπινου καρκινώματος της ουροδόχου κύστεως ήταν στην αρχή ένα αίνιγμα. Καμία μεγάλη ανακατάταξη αυτού του γονιδίου δεν ήταν προφανής όταν συγκρινόταν με το φυσιολογικό του ανάλογο σε μη καρκινικά κύτταρα.1.

Η ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου αποκάλυψε μια εκπληκτικά λεπτή ανωμαλία, δηλαδή μια σημειακή μεταλλαγή στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου που μετατρέπει τη γλυκίνη σε βαλίνη. Η ανάλυση ενός μεγάλου αριθμού καρκίνων του πνεύμονα και του παχέος εντέρου, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο διαμόλυνσης των κυττάρων 3T3 ποντικού είχε σαν αποτέλεσμα τη κλωνοποίηση ενεργοποιημένων γονιδίων H-*gas*, K- *gas* και N- *gas* γονιδίων τα οποία είναι σχετιζόμενα μέλη της ίδιας γονιδιακής οικογένειας.1.

Αξιοσημείωτο είναι ότι όλα αυτά τα ενεργοποιημένα γονίδια περιείχαν σημειακές μεταλλαγές είτε στο κωδικόνιο 12 είτε στο κωδικόνιο 13 είτε στο κωδικόνιο 61 του γονιδίου *gas*, γεγονός που υποδηλώνει ότι αυτές οι θέσεις πρέπει να είναι εξαιρετικά σημαντικές για το φυσιολογικό έλεγχο της κυτταρικής αύξησης. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι το πρωτεϊνικό προϊόν του *gas* υπάρχει σε μια ενεργή μορφή που προσδένει το GTP και σε μια ανενεργή μορφή που προσδένει το GDP. Προφανώς, αυτές οι σημειακές μεταλλαγές εμποδίζουν την αυτομετραπή της πρωτεΐνης του *gas* από την ενεργή στην ανενεργή μορφή της, έτσι ώστε να επιτρέπουν μια χωρίς ρύθμιση αύξηση (1).

Οι σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου N-RAS μπορεί να μην ξεκινούν γεγονότα, αλλά μπορούν να συνεισφέρουν σε μια κλωνική εξέλιξη του ΜΔΣ σε ΟΛ.(2). Αυτά τα οποία μα επιτρέπεται να προσθέσουμε από την έρευνά μας στα μέχρι στιγμής δεδομένα και ιδιαίτερα για τον ελληνικό πληθυσμό είναι τα κάτωθι:

- Η συχνότητα εμφάνισης μεταλλάξεων του N-RAS γονιδίου σε Ελληνικό πληθυσμό με ΜΔΣ ανέρχεται σε 8%.
- Οι μεταλλάξεις εμφανίζονται συχνότερα σε ασθενείς με CMML.
- Ο συχνότερος τύπος μετάλλαξης στον ελληνικό πληθυσμό είναι εκείνος της αντικατάστασης της γουανίνης από αδενίνη στην πρώτη θέση του κωδικονίου 12.
- Οι σημειακές μεταλλάξεις N-RAS ενδεχομένως να παίζουν κάποιο ρόλο στη συχνότητα εξέλιξης των ΜΔΣ σε οξεία λευχαιμία.

## Βιβλιογραφία

1. PRINCIPLES OF MEDICAL GENETICS. Thomas D. Gelehrter, MD, Francis S. Collins, MD., PH.D., Williams & Wilkins, edition 2000, page 174.
2. CANCER GENETICS. 2000 Mar;117(2):104-7 Complex karyotype and N-RAS point mutation in a case of acute megakaryoblastic leukemia following a MDS. De Souza Fernandez T, et al.
3. BR J HAEMATOL. 2002 Jul;118(1):174-80 Prolonged administration of EPO increases erythroid response rate in MDS: a phase II trial in 281 patients. Terpos E., et al
4. LEUKEMIA. 2006 Apr;20(4):635-44 Hyperactivation of the RAS signalling pathway in MDS with AML1/RUNX1 point mutations. Minmi H, et al.
5. Αιματολογία. Κ. Α. Μπουραντάς, Εκδόσεις Πανεπιστημίου Ιωαννίνων 2006.
6. Ηλιοπουλος Γ. Προγονικές αιμοποιητικές βαθμίδες. Φυσιολογία και Φυσιοπαθολογία του αίματος και των αιμοποιητικών οργάνων, Εκδ. Πανεπιστημίου Ηρακλείου, 1999.