

Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ιατρική Σχολή

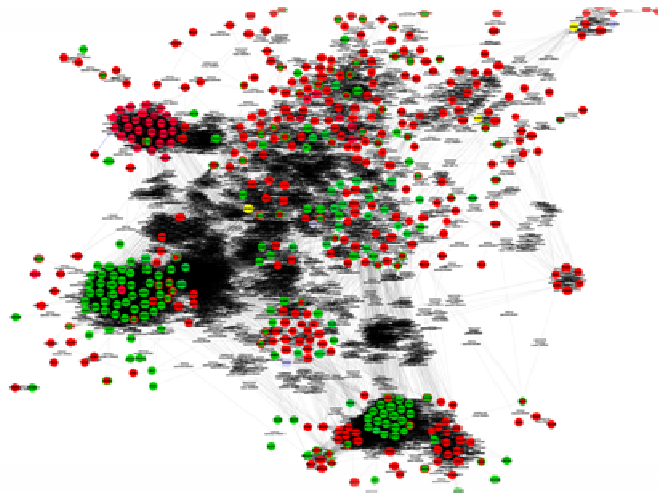
Κλινικοεργαστηριακός Τομέας

Α' Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής

Διευθυντής: Καθηγητής Ε. Πατσούρης

Διδακτορική διατριβή

"Γενωμική και πρωτεωμική ανάλυση της επαγωγής
του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 σε Hodgkin
και μη-Hodgkin λεμφώματα"



Κωνσταντίνα Αθ. Ψαθά

Βιολόγος, MSc

Αθήνα, Οκτώβριος 2015

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΟΥ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑΣ ΑΘ. ΨΑΘΑ

ΘΕΜΑ: «Γενωμική και πρωτεωμική ανάλυση της επαγωγής του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 σε Hodgkin και μη Hodgkin λεμφώματα».

Η κ. Κωνσταντίνα Ψαθά υπέβαλε την 22/11/07 αίτηση στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Αθηνών για εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Αθηνών με αριθμό πρωτοκόλλου 6740. Η Γ.Σ.Ε.Σ. της Ιατρικής Σχολής στη συνεδρίαση της 20/2/08 όρισε την ακόλουθη Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή: 1. Πατσούρης Ευστράτιος (Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής) 2. Γοργούλης Βασίλειος (Καθηγητής Ιστολογίας) και 3. Ρασιδάκης Γεώργιος (Επικ. Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής). Η Γ.Σ.Ε.Σ. της Ιατρικής Σχολής στη συνεδρίαση της 29/7/08 καθόρισε ως θέμα της διδακτορικής διατριβής το εξής: «Γενωμική και πρωτεωμική ανάλυση της επαγωγής του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 σε Hodgkin και μη-Hodgkin λεμφώματα». Η Γ.Σ.Ε.Σ. της Ιατρικής Σχολής στη συνεδρίαση της 30/10/15 όρισε την ακόλουθη Επταμελή Συμβουλευτική Επιτροπή: Πατσούρης Ευστράτιος (Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής) 2. Γοργούλης Βασίλειος (Καθηγητής Ιστολογίας), 3. Ρασιδάκης Ζ. Γεώργιος (Επικ. Καθηγητής Αιματολογίας), 4. Παναγιωτίδης Παναγιώτης, 5. (Επικ. Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής) Λάζαρης Χ. Ανδρέας, (Επικ. Καθηγητής Αιματολογίας) Θεόδωρος Π. Βασιλακόπουλος, 6. (Επικ. Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής) Δράκος Ηλίας.

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος II . Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.



ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Λέμφωματα Hodgkin και μη-Hodgkin
Ιστορικά στοιχεία- Ταξινόμηση-Ιστοπαθολογία λεμφωμάτων -Επιδημιολογία
Κλινικά στοιχεία, διάγνωση και σταδιοποίηση
Θεραπεία-Πρόγνωση
Λέμφωμα Από Κύτταρα Του Μανδύα
Αναπλαστικό λέμφωμα από μεγάλα κύτταρα

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53
Δομή, ρύθμιση και λειτουργία της p53
Ο ρόλος της p53 στα λεμφώματα
Nutlins και Nutlin-3A
Η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών (Microarrays)-Affymetrix
Πρωτεωμική ανάλυση
Συνδυασμός πρωτεωμικής και γενωμικής ανάλυσης ως εργαλείο

ΣΚΟΠΟΣ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Οργανολογία
Κυτταροκαλλιέργειες
Θρεπτικά μέσα
Κυτταρικές σειρές και φαρμακευτικές δοκιμασίες
(Ανα) καλλιέργεια κυττάρων
Διατήρηση/Κατάψυξη κυττάρων
Απόψυξη κυττάρων-Έναρξη κυτταροκαλλιέργειας
Μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων
Μέτρηση της συγκέντρωσης των κυττάρων
Μέτρηση μεταβολικής ενεργότητας πληθυσμού κυττάρων με MTT
Ανίχνευση της κυτταρικής απόπτωσης
Ανάλυση κυτταρικού κύκλου
Απομόνωση πρωτεϊνικού εκχυλίσματος κυττάρων
Εκχύλιση με τη χρήση υπέρηχων (Sonication)
Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών
Ανάλυση πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση μίας διάστασης (1-DE/SDS PAGE)
Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Immunoblotting, WB)
Απομόνωση RNA από κύτταρα λεμφωματικών σειρών
Φωτομετρικός ποσοτικός προσδιορισμός του RNA
Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης
Μεταγραφική ανάλυση
Affymetrix - Ποσοτικοποίηση – Κανονικοποίηση – Ανάλυση Δεδομένων
Πρωτεωμική ανάλυση

Ισοτοπική επισήμανση πρωτεϊνών με τη μέθοδο ICPL (Isotope-Coded Protein Labels)

Χρώση και αποχρωματισμός πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου με Coomassie Brilliant Blue R250 (συμβατό με MS)

Πέψη σε πήκτωμα (*in-gel digestion*) των απομονωμένων πρωτεϊνικών ζωνών

Υποβοηθούμενη με φίλτρο προετοιμασία δείγματος (Filter Aided Sample Preparation; FASP) και πέψη με θρυψίνη σε διάλυμα (*in-solution tryptic digestion*)

Ανάλυση πεπτιδικών μιγμάτων με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας νανο-ροής (nano Liquid Chromatography, nLC) συνδεδεμένη σε σειρά με φασματοόμετρο μάζας (ESI-MS/MS)

Επεξεργασία φασματομετρικών δεδομένων, ταυτοποίηση & σχετική ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών

Βιοπληροφορική ανάλυση

Μετα-επεξεργασία μικροσυστοιχιών/φασματομετρικών δεδομένων - στατιστική ανάλυση

Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID)

Perseus

Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING)

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)

Gene Ontology Consortium (GOC)

Cytoscape

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΠΕ1. Γονιδιωματική/μεταγραφική μελέτη του p53 σε Hodgkin και μη Hodgkin λεμφώματα

Μελέτη του κυτταρικού κύκλου μετά από εφαρμογή της nutlin-3A σε κυτταρικές σειρές λεμφώματος Hodgkin και μη-Hodgkin

Επίδραση της nutlin-3A στη βιωσιμότητα κυτταρικών σειρών λεμφώματος Hodgkin και μη-Hodgkin

Επίδραση της nutlin-3A στην απόπτωση κυτταρικών σειρών λεμφώματος Hodgkin και μη-Hodgkin.

Διερεύνηση με ανοσοαποτύπωση κατά Western των αλλαγών έκφρασης της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 σε κυτταρικές σειρές ανθρώπινου λεμφώματος Hodgkin και μη-Hodgkin.

Εκτίμηση των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης με μικροσυστοιχίες μετά τη χορήγηση της nutlin-3A σε κυτταρικές σειρές λεμφώματος Hodgkin και μη-Hodgkin

ΠΕ2. Πρωτεωμική μελέτη του p53 σε Hodgkin και μη Hodgkin λεμφώματα

Ταυτοποίηση και σχετική ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών στους τρεις τύπους λεμφωμάτων των οποίων τα επίπεδα μεταβάλλονται σημαντικά μετά τη σταθεροποίηση και ενεργοποίηση της p53.

Χαρακτηρισμός των πρωτεϊνικών τροποποιήσεων σε κάθε λεμφωματική κυτταρική σειρά, μετά τη σταθεροποίηση και ενεργοποίηση της p53 από την nutlin-3A.

Συγκριτική μελέτη των αποτελεσμάτων πρωτεωμικής και μεταγραφικής ανάλυσης.

Μελέτη και σύγκριση των αποτελεσμάτων της μεταγραφικής ανάλυσης κάθε λεμφωματικής κυτταρικής σειράς μετά από N3A. - Διαφορική ανάλυση του μεταγραφήματος των λεμφωματικών κυτταρικών σειρών HL, MCL και ALK+ ALCL +/- N3A

Συγκριτική ανάλυση στα κοινά μεταγραφήματα των τριών λεμφωματικών σειρών μετά από N3A.

Μελέτη και σύγκριση των αποτελεσμάτων της πρωτεωμικής ανάλυσης κάθε λεμφωματικής κυτταρικής σειράς μετά από N3A.

Συγκριτική ανάλυση στα κοινά πρωτεώματα των τριών λεμφωματικών σειρών μετά από N3A.

Συγκριτική λειτουργική ανάλυση των απορρυθμισμένων πρωτεϊνών που είναι μοναδικές στις κυτταρικές σειρές μετά από N3A.

Μελέτη και σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταγραφικής και πρωτεωμικής ανάλυσης στις τρεις ομάδες λεμφώματος μελέτης μετά από N3A.

Συγκριτική ανάλυση στα κοινά μεταγραφήματα και πρωτεώματα των τριών λεμφωματικών σειρών μετά από N3A.

Συγκριτική λειτουργική ανάλυση των απορρυθμισμένων mRNAs και πρωτεϊνών σε κυτταρικές σειρές HL, MCL, ALCL +/- N3A

Συγκριτική λειτουργική ανάλυση των απορρυθμισμένων mRNAs και πρωτεϊνών που είναι μοναδικά στις κυτταρικές σειρές μετά από N3A.

Επιβεβαίωση επιλεγμένων πρωτεϊνικών μεταβολών με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

ΠΕ3. Αξιοποίηση των γενωμικών και πρωτεωμικών δεδομένων για την μελέτη οδών δι-επικοινωνίας μεταξύ της p53 και άλλων ογκογόνων μηχανισμών σε Hodgkin και μη Hodgkin λεμφώματα.

Ανάδειξη ομάδων πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και πιθανώς μετέχουν στην ίδια οδό μεταγωγής σήματος.

Προσδιορισμός απορρυθμισμένων γονιδίων/πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο μονοπάτι του p53

Προσδιορισμός απορρυθμισμένων γονιδίων/πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο μονοπάτι του κυτταρικού κύκλου

Προσδιορισμός απορρυθμισμένων γονιδίων/πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο μονοπάτι της απόπτωσης

Προσδιορισμός απορρυθμισμένων γονιδίων/πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο μονοπάτι της επιδιόρθωσης του DNA

Προσδιορισμός απορρυθμισμένων γονιδίων/πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο μονοπάτι του PI3K/AKT/mTOR

Προσδιορισμός απορρυθμισμένων γονιδίων/πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο μονοπάτι του HSR

Παρουσίαση βιολογικών αποτελεσμάτων μετά από ταυτόχρονη αναστολή ογκογόνων οδών και επίδραση με nutlin 3A.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Συμπεράσματα

Βιβλιογραφικές αναφορές

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Παράρτημα I:

Π.Ε.1 Γονιδιωματική (μεταγραφική) μελέτη του p53 σε Hodgkin και μη Hodgkin λεμφώματα

Παράρτημα II:

Π.Ε.2 Πρωτεωμική μελέτη του p53 σε Hodgkin και μη Hodgkin λεμφώματα

Παράρτημα III:

Π.Ε.3 Αξιοποίηση των γενωμικών και πρωτεωμικών δεδομένων για την μελέτη οδών δι-επικοινωνίας μεταξύ της p53 και άλλων ογκογόνων μηχανισμών σε Hodgkin και μη Hodgkin λεμφώματα.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ

Γενικά χαρακτηριστικά

Τα λεμφώματα αποτελούν την πιο συχνή μορφή κακοήθειας του αίματος, που οφείλονται στον ανώμαλο και ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων του λεμφικού συστήματος, των λεμφοκυττάρων. Ειδικότερα, συνιστούν μία ετερογενή ομάδα νεοπλασμάτων που μπορεί να προέρχονται από εξαλλαγμένα κύτταρα Β, Τ ή φυσικούς-φονείς (NK) του λεμφικού ιστού σε κάποιο στάδιο της διαφοροποίησής τους. Παραδοσιακά, διακρίνονται σε δυο μεγάλες κατηγορίες (Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, ΠΟΥ, 1998), οι οποίες διαφέρουν στον τρόπο ανάπτυξής τους, στη μεταφορά τους σε γειτονικούς ιστούς και στη θεραπευτική αγωγή που ακολουθείται με σκοπό την αντιμετώπισή τους:

1. Στο λέμφωμα ή νόσο του Hodgkin (Hodgkin's Lymphoma, HL), που αποτελείται από Β-λεμφοκύτταρα και συνιστά το 11,5% των λεμφωμάτων, και
2. Στα λεμφώματα μη-Hodgkin (Non Hodgkin's Lymphomas, NHL), που αποτελούνται από Β- ή Τ- /NK λεμφοκύτταρα και συνιστούν την πληθώρα των λεμφωμάτων (88,5%).

Το **λέμφωμα Hodgkin** ήταν από τα πρώτα νεοπλάσματα που ορίστηκαν με σχετική σαφήνεια ιστοπαθολογικά. Πρόκειται για μία σπάνια, κακοήθη υπερπλασία των λεμφοκυττάρων δευτερογενών λεμφικών οργάνων, άγνωστης κυρίως αιτιολογίας, που παρ'όλ'αυτά, αποτελεί πρότυπο ιάσιμης νεοπλασίας του αιμοποιητικού συστήματος. Εμφανίζεται κατά πλειοψηφία σε εφήβους και νεαρούς ενήλικες, προσβάλλοντας συνήθως τραχηλικούς λεμφαδένες. Χαρακτηρίζεται από την παρουσία των διάσπαρτων γιγαντιαίων νεοπλασματικών κυττάρων Hodgkin-Reed-Sternberg (HRS) (αποτελούν συνήθως <1% του συνολικών κυττάρων του όγκου), που συχνά περιβάλλονται δίκην ροζέτας από Τ λεμφοκύτταρα και από τα μη νεοπλασματικά λεμφοκύτταρα και άλλα φλεγμονώδη κύτταρα, τα οποία επικρατούν έναντι των κυττάρων του κακοήθους όγκου [al., 2008 #250][Jaffe, 2001 #251].

Τα **λεμφώματα μη-Hodgkin** αποτελούν την πιο συνηθισμένη μορφή λεμφώματος και προσβάλουν κυρίως ενήλικες (είναι 7 φορές συχνότερα από τα λεμφώματα τύπου Hodgkin). Πρόκειται για μία ετερογενή ομάδα άνω των 30 διαφορετικών υποτύπων λεμφωμάτων, που έχουν πολυεστιακή έναρξη (λεμφικά όργανα), μπορούν να επεκταθούν σε μυελό των οστών και ποικίλλα άλλα όργανα. Οι διάφοροι τύποι λεμφώματος NHL παρουσιάζουν λιγότερο

προβλέψιμη πορεία από το HL, με κοινά χαρακτηριστικά αλλά και σημαντικές διαφορές όσον αφορά την ιστολογική και μορφολογική τους εικόνα, τον ανοσοφαινότυπο των νεοπλασματικών κυττάρων, τα γενετικά και κλινικά χαρακτηριστικά του ασθενούς, καθώς και την ανταπόκρισή του στη θεραπεία και την πρόγνωση.

Παρά, τις διαφορές των λεμφωμάτων Hodgkin και μη-Hodgkin σε ιστοπαθολογικό, βιολογικό και κλινικό επίπεδο, έχουν καταγραφεί και περιπτώσεις, όπου: (α) τα λεμφώματα Hodgkin και μη-Hodgkin συνυπάρχουν, με ταυτόχρονη, ταυτόσημη ή ξεχωριστή εντόπιση (π.χ. οζώδες, ή του μανδύα, ή της μεθοριακής ζώνης λέμφωμα μαζί με Hodgkin) {Zettl, 2005 #252}{Marafioti, 1999 #253}{Huang, 2006 #254}{van den Berg, 2002 #255}{Caleo, 2003 #256} (β) το ένα είδος λεμφώματος διαδέχεται το ένα το άλλο (HL → NHL, {Huang, 2006 #254} NHL→HL){Mao, 2007 #257}{Ohno, 1998 #258}{Venkatraman, 2007 #259}{Kanzler, 2000 #260}{de Leval, 2004 #261}, (δ) αναπτύσσεται ένα λέμφωμα με «ενδιάμεσα» χαρακτηριστικά Hodgkin και μη-Hodgkin λεμφώματος (λεμφώματα «γκρίζων περιοχών»){Rudiger, 1998 #262}. Η τελευταία περίπτωση περιλαμβάνει τρεις “γκρίζες” περιοχές και αποτελεί ενεργό πεδίο εξέλιξης της παρούσας ταξινόμησης των λεμφωμάτων {Dogan, 2005 #263}.

Ιστορικά στοιχεία-Ταξινόμηση-Ιστοπαθολογία λεμφωμάτων-Επιδημιολογία

Το λέμφωμα Hodgkin πήρε την ονομασία του από το Βρετανό ιατρό Thomas Hodgkin το έτος 1832, ο οποίος μελετώντας μακροσκοπικά τα νεκροτομικά ευρήματα ασθενών που εμφάνιζαν λεμφαδενική διόγκωση και σπληνομεγαλία, έδωσε την πρώτη περιγραφή του λεμφώματος.

Η ταξινόμηση των λεμφωμάτων σε διακριτές ιστοπαθολογικές οντότητες συνέβαλε ώστε να γίνει πιο αποτελεσματική η διαχείριση της ανθρώπινης υγείας, διευκολύνοντας την έγκαιρη και αποτελεσματική πρόγνωση, καθώς και την επιλογή της εκάστοτε κατάλληλης θεραπείας. Το διεθνώς αποδεκτό πρότυπο κατηγοριοποίησης νεοπλασμάτων του αιμοποιητικού/λεμφικού ιστού, επιτεύχθηκε με βάση τον ΠΟΥ, στηριζόμενο στις αρχές ταξινόμησης REAL (Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms), που βασίζονται στους ιστοπαθολογικούς και γενετικούς δείκτες.

Σύμφωνα με την τελευταία ταξινόμηση του ΠΟΥ (2008), σήμερα ο όρος «**Λέμφωμα Hodgkin**», χωρίς να αποφεύγονται και οι ιστολογικές παραλλαγές (περιπτώσεις λεμφώματος Hodgkin με μη τυπικά ιστολογικά χαρακτηριστικά), περιλαμβάνει δύο κύριες ιστολογικές οντότητες, που ενώ διαφέρουν επιδημιολογικά, κλινικο/προγνωστικά, ιστολογικά, στη συχνότητα λοίμωξης από τον ιό Epstein-Barr (EBV) και παθοβιολογικά, συγκεντρώνουν

ανοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά που είναι ταυτόσημα. Ειδικότερα, διακρίνονται:

1) το κλασικό λέμφωμα *Hodgkin* (cHL, 95% των περιπτώσεων), ένα κλωνικό λεμφικό νεόπλασμα, με συγκαλυμμένα στοιχεία Β-λεμφοκυτταρικής διαφοροποίησης και 4 ιστολογικούς υπότυπους, ανάλογα τη σύνθεση του αντιδραστικού κυτταρικού περιβάλλοντος και τη μορφολογία των νεοπλαστικών κυττάρων (τον λεμφοεπικρατητικό, την οζώδη σκλήρυνση, τη μικτή κυτταροβρίθεια, και τον λεμφοπενικό υπότυπο) [Jaffe, 2001 #251]. Τα νεοπλασματικά κύτταρα στο cHL είναι ευμεγέθη, μονο-πύρηνια (κύτταρα *Hodgkin*, HRS), δι-πύρηνια (RS), ή πολυ-πύρηνια με άφθονο συνήθως κυτταρόπλασμα και διακριτό ηωσινόφιλο (σαν έγκλειστο) πυρήνιο ενώ, ανάλογα με τον υπότυπο παρατηρούνται και παραλλαγές [Jaffe, 2001 #251] [Pileri, 2002 #264] [Fraga, 2007 #265]. Στα κύτταρα HRS δεν ανιχνεύεται ανοσοσφαιρίνη επιφανείας και έχουν (τυπικό) ανοσοφαινότυπο CD30+, CD15+, CD45-, PAX5+, MUM1-, LMP1-/+, ο οποίος καθορίζει τη σωστή διάγνωση [Nathwani, 2007 #266] [McCune, 2006 #267] [Garcia-Cosio, 2004 #268] [Buettner, 2005 #269] [Carbone, 1998 #270] [Rassidakis, 2002 #271] [Krenacs, 1997 #272] [Oudejans, 1996 #273] [Asano, 2006 #274] [Atayar, 2005 #275] [Schneider, 2004 #276].

2) το οζώδες λεμφοεπικρατές λέμφωμα *Hodgkin* (ΟΛΛΗ, 5% των περιπτώσεων) μονοκλωνικής Β-λεμφοκυτταρικής διαφοροποίησης (CD20, CD79a, PAX-5+), με τα νεοπλασματικά κύτταρα να απαντώνται συνήθως μεμονωμένα στους όζους (οζώδες πρότυπο ανάπτυξης). Πρόκειται για κύτταρα μεγάλου μεγέθους, πολυ-πύρηνια ή με πολυ-λοβωτούς πυρήνες, και μικρά, συνήθως πολλαπλά ηωσινόφιλα πυρήνια (procorp ή L&H κύτταρα (Lymphocytic and Histiocytic-από τη σύνθεση του συνοδού κυτταρικού πληθυσμού). Ο ανοσοφαινότυπος των L&H κυττάρων καθορίζει τη σωστή διάγνωση, και στις τυπικές περιπτώσεις είναι CD30-, CD15-, CD45+, MUM1+, LMP1-, BCL-6, OCT-2 και BOB-1, που αναπτύσσεται εντός δικτύου δενδριτικών κυττάρων πλούσιου σε μικρά Β και Τ (CD4+, CD57+) λεμφοκύτταρα [Anagnostopoulos, 2000 #277] [Kraus, 2000 #278] [Torlakovic, 2001 #279] [Torlakovic, 2002 #280] [Steimle-Grauer, 2003 #281] [Prakash, 2006 #282] [Boudova, 2003 #283] [Pijuan, 2005 #284].

Τα **λεμφώματα μη-Hodgkin** διαχωρίζονται σε μεγάλες κατηγορίες με σημαντικά διαφορετική αντιμετώπιση και πρόγνωση. Πιο συγκεκριμένα, ακολουθώντας την ταχύτητα με την οποία αναπτύσσονται, διακρίνονται σε: (1) επιθετικά (ενδιάμεσου/ υψηλού βαθμού) λεμφώματα (είναι Β-κυτταρικής προέλευσης και ταχείας εξέλιξης, αντιστοιχώντας στο 85% περίπου των περιπτώσεων) και (2) βραδείας εξέλιξης λεμφώματα (χαμηλού βαθμού) (είναι κυρίως οζώδη/θυλακοειδή λεμφώματα). Σύμφωνα, δε, με τον ΠΟΥ διακρίνονται περαιτέρω σε Β, Τ/NK, ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του νεοπλασματικού κυττάρου προέλευσης. Τα Τ- προέλευσης λεμφώματα μη-Hodgkin αντιστοιχούν

μόλις στο 15%. Οι βασικότεροι ανοσοφαινοτυπικοί δείκτες των λεμφωμάτων μη-Hodgkin, ανάλογα με τα κύτταρα προέλευσής τους είναι: Β-λεμφοκύτταρα {CD19, CD20}; Τ-λεμφοκύτταρα {CD2, CD3, CD5, CD7}; NK -λεμφοκύτταρα {CD16, CD56}.

Η ετήσια επίπτωση **λεμφώματος Hodgkin** αντιστοιχεί περίπου στο 11% εκείνης όλων των λεμφωμάτων συνολικά, παρουσιάζει σημαντική διακύμανση παγκοσμίως ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή, τη φυλή και την ηλικία, με την κατανομή της συχνότητας εμφάνισής τους να ακολουθεί μια δικόρυφη καμπυλή. Άνοδος παρατηρείται στις νεαρές ηλικίες και μετά την ηλικία των 60 ετών και ενδιάμεση πτώση μέχρι την ηλικία των 45 ετών. Οι άνδρες προσβάλλονται συχνότερα από τις γυναίκες (1,3: 1 περίπου) {Γ, 2004 #285}.

Τα **λεμφώματα μη-Hodgkin** αποτελούν το 4% των νεοδιαγνωσθέντων νεοπλασιών ετησίως σε παγκόσμια κλίμακα. Η επίπτωση τους κυμαίνεται ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή και αυξάνεται προοδευτικά με την ηλικία (~50-70 χρονών). Οι άνδρες συγκριτικά με τις γυναίκες έχουν 1.5-2 φορές περισσότερες πιθανότητες να εμφανίσουν μη-Hodgkin λέμφωμα, ενώ ανάλογα τον τύπο της νόσου, μπορεί να έχουν διπλάσια (λέμφωμα τύπου μανδύα) ή και πενταπλάσια (αναπλαστικό λέμφωμα από μεγάλα T/null κύτταρα) πιθανότητα ασθένειας.

3. Προδιαθεσικοί ή αιτιολογικοί παράγοντες

Τα ακριβή αίτια που οδηγούν στην ανάπτυξη του λεμφώματος, στις περισσότερες περιπτώσεις παραμένουν αδιευκρίνιστα. Παρόλ'αυτά, έχουν ενοχοποιηθεί ορισμένοι κοινοί αιτιολογικοί παράγοντες, όπως είναι:

1. οι χημικοί παράγοντες (οργανικοί διαλύτες, εντομοκτόνα, βαφές, λιπάσματα, ξυλόσκονη, καπνό, ακτινοβολία) {Gallus, 2004 #286}{McCunney, 1999 #287}{Zahm, 1990 #288}{Woods, 1987 #289}{La Vecchia, 1989 #290}{Scherr, 1992 #291}
2. γενετικοί παράγοντες {Cartwright, 2004 #292}{Mack, 1995 #293}{Goldin, 2004 #294}{Chang, 2005 #295} π.χ. προδιαθεσικοί δείκτες προτείνονται οι γενετικές θέσεις στο χρωμόσωμα 4p, 2, και 11 {Goldin, 2005 #296}.
3. Η ανοσοανεπάρκεια λόγω σπάνιων κληρονομικών ασθενειών, ιατρογενούς προέλευσης (μεταμοσχεύσεις){Rowlings, 1999 #297}{Grulich, 2007 #298} ή
4. HIV (human immunodeficiency virus) λοίμωξης {Dolcetti, 2001 #299}{Biggar, 2006 #300}{Goedert, 1998 #301}.
5. αυτοάνοσα νοσήματα (π.χ. θυροειδίτιδα Hashimoto, σύνδρομο Sjogren, ρευματοειδής αρθρίτιδα) {Mariette, 2002 #302}
6. λοιμώδεις παράγοντες (π.χ. βακτήριο *Helicobacter pylori* προκαλεί γαστρικό λέμφωμα MALT1 {Correa, 2007 #303}{Ferrucci, 2007 #304}, ο

ανθρώπινος ερπητοϊός-8 (HHV-8) που συσχετίζεται με λέμφωμα από μεγάλα Β-λεμφοκύτταρα (ALCL) και ο ερπητοϊός Epstein-Barr Virus (EBV) που εμπλέκεται στο λέμφωμα Burkitt {Klein, 1994 #305}{Masucci, 1994 #306}, ενώ εκφράζεται σε σημαντικό ποσοστό ασθενών με λέμφωμα Hodgkin {Rosdahl, 1974 #307}{Jarrett, 2002 #308}{Hjalgrim, 2000 #309}{Spieker, 2000 #310}.

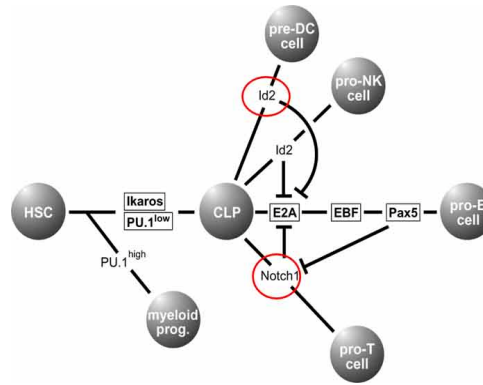
7. περιβαλλοντικοί και διατροφικοί παράγοντες {Hennessy, 2004 #311}.

4. Παθοβιολογία λεμφωμάτων

Ο όρος «παθοβιολογία» αναφέρεται στις διαδικασίες που υφίστανται σε μοριακό επίπεδο, οι οποίες διαταράσσουν την ανθρώπινη φυσιολογία και αντικατοπτρίζονται στην εκδήλωση κλινικών συμπτωμάτων που χαρακτηρίζουν την παθολογία του λεμφώματος. Στη συνέχεια θα γίνει αναφορά στα βασικά μόρια και μηχανισμούς, που έχουν διαπιστωθεί ότι συμμετέχουν στην ανάπτυξη του λεμφώματος Hodgkin. Στην περίπτωση των NHL θα γίνει κυρίως αναφορά στις δύο υποκατηγορίες των λεμφωμάτων μη-Hodgkin, που αποτέλεσαν αντικείμενο μελέτης στην παρούσα διδακτορική διατριβή, στα λεμφώματα MCL και ALCL.

Σύγχρονες βιολογικές τεχνικές έχουν καταδείξει ότι η νεοπλασματική φύση του **λεμφώματος Hodgkin** χαρακτηρίζεται από διάφορα γεγονότα. Ειδικότερα, στα HRS κύτταρα έχει ανιχνευθεί ο μονοκλωνικός τρόπος ανασυνδυασμού των γονιδίων των Β-κυτταρικών υποδοχέων χωρίς την παραγωγή του αντίστοιχου mRNA και πρωτεΐνης {Kuppers, 1994 #312}{Vockerodt, 1998 #313}{Marafioti, 2000 #314}, αλλοιώσεις του p53 σε μεμονωμένες περιπτώσεις, και μονοκλωνικός τρόπος ενσωμάτωσης του ιού EBV στο DNA των HRS κυττάρων {Spieker, 2000 #310}{Inghirami, 1994 #315}{Re, 2005 #317}{Kuppers, 2005 #318}{Seitz, 2000 #319}{Muschen, 2000 #320}.

Επίσης, στα κύτταρα HL μετά την επίδραση αντιγόνου στον κυτταρικό υποδοχέα δημιουργούνται γενετικές παραλλαγές του ανασυνδυασμένου υποδοχέα ανοσοανοσοσφαιρινών (υπερμεταλλάξεις, hypermutation), που μπορεί να μειώσουν (στα L&H κύτταρα) ή και να εξαφανίσουν (στα HRS κύτταρα) τη λειτουργικότητα του υποδοχέα {Brauninger, 2003 #321}{Muschen, 2001 #322}{Braeuninger, 1997 #323}{Marafioti, 1997 #324}. Επιπλέον, οι μεταγραφικοί παράγοντες που σχετίζονται με τη διαδικασία Β-λεμφοκυτταρικής διαφοροποίησης (PAX-5) {McCune, 2006 #267}{Stein, 2001 #325}{Loddenkemper, 2004 #326}{Theil, 2001 #327} και την παραγωγή των ανοσοσφαιρινών (BOB1 και OKT2) {Torlakovic, 2002 #280} απορρυθμίζονται στα νεοπλασματικά HRS κύτταρα, προσδίδοντάς τους χαρακτηριστικά λιγότερο διαφοροποιημένου λεμφοκυττάρου (Εικόνα 1). Ακόμα, πρέπει να σημειωθεί ότι οι περισσότερες από τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην οδό σηματοδότησης του Β-κυτταρικού υποδοχέα απουσιάζουν εντελώς από τα κύτταρα HRS {Busslinger, 2004 #328}{Renne, 2006 #329}{Janz, 2006 #330}{Mathas, 2006 #331}.



Εικόνα 1. Δίκτυο παραγόντων στην λεμφοκυτταρική διαφοροποίηση.

Με κόκκινο κύκλο σημειώνονται μερικοί από τους παράγοντες που υπερεκφράζονται στα κύτταρα HRS και θεωρείται ότι απορρυθμίζουν τη διαφοροποίηση. DC: dendritic cell, HSC: hematopoietic stem cell, CLP: common lymphocyte progenitor. Τροποποιημένο από το Meinard Busslinger, *Annu. Rev. Immunol.* 2004. 22:55–79

Γενετικές ανωμαλίες

Στις λεμφοκυτταρικές νεοπλασίες παρατηρούνται ανώμαλοι καρυότυποι με δομικές και αριθμητικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες, με έντονη αστάθεια του γενετικού υλικού, χωρίς, όμως, κάποια από αυτές να χαρακτηρίζει άμεσα την παθογένεια της νόσου. Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα HRS, στη συντριπτική τους πλειοψηφία εμφανίζουν διπλοειδία τα χρωμοσώματα 1,2,5,12,21. Επίσης, έχουν σημειωθεί αναδιατάξεις, όπως είναι η ενίσχυση των χρωμοσωμικών περιοχών 2p13, 12q14 και 9p22-23, όπου εδράζονται τα γονίδια *cREL*, *MDM2* και *JAK2* αντίστοιχα, αλλά και αναδιατάξεις του γονιδίου *BCL6* (στον οζώδη λεμφοεπικρατή τύπο και όχι στο cHL) {Re, 2002 #332}{Joos, 2002 #333}.

Στα λεμφώματα NHL έχουν βρεθεί υπερδιπλοειδίες (π.χ. τρισωμία 3 σε B-/T-NHL, τρισωμία 7 σε B-NHL), απαλείψεις (π.χ. del(17p13), που αφορά το p53 και απαντάται κυρίως σε B-NHL, del(6q) σε B- και T- λεμφώματα, del(7q) σε B-NHL), μονοσωμίες (π.χ. χρ.13, T-NHL) και αναδιατάξεις του 1p21-23 (T-NHL) και του 6q21 (B-NHL) που αφορούν τα γονίδια *Gfi1* και *Pim-1* αντίστοιχα {Schlegelberger, 1994 #334}{Itoyama, 2001 #335}{Akasaka, 2000 #336}.

Συχνές είναι οι αντιμεταθέσεις (ειδικά στα B-λεμφώματα) που αφορούν τις περιοχές των βαριών και των ελαφρών αλύσων των ανοσοσφαιρινών {Martin-Subero, 2006 #337} ή τις αλύσους του υποδοχέα TCR (T-NHL). Μία εξαίρεση στον κανόνα αποτελεί το ALCL, όπου η μετάθεση t(2;5) οδηγεί στη δημιουργία της χιμαιρικής πρωτεΐνης NPM-ALK.

Διαταραχές του κυτταρικού κύκλου

Σύμφωνα με μελέτες, τα κύτταρα λεμφώματος εμφανίζουν αυξημένο κλάσμα κυτταρικού πολλαπλασιασμού και απορύθμιση/γενετικές αλλοιώσεις αρκετών συστατικών του κυτταρικού κύκλου (π.χ. υπερέκφραση ρυθμιστικών ενζύμων του κυτταρικού κύκλου, όπως κυκλίνες, CDKs/κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες). Ειδικότερα, τα HRS εκφράζουν σε αυξημένα επίπεδα τις κυκλίνες D2, E, A, B1 και οι CDKs 2 και 6, και διαθέτουν απορρυθμισμένους αναστολείς του κυτταρικού κύκλου (p15, p16, και p18) {Garcia, 2002 #338}{Sanchez-Aguilera, 2004 #339}. Η υπερέκφραση της κυκλίνης E δικαιολογεί τη χρωμοσωμική αστάθεια και πολυπλοειδία που καταγράφεται στο λέμφωμα του Hodgkin.

Στα λεμφώματα μη-Hodgkin, το λέμφωμα του μανδύα συχνά εκφράζει υψηλά επίπεδα mRNA της κυκλίνης D1. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι τα κύτταρα ALCL υπερεκφράζουν τις κυκλίνες D3, και παρουσιάζουν απορρύθμιση αναστολέων του κύκλου όπως των p21, p19, p27 με διάφορους μηχανισμούς με χαρακτηριστική διαφορική έκφραση κάποιων από αυτά μεταξύ ALK θετικών και ALK αρνητικών όγκων.

Διαταραχές ενεργοποίησης μεταγραφικών παραγόντων

Στα λεμφώματα έχουν βρεθεί ότι υπερεκφράζονται κυρίως δύο συστήματα μεταγραφικών συστημάτων με σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη διαφόρων κυτταρικών λειτουργιών (κυτταρική διαφοροποίηση, πολλαπλασιασμό, απόπτωση), συνεπώς και της νόσου: τα μέλη της οικογένειας NF-κB (Nuclear Factor of kappa light chain gene enhancer in B cells) και της οικογένειας AP-1 (Activator Protein-1).

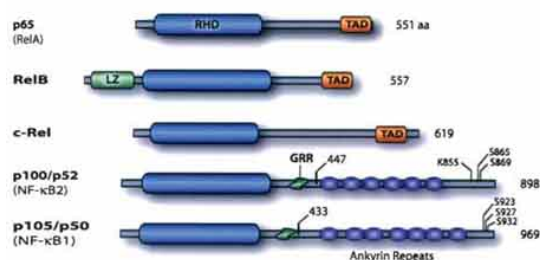
Το σύστημα του AP-1 (οικογένειες JUN (c-JUN, JUNB και JUND) και FOS (c-Fos, FosB, Fra-1 και Fra-2) {Shaulian, 2001 #340} συμμετέχει κυρίως στο κλασσικό λέμφωμα Hodgkin, όπου το c-JUN, και JUNB υπερεκφράζονται/υπερλειτουργούν {Mathas, 2002 #341}{Rassidakis, 2005 #342}. Το JUNB, επίσης, έχει βρεθεί ότι προάγει τη μεταγραφή του χαρακτηριστικού για το cHL, υποδοχέα CD30 {Watanabe, 2003 #343}.

Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB αποτελείται από πέντε υπομονάδες (RelA/p65, c-Rel, RelB, p50 και p52) {Nabel, 1993 #344}{Muller, 1995 #345} και σύνδεσή του με την πρωτεΐνη IκB, τον καθιστά ανενεργό. Πολλοί τύποι ανθρώπινου λεμφώματος στηρίζονται στη συστατική ενεργοποίηση του μονοπατιού του NF-κB προκειμένου να εξασφαλίσουν την κυτταρική τους επιβίωση, αναστέλλοντας την απόπτωση. Οι μεταλλάξεις στις πρωτεΐνες της οικογένειας REL/NF-κB (στο c-Rel (χρ. 2p), αλλά κυρίως στο μέλος IκB της οδού του NF-κB) έχουν ως αποτέλεσμα την ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση της οδού του NF-κB σε λεμφώματα HL και σε B-NHL {Martin-Subero, 2002 #346}{Joos, 2002

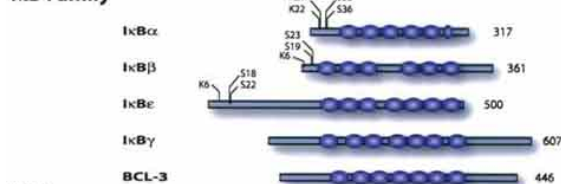
#333}{Jungnickel, 2000 #347}{Emmerich, 2003 #348}{Emmerich, 1999 #349}{Cabannes, 1999 #350}{Barth, 2003 #351}{Hartmann, 2010 #352}. Παρόλ'αυτά, ο NF-κB έχει βρεθεί ότι υπερλειτουργεί και όταν δεν υπάρχουν μεταλλάξεις (HL, T-NHL) {Martinez-Delgado, 2004 #353}{Roue, 2007 #354}.

Στο λέμφωμα του Hodgkin, κυτταρικοί υποδοχείς που ανήκουν στην οικογένεια των TNF (CD30/40, RANK) υπερεκφράζονται ενεργοποιώντας το μονοπάτι του NF-κB. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να υπεραπαράγονται αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες (π.χ. cIAP2, BCL-XL), πρωτεΐνες που εμπλέκονται με τον πολλαπλασιασμό (πχ, cyclin D2), και διάφορους αυτοκρινείς ή παρακρινείς παράγοντες με τροφικό ρόλο {Jungnickel, 2000 #347}{Fiumara, 2001 #355}{Emmerich, 2003 #348}. Ομοίως, συστηματική ενεργοποίηση του NF-κB (πιθανώς μέσω της οδού BCR/ TNF) έχει ανιχνευθεί σε κυτταρικές σειρές MCL και σε πρωτογενείς όγκους υπερεκφράζει ποικίλα γονία-στόχους, όπως τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες cFLIP, BCL2, BCLXL και XIAP {Roue, 2007 #354}{Pham, 2003 #356}.

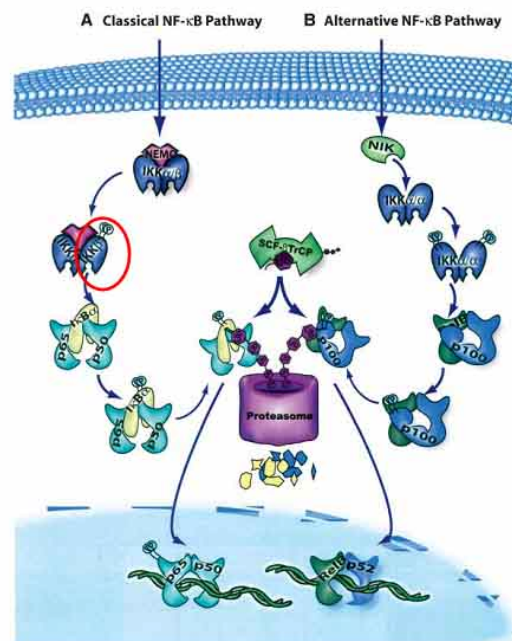
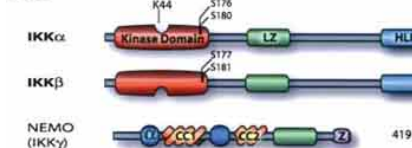
NF-κB/Rel Family



IκB Family



IKK's



Εικόνα 2. Τα μέλη του συστήματος NF-κB (αριστερά) και η λειτουργία της αντίστοιχης οδού (δεξιά). Ο κόκκινος κύκλος αντιστοιχεί στο μέλος όπου παρατηρούνται μεταλλάξεις σε ορισμένες περιπτώσεις κλασσικού λεμφώματος Hodgkin Τροποποιημένο από τους Matthew S. Hayden and Sankar Ghosh genes & development 18:2195–2224

Διαταραχές οδών κυτταρικής σηματοδότησης (cell signaling pathways)

Οι λειτουργία των οδών κυτταρικής σηματοδότησης αποτελεί σημαντικό μέρος του οντογενητικού προγράμματος τόσο για την εβρουγένεση, όσο και για την ομοιόσταση των ανεπτυγμένων πολυκυττάρων οργανισμών. Πολλά από τα ογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά γονίδια αφορούν μέλη των οδών αυτών. Η απορύθμιση των οδών κυτταρικής σηματοδότησης, τόσο μέσω μεταλλάξεων όσο και μέσω άλλων μηχανισμών επηρεάζει την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των νεοπλασματικών κυττάρων και αποτελεί σημαντικό τμήμα της βιολογίας όλων των νεοπλασιών. Στο λέμφωμα HL και NHL ένας σημαντικός αριθμός από αυτά τα μονοπάτια παρουσιάζουν απορρύθμιση και περιλαμβάνουν δυνητικούς μοριακούς στόχους μελλοντικών θεραπειών, όπως είναι το σηματοδοτικό μονοπάτι **BCR** (B-cell receptor), **Ras/ERK**, το **JAK-STAT** (Janus Kinase/signal transducer and activator of transcription), το **PI3K-AKT** (phosphatidylinositol-3 kinase/AKT), **mTOR** (mammalian target of rapamycin), το μονοπάτι των **MAP** κινάσων (MAPK, mitogen activated protein kinase), το μονοπάτι NOTCH, Wnt/ β -Catenin {Pighi, 2011 #357}{Bai, 1998 #358}{Aaronson, 2002 #359}{Skinnider, 2002 #360}{Chiarle, 2005 #361}{Marzec, 2005 #362}{Drakos, 2007 #363}{Watanabe, 2005 #364}{Zheng, 2003 #365}{Jundt, 2002 #366}{Weng, 2004 #367}{Persad, 2001 #368}{Bellei, 2004 #369}.

Ενδεικτικά, θα αναφέρουμε αναλυτικότερα κάποια από τα παραπάνω μονοπάτια που απορρυθμίζονται στα λεμφώματα HL και NHL (MCL/ALCL):

MAP Κινάσες (mitogen activator protein kinases)

Η οικογένεια των MAPK αποτελείται από κινάσες τυροσίνης/σερίνης-θρεονίνης/διπλής ειδικότητας (p38, JNK και ERK) που δρουν παράλληλα και μετέχουν στην ενδοκυττάρια μεταγωγή σήματος που ρυθμίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, την απόπτωση και την κυτταρική μετανάστευση. Μεμβρανικοί υποδοχείς μεταφέρουν το σήμα στις κινάσες, φωσφορυλιώνουν διαδοχικά η μία την άλλη (MAP3K-->MAP2K-->MAPK), και τελικά ενεργοποιούν διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες που ελέγχουν την έκφραση ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης

Τόσο το σύστημα JNK, όσο και το ERK έχουν αναφερθεί να υπερλειτουργούν στο κλασσικό λέμφωμα Hodgkin και να προάγουν τον πολλαπλασιασμό των HRS κυττάρων {Drakos, 2007 #363}{Watanabe, 2005 #364}{Zheng, 2003 #365}. Στο T-λέμφωμα ALK+ ALCL, η NPM-ALK φωσφορυλιώνει την JNK, ενεργοποιώντας το μηχανισμό JNK/Jun, συμβάλλοντας τελικά στον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Επίσης, η φωσφορυλιωμένη TAK1 (μέλος της MAPK-οικογένειας), που συμβάλει στην

αύξηση και ανάπτυξη Β-κυττάρων, έχει βρεθεί ότι υπερ-εκφράζεται σε σειρές HL, MCL, ALCL {Buglio, 2012 #370}.

HSP90

Η πρωτεΐνη-τσαπερόνη HSP90 επάγεται στα ευκαρυωτικά κύτταρα σε συνθήκες θερμικού σοκ σε αυξημένα ποσοστά, αλλά υπερ-εκφράζεται και υπό φυσιολογικές συνθήκες (απουσία στρες), ελέγχοντας την ενεργότητα, ανακύκλωση, αναδίπλωση και στερεοταξική ρύθμιση μεγάλου αριθμού πρωτεϊνών-υποστρωμάτων (>200), συμπεριλαμβανομένων της p53, πολλών κινασών, υποδοχέων στεροειδών και μεταγραφικών παραγόντων. Η ρύθμιση όλων αυτών των πρωτεϊνών από την HSP90 είναι μείζονης σημασίας για την κυτταρική μεταγωγή σήματος, παίζοντας κρίσιμο ρόλο σε κυτταρικές διαδικασίες, όπως είναι η κυτταρική διαίρεση/διαφοροποίηση/μετανάστευση, η και η απόπτωση {Whitesell, 2005 #371}. Η συμβολή της HSP90 στην καρκινογένεση έχει μελετηθεί *in vitro* σε λεμφώματα, ενώ η αναστολή της έχει δειχθεί ότι μπορεί να οδηγήσει σε παύση του κυτταρικού κύκλου και σε απόπτωση {Valbuena, 2005 #372}{de Vos, 2003 #373}. Η HSP90, φαίνεται να υπερεκφράζεται σε κύτταρα HRS, διευκολύνοντας περαιτέρω την ενεργοποίηση πρωτεϊνών-υποστρωμάτων τους, όπως η κινάση AKT. Σε ορισμένες περιπτώσεις MCL έχει καταγραφεί αυξημένη έκφραση της HSP90, η οποία σχετίζεται με σαφή κυτταρολογικά χαρακτηριστικά (βλαστοειδή μορφή MCL).

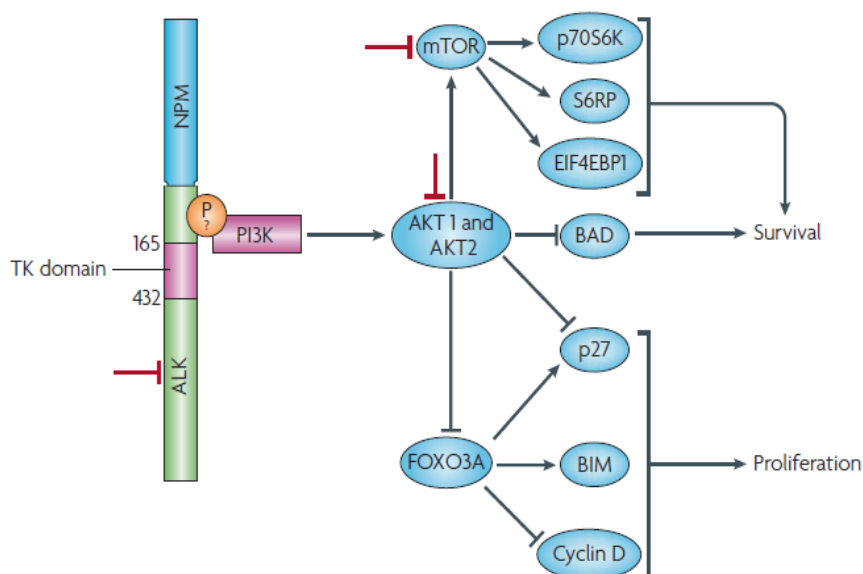
PI3K/AKT/mTOR (mamalian target of rapamycin)

Το σηματοδοτικό μονοπάτι του mTOR είναι παίζει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού και την κυτταρική αύξηση, κυρίως ρυθμίζοντας τη μετάφραση των πρωτεϊνών αλλά και την αυτοφαγία. Η ενεργοποίησή του δεν έχει πλήρως κατανοηθεί, αλλά μπορεί να περιλαμβάνει το BCR, την οδό του CD40 και το BAFF (tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b). Ανοσοϊστοχημικές μελέτες σε πρωτοπαθείς όγκους cHL και *in vitro* λειτουργικές μελέτες έδειξαν ενεργοποίηση του AKT/mTOR, προάγοντας τον νεοπλασματικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωσή τους. *In vitro* και *in vivo* μελέτες, σε ζωικά μοντέλα με μοσχεύματα όγκων, έδειξαν ότι αναστέλλοντας mTOR με ραπαμυκίνη ή ανάλογά της έχει αντι-νεοπλασματική δράση έναντι των HRS κυττάρων

Στο λέμφωμα του μανδύα έχουν βρεθεί υψηλά επίπεδα ενεργοποιημένης οδού AKT/mTOR. Σε μερικές περιπτώσεις της νόσου όπου καταγράφεται συστατική ενεργοποίηση της AKT, παρατηρείται απώλεια της έκφρασης ή απενεργοποίηση της φωσφορύλιωσης της PTEN (αρνητικός ρυθμιστής της PI3K)

Πρόσφατα δείχθηκε ότι το microRNA (miRNA) miR17-92 σύμπλεγμα που συχνά ενισχύεται και υπερεκφράζεται στο MCL, μειώνει την έκφραση του *PTEN* και ενεργοποιεί το μονοπάτι της AKT, προάγοντας την αντίσταση στην απόπτωση που προκαλεί η χημειοθεραπεία σε αυτούς τους όγκους.

Σύμφωνα με πειραματικές μελέτες, η οδός PI3K/AKT συμβάλλει στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου στο ALK+ ALCL, μέσω φωσφορύλιωσης του αναστολέα των κυκλινο- εξαρτόμενων κινασών p27 από το AKT, επιταχύνοντας την αποικοδόμησή του μέσω του πρωτεασώματος. Επίσης, απενεργοποίηση του μονοπατιού της PI3K με αναστολείς, προκαλεί απόπτωση σε κύτταρα λεμφωμάτων που εκφράζουν την NPM-ALK. Στο ALK+ ALMK, ο μεταγραφικός παράγοντας FOXO3A αποτελεί στόχο του AKT, οδηγώντας στην άνοδο των επιπέδων της κυκλίνης D2, στην πτώση της αποπτωτικής πρωτεΐνης Bim και του αναστολέα των κυκλινο- εξαρτόμενων κινασών p27, τα οποία συνδυαστικά προάγουν την κυτταρική επιβίωση τον κυτταρικό κύκλο. Το μονοπάτι του mTOR, ενεργοποιείται από μοριακά σημάτα που προέρχονται από την NPM-ALK και τις οδούς PI3K/AKT, Ras-ERK. Σε αυτό συμβάλουν οι καταρροϊκές πρωτεΐνες του mTOR, οι **p70S6K** (ribosomal protein S6 kinase), **S6RP** (S6 ribosomal protein), **EIF4BP1** (eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1). Ωστόσο, τελευταία δεδομένα πιστοποιούν ότι η ενεργοποίηση του mTOR μέσω της NPM-ALK, μεσολαβείται κυρίως μέσω του μονοπατιού Ras-ERK, καθώς οι αναστολείς των **MEK** (mitogen activated-ERK kinase) φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματικοί από τους αναστολείς του μονοπατιού PI3K/AKT. Τέλος, έχει βρεθεί ότι ο αναστολέας Rapamycin της οδού mTOR, αναστέλλει την κυτταρική αύξηση και προάγει την απόπτωση σε κύτταρα ALK+ ALMK (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ NPM-ALK και της οδού μεταγωγής σήματος PI3K-AKT και mTOR στο ALK+ ALCL (από Chiarle et al).

JAK-STAT

Ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού JAK-STAT μπορεί να είναι ο μηχανισμός που συνδέει τα εξωτερικά ερεθίσματα με την κυτταρική επιβίωση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Στα κύτταρα HRS έχει διαπιστωθεί συνεχής ενεργοποίηση διαφόρων μελών της ομάδας JAK-STAT (STAT3, STAT5 και STAT6), οι οποίες προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των νεοπλασματικών κυττάρων⁵⁷⁻⁵⁹. Επιπλέον, η αναστολή έκφρασης των STAT σε κυτταρικές σειρές HL είχε ως αποτέλεσμα την μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Στο πρωτογενές MCL η STAT3 απαντάται φωσφορυλιωμένη, πιθανώς μέσω ενός αυτοκρινούς IL-6 και/ή IL-10 εκκριτικού βρόχου και/ή προκαλείται από τη δέσμευση του υποδοχέα BCR. Σε ορισμένες άλλες περιπτώσεις MCL έχουν καταγραφεί μεταλλάξεις που απενεργοποιούν τον αναστολέα του μονοπατιού JAK-STAT, τον SOCS1. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η ενεργοποίηση της STAT3 είναι πιο συχνή στο λέμφωμα του μανδύα όπου το γονίδιο *IGHV* είναι υπερμεταλλαγμένο (αντί να είναι μη-μεταλλαγμένο), προτείνοντας ένα διαφορετικό μηχανισμό κυτταρικής βιωσιμότητας ανάμεσα στους δύο αυτούς υποτύπους MCL.

Ο ρόλος της απακετυλάσης των ιστονών

Τα τελευταία χρόνια πολλές ερευνητικές αναφορές αφορούν τις επιγενετικές λειτουργίες του κυττάρου που ρυθμίζουν την έκφραση αφήνοντας ανέπαφη την αλληλουχία του DNA και περιλαμβάνουν την τροποποίηση του DNA και της χρωματίνης με μεθυλίωση, ακετυλίωση, φωσφορυλίωση, ουμπικουτινίωση και σουμοϋλίωση. Ειδικότερα, ένζυμα όπως οι ακετυλοτρανσφεράσες (HAT) ή οι απακετυλάσες (HDAS) των ιστονών ρυθμίζουν την ακετυλίωση και κατ'έπείταση την έκφραση μιας σειράς γονιδίων που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση του κυττάρου, την αγγειογένεση και άλλες σημαντικές λειτουργίες. Λόγω της ιδιαίτερης βιολογικής σημασίας τους, οι HDAS αποτελούν ελκυστικό θεραπευτικό στόχο. Έχει αναπτυχθεί μια σειρά αναστολέων των διαφόρων τύπων του ενζύμου (τάξη I, IIΑ, IIΒ, IV), οι οποίοι έχουν δοκιμαστεί σε πολυάριθμες προκλινικές και κλινικές μελέτες στην ογκολογία. Σε κυτταρικές σειρές κλασσικού HL οι αναστολείς HDAS έχουν δείξει σημαντικά βιολογικά αποτελέσματα στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και απόπτωση καθώς και συνεργικές δράσεις με άλλες στοχευμένες θεραπείες όπως αναστολείς της mTOR. Σε ασθενείς με υποτροπιάζον HL έχουν δοκιμαστεί ευρείας δράσης αναστολείς των απακετυλασών σε συνδυασμό με άλλες στοχευμένες θεραπείες με υποσχόμενα αποτελέσματα.

5. Κλινικά στοιχεία, διάγνωση και σταδιοποίηση

Κλινικά στοιχεία

Στο **λέμφωμα Hodgkin** προσβάλλονται οι λεμφαδένες κατά μήκος του κεντρικού άξονα του σώματος (τραχηλικοί, μεσοθωρακίου, κοιλιακοί, παραορτικοί, βουβωνικοί). Ειδικότερα, το πιο σύνηθες εύρημα της νόσου αποτελεί η διόγκωση ψηλαφητών λεμφαδενικών ομάδων, συνήθως τραχηλικών ή υπερκλειδιών, με ή χωρίς γενικά συμπτώματα (αίσθημα κόπωσης, υψηλό ή ακανόνιστο διαλείποντα πυρετό, νυχτερινή εφίδρωση, απώλεια βάρους, κνησμό και η εμφάνιση μάζας στο μεσοθωράκιο (με συμπτώματα δύσπνοιας, βήχα ή θωρακικού άλγους). Σπανιότερα, εμφανίζεται λεμφαδενικό άλγος μετά από κατανάλωση αλκοόλ, δερματικές αλλοιώσεις και διάφορα παρανεοπλασματικά σύνδρομα (π.χ. νεφρωτικό σύνδρομο, χολόσταση, και το σύνδρομο της Οφηλίας) Συνήθως δεν υπάρχει προσβολή εξωλεμφικών οργάνων.

Τα κακοήθη λεμφώματα **μη-Hodgkin** μπορούν να εκδηλωθούν σε όλες τις περιοχές του σώματος όπου υπάρχει λεμφικός ιστός, ανάλογα με την πρωτοπαθή εντόπιση της νόσου. Το πιο κοινό εύρημα είναι η διόγκωση των λεμφαδένων (σε ποσοστό ~75%). Στο υπόλοιπο 25% οι ασθενείς νοσούν σε εξωλεμφαδενικές θέσεις (μυελό των οστών, πεπτικό σωλήνα, δέρμα, πνεύμονες). Η συμπτωματολογία των NHL περιλαμβάνει σε μεγάλο ποσοστό βήχα, απώλεια βάρους, πυρετό, νυχτερινή εφίδρωση ή/και επίμονο κνησμό 6 μήνες πριν τη διάγνωση. Ωστόσο, τα συμπτώματα αυτά μπορεί να αποτελούν και ενδείξεις μη-καρκινικών προβλημάτων, όπως λοιμώξεων.

Διάγνωση

Για την ακριβή διάγνωση είναι απαραίτητος ο καθορισμός της προέλευσης του νεοπλασματικού κυττάρου (B, T ή NK) και του βαθμού διαφοροποίησής του. Η ταυτοποίηση της νόσου γίνεται πάντα ιστοπαθολογικά. Γίνεται βιοψία ενός διογκωμένου λεμφαδένα/εξωλεμφικού οργάνου ή /και του μυελού των οστών και η ιστολογική εικόνα εκτιμάται από παθολογοανατόμο για την ορθή διάγνωση, ακριβή τυποποίηση και κλινική σταδιοποίηση των λεμφωμάτων. Ακολουθούν δοκιμές και διαδικασίες που θα προσδιορίσουν τις προσβεβλημένες περιοχές του σώματός του ασθενούς. Έτσι, πραγματοποιούνται διάφορες εξετάσεις, αιματολογικές, μη αιματολογικές (πχ. εκτίμηση ηπατικής/νεφρικής λειτουργίας, κυτταρογενετικός έλεγχος, μικροσυστοιχίες, PCR), απεικονιστικές (αξονική, μαγνητική, εκπομπής ποζιτρονίων τομογραφία, σπινθηρογράφημα με ραδιενεργό Γάλλιο για τη σταδιοποίηση και πρόγνωση της νόσου, με σκοπό την επιλογή του κατάλληλου θεραπευτικού σχήματος, καθώς και εξετάσεις εκτίμησης των παρενεργειών (καρδιακή και πνευμονική λειτουργία ή εκτίμηση των γονάδων και διαφύλαξη σπέρματος). Οι προαναφερθείσες εξετάσεις δεν εφαρμόζονται απαραίτητα σε κάθε ασθενή,

αλλά ανάλογα με το ιστορικό και την κλινική εξέταση καθορίζεται το πρωτόκολλο που θα ακολουθηθεί κατά περίπτωση. Εξαίρεση αποτελούν οι ιστολογικές εξετάσεις που ακολουθούν τη λήψη ιστών για βιοψία, οι οποίες θα προσδιορίσουν το στάδιο και τον ιστολογικό τύπο της νόσου, από τα οποία θα εξαρτηθεί η θεραπεία του ασθενούς.

Σταδιοποίηση

Η κλινική σταδιοποίηση κατά Ann Arbor καθιερώθηκε για τη νόσο Hodgkin (1971), εφαρμόστηκε και στα λεμφώματα μη-Hodgkin, με μικρότερη, όμως, προγνωστική αξία, οδηγώντας στην ανάπτυξη ειδικών συστημάτων σταδιοποίησης για ορισμένους τύπους NHL (π.χ. τα πρωτοπαθή λεμφώματα του ΚΝΣ, του στομάχου, τα T-δερματικά, και το λέμφωμα Burkitt). Η σταδιοποίηση κατά Ann Arbor λαμβάνει υπόψη τον αριθμό/εντόπιση των (έξω)λεμφαδενικών θέσεων του λεμφώματος, και την παρουσία ή όχι συστηματικών συμπτωμάτων. Η κατά Cotswolds (1989) τροποποίηση της σταδιοποίησης Ann Arbor διακρίνει 4 στάδια λεμφώματος και συνοψίζεται ως εξής:

Στάδιο I. Διήθηση μονήρους (έξω) λεμφαδενικής περιοχής ή ενός λεμφικού οργάνου

Στάδιο II. Διήθηση δύο ή περισσότερων λεμφαδενικών περιοχών στην ίδια πλευρά του διαφράγματος ή εντοπισμένη διήθηση μιας εξωλεμφαδενικής περιοχής και λεμφαδένων στην ίδια πλευρά του διαφράγματος.

Στάδιο III. Διήθηση λεμφαδενικών περιοχών ή λεμφικών οργάνων σε αμφότερες πλευρές του διαφράγματος

III₁: χωρίς προσβολή παρααορτικών, λαγόνιων και μεσεντέριων λεμφαδένων

III₂: με προσβολή παρααορτικών, λαγόνιων, ή μεσεντέριων λεμφαδένων

Στάδιο IV. Διάχυτη ή επεκταμένη διήθηση σε εξωλεμφαδενικές θέσεις πέρα από από το υποστάδιο που ορίζεται ως E.

Συμβολισμοί που αφορούν όλα τα στάδια

E: προσβολή μίας εξωλεμφαδενικής θέσης συνεχόμενης ή γειτονικής με γνωστή προσβεβλημένη λεμφαδενική περιοχή.

X: παρουσία ογκώδους προσβολής (λεμφαδενική μάζα >10 cm, ή >1/3 διπλάτυνση του μεσοθωρακίου από αντίστοιχη μάζα).

A: απουσία συστηματικών συμπτωμάτων (π.χ. στάδιο IVA).

B: παρουσία συστηματικών συμπτωμάτων (πυρετός >38°C, απώλεια βάρους >10% στους τελευταίους 6 μήνες, νυχτερινή εφίδρωση, π.χ. στάδιο IVB).

S: διήθηση σπληνός

6. Θεραπεία, Πρόγνωση

Θεραπεία

Σήμερα, η κύρια θεραπευτική στρατηγική που ακολουθείται σε ασθενείς με λέμφωμα Hodgkin και μη-Hodgkin περιλαμβάνει την ακτινοθεραπεία (τα HL εμφανίζουν μεγαλύτερη ακτινοευαισθησία συγκριτικά με τα NHL), τη χορήγηση χημειοθεραπευτικών φαρμάκων (μόνων τους ή σε συνδυασμό), τα (ραδιοεπισημασμένα) μονοκλωνικά αντισώματα και τη μεταμόσχευση αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων. Πάντα κρίνεται απαραίτητη η εξατομίκευση της θεραπείας κάθε ασθενούς, που εφαρμόζεται από εξειδικευμένο αιματολόγο ή ογκολόγο, λαμβάνοντας συνήθως υπόψιν το είδος του λεμφώματος, την έκταση, την επιθετικότητά του, τα συμπτώματα, την ηλικία και τη γενικότερη κατάσταση της υγείας του ασθενούς. Επιπλέον, η θεραπεία θα πρέπει να συμπεριλαμβάνει τη χορήγηση αντιβιοτικών για την πρόληψη/θεραπεία λοιμώξεων, την απαραίτητη υποστηρικτική μέριμνα για την αντιμετώπιση τυχόν παρενεργειών της εφαρμοζόμενης θεραπευτικής φροντίδας και μακροπρόθεσμη παρακολούθηση με σκοπό την καταγραφή/διαχείριση της ανταπόκρισης του ασθενούς στη θεραπεία και την ανίχνευση πιθανής υποτροπής της νόσου.

Πρόγνωση

Η πρόγνωση για το λέμφωμα του **Hodgkin** είναι πολύ καλή, καθώς αποτελεί μια από τις πλέον ιάσιμες μορφές νεοπλασματος, μετά την εφαρμογή κατάλληλης θεραπείας (διακύμανση ποσοστών ίασεως στο 70-90%). Στα κακοήθη λεμφώματα **NHL** τα ποσοστά μακροχρόνιας επιβίωσης διακυμαίνονται ανάλογα με την επίπτωση του όγκου στον ασθενή, τον αριθμό των προσβεβλημένων σημείων, την ηλικία του ασθενούς, την επιθετικότητα και το στάδιο της νόσου (διακύμανση ποσοστών στο 50-80%). Σε συγκεκριμένους, δε, ιστολογικού υποτύπους NHL, λόγω αυξημένης ποικιλίας στην πορεία τους, εφαρμόζονται συγκεκριμένα προγνωστικά συστήματα (IPI: International Prognostic Index, FLIPI: Follicular Lymphoma International Prognostic Index).

Στη συνέχεια θα γίνει μια ειδική αναφορά σε δύο υποκατηγορίες των λεμφωμάτων μη-Hodgkin, τα οποία αποτέλεσαν μαζί με το λέμφωμα Hodgkin, αντικείμενο μελέτης στα πλαίσια της παρούσης διδακτορικής διατριβής. Θα αναφερθούν επιγραμματικά τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, η ταξινόμηση, η πρόγνωση και θεραπεία που αφορούν τα λεμφώματα του μανδύα και του αναπλαστικού από μεγάλα κύτταρα.

Λέμφωμα Από Κύτταρα Του Μανδύα (*Mantle Cell Lymphoma - MCL*)

Το λεμφώμα από κύτταρα του μανδύα (ΛΚΜ) είναι μια καλά χαρακτηρισμένη επιθετική Β-λεμφοκυτταρικής προέλευσης νοσολογική οντότητα. Συνδυάζει δυσμενή στοιχεία χαμηλής και υψηλής κακοήθειας λεμφωμάτων. Η νόσος φαίνεται ότι προκύπτει από ένα πρωτογενές λεμφοζιδιακό, ώριμο, παρθένο (μη εκτεθειμένο σε αντιγόνο) Β-λεμφοκύτταρο, με φυσιολογικούς γόνους ανοσοσφαιρινών, που μοιάζουν με τα κύτταρα της ζώνης του μανδύα, τα οποία είναι θετικά για το κυτταρικό αντιγόνο CD5. Αντιπροσωπεύει το 3-10% όλων των NHLs και η συχνότητα εμφάνισης αυξάνεται με την ηλικία (~65), με επικράτηση των ανδρών έναντι των γυναικών (3 άνδρες/1 γυναίκα)

Μορφολογία -Ταξινόμηση

Τα νεοπλασματικά κύτταρα του μανδύα συνήθως χαρακτηρίζονται από μεσαίου έως μεγάλου μεγέθους λεμφοκύτταρα, με ανώμαλου περιγράμματος πυρήνα που διαθέτει μία εντομή, αδρή χρωματίνη, μικρό πυρήνιο και ελάχιστο κυτταρόπλασμα. Σπανιότερα, είναι μεγαλύτερου μεγέθους και μοιάζουν με λεμφοβλάστες. Τα MCL αναπτύσσονται συνήθως με διάχυτο ή ασαφώς οζώδες τρόπο. Σε σπάνιες περιπτώσεις εμφανίζουν μορφολογία «ζώνης μανδύα», με τα κύτταρα του όγκου να διηθούν το (διατηρούμενο) μανδύα των βλαστικών κέντρων.

Τα κύτταρα του μανδύα ανάλογα με τη μορφολογία τους διακρίνονται σε κλασσικά και βλαστικά. Η βλαστοειδής μορφή του MCL μπορεί να εμφανιστεί είτε κατά τη διάγνωση (σε ποσοστό 10%), είτε σπανιότερα ως εξέλιξη της κλασσικής μορφής και έχει κακή πρόγνωση, με συχνή ύφεση της νόσου. Όλοι οι ιστολογικοί υπότυποι χαρακτηρίζονται από υψηλό δείκτη πολλαπλασιασμού.

Ανοσοφαινότυπος

Τα βασικότερα ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά του MCL είναι ότι συν-εκφράζουν στην επιφάνειά τους το CD5 και τα παν-B-κυτταρικά αντιγόνα (CD19, CD20, CD22 και CD524) και συχνά τα CD79b+, CD43+. Εμφανίζουν έλλειψη έκφρασης του CD10(+/-), BCL6, CD11c, CD103 και CD23. Όλες οι περιπτώσεις MCL είναι FMC-7 και BCL2 θετικές και σχεδόν όλες εκφράζουν κυκλίνη D1 (κυκλίνη της φάσης G1 του κυτταρικού κύκλου) ως φυσικό επακόλουθο της διαγνωστικής παρουσίας της χρωμοσωμικής μετάθεσης t(11;14). Επίσης, συνήθως εκφράζουν πιο έντονα τη μεμβρανική sIgM από την sIgD και πιο συχνά μονοκλωνικότητα της ελαφράς αλυσίδας επιφανείας ανοσοσφαιρίνης λ.

Παθολογία λεμφώματος του μανδύα

Γενετικές ανωμαλίες - Διαταραχές του κυτταρικού κύκλου

Η πιο χαρακτηριστική γενετική αλλοίωση του κύκλου, αφορά την κυκλίνη D1. Πολλοί ασθενείς (70-75%) εμφανίζουν τη χρωμοσωμική μετάθεση t(11;14)(q13;32), που περιλαμβάνει το γονίδιο BCL-1 στο χρωμόσωμα 11, το οποίο κωδικοποιεί την κυκλίνη D1 και το γονίδιο της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης IgH στο χρωμόσωμα 14. Η μετάθεση οδηγεί στο σχηματισμό του χιμαιρικού γονιδίου BCL-1/IgH, και έχει ως αποτέλεσμα την υπερπαραγωγή της ογκοπρωτεΐνης BCL-1 και την απορύθμιση της ομαλής μετάβασης από τη φάση G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Η επακόλουθη υπερέκφραση του mRNA της κυκλίνης D1 που συνδέεται με τις κινάσες CD4/6, έχει σα συνέπεια την ενεργοποίηση του μεταφραστικού παράγοντα E2F φωσφορυλιώνοντας τον αναστολέα του, την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος, Rb1 και προκαλώντας άρση της ανασταλτικής δράσης της στον κυτταρικό κύκλο. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι η κυκλίνη D1 μπορεί να λειτουργεί ως ογκογονίδιο, προωθώντας περαιτέρω την ενεργοποίηση της κυκλίνης E/CDK2, αναστέλλοντας την Rb1, πυροδοτώντας τη μετάβαση του κυττάρου στη φάση S του κυτταρικού κύκλου και ενισχύοντας τελικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Κυτταρογενετικές και μοριακές μελέτες έχουν δείξει ανωμαλίες στο γονίδιο ATM (ataxia telangiectasia mutated) και CHK2 (checkpoint homolog), προτείνοντας πιθανό ρόλο στα πρώιμα στάδια παθογένεσης του μανδύα. Επίσης, σημαντικές στην εξέλιξη της νόσου θεωρούνται βλάβες στην περιοχή 17p που αδρανοποιούν το γονίδιο p53, αναστολή των ρυθμιστικών πρωτεϊνών της G1 φάσης, CDKN1B (p27) ή CDKN1A (p21) ή μεταλλάξεις/ελλείψεις σε γονίδια που επηρεάζουν την κυτταρική γήρανση, απόκριση σε βλάβη DNA και αναστέλλουν τον κυτταρικό κύκλο (π.χ. CDKN2A (p16), CDKN2C p18).

Κλινική ευρήματα-Διάγνωση

Η επιθετική συμπεριφορά του λεμφώματος από κύτταρα του μανδύα εκδηλώνεται σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις, ως γενικευμένη λεμφαδενοπάθεια (90%), που συνοδεύεται από ηπατοσπληνομεγαλία, διήθηση του μυελού, εξωλεμφαδενικές εντοπίσεις κυρίως του πεπτικού και συχνά λευχαιμική περιφέρεια. Η διάγνωση αρχικά στηρίζεται στην κλινική εικόνα του ασθενούς και επιβεβαιώνεται πραγματοποιώντας εργαστηριακές εξετάσεις (ανοσοϊστοχημικές, αιματολογικές, βιοχημικές, PCR). Το MCL είθισται να διαγιγνώσκεται σε προχωρημένο στάδιο, έχει σύντομη κλινική πορεία, με συνεχείς υποτροπές και μέση επιβίωση τα 3-5 έτη, που σπάνια φθάνει τη 10ετή επιβίωση (10-20%).

Πρόγνωση-Θεραπεία

Τα MCL έχουν πολύ κακή πρόγνωση (5-7 χρόνια), χωρίς να υπάρχει ιάσιμη θεραπευτική στρατηγική. Κλασική ιστολογική προγνωστική παράμετρος της νόσου αποτελεί η υψηλή μιτωτική δραστηριότητα. Προγνωστική σημασία, σε συνδυασμό ή μόνοι τους, έχουν οι παράγοντες: ο δείκτης πολλαπλασιασμού (Ki-67), η βλαστική μορφή, η τρισωμία 12, μεταλλάξεις στο γονίδιο P53 και οι αυξημένες τιμές των ασθενών σε ηλικία/LDH/λευκά. Ασθενείς με διήθηση του μυελού ή του σπλήνα, αλλά χωρίς αδενοπάθεια, έχουν καλύτερη πρόγνωση.

Η βασική θεραπευτική προσέγγιση που ακολουθείται στο λέμφωμα μανδύα είναι κυρίως χημειοθεραπεία. Λαμβάνοντας υπόψιν την ηλικία, τη φυσική κατάσταση του ασθενούς και πιθανή προηγούμενη θεραπεία, συνήθως, χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με μονοκλωνικά αντισώματα (Rituximab) ή άλλους βιολογικούς παράγοντες (λεναλιδομίδη, CHOP, ESHAP, κλπ). Κλινικές δοκιμές με bortezomib (αναστολέας πρωτεασώματος), έχουν σημειώσει θεαματικά αποτελέσματα, ενώ πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι το Everolimus (αναστολέας του mTOR μονοπατιού) παρουσιάζει ποσοστά επιτυχούς ανταπόκρισης της τάξεως του 15-20% στο υποτροπιάζον ή ανθεκτικό λέμφωμα μανδύα. Τέλος, σε επιλεγμένους ασθενείς εφαρμόζεται αυτόλογη ή αλλογενής (μειωμένης έντασης) μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων.

Αναπλαστικό λέμφωμα από μεγάλα κύτταρα (*Anaplastic Large Cell Lymphoma-ALCL*)

Η κλινικοπαθολοανατομική αυτή οντότητα είναι ένα υψηλής κακοήθειας λέμφωμα **μη-Hodgkin** T-κυτταρικής προέλευσης. Διακρίνονται δύο υποκατηγορίες, ανάλογα την έκφραση ή μη της κινάσης του αναπλαστικού λεμφώματος (*Anaplastic large cell Lymphoma Kinase-ALK*). Παρά την ομοιότητά τους, τόσο σε επίπεδο κλινικής και όσο και ιστολογικής εικόνας, οι δύο αυτές υποκατηγορίες διαφέρουν σε πιο ειδικευμένα χαρακτηριστικά των ασθενών, όπως είναι τα επιδημιολογικά/μοριακά τους δεδομένα και η πρόγνωση. Όταν ALK δεν ανιχνεύεται, τότε η πρόγνωση είναι δυσμενέστερη. Το ALCL αντιπροσωπεύει το 3-10% όλων των NHLs και η συχνότητα εμφάνισης αυξάνεται κατά την παιδική ηλικία (10-30% των παιδιατρικών λεμφωμάτων), όπου οι ALK+ περιπτώσεις αφορούν περισσότερο από το 90% των ασθενών. Η συχνότητα εμφάνισης της νόσου στους άνδρες επικρατεί έναντι των γυναικών.

Ταξινόμηση-Μορφολογία

Η πρόσφατη ταξινόμηση του ΠΟΥ, ανάλογα με την εντόπιση του λεμφώματος και την έκφραση ή μη της ALK, αναγνωρίζει 1) το συστηματικό ALK+ ALCL, 2) το συστηματικό ALK- ALCL («προσωρινή» (provisional) νοσολογική οντότητα) και 3) το πρωτοπαθές δερματικό ALCL. Οι τρεις τύποι του ALCL έχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους αναφορικά με τις ηλικίες/φύλα εμφάνισης και την πρόγνωση. Η πρωτεΐνη ALK ανιχνεύεται στο 60-85% των περιπτώσεων και διαδραματίζει κεντρικό παθογενετικό ρόλο στην εμφάνιση του συστηματικού ALK+ ALCL. Το υπόλοιπο 15-40 % όλων των ALCL είναι ALK-, χωρίς άλλες χρωμοσωμικές μετατοπίσεις. Το συστηματικό ALK- ALCL, διαθέτει ιστολογική εικόνα παρόμοια με αυτήν του ALK+ ALCL, με έντονη και ομοιόμορφη έκφραση του CD30. Το πρωτοπαθές δερματικό ALCL, εντοπίζεται στο δέρμα του ασθενούς χωρίς συστηματική προσβολή και είναι σχεδόν πάντα ALK-.

Το ALCL, λόγω μεγάλης ιστολογικής ετερογένειας, διαχωρίζεται σε 3 κύριους μορφολογικούς υποτύπους,: τον κοινό/κλασσικό (70%), τον λεμφοϊστιοκυτταρικό (10%) και το μικροκυτταρικό (5-10%). Όλοι οι υποτύποι χαρακτηρίζονται από ποικίλο αριθμό μεγάλων πλειόμορφων κυττάρων με έκκεντρο, πεταλοειδή ή νεφροειδή πυρήνα και διαυγές κυτταρόπλασμα. Είναι δυνατόν να συνυπάρχουν περισσότεροι του ενός υποτύπου στην ίδια βιοψία σε συνολικό ποσοστό 10-15%, ενώ ο ιστολογικός υπότυπος μπορεί να μεταβληθεί στις περιπτώσεις που εμφανίζουν υποτροπές.

Ανοσοφαινότυπος

Χαρακτηριστικό εύρημα των ALCL είναι η σταθερή έκφραση του δείκτη ενεργοποίησης CD30. Η ενεργοποίηση του CD30 στο ALCL συνδέεται με άρση της κυτταρικής αύξησης και κύκλου και μικρό ποσοστό απόπτωσης, αν και υψηλά επίπεδα κυτταρικού θανάτου σημειώθηκαν παρουσία αναστολέων της πρωτεϊνσύνθεσης. Υπάρχουν περιπτώσεις όπου παρατηρείται έκφραση (60%) ή όχι (~10%, «null» περιπτώσεις) των ανοσοϊστοχημικών δεικτών T-κυτταρικής προέλευσης (π.χ. CD3, CD43 ή CD45RO), με συχνή απώλεια των πρωτεϊνών του T-υποδοχέα και της πρωτεΐνης ZAP70. Στο ALK- ALCL είναι συχνότερη η έκφραση των παν-T δεικτών CD2 και CD3, και του CD15. Αντίθετα, στο ALK+ ALCL παρατηρείται CD15- και πιο συχνή έκφραση των κυτταροτοξικών μορίων TIA-1, granzyme B και περφορίνης, αλλά και του EMA ή MUC-1. Η έκφραση των CD4 και CD8 είναι ίδια στις ALK+ και ALK- περιπτώσεις. Σε μοριακό επίπεδο, η αναδιάταξη του T-υποδοχέα εντοπίζεται στη συντριπτική πλειοψηφία των ALCL. Διαγνωστικοί δείκτες, όπως η έκφραση του κοινού λεμφοκυτταρικού αντιγόνου (LCA) και η απουσία έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα PAX5 (παν-B δείκτης) διευκολύνουν τη διάκριση του ALCL από το cHL και τα CD30+ επιθετικά B-λεμφώματα.

Γενετικές ανωμαλίες

ALK

Η έκφραση της ALK στο ALK+ ALCL είναι αποτέλεσμα κυτταρογενετικών ανωμαλιών (κυρίως χρωμοσωμικών μεταθέσεων), θέτοντας τμήμα του γονιδίου της ALK υπό τον έλεγχο επαγωγέων άλλων γονιδίων, προκαλώντας την ανώμαλη έκφραση του κυτταροπλασματικού (κυρίως) τμήματός της, που της προσδίδει τη δραστηριότητα της τυροσινικής κινάσης (βλ. πίνακα 1).

Πίνακας 1. Παράθεση των χρωμοσωμικών μεταθέσεων στις οποίες εμπλέκεται το γονίδιο ALK και ενέχονται στην παθογένεια λεμφωμάτων

Χρωμοσωμική Μετάθεση	Συνοδός πρωτεΐνη	Συχνότητα (%)	Χιμαιρική πρωτεΐνη (kDa)	Υποκυττάρια εντόπιση	Τύπος όγκου
t(2;5)(p23;q35)	Nucleophosmin (NPM)	75–80	NPM-ALK (80)	Πυρήνας, πυρήνιο, κυτταρόπλασμα	ALK+ ΑΛΜΚ και ΑΛΚ+ ΔΛΜΒΚ*
t(1;2)(q25;p23)	Tropomyosin 3 (TPM3)	12–18	TPM3-ALK (104)	κυτταρόπλασμα	ALK+ ΑΛΜΚ
t(2;3)(p23;q21)	TRK-fused gene (TGF)	2	TFG-ALK (113, 97, 85)	κυτταρόπλασμα	ALK+ ΑΛΜΚ
inv(2)(p23;q35)	AT1C	2	AT1C-ALK (96)	κυτταρόπλασμα	ALK+ ΑΛΜΚ
t(2;17)(p23;q23)	Clathrin heavy chain-like 1 (CLTC1)	2	CLTC1-ALK (250)	Κυτταρόπλασμα (κοκκώδες)	ALK+ ΑΛΜΚ, ΑΛΚ+ ΔΛΜΒΚ*
t(2;X)(p23;q11–12)	Moesin (MSN)	<1	MSN-ALK (125)	Κυτταρική μεμβράνη	ALK+ ΑΛΜΚ
t(2;19)(p23;p13)	Tropomyosin 4 (TPM4)	<1	TPM4-ALK (95–105)	κυτταρόπλασμα	ALK+ ΑΛΜΚ
t(2;17)(p23;q25)	ALO17	<1	ALO17-ALK (ND)	κυτταρόπλασμα	ALK+ ΑΛΜΚ
t(2;22)(p23;q11.2)	Non-muscle myosin heavy chain (MYH9)	<1	MYH9-ALK (220)	κυτταρόπλασμα	ALK+ ΑΛΜΚ
ins(3'ALK)(4q22–24)	άγνωστη	<1	άγνωστη	Κυτταρόπλασμα (κοκκώδες)	ALK+ ΔΛΜΒΚ*

ALK+ ΑΛΜΚ: αναπλαστικό λέμφωμα από μεγάλα κύτταρα, ALK+, ALK+ ΔΛΜΒΚ: ALK+ διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα κύτταρα
** Αφορά σε εξαιρετικά σπάνια πλάσμαβλαστικά CD30- ΔΛΜΒΚ*
† Τροποποιημένος πίνακας από Chiarle et al.⁵ Το γονίδιο alk εμπλέκεται στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονος με τη βλάβη inv(2)(p21;p23) [Echinoderm microtubule-associated protein-like 4 (EML4)] καθώς και στο φλεγμονώδη ψευδοόγκο με τις ακόλουθες μεταθέσεις εκ των ανωτέρω: t(1;2)(q25;p23), inv(2)(p23;q35), t(2;17)(p23;q23), t(2;19)(p23;p13) αλλά και t(2;2)(p23;q13) ή inv(2)(p23;q11–13) [RAN binding protein 2 (RANBP2)], t(2;11;2)(p23;p15;q31) [CysteinyI-tRNA synthetase (CARS)] και t(2;4)(p23;q21) [SEC31 homologue A (S. cerevisiae) (SEC31L1)].

NPM-ALK

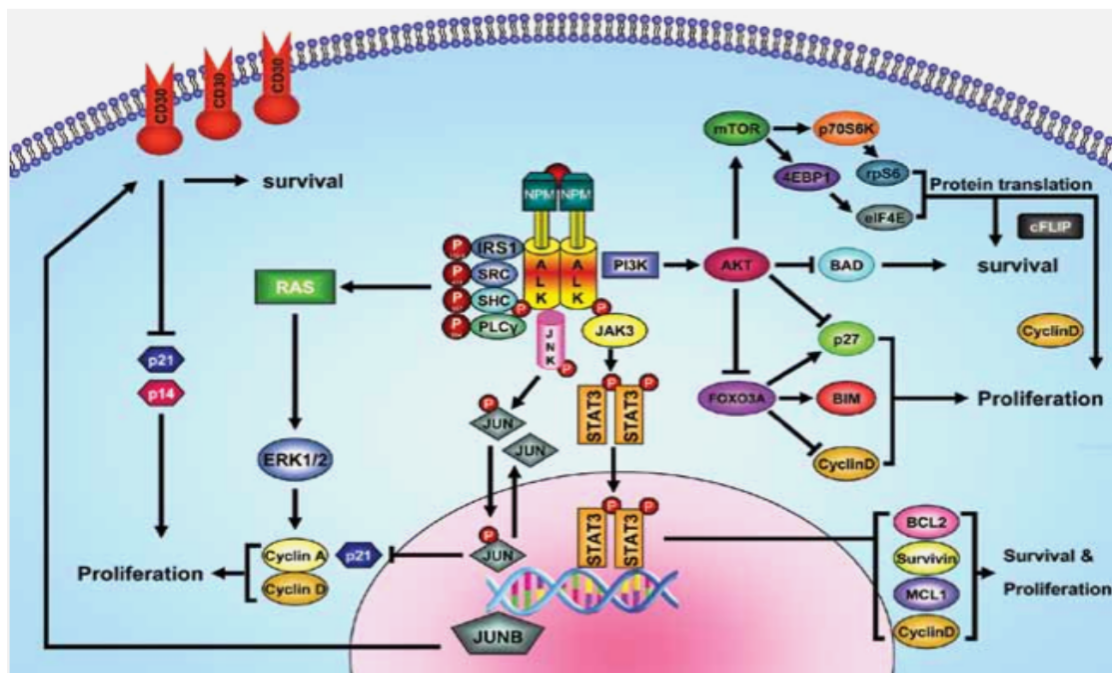
Η συχνότερη γενετική ανωμαλία ALK+ ALCL (70%-80%) είναι η χρωμοσωμική διαμετάθεση t(2;5)(p23;q35), που έχει ως αποτέλεσμα τη χιμαιρική πρωτεΐνη NPM-ALK. Παρόλ'αυτά, υπάρχουν και άλλες χρωμοσωμικές διαμεταθέσεις που περιλαμβάνουν την συγχώνευση της ALK και με άλλα γονίδια, καταδεικνύοντας το ρόλο της στην ογκογένεση του ALCL (βλ. πίνακα 2) Φυσιολογικά, η ALK εκφράζεται στο νευρικό σύστημα, ενώ η NPM κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που συμμετέχει στη μεταφορά των προ-ριβωσωμικών σωματιδίων από τον πυρήνιο, στη βιογένεση ριβωσωμάτων, στη ρύθμιση της κυτταρικής διαίρεσης, την επιδιόρθωση του DNA και τέλος στη μεταγραφή.

Πίνακας 2. Συχνότερες διαμεταθέσεις του ALK γονιδίου (τροποποιημένο από Chiarle R et al.)

Χρωμοσωμική αλλοίωση	Συνοδευτική ή πρωτεΐνη	Συχνότητα εμφάνισης (%)	Μεταλλαγμένη πρωτεΐνη (kDa)	Κυτταρικό πρότυπο πρωτ/κης έκφρασης	Είδος όγκου
t(2;5)(p23;q35)	NPM	75-80	NPM-ALK	Πυρήνας	ALK+ ΑΛΜΚ ^(α) & ALK+ΔΛΜΒΚ ^(β)
				Πυρ/σκος	
				Κυττ/σμα	
t(1;2)(q25;p23)	TPM3	12-18	TPM3-ALK	Κυττ/σμα	ALK+ ΑΛΜΚ & ΦΜΟ ^(γ)

t(2;3)(p23;q21)	TFG	2	TFG-ALK	Κυττ/σμα	ALK+ ΑΛΜΚ
inv(2)(p23;q35)	AT1C	2	AT1C-ALK	Κυττ/σμα	ALK+ ΑΛΜΚ & ΦΜΟ
t(2;17)(p23;q23)	CLTC1	2	CLTC1-ALK	Κοκκιάδες Κυττ/σμα	ALK+ ΑΛΜΚ & ALK+ ΔΔΒΜΚ
t(2;19)(p23;q13)	TPM4	< 1	TPM4-ALK	Κυττ/σμα	ALK+ ΑΛΜΚ& ΦΜΟ ^(*)

Η NPM διαθέτει μια περιοχή διμερισμού με άλλες πρωτεΐνες, διευκολύνοντας τη δημιουργία συμπλεγμάτων μεταξύ των πρωτεϊνών NPM και ALK, προκαλώντας την αυτοφωσφορύλωση και επακόλουθη ενεργοποίηση της τυροσινικής κινάσης της ALK. Πληθώρα πειραμάτων *in vitro* και *in vivo* πιστοποιούν την ικανότητα μετασχηματισμού της NPM-ALK στο ALCL, εξετάζοντας την περίπτωση να αποτελεί τον αιτιολογικό παράγοντα για το ALK+ ALCL. Η ογκογόνος δράση της NPM-ALK προκύπτει από την άμεση ή έμμεση αλληλεπίδρασή της (μέσω ειδικών πρωτεϊνών «προσαρμογέων» (adaptor proteins) [38] με πολλαπλές σηματοδοτικές οδούς (PLC-γ, RAS/ERK, JAK-STAT, PI3K/AKT/mTOR και JNK/Jun), οδηγώντας σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό, κυτταρικό μετασχηματισμό, αναστολή της απόπτωσης, αντίσταση σε φάρμακα/ακτινοβολία, στην κυτταροσκελετική οργάνωση, στην κυτταρική μετανάστευση και σε αυξημένη επιβίωση.



Εικόνα 4. Κυτταρικές οδοί σηματοδότησης και NPM-ALK.

Κλινική ευρήματα-Διάγνωση

Κλινικά παρατηρείται προσβολή των λεμφαδένων και των εξωλεμφαδενικών περιοχών (μυελός των οστών, δέρμα, οστά και μαλακά μόρια), με ή χωρίς γενικά συμπτώματα. Στα συστηματικά ALCL ενήλικων ασθενών η μόνη παράμετρος που καταγράφεται να είναι διαφορετικής συχνότητας είναι η ηλικία. Αντίθετα, διαφοροποιήσεις παρατηρούνται όταν προστίθενται και τα παιδιατρικά λεμφώματα, οπότε παρατηρείται αναιμία, υψηλά επίπεδα G-CSF στον ορό ή και ηωσινοφιλία. Σπανιότερα, μπορεί να εμφανισθεί λευχαιμική εικόνα (σε ALK+ ALCL «μικροκυτταρικής» μορφής, ALK- ALCL) και διήθηση του μυελού των οστών (σε ALK+ ALCL). Τουλάχιστον 40% των ασθενών με ALCL έχουν αυξημένα επίπεδα γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) ορού 6-8, περίπου το 25% υπολευκωματιναιμία, ενώ το 70% εμφανίζει αυξημένα επίπεδα β2-μικροσφαιρίνης. Η διάγνωση της νόσου πραγματοποιείται όπως αναλύθηκε στην ενότητα 5. Οι ασθενείς που διαγιγνώσκονται με συστηματικό ALK+ ALCL είναι κυρίως νεαρά άτομα (~ 20-30 ετών), με την αναλογία ανδρών/γυναικών να προσδιορίζεται στο 6.5/1. Αντίθετα, οι ασθενείς με συστηματικό ALK- ALCL είναι συνήθως ενήλικες με μέσο όρο ηλικίας τα 40-65 έτη.

Πρόγνωση-Θεραπεία

Η έκφραση της πρωτεΐνης ALK και ο IPI αποτελούν τους πιο σημαντικούς προγνωστικούς παράγοντες του αναπλαστικού λεμφώματος από μεγάλα κύτταρα. Χαρακτηριστικοί δυσμενείς βιολογικοί δείκτες της νόσου αποτελούν η έκφραση της survivin, του CD56 και του MUC-1 (κυρίως στο ALK+ ALCL). Επίσης, η αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη BCL-2 υπερεκφράζεται σχεδόν αποκλειστικά στο ALK- ALCL, ενώ μελέτες (λιγότερο ισχυρές) έχουν σημειωθεί και για άλλους δυνητικούς βιολογικούς προγνωστικούς παράγοντες (π.χ. την έκφραση της ενεργού κασπάσης 3, μορίων απόπτωσης και του p27. Αν και τα πρόσφατα δεδομένα που έχουν καταγραφεί είναι ευοίωνα για τη σημασία της σχέσης των διαφόρων βιολογικών δεικτών με την παθογένεια του ALCL, χρήζουν συνεχούς αξιολόγησης και επιβεβαίωσης.

Η βασική θεραπευτική στρατηγική που ακολουθείται στο ALCL καθορίζεται από την παρουσία ή απουσία της πρωτεΐνης ALK και τον IPI και αντιμετωπίζεται κυρίως με χημειοθεραπεία (CHOP και παραλλαγές αυτού. Η πιο συνήθης θεραπεία του πρωτοπαθούς δερματικού ALCL περιλαμβάνει χειρουργική εκτομή της προσβεβλημένης περιοχής του δέρματος συνοδεία ή μη ακτιβολίας. Εκτός από χημειοθεραπεία, ανάλογα τις περιπτώσεις ασθενών, εφαρμόζεται (συνδυασμός της ή μη με) μεγαθεραπεία, αυτόλογη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων στην 1η ύφεση, χορήγηση «βιολογικών» φαρμάκων (Denileukin Diftitox) και μονοκλωνικά αντισώματα. Τέλος, η εφαρμογή κλινικών μελετών στοχευμένης θεραπείας έναντι του CD30 με

ενθαρρυντικά αποτελέσματα (π.χ. MDX-060, SGN-30) και μελέτες κατασκευής αντισωμάτων συζευγμένων με φάρμακα προσπαθούν για τη δυνατότητα στοχευμένης και αποτελεσματικότερης θεραπείας στο ALCL.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *p53*

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *p53* (*TP53*), ο «μοριακός φύλακας» του γονιδιώματος και ρυθμιστικός παράγοντας όλων των πολυκύτταρων οργανισμών πρωτοεντοπίστηκε το 1979. Αρχικά θεωρήθηκε ότι ήταν ογκογονίδιο, ενώ μια δεκαετία αργότερα προσδιορίστηκε ότι η φυσιολογική (wild type, wt) *p53* (Tumor Protein 53, *TP53*, OMIM 191170) είναι ουσιαστικά μία ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη. Προστατεύει από γενωμικές μεταλλάξεις με σκοπό την αποφυγή μεταφοράς κυτταρικής βλάβης στην επόμενη κυτταρική γενιά, διασφαλίζοντας την ακεραιότητα του DNA και συνεπώς τη γενωμική σταθερότητα στο κύτταρο. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω επιδιορθωτικών μηχανισμών του DNA και τροποποιήσεων του κυτταρικού μεταβολισμού, με παράλληλη ρύθμιση της παύσης του κυτταρικού κύκλου, της απόπτωσης, της γήρανσης και της αυτοφαγίας, μέσω μεταγραφικών (Transcription-dependent activities, TA) και μη μεταγραφικών δραστηριοτήτων (Transcription-independent activities, TIA). Η επιλογή ανάμεσα στην παύση του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο, το κυτταρικό στάδιο, το μέγεθος βλάβης του DNA, τα επίπεδα και το κλάσμα του *p53* προς τις ισομορφές του, εξωτερικούς παράγοντες επιβίωσης και εσωτερικές κυτταρικές ρυθμίσεις. Τα λεμφοκύτταρα είναι επιρρεπή στην απόπτωση υπό συνθήκες στρες, ενώ άλλου τύπου κύτταρα τείνουν να οδηγούνται σε παύση του κυτταρικού κύκλου, σε μετασχηματισμό ή μιτωτική καταστροφή που οδηγεί σε απόπτωση και δεν εξαρτάται από το *p53* ή νεκρωτικό θάνατο.

Ο κεντρικός ρόλος που διαδραματίζει το *p53* στα κύτταρα υποδεικνύει ότι απώλεια της πρωτεϊνικής του λειτουργίας μπορεί να επιφέρει σοβαρές συνέπειες. Μεταλλαγή σε ένα από τα δύο αλληλόμορφα του γονιδίου *p53* ενός κυττάρου (π.χ. σύνδρομο Li Fraumeni), μπορεί να το καταστήσει μη λειτουργικό, μια και όλα τα ολιγομερή που θα προκύψουν, θα περιέχουν τουλάχιστον μία μη λειτουργική υπομονάδα, εμποδίζοντας πιθανώς τη μεταγραφική τους δράση. Απώλεια της λειτουργίας της *p53* λόγω μετάλλαξης, απαλοιφής, αλληλεπίδρασης με κυτταρικές και ιϊκές ογκοπρωτεΐνες (MDM2/Hsc70 και το T αντιγόνο του ιού SV40 αντίστοιχα) ή λόγω διαφόρων δυσ-λειτουργιών των καταρροϊκών μονοπατιών συνεπάγεται γενετική αστάθεια και διαταραχή της αποπτωτικής μηχανής, συμβάλλοντας ενεργά στη διαδικασία της κακοήθους εξαλλαγής. Αυτό εξηγεί και το γεγονός ότι το μεταλλαγμένο γονίδιο *TP53* είναι η πιο συχνή γενετική βλάβη που εντοπίζεται στους ανθρώπινους όγκους (>50%).

Δομή, ρύθμιση & λειτουργία της p53

Δομή

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *TP53* έχει μήκος 22kb, εδράζεται στο χρωμόσωμα 17 p13.1 και παράγει ένα 2.2 kb μετάγραφο mRNA από 11 εξώνια και 10 ιντρόνια και η έκφρασή του ελέγχεται από τρεις υποκινητές (P1, P2, P3). Το κυρίαρχο μετάγραφο του *p53* είναι ένα mRNA, 2586 νουκλεοτιδίων, που συμπεριλαμβάνει τις ακόλουθες περιοχές:

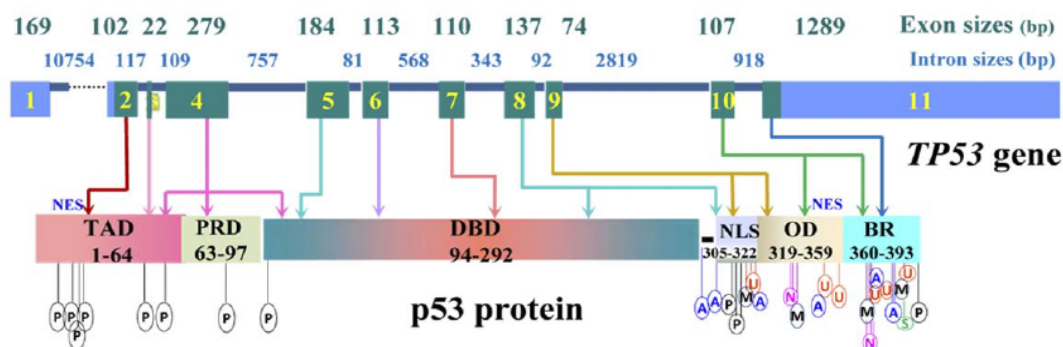
- 1) την 5'-αμετάφραστη περιοχή (untranslated region, UTR) ανάμεσα στο 1^ο και 2^ο εξώνιο
- 2) την 3'-UTR περιοχή του 11^{ου} εξωνίου, και
- 3) την κωδική περιοχή/αλληλουχία (Coding Sequence, CDS) που εκτείνεται από το 2^ο εξώνιο έως το 11^ο, η οποία μεταφράζεται στο κανονικό προϊόν του p53.

Το προϊόν αυτού του γονιδίου, η πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 53 kDa αποτελείται από 393 αμινοξέα και διακρίνεται δομικά στην:

- 1) πλούσια σε όξινα αμινοξέα αμινοτελική περιοχή (αμινοξέα 1-64), η οποία περιλαμβάνει την περιοχή πρόσδεσης του MDM2 και της μεταγραφικής ενεργοποίησης/καταστολής (Transactivation Domain, TAD)
- 2) πλούσια σε προλίνη περιοχή (63-97), που σε περίπτωση βλάβης του DNA προκαλεί την αποπτωτική απόκριση του p53 (Proline Rich Domain, PRD)
- 3) περιοχή πρόσδεσης του DNA (αμινοξέα 94-292), η οποία είναι η κεντρική, συντηρημένη περιοχή του γονιδίου. Σε αυτήν εντοπίζεται και η πλειονότητα των μεταλλάξεων που απαντώνται στον ανθρώπινο καρκίνο αφαιρώντας από την p53 την ικανότητα ενεργοποίησης των γονιδίων-στόχων της (DNA Binding Domain, DBD)
- 4) περιοχή ολιγομερισμού (αμινοξέα 319-359) η οποία περιλαμβάνεται στο καρβοξυτελικό άκρο (Oligomerization domain, OD) και είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό των τετραμερών του p53, που είναι απαραίτητα για την *in vivo* λειτουργικότητα της p53.
- 5) καρβοξυτελική περιοχή (αμινοξέα 360-393), που εμπλέκεται στην καταστολή της πρόσδεσης του DNA στην κεντρική περιοχή (Basic/Repression, BR, of DBD)

Επιπλέον, διακρίνονται οι περιοχές με σήματα πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signals, NLS), (αμινοξέα 316-324, 370-376, 380-386) που περιλαμβάνονται, επίσης, στο καρβοξυτελικό άκρο και οι περιοχές εξόδου πυρηνικού σήματος (Nuclear Export Signals, NES), που εντοπίζονται στις

περιοχές αμινοτελικού άκρου (αμινοξέα 11-24) και ολιγομερισμού (αμινοξέα 340-351) [Εικόνα 5]



Εικόνα 5. Σχηματική αποτύπωση της δομής του γονιδίου *TP53*, των λειτουργικών περιοχών της πρωτεΐνης *p53* και των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (phosphorylation (P), acetylation (A), ubiquitination (U), methylation (M), neddylation (N), or sumoylation (S)). (από Xu-Monette ZY et al).

Ρύθμιση

Η ρύθμιση των επιπέδων της *p53* πρωτεΐνης γίνεται κυρίως σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο, καθώς ο χρόνος ημιζώης της πρωτεΐνης είναι μικρός (~20 λεπτά). Η ποσότητα δε του *p53* προσδιορίζεται από το ρυθμό αποικοδόμησής του μέσω πρωτεόλυσης και όχι από το ρυθμό «παραγωγής» του. Στα φυσιολογικά, μη-στρεσαρισμένα κύτταρα, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της *p53* ελέγχονται από ένα μεγάλο δίκτυο (αρνητικών και θετικών) αυτο-ρυθμιζόμενων βρόχων ανατροφοδότησης (feedback loop), εμπλέκοντας ένα σύνολο ρυθμιστικών πρωτεϊνών (π.χ. MDM2, COP1, Pirh2, Arf-BP1, Pb, PTEN, Carps και προωθώντας την αποικοδόμηση της *p53* μέσω του μονοπατιού της ουμπικιτίνης/πρωτεασώματος. Η πολυπλοκότητα του ρυθμιστικού δικτύου της *p53*, υποδεικνύει ότι μεταβολές σε έναν από τους εμπλεκόμενους ρυθμιστές επιδρά στη ρύθμιση της *p53*. Η πλειοψηφία δε των βρόχων είναι αρνητικοί ρυθμιστές του *p53*, επηρεάζοντας πιθανότατα αρνητικά τη δράση της *p53*, οδηγώντας ενδεχομένως σε απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και σε καρκινογένεση.

Ο κύριος αρνητικός ρυθμιστής της *p53* είναι η πρωτεΐνη MDM2 (Mouse double minute 2, HDM2 στον άνθρωπο). Το ογκογονίδιο MDM2 βρίσκεται στη χρωμοσωμική θέση 12q13-14, έχει μέγεθος ~25 kb και κωδικοποιεί μια φωσφοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 90–95 kDa. Διαθέτει αλληλουχίες NES και NLS μεταξύ των αμινοξέων 175 και 195 και δρα ως λιγάση της ουμπικουτίνης E3 (E3 ubiquitin ligase). Η MDM2 προσδέεται στην ειδική περιοχή πρόσδεσης του αμινοτελικού άκρου της πρωτεΐνης *p53* (αμινοξέα 15-29) σχηματίζοντας σταθερό σύμπλοκο μαζί της (*p53*-MDM2). Έτσι, καταστέλλει τη μεταγραφική

ενεργοποίηση της p21 και άλλων γονιδίων-στόχων της p53, βοηθάει στην έξοδο της p53 από τον πυρήνα και επάγει την αποικοδόμησή της από το πρωτεάσωμα, εμποδίζοντας την παύση του κυτταρικού κύκλου ή την απόπτωση και διατηρώντας την p53 σε χαμηλά επίπεδα. Γι' αυτόν το λόγο, πολλές περιπτώσεις ανθρώπινων καρκίνων σε μοριακό επίπεδο δείχνουν ότι η υπερέκφραση του γονιδίου *MDM2* συνοδεύεται από αδρανοποίηση της p53.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, οι δύο πρωτεΐνες βρίσκονται σε μη φωσφορυλιωμένη κατάσταση, επιτρέποντας τη μεταξύ τους αλληλεπίδραση. Όταν υπάρχει βλάβη στο DNA, οι δύο πρωτεΐνες φωσφορυλιώνονται σε αμινοξέα επιφανείας (από τις πρωτεΐνες π.χ. ATM, ATR, CHK2), εμποδίζοντας την περαιτέρω διατήρηση του συμπλόκου p53-MDM2. Αυτό σημαίνει ότι η p53 δεν προωθείται προς αποικοδόμηση και συσσωρεύεται.

Η έκφραση της *MDM2* ελέγχεται από 2 διαφορετικούς υποκινητές: τον συστατικό υποκινητή P1 που είναι ανεξάρτητος από την p53 και από τον υποκινητή P2, που ανταποκρίνεται στη ρύθμιση της p53. Έτσι, το *MDM2* αποτελεί μεταγραφικό στόχο της p53 ρυθμίζοντας θετικά τα επίπεδα της πρώτης, με αποτέλεσμα να δημιουργείται μια θηλιά αρνητικής ανατροφοδότησης. Παράλληλα, η *MDM2*, ρυθμίζεται και από την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p14 Arf, η οποία θεωρείται με τη σειρά της θετικός ρυθμιστής της p53, καθώς αναστέλοντας την *MDM2*, προκαλεί σταθεροποίηση και αύξηση των επιπέδων της p53.

Ένας άλλος ρυθμιστής της λειτουργίας της *MDM2* είναι η δομικά ομόλογή της, ογκοπρωτεΐνη, η *MDMX* (*MDM4*). Τα δύο μόρια αλληλεπιδρούν μεταξύ τους μέσω των καρβοξυτελικών τους περιοχών-RING (Really Interesting New Gene, περιοχή με δακτύλιο ψευδαργύρου που συμμετέχει στο μονοπάτι της ουμπικιτινιλίωσης). Η *MDMX* αποτελεί, παράλληλα, έναν αρνητικό ρυθμιστή του p53 στοχεύοντας στην αποικοδόμηση της p53. Επιπλέον, έρευνες έχουν δείξει ότι η *MDM2* και η *MDMX* σχηματίζουν ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο με την p53 στους υποκινητές συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων του p53, καταστέλλοντας τη μεταγραφή τους. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι η *MDMX* σταθεροποιεί τις πρωτεΐνες *MDM2* και p53, προωθεί τη δράση της *MDM2* ως E3 λιγάση της ουμπικουϊτίνης, αλλά κυρίως στοχεύει στην αναστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας της p53, αποτρέποντας την αποικοδόμησή της μέσω της *MDM2*. Μελέτες σε ποντίκια χωρίς τις δύο πρωτεΐνες, *MDM2* και *MDMX*, έδειξαν θάνατο κατά την εμβρυογένεση, καθώς η λειτουργία της p53 δε μπορούσε να ανασταλεί, οδηγώντας σε παύση του κυτταρικού κύκλου και επακόλουθη απόπτωση. Ο φαινότυπος αυτός άλλαξε μόνο μετά από απενεργοποίηση του p53. Η λειτουργία της p53 δε μπορούσε να ανασταλεί, οδηγώντας σε παύση του κυτταρικού κύκλου και επακόλουθη απόπτωση. Κατά συνέπεια, η ρύθμιση της p53 από την *MDM2* ή

την MDMX παίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση των οργανισμών και την καρκινογένεση.

Σε περίπτωση βλάβης του DNA, η επαγωγή της μεταγραφικής δραστηριότητας της p53 και η σταθεροποίηση/ενεργοποίησή της πραγματοποιείται με διάφορες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (Εικόνα 5), όπως είναι η ακετυλίωση (μέσω ιστόνων ακετυλοτρανσφερασών, Histone Acetyl-Transferases, HATs), η σουμοϋλίωση, η μεθυλίωση, η γλυκοσυλίωση και φυσικά η φωσφορυλίωση σε κρίσιμα αμινοξέα μέσω διαφόρων κινασών (κινάση της καζεΐνης I/II, JNK1, p38, κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες-Cdks). Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της p53, με διαφοροποιήσεις ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, αναδιαμορφώνουν το τετραμερές της πρωτεΐνης, ενεργοποιούν τα NLS και καλύπτουν τις περιοχές πρόσδεσής του με το MDM2. Έτσι, η ενεργοποιημένη p53 μπορεί να μπει στον πυρήνα και να λειτουργήσει ως μεταγραφικός παράγοντας. Συνεπώς, η χαρτογράφηση μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, όπως της φωσφορυλίωσης και ακετυλίωσης του p53 μεταξύ κανονικών και καρκινικών κυττάρων έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον και βρίσκεται ακόμα σε πρώιμο στάδιο. Ειδικότερα, η αναστρέψιμη διαδικασία της φωσφορυλίωσης κρίνει τη ρύθμιση της βιολογικής δράσης εκατοντάδων πρωτεϊνών. Ένζυμα τα οποία φωσφορυλιώνουν πρωτεΐνες (κινάσες) άλλα αφαιρούν φωσφορικά οξέα (φωσφατάσες) συνήθως ενεργοποιούν ή απενεργοποιούν μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Η φωσφορυλίωση του p53 συνήθως οδηγεί στη σταθεροποίησή του. Σε μερικές περιπτώσεις προηγούμενη φωσφορυλίωση μπορεί να είναι απαραίτητη για επόμενη ακετυλίωση του p53 και σχεδόν κάθε τύπος κυτταρικού στρες αυξάνει τα επίπεδα ακετυλίωσης του p53 σε διάφορους κυτταρικούς τύπους. Συνήθως, η απο-ακετυλίωση του p53 οδηγεί στην ουμπικιτυλίωσή του και αποικοδόμησή του. Τα λόγω βλάβης του DNA ακετυλιωμένα καρβοξυλικά κατάλοιπα της p53, επίσης ουμπικιτυλιώνονται από το MDM2 – οπότε η ακετυλίωση δύναται να αποτρέψει την ουμπικιτυλίωση, οδηγώντας σε σταθεροποίηση του p53. Ομοίως, λόγω της υπερέκφρασης της MDM2 σε πολλούς διαφορετικούς καρκίνους, η ακετυλίωση που απαιτείται για την ενεργοποίηση της p53 θα μπορούσε να συναγωνίζεται με την ουμπικιτυλίωση, οδηγώντας σε αποσταθεροποίηση και αποικοδόμηση της p53.

Λειτουργία

Στα φυσιολογικά κύτταρα του οργανισμού η p53 απαντάται στο κυτταρόπλασμα, σε χαμηλά επίπεδα. Λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας πληθώρας γονιδίων, μέσω της πρόσδεσής της με τις ειδικές αλληλουχίες πρόσδεσης του DNA που διαθέτει (sequence-specific DNA-binding protein)]. Οι μεταγραφικοί στόχοι της p53 είναι ανασταλτικά γονίδια του κυτταρικού κύκλου,

της αγγειογένεσης και της μετάστασης, επαγωγικά γονίδια της απόπτωσης, καθώς και γονίδια που σχετίζονται με την επιδιόρθωση του DNA.

Σε περίπτωση κυτταρικού στρες, βλάβης του γενετικού υλικού, ενεργοποίησης κάποιου ογκογονιδίου (Ras, Myc), επίδρασης χημειοθεραπευτικών φαρμάκων ή σε συνθήκες υποξίας, η ενεργοποίηση της p53 γίνεται σε δύο βήματα. Αρχικά, αναστέλονται οι παράγοντες που μπλοκάρουν την έκφραση του wt p53, προκαλώντας αύξηση των ενδοκυτταρικών του επιπέδων και ενεργοποίηση του μεταγωγικού μονοπατιού σήμανσης της p53. Συμπληρωματικά, η υπερ-παραγωγή του mRNA της p53 διασφαλίζει την αύξηση της συγκέντρωσής της. Στη συνέχεια, μια σειρά από μόρια-διαμορφωτές (κινάσες, ακετυλάσες) ενεργοποιούν τη μεταγραφική ενεργότητα της p53. Ειδικότερα, η p53 τροποποιείται μετα-μεταφραστικά, απελευθερώνεται από το φυσιολογικό, αρνητικό της ρυθμιστή, το γονίδιο MDM2 και καθίσταται ενεργοποιημένη. Η ενεργοποιημένη p53 προκαλεί τη μεταγραφή του γονιδίου CDKN1, που κωδικοποιεί την p21^{WAF1/CIP1}, οπότε αναστέλλονται τα σύμπλοκα CDKs/κυκλίνης και της PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen). Αυτό συνεπάγεται αναστολή της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου και με τη συμβολή των πρωτεϊνών Gadd45 (Growth arrest and DNA-damage-inducible) και 14-3-3σ, παράταση της διαμονής του κυττάρου στη φάση G1 και G2, πριν τον αναδιπλασιασμό του (αντιγραφή), προκειμένου να επιδιορθώσει το «λάθος» του DNA. Ακολούθως, η p53 ενεργοποιεί την έκφραση των γονιδίων p48 (DDB2, Q92466) και p53R2 (RRM2B, Q7LG56), με τα οποία γίνεται, αντίστοιχα, η επιδιόρθωση του DNA με εκτομή και η σύνθεσή του. Μετά το πέρας της επιδιόρθωσης, η p53 ενεργοποιεί το γονίδιο MDM2, αυτοαναστέλλεται και συνεχίζεται φυσιολογικά η κυτταρική διαίρεση.

Όταν η βλάβη δε χρήζει επιδιόρθωσης, τότε η p53 κινητοποιεί τη διαδικασία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωσης) με διττό τρόπο, μέσω TA ή TIA της p53. Όλα τα μέλη της οικογένειας Bcl-2 διαθέτουν μία περιοχή ομολογίας BH (Bcl-2 homology; BH1-BH4) (ή περισσότερες), με τις αποπτωτικές πρωτεΐνες να έχουν την περιοχή BH3 που είναι απαραίτητη για το διμερισμό τους με άλλες πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 και την αποπτωτική τους λειτουργία. Στην περίπτωση των TA δράσεων της p53, η ενεργοποιημένη πυρηνική p53 επάγει την έκφραση των πρωτεϊνών με περιοχή BH3 (BAX, PUMA, και NOXA), ενώ στην περίπτωση των TIA, η ίδια η p53 λειτουργεί ως BH3-μόνο προ-αποπτωτική πρωτεΐνη (πρωτεΐνη που διαθέτει μόνο την BH3 περιοχή, BH3-only), οπότε κατά την έξοδό της στο κυτταρόπλασμα, στοχεύει το BAX και τα μιτοχόνδρια, ενεργοποιώντας άμεσα την ενδογενή αποπτωτική οδό, χωρίς την παραγωγή νέων πρωτεϊνών. Ειδικότερα, η p53 δεσμεύεται στο μιτοχόνδριο, απελευθερώνοντας διάφορους αποπτωτικούς γονιδιακούς παράγοντες (π.χ. το κυτόχρωμα c), με αποτέλεσμα να ενεργοποιούνται μέλη της οικογένειας των κασπασών και να δημιουργείται ένα υψηλού μοριακού βάρους σύμπλοκο.

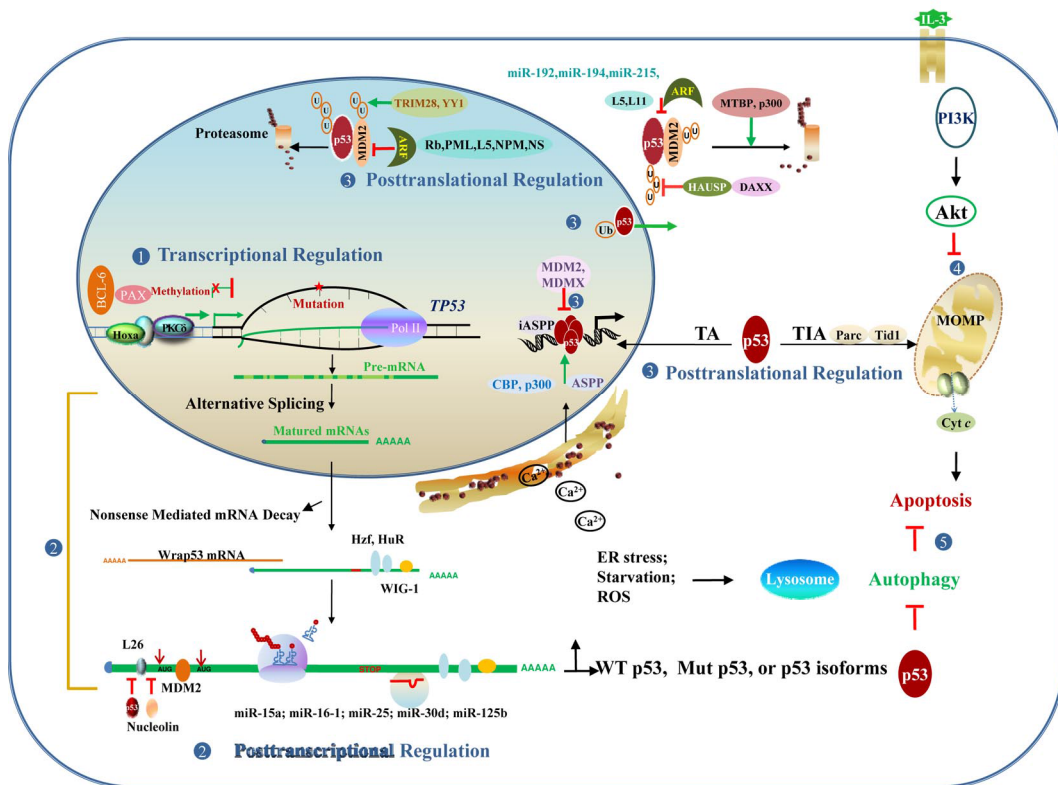
Πρόκειται για το αποπτώσωμα, το οποίο περιέχει την πρωτεΐνη υποδοχής Araf-1 και την ενεργοποιημένη κασπάση 9. Η κασπάση 9 διασπά και ενεργοποιεί τις κασπάσες-τελεστές 3, 6 και 7, και αυτές με τη σειρά τους εκτελούν τον αποπτωτικό μηχανισμό. Παράλληλα, ενεργοποιούνται οι προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες της ενδογενούς μιτοχονδριακής αποπτωτικής οδού, όπως είναι η BAX, PUMA, και NOXA, που απελευθερώνουν το κυτόχρωμα c από το μιτοχόνδριο.

Η απόπτωση διευκολύνεται επιπλέον, με την ενεργοποίηση, από την p53, του υποδοχέα Gd95 (ή Fas/Apo1), και την αναστολή της έκφραση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2. Επίσης, οι ομόλογες πρωτεΐνες της p53, η p63 και p73, ενεργοποιούνται σε βλάβη του DNA, υπερεκφράζονται και ενεργοποιούν τους υποκινητές της p53, επάγοντας τον αποπτωτικό μηχανισμό.

Δυσ-λειτουργία του p53 & μηχανισμοί που εμπλέκονται στη λεμφωματογένεση

Μοντέλα ποντικών με ανεπαρκή λειτουργία της p53, λόγω απώλειας ή λόγω έλλειψης λειτουργικής p53, έχουν την τάση να εμφανίζουν λέμφωμα ως κύρια μορφή κακοήθειας. Επίσης, η διακοπή της απόπτωσης που οφείλεται στην p53, είναι βασική προϋπόθεση στην ανάπτυξη και εξέλιξη λεμφοπολλαπλαστικών ασθενειών.

Η δυσ-λειτουργία του p53 στις λεμφωματικές κακοήθειες, οφείλεται στη ρύθμισή του σε επίπεδο DNA, mRNA και πρωτεΐνης όπως αποτυπώνεται στην Εικόνα 6/Πίνακα 3 που ακολουθεί.



Εικόνα 6. Ρύθμιση και μηχανισμοί δυσλειτουργίας του p53 που εμπλέκονται στη λεμφματογένεση (1) Σε επίπεδο DNA, απορρύθμιση μεταγραφικών παραγόντων και υπερ-μεθυλίωση γονιδιακών υποκινητών μπορούν να προκαλέσουν γονιδιακή αποσιώπηση. (2) Σε επίπεδο mRNA, μετα-μεταγραφικά γεγονότα περιλαμβάνουν εναλλακτικό μάτισμα που δίνει ισομορφές του p53 με τροποποιημένη λειτουργία, mRNA-σταθερότητα/αποικοδόμηση, και μεταφραστική ρύθμιση. (3) Σε πρωτεϊνικό επίπεδο, μεταφραστικές τροποποιήσεις, οξειδοαναγωγική ρύθμιση και ρυθμιστές του p53 επηρεάζουν τη σταθερότητα/λειτουργία του p53 στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα. (4) μονοπάτια που είναι ανεξάρτητα του p53, όπως PI3K/Akt επιδρούν στην απόπτωση που εξαρτάται από το p53. (5) Η αυτοφαγία που προκαλείται από διάφορες μορφές στρες (π.χ. από διαταραχή των φυσιολογικών λειτουργιών του ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ), το λεγόμενο στρες του ΕΔ, από έλλειψη τροφής, κ.α.) αναστέλλει συνήθως την απόπτωση που εξαρτάται από το p53. Το κυτταροπλασματικό p53 αναστέλλει την αυτοφαγία προωθώντας το μονοπάτι του mTOR, ενώ το πυρηνικό p53 προάγει την αυτοφαγία ενεργοποιώντας γονίδια που σχετίζονται με αυτή. (MOMP, mitochondrial outer membrane permeabilization (διαπερατότητα μιτοχονδριακής εξωτερικής μεμβράνης); U /Ub, ubiquitination (ουμπικιτινίωση)). (Από Xu-Monette ZY et al.)

Πίνακας 3. Μοριακοί μηχανισμοί δυσλειτουργίας του *p53* σε λεμφοειδείς κακοήθειες (τροποποιημένος πίνακας του Xu-Monette ZY et al.)

Επίπεδο	Δυσλειτουργία	Αποτέλεσμα	Εμφάνιση ή παραδείγματα
DNA	μεταλλαγές CDS	απώλεια και κέρδος λειτουργίας	14.9% σε λεμφοειδείς/πλασματοκυτταρικές κακοήθειες
	πολυμορφισμοί	διαφορετική λειτουργία/σταθερότητα	συσχετισμός του p53Pro72 με υψηλό ποσοστό εμφάνισης λεμφώματος
	μεταλλαγές σε υποκινητές	μειωμένη γονιδιακή έκφραση	σπάνιο
	μεθυλώσεις σε υποκινητές και UTR	γονιδιακή αποσιώπηση	32% σε ALL (8/25 ασθενείς); 19% σε CLL (10/54 ασθενείς); 4% σε DLBCL (4/108 ασθενείς)
	μεταγραφικοί αναστολείς	μειωμένη μεταγραφή	υπερέκφραση του PAX-5 στο LPL; OM από ενεργά λεμφοκύτταρα T και μακροφάγα; LANA σε PEL
	μεταλλαγές UTR	μειωμένη μεταφραστική αποτελεσματικότητα	μονο-νουκλεοτιδική αντικατάσταση σε ALL
RNA	εναλλακτικό μάτισμα	επιλεκτική λειτουργία TA; απώλεια λειτουργίας TA	
		πιθανή σύνδεση με απόκριση σε χημειοθεραπεία	Δp53, πιθανώς p53β στο AML; κομμένο p53 (50 kDa) σε λέμφωμα B-κυτταρικής προέλευσης (PW κύτταρα) μετά από επίδραση BSO
		επιλεκτική λειτουργία TA; απώλεια λειτουργίας, που σταθεροποιεί το p53; αναστολή λειτουργίας της p53	p53β, p53γ; Δ40p53; Δ133p53α, Δ133p53γ
	εναλλακτική εσωτερική ριβοσωμική θέση εισόδου	Δ40p53 σε κύτταρα H1299	
	μεταγραφική αποτελεσματικότητα		Η MDM2 επιδρά στη μετάφραση και στα επίπεδα της p53 σε κύτταρα H1299
	αναστολή μετάφρασης από miRNAs	miR-15a και miR-16-1 σε CLL; miR-25 και miR-30d σε MM; miR-125b σε κύτταρα H1299	
πρωτεΐνης	σταθερότητα	αποικοδόμηση p53	MTBP, TRIM28, TAF1, YY1, και p300 ενισχύουν την αποικοδόμηση της p53 που οφείλεται στην MDM2 σε κύτταρα H1299 ή λεμφώματος; πρωτεώλυση INK4/ARF σε κύτταρα BL; γονιδιακή αποσιώπηση του <i>p16</i> σε κύτταρα BL
	αναστολή της λειτουργίας των p53 TA		απώλεια της ASPP1 σε ALL; μοντέλα ποντικών με αναστολή από MIF; αναστολή από MDMX, PLK1, YY1, DJ-1, και APAK σε κύτταρα H1299
	μειωμένη ενεργότητα		μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις; απ-ενεργοποίηση της ATM σε CLL
	εντοπισμένη ρύθμιση		

LPL, lymphoplasmacytic lymphoma (λεμφοπλασματοκυτταρικό λέμφωμα); AML, acute myeloid leukemia (οξεία μυελογενής λευχαιμία); ALL, acute lymphoblastic leukemia (οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία); CLL, chronic lymphocytic leukaemia (χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία); DLBCL, diffused large B- cells lymphoma (διάχυτο B λέμφωμα από μεγάλα κύτταρα); MM, multiple myeloma (πολλαπλό μυέλωμα); OM, oncostatin M (ογκοστατίνη M); LANA, latency-associated nuclear antigen (πυρηνικό αντιγόνο που συνδέεται με λανθάνουσα κατάσταση); PEL,

primary effusion lymphoma (λέμφωμα των κοιλοτήτων); BSO, L-buthionine sulfoximine.

Ειδικότερα, η μεταγραφική απορρύθμιση του p53 μπορεί να οφείλεται σε μεθυλίωση και μεταλλαγές στους υποκινητές του, αλλά και στη δράση διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων-ρυθμιστών της μεταγραφής του p53 (π.χ. PAX-5, BCL-6, TAX, LANA, ογκοστατίνη M, PKCδ HOXA5) διαφοροποιώντας τον υποκινητή του p53, πιθανώς με ιστοειδικό τρόπο.

Η μεταγραφική απορρύθμιση του p53 σε επίπεδο mRNA στα λεμφώματα μπορεί να οφείλεται στο εναλλακτικό μάτισμα και στην απορρύθμιση της σταθερότητας και μετάφρασης του mRNA. Το εναλλακτικό μάτισμα δημιουργεί παραλλαγές μεταγράφων που μεταφράζονται σε αντίστοιχες ισομορφές. Συνεπώς, το γονίδιο *TP53*, υπό φυσιολογικές συνθήκες, εκφράζει διάφορες πρωτεϊνικές ισομορφές, λόγω της παρουσίας εναλλακτικών υποκινητών, θέσεων ματίσματος και μεταφραστικής έναρξης. Οι ποικίλες ισομορφές του p53 (p53α, p53β, p53γ, Δp53, Delta Ex6) διαθέτουν διαφορετικό υποκυτταρικό εντοπισμό και λειτουργία, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η λειτουργία του σηματοδοτικού μονοπατιού του p53. Πολλές είναι οι μελέτες που διερευνούν το ρόλο που διαδραματίζουν οι διάφορες ισομορφές του p53, και τη ρύθμισή τους σε διάφορες κακοήθειες, ωστόσο, μέχρι τώρα δε φαίνεται να καταλήγουν σε σαφή συμπεράσματα. Γεγονός, όμως, είναι ότι σε λεμφώματα έχει αναφερθεί η παρεκκλίνουσα έκφραση των διαφόρων ισομορφών του p53. Από την άλλη, πρόσφατες μελέτες αποκάλυψαν νέους μετα-μεταγραφικούς μηχανισμούς ρύθμισης του p53, συμπεριλαμβανόμενης της ρύθμισης της σταθερότητας του mRNA (από το Wrap, HuR, Hzf, WIG-1) και της μετάφρασης (από το HuR, Hzf, WIG-1, L26, Nuclolin, p53, MDM2) μέσω των περιοχών 5'-UTR, 3'-UTR ή CDS, υποδεικνύοντας τη συμμετοχή τους στη λεμφωματογένεση. Τα miRNAs (ενδογενή, μονής-έλικας RNAs, ~22nt, που προσδένονται σε συμπληρωματικές αλληλουχίες mRNAs-στόχων, οδηγώντας τους σε αποικοδόμηση ή σε μεταγραφική αναστολή) στοχεύουν σε 3'-UTR και αποτελούν νέους, μετα-μεταγραφικούς ρυθμιστές, με 9 από αυτά (miRs-25, -30d, -92a, -125b, 504, -1285, -141, -15, -16) να έχουν βρεθεί ότι αναστέλλουν άμεσα το γονίδιο p53.

Η μετα-μεταφραστική απορρύθμιση του p53 σε επίπεδο πρωτεΐνης στα λεμφώματα οφείλεται κυρίως στην αποικοδόμησή του. Η MDM2 βοηθάει την πολυ-, μόνο-ουμπικιτινιλίωση της p53, η οποία συνοδεύεται από την αποικοδόμησή της, τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα. Η p53 ουμπικιτινιλιώνεται και από άλλες E3 λιγάσες (Pirh2, η COP1 και η ARF-BP1). Επίσης, η MDMX ουμπικιτινιλιώνει την p53, χωρίς όμως να προωθεί την αποικοδόμησή της. Πολλές αιματολογικές κακοήθειες παρουσιάζουν απορρύθμιση των ρυθμιστών της MDM2 ή υπερέκφρασή της, σηματοδοτώντας

κακή πρόγνωση σε ασθενείς με FL (follicular lymphoma, λεμφοζιδιακό. λέμφωμα), DLBCL, MCL, MZL (marginal zone lymphomas, λέμφωμα εκ κυττάρων Β οριακής ζώνης), BL, ALL, AML, CLL, MM. Επίσης, παρατηρείται απορρύθμιση της μη-μεταφραστικής και της μεταφραστικής λειτουργίας της p53. Η λειτουργία της p53 οφείλεται, κυρίως στις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και στη δράση των ρυθμιστών της. Η επίδραση που έχουν οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις πάνω στην p53 διαφοροποιείται, ανάλογα τα μοντέλα και τις στρεσογόνες συνθήκες που χρησιμοποιούνται, ενώ τυχόν απορρύθμιση των ρυθμιστών της p53 (π.χ. ASPP1, ATM) μπορεί να προκαλέσει δυσλειτουργία της πρωτεΐνης, ακόμα και χωρίς τη μεσολάβηση p53-γονιδιακής μεταλλαγής. Τέλος, οι μη-μεταγραφικές λειτουργίες της p53 σε λεμφοειδείς νεοπλασίες σχετίζονται με πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις που αφορούν την απόπτωση μέσω του ενδογενούς μιτοχονδριακού μονοπατιού και της αυτοφαγίας, διαδικασίες που δεν έχουν ακόμα διασαφηνιστεί.

p53 στα λεμφώματα

Το γονίδιο του p53, αν και είναι το πιο συχνά μεταλλαγμένο γονίδιο στον ανθρώπινο καρκίνο, παρόλ'αυτά, μελέτες μαρτυρούν ότι η συχνότητα εμφάνισης μεταλλαγών του σε αιμοποιητικές νεοπλασίες είναι μικρότερη από ό,τι αυτή σε συμπαγείς όγκους. Καταγραφή μεταλλαγών/απαλοιφών του p53 συνδέονται συχνά με πιο επιθετικές μορφές της νόσου, με χαμηλά ποσοστά επιβίωσης και ανθεκτικότητα σε θεραπείες. Ενδεικτικά, το p53 βρίσκεται συνήθως μεταλλαγμένο στο 10-20% των περιπτώσεων χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας (CLL), στο 3-8% των περιπτώσεων οξείας μυεοειδικής λευχαιμίας (AML, στο <3% των περιπτώσεων οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας (ALL), και στο 10-12% των περιπτώσεων πολλαπλού μυελώματος (MM). Επίσης, μεταλλαγές του p53 έχουν αναφερθεί στο 10% των ασθενών με HL και στο 10-20% διαφόρων υποτύπων NHL. Στα λεμφώματα, η συχνότητα εμφάνισης μεταλλαγών του p53 ποικίλλει σημαντικά, ανάλογα τον ιστολογικό υπότυπο και το στάδιο της νόσου. Γενικά, ο ρυθμός εμφάνισης μεταλλαγών που παρατηρείται στα χαμηλής κακοήθειας NHL είναι μικρός, ενώ το αντίθετο ισχύει για το ρυθμό εμφάνισης μεταλλαγών σε πολλούς επιθετικούς υποτύπους NHL, ειδικά όταν αυτοί έχουν προκύψει από μετασχηματισμό των πρώτων. Μελέτες έχουν συστηματικά αποδείξει ότι ανωμαλίες στο γονίδιο p53, όπως είναι η υπερέκφραση, η απώλεια αλληλόμορφου και οι μεταλλαγές συνδέονται με κακή απόκριση σε θεραπευτικές αγωγές και βραχύτερη επιβίωση. Παρόλ'αυτά, τα περισσότερα λεμφώματα (HL/NHL), δεν παρουσιάζουν γενετικές αλλοιώσεις ενώ συχνά, χρησιμοποιώντας μηχανισμούς που δεν είναι ακόμα σαφείς, εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα της πρωτεΐνης p53 από,τι στα φυσιολογικά κύτταρα.

Σε λεμφώματα με wt $p53$, η απενεργοποίηση του $p53$ οφείλεται συχνά σε υπερέκφραση του $MDM2$ και της αντίστοιχης πρωτεΐνης. Σε αντίθεση, δε, με τη μέχρι τώρα επικρατούσα αντίληψη ότι το wt $p53$ σχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση, πρόσφατα προτάθηκε ότι απουσία απόπτωσης, το wt $p53$ μπορεί να προστατεύσει τα καρκινικά κύτταρα που αντιμετωπίζονται με ιονίζουσα ακτινοβολία ή χημειοθεραπεία από μιτωτική καταστροφή ή μόνιμη παύση, μέσω παύσης του κυτταρικού κύκλου και επιδιόρθωσης του DNA, συνεπώς επενεργεί ως παράγοντας επιβίωσης. Το wt $p53$ μπορεί να λειτουργεί ως παράγοντας επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων όταν η $p53$ προκαλεί αυτοφαγία, η οποία αναστέλλει την απόπτωση. Σύμφωνα με τον Amrein et al., η αυτοφαγία παρατηρήθηκε μόνο σε πρωτογενή λεμφοκύτταρα CLL με wt $p53$ και συνέβαλε στη φαρμακευτική ανθεκτικότητα.

Μία σύνοψη ευρημάτων που αφορούν μεταλλάξεις του $p53$ σε λεμφώματα ενδιαφέροντος αποτυπώνεται στον πίνακα που ακολουθεί (πίνακα 4).

Πίνακας 4. Διαταραχές του $p53$ στα λεμφώματα (τροποποιημένος πίνακας του Cheung, K.-J. J et al.)

Τύπος λεμφώματος	Συχνότητα (%)	Μηχανισμός	Βιβλιογραφίες
HL	1/4 (25)	Υπερέκφραση	Trumper et al (1993)
		Μεταλλαγή στο εξόνιο 7 απομονωμένων κυττάρων RS	
	37/49 (75)	Υπερέκφραση	Xerri et al (1995)
	0/10 (0)	Μεταλλαγή στα εξόνια 5-8	
	16/30 (53.3)	Υπερέκφραση	Elenitoba-Johnson et al (1996)
	2/30 (6.7)	Σημειακή μεταλλαγή	
	0/8 (0)	Μεταλλαγή στα εξόνια 4-8 απομονωμένων κυττάρων RS	Montesinos-Rongen et al (1999)
	0/5 (0)	Μεταλλαγή στα εξόνια 5-9 απομονωμένων κυττάρων RS	Kupper et al (2001)
ALCL	12/15 (80)	Υπερέκφραση	Cesarman et al (1993)
MCL	3/8 (38)	Υπερέκφραση	Hernandez et al (1996)
		Σημειακή μεταλλαγή στα εξόνια 5/8 βλαστικού υποτύπου	
	0/35 (0)	Πολυμορφισμός στο εξόνιο 6 και στα εσόνια 7/8 τυπικού υποτύπου	
	6/21 (28.6)	Σημειακές μεταλλαγές σε εξόνια 5-8 βλαστικού υποτύπου Υπερέκφραση Απαλοιφή	Greiner et al (1996)
	2/32 (6.3)	Σημειακή μεταλλαγή στα εξόνια 5-8 τυπικού υποτύπου Υπερέκφραση	

Στο λέμφωμα του ALCL έχει καταγραφεί χαμηλή συχνότητα μεταλλαγών του $p53$ (<10%). Η πληθώρα των όγκων του ALCL (ALK+/ALK-) συχνά εκφράζουν την wt $p53$ σε ποικίλα επίπεδα. Οι όγκοι δε, που είναι $p53+$ εμφανίζουν μεγαλύτερο ρυθμό αποπτωτικής διαδικασίας (apoptotic rate, AP) από αυτούς που είναι $p53-$, συσχετίζοντας την έκφραση της πρωτεΐνης με το AP. Επιπλέον, η έκφραση γονιδίων-στόχων της $p53$ ($p21$) σε ένα υποσύνολο όγκων

του λεμφώματος ALCL, υποδεικνύει ότι τουλάχιστον στο υποσύνολο αυτό διατηρείται η λειτουργικότητα της wt $p53$.

Στο λέμφωμα του μανδύα, μεταλλαγές του γονιδίου $p53$ έχουν παρατηρηθεί κυρίως στην κλινικά επιθετική βλαστοειδή παραλλαγή του MCL (~30%) σε σύγκριση με τον κλασικό τύπο του MCL (~10%), συσχετίζοντας την ανίχνευση των μεταλλαγών, αλλά και την υπερέκφραση του $p53$ με κακή πρόγνωση. Επιπλέον, περιπτώσεις MCL οι οποίες διαθέτουν μεταλλαγές που απενεργοποιούν το $p53$ παρουσιάζουν σημαντικά μικρότερη διάμεση επιβίωση, σε σύγκριση με περιπτώσεις της νόσου όπου διατηρείται το wt $p53$. Δεδομένου του ότι οι μεταλλαγές στο $p53$ δεν απαντώνται εύκολα στον κλασικό τύπο MCL χαμηλού πολλαπλασιαστικού ρυθμού, αλλά ανευρίσκονται σε ποσοστό έως 30% σε περιπτώσεις βλαστοειδούς τύπου MCL υψηλού πολλαπλασιαστικού ρυθμού και σχετίζονται με κακή πρόγνωση, ενισχύεται η ιδέα ότι τα περισσότερα κύτταρα του μανδύα που βρίσκονται στη λευχαιμική φάση έχουν μεταλλαγμένο $p53$. Κάτι τέτοιο έρχεται σε συμφωνία με συμβατικά κυτταρογενετικά δεδομένα περιπτώσεων MCL που δείχνουν ότι οι ανωμαλίες στο χρωμόσωμα 17 αποτελούν σύνηθες εύρημα κυττάρων του μανδύα της λευχαιμικής φάσης.

Στο λέμφωμα του Hodgkin, τα μέχρι τώρα δεδομένα που αφορούν τον κλινικό και προγνωστικό ρόλο των μεταλλαγών του γονιδίου $p53$ είναι ανεπαρκή. Ειδικότερα, υπάρχουν μελέτες που συσχετίζουν την πρωτεϊνική έκφραση της $p53$ με δυσμενή πρόγνωση στο HL. Παρόλ'αυτά, υπάρχουν πολλές άλλες αναλύσεις που δεν έχουν καταφέρει να συνδέσουν την έκφραση της $p53$ με συγκεκριμένη πρόγνωση της πορείας των ασθενών με HL. Επιπρόσθετα, η ομάδα του Brink et al (1998) βρήκε ότι υπάρχει σχέση ανάμεσα στην υψηλή έκφραση της $p53$ και την ευνοϊκή κλινική έκβαση ασθενών με HL. Συνεπώς, ο προγνωστικός ρόλος της έκφρασης της $p53$ είναι περισσότερο αμφιλεγόμενος σε ασθενείς με λεμφώματα Hodgkin από ότι σε ασθενείς με λεμφώματα μη Hodgkin.

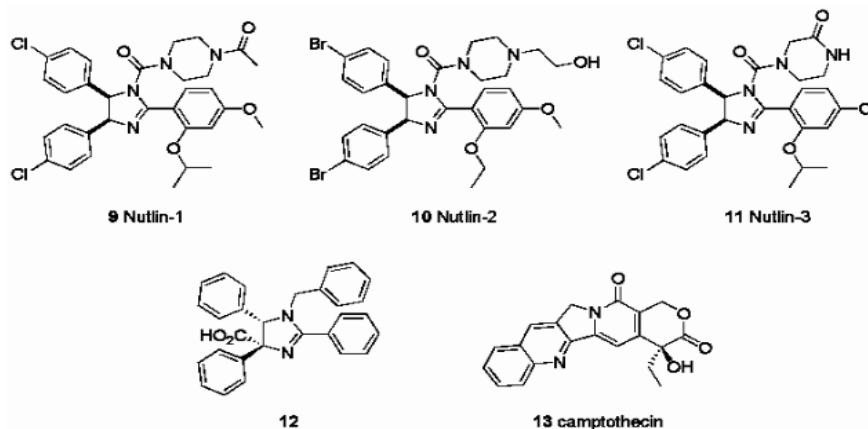
Nutlins και Nutlin-3A

Τα τελευταία χρόνια, η αναγνώριση της μείζωνης βιολογικής σημασίας των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων στην ύπαρξη παθολογικών φαινοτύπων οδήγησε στο σχεδιασμό νέας γενιάς (βιολογικών) φαρμάκων, με τις κατάλληλες θερμοδυναμικές ιδιότητες και συνθετικά συστατικά. Στόχος είναι η αντιμετώπιση νεοπλασιών χρησιμοποιώντας μη κλασσικά χημειοθεραπευτικά φάρμακα, προκειμένου να αποφεύγονται επιπλοκές, όπως είναι δευτερογενείς νεοπλασίες κ.α.

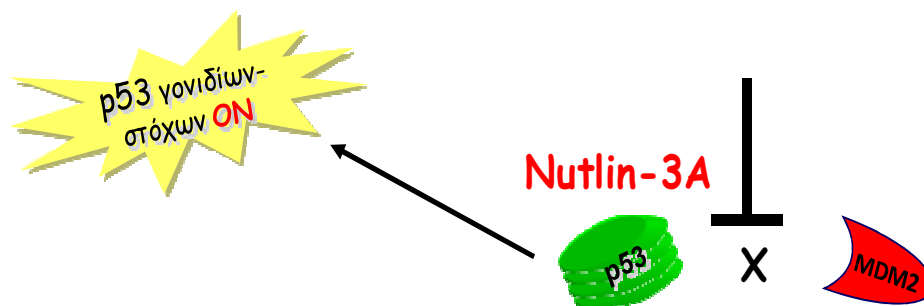
Σε αυτό το πλαίσιο και λαμβάνοντας υπόψιν τη σημασία της $p53$ στην

καταστολή νεοπλασιών, γεγονός που ενισχύ από το σύνηθες εύρημα της απενεργοποίησής της στον ανθρώπινο καρκίνο, έγιναν πολλές προσπάθειες προκειμένου να αναπτυχθούν στρατηγικές βασισμένες στην επαν-ενεργοποίηση αυτού του γονιδίου. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί και η στόχευση του πρωτεϊνικού συμπλόκου p53-MDM2 με σκοπό την αποκατάσταση της λειτουργίας του wt p53, που οδήγησε τελικά στη δημιουργία ανταγωνιστών της MDM2, των μικρών μορίων Nutlins (Nutmey inhibitors).

Πρόκειται για συνθετικά, μη γενοτοξικά, ανάλογα ιμιδαζόλης (*cis*-imidazole analogue) που περιέχουν όλα έναν *trans*-4,5-διφαινυλ-σκελετό, μία ομάδα C-2aryl στην επιφάνεια πρόσδεσης της MDM2, απαραίτητη για την πρόσδεσή τους στο p53, και σημειώνουν ενδιάμεση (*median*) συγκέντρωση



αναστολής (IC₅₀) εύρους 100-300nM. Μέχρι τώρα έχουν αναφερθεί τρία μόρια Nutlins (-1, -2, -3) δύο *cis*- εναντιομερών (-α, -β), με τα -α εναντιομερή να παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης (150-200-fold) έναντι των -β. Η αποτύπωση της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου MDM2-Nutlins έχει δείξει ότι οι Nutlins προσδέονται στο υδροφοβικό σημείο δέσμευσης της p53 πάνω στην MDM2 με εξαιρετικά υψηλή στερική συμπληρωματικότητα, η οποία μιμείται σημαντικά την πραγματική αλληλεπίδραση της p53 με την MDM2 (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Σχηματική αποτύπωση του μηχανισμού δράσης της Nutlin-3A (Psatha et al.)

Μελέτες *in vitro* και *in vivo* με Nutlins έχουν δείξει αντι-νεοπλασματική δραστηριότητα σε κύτταρα με wt p53 (εύρος δραστικότητας των Nutlins 1-3μM), αλλά όχι σε κύτταρα με έλλειψη ή μεταλλαγή της p53. Η επίδραση δε του εναντιομερούς με τη μεγαλύτερη ενεργότητα, της Nutlin-3A, έχει δειχθεί ότι οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα την p53, σε επακόλουθη παύση του κυτταρικού κύκλου και σε απόπτωση πληθώρα καρκινικών κυττάρων. Επίσης, η ενεργοποιημένη οδός του p53 από τη Nutlin-3a αποδείχθηκε ότι είναι μη γενotoξική σε νεοπλασίες και μπορεί και προσδίδει καλύτερο βιολογικό αποτέλεσμα σε σχέση με τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της p53 που προκαλούνται από το γενotoξικό στρες. Σύμφωνα με τους Brummelkamp et al. (2006), η πρωτεΐνη 1 της βλάβης του DNA που προσδένεται στην p53 (53BP1) αποτελεί σημαντικό μεσολαβητή της κυτταροτοξικής επίδρασης της Nutlin-3a. Παρά το ότι η Nutlin-3B δεν είναι γενotoξική μελέτες ενισχύουν την αντίληψη ότι πραγματοποιείται ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού της βλάβης του DNA σε καρκινικά κύτταρα, συμβάλλοντας στην κυτταροτοξική δράση της Nutlin-3A. Παράλληλα, στα φυσιολογικά κύτταρα, η ενεργοποίηση της p53 με τον αναστολέα της MDM2 έχει δειχθεί ότι οδηγεί σε αναστρέψιμη παύση του κυτταρικού κύκλου και όχι σε κυτταρικό θάνατο, υποδεικνύοντας την απουσία τοξικότητας και τονίζοντας τη χρησιμότητα της συνθετικής αυτής ουσίας για θεραπευτικούς σκοπούς. Παρόλ'αυτά, πρόσφατη μελέτη *in vitro* έδειξε ότι η Nutlin-3A μπορεί να προωθήσει την κυτταρική γήρανση, γεγονός που θα πρέπει να διερευνηθεί καλύτερα. Επίσης, πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η θεραπευτική δράση της Nutlin-3A αφορά, εκτός από την κυτταροτοξικότητα και αναστολή της αγγειογένεσης, διαδικασία ζωτικής σημασίας στην ανάπτυξη όγκων.

Nutlin-3A ως θεραπευτικό μέσο σε λεμφώματα

Η λειτουργικότητα της ενεργοποίησης της p53 χρησιμοποιώντας τη Nutlin-3A, μόνη της ή σε συνδυασμό με άλλους θεραπευτικούς παράγοντες έχει μελετηθεί και στις αιμοποιητικές κακοήθειες. Μελέτες σε λεμφώματα (HL, MCL, DLBCL, ALCL.) δείχνουν ότι η στοχευμένη ενεργοποίηση του p53 από Nutlin-3A οδηγεί σε αναστολή της προόδου του κυτταρικού κύκλου λόγω p53/p21 και σε p53-εξαρτώμενο αποπτωτικό θάνατο τα νεοπλασματικά κύτταρα που διαθέτουν wt p53. Επιπλέον, μελέτες δείχνουν ότι εφαρμογή της Nutlin-3A προκαλεί αυξημένη έκφραση του ομολόγου της p53, p73, σε λεμφώματα MCL, ALCL, ή BCL όπου το p53 είναι μεταλλαγμένο. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η συνεργιστική επίδραση της Nutlin-3A σε συνδυασμό με διάφορους κλασικούς και μη χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. Ενδεικτικά, συνδυασμός της Nutlin-3A με doxorubicin, etoposide και vincristine σε κύτταρα HL (wt p53) με doxorubicin και etoposide σε κύτταρα ALCL (wt/mt p53) αλλά και σε κύτταρα_14-18-BCL (wt/mt

p53) ανέστειλε την κυτταρική αύξηση και ενίσχυσε το αποπτωτικό αποτέλεσμα, μειώνοντας την τοξική συγκέντρωση των χημειοθεραπευτικών ουσιών. Επίσης, όταν η nutlin-3a συνδυάστηκε με τον αναστολέα της HSP90, geldanamycin, η Nutlin-3A επέδρασε αποπτωτικά τόσο σε wt όσο και σε μεταλλαγμένα κύτταρα HL, μια και η επαγωγή της απόπτωσης από τη δράση της geldanamycin ήταν ανεξάρτητη της p53. Η αναστολή της MDM2 από τη Nutlin-3A προκάλεσε ενεργοποίηση της ενδογενούς ή μιτοχονδριακής απόπτωσης μέσω αύξησης της έκφρασης της Noxa (γονίδιο-στόχος της p53) σε ανθεκτικά κύτταρα MCL, ενώ αντίθετα η εφαρμογή μόνο της ουσίας bortezomib παρουσίασε περιορισμένη ευαισθησία. Ο συνδυασμός nutlin/bortezomib ενίσχυσε την πρωτεϊνική έκφραση της Noxa σε κύτταρα MCL με μεταλλαγμένο p53 αλλά όχι σε αντίστοιχα κύτταρα με wt p53. Επίσης, η απόπτωση ως επακόλουθο της εφαρμογής της Nutlin-3A σε κύτταρα ALCL έχει δειχθεί ότι αφορά μηχανισμούς που οφείλονται στη μεταγραφική δράση της p53, αλλά και που είναι ανεξάρτητοι αυτής.

Γονίδια που επηρεάζονται από τη Nutlin-3A

Παρά το μεγάλο αριθμό των ερευνών που έχουν σημειωθεί μέχρι τώρα, πολύ λίγα γονίδια έχουν συνδυαστεί με την ευαισθησία απόκρισης στη Nutlin-3A. Μεταξύ των διαφόρων γονιδίων που σχετίζονται με το μονοπάτι του p53, έχει δειχθεί ότι η Nutlin-3A προκαλεί αύξηση στην έκφραση του Notch1, στα επίπεδα του mRNA των PCNA, p21, GDF15, TRAIL-R2, PIG3 Gadd45, ενώ επηρεάζει μόρια όπως το ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου E2F1, τον υποδοχέα του ανδρογόνου, τον παράγοντα HIF και το μονοπάτι του NF-kB.

Συνεπώς, θα ήταν πολύ σημαντικό να διελευκανθεί περαιτέρω το σύνολο των γονιδίων που επηρεάζονται από την εφαρμογή της Nutlin-3A, με απώτερο σκοπό τον αποτελεσματικότερο συνδυασμό της με άλλα θεραπευτικά μόρια.

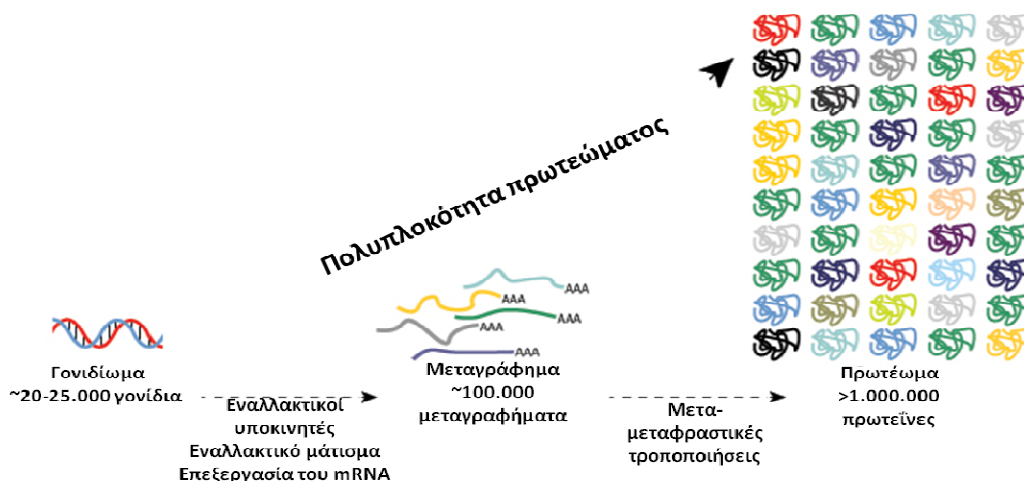
Η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών (Microarrays) - Affymetrix

Η εκτίμηση της μεταγραφής σε επίπεδο γονιδιώματος έγινε εφικτή μέσω της ανάπτυξης της γονιδιωματικής ανάλυσης με μικροσυστοιχίες DNA (γνωστές και ως γονιδιακό ή γενωμικό τσιπ, *DNA chip* ή διάταξη γονιδίων <http://el.wikipedia.org>). Πρόκειται για ένα υψηλής απόδοσης τεχνολογικό εργαλείο, που με βάση την αντίδραση υβριδισμού, επιτρέπει την ταχεία, παράλληλη και ευρείας κλίμακας ανάλυση της αλληλουχίας πληθώρας (ή όλων των) γονιδίων ενός οργανισμού, με μία πειραματική διαδικασία. Με αυτόν τον τρόπο, γίνεται ο προσδιορισμός της γονιδιακής έκφρασης σε επίπεδο mRNA, σε φυσιολογικές/παθολογικές καταστάσεις ή σε απόκριση σε κάποιο ερέθισμα του περιβάλλοντος. Η χρήση δε του ηλεκτρονικού υπολογιστή εξασφαλίζει την κατ'επανάληψη ποσοτικοποίηση και υψηλής ποιότητας γονιδιακή ανάλυση, παρέχοντας τη δυνατότητα περαιτέρω μελέτης των μεταγραφικών δικτύων και των εμπλεκόμενων γονιδιακών μηχανισμών.

Οι μικροσυστοιχίες είναι στερεές (γυάλινες ή πολυμερούς) διατάξεις, πάνω στις οποίες τοποθετείται ένα μωσαϊκό νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (probes) σε καθορισμένες θέσεις (spots), με τη μορφή βακτηριακών κλώνων cDNA (Expressed sequence tags, ESTs) ενισχυμένων με PCR, τις λεγόμενες μικροσυστοιχίες cDNA (cDNA arrays) ή με τη μορφή ολιγονουκλεοτιδικών μικροσυστοιχιών (in-situ oligonucleotide microarrays, τύπου Affymetrix Gene Chips). Οι μικροσυστοιχίες βασίζονται στην αρχή της συμπληρωματικής υβριδοποίησης (complementary hybridization). Κάθε αλληλουχία αποτελεί τον ανιχνευτή ενός ειδικού γονιδιωματικού μεταγράφου (transcript) και είναι ειδική προς την έκφραση ενός γονιδίου του εξεταζόμενου δείγματος. Τα mRNAs κάθε δείγματος, σημαίνονται με φθορίζουσα χρωστική, υβριδοποιούνται στη μικροσυστοιχία, και ακολουθεί η διέγερση της κάθε υβριδοποιημένης μικροσυστοιχίας με λέιζερ, στο κατάλληλο μήκος κύματος για τον προσδιορισμό της χρωστικής. Η ένταση του σήματος υβριδοποίησης κάθε spot, αντιστοιχεί στην απόλυτη ποσότητα του αντίστοιχου μεταγράφου στο δείγμα και μεταφράζεται σε επίπεδα γονιδιακής έκφρασης. Στις ολιγονουκλεοτιδικές μικροσυστοιχίες τα πρότυπα και τα υπό ανάλυση δείγματα υβριδοποιούνται ξεχωριστά, δηλαδή σε διαφορετικές μικροσυστοιχίες, ενώ στις μικροσυστοιχίες cDNA υβριδοποιούνται ταυτόχρονα, πάνω στις ίδιες μικροσυστοιχίες. Επίσης, οι ολιγονουκλεοτιδικές μικροσυστοιχίες, ανάλογα με τη μέθοδο σύνθεσής τους διακρίνονται περαιτέρω σε αυτές που κατασκευάζονται με τη χρήση της φωτολιθογραφίας (Affymetrix), με την ηλεκτροχημική σύνθεση και με την inkjet τύπωση. Ανεξάρτητα από την τεχνολογία μικροσυστοιχιών που επιλέγεται να χρησιμοποιηθεί, το γενικό πρωτόκολλο που ακολουθείται συνοψίζεται στα ακόλουθα βήματα: 1) στην επιλογή των ανιχνευτών, 2) στην κατασκευή μικροσυστοιχιών, και 3) στην ανίχνευση / ανάλυση / ανάγνωση του δείγματος.

Πρωτεωμική ανάλυση

Σε ένα ζωντανό κύτταρο, οι περισσότερες λειτουργίες πραγματοποιούνται από τις πρωτεΐνες. Η λέξη «πρωτέωμα», σύντμηση των όρων «πρωτεΐνη» και «γονιδίωμα», πρωτοδιατυπώθηκε από τον Marc Wilkins το 1996 και αναφέρεται στο σύνολο των πρωτεϊνών που μεταφράζονται από το γονιδίωμα (σύνολο γονιδίων) ενός ολοκληρωμένου κυττάρου ή οργανισμού ή συστήματος. Σε αντίθεση με το σταθερό/στατικό πρωτεϊνικό εκμαγείο του κυττάρου, το γονιδίωμα, το πρωτέωμα είναι εξαιρετικά δυναμικό, καθώς επηρεάζεται και διαφοροποιείται από αλλαγές στο ευρύτερο εσωτερικό αλλά και εξωτερικό μικρο-κυτταρικό περιβάλλον, επηρεάζοντας την κατάσταση ολιγομερισμού των πρωτεϊνών, το χρόνο ημιζωής τους, τον κυτταρικό εντοπισμό τους και τη λειτουργία/δραστηριότητά τους. Συνεπώς, ένα κύτταρο μπορεί να παρασκευάζει από ένα ίδιο, σχετικά μικρό γονιδίωμα πολλαπλάσια πρωτέωματα.



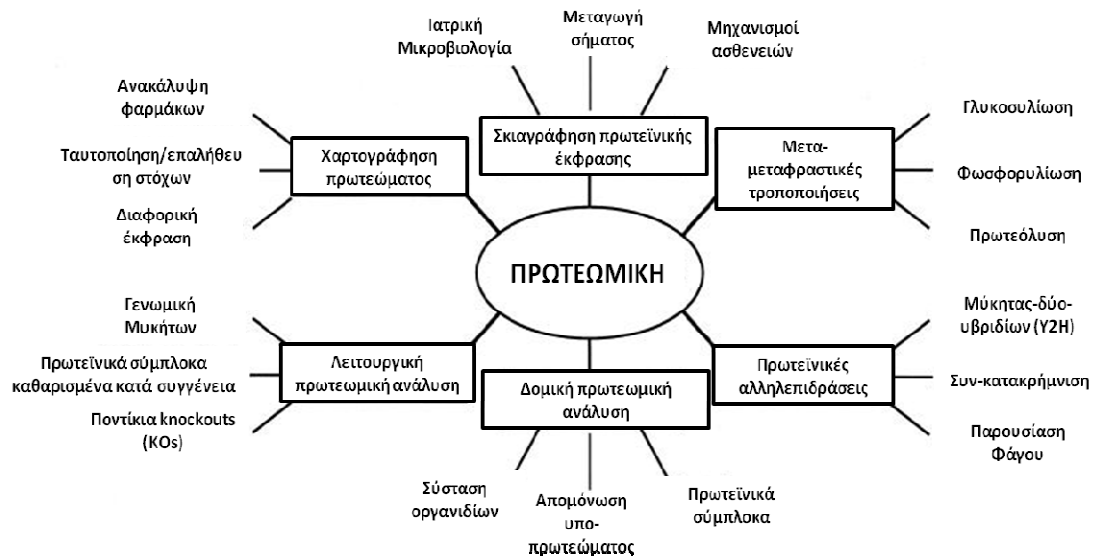
Εικόνα 8. Μηχανισμοί με τους οποίους ένα γονίδιο μπορεί να δημιουργήσει πολλαπλά γονιδιακά προϊόντα (τροποποιημένο σχήμα από τη σελίδα <http://www.piercenet.com>]

Ο όρος «πρωτεωμική ανάλυση/proteomics» χρησιμοποιήθηκε το 1997 κατ' αναλογία με τον όρο «γονιδιωμική ανάλυση/genomics». Η «πρωτεωμική ανάλυση» αποτελεί έναν δι-επιστημονικό τομέα που βασίστηκε στην έρευνα και την ανάπτυξη του «Human Genome Project», με σκοπό την πλήρη και ταυτόχρονη αποσαφήνιση του πρωτεϊνικού περιεχομένου ενός βιολογικού συστήματος (εώς και χιλιάδες πρωτεΐνες), σε μία δεδομένη χρονική στιγμή ή κατάσταση. Συμπεριλαμβάνει δε ένα σύνολο πληροφοριών που αφορούν την αφθονία των πρωτεϊνών, τις μεταβολές και τις τροποποιήσεις που υφίστανται,

καθώς και τα μόρια/δίκτυα με τα οποία αλληλεπιδρούν, με σκοπό την καλύτερη κατανόηση πληθώρας κυτταρικών διεργασιών σε μια φυσιολογική ή παθολογική κατάσταση (καρκίνος, κ.α. ασθένειες).

Η αυξημένη γονιδιακή απογραφή εκατοντάδων οργανισμών τα τελευταία χρόνια προώθησαν τη ραγδαία ανάπτυξη της πρωτεωμικής ανάλυσης, παρέχοντάς της ως πλαίσιο εργασίας την αλληλουχία βάσεων των διαφόρων γονιδιωμάτων, με σκοπό την εξερεύνηση του αντίστοιχου πρωτεώματός τους. Επίσης, η διαπίστωση ότι δεν υπάρχει άμεση συσχέτιση ανάμεσα στην αλληλουχία του γονιδιώματος και την πρωτεϊνική λειτουργία αύξησε το ενδιαφέρον για την πρωτεωμική ανάλυση. Το γεγονός αυτό, οφείλεται τόσο στη ρύθμιση της έκφρασης των πρωτεϊνών κατά τη μεταγραφή και τη μετάφραση, όσο και στις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (post-translational-modifications, PTMs) των πρωτεϊνών (δημιουργία τεταρτοταγούς δομής, ομοιοπολική προσθήκη μορίων π.χ. σάκχαρα και ομάδες φωσφόρου, μεθυλομάδων, πρωτεολυτική πέψη, αφαίρεση σηματοδοτικών αλληλουχιών κ.α.). Στην ανάπτυξη της πρωτεωμικής ανάλυσης συνέτεινε και το γεγονός ότι η φασματοσκοπία μάζας απλοποίησε την ανάλυση και το χαρακτηρισμό πρωτεϊνών και των PTMs τους, εισάγοντας διάφορες, σημαντικές καινοτομίες, οι οποίες επέκτειναν τις δυνατότητες της φασματοσκοπίας μάζας. Η ανίχνευση, ο δομικός και λειτουργικός καθορισμός των πρωτεϊνών/PTMs επιτυγχάνεται με την αλληλούχιση κατά Edman ή με ESI-MS/MS ανάλυση των διαφορών στις πραγματικές και θεωρητικές μάζες ενός πεπτιδίου και με δομική και λειτουργική σύγκριση της πρωτεΐνης με και χωρίς τροποποίηση. Ωστόσο, η φασματομετρία μάζας (mass spectrometry, MS) συχνά αποτυγχάνει να αναγνωρίσει τη φύση των τροποποιήσεων εάν το πεπτίδιο δε μπορεί να απομονωθεί ή διαφεύγει του ιοντισμού στο MS (mass spectrum). Οι Gaever et al. πρότειναν την απομόνωση των N-τελικά μπλοκαρισμένων πεπτιδίων με ακετυλίωση όλων των ελεύθερων αμινοξέων της πρωτεΐνης και ανάλυση με LC-MS/MS των πεπτιδίων που έχουν υποστεί πέψη με το ένζυμο της θρυψίνης.

Το κύριο πεδίο της πρωτεωμικής ανάλυσης είναι η πλήρης ανάλυση/χαρτογράφηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου ενός δείγματος. Η πρωτεωμική ανάλυση καλύπτει τέσσερις κύριες περιοχές μελέτης: την πρωτεωμική ανάλυση έκφρασης (expression proteomics), τη λειτουργική πρωτεωμική ανάλυση (interaction – functional proteomics), τη δομική πρωτεωμική ανάλυση και τη σχετιζόμενη με το πρωτέωμα βιοπληροφορική. Κάθε τύπος πρωτεωμικής ανάλυσης χρησιμοποιεί δε πειραματικές διαδικασίες προσαρμοσμένες στην κάθε περίπτωση.



Εικόνα 10. Τύποι πρωτεωμικής και οι εφαρμογές τους στη βιολογία. (τροποποιημένο σχήμα του Graves PR et al.

Η καθιερωμένη και γενικευμένη προσέγγιση της πρωτεωμικής ανάλυσης περιλαμβάνει τα ακόλουθα τέσσερα βήματα:

- 1) την απομόνωση των πρωτεϊνών από το δείγμα (ανάλογα τη φύση του δείγματος),
- 2) το διαχωρισμό τους (1DE/2DE-SDS-PAGE),
- 3) την ανίχνευσή τους (μέσω πρωτεϊνικής χρώσης εντός του πηκτώματος, ανάλογα τη μέθοδο ταυτοποίησης/ανάλυσης που ακολουθεί)
- 4) την ταυτοποίηση/σχετική ποσοτικοποίηση των απομονωθέντων πρωτεϊνών, με τη βοήθεια εξειδικευμένων υπολογιστικών προγραμμάτων (softwares). Οι πρωτεΐνες μικρής συγκέντρωσης, αλλά μεγάλης λειτουργικής σημασίας (ρυθμιστικές ή σηματοδοτικές πρωτεΐνες) είναι δύσκολο να ανιχνευτούν.

Φασματομετρία μάζας

Η φασματομετρία μάζας είναι μια εξελισσόμενη τεχνική που εμφανίστηκε στις αρχές του προηγούμενου αιώνα και χρησιμοποιείται στον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό ποικίλων (βιο)χημικών ενώσεων/ουσιών. Η ιδιαιτερότητα της φασματομετρίας μάζας ανάμεσα στις υπάρχουσες αναλυτικές τεχνικές έγκειται στο ότι μετράει με πολύ μεγάλη ακρίβεια μία φυσική ιδιότητα των μορίων, τη μάζα τους. Οι συνηθέστερες μέθοδοι ανάλυσης και διαχωρισμού των μαζών είναι α) το μαγνητικό πεδίο β) το τετράπολο και γ) ο χρόνος πτήσης και βασίζονται στην εφαρμογή ηλεκτρικών και μαγνητικών πεδίων που επιδρούν στην κίνηση φορτισμένων σωματιδίων (ιοντισμένων ατόμων ή μορίων) και την αντιστοίχιση των μαζών των λαμβανομένων ιόντων με τη δομή της αρχικής/γονεϊκής (parent) ουσίας. Ένας φασματογράφος μάζας δε, αποτελείται από τρία βασικά σημεία: τον ιονιστή (ion source), τον αναλυτή (mass analyzer) και τον ανιχνευτή (detector) μάζας.

Η φασματομετρία μάζας, τη δεκαετία του 1980 και σε μεγαλύτερο εύρος, τη δεκαετία του 1990 έπαιξε σπουδαίο ρόλο στην εξέλιξη των βιολογικών επιστημών (Mann et al, 2001). Η φασματομετρία μάζας άρχισε να βρει εφαρμογή στα βιολογικά συστήματα, κυρίως λόγω της δυνατότητας ανάλυσης μόνο φορτισμένων και πτηκτών μορίων. Τα βιομόρια είναι μεγάλα και πολικά μόρια που δε μεταφέρονται και δεν ιονίζονται εύκολα στην αέρια φάση. Ο ηλεκτροψεκασμός (ES)(Fenn et al, 1989) και η απόπτωση με laser υποβοηθούμενη από υπόστρωμα (MALDI) (Karas & Hillenkamp, 1988) αποτέλεσαν τις τεχνικές ιονισμού εκείνες στις οποίες οφείλεται η επιτυχημένη χρήση της φασματομετρίας μάζας σε βιολογικά μόρια. Οι απαιτήσεις της μοριακής βιολογίας για τεχνικές μεγαλύτερης ευαισθησίας οδήγησαν στο συνδυασμό της φασματομετρίας μάζας με την πρωτεωμική ανάλυση. Η αρχή της χρήσης της πρωτεωμικής ανάλυσης χρονολογείται στις αρχές της δεκαετίας του 1970 με την ανακάλυψη της δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης, η οποία παρείχε για πρώτη φορά τη δυνατότητα αποτύπωσης εκατοντάδων ή ακόμα και χιλιάδων πρωτεϊνών σε μία απλή πηκτή (Klose, 1975; O'Farrell, 1975). Η ταυτοποίηση των πρωτεϊνικών στιγμάτων που διαχωρίζονταν στην πηκτή, περιοριζόνταν μόνο στα πιο έντονα στίγματα μέχρι την δεκαετία του 1990, όπου η φασματοσκοπία μάζας σε βιολογικά συστήματα εξελίχθηκε σε μία ακριβής και αξιόπιστη τεχνική. Σήμερα η φασματοσκοπία μάζας αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι του τομέα της πρωτεωμικής ανάλυσης και χρησιμοποιείται κυρίως σε τρία πεδία.

- 1) στη μοριακή βιολογία, για το χαρακτηρισμό και τον έλεγχο ποιότητας ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών και άλλων μακρομορίων.
- 2) στην ταυτοποίηση πρωτεϊνών σε απλά βιοχημικά πειράματα ή σε μεγάλης κλίμακας πρωτεωμική ανάλυση.
- 3) στον προσδιορισμό και το χαρακτηρισμό μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, ενώ μπορεί να προσδιορίσει μεγάλο εύρος ομοιοπολικών τροποποιήσεων που μεταβάλλουν τη μάζα μιας πρωτεΐνης.

Βιοπληροφορική

Η βιοπληροφορική είναι ένα νέο και ραγδαία αναπτυσσόμενο πεδίο το οποίο είναι απαραίτητο για τη γονιδιωματική και πρωτεωμική ανάλυση. Η δημιουργία της εννόησε την ανάπτυξη βάσης δεδομένων χρησιμοποιώντας τον τεράστιο αριθμό δεδομένων που προκύπτουν από τις υψηλής απόδοσης αναλυτικές μεθόδους. Συνδυάζει τα αποτελέσματα της γονιδιωματικής και πρωτεωμικής ανάλυσης με πειραματικά αποτελέσματα και με τη χρήση εξαιρετικών λογισμικών μπορεί να δημιουργήσει βάσεις πειραματικών και θεωρητικών δεδομένων. Μόνο με την ανάπτυξη και τη χρήση της βιοπληροφορικής είναι δυνατή η αξιόπιστη αξιολόγηση του τεράστιου αριθμού των πειραματικών δεδομένων, βασιζόμενη σε 2 κύρια μέρη:

1. στην προεπεξεργασία δεδομένων (ανάλυση χαμηλού επιπέδου, low level analysis/pre-processing)
2. στην μετα-επεξεργασία δεδομένων και τη συνήθη εφαρμογή κάποιου αλγόριθμου ταξινόμησης (classification algorithm) (ανάλυση υψηλότερου επιπέδου, higher level analysis).

Τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί μεγάλος αριθμός λογισμικών για τη μελέτη των πειραματικών και θεωρητικών δεδομένων καθώς και διάφορα μοντέλα για την πρόβλεψη της δομής και της λειτουργίας των γονιδίων και των πρωτεϊνών. Επιπλέον, έχουν αναπτυχθεί μοντέλα για την πρόβλεψη πιθανών διαμεμβρανικών τμημάτων, όπως α -έλικες (TMtrep (Bagos et al, 2004; Hofmann & Stoffel, 1993)) και β -πτυχωτές (PRED-TMBB (Bagos et al, 2004)), καθώς και για την πρόβλεψη της θέσης των πρωτεϊνών μέσα στο κύτταρο (SignalP (Bendtsen et al, 2004) και PSORTB (Gardy et al, 2005)).

Συνδυασμός γονιδιωματικής & πρωτεωμικής ανάλυσης ως εργαλείο

Η ολοκλήρωση της πλήρους χαρτογράφησης του ανθρώπινου γονιδιώματος (30.000-40.000 γονίδια) σήμανε την ανατολή μιας νέας εποχής στην έρευνα. Η διαφορική έκφραση του μοριακού φαινότυπου παθολογικών κυττάρων από την έκφραση των αντίστοιχων φυσιολογικών, οδήγησε στην ανάπτυξη τεχνολογιών ανάλυσης ευρείας κλίμακας, όπως είναι η «γονιδιωματική» (επίπεδο μεταγραφώματος) και η «πρωτεωμική» ανάλυση. Η εφαρμογή των μεθόδων αυτών αποτέλεσαν ουσιαστική βοήθεια στην κατανόηση του τρόπου λειτουργίας όλων των (μικρο) οργανισμών, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*.

Η γονιδιωματική (μεταγραφωματική) και πρωτεωμική ανάλυση προάγουν την εξαγωγή επιστημονικών υποθέσεων/συμπερασμάτων, απορρέοντα από την αποκρυπτογράφηση της γονιδιακής και πρωτεϊνικής σφραγίδας συγκεκριμένου κυττάρου/οργανισμού, υπό καθορισμένες συνθήκες περιβάλλοντος. Ακολουθώντας τα αποτελέσματα αυτά ελέγχονται με τις «κλασσικές» μεθόδους μοριακής βιολογίας, γενετικής και βιοχημείας. Παράδειγμα αποτελεί ο δυνητικά αυξανόμενος αριθμός πρωτεϊνών που αποκαλύπτεται ότι διαθέτει πολλαπλή κυτταρική λειτουργία, ο προσδιορισμός των πρωτεϊνικών αλλοιώσεων σε επίπεδο DNA ή μετα-μεταφραστικό, το πλήθος αλλά και η πολυπλοκότητα των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, παρατηρήσεις που δεν ήταν εφικτές με τις μέχρι πρότινος «παραδοσιακές» προσεγγίσεις. Επιπλέον, η εκτίμηση του μεταγραφικού και μεταφραστικού προφίλ στα ανθρώπινα κύτταρα/οργανισμό αποτελεί ανεκτίμητο διαγνωστικό και ερευνητικό εργαλείο. Χάρη σε αυτά, επιτράπηκε η μαζική συλλογή /εξέταση πληροφοριών που αφορούν την ποσοτικοποίηση της γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης, την ταυτοποίηση και βαθύτερη κατανόηση μιας νόσου (βιολογικοί μηχανισμοί πολύπλοκων ή παθολογικών καταστάσεων), τον προσδιορισμό βιομαρτύρων και την ακριβέστερη ταξινόμηση και πρόγνωση, που κρίνονται απαραίτητες για την αποτελεσματικότερη διάγνωση και θεραπεία ασθενειών και κακοηθειών.

Η επίδραση που έχει ο συνδυασμός της γονιδιωματικής (μεταγραφωματικής) και πρωτεωμικής ανάλυσης στην ακαδημαϊκή έρευνα αντανakλάται στο διαρκώς αυξανόμενο ποσοστό επιστημονικών δημοσιεύσεων, σε όλο και περισσότερα ερευνητικά πεδία, ενώ μεγάλη και συχνή είναι η επιτυχής χρήση των δύο τεχνολογιών τα τελευταία χρόνια, από πολλές βιομηχανίες φαρμάκων και βιοτεχνολογικές εταιρείες. Σκοπός τέτοιων μελετών είναι η ανακάλυψη βιοδεικτών, δηλαδή μορίων-τελεστών διαφορετικών κυτταρικών καταστάσεων, που είναι σημαντικοί για τη διάγνωση/σταδιοποίηση/θεραπεία/πρόγνωση μιας ασθένειας, καθώς και η εξέλιξη/ανάπτυξη νέων φαρμάκων και μοριακών διαγνωστικών τεχνικών. Είναι

σαφές, ότι το μέλλον της θεραπευτικής στρατηγικής προσέγγισης που θα επικρατήσει, θα βασιστεί στην ανάλυση της γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης σε απόκριση στα διάφορα αντι-καρκινικά (και όχι μόνο) φάρμακα, που θα εξατομικεύεται ανάλογα την περίπτωση.

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η μελέτη της κυτταρικής επίδρασης σε επίπεδο μεταγραφής και μετάφρασης γονιδίων, της επαγόμενης από τη Nutlin-3α σταθεροποίησης και ενεργοποίησης της wt p53 σε Hodgkin και μη-Hodgkin ανθρώπινα λεμφώματα.

Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα που προέκυψαν από την ανάλυση τόσο του γονιδιώματος, όσο και του πρωτεώματος σε *in vitro* συστήματα λεμφωμάτων.

Συνδυάζοντας μεθόδους γενωμικής και πρωτεωμικής στόχος είναι να πραγματοποιηθεί για πρώτη φορά, σε διαφορετικού ιστολογικού τύπου λεμφώματος, Hodgkin και μη-Hodgkin, B- και T-κυτταρικής προέλευσης, παράλληλη μελέτη όσον αφορά την ενεργοποίηση της p53, και την κυτταρική και θεραπευτική επίδραση της Nutlin-3α.

Τα αποτελέσματα της μελέτης μας θα συμβάλλουν στην πληρέστερη κατανόηση της ευεργετικής δράσης της Nutlin-3α στα λεμφώματα, στην ταυτοποίηση νέων p53-εξαρτώμενων μηχανισμών που εμπλέκονται στην αιτιολογία και παθογένεση των λεμφωμάτων (ποιοτικά και ποσοτικά) και στην ενίσχυση ανάδειξης νέας, στοχευμένης μη-γενετοξικής θεραπείας στα νεοπλάσματα αυτά.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Οργανολογία

Για την εφαρμογή των απαιτούμενων τεχνικών, διατέθηκαν τα κάτωθι όργανα:

- pHμετρο (Jenway 3510) για τις μετρήσεις του pH των διαλυμάτων
 - Φασματοφωτόμετρο (Thermo Scientific, Multiscan Spectrum), για τον προσδιορισμό πρωτεϊνικής συγκέντρωσης, όπου οι απορροφήσεις των δειγμάτων στην περιοχή του ορατού φάσματος (595nm) μετρήθηκαν σε UV/Vis
 - Επωαστικός κλίβανος CO₂
 - Θάλαμος κάθετης νηματοειδούς ροής αέρα (Laminar Air Flow)
 - Μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης τύπου
 - Κυτταρόμετρο ροής (Beckman Coulter)
 - Αιμοκυτταρόμετρο τύπου Neubauer, με βάθος θαλάμου 0.1mm (Marienfeld)
 - Φυγόκεντρος (Hermle, Labnet)
 - Δοχείο υγρού αζώτου, τύπου
 - Συσκευή ηλεκτροφόρησης (Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell)
 - Διασπαστή κυττάρων με υπερήχους
 - Συστήματα Υγρής Χρωματογραφίας νανο-ροής (nano Liquid Chromatography, nLC) συνδεδεμένη σε σειρά με Φασματόμετρο Μάζας (ESI-MS/MS):
1. Esquire HCT ion trap (Bruker Daltonics) συνδεδεμένο με ένα σύστημα Ultimate 3000 LC (Dionex-LC Packings)
 2. LTQ-Orbitrap XL συνδεδεμένο με ένα Easy nLC (Thermo Scientific), και
 3. Orbitrap Fusion συνδεδεμένο με ένα σύστημα Ultimate 3000 nano RSLC (Thermo Scientific).

2.1.1 Κυτταροκαλλιέργειες

Χρήσιμοι ορισμοί

Κυτταροκαλλιέργεια (cell culture), ορίζεται η ανάπτυξη ή η διατήρηση κυττάρων για χρονικό διάστημα άνω των 24 ωρών, ανάλογα τις συνθήκες και το κυτταρικό είδος.

Κυτταρικές σειρές ορίζονται οι καλλιέργειες κυττάρων που είναι πρακτικά αθάνατα (ανακαλλιεργούνται για απεριόριστο αριθμό γενεών).

Οι κυτταροκαλλιέργειες εφαρμόστηκαν σύμφωνα με τους κανόνες χρήσης και καλλιέργειας κυτταρικών σειρών, σε αυστηρά άσηπτες συνθήκες. Όλα τα υλικά, τα θρεπτικά μέσα και τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν

αποστειρωμένα. Τα χημικά διαλύματα παρασκευάστηκαν σε δις απιονισμένο νερό (ddH₂O) και μαζί με τα υαλικά αποστειρώνονταν σε αυτόκαυστο, Autoclave 760. Ο χειρισμός των κυτταροκαλλιιεργειών έγινε σε θάλαμο κάθετης νηματοειδούς ροής άσηπτες συνθήκες (*Laminar Air Flow*), που αποστειρώνεται πριν και μετά από κάθε χρήση με UV ακτινοβολία για 30 λεπτά. Κατά την παραμονή στο θάλαμο, γινόταν παράλληλα εφαρμογή απολύμανσης με αιθανόλη 70%. Τα κύτταρα καλλιιεργήθηκαν σε φλάσκες των 25 και 75 cm, επώαστηκαν σε κλίβανο, σε περιβάλλον 37°C, υγρή ατμόσφαιρα αέρος 95% και ροή CO₂ 5%, για τη διατήρηση του pH στο θρεπτικό υλικό της καλλιιεργειας.



Εικόνα 1: Απεικόνιση φλάσκας 75 cm.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν, αναπτύχθηκαν σε καλλιιεργητικά μέσα μέχρις ότου να αποκτήσουμε τον επιθυμητό αριθμό κυττάρων για την επιτέλεση του εκάστοτε πειράματος. Κατά τη διεκπεραίωση της παρούσης εργασίας, καθορίστηκαν οι ιδανικές συνθήκες διεξαγωγής των κυτταρικών καλλιιεργειών των διαφορετικών λεμφωκυτταρικών σειρών μελέτης και διατηρήθηκαν σταθερές παράμετροι, μέχρι το πέρας της. Τα προς καλλιιεργεια κύτταρα προέρχονταν από παγωμένα φιαλίδια της εκάστοτε κυτταρικής σειράς που είχαν αποθηκευτεί σε υγρό άζωτο. Τα κύτταρα παρέμεναν σε υγρή καλλιιεργεια το πολύ για 10 -12 ημέρες, ανάλογα τον κυτταρικό τύπο. Οι κυτταροκαλλιιεργειες ελέγχονταν καθημερινά για το χρώμα, τη διαύγεια του καλλιιεργητικού μέσου, τη μορφολογία και τον πληθυσμό των κυττάρων. Οι αλλαγές του καλλιιεργητικού υλικού γίνονταν κάθε 1-2 μέρες. Στη συνέχεια, και εφόσον είχε επιτευχθεί το επιθυμητό επίπεδο πληθυσμού και κυτταρικής βιωσιμότητας, ακολουθούσε η συλλογή του κυτταρικού ιζήματος, με σκοπό την ανακαλλιιεργεια, την κατάψυξη των κυττάρων ή την περαιτέρω ανάλυση των δειγμάτων (απομόνωση του RNA, του πρωτεϊνικού τους εκχυλίσματος).

2.1.2 Θρεπτικά μέσα

Όλες οι κυτταρικές σειρές αναπτύχθηκαν σε συγκέντρωση $10^6/ml$, σε συγκεκριμένο καλλιεργητικό θρεπτικό μέσο, για τη διασφάλιση της επιβίωσης και της ομαλής ανάπτυξής τους, σε καθορισμένο pH και θερμοκρασία. Για την αποφυγή επιμολύνσεων, μετά την παρασκευή του, ακολουθούσε τοποθέτησή του σε falcon των 50ml, στους $4^{\circ}C$. Για την παρασκευή πλήρους θρεπτικού υλικού χρειάστηκε η ανάμειξη των παρακάτω συστατικών:

- 1) RPMI 1640 καλλιεργητικό μέσο αμινοξέων και βιταμινών
- 2) 1% γλουταμινικό οξύ (+ glutamax, Gibco)
- 3) 10% εμβρυικό ορό βοδιού (Fetal Bovine Serum, (FBS), Invitrogen Corporation)
- 4) 1% διάλυμα αντιβιοτικών στρεπτομυκίνης-πενικιλίνης

Το γλουταμικό οξύ συγκαταλέγεται στα αμινοξέα που είναι απαραίτητα στοιχεία του μεταβολισμού και χρησιμοποιείται βοηθητικά ως πηγή ενέργειας και άνθρακα. Το FBS είναι ένα διάλυμα που περιέχει χρήσιμα συστατικά για την κυτταρική ανάπτυξη (growth factors). Πριν χρησιμοποιηθεί στην ετοιμασία του θρεπτικού, μεταφέρεται στους $56^{\circ}C$ για 30 λεπτά, με σκοπό τη θερμική απενεργοποίησή του (υδατόλουτρο) και ακολούθως αποθηκεύεται στους $-20^{\circ}C$. Η διαδικασία αυτή κρίνεται απαραίτητη για να εξασφαλιστεί η καταστροφή των πρωτεϊνών συμπληρώματος (προϊόντα ανοσοαπόκρισης) και του μυκοπλάσματος. Τέλος, αναφορικά με τα αντιβιοτικά, η στρεπτομυκίνη δρα αναστέλλοντας την πρωτεϊνοσύνθεση στα βακτήρια Gram+, ενώ η πενικιλίνη δρα αναστέλλοντας τη δημιουργία βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος.

Στη συνέχεια του κειμένου, οποιαδήποτε αναφορά σε θρεπτικά υλικά κυτταροκαλλιεργείων, θα παραπέμπει σε θρεπτικά της ανωτέρω σύστασης. Οποιαδήποτε τροποποίηση θα αναφέρεται.

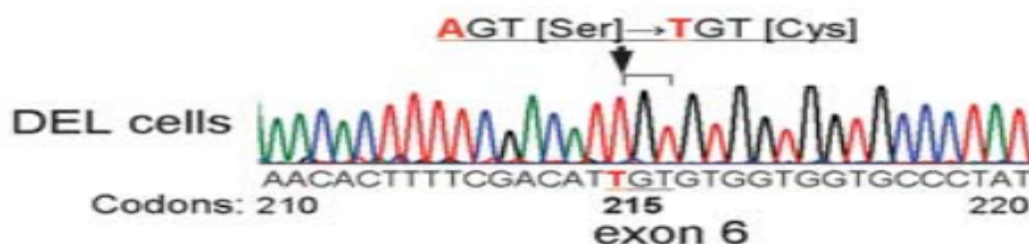
2.1.3 Κυτταρικές σειρές και φαρμακευτικές δοκιμασίες

Το *in vitro* σύστημα μελέτης περιλάμβανε έξι κυτταρικές σειρές, από τρία διαφορετικά είδη λεμφωμάτων: το λέμφωμα Hodgkin (HL), και δύο μη Hodgkin λεμφώματα (NHL).

Πίνακας 1: Λεπτομερής απεικόνιση των κυτταρικών σειρών ανθρώπινου λεμφώματος που χρησιμοποιήθηκαν, πριν και μετά τη θεραπεία με Nutlin-3A.

Τύποι Ανθρώπινου Λεμφώματος		# Πειράματος	# Διγίματος	Κυτταρικές σειρές	
HL		1	1	MDA-V <u>control</u>	
			2	MDA-V <u>Nutlin</u>	
		2	3	KM-H2 <u>control</u>	
			4	KM-H2 <u>Nutlin</u>	
NHL		3	5	SP53 <u>control</u>	
			6	SP53 <u>Nutlin</u>	
		4	7	JMP-1 <u>control</u>	
			8	JMP-1 <u>Nutlin</u>	
		ALCL	5	9	SUP-M2 <u>control</u>
				10	SUP-M2 <u>Nutlin</u>
			6	11	DEL (Dr Amin) <u>control</u>
				12	DEL (Dr Amin) <u>Nutlin</u>

Στα τελευταία συνπεριλήφθηκαν ένα κλινικά επιθετικό λέμφωμα Β-κυτταρικής προέλευσης, το λέμφωμα του Μανδύα (MCL), και ένα υψηλής κακοηθείας λέμφωμα Τ-κυτταρικής προέλευσης, το Αναπλαστικό Λέμφωμα από Μεγάλα Κύτταρα (ALCL). Ως κυτταρικό σύστημα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε κυτταρική σειρά ενός από τους εξεταζόμενους τύπους λεμφώματος, οι οποία έφερε γνωστή μεταλλαγή του γονιδίου *p53* (KM-H2). Όλες οι υπό μελέτη κυτταρικές σειρές είχαν ήδη ελεγχθεί με μεθόδους αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και αυτόματης ανάλυσης αποκωδικοποίησης του DNA (direct sequencing), και είχε διαπιστωθεί ότι το γονίδιο *p53* δεν εμφανίζει μεταλλαγή ή απώλεια, συνεπώς είναι λειτουργικό. Εξαιρέση σε αυτό αποτέλεσαν τα κύτταρα DEL, (ALCL), που βρέθηκαν ότι φέρουν μια παρερμηνεύσιμη μεταλλαγή στο κωδικόνιο 215 του 6 εξωνίου, στην περιοχή του *p53* όπου δεσμεύεται το DNA (Εικόνα 2). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, πρόκειται για μια μεταλλαγή που χαρακτηρίζεται ως «μερικώς λειτουργική», καθώς διατηρεί κατάλοιπα της δραστικότητας δια-ενεργοποίησης της *p53* (*p53* transactivation activity) για ποικίλα γονίδια-στόχους του *p53*.



Εικόνα 2: Απεικόνιση της αυτόματης αποκωδικοποίησης της αλληλουχίας του cDNA της DEL κυτταρικής σειράς (DNA sequencing)

Αναλυτικότερα, χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες λεμφωκυτταρικές σειρές:

- Κλασσικό λέμφωμα Hodgkin (HL): *MDA-V, KM-H2*
- Λέμφωμα του Μανδύα (MCL): *SP53, JMP-1*
- Αναπλαστικό Λέμφωμα από Μεγάλα Κύτταρα (ALCL), ALK-θετικό: *SUP-M2, DEL*

Οι σειρές προσφέρθηκαν ευγενικά από εργαστήρια του University of Texas MD Anderson Cancer Center (Houston, ΗΠΑ) και περιγράφονται αναλυτικότερα παρακάτω:

MDA-V: Πρόκειται για κλασσικό λέμφωμα του Hodgkin (cHL) B-κυτταρικής προέλευσης. Δημιουργήθηκε από λεμφαδένες ενός ασθενούς, ο οποίος είχε διαγνωστεί με cHL σταδίου I, ιστολογικού τύπου «Οζώδους Σκλήρυνσης».

KM-H2: Πρόκειται για κλασσικό λέμφωμα του Hodgkin (cHL) B-κυτταρικής προέλευσης. Προήλθε από λεμφαδένες 32χρονου άντρα, που διαγνώστηκε ότι νοσεί από cHL σταδίου IV, ιστολογικού τύπου «Μικτής Κυτταροβριθείας».

SP53: Πρόκειται για κυτταρική σειρά λεμφώματος του μη-Hodgkin (NHL) B-κυτταρικής προέλευσης. Δημιουργήθηκε από περιφερειακό αίμα 58χρονης ασθενούς ενδιάμεσου λεμφωκυτταρικού λεμφώματος, που παρουσίασε λευχαιμική εξέλιξη και ήταν αρνητική για το ιικό πυρηνικό αντιγόνο EBNA (Epstein Barr virus nuclear antigen).

JMP-1 (M-1): Πρόκειται για μη-Hodgkin λέμφωμα (NHL) B-κυτταρικής προέλευσης.

SUP-M2: Πρόκειται για μη-Hodgkin λέμφωμα (NHL) T-κυτταρικής προέλευσης. Είναι φορέας της διαμετάθεσης t(2;5) που οδηγεί στη δημιουργία του μεταλλαγμένου γονιδίου NPM-ALK και είναι CD30+. Πρόκειται για κύτταρα στρογγυλά, που αυξάνονται είτε μεμονωμένα, είτε σε μικρές συγκεντρώσεις (σωρούς). Η εν λόγω κυτταροσειρά προήλθε από εγκεφαλονωτιαίο υγρό ενός 5χρονου κοριτσιού που θεωρείτο ότι έπασχε από ανεξέλεγκτη, «Κακοήθη Ιστοκυττάρωση».

DEL: Πρόκειται για μη-Hodgkin λέμφωμα (NHL) T-κυτταρικής προέλευσης. Τα κύτταρα φέρουν την κρυπτική διαμετάθεση t(2;5) NPM-ALK, είναι κυρίως

πολυγωνικά, ενίοτε και στρογγυλά, που αυξάνονται σε συσσωματώματα (σωρούς). Η κυτταρική σειρά προέκυψε από υπεζωκοτικό υγρό 12χρονου αγοριού οiu διαγνώσθηκε με «Κακοήθη Ιστοκύττωση» (Κακοήθη Ιστοκυττάρωση) το 1987.

Οι εκλεκτικοί αναστολείς 1) της MDM2 (Nutlin-3A) 2) της HSP90 (17-AAG) και της FAK (διαλυμένοι στον οργανικό διαλύτη DMSO) αγοράστηκαν από την εταιρεία Cayman. Οι υπό μελέτη κυτταρικές σειρές υπέστησαν φαρμακευτική επεξεργασία με τους άνωθεν αναστολείς σε αυξανόμενες τιμές συγκεντρώσεων, όπως αυτές περιγράφονται στις εικόνες των αποτελεσμάτων. Τα χρονικά σημεία επώασης των κυτταρικών σειρών με nutlin-3a και τους διάφορους αντινεοπλαστικούς παράγοντες επελέγησαν σύμφωνα με προηγούμενες δημοσιευμένες μελέτες (της δικιάς μας αλλά και άλλων ομάδων) ώστε να διερευνηθεί η μεταξύ τους αλληλεπίδραση.

2.1.4 (Ανα) καλλιέργεια κυττάρων

Αρχικά γινόταν παρατήρηση της φλάσκας σε μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεως. Η εκτίμηση της θέσης, τους σχήματος, της μορφολογίας και της συγκέντρωσης των κυττάρων, καθόριζε την πραγμάτωση ή όχι νέας ανακαλλιέργειας (split). Η (ανα) καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε όταν ο αριθμός των κυττάρων (10⁶/ml) και η βιωσιμότητά τους έφτανε σε υψηλά επίπεδα (>88-90).

Πειραματική διαδικασία

- 1) Τοποθέτηση θρεπτικού σε υδατόλουτρο (37°C)
- 2) Συλλογή κυττάρων από τη φλάσκα καλλιέργειας
- 3) Μεταφορά του κυτταρικού εναιωρήματος σε falcon των 15 ml
- 4) Φύλαξη μικρής ποσότητας κυτταρικού διαλύματος (~10 μl) για μέτρηση των ζωντανών κυττάρων ανά καλλιέργεια, με πλάκα Neubauer στο μικροσκόπιο.
- 5) Φυγοκέντρηση στις 1200 στροφές για 5 λεπτά
- 6) Απομάκρυνση υπερκείμενου

7) Επαναραίωση του κυτταρικού ιζήματος με προσθήκη φρέσκου διαλύματος θρεπτικού υλικού ανάλογης ποσότητας, ώστε 1 ml καλλιέργειας να αντιστοιχεί σε 10^6 κύτταρα *

8) Μεταφορά κυττάρων σε φλάσκα καλλιέργειας και επωαστικό κλίβανο

**Βάσει της μέτρησης βιώσιμων κυττάρων υπολογίζεται η ποσότητα επαναδιάλυσης του θρεπτικού μέσου του ιζήματος των κυττάρων μετά τη φυγοκέντρηση.*

2.1.5 Διατήρηση - Κατάψυξη κυττάρων

Τα κύτταρα αποθηκεύτηκαν σε υγρό άζωτο (σε θερμοκρασίες μεταξύ -195°C και -210°C), προκειμένου να υπάρχουν διαθέσιμα φιαλίδια κατεψυγμένων κυττάρων για μελλοντικά πειράματα. Η επιτυχής διατήρηση των κυττάρων για μεγάλο χρονικό διάστημα βασίζεται στην καλή μεταβολική τους κατάσταση πριν την ψύξη (επιλογή κύτταρων σε λογαριθμική φάση ανάπτυξης), καθώς και στη σταδιακή τους ψύξη (-20°C για 15 λεπτά και μετά στους -80°C). Ο σχηματισμός κρυστάλλων πάγου στο περιβάλλον μέσο αντί του εσωτερικού των κυττάρων και η ελαχιστοποίηση της απώλειας νερού επιτυγχάνεται με την κρυοπροστατευτική δράση του διμεθυλο-σουλφοξειδίου DMSO (Dimethyl Sulfoxide). Αντίθετα, το DMSO είναι ιδιαίτερα τοξικό για τα κύτταρα σε θερμοκρασία δωματίου, συνεπώς συνίσταται η τελική συγκέντρωσή του να μην υπερβαίνει το 20%, ενώ επιβάλλονται γρήγορες κινήσεις χειρισμού. Η ποσότητα κυττάρων προς ψύξη κυμάνθηκε μεταξύ $6-10 \times 10^6$ κύτταρα / κρυοφιαλίδιο.

Διάλυμα ψύξης:

RPMI 70%

FBS 20%

DMSO 10%

Πειραματική διαδικασία

1) Ακολουθήθηκαν τα βήματα κυτταρικής συλλογής και επεξεργασίας, όπως αυτά περιγράφονται αναλυτικά παραπάνω (ανακαλλιέργεια, 1→7).

2) Προετοιμασία των κρυοφιαλιδίων (cryovials):

σημείωση κυτταρικού τύπου, ημερομηνία ψύξης, αριθμό κυττάρων, κυτταρική γενιά μετά το ξεπάγωμα.

3) Φυγοκέντρηση στις 1200 στροφές για 5 λεπτά

4) Απομάκρυνση υπερκειμένου

5) Επαναραίωση του κυτταρικού ιζήματος σε 1.5 ml διάλυμα ψύξης και γρήγορη ανάδευση για ομοιογενή κατανομή του

6) Τοποθέτηση κρυοφιαλιδίων σε συσκευή με ισοπροπανόλη, κατάλληλη για την επίτευξη σταδιακής και ελεγχόμενης ψύξης με ρυθμό $-1 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ και μεταφορά τους στους $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ μέχρι τη (άμεση) φύλαξή τους σε δοχείο υγρού αζώτου

2.1.6 Απόψυξη κυττάρων-Έναρξη κυτταροκαλλιέργειας

Η επαναφορά των κυττάρων σε θερμοκρασία καλλιέργειας, απαιτεί γρήγορη απόψυξη, προκειμένου να αμβλυνθεί, κατά το δυνατόν, η επιζήμια τήξη κρυστάλλων πάγου και η έκθεσή τους στην τοξικότητα του DMSO (>1%=κυτταροτοξικό).

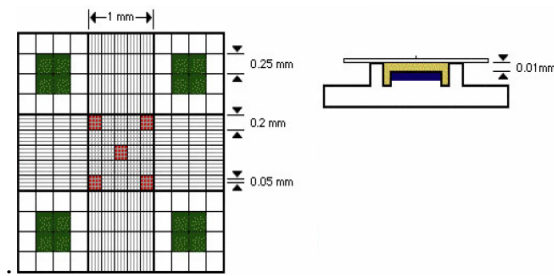
Πειραματική διαδικασία

- 1) Τοποθέτηση θρεπτικού σε υδατόλουτρο (37°C)
 - 2) Προσθήκη 8.5ml θρεπτικού σε falcon των 15 ml
 - 3) Μεταφορά κρυοφιαλιδίων από υγρό άζωτο σε υδατόλουτρο – ξεπάγωμα κυττάρων με γρήγορη ανάδευση για 2-3 λεπτά
 - 4) Μεταφορά του κυτταρικού διαλύματος (1.5 ml) στα 8.5ml θρεπτικού μέσου και γρήγορη ανάμειξη.
- Στόχος είναι η μετατροπή της συγκέντρωσης του DMSO σε μη κυτταροτοξική (10%→1%)
- 5) Φύλαξη μικρής ποσότητας κυτταρικού διαλύματος (~10 μl) και μικροσκόπηση των κυττάρων με αιμοκυτταρομετρική πλάκα Neubauer, για τον ακριβή αριθμητικό προσδιορισμό τους ανά καλλιέργεια
 - 6) Φυγοκέντρηση στις 1200 στροφές για 5 λεπτά
 - 7) Απομάκρυνση υπερκειμένου
 - 8) Επανααραίωση του κυτταρικού ιζήματος με προσθήκη φρέσκου διαλύματος θρεπτικού υλικού και συνέχιση της καλλιέργειας, ακολουθώντας την περιγραφή της παραγράφου (2.3.5)

2.2 Μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων (Trypan Blue Dye Exclusion Test)

Η μέτρηση βιωσιμότητας των κυττάρων έγινε χρησιμοποιώντας ένα αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Neubauer) και τη χρωστική κυανό του τρυπανίου (Trypan Blue, Sigma). Πρόκειται για μια μέθοδο που βασίζεται στη δειγματοληπτική μέτρηση του αριθμού των κυττάρων πάνω σε μια βαθμονομημένη επιφάνεια και την αναγωγή των αποτελεσμάτων σε αριθμό κυττάρων ανά ml.

Το αιμοκυτταρόμετρο είναι μια διαβαθμισμένη, τροποποιημένης κατασκευής αντικειμενοφόρος πλάκα, με διαγραμμισμένες περιοχές που συνθέτουν ένα τετραγωνισμένο πλέγμα. Το πλέγμα αποτελείται από 9 μεγάλα τετράγωνα μήκους πλευράς 1 mm και υποδιαίρεσεις αυτών που διευκολύνουν τη μέτρηση των κυττάρων. Ο όγκος του δείγματος που θα καλύπτει ένα από τα 9 τετράγωνα είναι 0,1mm (1,0mm² x 0,1mm) ή 1 x 10⁻⁴.



Εικόνα 3: Αιμοκυτταρόμετρο σε κάτοψη και διατομή

Το κυτταρικό αιώρημα προς μέτρηση αναμείχθηκε με ίση ποσότητα χρωστικής και ακολούθησε μικροσκοπική μέτρηση των ζωντανών κυττάρων ανά καλλιέργεια. Τα ζωντανά κύτταρα, και κύτταρα σε πρώιμο στάδιο απόπτωσης φαίνονταν διαυγή (η χρωστική δεν απορροφάται), ενώ τα νεκρά κύτταρα, διαθέτοντας διαπερατή μεμβράνη, παρουσιάζονταν βαμμένα μπλε.

Ο κυτταρικός αριθμός κάθε δείγματος (καλλιέργειας), μετρήθηκε σε τέσσερα διαφορετικά, ανεξάρτητα οπτικά πεδία. Υπολογίστηκε ο μέσος όρος των τιμών και η συγκέντρωση των κυττάρων (ζωντανών και νεκρών), λαμβάνοντας υπόψιν κάθε φορά την αραιώση που χρησιμοποιήθηκε με το διάλυμα της χρωστικής. Η κάθε μέτρηση έγινε τρεις φορές και οι τιμές που χρησιμοποιήθηκαν αντιστοιχούν στο μέσο όρο των μετρηθέντων τιμών.

Η πειραματική διαδικασία που εφαρμόστηκε ήταν:



Εικόνα 4: Τοποθέτηση βιώσιμων κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο

Πειραματική διαδικασία

- 1) Συλλογή κυτταρικού περιεχομένου από φλάσκα καλλιέργειας (βλ. παράγραφο 2.1.4)
- 2) Φύλαξη 10 μl κυτταρικού διαλύματος
- 3) Ανάμειξη των 10 μl κυτταρικού διαλύματος με 10 μl διαλύματος χρωστικής σε φιαλίδιο (αραιώση 1:1)

4) Τοποθέτηση σταγόνας του άνωθεν μίγματος στη θέση εισαγωγής δείγματος του αιμοκυτταρόμετρου

5) Μέτρηση βιώσιμων κυττάρων με τη βοήθεια μικροσκοπίου

Από τον αριθμό των κυττάρων που έχουν βαφτεί κυανά λόγω εισόδου της χρωστικής, υπολογίζεται το ποσοστό βιωσιμότητας και η συγκέντρωση των κυττάρων στην μονάδα του όγκου σύμφωνα με τις σχέσεις:

% βιωσιμότητας = $100 \times (\text{Αριθμός ζωντανών κυττάρων} / \text{Αριθμός ζωντανών \& νεκρών κυττάρων})$

2.2.1 Μέτρηση της συγκέντρωσης των κυττάρων

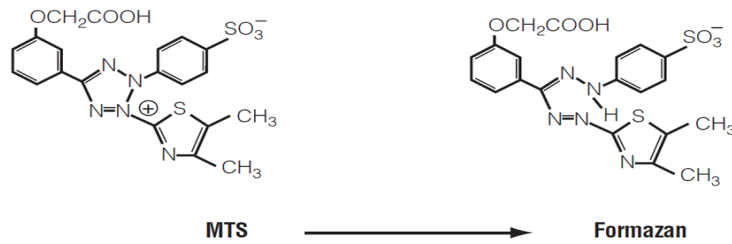
Παράλληλα με τη μέτρηση βιωσιμότητας, πραγματοποιήθηκε μέτρηση συγκέντρωσης (πολλαπλασιασμού) των κυττάρων, σύμφωνα με τον τύπο:

Συγκέντρωση κυττάρων/ml = Αριθμός ζωντανών κυττάρων x αραιώση χρωστικής x 10^4 .

Ο πολλαπλασιαστής 10^4 προκύπτει από τις διαστάσεις της πλάκας Neubauer.

2.2.2 Μέτρηση μεταβολικής ενεργότητας πληθυσμού κυττάρων με MTT

Η συνολική αύξηση των υπό δοκιμασία κυττάρων προσδιορίστηκε με την εφαρμογή της χρωματικής μεθόδου MTT (MTT colometric assay, Roche Applied Science, Germany). Η συγκεκριμένη τεχνική βασίζεται στη μετατροπή των (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide αλάτων τετραζολίου, MTT, σε αδιάλυτα παράγωγα φορμαζάνης. Το κίτρινο χρώμα του MTT οξειδώνεται από μεταβολικά ενεργές αφυδρογονάσες μιτοχονδρίων ζωντανών κυττάρων, με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται στα μιτοχόνδρια υγιών κυττάρων κρυσταλλοί φορμαζάνης κυανού χρώματος. Συνεπώς, η συγκέντρωση κρυστάλλων φορμαζάνης είναι απευθείας ανάλογη του αριθμού βιώσιμων κυττάρων, επιτρέποντας την εκτίμηση του ρυθμού του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Το προϊόν της αντίδρασης διαλυτοποιείται με την προσθήκη κατάλληλου οργανικού διαλύτη (10% SDS σε 0,01M HCL), και το χρώμα που παράγεται υπολογίζεται φωτομετρικά (οπτική απορρόφηση). Ο % κατά προσέγγιση ρυθμός πολλαπλασιασμού εκτιμήθηκε σε προκαθορισμένους χρόνους από την έναρξη των χειρισμών, όπως αναφέρεται αναλυτικά στα αποτελέσματα, με την εφαρμογή του αντιδραστηρίου σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αναλυτικότερα:



Εικόνα 5: Χημικές δομές MTT τετραζολίου και του προϊόντος του

Πειραματική διαδικασία

- 1) Τοποθέτηση 100 μl κάθε δείγματος με 10 μl MTT αντιδραστηρίου σε συστοιχίες των 96 θέσεων. Για στατιστικούς λόγους, όλα τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε τριπλέτες.
- 2) Επώαση των δειγμάτων στον επωαστή (37 °C, 5% CO₂) για 4-6 ώρες, με περιοδικό έλεγχο κάτω από ανάστροφο μικροσκόπιο για τη δημιουργία ιζήματος
- 3) Προσθήκη 100μl αντιδραστηρίου διαλυτοποίησης ανά θέση και επώαση ο/η.
- 4) Μέτρηση της συγκέντρωσης των σχηματισμένων κρυστάλλων φορμαζάνης σε φίλτρο απορρόφησης φωτός σε μήκος κύματος 550-600nm και μήκος κύματος αναφοράς στα 650nm, σε φωτόμετρο (Elisa reader) με το κατάλληλο πρόγραμμα (Biotek Instruments, Winooski, VT, ΗΠΑ)
- 4) Χρήση μέσου όρου των τριών μετρήσεων/δείγμα και τυπικής απόκλισης.

2.2.3 Ανίχνευση της κυτταρικής απόπτωσης με Annexin V

Η απόπτωση των λεμφωματικών κυττάρων μελετήθηκε με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής και του Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences Pharmingen, Germany) στις 24h, μετά από επώαση με Nutlin-3A (5μM), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Πειραματική διαδικασία

- 1) Συλλογή 5X10⁵ κυττάρων υπό δοκιμασία με Nutlin-3A
- 2) Πλύσιμο με κρύο (4°C) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffer Saline, PBS) με φυγοκέντρηση στα 1000rpm, 20°C, 5min - αφαίρεση υπερκείμενου
- 3) Επαναδιάλυση κυτταρικού ιζήματος σε 100μl (παγωμένου) ειδικού δεσμευτικού διαλύματος (1X Binding Buffer)
- 4) Διατήρηση δειγμάτων σε πάγο και επώαση για 15 λεπτά με 2 μl διαλύματος Annexin-V σε σκοτεινό περιβάλλον.

Διατήρηση δείγματος/μάρτυρα που περιλαμβάνει κύτταρα χωρίς καμία χρωστική

- 5) Προσθήκη 300μl ειδικού δεσμευτικού διαλύματος σε κάθε δείγμα
- 6) Φυγοκέντρηση στα 1000rpm, 20°C, 5min και αφαίρεση υπερκείμενου
- 7) Επαναδιάλυση κυτταρικών ιζημάτων σε 400μl ειδικού δεσμευτικού διαλύματος

8) Μεταφορά δειγμάτων στο δωμάτιο κυτταρομετρίας ροής. Προσθήκη, εκεί, 5 μl διαλύματος Propidium iodine (PI) / δείγμα, για 1 min

9) Άμεση ανάλυση κυττάρων για τη δέσμευση Annexin-V ή PI με κυτταρόμετρο ροής (εντός μισής ώρας)

10) Ανάλυση δεδομένων κάνοντας χρήση του λογισμικού System II, Beckman Coulter

Σε κάθε σειρά μετρήσεων χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι μάρτυρες θετικότητας σε Annexin-V και PI:

- κύτταρα χωρίς καμία χρωστική, ως μάρτυρα του πειράματος
- κύτταρα επωασμένα μόνο με Annexin-V, για τον κατάλληλο καθορισμό του ορίου θετικότητας για Annexin-V
- κύτταρα επωασμένα μόνο με PI, για τον κατάλληλο καθορισμό του ορίου θετικότητας για PI.

Το συνολικό ποσοστό των αποπτωτικών κυτάρων επί τοις % υπολογίστηκε ως εξής:

$(\text{Annexin-V}(+)\text{γεγονότα} / \text{Συνολικά γεγονότα}) \times 100$.

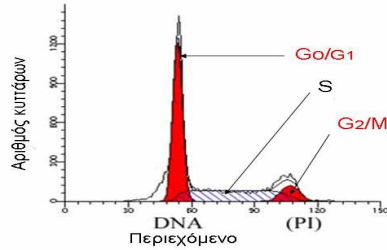
Τα Annexin-V(+)/γεγονότα περιλάμβαναν Annexin-V(+)/PI(-) (προαποπτωτικά κύτταρα) και Annexin-V(+)/PI(+) (τελικά αποπτωτικά κύτταρα). Όλα τα πειράματα επαναλήφθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές.

2.2.4 Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου

Η ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των λεμφωματικών κυττάρων μελέτης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής χρώση με ιωδιούχο προπίδιο (PI) και τη μέθοδο ενσωμάτωσης BrdU, 24hrs μετά από επώαση με Nutlin-3A (5μM), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Πειραματική διαδικασία

- 1) Συλλογή κυττάρων υπό δοκιμασία με Nutlin-3A
- 2) Μονιμοποίηση κυττάρων με 70-30% v/v διάλυμα αιθυλικής αλκοόλης-PBS σε θερμοκρασία 4°C για 12 ώρες
- 3) Πλύση με ρυθμιστικό διάλυμα PBS
- 4) Επώαση για 30 λεπτά στους 37°C με διάλυμα ιωδιούχου προπίδιου (PI) [50 μg/mL PI που περιείχαν 200 μονάδες/mL RNάση χωρίς παρουσία DNάσης σε PBS (pH 7.4); Roche Applied Science].
- 5) Προσδιορισμός περιεχόμενου DNA κάθε κυττάρου με τη χρήση κυτταρομέτρου (FACS Calibur, Becton-Dickinson)
- 6) Ανάλυση αποτελεσμάτων με το πρόγραμμα ModFit LT (Verity Software House) και σύμφωνα με την εικόνα που ακολουθεί (εικόνα 6):



Εικόνα 6: Αποτύπωση των φάσεων του κυτταρικού κύκλου. Τα τρία εμβαδά που διαγράφονται στο σχήμα αντιπροσωπεύουν τις φάσεις του κύκλου G₀/G₁, S και G₂/M, αντίστοιχα.

2.2.5 Απομόνωση πρωτεϊνικού εκχυλίσματος κυττάρων

Κύτταρα από πληθυσμούς κάθε κυτταρικής σειράς των υπό μελέτη ανθρώπινων λεμφωμάτων συλλέχθηκαν κατά την λογαριθμική φάση ανάπτυξης της εκατόστες καλλιέργειας, πριν και μετά την έναρξη των φαρμακευτικών χειρισμών.

Πειραματική διαδικασία

- 1) Φυγοκέντρηση 3×10^6 κυττάρων στις 1000 στροφές για 5 λεπτά
- 2) Απομάκρυνση υπερκειμένου & διατήρηση ιζήματος (άμεση χρήση ή φύλαξη στους -80°C)
- 3) Επαναραίωση ιζήματος σε 3 ml παγωμένου & αποστειρωμένου PBS
- 4) Τοποθετούμε στον πάγο
- 5) Φυγοκέντρηση στις 1000 στροφές για 5 λεπτά
- 6) Απομάκρυνση υπερκειμένου & διατήρηση ιζήματος
- 7) Προετοιμασία φιαλιδίων των 1,5 ml
- 8) Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος λύσης* (Lysis Buffer)
- 9) Επαναραίωση ιζήματος σε ποσότητα μείγματος ανάλογη της ποσότητας του ιζήματος (60-200 μl)
- 10) Μεταφορά διαλύματος στα φιαλίδια, γρήγορη ανάδευση
- 11) Επώαση σε αναδευτήρα στους 4°C , για 20 λεπτά.
- 12) Φυγοκέντρηση σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (4°C), στις 14000 στροφές για 15 λεπτά
- 13) Προετοιμασία νέων φιαλιδίων των 1,5 ml
- 14) Λήψη υπερκειμένου και μεταφορά του στα νέα φιαλίδια -τοποθέτηση σε πάγο (λήψη ποσότητας για Bradford/BCA assay)
- 15) (υπολειπόμενη ποσότητα) Φύλαξη στους -80°C

*Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (Lysis Buffer):

-Τοποθέτηση ταμπλέτας αναστολέα πρωτεασών (χωρίς EDTA) σε 7ml ρυθμιστικό διάλυμα κυτταρικής λύσης

i) που περιείχε 25 mM Hepes, 400 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 2 mM EDTA και 0,5% TritonX100 ή

ii) της Pierce (Pierce Cell-Lysis Buffer)

-Λήψη 2ml του άνωθεν μίγματος ρυθμιστικού διαλύματος κυτταρικής λύσης της Pierce και προσθήκη $\rightarrow 20 \mu\text{l}$ κοκτέιλ αναστολέων φωσφατασών 1

- (phosphatase inhibitors cocktail 1)
- 20μl κοκτέιλ αναστολέων φωσφατασών 2
- (phosphatase inhibitors cocktail 2)
- 6μl DDT (1mM)
- 2μl PMSF
- (100mM, 17.4mg σε 1ml ισοπροπανόλης)

2.2.6 Εκχύλιση με τη χρήση υπέρηχων (Sonication)

Η χρήση των υπέρηχων ως μεθόδου διάρρηξης κυττάρων επιτυγχάνεται με την εφαρμογή κυμάτων πίεσης που δημιουργούνται μέσα στο υδατικό διάλυμα από μια ειδική γεννήτρια υπέρηχων, τα οποία θραύουν τις πλασματικές μεμβράνες με αποτέλεσμα να απελευθερώνονται τα κυτταροπλασματικά συστατικά.

Πειραματική διαδικασία

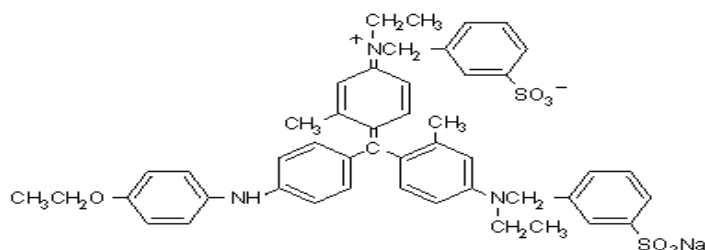
- 1) Διάσπαση κυττάρων με υπέρηχους (40% amplification, 3x13-15 sec με παύση 5 sec στα 90-100 Watt), σε πάγο, σκοτάδι και περιβάλλον N_2
- 2) Απομάκρυνση αδιάσπαστων κυττάρων καθώς και κυτταρικών θραυσμάτων, με φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 15 min στους 4°C.

2.2.7 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών

Ο προσδιορισμός της πρωτεϊνικής περιεκτικότητας κάθε δείγματος που αναλογούσε στην εκάστοτε λεμφωκυτταρική σειρά επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας τις μεθόδους Bradford και BCA. Η επιλογή χρήσης της εκάστοτε μεθόδου βασίστηκε στη συμβατότητα του αντιδραστηρίου Bradford/BCA με τις χημικές ενώσεις που απαρτίζουν το διάλυμα κυτταρικής λύσης, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

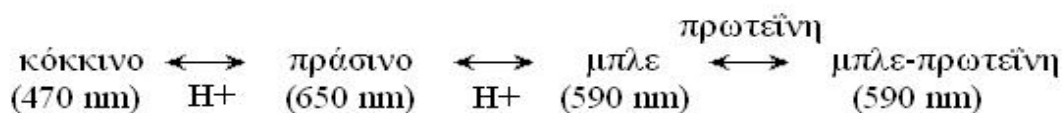
Μέθοδος Bradford

Η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών έγινε με τη μέθοδο Bradford (Bio-Rad Protein Assay), σε συμφωνία με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η μέθοδος Bradford είναι μια γρήγορη και ευαίσθητη ποσοτική τεχνική προσδιορισμού της ολικής συγκέντρωσης πρωτεϊνών σε βιολογικά δείγματα. Στηρίζεται στην ιδιότητα των πρωτεϊνών να αντιδρούν με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 σε όξινα υδατικά διαλύματα.



Εικόνα 7: Χημική δομή του Coomassie Brilliant Blue G-250

Η χρωστική συζευγνύεται γρήγορα (~2 min) και σταθερά (για ~60 min) με τις πρωτονιωμένες αμινοομάδες των αμινοξικών κατάλοιπων των πρωτεϊνών και κυρίως με την αργινίνη, λυσίνη και τα υδρόφοβα αμινοξικά κατάλοιπα. Με την πρόσδεση αυτή η χρωστική λαμβάνει τη μη πρωτονιωμένη μπλε μορφή της, με μετατοπισμένο μέγιστο απορρόφησης από τα 465 στα 595 nm.



Εικόνα 8: Οι τρεις μορφές της χρώσης Coomassie Brilliant Blue G-250: κατιονική (κόκκινη), ουδέτερη (πράσινη), ανιονική (μπλε). Πρόσδεση της χρωστικής με πρωτεΐνη οδηγεί την πρώτη στη μη πρωτονιωμένη μπλε μορφή της.

Η αύξηση της απορρόφησης είναι ανάλογη της ποσότητας της δεσμευμένης/ανιοντικής χρωστικής, συνεπώς και της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στο δείγμα. Ο προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford είναι λιγότερο ευαίσθητος στην επίδραση διαφόρων χημικών προσμίξεων στο δείγμα, με εξαίρεση τις υψηλές συγκεντρώσεις απορρυπαντικών.

Πειραματική διαδικασία

1) Αραίωση του έτοιμου αντιδραστηρίου Bradford 5x σε 1x με ddH₂O

Το αντιδραστήριο Bradford 5x, φυλάσσεται στους 4°C ή παρασκευάστηκε με διάλυση 100 mg Coomassie Blue G-250 σε 50 ml 95% αιθανόλη, προσθήκη 100 ml 85% (w/v) φωσφορικού οξέος H₂PO₄ και αραίωση σε 1 lt με H₂O

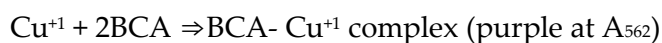
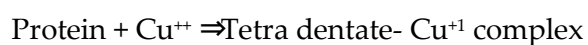
2) Προετοιμασία σε eppendorf τεσσάρων στάνταρ διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων BSA (0, 250, 500, 750, 1000 μg/mL), για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης (αλβουμίνη βοείου ορού, Bovine Serum Albumin, BSA)

- 3) Προσθήκη σε συστοιχίες των 96 θέσεων 2 μl προτύπου διαλύματος ή δείγματος* σε 200μl αντιδραστηρίου Bradford και ανάμειξη με αναδευτήρα (*κάθε δείγμα τοποθετήθηκε εις τριπλούν)
- 4) Μέτρηση των διαλυμάτων σε φωτόμετρο ρυθμισμένο σε μήκος κύματος 595 nm
- 5) Χρήση μέσου όρου των τριών μετρήσεων/δείγμα.

Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης προσδιορίστηκε με τη βοήθεια του γραμμικού τμήματος της πρότυπης καμπύλης, όπως αυτή προέκυψε χρησιμοποιώντας τις απορροφήσεις των γνωστών συγκεντρώσεων BSA ως μετρήσεις αναφοράς. Για την αποφυγή σφάλματος κατά τη φωτομέτρηση, φωτομετρήθηκε τυφλό δείγμα (blank) 200 μl καθαρού διαλύματος Bradford και 2μl ddH₂O. Η τιμή της απορρόφησης του τυφλού αφαιρέθηκε από τις τιμές απορρόφησης των δειγμάτων.

Μέθοδος BCA

Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης ποσοτικοποιήθηκε με το αντιδραστήριο BCA (bicinchoninic acid) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Pierce). Η ανάλυση με BCA στηρίζεται στην αρχή μεθόδου:



Οι πρωτεΐνες σε αλκαλικό περιβάλλον αντιδρούν με ιόντα χαλκού (Cu⁺⁺) και τα δισθενή ιόντα χαλκού ανάγονται σε μονοσθενή (Cu⁺¹). Τα Cu⁺¹ αντιδρούν με δύο μόρια BCA παράγοντας μια χρωμογόνο ένωση υψηλής οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 562nm και γραμμικότητας σε συγκεντρώσεις πρωτεΐνης εύρους φάσματος από 20μg/ml-2000μg/ml.

Πειραματική διαδικασία

- 1) Προετοιμασία του αντιδραστηρίου εργασίας BCA (working reagent, 1:50)

Το αντιδραστήριο εργασίας BCA παρασκευάζεται αναμειγνύοντας 1 μέρος BCA πρότυπου αντιδραστηρίου A με 49 μέρη BCA πρότυπου αντιδραστηρίου B.

- 2) Παρασκευή σε eppendorf έξι προτύπων διαλυμάτων αλβουμίνης σε γνωστό φάσμα συγκεντρώσεων (0, 250, 500, 750, 1000, 1500 and 2000 μg/mL), για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης.
- 3) Προσθήκη σε πολυπροπυλενικές συστοιχίες των 96 θέσεων 25 μl προτύπου διαλύματος ή δείγματος* προς ανάλυση σε 200μl αντιδραστηρίου BCA και ήπια ανάμειξη (*κάθε δείγμα τοποθετήθηκε εις τριπλούν)
- 4) Επώαση στους 37°C για 30 λεπτά

- 5) Φωτομέτρηση των διαλυμάτων σε μήκος κύματος 562 nm
- 6) Χρήση μέσου όρου των τριών μετρήσεων/δείγμα

Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης προσδιορίστηκε με τη βοήθεια του γραμμικού τμήματος της πρότυπης καμπύλης, όπως αυτή προέκυψε από τις απορροφήσεις των προτύπων διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων BSA. Για την αποφυγή σφάλματος κατά τη φωτομέτρηση, φωτομετρήθηκε τυφλό δείγμα (blank) 200 μl καθαρού διαλύματος BCA και 25μl ddH₂O. Η τιμή της απορρόφησης του τυφλού αφαιρέθηκε από τις τιμές απορρόφησης των δειγμάτων. Ποσότητα που αντιστοιχούσε σε 50 μg ολικής πρωτεΐνης αναλύθηκε ακολούθως σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 8%, 10% ή 12%.

2.2.8 Ανάλυση πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση μίας διάστασης (1-DE/SDS PAGE)

Οι πρωτεΐνες του δείγματος αναλύθηκαν ηλεκτροφορητικά σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, εμποτισμένα σε αποδιατακτικό διάλυμα sodium dodecyl sulfate (SDS PAGE / SDS polyacrylamide gel electrophoresis). Πρόκειται για την πιο αξιόπιστη μέθοδο διαχωρισμού και ανάλυσης πρωτεϊνικών δειγμάτων, κατά την οποία η διαφορετική θέση μετανάστευσης μιας πρωτεΐνης από το σημείο εκκίνησης οφείλεται στο μοριακό της μέγεθος. Η τεχνική αυτή παράλληλα δύναται να συνδυάζεται εύκολα και αποτελεσματικά και με άλλες τεχνικές π.χ. Western Blotting (WB), IEF, Mass Spectrometry (MS).

Το προς ανάλυση πρωτεϊνικό διάλυμα αναμειγνύεται με το ανιοντικό απορρυπαντικό SDS, το οποίο δεσμεύεται στις πρωτεΐνες, με αναλογία 1,4g ανά g πρωτεΐνης. Το SDS προκαλεί την αποδιάταξη της β'ταγούς και δ'ταγούς δομής τους και τους προσδίδει ενιαίο αρνητικό φορτίο, ελαχιστοποιώντας τις διαφορές των πρωτεϊνών ως προς το ηλεκτρικό τους φορτίο. Η επιπλέον χρήση αναγωγικών παραγόντων, όπως είναι η διθειοθρεϊτόλη (DTT) ή η β-μερκαπτοαιθανόλη, έχει ως αποτέλεσμα την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών ανάμεσα στις κυστεΐνες των πρωτεϊνών (S-S disulfide bonds to SH and SH). Η πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται με θέρμανση των πρωτεϊνικών δειγμάτων για 10 λεπτά στους 70°C, παρουσία των παραπάνω αποδιατακτικών παραγόντων.

Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου αποτελεί το χημικά αδρανές και διάφανο μέσο του πρωτεϊνικού διαχωρισμού, δημιουργώντας τρισδιάστατα πολυμερή πλέγματα (πόρους) σε μια ευρεία κλίμακα συγκεντρώσεων (3% → 30%). Η συγκέντρωση του πολυακρυλαμιδίου καθορίζει την διαχωριστική ικανότητα του πηκτώματος, δηλαδή, όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωσή του, τόσο καλύτερα (και γρηγορότερα) θα διαχωριστούν οι πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους (MB)

(π.χ. 10 ή 12 %). Αντίθετα, πρωτεΐνες μεγάλου ΜΒ διαχωρίζονται καλύτερα και συντομότερα σε αραιό πήκτωμα διαχωρισμού (π.χ. 6 ή 8 %). Στην SDS-PAGE επιλέγεται η δημιουργία πηκτώματος επιστοιβαξης (stacking gel) και πηκτώματος διαχωρισμού (resolving ή separation ή running gel), έναντι της κατασκευής ενός, με σταθερή συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου και ρυθμιστικού διαλύματος (buffer). Το πήκτωμα επιστοιβαξης έχει μικρότερη συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου και συνεπώς μεγαλύτερους πόρους από το πήκτωμα διαχωρισμού. Η διαφορετική συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου και ρυθμιστικού διαλύματος, επιτρέπει δείγματα με μεγάλους όγκους να συγκεντρωθούν στο πρώτο πήκτωμα (stacking gel) πριν εισέλθουν στο δεύτερο, όπου και θα διαχωριστούν. Με αυτόν τον τρόπο, διασφαλίζεται η καλύτερη ανάλυση του δείγματος, καθώς ξεκινάει να αναλύεται από το ίδιο σημείο. Όταν ασκηθεί τάση, οι αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες μετακινούνται από το αρνητικό προς το θετικό ηλεκτρόδιο με διαφορετικές ταχύτητες, δημιουργώντας το πρωτεϊνικό αποτύπωμα του εκάστοτε δείγματος υπό τη μορφή ζωνών. Η ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα είναι συνάρτηση του μοριακού τους βάρους, το οποίο συνήθως μετράται σε kDa.

Πειραματική διαδικασία

- 1) Διαμόρφωση ειδικής υάλινης μήτρας με τζαμάκια, μέσα στην οποία θα πραγματοποιηθεί ο πολυμερισμός πηκτωμάτων - πλύση με dH₂O
- 2) Κατασκευή πηκτώματος διαχωρισμού σύμφωνα με τον πίνακα των πηκτωμάτων επί τοις % και με βάση το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που θέλουμε να ανιχνεύσουμε.

Πίνακας 2: Σύσταση πηκτώματος διαχωρισμού.

ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ (ml)				
Συστατικά	Πυκνότητα			
	6%	8%	10%	12%
d.d. H ₂ O	2.6	2.3	1.9	1.6
30% acrylamide mix	1.0	1.3	1.7	2.0
1,5 M Tris (pH = 8.8)	1.3	1.3	1.3	1.3
10% SDS	0.05	0.05	0.05	0.05
10% ammonium orsulfate	0.05	0.05	0.05	0.05
TEMED	0.004	0.003	0.002	0.002

- 3) Ανάμειξη πηκτώματος διαχωρισμού, τοποθέτηση σε συσκευή ανάδευσης και κατόπιν μεταφορά του στα μήτρα πηκτώματος
- 4) Προσθήκη μικρής ποσότητας (~ 200-500 μ l) προπανόλης και κάλυψη του πηκτώματος. Η προπανόλη βοηθάει στο να απομακρυνθούν οι φυσαλίδες του αέρα από το πήκτωμα.
- 5) Αναμονή για πολυμερισμό του πηκτώματος διαχωρισμού (~10 λεπτά)
- 6) Κατασκευή πηκτώματος επιστοιβάξης 5% (πάντα παρασκευάζεται φρέσκο), σύμφωνα με τον πίνακα :

Πίνακας 3: Σύσταση πηκτώματος επιστοιβάξης.

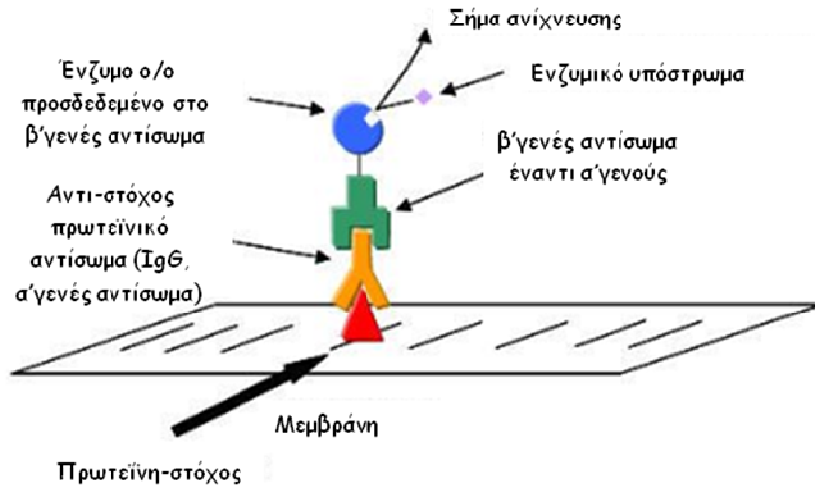
ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΕΠΙΣΤΟΙΒΑΞΗΣ	
(5 %, ml)	
d.d. H ₂ O	2.1
30% acrylamide mix	0.5
1,0 M Tris(pH = 6.8)	0.38
10% SDS	0.03
10% ammonium persulfate	0.03
TEMED	0.03

- 7) Ανάμειξη πηκτώματος επιστοιβάξης και ανάδευση
- 8) Απομάκρυνση προπανόλης πάνω από το πήκτωμα διαχωρισμού, καλό ξέπλυμα με ddH₂O και σκούπισμα στην άκρη με λίγο χαρτί
- 9) Πρόσθεση πηκτώματος επιστοιβάξης μέχρι πάνω και τοποθέτηση κατάλληλης ελαστικής μήτρας (χτενάκια), η οποία είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία φρεατίων επιθυμητού μεγέθους
(Αναμονή μέχρι το πέρας του πολυμερισμού του πηκτώματος επιστοιβάξης, ~20 λεπτά)
- 10) Προετοιμασία φιαλιδίων των 1,5 ml
- 11) Ανάμειξη ποσότητας δειγμάτων με το διάλυμα φόρτωσης (Loading Buffer, LB), σε συμφωνία με τη μέτρηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης των δειγμάτων προς ανάλυση που έχει προηγηθεί
- 12) Τοποθέτηση των δειγμάτων στους 70°C για 10 λεπτά, για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών
- 13) Τοποθέτηση πηκτώματος με υάλινη μήτρα στη συσκευή κατακόρυφης ηλεκτροφόρησης - πλύση με ddH₂O
- 14) Γέμισμα με διάλυμα διαχωρισμού (Running Buffer) 1X μέχρι πάνω, εξασφαλίζοντας στεγανοποίηση στο σύστημα – απομάκρυνση ελαστικής μήτρας
- 15) Σύντομη φυγοκέντρηση (spin down) των φιαλιδίων

- 16) Τοποθέτηση ~10 μl του μάρτυρα - δείκτη των μοριακών βαρών (marker) σε φρεάτιο πηκτώματος
- 17) Μεταφορά ποσότητας κάθε δείγματος σύμφωνα με τις μετρήσεις μας και σύμφωνα με την επιθυμητή σειρά
- 18) Ηλεκτροφόρηση με τη βοήθεια τροφοδοτικού συνεχούς ρεύματος, εφαρμόζοντας ομοιογενές ηλεκτρικό πεδίο σταθερής έντασης, 80 Volts
- 19) (μόλις το μέτωπο χρωστικής περάσει από το πήκτωμα επιστοίβαξης στο πήκτωμα διαχωρισμού) Προσαρμογή τάσης ρεύματος στα 120 Volts
- 20) Κλείσιμο συσκευής ηλεκτροφόρησης μόλις τα δείγματα φτάσουν στο κατώτερο άκρο του πηκτώματος διαχωρισμού
(χρόνος μεταφοράς= ανάλογος του μοριακού μεγέθους των πρωτεϊνών)
- 21) Απομάκρυνση του γυαλιού, αποκοπή με τη βοήθεια σπάτουλας του πηκτώματος, απόρριψη του τμήματος του πηκτώματος επιστοίβαξης και πλύση με ddH₂O.

2.2.9 Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Immunoblotting, WB)

Η Western – blott είναι μια τεχνική ανοσοχρώσης που χρησιμοποιείται συνήθως για την ανίχνευση της έκφρασης ή μη, επιλεγμένων πρωτεϊνών σε ένα πληθυσμό κυττάρων, ακινητοποιημένων σε αδρανή φίλτρα. Συνοπτικά, μετά τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακυλαμιδίου, ακολουθεί η ηλεκτρομεταφορά τους σε μεμβράνη PVDF (polyvinylidene difluoride) ή νιτροκυτταρίνης σε συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών. Η μεμβράνη χαρακτηρίζεται από τη μη ειδική δέσμευση των πρωτεϊνών, η οποία βασίζεται στις υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται κατά τη δημιουργία αλληλεπιδράσεων μεταξύ μεμβράνης και πρωτεϊνών. Μετά από την κάλυψη των κενών θέσεων της μεμβράνης σε ειδικό διάλυμα (blocking), οι εκτεθειμένες στη μεμβράνη πρωτεΐνες, δεσμεύονται με αντισώματα, ειδικά για τους εκάστοτε πρωτεϊνικούς στόχους επιλογής. Στη συνέχεια, η μεμβράνη επώαζεται με αντίσωμα που αναγνωρίζει την Fc περιοχή του πρώτου αντισώματος (α'γενές). Το δευτερογενές αντίσωμα (β'γενές) είναι συζευγμένο ομοιοπολικά με αλκαλική υπεροξειδάση (Horseradish Peroxidase). Η ανίχνευση του σήματος πραγματοποιείται με τη χρήση ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Enhanced ChemiLuminescence, ECL -αντιδραστήριο αποτελούμενο από H₂O₂ και λουμινόλη-). Το σύμπλοκο αντιγόνο-αντίσωμα παρουσία του υπεροξειδίου προκαλεί την οξείδωση της λουμινόλης και την επακόλουθη εκπομπή φωτός. Το εκπεμπόμενο φως του πρωτεϊνικού σήματος ανιχνεύεται από την αμαύρωση που προκαλεί η πρόσπτωσή του στο φωτογραφικό φιλμ.



Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου ανοσοαποτύπωσης κατά Western

Στη μελέτη που διεξήχθη, τα α'γενή & β'γενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

Πίνακας 4: Κατάλογος πρωτογενών αντισωμάτων για την τεχνική του WB.

Α'ΤΕΝΕΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ	ΖΩΟ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ
(p) mTOR	Cell signalling	κουνέλι
P70S6K	Cell signalling	κουνέλι
AMPKa	Cell signalling	κουνέλι
(p) S6	Cell signalling	κουνέλι
EIF4GI	Cell signaling	ποντίκι
EIF4GE	Cell signaling	κουνέλι
p21	Dako	κουνέλι

p53	Dako	ποντίκι
MDM2	Santa Cruz	ποντίκι
Hsp90	Cell signaling	κουνέλι
Hsp70	Cell signaling	κουνέλι
b- actin	Sigma	ποντίκι

Πίνακας 5: Κατάλογος δευτερογενών αντισωμάτων για την τεχνική του WB.

Β'ΤΕΝΕΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ/ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
Anti-rabbit antibody	Amersham (1:1000)
Anti-mouse antibody	Amersham (1:1000)

Ο υπολογισμός του πρωτεϊνικού μεγέθους υπολογίστηκε βάσει μεγέθους των πρωτεϊνών του μάρτυρα, όπως διαχωρίζονται κατά την ηλεκτροφόρηση. Η β-ακτίνη που ανιχνεύτηκε με μονοκλωνικό αντίσωμα χρησίμευσε ως πρωτεΐνη ελέγχου της ποσότητας και ακεραιότητας της ολικής πρωτεΐνης, η οποία απομονώθηκε σύμφωνα με τα ανωτέρω.

Πειραματική διαδικασία

1^η Ημέρα

Σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου αναλύθηκαν με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση 50 μg πρωτεΐνης (σύμφωνα με τα βήματα 1 →21 της παραγράφου 2.2.8).

- ✓ Πριν την ολοκλήρωση της ηλεκτροφορητικής ανάλυσης πραγματοποιήθηκε κόψιμο μεμβράνης (PVDF ή νιτροκυτταρίνης) και χαρτιών Wattman στις διαστάσεις του πηκτώματος διαχωρισμού και μαρκάρισμα μεμβράνης (αναγραφή ημ/νιας, αριθμό πηκτώματος)

- ✓ Μετά το πέρας της ηλεκτροφορητικής ανάλυσης, μετά τα βήματα 20/21 της παραγράφου 2.2.8, ακολούθησαν οι παρακάτω εμβαπτίσεις:

PVDF μεμβράνη

- 1 λεπτά σε 100% μεθανόλη
- 2 λεπτά σε ddH₂O
- 5 λεπτά σε διαλύμα μεταφοράς (Transfer Buffer, TB)

Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

- 5 λεπτά σε TB

Πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου

- 20 λεπτά σε TB

Χαρτί Wattman

- 5 λεπτά σε TB

- 22) Τοποθέτηση "χαρτιού Wattman – πήκτώματος - μεμβράνης - Wattman" μέσα σε κατακόρυφη συσκευή υγρής ηλεκτρομεταφοράς (BIORAD), αποκλείοντας φυσαλίδες αέρα, με προσανατολισμό μεμβράνης προς την άνοδο.
- 23) Μεταφορά στα 400 mA για ~1 ώρα, στους 4°C
- 24) Αφαίρεση μεμβράνης και ξέπλυμα σε PBS για 15 λεπτά στον αναδευτήρα
- 25) Επώαση μεμβράνης σε γάλα (5% σε PBS-Tween) για 20 λεπτά
- 26) Παρασκευή και κλείσιμο άγενούς αντισώματος σε γάλα ή BSA ανάλογα με τις οδηγίες του κατασκευαστή
- 27) Επώαση μεμβράνης σε αναδευτήρα στους 4°C, ο/η (ή σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 ώρες)

2^η Ημέρα

- 28) Απομάκρυνση άγενούς αντισώματος
- 29) Πλύση μεμβράνης (x2) σε PBS Tween για 15 λεπτά
- 30) Επώαση μεμβράνης σε β'γενές αντίσωμα (anti-**mouse** ή anti-**rabbit**, ανάλογα με τη φύση του άγενούς αντισώματος) σε αναδευτήρα, για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου
- 31) Πλύση μεμβράνης (x3) με PBS Tween, για 10 λεπτά
- 32) Επώαση μεμβράνης με διάλυμα ECL (BIORAD)
- 14) Πραγματοποίηση εκθέσεων σε κατάλληλους χρόνους πάνω σε φωτογραφικό φιλμ σε σκοτεινό θάλαμο και εμφάνιση
- 15) Πλύση μεμβράνης με κατάλληλο stripping buffer (10-20 λεπτά) και στη συνέχεια με PBS-Tween 0,1% (2x10 λεπτά) με σκοπό την επανάληψη διαδικασίας από το βήμα (25) της 1ης ημέρας, χρησιμοποιώντας άλλο άγενές αντίσωμα για την ανίχνευση της αντίστοιχης πρωτεΐνης ενδιαφέροντος.

2.2.10 Απομόνωση RNA από κύτταρα λεμφωματικών σειρών

Η απομόνωση RNA πραγματοποιείται εφαρμόζοντας πληθώρα διαφορετικών τεχνικών. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η Λόγω της υψηλής ευαισθησίας του RNA σε ριβονουκλεάσες που μπορούν να το καταστρέψουν (πέψουν), κρίνεται ιδιαίτερα σημαντικό να τηρούνται ειδικά μέτρα προφύλαξης καθ'όλη τη διάρκεια των σταδίων απομόνωσης του RNA (χρήση υπερχαθρών και αποστειρωμένων διαλυμάτων/υλικών, απαλλαγμένων από RNAάσες).

Πειραματική διαδικασία

Κυτταρική λύση

- 1) Συλλογή κυττάρων επιθυμητής συγκέντρωσης/ml (πριν και μετά την επίδραση με nutlin-3a) με φυγοκέντρηση στις 1.200 στροφές, για 5 λεπτά
- 2) Απομάκρυνση υπερεκείμένου και πλύση κυτταρικού ιζήματος με 1ml PBS
- 3) Μεταφορά σε φιαλίδια των 1.5ml
- 4) Φυγοκέντρηση στις 1.200 στροφές, για 5 λεπτά
- 5) Απομάκρυνση υπερεκείμένου και ομογενοποίηση του ιζήματος σε διάλυμα Trizol (1ml, Invitrogen)
- 6) Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου

Διαχωρισμός φάσεων

- 7) Προσθήκη 200μl χλωροφόρμιο (CHCl_3)
- 8) Γρήγορη ανάδευση και επώαση για 2-3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- 9) Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 13.000 στροφές, στους 4°C

Καθίζηση του RNA

- 10) Μεταφορά της υδατικής φάσης σε νέο φιαλίδιο
- 11) Προσθήκη 500μl ισοπροπανόλης (2-propanol)
- 12) Επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ή Ο/Ν στους -20°C
- 13) Φυγοκέντρηση 15min για 15 λεπτά στις 13.000 στροφές, στους 4°C

Πλύσεις του RNA

- 14) Απομάκρυνση του υπερεκείμένου
- 15) Πλύση με 200μl 75% αιθανόλη – ανάμειξη
- 16) Φυγοκέντρηση 15min για 5 λεπτά στις 12.000 στροφές, στους 4°C

Επαναδιάλυση του RNA

- 17) Στέγνωμα του ιζήματος στον αέρα και επαναδιάλυση, ανάλογα το μέγεθός του, σε 25-50 μl , σε νερό χωρίς Rnάσες (RNase free water)
- 18) Φωτομέτρηση

2.2.11 Φωτομετρικός ποσοτικός προσδιορισμός του RNA

Για το φωτομετρικό προσδιορισμό του RNA πραγματοποιούνται μετρήσεις στα 260nm/280nm οπτικής απορρόφησης. Ο βαθμός καθαρότητας του RNA υπολογίζεται από το λόγο των παραπάνω τιμών (OD_{260}/OD_{280}). Καθαρά θεωρούνται ότι είναι δείγματα χωρίς προσμίξεις από πρωτεΐνες ή φαινόλη, που ο λόγος OD_{260}/OD_{280} δίνει τιμές μεταξύ 1.8-2.0. Στην αντίθετη περίπτωση οι τιμές είναι πολύ μικρότερες, καθιστώντας τον ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό του RNA αδύνατο.

2.2.12 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι μια γρήγορη τεχνική που εφαρμόζεται για να πραγματοποιηθεί ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων. Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός/χαρσκτηρισμός/απομόνωση τμημάτων DNA και ο έλεγχος της ποιότητας του απομονωμένου RNA, με βάση την ένταση του φθορισμού που εκπέμπει το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr). Το EtBr, με μια πλευρική ομάδα που περιέχει, παρεμβάλλεται μεταξύ γειτονικών βάσεων του DNA/RNA και φθορίζει ανάλογα της συνολικής μάζας του DNA/RNA όταν ακτινοβολείται με υπεριώδη ακτινοβολία.

Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των νουκλεϊκών οξέων στο πήκτωμα αγαρόζης εξαρτάται:

- από το μέγεθος των μορίων νουκλεϊκού οξέος (π.χ. δίκλινα γραμμικά μόρια κινούνται μέσω του πηκτώματος με ρυθμούς αντιστρόφως ανάλογους του λογαρίθμου (\log_{10}) του μοριακού τους βάρους (Helling R.B. et al. 1974) και
- από τη συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα (τμήμα RNA/DNA γνωστού μεγέθους μεταναστεύει με διαφορετικό ρυθμό σε πηκτώματα αγαρόζης διαφορετικής συγκέντρωσης, σύμφωνα με την εξίσωση: $\log_{10}\mu - \log_{10}\mu_0 = -K_1t$, όπου μ_0 = η ελεύθερη ηλεκτροφορητική ικανότητα του RNA/DNA και K_1 = ο συντελεστής καθυστέρησης)
- από τη στερεοδιάταξη του DNA
- από την εφαρμοζόμενη τάση και
- από τη σύνθεση του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης

Η άγνωστη συγκέντρωση των εξεταζόμενων δειγμάτων DNA υπολογίζεται συγκρίνοντας την ένταση φθορισμού τους με αυτή που εκπέμπει ένα δείγμα-μάρτυρας γνωστής συγκέντρωσης σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Στην ανάλυση της ποιότητας του RNA με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, αποτυπώνονται ως δύο ζώνες τα δύο ριβοσωμικά RNA (18S και 28S rRNA), μετά από την έκθεση του πηκτώματος σε υπεριώδη ακτινοβολία. Προκειμένου να αποφευχθεί η καταστροφή του RNA, συνίσταται η χρήση υλικών που προστατεύουν από τη δράση των ριβονουκλεασών (RNAάσες), καθώς και η εφαρμογή συστηματικού καθαρισμού όλων των εξαρτημάτων ηλεκτροφόρησης.

Πειραματική διαδικασία

1) Παρασκευή πηκτώματος σε κωνική φιάλη, διαλύοντας αγαρόζη 1.5-2.0% (SIGMA), σε ddH₂O με την προσθήκη TAE 1x και EtBr.

- ✓ Παρασκευή διαλύματος TAE 1x με αραιώση TAE 50x (για 200 ml: 242 gr Trizma base (SIGMA), 57.1 ml Glacial Acetic Acid (Schanlau), 100 ml 0.5 M EDTA pH 8).

2) Θέρμανση, ψύξη (μέχρι τους 50°C) και μεταφορά διαλύματος αγαρόζης σε ειδική μήτρα μέχρι στερεοποίησης

3) Μεταφορά της μήτρας με το πήκτωμα στην οριζόντια δεξαμενή της συσκευής ηλεκτροφόρησης - γέμισμα συσκευής με TAE 1x μέχρι να καλυφθεί αυτό πλήρως.

4) Προσθήκη στα προς ανάλυση δείγματα, διαλύματος χρωστικής (loading buffer) κατάλληλης τελικής συγκέντρωσης, με σκοπό την παρακολούθηση του μετώπου της ηλεκτροφόρησης και την αύξηση πυκνότητας των δειγμάτων, ώστε να παραμείνουν στις θέσεις υποδοχής τους στο πήκτωμα.

5) Τοποθέτηση δειγμάτων στα πηγαδάκια και χρήση κατάλληλου μάρτυρα μοριακών μεγεθών (Invitrogen)

6) Σύνδεση ηλεκτροδίων της συσκευής με πηγή σταθερής τάσης με τρόπο ώστε τα μόρια του RNA/DNA να μετακινηθούν προς το θετικό πόλο.

7) Φωτογράφιση πηκτωμάτων σε υπολογιστή συνδεδεμένο με ειδικό απαγωγό με ακτινοβολία UV.

2.3 Μεταγραφική ανάλυση

2.3.1 Affymetrix - Ποσοτικοποίηση – Κανονικοποίηση – Ανάλυση Δεδομένων

Οι μικροσυστοιχίες που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη μας ήταν τύπου Affymetrix (**Affymetrix GeneChip**). Η εταιρεία Affymetrix σχεδίασε μια πλατφόρμα κατασκευής μικροσυστοιχιών ενός χρώματος, που συνδυάζει τη μέθοδο φωτολιθογραφίας και ολιγονουκλεοτιδικής χημείας στερεάς φάσης, για την υψηλής ακρίβειας σύνθεση 25μερών ολιγονουκλεοτιδικών ανιχνευτικών μορίων (μέσω μασκών) κατευθείαν πάνω στη γυάλινη επιφάνεια στήριξης.

[Fodor et.al., 1991]. Η διαδικασία περιλαμβάνει την ομοιοπολική ακινητοποίηση (φωτο)τροποποιημένων βάσεων στην επιφάνεια της μικροσυστοιχίας και τη χημική σύζευξη νέων βάσεων πάνω στις προηγούμενες. Η υψηλής ακρίβειας σύνθεση των 25μερών οφείλεται στην εκλεκτική φωτο-απομάκρυνση της προστατευτικής ομάδας που φέρει κάθε βάση μέσω υπεριώδους ακτινοβολίας και στην επακόλουθη ενεργοποίηση των θέσεων πρόσδεσης νέων βάσεων. Ο συνδυασμός διαφορετικών προτύπων κάλυψης σε κάθε κύκλο επιτρέπει την ενσωμάτωση πρόσθετων νουκλεοτιδίων στις νεοσυντιθέμενες αλυσίδες, με ειδικό και στοχευμένο τρόπο για κάθε probe της μικροσυστοιχίας. Οι κύκλοι επαναλαμβάνονται και η φωτο-κατευθυνόμενη σύνθεση των ολιγονουκλεοτιδίων ολοκληρώνεται με την τελική σύνθεση όλων των 25μερών στις αντίστοιχες θέσεις της μικροσυστοιχίας. (Lipshutz et al.1999).



Εικόνα 10: Απεικόνιση του Affymetrix GeneChip όπως είναι σε πραγματικό μέγεθος (www.affymetrix.com)

Κάθε γονίδιο του οποίου η έκφραση αναλύεται αντιπροσωπεύεται στη μικροσυστοιχία από ένα σύνολο διαφορετικών 25μερών probes που έχουν επιλεγεί ώστε να προσδιορίζουν ειδικά το κάθε γονίδιο. Τα 25μερή αυτά καλούνται Perfect Match (πλήρους υβριδισμού-PM) και είναι σχεδιασμένα έτσι ώστε να αναγνωρίζουν τμήματα του 3' άκρου του γονιδίου. Εκτός από τα PMs, για κάθε γονίδιο υπάρχει και μία σειρά probes που καλείται Mismatch (ατελούς υβριδισμού-MM). Η διαφορά μεταξύ των PM-MM είναι εντοπίζεται στο 13^ο (το κεντρικό) νουκλεοτίδιο που έχει αντικατασταθεί από κάποιο άλλο. Η σκοπιμότητα των Mismatch probes είναι ότι παρέχουν τη δυνατότητα εκτίμησης της μη ειδικής υβριδοποίησης που συνεισφέρει στο σήμα του probe. Το σύνολο των PM και MM probes για κάθε γονίδιο συνιστά το probe set. Τα PM και MM κάθε probe set ενσωματώνονται σε έναν αλγόριθμο, με βάση τον οποίο αφαιρούνται οι τιμές υβριδοποίησης των MM από αυτές των PM, έτσι ώστε να καθοριστεί η ακριβής ένταση του σήματος για κάθε probe set. Τα mRNAs των

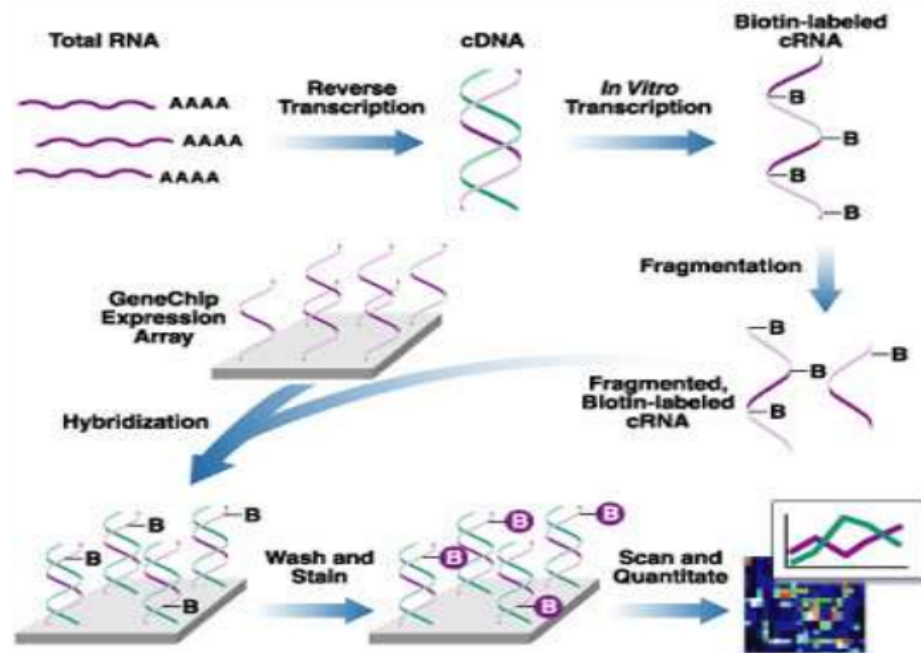
δειγμάτων που πρόκειται να συγκριθούν σημαίνονται με φθορίζουσα χρωστική και το κάθε δείγμα υβριδοποιείται στη συνέχεια σε μία μικροσυστοιχία. Η κάθε υβριδοποιημένη μικροσυστοιχία διεγείρεται από λέιζερ στο μήκος κύματος που είναι κατάλληλο για τον προσδιορισμό της χρωστικής. Με τον τρόπο αυτό, παράγεται μία εικόνα στην οποία η ένταση του σήματος υβριδοποίησης των spot που αντιστοιχούν σε ένα μοναδικό γονίδιο, μεταφράζεται σε επίπεδα γονιδιακής έκφρασης.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το Affymetrix GeneChips Human Genome U133 Plus 2.0 Array (HG-U133 Plus 2.0 Array) για τη σφαιρική εκτίμηση αλλαγών στην έκφραση του μεταγραφικού προφίλ των υπό εξέταση Hodgkin και μη-Hodgkin ανθρώπινων λεμφωματικών σειρών, πριν και μετά την επίδραση της Nutlin-3a. Ολικό RNA απομονώθηκε από τις έξι λεμφοκυτταρικές σειρές, σημάνθηκε και υβριδοποιήθηκε στα πλακίδια ολιγονουκλεοτιδικών μικροσυστοιχιών υψηλής πυκνότητας. Η σύνθεση του cDNA/RNA, ο καθαρισμός τους και ο έλεγχος της ποιότητάς τους έγινε στο Microarray Centre, Affymetrix Microarray station MD Anderson. Κάθε μικροσυστοιχία HG-U133 Plus 2.0 Array περιείχε 54.675 σύνολα ανιχνευτικών σημείων (probe sets), που αντιστοιχούσαν σε 39.000 μετάγραφα και ESTs και για κάθε γονίδιο λήφθηκε ένα επίπεδο έκφρασης. Χρησιμοποιήθηκαν 62 μάρτυρες ελέγχου της υβριδοποίησης, ενώ χρησιμοποιήθηκαν και ανιχνευτές που ήταν ειδικοί για κάποια γονίδια αναφοράς (GAPDH, alpha 1 Actin, Affymetrix Data Sheet, www.affymetrix.com). Τα δείγματα υπέστησαν ποιοτικό έλεγχο αναφορικά με την ποσότητα του σημασμένου RNA, αλλά και την ποιότητα που καταγράφηκε στην εικόνα της μικροσυστοιχίας. Όλα τα αρχεία που προέκυψαν από τις μικροσυστοιχιές επεξεργάστηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα DNA-Chip Analyzed (dChip2004), που αναπτύχθηκαν από τους Li και Wong, Harvard University. Οι τιμές των εντάσεων φθορισμού κανονικοποιήθηκαν και στατιστικά αναλύθηκαν απομακρύνοντας την τυχαία και συστηματική μεταβλητότητα (π.χ. κατασκευή πλακιδίων, προετοιμασία βιολογικού δείγματος, πρωτόκολλα και απόδοση υβριδοποίησης, διαφορές σήματος). Ο υπολογισμός των τελικών επιπέδων έκφρασης για κάθε μικροσυστοιχία (probe set) βασίστηκε στο Perfect Match (PM)-only μοντέλο, καταλήγοντας σε αρχεία Excel με τις τελικές λίστες των διαφορικά ρυθμισμένων mRNAs μετά από Nutlin-3A.

Πειραματική διαδικασία

- 1) Εξαγωγή συνολικού RNA από το κύτταρο
- 2) Μετατροπή του mRNA σε cDNA χρησιμοποιώντας την αντίστροφη μεταγραφάση
- 3) Μεταγραφή του cDNA σε ιχνηθετημένο cRNA, χρησιμοποιώντας νουκλεοτίδια σημασμένα με βιοτίνη (-UTP, -CTP) (αντίδραση *in vitro* transcription-IVT)
- 4) Επώαση του cRNA στους 94°C προκειμένου να παραχθούν cRNA τμήματα μήκους 30 -400 βάσεων

- 5) Υβριδοποίηση του cRNA στις μικροσυστοιχίες, σε συμπληρωματικές θέσεις ανιχνευτών και πλύσιμο για απομάκρυνση του μη υβριδοποιημένου cRNA
- 6) Βαφή και επώαση του υβριδοποιημένου cRNA με βιοτίνη με φθορίζουσα χρωστική (στραπταβιδίνη-φυκοερυθρίνη)
- 7) Σάρωση κάθε μικροσυστοιχίας στον ειδικό ομοεστιακό ανιχνευτή (Gene Chip Scanner 3000)
- 8) Ανίχνευση εκπνεόμενου σήματος και ποσοτικοποίηση της έντασης της έκφρασης κάθε γονιδίου



Εικόνα 11: Απεικόνιση των βημάτων που ακολουθούνται κατά την υβριδοποίηση σε μικροσυστοιχίες Affymetrix (www.dkfz.de/gpcf/24html)

2.4. Πρωτεωματική ανάλυση

Η πρωτεωματική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με σκοπό τη μελέτη της μεταβολής του πρωτεώματος στις τρεις υπό ανάλυση λεμφοκυτταρικές σειρές, η οποία επάγεται της σταθεροποίησης και ενεργοποίησης της p53 από τη nutlin-3a. Οι τεχνικές που εφαρμόστηκαν για την ανάλυση των πρωτεϊνών, ακολούθησαν τα τέσσερα βασικά στάδια: (1) κυτταρική λύση/απομόνωση πρωτεϊνικού εκχυλίσματος (παράγραφος 2.2.5-7), (2) διαχωρισμό των πρωτεϊνών (1-DE/SDS PAGE, παράγραφος 2.2.8), (3) ταυτοποίηση και σχετική ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών με φασματομετρία μάζας (ICPL, nLC-ESI-MS/MS) και (4) στατιστική ανάλυση των δεδομένων που προέκυψαν με τη βοήθεια της βιοπληροφορικής (Mascot, GOC, DAVID κ.α.).

Παρακάτω περιγράφονται αναλυτικότερα οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν:

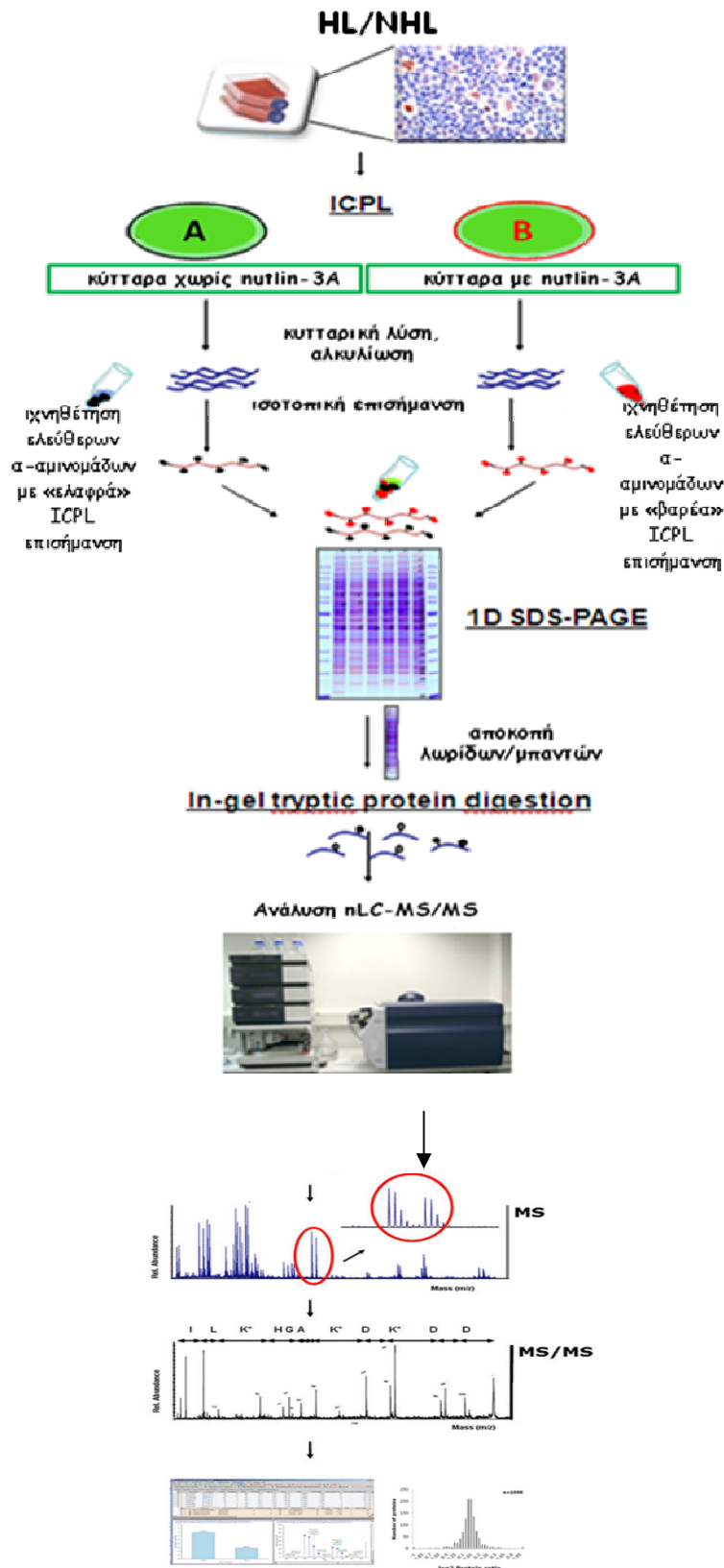
2.4.1 Ισοτοπική πρωτεϊνών με τη μέθοδο ICPL (Isotope-Coded Protein Labels)

Τις τελευταίες δεκαετίες, ο συνδυασμός της συζευγμένης με φασματομετρία μάζας υγρής χρωματογραφίας (LC-MS) με μεθόδους σταθερής ισοτοπικής επισήμανσης έχει αναδειχθεί σε ένα πολύ ισχυρό εργαλείο μελέτης της ποσοτικής πρωτεωματικής ανάλυσης σύνθετων πρωτεϊνικών μιγμάτων. Πρόκειται για σταθερά, μη-ραδιενεργά ισότοπα στοιχείων, που φυσιολογικά εμπεριέχονται σε μικρή αναλογία στα αντίστοιχα φυσικά στοιχεία (π.χ. ^{13}C -, ^{15}N - ή ^2H -). Συγκεκριμένα ισότοπα, όπως είναι τα ^{12}C - και ^{13}C -, λόγω της παρουσίας ατόμων άνθρακα σχεδόν σε όλους τους μεταβολίτες, κρίνονται ιδιαίτερος βοηθητικά στην παρακολούθηση των επισημασμένων παραγόμενων μορίων ποικίλων (βιο) χημικών και βιοφαρμακευτικών διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα στα διάφορα εξεταζόμενα βιολογικά συστήματα. Η ανίχνευσή τους πραγματοποιείται με εξειδικευμένα όργανα π.χ. φασματομετρία μάζας (MS) μετρώντας το λόγο των αντίστοιχων ισοτόπων (π.χ. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$).

Μεταξύ των διαφόρων μεθόδων επισήμανσης, η μέθοδος ICPL συμβάλλει στην υψηλής διεκπεραιωτικής ικανότητας (high-throughput) και επαναπαραγόμενη ποσοτική αποσαφήνιση του συνόλου του πρωτεώματος σε διαφορετικές κυτταρικές καταστάσεις (π.χ. πριν και μετά την επίδραση μιας ουσίας) σε ένα πείραμα. Με αυτόν τον τρόπο, μειώνεται η πολυπλοκότητα του κάθε πρωτεϊνικού κλάσματος, αυξάνοντας το δυναμικό εύρος ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού των πρωτεϊνών και συνεπώς, τον ίδιο τον αριθμό των ταυτοποιημένων μορίων. Η τεχνική ICPL βασιζόμενη στη σταθερή ισοτοπική επισήμανση των ελεύθερων αμινομάδων ανέπαφων πρωτεϊνών (intact proteins), μπορεί να εφαρμοστεί σε κάθε είδους πρωτεϊνικό δείγμα (π.χ. μεμβρανικές πρωτεΐνες, εκχύλισμα από κύτταρα, ιστούς ή σωματικά υγρά) και είναι συμβατή με όλες τις γνωστές μεθόδους διαχωρισμού (1DE-SDS-PAGE, n-HPLC κ.α.) [20, Lottspeich F, Kellermann J., ICPL labeling strategies for proteome research, **Methods Mol Biol.** 2011;753:55-64. Η εφαρμογή, δε, της μεθόδου, αμέσως μετά τη λήψη του προς εξέταση υλικού και πριν οποιαδήποτε περαιτέρω επεξεργασία, εξασφαλίζει τη μείωση τυχόν διακυμάνσεων λόγω τεχνικών χειρισμών.

Ειδικότερα, στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιώντας το SERVA ICPL™ Kit, εφαρμόστηκε η σταθερή ισοτοπική επισήμανση των απομονωμένων πρωτεϊνών στις ελεύθερες α-αμινομάδες τους (N-τερματικό άκρο, λυσίνες) με τη χρήση ^{12}C - (πριν) και ^{13}C - (μετά από επίδραση με Nutlin-3a) N- nicotinoyloxy-succinimide (Nic-NHS), σύμφωνα με τον Schmidt et al. 2005. Μετά την επισήμανση, οι «ελαφρά» και «βαρέα» σημασμένες πρωτεΐνες που προέκυψαν από κάθε

κυτταρική σειρά μελέτης, ενώθηκαν σε ένα ενιαίο πρωτεϊνικό μίγμα. Ακολούθως, τα πρωτεϊνικά διαλύματα ίσων πρωτεϊνικών ποσοτήτων, διαχωρίστηκαν βάσει του μοριακού τους βάρους με 1DE-SDS-PAGE, ενώ τα προκύπτοντα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης χρώστηκαν με κολλοειδές Coomassie και πρωτεολύθηκαν με θρυψίνη. Με τη χρήση υψηλής ακρίβειας και ευαισθησίας φασματομετρίας μάζας σε συνδυασμό με υγρή χρωματογραφία ανάστροφης φάσης νανο-ροής (nLC-MS/MS) διαχωρίστηκαν και ταυτοποιήθηκαν τα σταθερά ισότοπα του C, ^{12}C (L, light) και ^{13}C (H, heavy). Έτσι, στο φάσμα μαζών καταγράφηκε η διαφορά μάζας των πεπτιδίων που προέκυψαν από τις ίδιες πρωτεΐνες κάθε δείγματος, αλλά περιείχαν είτε την «ελαφρά» (L, light) είτε τη «βαρέα» (H, heavy) επισήμανση, αντίστοιχα. Με τη βοήθεια της βιοπληροφορικής, από το λόγο των εντάσεων των κορυφών που προέκυψε από τα επισημασμένα αυτά «αδελφά» ζεύγη πεπτιδίων, συγκεντρώθηκαν οι πληροφορίες που αφορούσαν τη σχετική ποσότητα των «γονικών» πρωτεϊνών (parent proteins) του αρχικού δείγματος. Ακολούθως, τα ισοτοπικά πεπτιδικά ζεύγη με διαφορές στην σχετική τους αφθονία, επιλέχθηκαν αυτόματα για «διαχωρισμό-μετά-από-πρόσκρουση» (collision-induced dissociation, CID) και ταυτοποιήθηκαν κατά αντιστοιχία με Βάσεις Δεδομένων, κάνοντας χρήση ειδικών αλγόριθμων αναζήτησης. Στο σχήμα που ακολουθεί αποτυπώνεται η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την εφαρμογή της πρωτεϊνικής ισοτοπικής επισήμανσης με τη μέθοδο ICPL.



Εικόνα 12: Απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε κατά την πορεία της ανάλυσης, ταυτοποίησης και σχετικής ποσοτικοποίησης κατά ICPL: Πρωτεϊνικό εκχύλισμα κυττάρων από κυτταρικές σειρές λεμφώματος A και B κυτταρικών καταστάσεων (πριν και μετά την εφαρμογή της Nutlin-3A αντίστοιχα) σημάνθηκαν με τα ICPL-αντιδραστήρια.

Αφού ενώθηκαν τα πρωτεϊνικά δείγματα διαχωρίστηκαν σε πρωτεϊνικό επίπεδο με 1D-SDS-PAGE και σε πεπτιδικό επίπεδο με πρωτεόλυση, για να ακολουθήσει περαιτέρω ανάλυση με n-LC-MS/MS. Τα δεδομένα που προέκυψαν επεξεργάστηκαν με κατάλληλους αλγόριθμους για την ταυτοποίηση και σχετική ποσοτικοποίηση των επισημασμένων πεπτιδικών ζευγών, καταλήγοντας σε μια ποσοτική κατανομή της σχετικής αναλογίας των γονικών πρωτεϊνών στα αρχικά δείγματα.

Πειραματική διαδικασία

I. Καθαρισμός των πρωτεϊνικών δειγμάτων με κατακρήμνιση ακετόνης.

- 1) Προσθήκη ποσότητας ddH₂O ίσης με τον όγκο κάθε δείγματος σε κάθε φιαλίδιο
- 2) Προσθήκη 5x του συνολικού όγκου κάθε φιαλίδιο (δείγμα + ddH₂O) κρύας ακετόνης σε κάθε δείγμα και επώαση στους -20°C ο/η
- 3) Φυγοκέντρηση των κατακρημνισμένων πρωτεϊνών στις 14000rpm, για 30 λεπτά, στους 4°C
- 4) Απόρριψη του υπερκειμένου και απομάκρυνση της υπολειπόμενης ακετόνης μέσω εξάτμισης σε θερμοκρασία δωματίου
- 5) Επικάλυψη των κατακρημνισμένων πρωτεϊνών με 100-200μl παγωμένης 80% ακετόνης
- 6) Προσεκτική ανάμειξη και φυγοκέντρηση των κατακρημνισμένων πρωτεϊνών στις 20000g, για 5 λεπτά στους 4°C
- 7) Απόρριψη του υπερκειμένου και απομάκρυνση της υπολειπόμενης ακετόνης μέσω εξάτμισης σε θερμοκρασία δωματίου
- 8) Αναδιάλυση των κατακρημνισμένων πρωτεϊνικών δειγμάτων σε ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για την κυτταρική λύση (Lysis Buffer)
- 9) Ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών σε κάθε δείγμα χρησιμοποιώντας τις μεθόδους Bradford ή BCA (παράγραφοι 2.2.7).

II. Αναγωγή και μπλοκάρισμα των κατάλοιπων κυστεΐνης (Καρβαμιδομεθυλίωση)

Πριν την εκκίνηση της διαδικασίας:

- ✓ Πραγματοποιείται έλεγχος του pH των δειγμάτων προς ανάλυση (ρύθμιση του pH στα $8,5 \pm 0,1$ με προσθήκη HCL ή NaOH)
- ✓ Το πρωτόκολλο καρβαμιδομεθυλίωσης εφαρμόζεται ομοίως στα δείγματα A και B

- 1) Προσθήκη 5μl έτοιμου διαλύματος αναγωγής (reduction solution) σε κάθε δείγμα προς ανάλυση
- 2) Γρήγορη ανάδευση - επικάλυψη με αέριο αργό για την αποφυγή οξειδωσης- γρήγορη ανάδευση και χρήση υπερήχων για 1 λεπτό
- 3) Επώαση για 30 λεπτά, στους 60°C
- 4) Μεταφορά δείγματος σε θερμοκρασία δωματίου
- 5) Προσθήκη 5μl «φρέσκου» ιωδοακεταμιδίου (IAA, αντιδραστηρίου αλκυλίωσης) σε κάθε δείγμα - κάλυψη με αλουμινόχαρτο για λόγους φωτοπροστασίας

- 6) Επώαση δειγμάτων για 30 λεπτά, στους 25°C
- 7) Παύση αντίδρασης προσθέτοντας 5μl έτοιμου «διαλύματος παύσης 1» (N-Acetyl-Cystein) σε κάθε δείγμα
- 8) Επώαση δειγμάτων για 15 λεπτά, στους 25°C
- 9) Ρύθμιση του pH στα $8,5 \pm 0,1$, προσθέτοντας NaOH ή HCL

III. Ισοτοπική επισήμανση των πρωτεϊνικών δειγμάτων

- 1) Προσθήκη 30μl ^{12}C -Nic-αντιδραστηρίου στα δείγματα A και 30μl ^{13}C -Nic-αντιδραστηρίου στα δείγματα B
- 2) Γρήγορη ανάδευση και επικάλυψη και των δύο «ειδών» δειγμάτων με αέριο αργό
- 3) Γρήγορη ανάδευση και χρήση υπερήχων για 1 λεπτό
- 4) Επώαση δειγμάτων για 2h στους 25°C
- 5) Προσθήκη 20μl υδροξυλαμίδης («διαλύματος παύσης 2») σε κάθε δείγμα
- 6) Επώαση δειγμάτων για 20 λεπτά στους 25°C για την καταστροφή περίσσειας αντιδραστηρίου
- 7) Συνδυασμός των ICPL δειγμάτων A και B, συνοδευόμενος από καλή ανάδευση
- 8) Ρύθμιση του pH στα $11,9 \pm 0,1$ με προσθήκη 2N NaOH για την καταστροφή πιθανών προϊόντων εστεροποίησης
- 9) (Μετά από 20 λεπτά) Προσθήκη ίσης ποσότητας 2N HCL για την εξουδετέρωση των δειγμάτων

IV. Καθαρισμός των ισοτοπικά σημασμένων πρωτεϊνικών δειγμάτων με κατακρήμνιση ακετόνης.

Επαναλαμβάνονται τα βήματα 1→7 της παραγράφου I αυτής της ενότητας. Ακολουθεί η φύλαξη των δειγμάτων στους -80°C ή η απευθείας αναδιάλυσή τους σε κατάλληλα ρυθμιστικά διαλύματα με σκοπό το διαχωρισμό των πρωτεϊνών (1-DE ή 2-DE gels).

Τα προκύπτοντα πρωτεϊνικά (προς ανάλυση με LC-MS/MS) δείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση μίας διάστασης (1-DE/SDS PAGE), κατά την παράγραφο 2.2.8 για να ακολουθήσει η χρώση και αποχρωματισμός του gel, σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολλο.

2.4.2 Χρώση και αποχρωματισμός πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου με Coomassie Brilliant Blue R250 (συμβατό με MS)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφορητικής ανάλυσης των δειγμάτων με σκοπό την εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών. Αποτελεί, δηλαδή, μία απεικονιστική μέθοδο ελέγχου της καθαρότητας και της απόδοσης της έκφρασης των πρωτεϊνών. Η ένταση του χρώματος είναι ενδεικτικό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης. Η χρώση αυτή είναι συμβατή για περαιτέρω ανάλυση με φασματομετρία μάζας (MS).

Υλικά και Διαλύματα

Διάλυμα Χρωστικής Coomassie

0.1% Coomassie R-250
40% Εθανόλη
10% Οξικό οξύ
ddH₂O

Διάλυμα αποχρωματισμού

10% Εθανόλη
7.5% Οξικό οξύ
ddH₂O

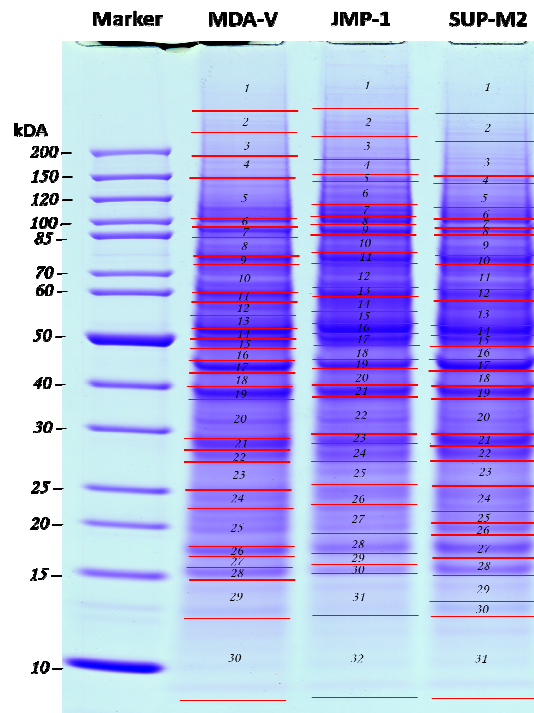
Πειραματική διαδικασία

- 1) Προετοιμασία διαλύματος χρώσης με Coomassie (πριν το πέρας της ηλεκτροφόρησης)
- 2) Εμβάπτιση πηκτώματος σε δοχείο αποθήκευσης με διάλυμα χρωστικής Coomassie - επώαση με ήπια ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου (>30 λεπτά)
- 3) Προετοιμασία διαλύματος αποχρωματισμού (μετά την ηλεκτροφόρηση)
- 4) Αποχρωματισμός του πηκτώματος με επώαση σε αποχρωστικό διάλυμα, σε αναδευτήρα (>30 λεπτά)
Το αποχρωστικό διάλυμα ανανεώνεται μέχρι να εξαλειφθεί η μη ειδική χρώση του πηκτώματος
- 5) Πλύση πηκτώματος με ddH₂O

Μετά το πέρας της διαδικασίας του αποχρωματισμού, το πήκτωμα αν δε χρησιμοποιηθεί άμεσα, διατηρείται σε διάλυμα 5% οξικού οξέος/dd H₂O, στους 4°C.

2.4.3 Πέψη σε πήκτωμα (*in-gel digestion*) των απομονωμένων πρωτεϊνικών ζωνών

Οι στήλες (lanes) του πηκτώματος κάθε κυτταρικής σειράς, αποκόπηκαν σε ~ 30 τεμάχια (μπάντες), ανάλογα με τον αριθμό των πρωτεϊνικών ζωνών που αποκαλύφθηκε ότι περιείχαν, μετά τη χρώση με κολλοειδές Coomassie. Κάθε μπάντα κόπηκε περαιτέρω σε μικρότερα κομμάτια, τα οποία και μεταφέρθηκαν σε φιαλίδια. Στη συνέχεια, ακολούθησε ο αποχρωματισμός και η αφυδάτωση των πρωτεϊνών με ακετονιτρίλιο (ACN), ενώ οι πρωτεΐνες υποβλήθηκαν σε αναγωγή και αλκυλίωση των υπάρχοντων θειολικών τους ομάδων (-S-H) με διθειοθρεϊτόλη (DTT) και ιωδοακεταμίδιο (IAA) αντιστοίχως, προκειμένου να αποτραπεί ο ανασχηματισμός δισουλφυδικών δεσμών [Hale, J. E., J. P. Butler, V. Gelfanova, J. S. You and M. D. Knierman: A simplified procedure for the reduction and alkylation of cysteine residues in proteins prior to proteolytic digestion and mass spectral analysis. *Anal Biochem* 2004, 333(1):174-181]. Στα κομμάτια πηκτώματος προστέθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα της πρωτεόλυσης που περιείχε το σύννηθες ένζυμο-τελεστή της πρωτεϊνικής πέψης, τη θρυψίνη (trypsin). Η σερινοπρωτεάση αυτή χρησιμοποιείται ευρέως στην πρωτεωμική ανάλυση επειδή παρουσιάζει τα εξής πλεονεκτήματα: α) καταλύει τη υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών αποκλειστικά στο καρβοξυτελικό άκρο ύστερα από κατάλοιπα αργινίνης (R, Arg) ή λυσίνης (K, Lys), εκτός εάν ακολουθεί προλίνη (P, Pro), λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης [Olsen J.V., Ong S., and Mann M. Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Mol Cell Proteomics* 2004, 3:608-614.]. Τα αμινοξέα R/K εντοπίζονται στις πρωτεΐνες περίπου ένα ανά 10-12 αμινοξέα, σε τέτοιες πρωτεϊνικές θέσεις, που όταν πραγματοποιηθεί θραύση στα σημεία που εδράζονται, προκύπτουν πεπτίδια μέσου μεγέθους 800-2000 Da το οποίο είναι πολύ κατάλληλο για MS ανάλυση, β) τα πεπτίδια που παράγονται από θρυψίνη πραγματοποιούν πολύ ομοιογενή θραυσματοποίηση σε CID και έτσι κάθε φάσμα θραύσης μόνο ενός πεπτιδίου-αποτέλεσμα θρυψινοποίησης, μπορεί να δώσει αρκετή πληροφορία για την ταυτοποίηση μιας πρωτεΐνης, εφόσον συμπεριλαμβάνεται σε βάσεις δεδομένων. Τέλος, τα πεπτίδια αφαιρέθηκαν από τα κομμάτια πηκτώματος με τη χρησιμοποίηση ενός διαλύματος εκχείλισης και λυοφιλίωσης (ACN και TFA αντίστοιχα).



Εικόνα 13: Ηλεκτροφόρηση πηκτώματος 1D-SDS-PAGE των πρωτεϊνικών δειγμάτων λεμφώματος, με σκοπό την ταυτοποίηση και σχετική ποσοτικοποίηση κατά ICPL με MS: Πρωτεϊνικό εκχύλισμα κυττάρων από κυτταρικές σειρές λεμφώματος πριν και μετά την εφαρμογή της Nutlin-3A, αφού σημάνθηκε με τα ICPL-αντιδραστήρια, διαχωρίστηκε σε πρωτεϊνικό επίπεδο με 1D-SDS-PAGE. Ακολούθησε χρώση του πηκτώματος με κολλοειδές Coomassie, κόψιμο των μαρκαρισμένων μπαντών (~30 μπάντες/στήλη) και πρωτεόλυση με θρυψίνη. Αριστερά του πηκτώματος, ο πρωτεϊνικός δείκτης (marker) βοηθάει στον προσδιορισμό των μοριακών μεγεθών των πρωτεϊνών.

Πειραματική διαδικασία

Αποχρωματισμός

- 1) Επικάλυψη των κομματιών πηκτώματος με 100μl 50%ACN/ddH₂O – τοποθέτηση σε αναδευτήρα για 15 λεπτά
- 2) Αφαίρεση υπερκείμενου – προσθήκη ίσου όγκου ρυθμιστικού αμμωνιοδικαρβονιτικού διαλύματος (ABS)
- 3) Απόθεση σε αναδευτήρα για 15 λεπτά
- 4) Αφαίρεση υπερκείμενου

Επανάληψη των βημάτων 1 → 4 εις διπλούν

Αναγωγή / Αποδιάταξη

- 5) Προσθήκη 100 μl 10 mM DTT
- 6) Τοποθέτηση σε αναδευτήρα για 45 λεπτά στους 56°C

Αλκυλίωση

- 7) Αφαίρεση υπερκείμενου - Προσθήκη ίσου όγκου 55 mM IAA
- 8) Τοποθέτηση σε αναδευτήρα για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου

Πλύσεις

9) Αφαίρεση υπερκείμενου – Εφαρμογή διαδοχικών 15λεπτων πλύσεων με ACN και ABS, αφαιρώντας κάθε φορά το προηγούμενο διάλυμα (x2)

Πρωτεόλυση

10) Αφαίρεση υπερκείμενου - Ενυδάτωση αποξηραμένων κομματιών προσθέτοντας 25-30μl διαλύματος θρυψίνης (Trypsin Solution: Promega) ο/n σε συνθήκες σκότους και θερμοκρασία δωματίου

11) Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέα φιαλίδια

Εκχείλιση και Λυοφιλίωση

12) Επικάλυψη των κομματιών πηκτώματος με 50μl ddH₂O - Απόθεση σε αναδευτήρα για 20 λεπτά

13) Μεταφορά του υπερκείμενου ddH₂O στα νέα φιαλίδια

14) Επικάλυψη των κομματιών πηκτώματος με 50μl 50% ACN - Απόθεση σε αναδευτήρα για 20 λεπτά

15) Μεταφορά του υπερκείμενου στα νέα φιαλίδια

16) Επικάλυψη των κομματιών πηκτώματος με 50μl 50% ACN + 0.1 TFA/ ddH₂O - Απόθεση σε αναδευτήρα για 20 λεπτά

17) Μεταφορά του υπερκείμενου 50% ACN + 0.1 TFA/ ddH₂O στα νέα φιαλίδια

18) Τοποθέτηση των νέων φιαλίδια στο speed vacuum concentrator (centrifugation under vacuum, MaxiDry Plus, Heto, Allered, Denmark) για εξάτμιση μέχρι ξηρού σε κενό – φύλαξη

Αφαλάτωση

Για την απομάκρυνση της περίσσειας συγκέντρωσης αλάτων στα πεπτιδικά δείγματα κάθε πρωτεϊνικής ζώνης πριν την ανάλυση με φασματόμετρο μάζας, προετοιμάστηκε μια σειρά από στήλες αφαλάτωσης αντίστροφης φάσης οκταδεκυλίου (C18, Empore High Performance Extraction Disks). Η εισαγωγή των διαλυμάτων σε κάθε στήλη πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια πλαστικής σύριγγας.

Προετοιμασία χρωματογραφικών στηλών C18

- ✓ Προσθήκη 10μl ισοπροπανόλης
- ✓ Πλύση με 10μl 5% FA (x2)

1) Αναδιάλυση δειγμάτων σε 10μl 5% FA

- 2) Πέρασμα των εκχυλισμένων πεπτιδικών διαλυμάτων κάθε δείγματος μέσα από κάθε αντίστοιχη χρωματογραφική στήλη
- 3) Πλύση με 10μl 5% FA (x2)
- 4) Προσθήκη 20μl μεθανόλης και 5% FA για την εκχύλιση των πεπτιδίων από τη στήλη
- 5) Μεταφορά του εκλούσματος σε νέα φιαλίδια
- 6) Τοποθέτηση των νέων φιαλιδίων στο speed vacuum concentrator για εξάτμιση μέχρι ξηρού σε κενό
- 7) Επαναδιάλυση σε 20μl 5% FA

2.4.4 Υποβοηθούμενη με φίλτρο προετοιμασία δείγματος (*Filter Aided Sample Preparation; FASP*) και πέψη με θρυψίνη σε διάλυμα (*in-solution tryptic digestion*)

Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που προέκυψαν από τις κυτταρικές σειρές των τριών λεμφωμάτων μελέτης (MDA-V, JMP-1 and SUP-M2), πριν και μετά την εφαρμογή της N3A, προετοιμάστηκαν χωρίς πήκτωμα (gel-free) και πρωτεολύθηκαν εφαρμόζοντας το πρωτόκολλο «υποβοηθούμενης με φίλτρο προετοιμασίας δείγματος» FASP, [57, 58] με μικρές τροποποιήσεις. Συνοπτικά, κυτταρικά εκχυλίσματα ανήχθηκαν

Αναγωγή και μπλοκάρισμα των κατάλοιπων κυστεΐνης (Καρβαμιδομεθυλίωση)

Πριν την εκκίνηση της διαδικασίας:

- ✓ Πραγματοποιείται έλεγχος του pH των δειγμάτων προς ανάλυση (ρύθμιση του pH στα $8,5 \pm 0,1$ με προσθήκη HCL ή NaOH)
- ✓ Το πρωτόκολλο καρβαμιδομεθυλίωσης εφαρμόζεται ομοίως στα δείγματα A και B

- 1) Προσθήκη διαλύματος αναγωγής σε κάθε δείγμα προς ανάλυση (150 μg πρωτεΐνης) 10mM DTT και επώαση για 30 λεπτά, στους 56°C
- 2) Μεταφορά δείγματος σε θερμοκρασία δωματίου
- 3) Προσθήκη 30mM IAA σε θερμοκρασία δωματίου σε κάθε δείγμα και επώαση για 30 λεπτά - κάλυψη με αλουμινόχαρτο για λόγους φωτοπροστασίας
- 4) Αραίωση δειγμάτων (έως 300μl) με «φρέσκο» διάλυμα 8M ουρίας-100mM Tris-HCl (pH 8.5) (Kollipara and Zahedi 2013)
- 5) Φυγοκέντρηση δειγμάτων στις 13,500g, για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- 6) Απαλοιφή υπολειπόμενου SDS εφαρμόζοντας τρία πλυσίματα με διάλυμα 8M ουρίας-100mM Tris-HCl (pH 8.5), 100μl)
- 7) Προσθήκη 100μl διαλύματος πέψης (1:25 w/w, ένζυμο θρυψίνης προς πρωτεΐνη), 2mM CaCl₂ σε 50mM TEAB (pH 8.5)) στα συγκεντρωμένα πρωτεϊνικά δείγματα
- 8) Επώαση στους 37°C για 14hrs.
- 9) Ανάκτηση των πεπτιδίων θρυψίνης που έχουν προκύψει με φυγοκέντρηση χρησιμοποιώντας διαδοχικά 50μl 50mM TEAB (pH 8.5) και 50μl υπερεκαθαρού νερού
- 10) Προσαρμογή του pH <3 με 10% TFA (v/v)

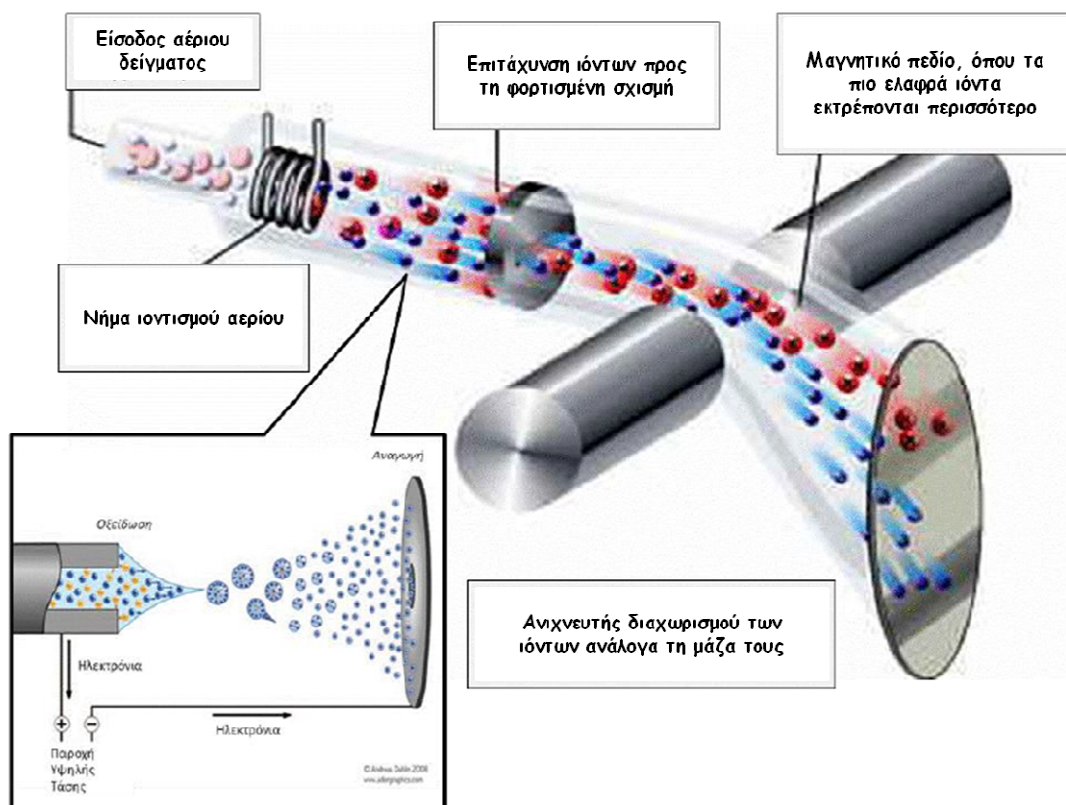
11) Ποιοτικός έλεγχος των προϊόντων πέψης βάσει βιβλιογραφίας (Burkhart, Schumbrutzki et al. 2012)

Κάθε δείγμα προς ανάλυση με LC-MS/MS εισήχθη με ειδικά φιαλίδια (Waters) στο στόμιο εισαγωγής του φασματογράφου

2.4.5 Ανάλυση πεπτιδικών μιγμάτων με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας νανο-ροής (nano Liquid Chromatography, nLC) συνδεδεμένη σε σειρά με φασματόμετρο μάζας (ESI-MS/MS)

Για την ταυτοποίηση και μετέπειτα σχετική ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών, τα πεπτιδικά μίγματα που προέκυψαν από κάθε ζώνη, αναλύθηκαν με nLC-ESI-MS/MS. Πρόκειται για ένα φασματόμετρο μάζας που διαθέτει συζευγμένα φίλτρα μαζών για την επίτευξη υψηλής διακριτικής ικανότητας παρόμοιων λόγων μάζα/φορτίο (m/z), το οποίο είναι συνδεδεμένο με μια ανάστροφης φάσης στήλη υγρής χρωματογραφίας νανο-ροής για το διαχωρισμό των διαφόρων ενώσεων που περιέχονται σε κάθε δείγμα. Τα συστατικά του δείγματος ακολούθως εισάγονται στο MS, όπου δημιουργούνται και ανιχνεύονται μονά ή πολλαπλά φορτισμένα ιόντα. Ως μέθοδος ιονισμού χρησιμοποιείται μια πηγή ηλεκτροψεκασμού (Electrospray Ionization, ESI). Στη βελόνα ιονισμού εφαρμόζεται υψηλό δυναμικό παράγοντας σταγονίδια που διαθέτουν ηλεκτρικά φορτία στην επιφάνειά τους. Όταν η πυκνότητα του φορτίου αυξηθεί σε κρίσιμο σημείο, οι σταγόνες διαιρούνται διαδοχικά σε μικρότερες, μέχρι να παραχθούν μικροσκοπικά σταγονίδια. Τα τελευταία, εισέρχονται λόγω απωθητικών δυνάμεων στο MS, με τη βοήθεια φακών εστίασης και αναλύονται.

Αναλυτικότερα, στη στήλη nLC, τα προς εξέταση πρωτεολυμένα πεπτίδια, διαχωρίστηκαν χρησιμοποιώντας μια ανάστροφης φάσης χρωματογραφική στήλη, η οποία βασίζει το διαχωρισμό των πεπτιδίων στην υδροφοβικότητα και/ή πολικότητά τους. Στο ESI τα πεπτίδια μετατράπηκαν σε ιόντα στην αέρια φάση, και στη συνέχεια αφού διαχωρίστηκαν ως προς το λόγο m/z στον αναλυτή μάζας, αποτυπώθηκαν στον ανιχνευτή μάζας υπό τη μορφή φάσματος μάζας (mass spectrum, MS). Κάθε πεπτίδιο που αναλύθηκε (MS) υπέστη περαιτέρω θραυσμάτωση, παράγοντας ιόντα που αποτυπώνονται σε MS/MS φάσματα, τα οποία οδηγούνται στην κεντρική συσκευή ελέγχου και μέτρησης. Με τον τρόπο αυτό, τα πεπτίδια ταυτοποιήθηκαν βάσει των ισοτοπικών μαζών των άθραυστων «γονικών» ιόντων («parent» ions) και των ισοτοπικών μαζών των θραυσμάτων, από όπου προέκυψαν οι απαιτούμενες πληροφορίες για την αλληλουχία των αμινοξέων του εκάστοτε πεπτιδίου.



Εικόνα 13: Τα βασικά μέρη που απαρτίζουν ένα φασματομέτρο ESI-MS/MS (πηγή ιόντων, αναλυτή μάζας, ανιχνευτή ποσοτικοποίησης ιόντων) (τροποποιημένο σχήμα από τη σελίδα: jahschem.wikispaces.com, www.waters.com)

Στην περίπτωση μας η ανάλυση των δειγμάτων με nLC-ESI-MS/MS πραγματοποιήθηκε σε τρία διαφορετικά συστήματα:

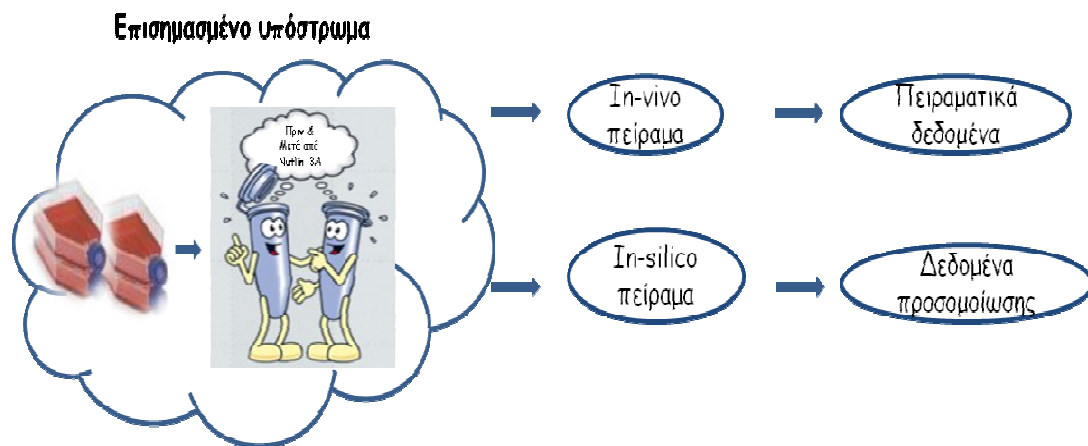
4. σε Esquire HCT ion trap συνδεδεμένο με ένα σύστημα Ultimate 3000 LC
5. σε LTQ-Orbitrap XL συνδεδεμένο με ένα Easy nLC, και
6. σε Orbitrap Fusion συνδεδεμένο με ένα σύστημα Ultimate 3000 nano RSLC.

Η προετοιμασία δείγματος και ο διαχωρισμός στο LC των δύο πρώτων συστημάτων πραγματοποιήθηκε με μικρές τροποποιήσεις όπως περιγράφεται στη βιβλιογραφία (Aivaliotis, Gevaert et al. 2007). Συνοπτικά, τα θρυψινοποιημένα πεπτιδικά μίγματα διαχωρίστηκαν πάνω σε αντίστροφης-φάσης στήλη (Reposil Pur C18 AQ, μέγεθος μορίου = 3 μm , μέγεθος πόρου = 120 \AA (Dr. Maisch), συντηγμένοι πομποί διοξειδίου πυριτίου μάκρους 100 mm και εσωτερικής διαμέτρου 75 μm (Thermo Scientific), πακεταρισμένη από το εργαστήριο πρωτεωμικής ανάλυσης PROFI (Proteomics facility at IMBB), χρησιμοποιώντας μια υπό πίεση «μπόμπα» πακεταρίσματος (35-40 bars ηλίου) (Loader kit SP035, Proxeon). Ο ρυθμός ροής στο nLC ήταν 300 nl min^{-1} . Τα θρυψινοποιημένα πεπτιδικά διαχωρίστηκαν και εκλούστηκαν σε γραμμική διαβάθμιση υδατο-ακετονιτριλίου, ενώ εισήχθησαν στο MS κατά την περιγραφή

που δίνεται στη βιβλιογραφία Aivaliotis et al. 2007, 2009 (Aivaliotis, Gevaert et al. 2007, Aivaliotis, Macek et al. 2009). Στο τρίτο σύστημα, τα πεπτίδια προσυγκεντρώθηκαν σε μια στήλη-παγίδευσης C18 διαστάσεων «75 μ m x 2cm» για 5 λεπτά χρησιμοποιώντας 0.1% TFA (v/v) με ρυθμό ροής 20 μ L/min και ακολούθως διαχωρίστηκαν στη βασική στήλη C18 διαστάσεων «75 μ m x 50cm» (και οι δυο: Acclaim Permap nanoviper, Thermo Scientific) χρησιμοποιώντας μία 120 λεπτών διαβάθμιση LC εύρους από 3-42% του 84% ACN σε 0.1% FA (v/v) με ρυθμό ροής 250 nL/min. Το «Orbitrap Fusion MS» λειτούργησε ακολουθώντας έναν δεδομένο-εξαρτώμενο τρόπο (data dependent manner; OT-Q-CID-IT). Τα ερευνητικά MS σκαναρίσματα αποκτήθηκαν στο Orbitrap (OT) με τιμές που κυμαίνονταν από 300 έως 2,000m/z και ανάλυση 60,000, ενώ για το MS/MS, η πρόδρομη απομόνωση στα 1.6m/z πραγματοποιήθηκε από το τετραπολικό (quadrupole; Q). Ο κατακερματισμός των 20 πιο έντονων ιόντων χρησιμοποιώντας CID, με κανονικοποιημένη ενέργεια πρόσκρουσης των 35% και γρήγορη ανάλυση MS των σκαναρισμάτων πραγματοποιήθηκε σε παγίδα ιόντων (ion trap; IT). Η δυναμική διάρκεια αποκλεισμού τέθηκε στα 15s με 10ppm ανοχή σε επιλεγμένα πρόδρομα μόρια και τα ισότοπά τους. Τα μεγέθη-στόχοι AGC ορίστηκαν στα 4.0x10⁵ and 1.0x10⁴ και οι μέγιστες φορές πραγματοποίησης ένεσης στα 50ms και 35ms για MS και MSn σκαναρίσματα, αντίστοιχα.

2.4.6 Επεξεργασία φασματομετρικών δεδομένων, ταυτοποίηση & σχετική ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών

Τα πρωτεϊνικά δείγματα που προέκυψαν από τα τρία είδη λεμφώματος πριν και μετά την επίδραση με Nutlin-3A, και δεν επισημάνθηκαν, ταυτοποιήθηκαν και σχετικά ποσοτικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό Progenesis LC-MS software (<http://www.nonlinear.com/progenesis/qi-for-proteomics/>) από τη Nonlinear Dynamics (Newcastle upon Tyne, U.K.) version 4.1. Τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά δείγματα που επισημάνθηκαν ισOTOπικά (ICPL) τέθηκαν σε επεξεργασία και ερμηνεύθηκαν για την ταυτοποίηση και σχετική ποσοτική ανάλυση των πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας το λογισμικό Mascot Software 2.2.0, της Matrix Science Ltd (London, UK) [Matrix Science, www.matrixscience.com]. Πρόκειται για ένα εξαιρετικά ικανό πρόγραμμα που εφαρμόζεται απευθείας σε πρωτογενή δεδομένα (raw files) της LC-MS/MS ανάλυσης πολύπλοκων πεπτιδικών μιγμάτων, επιτυγχάνοντας την εξομάλυνσή τους, το φιλτράρισμα του θορύβου και την επιλογή των μονο-ισOTOπικών κορυφών. Χρησιμοποιεί τον αλγόριθμο MOWSE (Molecular Weight SEarch), ο οποίος βασίζεται σε πιθανότητες και έχει τη δυνατότητα συσχέτισης των πειραματικά προσδιορισμένων πεπτιδικών αλληλουχιών με τις θεωρητικά προβλεπόμενες πεπτιδικές ακολουθίες από μια Βάση Δεδομένων επιλογής.

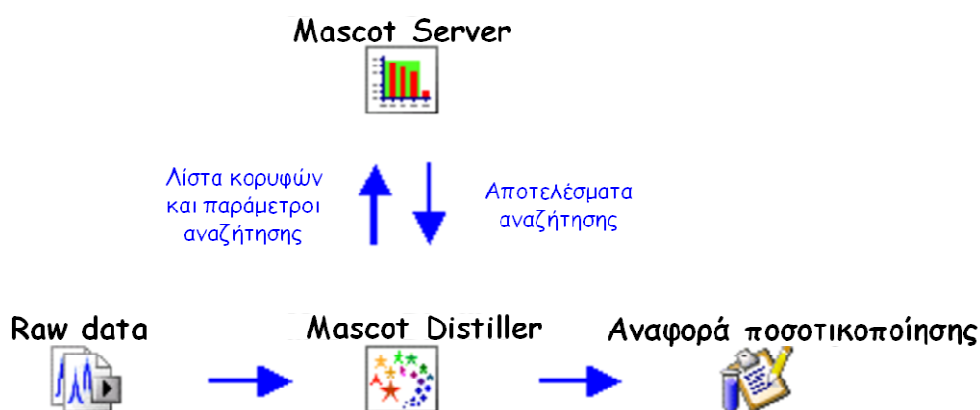


Εικόνα 14: Απεικόνιση της διαδικασίας βιοπληροφορικής επεξεργασίας δεδομένων

Στην εν λόγω πειραματική διαδικασία, επιλέχθηκε η πρωτεϊνική Βάση δεδομένων UniprotKB (Universal Protein Resource Knowledgebase). Πρόκειται για μια Βάση Δεδομένων που αναβαθμίζεται συστηματικά και βασίζεται στην πληροφορία που προσφέρουν οι πρωτογενείς πρωτεϊνικές «τράπεζες δεδομένων», όπως είναι η Swiss-Prot και η TrEMBL. Έτσι, προσδιορίστηκε αυτόματα το μοριακό βάρος των μονο-ϊσοτοπικών φασματικών κορυφών από το λογισμικό της Mascot και τα πεπτίδια που προέκυψαν από την αυτόλυση της θρυψίνης χρησιμοποιήθηκαν για την εσωτερική βαθμονόμηση των φασμάτων. Η εισαγωγή εσωτερικών πεπτιδικών προτύπων για τη διόρθωση των πεπτιδικών μαζών που μετρήθηκαν, επιτρέπει τη χρήση στενών ορίων ανοχής μάζας, αυξάνοντας έτσι την αξιοπιστία της πρωτεϊνικής ταυτοποίησης (τιμή συσχέτισης, correlation score). Αταίριαστα πεπτίδια ή πεπτίδια-προϊόντα αποτυχημένης πρωτεόλυσης δε χρησιμοποιήθηκαν στην αναζήτηση στη Βάση Δεδομένων. Οι πεπτιδικές μάζες που προέκυψαν συγκρίθηκαν με τη λίστα των θεωρητικών πεπτιδικών μαζών οι οποίες αντιστοιχούν σε όλες τις πρωτεΐνες, του ανθρώπινου είδους, που διατίθενται στη UniprotKB (Εικόνα 13).

Για τη σχετική ποσοτικοποίηση των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών, το σύννηθες πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται βασίζεται στις σχετικές εντάσεις των εκλούωμενων ιοντικών χρωματογραφημάτων (extracted ion chromatograms, XICs) των πρόδρομων μορίων (precursors), μέσα σε ένα μονό σετ δεδομένων. Αυτό σημαίνει ότι πρέπει να είναι διαθέσιμες οι πληροφορίες που υπάρχουν στα πρωτογενή δεδομένα, οι οποίες απουσιάζουν από τη λίστα των φασματικών κορυφών. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν δύο προγράμματα του Mascot, το Mascot Daemon και το Mascot Distiller. Με την πρώτη εφαρμογή, επιτυγχάνεται η μετατροπή των αρχείων από πρωτογενή δεδομένα σε mascot generic format (mgf), και η αυτόματη εισαγωγή τους στο Mascot server, χρησιμοποιώντας τις

ίδιες παραμέτρους με αυτές της αρχικής αναζήτησης στη Βάση Δεδομένων UniProtKB. Μετά την ολοκλήρωση της αναζήτησης, τα αποτελέσματα εισάγονται στο Mascot Distiller, ένα πρόγραμμα που δίνει υψηλής ποιότητας φασματικές κορυφές. Το Mascot Distiller χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση όλων των σημασμένων με ICPL πεπτιδίων και τον προσδιορισμό των μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων των πρωτεϊνών. Ως σταθερή (fixed) κυστεϊνική τροποποίηση ορίστηκε η καρβαμιδομεθυλίωση, ενώ ως μεταβλητή (variable) η φωσφορυλίωση, η οξειδωση της μεθειονίνης και φυσικά η $^{12}\text{C}_6$ - and $^{13}\text{C}_6$ - νικοτυλίωση λυσινών στο N-τερματικό άκρο. Τα πρωτογενή δεδομένα, λοιπόν, επεξεργάστηκαν στο Mascot Distiller και η αναζήτηση υποβλήθηκε στο Mascot server. Με την ολοκλήρωση της αναζήτησης, τα αποτελέσματα επέστρεψαν στο Mascot Distiller. Ακολουθώς, το εν λόγω πρόγραμμα δημιούργησε την αναφορά ποσοτικοποίησης, καθώς το πρόγραμμα παρέχει τη διττή δυνατότητα πρόσβασης τόσο στα πρωτογενή δεδομένα, όσο και στα αποτελέσματα αναζήτησης με Mascot (Mascot search results).



Εικόνα 15: Απεικόνιση της διαδικασίας που ακολουθείται για τη σχετική ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα του Mascot Distiller (τροποποιημένο σχήμα από τη σελίδα: <http://www.matrixscience.com>)

2.6 Βιοπληροφορική ανάλυση

Μετα-επεξεργασία μικροσυστοιχιών/φασματομετρικών δεδομένων-στατιστική ανάλυση

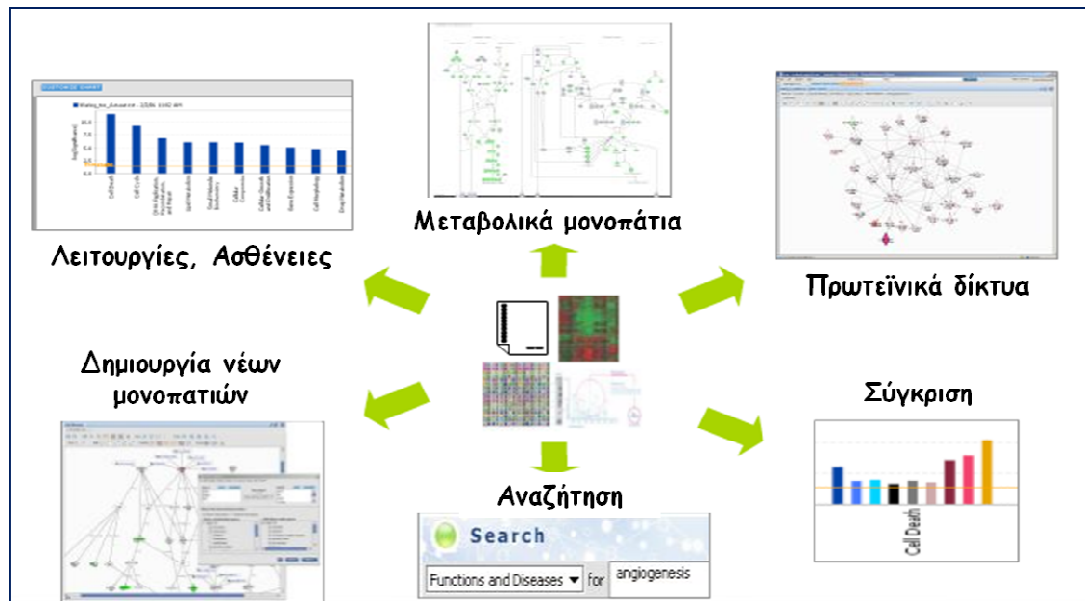
2.6.1 Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID)

Το σύνολο των γονιδίων και πρωτεϊνών που μεταβλήθηκαν σημαντικά μετά την επίδραση της Nutlin-3a στα λεμφωματικά κύτταρα HL, MCL και ALCL αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό εργαλείο λειτουργικής ταξινόμησης DAVID (Bioinformatics Resource v.6.7, <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>). Πρόκειται για ένα πολύτιμο λογισμικό-εργαλείο που είναι ελεύθερα διαθέσιμο στο ευρύτερο ευρευνητικό κοινό και διευκολύνει την ταξινόμηση, την απεικόνιση και τη σύγκριση μεγάλου όγκου πληροφορίας (γονιδιακές/πρωτεϊνικές λίστες) βάσει της συμμετοχής που σημειώνουν σε πλήθος γνωστών βιολογικών λειτουργιών και μηχανισμών.

Αρχικά, οι γονιδιακές λίστες (Affymetrix IDs) μετατράπηκαν σε Uniprot Ids χρησιμοποιώντας το εργαλείο μετατροπής «Gene Conversion Tool», προκειμένου να δημιουργηθεί μια κοινή «γλώσσα» σύγκρισης, ανάμεσα στα ταυτοποιημένα/σχετικά ποσοτικοποιημένα γονίδια και πρωτεΐνες. Ακολούθως, το σύνολο αυτό του μεταγραφήματος/πρωτεώματος κατατάχθηκε σε λειτουργικές υποκατηγορίες και μονοπάτια χρησιμοποιώντας τα εργαλεία «Functional Annotation tools», με σκοπό τελικά τη δημιουργία ομάδων γονιδίων/πρωτεϊνών που σχετίζονται λειτουργικά. Η λειτουργική μεταγραφική και πρωτεϊνωματική ανάλυση έγινε βάσει της συμμετοχής των γονιδίων/πρωτεϊνών σε γνωστά μονοπάτια κατηγοριοποίησης (KEGG, Panther, Reactome, BBID, BIOCARTA) και βάσει της ανάλυσης γονιδιακής οντολογίας (Gene Ontology, GO), σύμφωνα με τους όρους «Βιολογική διαδικασία» (BP, Biological Process), «Κυτταρικές δομές/οργανίδια» (CC, Cellular Component) και «Μοριακή λειτουργία» (MF, Molecular Function). Συγκεκριμένες ομάδες κατηγοριών ενδιαφέροντος που προέκυψαν επιλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση και ερμηνεία χρησιμοποιώντας τα ακόλουθα στατιστικά κριτήρια σημαντικότητας:

- 1) ελάχιστος αριθμός γονιδίων/πρωτεϊνών/ανά κατηγορία 2,
- 2) προσαρμοσμένη κατά Benjamini-Hochberg p-value ≤ 0.05 ,
- 3) αρχική πολλαπλάσια μεταβολή ≥ 2 . (fold change)

Ως πιο σημαντικές κατηγορίες από βιολογική άποψη θεωρήθηκαν αυτές που είχαν την καλύτερη τιμή εμπλουτισμού και χρησιμοποιούσαν τον μεγαλύτερο αριθμό γονιδίων.



Εικόνα 16: Απεικόνιση της λειτουργικής ανάλυσης του μεταγραφώματος/πρωτεώματος χρησιμοποιώντας ειδικά λογισμικά εργαλεία (τροποποιημένο σχήμα από τη σελίδα: <http://www.ingenuity.com>)

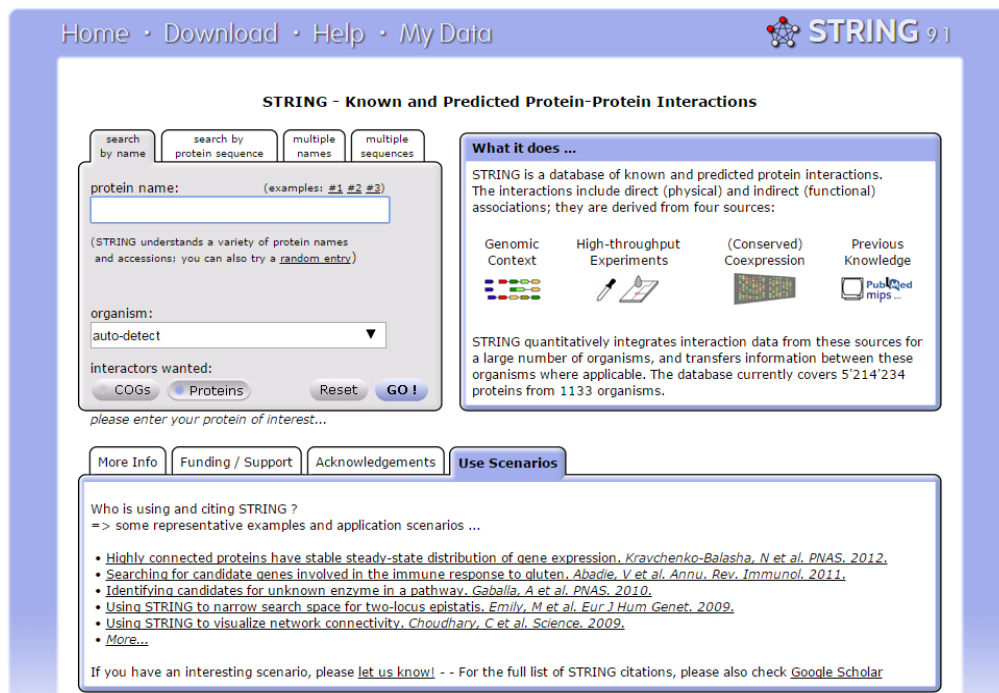
2.6.2 Perseus (v. 4.5)

Το Perseus (http://perseus_doku/) είναι ένα λογισμικό πακέτο για «shotgun» ανάλυση πρωτεωμικών δεδομένων, που διευκολύνει την εξόρυξη βιολογικά μεστών πληροφοριών από επεξεργασμένα ακατέργαστα αρχεία. Πραγματοποιεί βιοπληροφορικές αναλύσεις στα δεδομένα που παράγει το πρόγραμμα MaxQuant, ολοκληρώνοντας την πρωτεωμική ανάλυση. Το πρόγραμμα απαρτίζεται από ένα κεντρικό άξονα, πάνω στον οποίο προστίθενται πληθώρα «plugins», επιτρέποντας εύκολα την ενοποίηση αναρίθμητων ανεξάρτητων στατιστικών εργαλείων που μπορούν να φανούν χρήσιμα σε μια ανάλυση. Το Perseus περιλαμβάνει διάφορες στατιστικές μεθόδους και απεικονίσεις (μετατροπή δεδομένων (data transformation), κανονικοποίηση, προφίλ συσχέτισης, έλεγχο εμπλουτισμού, ταυτοποίηση μοτίβου, απεικονίσεις τύπου «volcano/scatter») κ.α. Επιπλέον, μπορεί να συνδυάσει δεδομένα από όλες τις «omics» πηγές για ανάλυση συστημάτων (systems-wide analyses).

2.6.3 Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING)

Η STRING (<http://string-db.org/>) αποτελεί μία ελεύθερα διαθέσιμη στο ευρύτερο ευρευνητικό κοινό βάση δεδομένων γνωστών και προβλεπόμενων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, η οποία σχεδιάστηκε με σκοπό τη συγκέντρωση, την αξιολόγηση και τη διάδοση αυτών, με τρόπο φιλικό και κατανοητό προς το χρήστη. Οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις μπορεί να είναι άμεσης (φυσικής επαφής) και έμμεσης (λειτουργικές) μορφής και προκύπτουν από τις ακόλουθες τέσσερις πηγές: (i) από ένα γενωμικό πλαίσιο (ii) από πειράματα υψηλής απόδοσης (iii) από (διατηρημένες) συν-εκφράσεις (iv) από προϋπάρχουσα βιβλιογραφικά καταχωρημένη γνώση. Η STRING ξεχωρίζει γιατί είναι από τους λίγους ιστοτόπους που διαθέτουν μία πληθώρα συμπληρωματικών πληροφοριών (πρωτεϊνικές περιοχές/δομές) και ένα σύνολο από πειραματικές, προβλεπόμενες, εισερχόμενες και βιβλιογραφικής επιμέλειας αλληλεπιδράσεις, που ενημερώνονται συνεχώς. Τελικά, η STRING αξιολογεί προσεκτικά και ενσωματώνει όλα αυτά τα στοιχεία, προκειμένου να αποκτήσει μια ενιαία βαθμολόγηση εμπιστοσύνης όλων των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, καταλήγοντας σε αναλυτικά πρωτεϊνικά δίκτυα που καλύπτουν >1000 οργανισμούς, 5 εκατομμύρια πρωτεΐνες και >200 εκατομμύρια αποθηκευμένες αλληλεπιδράσεις. Ειδικότερα, η παρούσα έκδοση 9.1 της STRING καλύπτει 5.214.234 πρωτεΐνες από 1133 οργανισμούς.

Αρχικά, οι γονιδιακές/πρωτεϊνικές λίστες ενδιαφέροντος εισήχθησαν στη βάση δεδομένων STRING, και αφού προσδιορίστηκε ο οργανισμός προέλευσης, προέκυψε μία διαδραστική εικόνα του προβλεπόμενου ομαδοποιημένου πρωτεϊνικού δικτύου και μία λίστα με τα προβλεπόμενα λειτουργικά συμμετέχοντα μόρια, με κατάταξη εκτιμώμενης εμπιστοσύνης. Η STRING, στη φάση αυτή, επιτρέπει την περαιτέρω επέμβαση στα δεδομένα, ενεργοποιώντας λιγότερες ή περισσότερες συνδέσεις με άλλα πρωτεϊνικά μόρια που σχετίζονται λειτουργικά. Παράλληλα, επιτρέπεται η πρόσβαση σε προεπισκοπήσεις δομικών πληροφοριών και περαιτέρω σελίδες που συνοψίζουν και επεξηγούν τα στοιχεία που οδηγούν στις προβλέψεις. Επιπλέον, το σύνολο των προβλέψεων που περιλαμβάνονται στην STRING είναι διαθέσιμα στο χρήστη με τη μορφή «flat-files» μέσω της ιστοσελίδας, καθιστώντας δυνατή και την ανεξάρτητη ανάλυση των υπολογισμών της βάσης δεδομένων.



Εικόνα 17: Απεικόνιση της αρχικής σελίδας τη βάσης δεδομένων STRING (<http://string-db.org/>)

2.6.4 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)

Η KEGG (<http://www.kegg.jp/>) είναι μία διεθνής εξειδικευμένη βάση δεδομένων που αναπτύχθηκε το 1995 από το Ινστιτούτο Χημικών Ερευνών του Πανεπιστημίου του Κιότο (Bioinformatics Center, Institute for Chemical Research, Kyoto University) σε συνεργασία με το Κέντρο Ανθρώπινου Γονιδιώματος του Πανεπιστημίου του Τόκιο (Human Genome Center, Institute of Medical Science, University of Tokyo) στο πλαίσιο του "Προγράμματος Ανάλυσης του Γονιδιώματος του Ανθρώπου" (Human Genome Project) στην Ιαπωνία (Kanehisa, Goto et al. 2004). Πρόκειται για μία συλλογή δεδομένων που προέκυψε από τη συγχώνευση πληροφοριών από 17 διαφορετικές βιολογικές βάσεις δεδομένων (Kanehisa, Goto et al. 2010), και παρέχει πληροφορίες για χημικές ενώσεις, ασθένειες, φάρμακα, γονιδιώματα, πρωτεΐνες, νουκλεοτιδικές/γονιδιακές αλληλουχίες, αντιστοιχίσεις γονιδίων και πρωτεϊνών σε μονοπάτια (μεταβολικά, βιοχημικά, μονοπάτια σηματοδότησης) στα οποία συμμετέχουν (Kanehisa, Goto et al. 2004), διατηρώντας καθορισμένους κωδικούς (αναγνωριστικά) για κάθε οντότητα χάριν διευκόλυνσης της αναφοράς των ερευνητών σε αυτή. Πρόκειται για πληροφορίες που έχουν προκύψει από την ενδελεχή συλλογή τους από τη βιβλιογραφία από ειδικούς επιστήμονες, ανανεώνονται συχνά και μπορούν να αναπαριστάνονται με τρεις τρόπους:

1. ως γράφοι (χάρτες μονοπατιών),
2. ως απλό κείμενο (simple list),

3. ως ιεραρχική λίστα

Η κωδικοποίηση του KEGG ακολουθείται ή συνδέεται έμμεσα με την κωδικοποίηση πολλών διεθνών βάσεων δεδομένων και προγράμματα, εξυπηρετώντας τη βιοπληροφορική έρευνα, τη μελέτη δεδομένων αναλύσεων «omics» (μεταγραφωματική, πρωτεωματική, μεταβολωμική) και προσομοιάζοντας συστήματα βιολογίας.

Στην ανάλυσή μας, οι γονιδιακές/πρωτεϊνικές λίστες ενδιαφέροντος εισήχθησαν στην ειδική φόρμα της βάσης δεδομένων KEGG όπου καθορίστηκε ο οργανισμός προέλευσης (hsa), το είδος της πληροφορίας ενδιαφέροντος, η εισαγωγή χρωματικής σήμανσης και η αναγνωριστική ονοματολογία των εισαγόμενων μορίων (UniProt). Ακολούθως πραγματοποιήθηκε η ομαδοποίηση και οπτικοποίηση των δεδομένων βάσει της ανάθεσής τους σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια και ο χρωματισμός των διαφορεικά εκφραζόμενων συμμετέχοντων μορίων. Τα μονοπάτια στη βάση δεδομένων “KEGG PATHWAY” αντιπροσωπεύουν τη μέχρι τώρα γνώση σχετικά με τις μοριακές αλληλεπιδράσεις και τα δίκτυα αντιδράσεων που αφορούν διάφορες διαδικασίες και συστήματα. Το χρώμα κόκκινο αντιστοιχούσε σε αύξηση της ποσότητας του συμμετέχοντος μορίου, το χρώμα πράσινο σε μείωση, ενώ το χρώμα ροζ σε απουσία του. Το μοντέλο αυτό απεικονίζει με απλό τρόπο τις δικτυακές δομές (κόμβοι, ακμές) του δικτύου, καθώς και τη μετα-επεξεργασία δεδομένων τόσο των κόμβων (γονιδίων/πρωτεϊνών) όσο και των ακμών (συσχετίσεις), επιτρέποντας την εκτίμηση των μοριακών καταλόγων, υπό το πρίσμα της συμμετοχής τους σε γνωστά μεταβολικά μονοπάτια.

2.6.5 Gene Ontology Consortium (GOC)

Η Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>) είναι ένα σύνολο βιολογικών βάσεων δεδομένων και ερευνητικών ομάδων που ασχολούνται ενεργά με τη μελέτη Γονιδιακής Οντολογίας ["The GO Consortium". Retrieved 2009-03-16.] Συμπεριλαμβάνει ένα πλήθος από βάσεις δεδομένων μοντέλων-οργανισμών, πρωτεϊνικές βάσεις δεδομένων πολλών ειδών και παρέχει ένα δομημένο ελεγχόμενο λεξιλόγιο (οντολογία) που περιγράφει τα γονίδια ή πρωτεΐνες σε τρία επίπεδα:

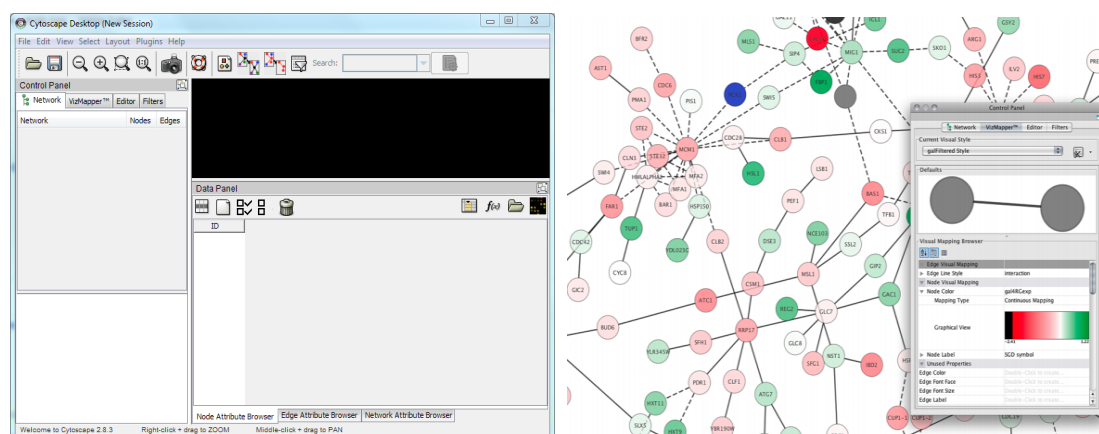
- cellular component (CC) (περιοχή του κυττάρου ή εξωκυττάριος χώρος όπου εντοπίζεται το γονίδιο ή πρωτεΐνη ενδιαφέροντος)
- molecular function (MF) (μοριακή λειτουργία του γονιδίου ή πρωτεΐνης ενδιαφέροντος) σε μοριακό επίπεδο, π.χ. κατάλυση ή δέσμευση)
- biological process (BP) (σύνολο βιολογικών διαδικασιών που επιτελούνται μέσα στο κύτταρο ή τον οργανισμό, π.χ. μεταγωγή σήματος).

Για την πρόσβαση στα δεδομένα έχουν αναπτυχθεί κατάλληλα εργαλεία λογισμικού.

2.6.6 Cytoscape (2.8.3)

Το Cytoscape αποτελεί ένα ανοιχτό λογισμικό, ένα ανεξάρτητο και πλήρες πρόγραμμα βιο-πληροφορικής ανάλυσης, το οποίο χρησιμοποιώντας γλώσσα προγραμματισμού Java, επιτρέπει στο χρήστη να δημιουργήσει δικά του δίκτυα ή επιλογής από βάσεις δεδομένων με σκοπό την ομαδοποίηση και οπτικοποίηση δικτύων μοριακών μονοπατιών και πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων.

Έχοντας ως μεγάλο πλεονέκτημα την επεκτασιμότητά του, η πλατφόρμα του Cytoscape διαθέτει πληθώρα "plugins" μέσω των οποίων μπορεί να γίνει εφαρμογή νέων αλγορίθμων, συμπληρωματικών αναλύσεων δικτύων επιλογής, προσθήκη βιολογικής σημασιολογίας (semantics), παραγωγή γραφικών παραστάσεων σε διάφορες μορφές (αρχαία εικόνας, PDF, κ.α.). Επιτρέπει την προσθήκη στα προς ανάλυση δίκτυα πρόσθετων δεδομένων (π.χ. προσθήκη προφίλ γονιδιακής/πρωτεϊνικής έκφρασης κ.α.) και τη δυνατότητα φιλτραρίσματος/επεξεργασίας του δικτύου βάσει επιλεγμένων κριτηρίων. Ως πηγές χρησιμοποιούνται διάφορες βάσεις δεδομένων, όπως η γονιδιακή οντολογία (Gene Ontology, GO)) και τα μοριακά μονοπάτια κατά KEGG, Wikipathways [<http://wikipathways.org/index.php/WikiPathways>] και Reactome. Έτσι, ο χρήστης μπορεί να δημιουργήσει δίκτυα με ποικίλες διατάξεις, χρώματα, και μορφές, αποτυπώνοντας γραφικά δίκτυα και διαγράμματα όπου επισημαίνεται η βιολογική σημασία κάθε δημιουργούμενης ομάδας, ενώ περιέχονται και σύνδεσμοι στο διαδίκτυο.



Εικόνα 18: Η αρχική οθόνη του προγράμματος Cytoscape (αριστερά) και ένα παράδειγμα ομαδοποίησης και επεξεργασίας πρωτεϊνικού δικτύου (δεξιά).

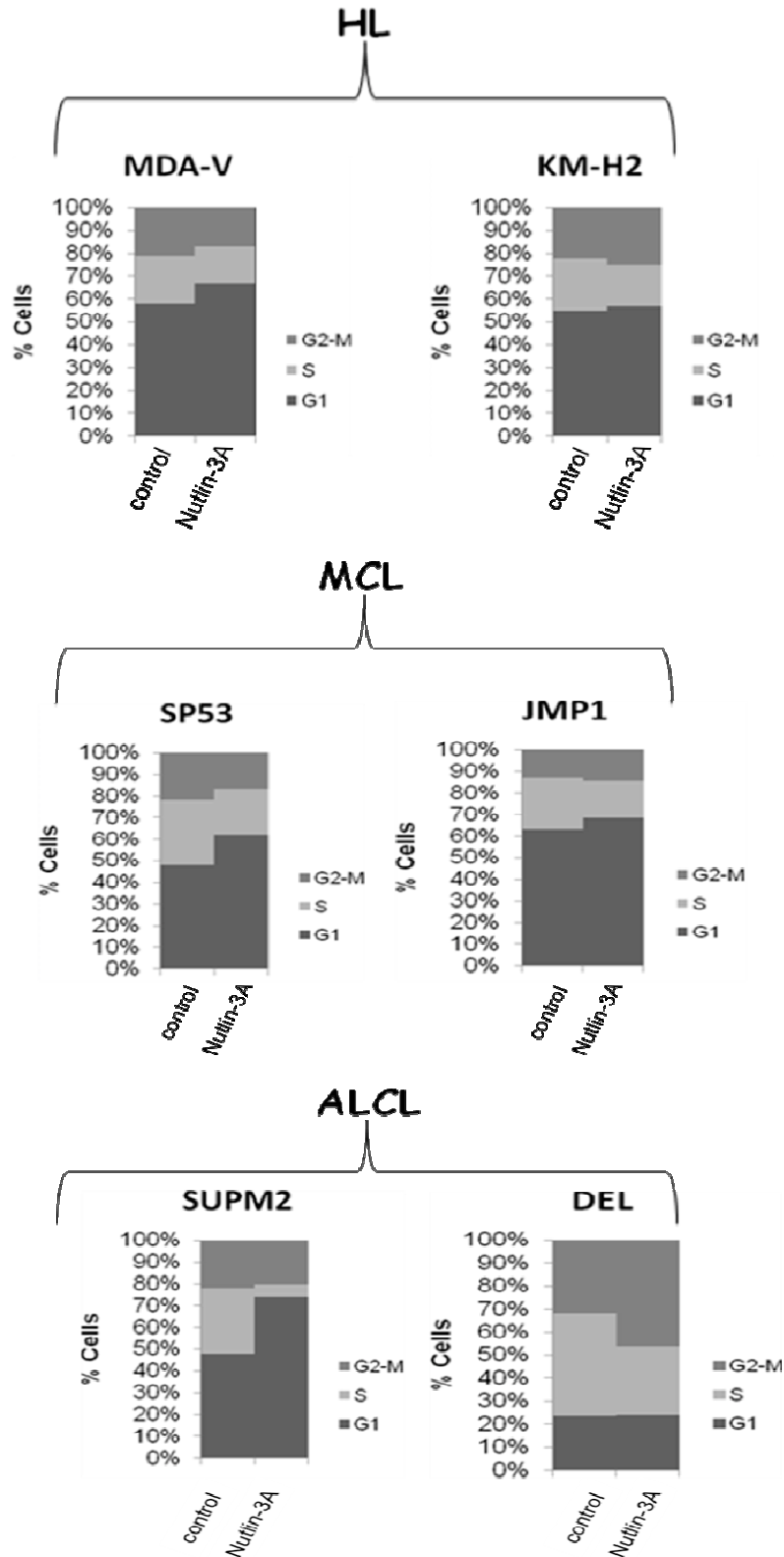
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Π.Ε.1 Γονιδιωματική (μεταγραφωματική) μελέτη του p53 σε Hodgkin και μη Hodgkin λεμφώματα

1^η Δραστηριότητα

Μελέτη του κυτταρικού κύκλου μετά από εφαρμογή της Nutlin-3A σε κυτταρικές σειρές λεμφώματος Hodgkin και μη-Hodgkin

Λαμβάνοντας υπόψιν τη γνώση ότι η πρωτεΐνη p53 επηρεάζει τον κυτταρικό κύκλο, αρχικά διερευνήθηκε η 24ωρη επίδραση που έχει η Nutlin-3A στην κατανομή των κυττάρων κατά τις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου, σε λεμφώματα Hodgkin και μη Hodgkin. Έτσι, χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής, χρώση με PI και τη μέθοδο ενσωμάτωσης BrdU πραγματοποιήθηκε ανάλυση του κυτταρικού κύκλου της απόκριση των εξεταζόμενων κυττάρων στην επίδραση του ανταγωνιστή του MDM2. Από την ιστογραμματική απεικόνιση των κυτταρικών φάσεων G1, S, και G2 που προέκυψε, μετρήθηκε το ποσοστό των κυττάρων σε κάθε φάση του κυτταρικού κύκλου. Σε γενικές γραμμές, παρατηρήθηκε ότι η ενεργοποίηση του p53 μετά την εφαρμογή της Nutlin-3A, προκάλεσε συνωστισμό των κυττάρων στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου, με ακόλουθη μείωση του κλάσματος της φάσης S (synthesis). Αναλυτικότερα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1 τα ποσοστά των κυττάρων στη φάση S μειώθηκαν κατά 20%, 22%, 30%, 29%, 80% και 33% στις κυτταρικές σειρές MDA-V, KM-H2, SP53, JMP-1, SUP-M2 και DEL αντίστοιχα, συγκριτικά με τα κύτταρα-μάρτυρες (κύτταρα χωρίς την επίδραση της Nutlin-3A). Επιπρόσθετα, στα κύτταρα της σειράς KM-H2, JMP-1 και DEL, διαπιστώθηκε τάση αύξησης και αύξηση του κλάσματος της φάσης G2/M αντίστοιχα, καταδεικνύοντας παύση του κυτταρικού κύκλου, τόσο στη φάση G1, όσο και στη φάση G2/M. Μόνο τα κύτταρα της κυτταρικής σειράς ALK+ ALCL DEL που διαθέτουν pf p53 δεν παρουσίασαν αύξηση στον αριθμό των κυττάρων που βρίσκονταν στη φάση G1 μετά από Nutlin-3A. Συνεπώς, τα παραπάνω δεδομένα κατέδειξαν ότι η χορήγηση της Nutlin-3A σε ανθρώπινα λεμφώματα με wt p53 οδήγησε σε παύση του κυτταρικού κύκλου, κυρίως στη φάση G1/S ή και στα δύο σημεία ελέγχου, τη φάση G1/S και G2/M (Εικόνα 1).

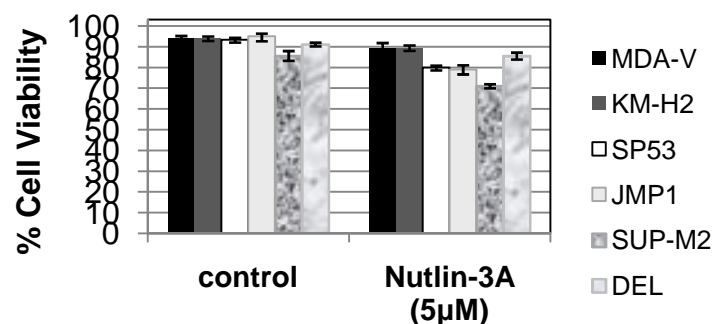


Εικόνα 1: Ανάλυση κυτταρικού κύκλου ανθρώπινων κυττάρων λεμφώματος Hodgkin (MDA-V, KM-H2) και μη Hodgkin (SP53, JMP1, SUPM2 και DEL), πριν (control) και μετά τη δράση της Nutlin -3A. Η μελέτη του κυτταρικού κύκλου έδειξε ότι κατά βάση, η Nutlin -3A επιφέρει παύση στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου, με εξαιρετική μείωση του κλάσματος της φάσης S στη σειρά SUPM2 (ALK+ ALCL).

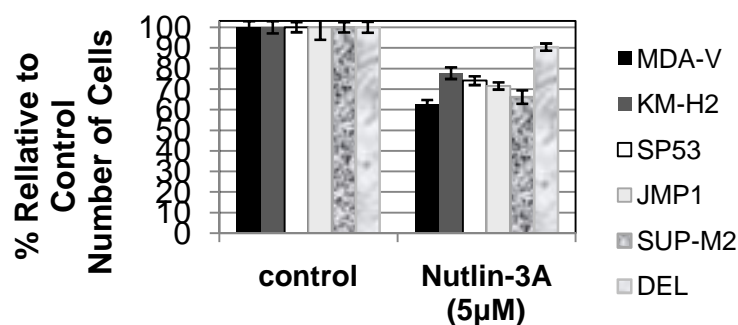
Επίδραση της Nutlin-3A στη βιωσιμότητα κυτταρικών σειρών λεμφώματος Hodgkin και μη-Hodgkin

Μετά την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου, εξετάστηκε αν η εφαρμογή της Nutlin-3A για 24 ώρες σε λεμφώματα HL και NHL επιδρά στο φαινότυπο των κυττάρων, οδηγώντας σε ένα διαφορετικό βιολογικό αποτέλεσμα. Παρατηρήθηκε ότι η Nutlin-3A ανέστειλε την ανάπτυξη των κυτταρικών σειρών ανθρώπινου λεμφώματος, σε ποσοστό που κυμάνθηκε από 71% (SUP-M2, ALCL; NHL) μέχρι και 89% (KM-H2; HL) (Εικόνα 2α). Η % σχετική αύξηση του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων μετά τη χορήγηση της Nutlin-3A, κατέδειξε τη μεγαλύτερη μείωση στην κυτταρική σειρά MDA-V (HL) σε ποσοστό 62,28%, ενώ τη μικρότερη στην κυτταρική σειρά SUP-M2 (NHL), σε ποσοστό 90,35%. (Εικόνα 2β).

(α)



(β)



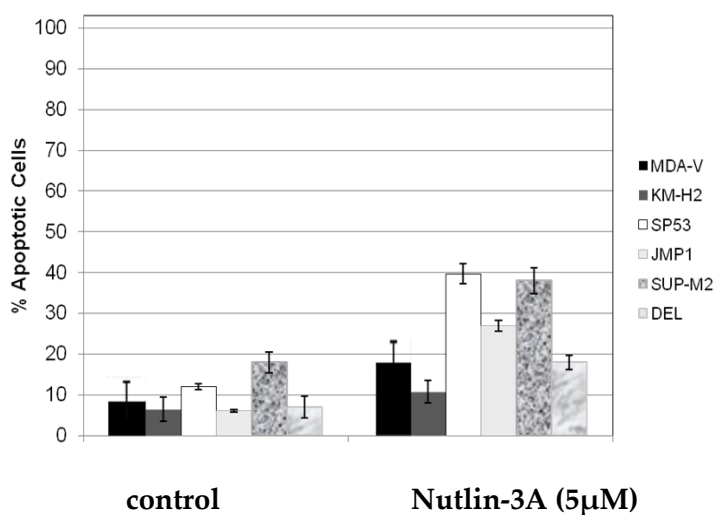
Εικόνα 2: Έλεγχος της βιωσιμότητας κυτταρικών σειρών λεμφώματος Hodgkin και μη-Hodgkin μετά από Nutlin-3A. Εφαρμογή της Nutlin-3A (5µM) σε λεμφώματα Hodgkin και μη-Hodgkin με wt p53 οδήγησε το p53 σε σταθεροποίηση και ενεργοποίηση, ενεργοποιώντας την οδό σηματοδότησης που ελέγχεται από αυτό, επάγοντας την κυτταρική απόπτωση. Συνακόλουθο αποτέλεσμα αυτού ήταν η καταγραφή της μείωσης της % κυτταρικής βιωσιμότητας και της % σχετικής αύξησης των βιώσιμων κυττάρων από 16% (α) έως και 40%(β) αντίστοιχα.

Επίδραση της Nutlin-3A στην απόπτωση κυτταρικών σειρών λεμφώματος Hodgkin και μη-Hodgkin.

Μέτρηση της απόπτωσης με Αννεξίνη-V

Η εκτίμηση της κυτταρικής απόπτωσης πραγματοποιήθηκε με την ανίχνευση της φωσφατιδυλοσερίνης στη μεμβράνη των υπό μελέτη λεμφωματικών κυττάρων, μέσω δέσμευσης αυτής με σημασμένη με FITC Αννεξίνη V και κάνοντας χρήση κυτταρομετρία ροής.

Τα αποτελέσματα έδειξαν μικρή και μεγάλη αύξηση του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου σε όλες τις κυτταρικές σειρές. Ειδικότερα, τα αποπτωτικά κύτταρα των σειρών MDA-V και DEL σημείωσαν αύξηση της τάξεως του 20%, ενώ αυτά της σειράς JMP-1 έδειξαν αύξηση κατά 27%. Η μικρότερη αποπτωτική εικόνα αποτυπώθηκε στην κυτταρική σειρά λεμφώματος Hodgkin, KM-H2 (11%), ενώ οι σειρές SP-53 και SUP-M2 παρουσιάστηκαν ως οι περισσότερο ευαίσθητες, σημειώνοντας θάνατο μέχρι και 40% (Εικόνα 3).

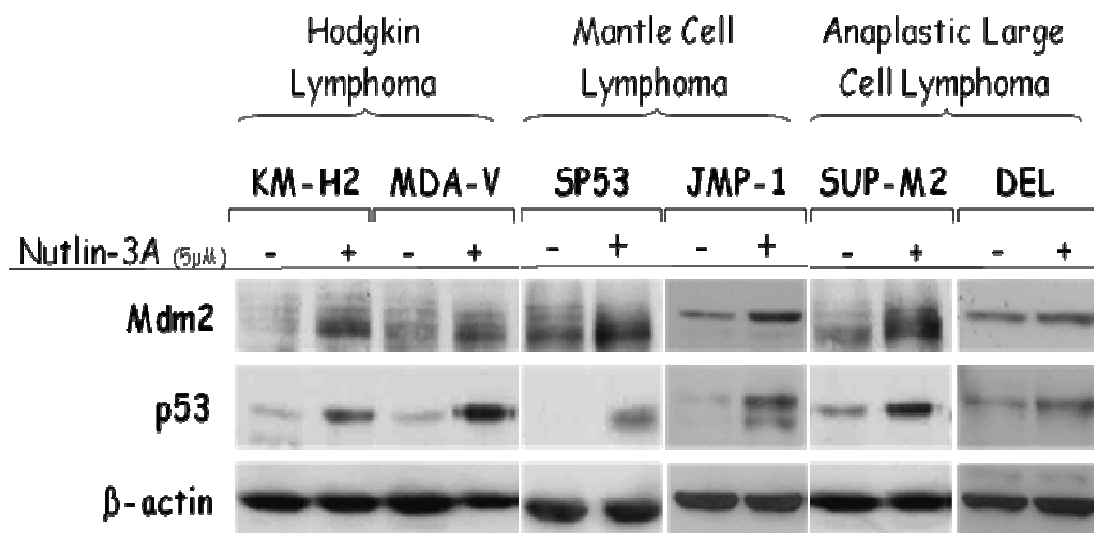


Εικόνα 3: Έλεγχος της απόπτωσης κυτταρικών σειρών λεμφώματος Hodgkin και μη-Hodgkin μετά από Nutlin-3A. Η εφαρμογή της Nutlin-3A σε κύτταρα λεμφώματος Hodgkin και μη-Hodgkin με wt p53 οδήγησε σε απόπτωση. Το ποσοστό απόπτωσης έφτασε το 40% κατά τη εκτίμηση του αποπτωτικού θανάτου εφαρμόζοντας χρώση Αννεξίνη-V στα υπό μελέτη κύτταρα.

2^η Δραστηριότητα

Διερεύνηση με ανοσοαποτύπωση κατά Western των αλλαγών έκφρασης της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 σε κυτταρικές σειρές ανθρώπινου λεμφώματος Hodgkin και μη-Hodgkin.

Προκειμένου να διερευνηθούν οι αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης της p53, μαζί με το φυσιολογικό της αναστολέα, MDM2, εφαρμόστηκε η μέθοδος ανοσοαποτύπωσης (Western Blot) σε έξι κυτταρικές σειρές λεμφώματος Hodgkin (MDA-V, KM-H2), και μη-Hodgkin (SP53, JMP-1 (Mo-1), SUP-M2 και DEL) μετά από Nutlin-3A. Σε όλες τις εξεταζόμενες κυτταρικές σειρές, οι πρωτεΐνες εμφάνισαν παρόμοια επίπεδα έκφρασης, με την p53 και την MDM2 να σημειώνουν αύξηση μετά την επίδραση της Nutlin-3A. Η p53 σημείωσε τη μεγαλύτερη αύξηση στις MDA-V (HL), τη JMP-1 (MCL) και τη SUP-M2 (ALCL). Η MDM2 βρέθηκε ότι εκφράζεται σε αναλογία με το ποσοστό έκφρασης της φυσιολογικά ρυθμιζόμενης από αυτή p53. Για την εξασφάλιση της λειτουργικότητας του πειράματος χρησιμοποιήθηκε β-ακτίνη, η έκφραση της οποίας παρέμεινε σταθερή, πριν και μετά τη δράση της Nutlin-3A (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Ανίχνευση της επίδρασης της Nutlin-3A σε επίπεδο πρωτεϊνικής έκφρασης με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Εφαρμογή της Nutlin -3A σε wt p53 κυτταρικές σειρές λεμφώματος, του Hodgkin (MDA-V, KM-H2), του μανδύα (SP53, JMP1) και του αναπλαστικού λεμφώματος από μεγάλα κύτταρα (SUPM2 και DEL) έδειξε αύξηση στην *in vitro* έκφραση των πρωτεϊνών p53 και MDM2, όπως αυτή ανιχνεύεται με Western Blot.

Ακολούθως, εφαρμόσαμε μικροσυστοιχίες DNA και πρωτεωμική ανάλυση, με σκοπό τον εντοπισμό και τη μελέτη των γονιδίων που διαφοροποιήθηκαν σημαντικά ως προς τη μεταγραφή και τη μετάφρασή τους, μετά τη σταθεροποίηση και ενεργοποίηση της p53 από την Nutlin-3A. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε διερευνητική μεταγραφωματική και πρωτεωμική ανάλυση και στις έξι κυτταρικές σειρές. Για να διασφαλιστεί, όμως, η βέλτιστη επαναληψιμότητα, ακρίβεια, συνεπώς και αξιοπιστία των δεδομένων που προέκυψαν από της υψηλής ανάλυσης παραπάνω τεχνολογίες, προβήκαμε στην επιλογή τριών εκ των έξι κυτταρικών σειρών, μία για κάθε είδος λεμφώματος. Έτσι, λαμβάνοντας υπόψιν και τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης της p53 μετά

από N3A, επιλέχθηκε η MDA-V για το λέμφωμα HL, η JMP-1 για το λέμφωμα MCL και η SUP-M2 για το λέμφωμα ALCL. Οι τρεις προαναφερθείσες κυτταρικές σειρές, υποβλήθηκαν σε πολλαπλές (βιολογικές και τεχνικές) επαναλήψεις των αναλυτικών αυτών διαδικασιών, εξασφαλίζοντας τη στατιστική σημαντικότητα στα αποτελέσματα που προέκυψαν, βάσει των σχετικών συχνοτήτων εμφάνισής τους.

3^η Δραστηριότητα

Εκτίμηση των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης με μικροσυστοιχίες μετά τη χορήγηση της Nutlin-3A σε κυτταρικές σειρές λεμφώματος Hodgkin και μη-Hodgkin.

Για τη μελέτη των γονιδίων που συμμετέχουν στην ενεργοποίηση και σταθεροποίηση του p53 μέσω Nutlin-3A, πραγματοποιήθηκε απομόνωση εκχυλίσματος ολικού κυτταρικού RNA (παράγραφος 2.2.11) τόσο στα υπό μελέτη κύτταρα ελέγχου (χωρίς την επίδραση της Nutlin-3A), όσο και σε κύτταρα που είχε επιδράσει η Nutlin-3A για 24 ώρες. Ακολουθώντας, το RNA των δειγμάτων, αφού ελέγχτηκε ποιοτικά (παράγραφος 2.2.12-13), υβριδίστηκε πάνω στα προκατασκευασμένα πλακίδια U133 Plus 2.0 Affymetrix GeneChips, σύμφωνα με τα πρωτόκολλα της «Affymetrix Core Facility» (παράγραφος 2.3). Χρησιμοποιώντας κατάλληλα υπολογιστικά προγράμματα του τμήματος «Bioinformatics» του «The University of Texas M.D. Anderson Cancer Center» (Houston, TX, USA), τα αρχεία που προέκυψαν αναλύθηκαν, κανονικοποιήθηκαν και φιλτραρίστηκαν, καταλήγοντας τελικά σε μια συνολική λίστα γονιδίων (Παράρτημα I/Πίνακας 1) για κάθε κυτταρική σειρά ξεχωριστά και συνεπώς για καθένα από τα τρία είδη λεμφώματος (παράγραφος 2.3). Από την ανάλυση των δεδομένων που πραγματοποιήθηκε, πολλά γονίδια παρουσίασαν σημαντικές διαφοροποιήσεις ως προς τη μεταγραφή τους μετά τη σταθεροποίηση και ενεργοποίηση της p53 από τη Nutlin-3A. Στο Παράρτημα I, στον Πίνακα 1, παρατίθεται αναλυτικά ο κατάλογος των διαφοροποιημένων mRNAs των τριών ειδών λεμφώματος, ενώ στις εικόνες 5 και 6 ακολουθεί η αποτύπωσή τους.

Π.Ε.2 Ποιοτική και ποσοτική πρωτεωμική μελέτη της κυτταρικής επίδρασης της επαγόμενης από τη Nutlin-3A σταθεροποίησης και ενεργοποίησης του p53 σε Hodgkin και μη Hodgkin λεμφώματα

1^η Δραστηριότητα

Ταυτοποίηση και σχετική ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών στους τρεις τύπους λεμφωμάτων των οποίων τα επίπεδα μεταβάλλονται σημαντικά μετά τη σταθεροποίηση και ενεργοποίηση της p53.

Για τον προσδιορισμό και τη μελέτη των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην ενεργοποίηση και σταθεροποίηση του p53 μετά από Nutlin-3A, πραγματοποιήθηκε απομόνωση πρωτεϊνών ολικού κυτταρικού εκχυλίσματος στα κύτταρα που είχε επιδράσει η Nutlin-3A (5μM, 24h) και στα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου (χωρίς Nutlin-3A) (παράγραφος 2.2.5). Οι διαδικασίες που περιγράφηκαν αναλυτικά στις παραγράφους 2.2.6-8, 2.4 και 2.5 είχαν ως αποτέλεσμα τη συγκριτική πρωτεωμική ανάλυση των λεμφωματικών σειρών MDA-V, JMP-1, SUP-M2, πριν και μετά τη χορήγηση της Nutlin-3A. Το σύνολο των πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν και παρουσίασαν διαφορεική ρύθμιση μετά την ενεργοποίηση της p53 μέσω Nutlin-3A στα υπό μελέτη λεμφώματα, παρατίθεται αναλυτικά στο Παράρτημα II, στον Πίνακα 2 και 3, ενώ αποτυπώνεται στις εικόνες 10-12 που ακολουθούν. Ειδικότερα, ταυτοποιήθηκαν 4923 πρωτεΐνες, εκ των οποίων οι 4100 εντοπίστηκαν στο λέμφωμα HL, οι 3979 στο λέμφωμα MCL και οι 3960 στο λέμφωμα ALCL.

2^η Δραστηριότητα

Χαρακτηρισμός των πρωτεϊνικών τροποποιήσεων σε κάθε λεμφωματική κυτταρική σειρά, μετά τη σταθεροποίηση και ενεργοποίηση της p53 από την Nutlin-3A.

Εξαιτίας του σημαντικού ρόλου των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων των πρωτεϊνών, τόσο κατά τη διάρκεια της μετάφρασής τους (co-translation), όσο και μετά (post-translation), αναζητήσαμε στα δεδομένα της πρωτεωμικής μας ανάλυσης ποιές πρωτεΐνες έχουν βρεθεί με φωσφορυλίωση και ακετυλίωση. Θελήσαμε να βρούμε, δηλαδή, ποιές πρωτεΐνες συμμετέχουν σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος και είναι πολύ σημαντικές για τη ρύθμιση της βιολογίας του κυττάρου, οι οποίες σε περίπτωση απορρύθμισής τους, οδηγούν σε παθογένεια (καρκίνος, λεμφώματα).

Από την ανάλυση αυτή βρέθηκαν, όπως φαίνεται και στην εικόνα 5 που ακολουθεί, 297 πρωτεΐνες να είναι φωσφορυλιωμένες σε κατάλοιπα σερίνης,

θρεονίνης και τυροσίνης (Παράρτημα II /Πίνακας 4). Οι πρωτεΐνες παρουσίασαν μεγαλύτερο ποσοστό φωσφορυλίωσης σε κατάλοιπα σερίνης, ακολούθως θρεονίνης και τελευταία τυροσίνης. Οι 146 εντοπίστηκαν στο ALCL, οι 125 στο HL και οι 36 στο MCL. Οι φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες φαίνεται να είναι διαφορετικές στους τρεις λεμφωκυτταρικούς τύπους, με εξαιρετικά μικρό αριθμό αλληλεπικάλυσης μεταξύ τους ανά δύο κυτταρικές σειρές (6 στο ALCL/MCL, 1 στο MCL/HL και 4 στο HL/ALCL), ενώ δεν βρέθηκαν φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες που να είναι κοινές και στα τρία είδη λεμφώματος. Συνολικά, σε κάθε κυτταρική σειρά προσδιορίστηκε ένας μεγάλος αριθμός μοναδικών πρωτεϊνών (136 στο ALCL, 120 στο HL και 29 στο MCL) που δείχνει τη χαρακτηριστική σηματοδοτική ενεργοποίηση που συμβαίνει σε κάθε μία.

Εικόνα 5: Ανίχνευση της επίδρασης της Nutlin-3A σε επίπεδο φωσφορυλιωμένης πρωτεϊνικής έκφρασης. Η εφαρμογή της Nutlin -3A στις τρεις wt p53 κυτταρικές σειρές λεμφώματος, του Hodgkin (MDA-V), του μανδύα (JMP1) και του αναπλαστικού λεμφώματος από μεγάλα κύτταρα (SUPM2) φαίνεται ότι επηρέασε με διαφορετικό τρόπο τις φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες κάθε σειράς, υποδηλώνοντας ότι κάθε διαφορετική κυτταρική κατάσταση ενεργοποιείται από διαφορετικό είδος σήματος. Το χρώμα αντιστοιχεί σε παρουσία (κόκκινο)/απουσία (μαύρο) της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης, ενώ η ένταση του χρώματος αντικατοπτρίζει το βαθμό παρουσίας/έκφρασης.

Αντίστοιχα, πραγματοποιήθηκε παρόμοια επεξεργασία των αποτελεσμάτων πρωτεωμικής ανάλυσης για τον εντοπισμό των πρωτεϊνών με ακετυλίωση σε

κατάλοιπα λυσίνης, και βρέθηκαν 133 ακετυλιωμένες πρωτεΐνες (Εικόνα 6; Παράρτημα II /Πίνακας 4). Από αυτές, οι 59 εντοπίστηκαν στο ALCL, οι 44 στο MCL και οι 39 στο HL. Και σε αυτήν την περίπτωση, ο αριθμός των μοναδικών ακετυλιωμένων πρωτεϊνών σε κάθε κυτταρική σειρά ήταν αρκετά μεγάλος, δείχνοντας την ετερογένεια όσον αφορά το φαινόμενο της ακετυλίωσης των πρωτεϊνών στις τρεις διαφορετικές κυτταρικές καταστάσεις. Οι ακετυλιωμένες πρωτεΐνες παρουσίασαν και εδώ πολύ μικρό αριθμό αλληλεπικάλυψης μεταξύ τους συγκρίνοντας ανά δύο τις κυτταρικές σειρές (4 στο ALCL/ MCL, 3 στο MCL/HL και 3 στο HL/ALCL), ενώ βρέθηκε μόλις μία ακετυλιωμένη πρωτεΐνη να είναι κοινή και στα τρία είδη λεμφώματος. Συνολικά, σε κάθε κυτταρική σειρά εντοπίστηκε ένας μεγάλος αριθμός μοναδικών πρωτεϊνών (52 στο ALCL, 37 στο MCL και 33 στο HL) που δείχνει τη χαρακτηριστική σηματοδοτική ενεργοποίηση που συμβαίνει σε κάθε μία.

Εικόνα 6: Ανίχνευση της επίδρασης της Nutlin-3A σε επίπεδο ακετυλιωμένης πρωτεϊνικής έκφρασης. Η εφαρμογή της Nutlin -3A στις τρεις wt p53 κυτταρικές σειρές λεμφώματος, HL, MCL, ALCL, φαίνεται ότι επηρέασε διαφορετικά τις ακετυλιωμένες πρωτεΐνες κάθε σειράς, υποδηλώνοντας ότι κάθε διαφορετική κυτταρική κατάσταση επάγεται από διαφορετική σηματοδοτική οδό. Το χρώμα αντιστοιχεί σε παρουσία (κόκκινο)/απουσία (μαύρο) της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης, ενώ η ένταση του χρώματος αντικατοπτρίζει το βαθμό παρουσίας/έκφρασης.

3^η Δραστηριότητα

Συγκριτική μελέτη των αποτελεσμάτων πρωτεωμικής και μεταγραφικής ανάλυσης.

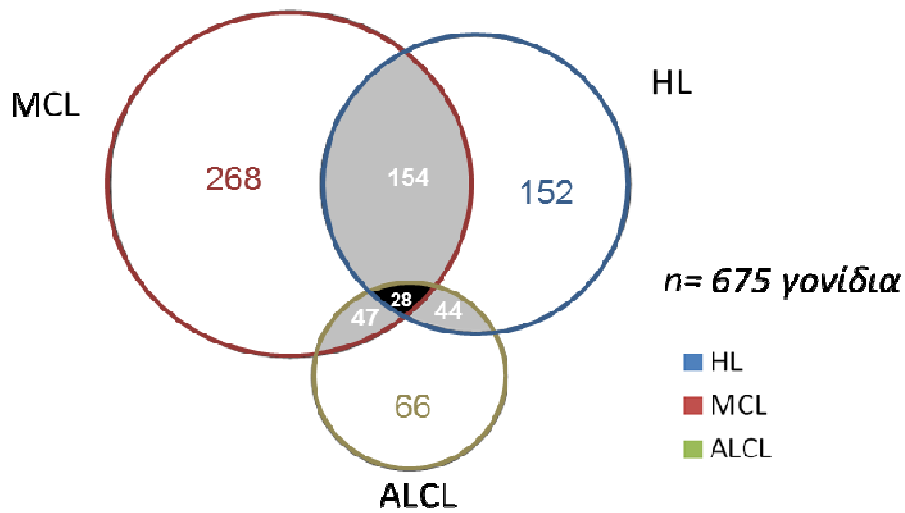
I. Μελέτη και σύγκριση των αποτελεσμάτων της μεταγραφικής ανάλυσης κάθε λεμφωματικής κυτταρικής σειράς μετά από N3A.

Διαφορική ανάλυση του μεταγραφώματος των λεμφωματικών κυτταρικών σειρών HL, MCL και ALK+ ALCL +/- N3A

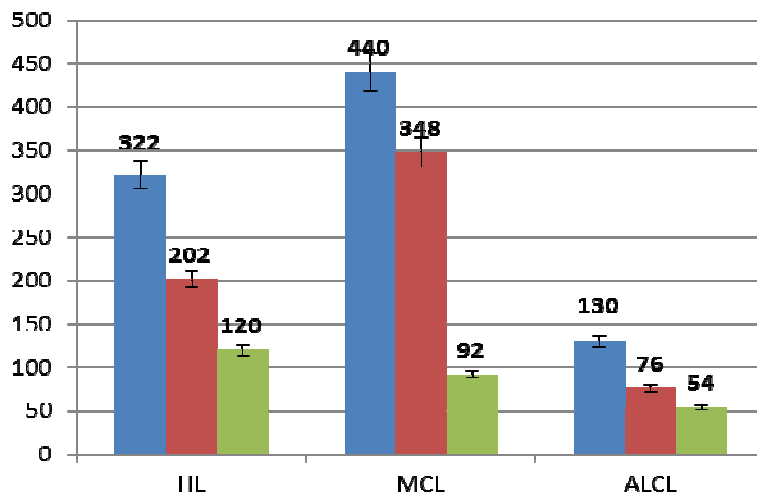
Ολοκληρώνοντας τη συγκριτική ανάλυση του μεταγραφώματος των τριών διαφορετικών λεμφωματικών σειρών της μελέτης μας μετά από την επίδραση της Nutlin-3A, προέκυψαν 675 μεταγραφώματα με τις αλλαγές στο επίπεδο του mRNA (fold change) να είναι ίσο ή μεγαλύτερο του +/-2 (Εικόνα 5- 6). Τα αποτελέσματα της μεταγραφικής ανάλυσης παρατίθενται αναλυτικά στο Παράρτημα I, στον Πίνακα 1, ενώ παρακάτω παρουσιάζονται συνοπτικά, τα πιο σημαντικά ευρήματα με σκοπό τη διευκόλυνση εξαγωγής βιολογικών συμπερασμάτων.

Γενικότερα, το μεταγράφημα των τριών λεμφωματικών σειρών μετά από Nutlin-3A παρουσίασε μία μικρή αλληλοεπικάλυψη, υποδεικνύοντας τις σημαντικές διαφορές που παρατηρούνται σε απόκριση του ανταγωνιστή της MDM2 και που συνοψίζουν τη διαφορετική βιολογική τους βάση (Εικόνας 7). Πιο συγκεκριμένα, τα λεμφώματα του μανδύα και του Hodgkin περιείχαν 154 κοινά γονίδια, αποτελώντας το μεγαλύτερο αριθμό των κοινών γονιδίων. Ακολούθως, τα λεμφώματα του μανδύα και του αναπλαστικού από μεγάλα κύτταρα διέθεταν 47 κοινά γονίδια, ενώ τα λεμφώματα του Hodgkin και του αναπλαστικού 44. Παράλληλα, η σύγκριση των μεταβολών του mRNA των τριών κυτταρικών σειρών προσδιόρισε 28 κοινά γονίδια. Τα απορρυθμισμένα μεταγραφώματα που βρέθηκαν ότι είναι «μοναδικά», δηλαδή εκφράζονται μόνο σε μία σειρά, ήταν 268 για το λέμφωμα του μανδύα, 152 για το λέμφωμα του Hodgkin και 66 για το αναπλαστικό λέμφωμα από μεγάλα κύτταρα (Εικόνα 7α, Παράρτημα I /Πίνακας 1). Επιπλέον, από τα συνολικά 440 απορρυθμισμένα mRNAs που εντοπίστηκαν στο λέμφωμα του μανδύα μετά από N3A, το 79% παρουσίασε αύξηση στη μεταγραφική ρύθμιση, ενώ το 21% μείωση. Ομοίως, στο HL, 63% και 37% από τα συνολικά 322 απορρυθμισμένα mRNAs εμφανίστηκαν με αυξημένα και μειωμένα επίπεδα αντίστοιχα. Τέλος, στο ALCL, η αύξηση και η μείωση του ποσοστού μεταγραφικής ρύθμισης στα συνολικά 130 απορρυθμισμένα mRNAs έφτασε το 53% και 42% αντίστοιχα (Εικόνα 7β, Παράρτημα I /Πίνακας 1).

(α)



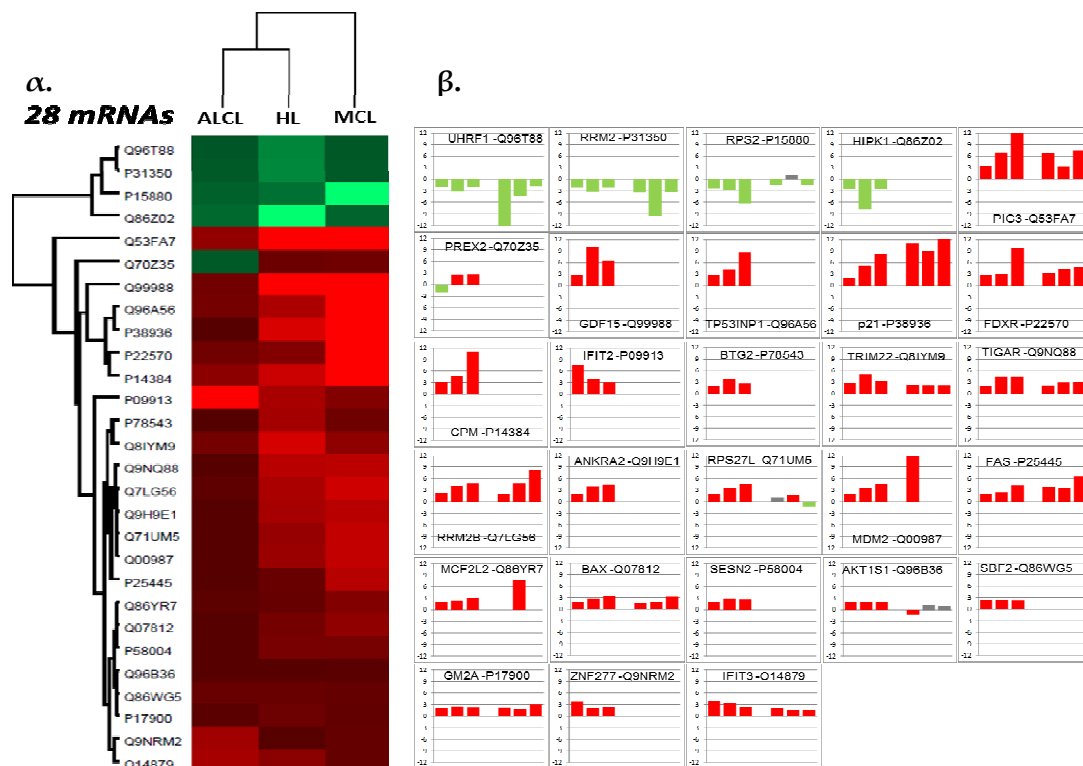
(β)



Εικόνα 7: Ιστογράμματα που δείχνουν το βαθμό κάλυψης των απορρυθμισμένων μεταγραφημάτων σε HL, MCL, ALCL λεμφώματα. (α) Στη διαγραμματική αποτύπωση (Venn diagram) συνοψίζονται οι μοναδικές και κοινές σχέσεις που δημιουργούνται κατά τη σύγκριση των αποτελεσμάτων που προκύπτει από τη διαφορική ανάλυση του μεταγραφήματος των λεμφωματικών κυτταρικών σειρών HL, MCL και ALK+ ALCL +/- N3A. Συνοπτικά, τη μεγαλύτερη αλληλοεπικάλυψη κατέδειξαν τα λεμφώματα του μανδύα και του Hodgkin (154 κοινά γονίδια), την υψηλότερη τιμή μοναδικών γονιδίων παρουσίασε το λέμφωμα του μανδύα (268), ενώ 28 γονίδια ήταν κοινά και στα τρία λεμφώματα. (β) Στο ραβδόγραμμα απεικονίζεται ο συνολικός αριθμός των απορρυθμισμένων γονιδίων κάθε κυτταρικής σειράς (μπλε χρώμα) και η διακύμανση στην έκφρασή τους (υπερ-έκφραση: κόκκινο χρώμα, υπο- έκφραση: πράσινο χρώμα). Οι τιμές πάνω από τις στήλες δείχνουν ότι το λέμφωμα του μανδύα παρουσίασε τη μεγαλύτερη αύξηση στη μεταγραφική έκφραση, ενώ το αναπλαστικό λέμφωμα από μεγάλα κύτταρα παρουσίασε τη μικρότερη.

Συγκριτική ανάλυση στα κοινά μεταγραφώματα των τριών λεμφωματικών σειρών μετά από Ν3Α.

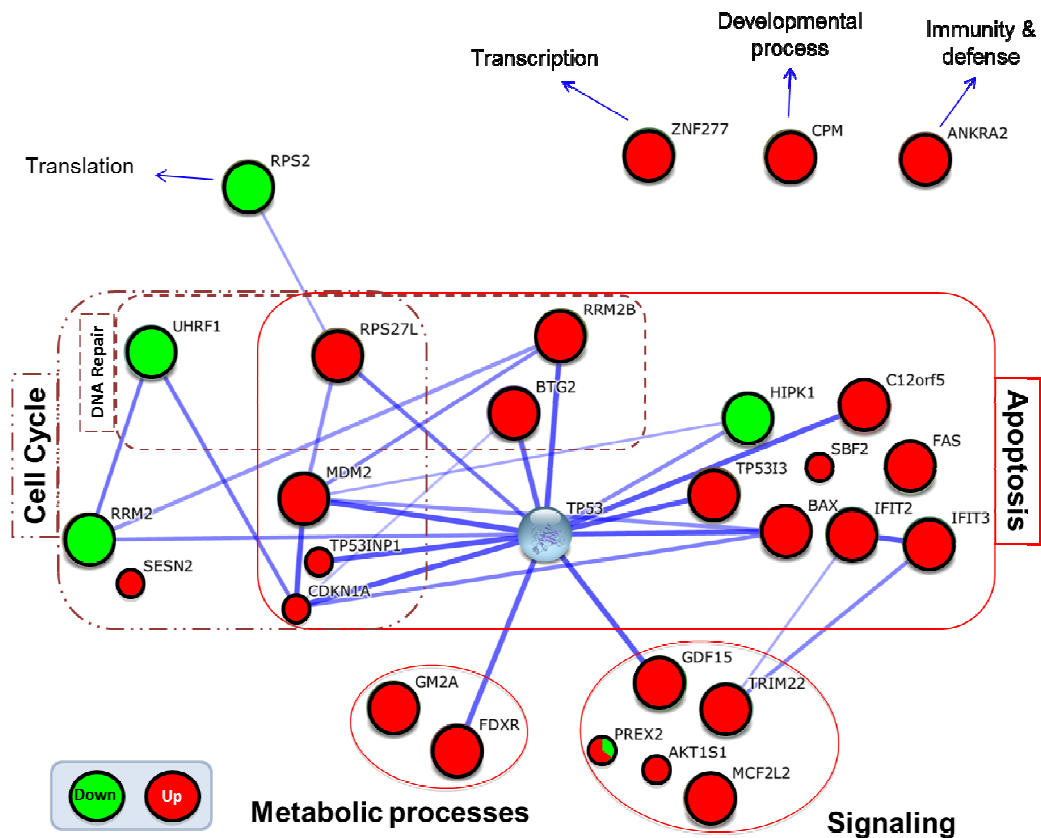
Η σύγκριση των μεταβολών του mRNA των τριών σειρών προσδιόρισε 28 κοινά γονίδια (Εικόνα 8α, Παράρτημα Ι /Πίνακας 4). Όλα τα γονίδια παρουσίασαν παρόμοια μεταβολή στο μεταγράφημά τους, με την εξαίρεση του PREX2, το οποίο βρέθηκε να έχει μειωμένα επίπεδα στο ALCL και αυξημένη ρύθμιση στις άλλες δύο σειρές. Η πλειονότητα των κοινών γονιδίων σημείωσε αύξηση στα επίπεδα του mRNA τους (24 στο HL και MCL, 23 στο ALCL). Μόλις τέσσερα και πέντε γονίδια εμφάνισαν μείωση στο μεταγράφημά τους στις σειρές HL/MCL και ALCL αντίστοιχα. Στη σειρά του λεμφώματος του μανδύα, παρατηρήθηκαν γονίδια έως τρεις φορές πιο αυξημένης ρύθμισης στο mRNA τους, συγκριτικά με αυτά της μειωμένης ρύθμισης. Αντίθετα, οι άλλες δύο σειρές παρουσίασαν μικρή απόκλιση ανάμεσα στα υπερ- και στα υπο- ρυθμισμένα γονίδια. Όπως φαίνεται και στο παρακάτω δενδρόγραμμα, τα λεμφώματα του HL και ALCL ομαδοποιήθηκαν και διαχωρίστηκαν από το λέμφωμα MCL, υπογραμμίζοντας το σημαντικό ποσοστό ομοιότητας ανάμεσα στα δύο πρώτα (Εικόνα 8α, Παράρτημα Ι /Πίνακας 4).



Εικόνα 8: Θερμικός χάρτης (α) και διαγραμματική απεικόνιση (β) της μεταγραφικής ρύθμισης των γονιδίων που είναι κοινά και στις τρεις ομάδες λεμφώματος. (α) Στο δενδρόγραμμα ομαδοποίησης απεικονίζεται η ομοιόμορφη κατανομή των μεταγραφικών προφίλ έκφρασης των κοινών γονιδίων στις τρεις λεμφωματικές κυτταρικές σειρές μελέτης. Τα θετικά ρυθμιζόμενα γονίδια χρωματίζονται με κόκκινο χρώμα, ενώ τα αρνητικά με πράσινο, με την ένταση του χρώματος να αντικατοπτρίζει το βαθμό ρύθμισης. Τα λεμφώματα του HL και ALCL ομαδοποιούνται και διαχωρίζονται από το

MCL, υποδηλώνοντας ένα σημαντικότερο ποσοστό ομοιότητας ανάμεσα στα δύο πρώτα. (β) Στην εικόνα αυτή, σε κάθε κουτί (αριστερά) αποτυπώνεται το μοτίβο έκφρασης κάθε ενός εκ των 28 κοινών μεταγραφημάτων στα τρία λεμφώματα. Σε κάποια κουτιά (17), η δεξιά τριπλέτα από ραβδογράμματα αντιστοιχεί στο μοτίβο έκφρασης των γονιδίων σε επίπεδο πρωτεϊνών, όπως βρέθηκαν στην πρωτεωμική ανάλυση. Όπως φαίνεται και στις εικόνες, η πληθώρα των κοινών μεταγραφημάτων υπερ-εκφράζονται (25/28), με τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά προφίλ έκφρασης να συμφωνούν.

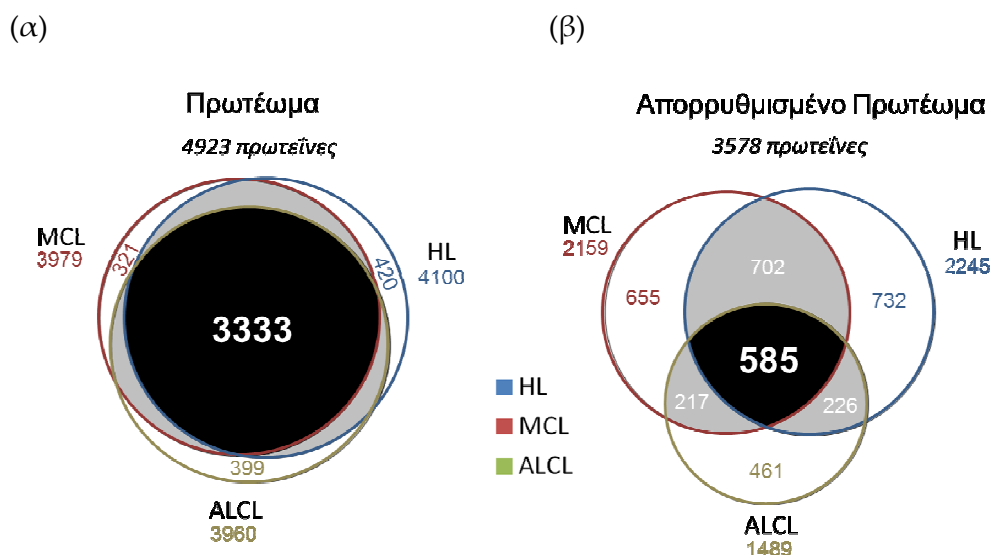
Στη συνέχεια διερευνήθηκε σύμφωνα με τη βάση δεδομένων STRING το πιθανό δίκτυο αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κοινών, διαφορεικά εκφραζόμενων μεταγραφημάτων στις τρεις ομάδες λεμφώματος. Στην εικόνα που ακολουθεί (Εικόνα 9), φαίνεται ότι υπάρχει μεγάλη και άμεση συνδεσιμότητα ανάμεσα στα 13 γονίδια που ρυθμίζονται από το *p53* (*p21*, *MDM2*, *Bax*, *RRM2B*, *TP53INP1*, *TP53I3*, *RRM2*, *HIPK1*, *FDXR*, *BTG2*, *RPS27L*, *C12orf5*, *GDF15*). Δύο γονίδια βρέθηκαν να συνδέονται έμμεσα με το *p53* (*UHRF1*, *RPS2*), ενώ δέκα δεν κατάφεραν να συνδεθούν (άμεσα ή έμμεσα) με κανένα από τα υπόλοιπα γονίδια. 14 γονίδια βρέθηκαν να εμπλέκονται με την απόπτωση, εκ των οποίων μόνο το ένα είχε μειωμένη ρύθμιση (*HIPK1*), ενώ επτά γονίδια βρέθηκαν να συμμετέχουν στον κυτταρικό κύκλο, όπου τα δύο είχαν μειωμένη ρύθμιση (*RRM2*, *UHRF1*). Επιπλέον, πέντε γονίδια βρέθηκαν να συμμετέχουν σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια (*mTOR*, *NF-kB*, *Rac*), τέσσερα στην επιδιόρθωση του DNA και δύο σε μεταβολικές διαδικασίες. Όλα τα εμπλεκόμενα γονίδια σε σηματοδοτικά μονοπάτια παρουσίασαν αυξημένη ρύθμιση με την εξαίρεση του *PREX2*, που όπως προαναφέρθηκε, βρέθηκε να έχει μειωμένα επίπεδα στο ALCL και αυξημένα στο HL και στο MCL.



Εικόνα 9: Απεικόνιση αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κοινών γονιδίων στις τρεις ομάδες λεμφώματος κατά STRING. Η εικόνα συνοψίζει τη σύμφωνα με τη βάση δεδομένων STRING απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κοινών γονιδίων στις τρεις ομάδες λεμφώματος, και την κατηγοριοποίησή τους σύμφωνα με τη συμμετοχή τους σε διάφορες βιολογικές διεργασίες. Το γράφημα οπτικοποίησης αλληλεπιδράσεων αποτυπώνεται με κυκλικά σημεία για τους κόμβους και με τόξα ανάμεσα σε κόμβους που συνδέονται. Κάθε κόμβος αναπαριστά ένα γονίδιο. Οι κόμβοι είναι χρωματισμένοι βάσει της αύξησης (κόκκινο χρώμα), της μείωσης (πράσινο χρώμα) των επιπέδων έκφρασής τους ή της διαφορικής ρύθμισής τους στις τρεις κυτταρικές σειρές μελέτης. Μερικοί κόμβοι συμμετέχουν σε πολλαπλές υποδομές, ενώ κάποιοι άλλοι διαθέτουν μεγαλύτερο μέγεθος, αντιστοιχώντας σε γονιδιακές οικογένειες όπου η πρωτεϊνική δομή είναι διαθέσιμη. Τα τόξα πιο μεγάλου πάχους αντιστοιχούν σε αλληλεπιδράσεις υψηλότερης εμπιστοσύνης.

II. Μελέτη και σύγκριση των αποτελεσμάτων της πρωτεωμικής ανάλυσης κάθε λεμφωματικής κυτταρικής σειράς μετά από N3A.

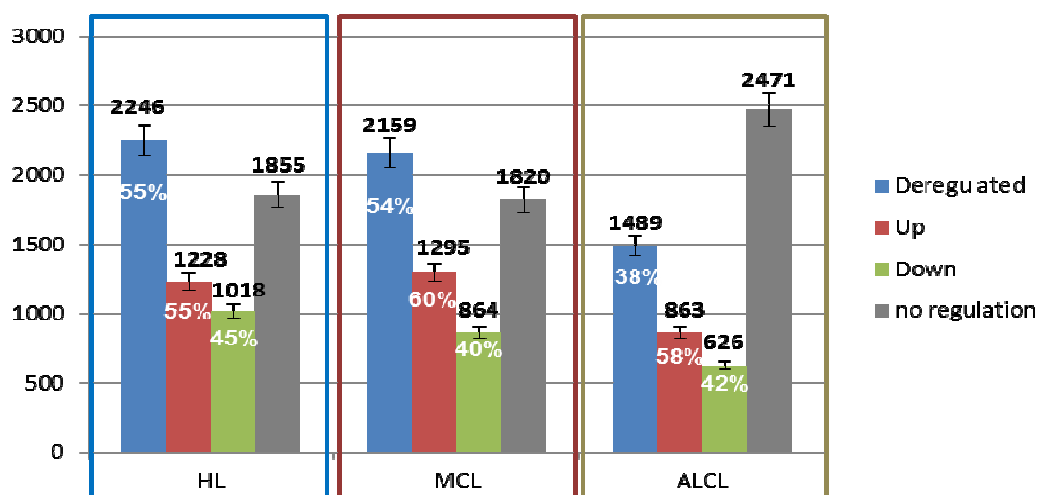
Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την πρωτεωμική ανάλυση κάθε λεμφώματος μετά από N3A, διαπιστώθηκε ότι ταυτοποιήθηκε ο εντυπωσιακός αριθμός των 4923 πρωτεϊνών, εκ των οποίων οι 3333 πρωτεΐνες ταυτοποιήθηκαν και στα τρία είδη λεμφώματος, ενώ 420, 321 και 399 πρωτεΐνες βρέθηκαν να εκφράζονται αποκλειστικά στα λεμφώματα HL, MCL και ALCL αντίστοιχα (Εικόνα 10; Παράρτημα II /Πίνακας 3). Από το σύνολο των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών, οι 3578 πρωτεΐνες βρέθηκαν να είναι σχετικά ποσοτικοποιημένες μετά τη χορήγηση της Nutlin-3A, με τις 2246 πρωτεΐνες να παρουσιάζουν απορρυθμισμένα επίπεδα στο λέμφωμα HL, τις 2159 πρωτεΐνες στο λέμφωμα MCL και τις 1489 πρωτεΐνες στο λέμφωμα ALCL. Συγκρίνοντας τις λίστες των απορρυθμισμένων πρωτεϊνών που προέκυψαν, τα λεμφώματα του μανδύα και του Hodgkin είχαν τη μεγαλύτερη αλληλοεπικάλυψη, το λέμφωμα του Hodgkin την υψηλότερη τιμή μοναδικών πρωτεϊνών ενώ εντοπίστηκαν 585 πρωτεΐνες να εκφράζονται και στα τρία λεμφώματα. Πιο συγκεκριμένα, 702 βρέθηκαν να είναι κοινές στο λέμφωμα του HL και του MCL, 217 στα κύτταρα του MCL και του ALCL και 226 στα κύτταρα του HL και του ALCL. Επιπλέον, 732, 655 και 461 πρωτεΐνες διαπιστώθηκε ότι εκφράζονται κατ' αποκλειστικότητα στα λεμφώματα HL, MCL και ALCL αντίστοιχα (Εικόνα 10; Παράρτημα II /Πίνακας 2-3).



Εικόνα 10: Διαγράμματα Venn που δείχνουν το βαθμό κάλυψης των ολικών και των απορρυθμισμένων πρωτεωμάτων HL, MCL, ALCL μετά από Nutlin-3A. Διαγραμματική αποτύπωση (venn diagram) του αριθμού των πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκε (α) και σχετικά ποσοτικοποιήθηκε (β) στους τρεις τύπους λεμφώματος, HL, MCL, ALCL, μετά την ενεργοποίηση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 με Nutlin-3A. Συνοψίζονται οι μοναδικές και κοινές σχέσεις που δημιουργούνται κατά τη σύγκριση των αποτελεσμάτων που προκύπτει από τη διαφορική ανάλυση του

πρωτεύματος των λεμφωματικών κυτταρικών σειρών HL, MCL και ALK+ ALCL +/- N3A. Συνοπτικά, τη μεγαλύτερη αλληλοεπικάλυψη έδειξαν τα λεμφώματα του μανδύα και του Hodgkin (702 κοινές πρωτεΐνες), την υψηλότερη τιμή μοναδικών πρωτεϊνών παρουσίασε το λέμφωμα του Hodgkin (732), ενώ 585 πρωτεΐνες ήταν κοινές και στα τρία λεμφώματα.

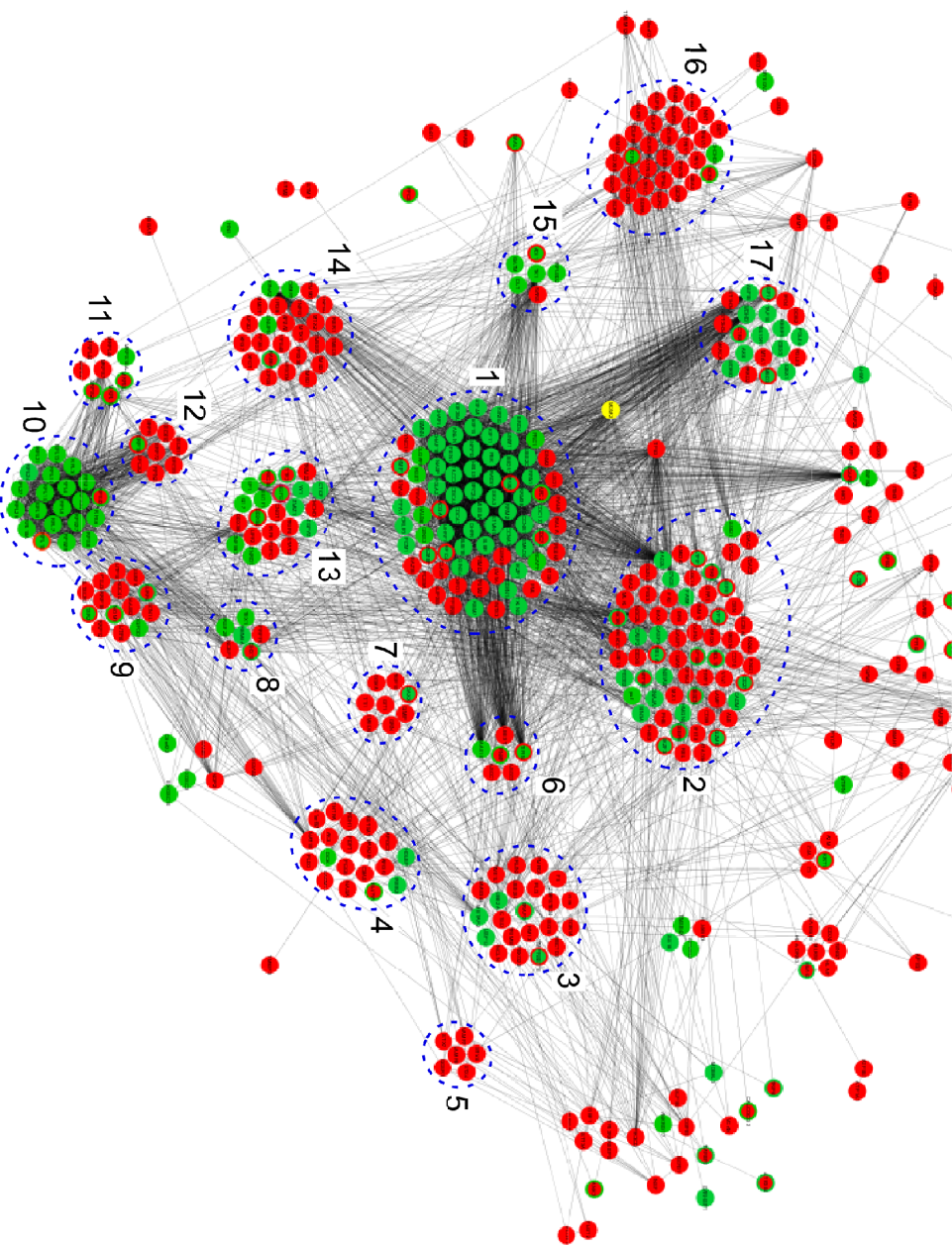
Επιπλέον, η επίδραση της Nutlin-3A στα λεμφώματα μελέτης μας αποκάλυψε ότι συνολικά το 55% των επιπέδων έκφρασης των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών που εντοπίστηκαν στο HL απορρυθμίστηκε, εκ των οποίων, το 55% παρουσίασε αύξηση στη μεταφραφική τους ρύθμιση και το 45% μείωση. Ομοίως, στο MCL, 60% και 40% από τις συνολικά 2159 απορρυθμισμένες πρωτεΐνες εμφανίστηκαν με αυξημένα και μειωμένα επίπεδα αντίστοιχα. Τέλος, στο ALCL, 2471 πρωτεΐνες δεν παρουσίασαν αλλαγή στα επίπεδά τους, ενώ η αύξηση και η μείωση του ποσοστού μεταφραφικής ρύθμισης στις συνολικά 1489 απορρυθμισμένες πρωτεΐνες έφτασε το 58% και 42% αντίστοιχα (Εικόνα 11, Παράρτημα II/Πίνακας 2-3).



Εικόνα 11: Ραβδογράμματα απεικόνισης του συνολικού αριθμού των απορρυθμισμένων πρωτεϊνών στα τρία λεμφώματα μελέτης (HL, MCL, ALCL). Στη διαγραμματική αποτύπωση με στήλες φαίνεται ο συνολικός αριθμός και το ποσοστό των πρωτεϊνών που απορρυθμίστηκαν (μπλε χρώμα), αλλά και που παρουσίασαν αύξηση (κόκκινο χρώμα), μείωση (πράσινο χρώμα) και σταθερότητα στα επίπεδά τους (γκρι χρώμα) μετά από τη επίδραση της Nutlin-3A, στα λεμφώματα HL και NHL. Οι τιμές πάνω από τις στήλες δείχνουν ότι το λέμφωμα του μανδύα παρουσίασε τη μεγαλύτερη αύξηση στην πρωτεϊνική έκφραση, ενώ το λέμφωμα του αναπλαστικού από μεγάλα κύτταρα παρουσίασε τη μικρότερη μείωση και το μεγαλύτερο αριθμό πρωτεϊνών με σταθερά επίπεδα έκφρασης.

Στη συνέχεια, η συγκριτική πρωτεωμική ανάλυση των κυττάρων μελέτης Hodgkin και μη-Hodgkin ανθρώπινων λεμφωμάτων, όπως αυτή προέκυψε μετά

την προσθήκη της Nutlin-3A, εισήχθη στη βάση δεδομένων STRING, προκειμένου να οπτικοποιηθούν οι καταγεγραμμένες σε αυτή πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Έτσι, προέκυψε η παρακάτω εικόνα του προβλεπόμενου πρωτεϊνικού δικτύου, που επιτρέπει, με μια ματιά, τη θεώρηση των πρωτεϊνικών συνδέσεων με άλλα πρωτεϊνικά μόρια, το βαθμό ρύθμισης των συμμετεχόντων πρωτεϊνών και την ομαδοποίησή τους βάσει της συμμετοχής τους σε προβλεπόμενα λειτουργικά μονοπάτια. Ενδεικτικά, αναφέρουμε ότι ισχυρές αλληλεπιδράσεις αναπτύχθηκαν ανάμεσα σε απορρυθμισμένες πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου, της απόπτωσης, της επιδιόρθωσης του DNA, της βιοσύνθεσης, της χρωματινικής αναδιαμόρφωσης/τροποποίησης και της πρωτεϊνικής μεταφοράς. Η, δε, ρύθμιση των ομαδοποιημένων πρωτεϊνών στις προαναφερθείσες κατηγορίες φαίνεται να ακολουθεί κατά κύριο λόγο τη λογική της επανεργοποιημένης p53, μειώνοντας τα επίπεδα έκφρασης στα συμμετέχοντα μόρια του κυτταρικού κύκλου, της βιοσύνθεσης και της χρωματινικής αναδιαμόρφωσης/τροποποίησης, αυξάνοντας τα επίπεδα έκφρασης στα συμμετέχοντα μόρια της αποπτωτικής διαδικασίας, της επιδιόρθωσης του DNA και της πρωτεϊνικής μεταφοράς (Εικόνα 12, Παράρτημα II/Πίνακας 3).



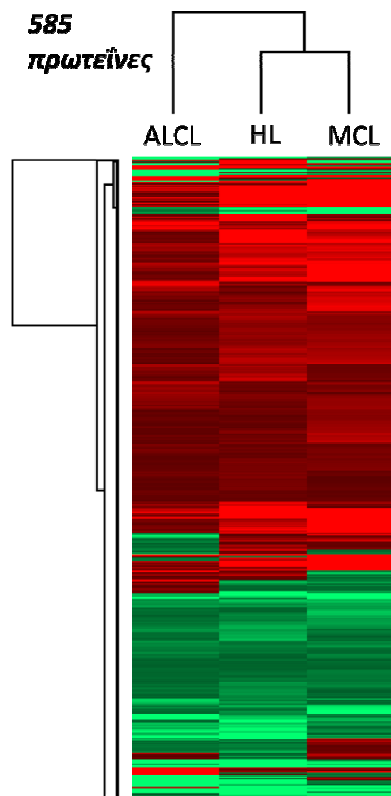
- Up-regulated
 - Down-regulated
 - Different regulation in lymphoma sub-types
 - Interaction
 - - - Category
1. Cell Cycle
 2. Apoptotic process
 3. Proteolysis
 4. Metabolic process
 5. SNARE complex
 6. DNA repair
 7. Signal transduction
 8. RNA splicing
 9. Ribosome biogenesis
 10. Ribosome
 11. Mitochondrial ribosome
 12. SRP-dependent co-translational targeting to membrane
 13. Transcription regulation
 14. Protein transport
 15. Biosynthesis
 16. Oxidative phosphorylation
 17. Chromatin remodeling/modification

Εικόνα 12: Απεικόνιση αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεωμάτων στις τρεις ομάδες λεμφώματος, κατά STRING. Η εικόνα συνοψίζει τη σύμφωνα με τη βάση δεδομένων STRING (και τη βοήθεια του εργαλείου προγραμματισμού CYTOSCAPE) αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών στις τρεις ομάδες λεμφώματος, και την κατηγοριοποίησή τους σύμφωνα με τη συμμετοχή τους σε διάφορες βιολογικές διεργασίες. Το γράφημα οπτικοποίησης αλληλεπιδράσεων αποτυπώνεται με κυκλικά σημεία για τους κόμβους και με τόξα ανάμεσα σε κόμβους που συνδέονται. Κάθε κόμβος αναπαριστά μία πρωτεΐνη. Οι κόμβοι είναι χρωματισμένοι βάσει της αύξησης (κόκκινο χρώμα) ή της μείωσης (πράσινο χρώμα) των επιπέδων έκφρασής τους, ενώ η παρουσία και των δύο χρωμάτων, παραπέμπει στην παρουσία διαφορετικής ρύθμισης στους διαφορετικούς τύπους λεμφώματος. Μερικοί κόμβοι συμμετέχουν σε πολλαπλές υποδομές, ενώ τα τόξα πιο μεγάλου πάχους αντιστοιχούν σε αλληλεπιδράσεις υψηλότερης εμπιστοσύνης.

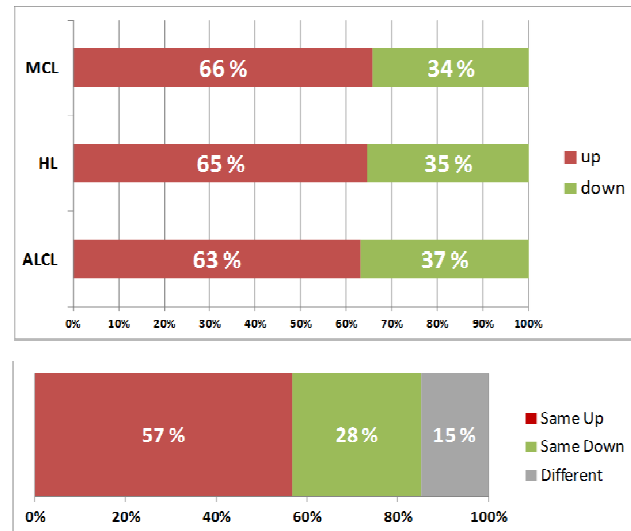
Συγκριτική ανάλυση στα κοινά πρωτεώματα των τριών λεμφωματικών σειρών μετά από N3A.

Η σύγκριση των μεταβολών του πρωτεώματος των τριών σειρών προσδιόρισε 585 στατιστικώς σημαντικές κοινές πρωτεΐνες (Εικόνα 13, Παράρτημα II/Πίνακας 5). Οι περισσότερες πρωτεΐνες (85%) παρουσίασαν παρόμοια μεταβολή στο πρωτεωμικό τους μοτίβο έκφρασης. Η πλειονότητα των κοινών πρωτεϊνών σημείωσε αύξηση στα πρωτεϊνικά τους επίπεδα (65% στο HL, 66% στο MCL και 63% στο ALCL). Αντίθετα, εμφάνισαν μείωση στα πρωτεϊνικά τους επίπεδα κατά 35% στο HL, 34% στο MCL και 37% στο ALCL. Στη σειρά του λεμφώματος του μανδύα, παρατηρήθηκαν πρωτεΐνες πιο αυξημένης ρύθμισης. Αντίθετα, οι άλλες δύο σειρές παρουσίασαν μικρή απόκλιση ανάμεσα στις υπερ- και στα υπο- ρυθμισμένες πρωτεΐνες. Επιπλέον, όπως φαίνεται και στο παρακάτω δένδrogramma (Εικόνα 13α), τα λεμφώματα του HL και ALCL ομαδοποιήθηκαν και διαχωρίστηκαν από το λέμφωμα MCL, υπογραμμίζοντας το σημαντικό ποσοστό ομοιότητας ανάμεσα στα δύο πρώτα (Εικόνα 13, Παράρτημα II/Πίνακας 5).

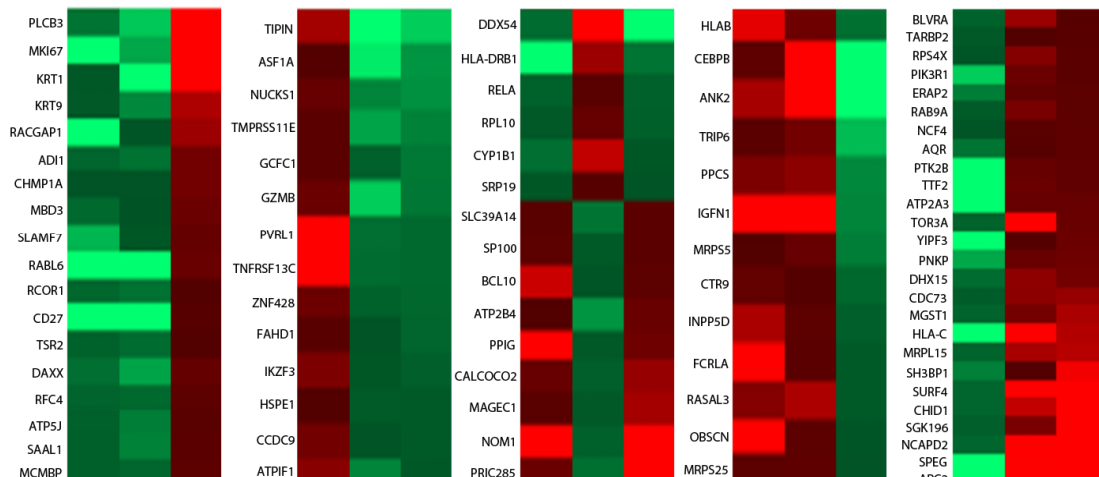
(α)



(β)



(γ)

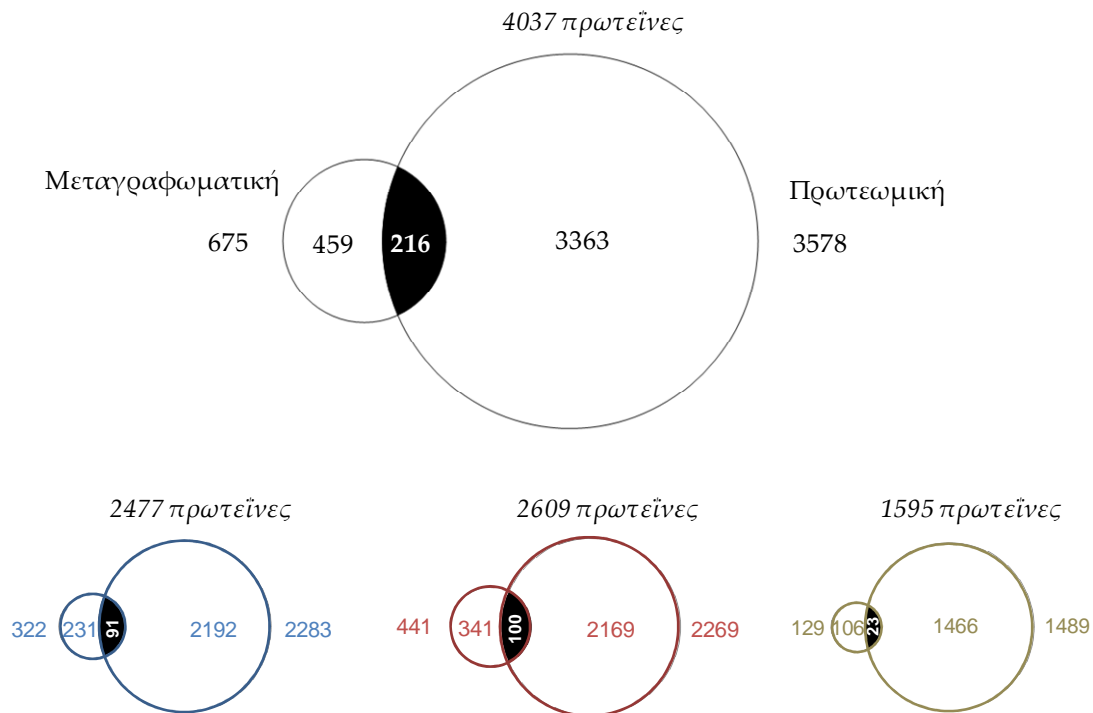


Εικόνα 13: Θερμικός χάρτης (α, γ) και ραβδόγραμμα (β) επί της ποσοτικής έκφρασης των πρωτεϊνών που είναι κοινές και στις τρεις ομάδες λεμφώματος (HL, MCL, ALCL). (α) Στο δενδρόγραμμα ομαδοποίησης απεικονίζεται η ομοιόμορφη κατανομή των πρωτεϊνικών προφίλ έκφρασης των κοινών πρωτεϊνών στις τρεις λεμφωματικές κυτταρικές σειρές μελέτης. Η πληθώρα των κοινών πρωτεϊνών παρουσιάζει αύξηση στη ρύθμισή τους, με το ποσοστό τους να φτάνει >60%. Οι θετικά ρυθμιζόμενες πρωτεΐνες χρωματίζονται με κόκκινο χρώμα, ενώ οι αρνητικά με πράσινο, με την ένταση του χρώματος να αντικατοπτρίζει το βαθμό ρύθμισής τους. Και σε αυτήν τη περίπτωση, τα λεμφώματα του HL και ALCL ομαδοποιούνται και διαχωρίζονται από το MCL, υποδηλώνοντας ένα σημαντικότερο ποσοστό ομοιότητας ανάμεσα στα δύο πρώτα. (β)

(πάνω) Στη διαγραμματική αποτύπωση με ράβδους καταγράφεται το ποσοστό των πρωτεϊνών που παρουσίασαν αύξηση (κόκκινο χρώμα), μείωση (πράσινο χρώμα) και σταθερότητα στα επίπεδά τους (γκρι χρώμα) μετά από τη επίδραση της Nutlin-3A, στα λεμφώματα HL και NHL. (κάτω) Όπως αποτυπώνεται στο ραβδόγραμμα, 15% επί του συνόλου των πρωτεϊνών που βρέθηκαν να είναι κοινές και στους τρεις τύπους λεμφώματος παρουσίασε διαφορετικά επίπεδα ρύθμισης στην έκφρασή τους, ενώ το 57% σημείωσε αύξηση και το 28% μείωση. (γ) Απεικόνιση της σχετικής ποσοτικοποίησης των 86 πρωτεϊνών, που αν και κοινές στα τρία λεμφώματα μελέτης έχουν διαφορετική ρύθμιση στην έκφρασή τους με μορφή θερμικού χάρτη.

III. Μελέτη και σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταγραφικής και πρωτεωμικής ανάλυσης στις τρεις ομάδες λεμφώματος μελέτης μετά από N3A.

Η συγκριτική μελέτη των δεδομένων που προέκυψαν από τη μεταγραφική και πρωτεωμική ανάλυση στις τρεις ομάδες λεμφώματος, στο HL, MCL και ALCL, έδειξε ότι από τα 4038 μόρια που ανιχνεύθηκαν απορρυθμισμένα μετά από N3A, τα 675 διαφοροποιήθηκαν σε επίπεδο μεταγραφής και τα 3578 σε επίπεδο πρωτεϊνικής μετάφρασης. Συνολικά, τα 459 mRNAs εντοπίστηκαν μόνο στη μεταγραφική ανάλυση και οι 3363 μόνο στην πρωτεωμική ανάλυση. 216 πρωτεΐνες βρέθηκαν να εκφράζονται στις δύο «omics» αναλύσεις, αριθμός που αντιστοιχεί στο 32% του συνολικού απορρυθμισμένου μεταγραφήματος και μόλις στο 6% του συνολικού απορρυθμισμένου πρωτεώματος. Από το σύνολο των mRNAs και πρωτεϊνών της ανάλυσης μας, οι 2283 πρωτεΐνες (από τις 2477 ταυτοποιημένες) και τα 322 μεταγραφήματα εκφράστηκαν διαφορετικά στο λέμφωμα του Hodgkin, οι 2269 πρωτεΐνες (από τις 2609 ταυτοποιημένες) και τα 441 μεταγραφήματα εκφράστηκαν διαφορετικά στο λέμφωμα του μανδύα και οι 1489 πρωτεΐνες (από τις 1595 ταυτοποιημένες) και τα 129 μεταγραφήματα εκφράστηκαν διαφορετικά στο αναπλαστικό λέμφωμα από μεγάλα κύτταρα. Ο αριθμός που βρέθηκε να αναλογεί στα επικαλυπτόμενα και μοναδικά γονίδια/πρωτεΐνες ήταν επίσης ποικίλος στους διαφορετικούς λεμφωκυτταρικούς τύπους. Το μεγαλύτερο αριθμό κοινών και μοναδικών γονιδίων/πρωτεϊνών παρουσίασε το λέμφωμα του μανδύα (κοινά: 100; μοναδικά: 341 mRNAs/2169 πρωτεΐνες). Ακολούθησε το λέμφωμα του Hodgkin (κοινά: 91; μοναδικά: 231 mRNAs/2192 πρωτεΐνες), ενώ στο αναπλαστικό λέμφωμα από μεγάλα κύτταρα εντοπίστηκε ο μικρότερος αριθμός κοινών και μοναδικών γονιδίων/πρωτεϊνών (κοινά: 23; μοναδικά: 106 mRNAs/1466 πρωτεΐνες) (Εικόνα 14; Παράρτημα II/Πίνακας 1-3).

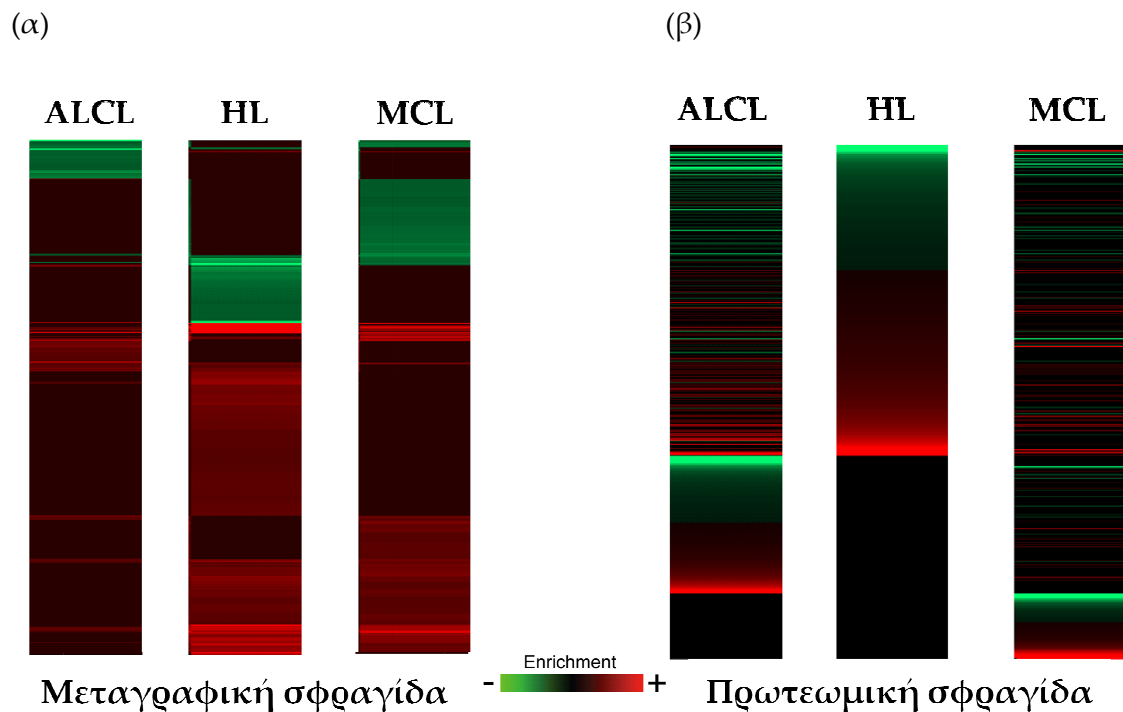


Εικόνα 14: Διαγραμματική αποτύπωση (Venn diagram) του συνολικού αριθμού των ταυτοποιημένων και απορρυθμισμένων γονιδίων και πρωτεϊνών που σχετικά ποσοτικοποιήθηκε στους τρεις τύπους λεμφώματος μελέτης (HL, MCL, ALCL), μετά την ενεργοποίηση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 με Nultin-3A. Η εικόνα αποτελεί μια σύνοψη των μοναδικών και κοινών σχέσεων που δημιουργούνται κατά τη σύγκριση των αποτελεσμάτων όπως προκύπτουν από τη διαφορική ανάλυση του μεταγραφώματος και πρωτεώματος, συνολικά (πάνω γράφημα) και ειδικά (κάτω γράφημα) των τριών λεμφωματικών κυτταρικών σειρών HL, MCL και ALK+ ALCL +/- N3A. Στο διάγραμμα φαίνεται καθαρά η μεγαλύτερη αναλυτική δύναμη της πρωτεωματικής ανάλυσης (3578 διαφοροποιημένες πρωτεΐνες) έναντι της μεταγραφωματικής (675 διαφοροποιημένα μεταγραφώματα). Ο αριθμός που αναλογεί στα συνολικά επικαλυπτόμενα γονίδια/πρωτεΐνες φτάνει μόλις τα 216, με τη μικρότερη αλληλοεπικάλυψη (23 γονίδια/πρωτεΐνες) να παρατηρείται στο λέμφωμα ALK+ ALCL +/-.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ιεραρχική ομαδοποίηση των αποτελεσμάτων της πρωτεωμικής ανάλυσης (Εικόνα 11, Παράρτημα II/Πίνακας 1, 3), με σκοπό την απεικόνιση της διαφοροποιημένης σχετικής γονιδιακής μεταβολής σε επίπεδο mRNA αλλά και σε επίπεδο πρωτεϊνών (οριζόντιες γραμμές έκφρασης) σε κάθε δείγμα και κυτταρική σειρά, τις ομάδες που απαρτίζουν, καθώς και τις μεταξύ τους σχέσεις βάσει της ομοιότητας στις τιμές έκφρασης των των probe sets και των πρωτεϊνικών δειγμάτων αντίστοιχα (κανονικοποιημένα δεδομένα, με εύρος τιμών από -2 έως +2). Τα τρία απεικονισμένα μεταγραφώματα (Εικόνα 15α) και πρωτεώματα (Εικόνα 15β) εμφάνισαν αρκετά διαφορετικά προφίλ έκφρασης, όπου στον άξονα των x απεικονίστηκε το προφίλ έκφρασης κάθε mRNA και πρωτεΐνης σε κάθε λέμφωμα, ενώ στον άξονα των y ο βαθμός ομοιότητας μεταξύ των πρωτεϊνών και των ομάδων τους. Το χρώμα κάθε κελιού αντιστοιχεί στη log₂ υπερ-έκφραση

(κόκκινο) ή υπο-έκφραση (πράσινο) κάθε γονιδίου και πρωτεΐνης μετά από N3A (συγκρίνοντάς τη με την τιμή της πριν τη χορήγηση της N3A). Οι τιμές έκφρασης αποτυπώνονται ως εξής: τα χαμηλά επίπεδα τιμών απεικονίζονται με πράσινο χρώμα, τα υψηλά με κόκκινο, η απουσία έκφρασης με μαύρο, ενώ η ένταση του χρώματος αντικατοπτρίζει το βαθμό ρύθμισης.

Εξετάζοντας το θερμικό χάρτη συσχετίσεων των διαφορικά εκφραζόμενων πρωτεϊνών που προέκυψαν μετά την εφαρμογή της N3A επιτράπηκε τελικά η ποσοτική και ποιοτική μελέτη των ομαδοποιημένων απορρυθμισμένων πρωτεϊνών. Έτσι, διαπιστώθηκε ότι οι κυτταρικές σειρές του λεμφώματος HL και MCL επηρεάστηκαν περισσότερο, συγκριτικά με τη σειρά ALK+ ALCL +/- N3A, που παρουσίασε το μικρότερο βαθμό απορρύθμισης σε επίπεδο μεταφραστικής ρύθμισης (Εικόνα 15, Παράρτημα II/Πίνακας 3).

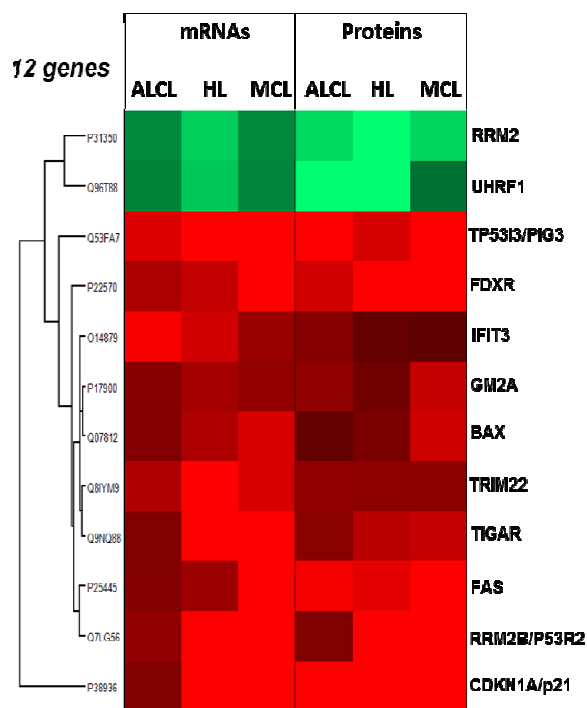


Εικόνα 15: Απεικόνιση των τριών απορρυθμισμένων μεταγραφημάτων και πρωτεωμάτων λεμφώματος (HL, MCL, ALCL), με τη μορφή «θερμικού χάρτη» (heatmap). Το χρώμα κάθε κελιού αντιστοιχεί στη \log_2 υπερ-έκφραση (κόκκινο) ή υπο-έκφραση (πράσινο) κάθε γονιδίου και πρωτεΐνης μετά από N3A (όπως αυτή προκύπτει μετά τη σύγκρισή του με την τιμή που είχε πριν τη χορήγηση της N3A). Τα απεικονισμένα μεταγραφώματα και πρωτεώματα εμφανίζουν αρκετά διαφορετικά προφίλ έκφρασης, δηλώνοντας ότι περιλαμβάνουν γονίδια και πρωτεΐνες που αποτελούν χαρακτηριστική μοριακή σφραγίδα της κάθε λεμφωματικής σειράς.

Συγκριτική ανάλυση στα κοινά μεταγραφήματα και πρωτεώματα των τριών λεμφωματικών σειρών μετά από N3A.

Όπως προαναφέρθηκε, η συγκριτική μελέτη των επικαλυπτόμενων μορίων (κοινά γονίδια/πρωτεΐνες) που προέκυψαν από τη μεταγραφική και πρωτεωμική ανάλυση στις τρεις ομάδες λεμφώματος, ανέδειξε 216 απορρυθμισμένα γονίδια. Πρόκειται για 216 γονίδια, τα οποία αν και βρέθηκαν να εκφράζονται στις δύο «omics» αναλύσεις, παρόλ' αυτά, δεν εντοπίζονται σε όλες τις κυτταρικές σειρές. Από αυτά, μόνο τα 12 γονίδια βρέθηκαν να είναι κοινά στις τρεις κυτταρικές σειρές μελέτης, με ανάλογο μοτίβο ρύθμισης (δέκα γονίδια/πρωτεΐνες με θετική ρύθμιση και δύο με αρνητική) (Εικόνα 16α; Παραρτήματα/Πίνακας χ). Τα περισσότερα, δε, γονίδια, αφορούν κυρίως υπερ-ρυθμισμένες πρωτεΐνες του σηματοδοτικού μονοπατιού της p53, καθώς και πρωτεΐνες που ρυθμίζονται από αυτή, όπως είναι η p21/CDKN1A, η FAS, η BAX, η TP53I3/PIG3, η RRM2, η RRM2B/P53R2 και η TIGAR και TRIM22, αντίστοιχα (Εικόνα 16).

(α)



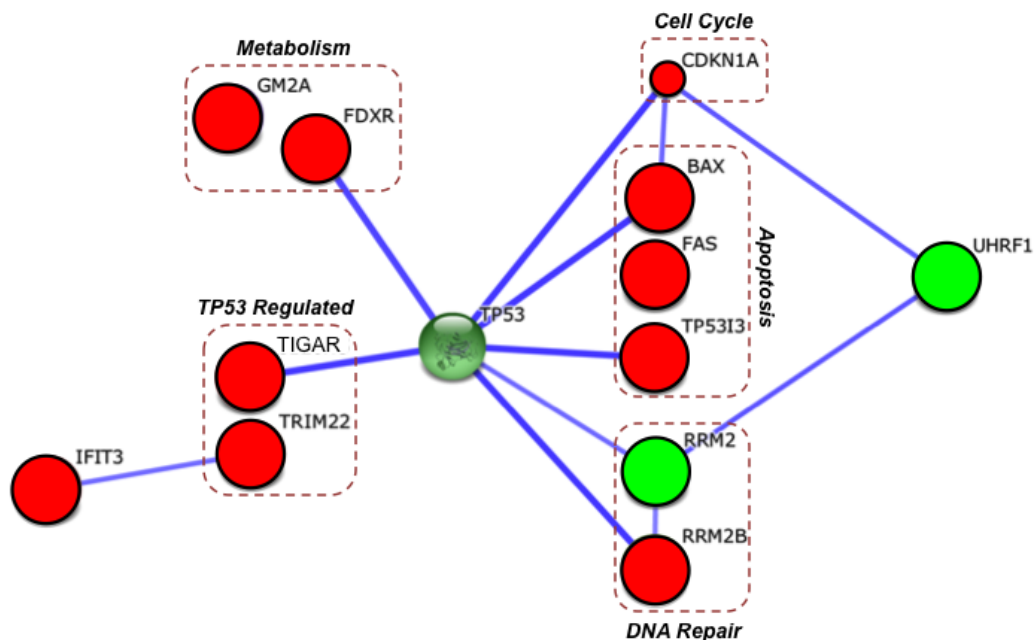
(β)



Εικόνα 16: Θερμικός χάρτης (α) και διαγραμματική απεικόνιση (β) των γονιδίων και πρωτεϊνών που είναι κοινά και στις τρεις ομάδες λεμφώματος, και στις δύο μεθόδους ανάλυσης («omics»). Στις δύο εικόνες (α και β) απεικονίζεται η ομοιόμορφη κατανομή των μεταγραφικών και πρωτεϊνικών προφίλ έκφρασης των κοινών γονιδίων και πρωτεϊνών στις τρεις λεμφωματικές κυτταρικές σειρές μελέτης και η θετική, κατά κύριο λόγο, ρύθμιση των κοινών μορίων (10 στα 12). (α) Τα θετικά ρυθμιζόμενα μόρια χρωματίζονται με κόκκινο χρώμα, ενώ τα αρνητικά με πράσινο, με την ένταση του χρώματος να αντικατοπτρίζει το βαθμό ρύθμισης. (β) Κάθε κουτί αφορά ένα από τα 12

κοινά απορρυθμισμένα μόρια στα τρία λεμφώματα, όπως αυτά προέκυψαν από την οπiς ανάλυσή μας. Τα δύο ζεύγη από τρία ραβδογράμματα κάθε κουτιού αποτυπώνουν το μεταγραφικό (αριστερά) και το πρωτεϊνικό (δεξιά) μοτίβο έκφρασης του εκάστοτε απορρυθμισμένου μορίου στα τρία λεμφώματα.

Πρόκειται, δηλαδή για πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην παύση του κυτταρικού κύκλου, στην επαγωγή της απόπτωσης, στο μεταβολισμό και στο μηχανισμό επιδιόρθωσης στους τρεις υποτύπους λεμφωμάτων. Οι υπόλοιπες τρεις, κοινές σε όλες τις λεμφωκυτταρικές σειρές, πρωτεΐνες με αυξημένη ρύθμιση ήταν οι GM2A, FDXR, IFIT3. Μόνο οι RRM2 (πρωτεΐνη του p53 μονοπατιού που συμμετέχει στην επιδιόρθωση του DNA) και UHRF1 βρέθηκαν να έχουν υπορρυθμισμένα επίπεδα (Εικόνα 17).



Εικόνα 17: Απεικόνιση αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κοινών γονιδίων και πρωτεϊνών στις τρεις ομάδες λεμφώματος και με τις δύο μεθόδους ανάλυσης, κατά **STRING**. Το γράφημα οπτικοποίησης αλληλεπιδράσεων αποτυπώνεται με κυκλικά σημεία για τους κόμβους και με τόξα ανάμεσα σε κόμβους που συνδέονται. Κάθε κόμβος αναπαριστά ένα μόριο. Οι κόμβοι είναι χρωματισμένοι βάσει της αύξησης (κόκκινο χρώμα) ή της μείωσης (πράσινο χρώμα) των επιπέδων έκφρασής τους. Μερικοί κόμβοι συμμετέχουν σε πολλαπλές υποδομές, ενώ κάποιοι άλλοι διαθέτουν μεγαλύτερο μέγεθος, αντιστοιχώντας σε γονιδιακές οικογένειες όπου η πρωτεϊνική δομή είναι διαθέσιμη. Τα τόξα πιο μεγάλου πάχους αντιστοιχούν σε αλληλεπιδράσεις υψηλότερης εμπιστοσύνης.

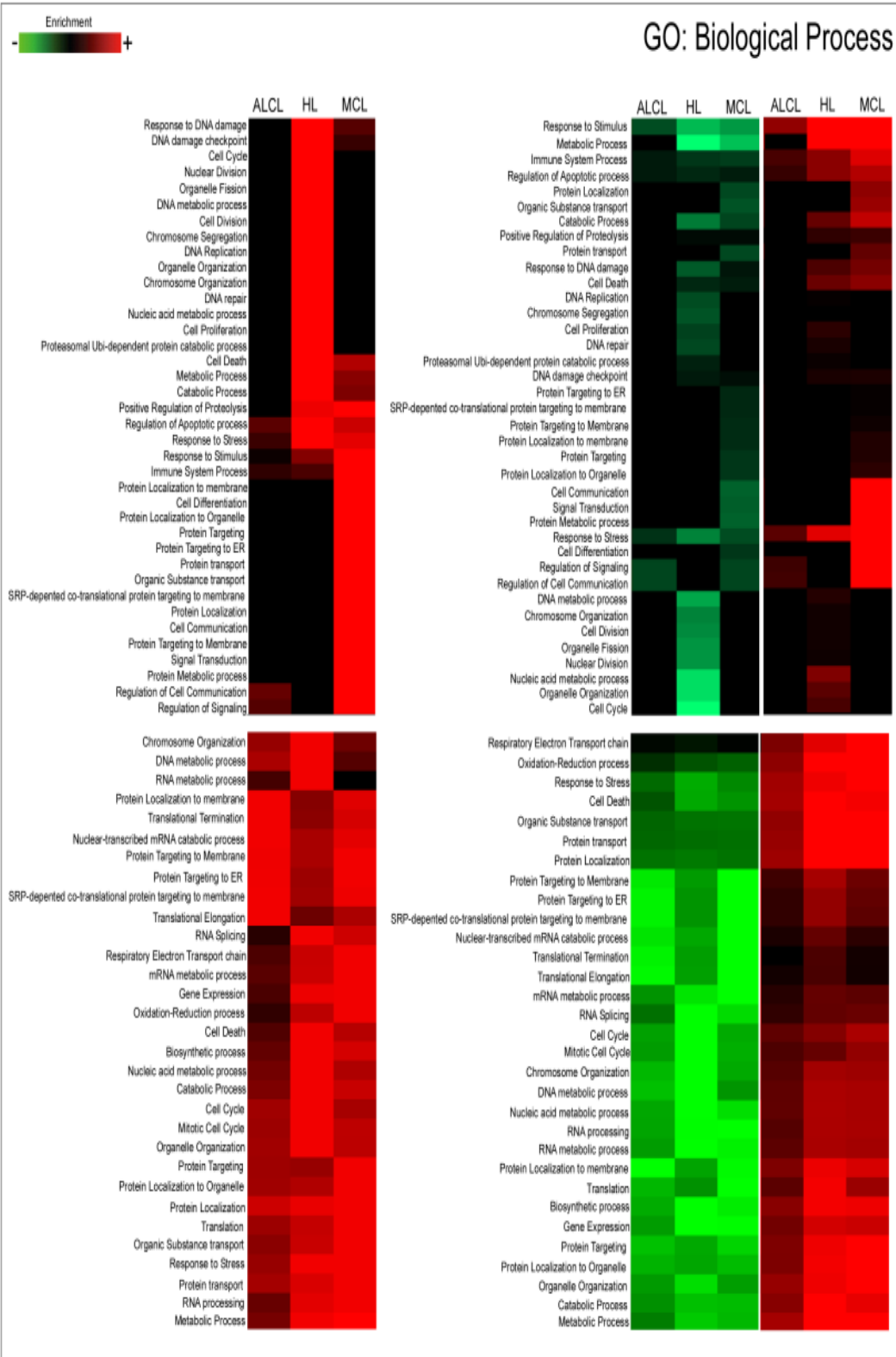
Συγκριτική λειτουργική ανάλυση των απορρυθμισμένων mRNAs και πρωτεϊνών σε κυτταρικές σειρές HL, MCL, ALCL +/- N3A

Τα στατιστικώς σημαντικά απορρυθμισμένα μετάγραφα και πρωτεΐνες (675 και 3578, αντίστοιχα) που προέκυψαν από τις τρεις διαφορετικές κατηγορίες λεμφωματικών κυττάρων μετά από την επίδραση της N3A, εξετάσθηκαν περαιτέρω χρησιμοποιώντας το λογισμικό πρόγραμμα Gene Ontology Consortium (GOC) και Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID). Κατά την ανάλυση, τα εξεταζόμενα γονίδια και πρωτεΐνες της ανάλυσης μας αντιστοιχήθηκαν σύμφωνα με όρους κατάταξης Γονιδιακής Οντολογίας (annotation to GO terms). Τα γονίδια/πρωτεΐνες με κοινή κυτταροειδική έκφραση και συμμετοχή στις ίδιες κατηγορίες κατάταξης, ομαδοποιήθηκαν μαζί, λαμβάνοντας μια τιμή εμπλουτισμού (enrichment score; ≥ 1). Έτσι, προσδιορίστηκε ότι, μετά την ενεργοποίηση της p53 μέσω N3A, τα στατιστικά σημαντικά γονίδια/πρωτεΐνες προβλέπεται ότι παρουσιάζουν έντονη μεταγραφική και μεταφραστική δραστηριότητα σε συγκεκριμένες κυτταρικές δομές/διαμερίσματα (CC; π.χ. κυτταρόπλασμα, πυρήνα, μιτοχόνδρια, ριβοσώματα), συμμετέχουν σε συγκεκριμένα μονοπάτια (KEGG pathways; π.χ. απόπτωση, οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, κυτταρικού κύκλου, p53), επιτελούν συγκεκριμένες βιολογικές διαδικασίες (BP; π.χ. ενζυμική/ιοντική/σαπερονική/ATP πρόσδεση, δράση πυροφωσφατάσης/ιστόνης/υδρολάσης) και μοριακές λειτουργίες (MF; π.χ.) (Εικόνα 18, 19; Παράρτημα I, II/Πίνακας 1, 3).

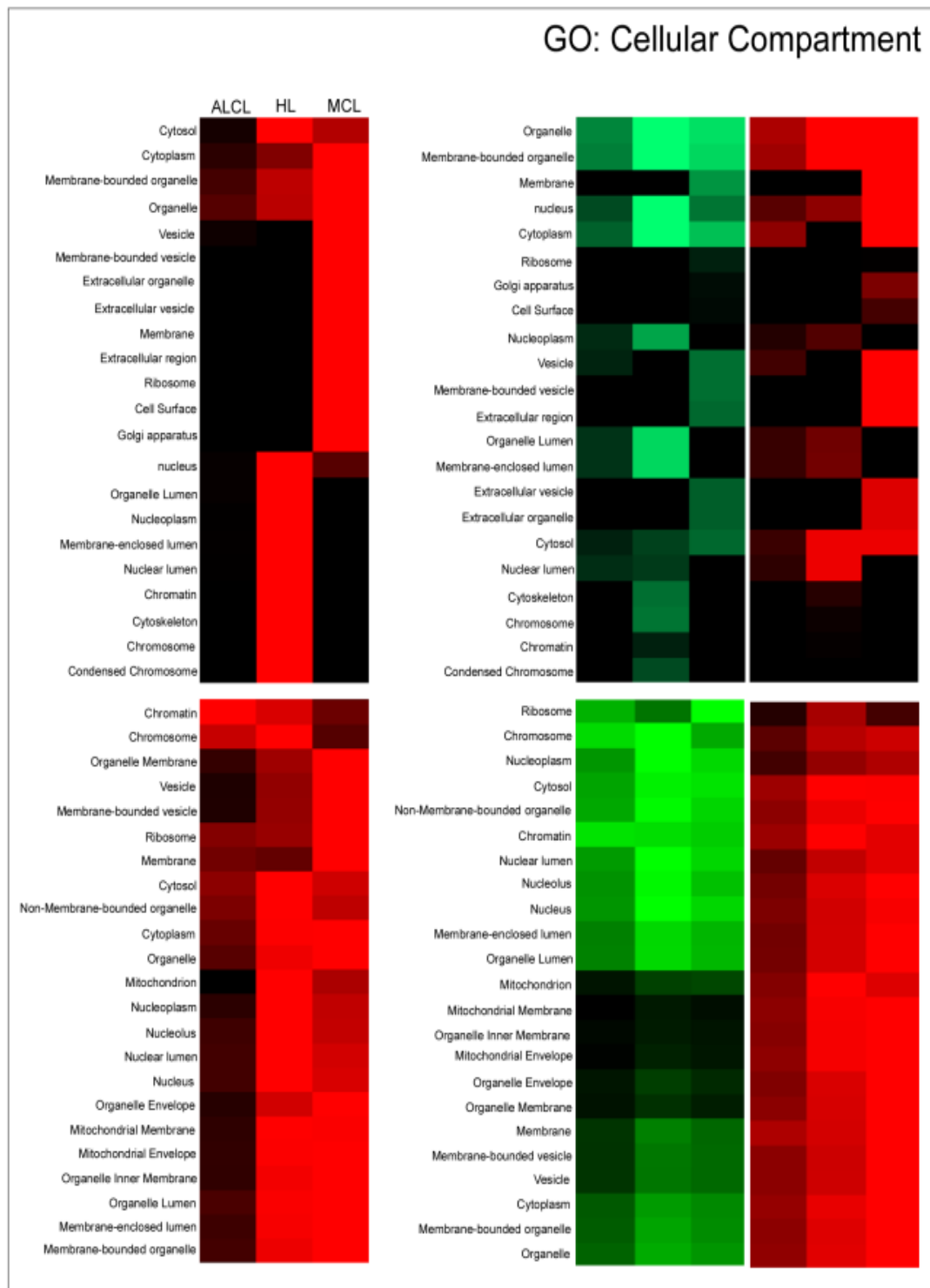
Τα αποτελέσματα της συγκριτικής λειτουργικής ανάλυσης παρατίθενται αναλυτικά στο αντίστοιχο παράρτημα (Παράρτημα I, II/Πίνακας 1, 3), ενώ στις εικόνες που ακολουθούν παρουσιάζονται τα πιο σημαντικά (συμπεριλαμβάνονται κατηγορίες ταξινόμησης με τις πιο υψηλές τιμές εμπλουτισμού) προκειμένου να διευκολυνθεί η εξαγωγή βιολογικών συμπερασμάτων. (Εικόνα 18, 19; Παράρτημα I, II/Πίνακας 1, 3).

Transcriptome

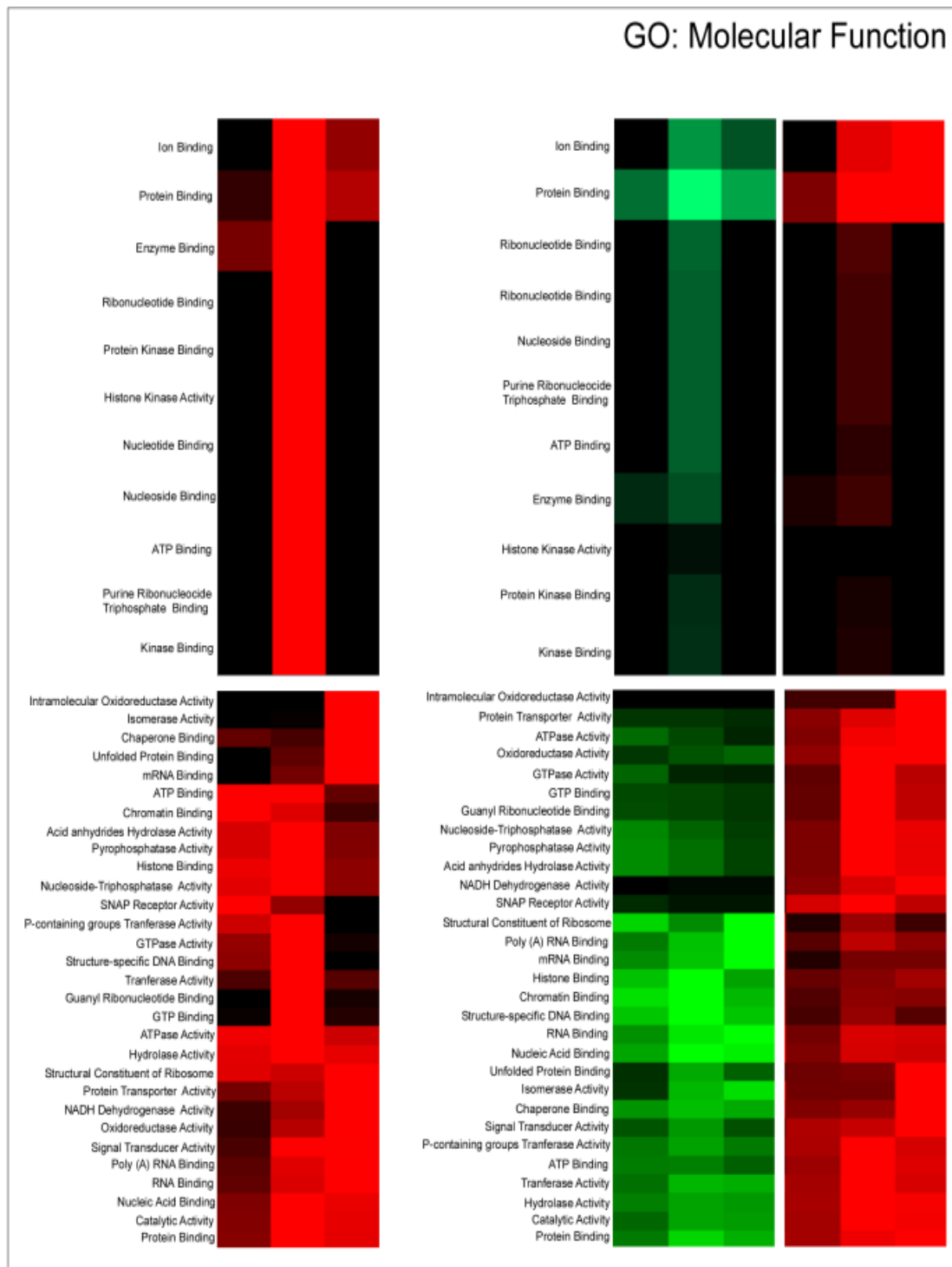
Proteome



(β)

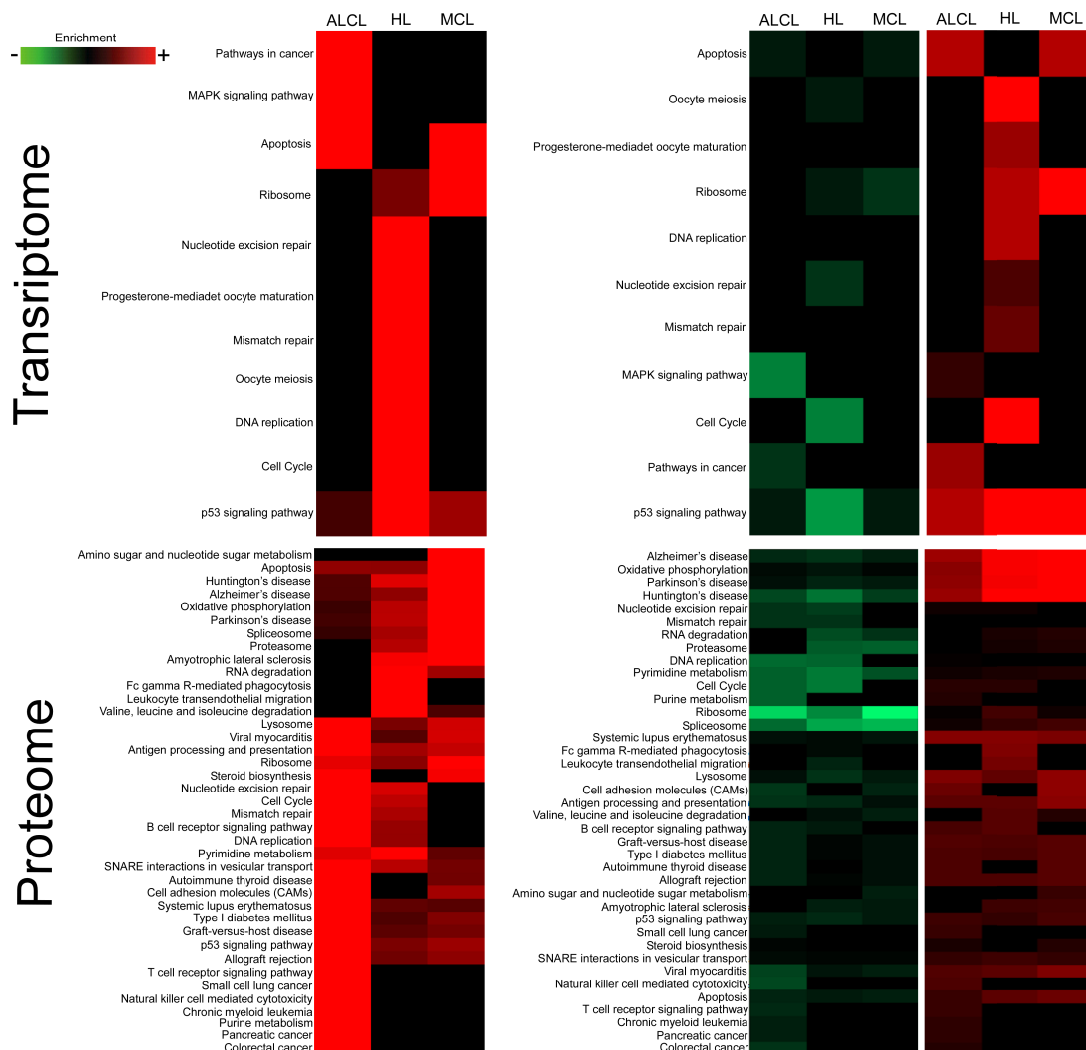


(γ)



Εικόνα 18: Θερμικοί χάρτες ανάλυσης της Γονιδιακής Οντολογίας των απορρυθμισμένων mRNAs και πρωτεϊνών των HL, MCL, ALCL λεμφωμάτων μετά από N3A, ως προς τους όρους BP (α), CC (β), MF (γ). Χρησιμοποιώντας το διαδικτυακό εργαλείο ομαδοποίησης Gene Ontology Consortium (GOC), τα μεταγραφωματικά και πρωτεωμικά δεδομένα των τριών λεμφωμάτων αναλύθηκαν και ομαδοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας κατάλληλους αλγόριθμους και οπτικοποιώντας τα αποτελέσματα κάθε κατηγοριοποίησης (Cytoscape). Αριστερά κάθε εικόνας ((α), (β), (γ)) απεικονίζεται η

ομαδοποίηση των μεταγραφημάτων βάσει της συμμετοχής τους σε βιολογικές διαδικασίες (BP), σε κυτταρικά οργανίδια/δομές (CC) και σε μοριακές λειτουργίες (MF). Με κόκκινο και μαύρο χρώμα επισημαίνεται, αντίστοιχα, η συσχέτιση ή μη ομάδας μεταγραφημάτων/πρωτεϊνών με συγκεκριμένες οντολογικές κατηγορίες. Στα δεξιά κάθε εικόνας ((α), (β), (γ)), απεικονίζεται η διακύμανση στην έκφραση των ομαδοποιημένων mRNAs/πρωτεϊνών κάθε οντολογικής κατηγορίας (υπερ-έκφραση: κόκκινο χρώμα, υπο-έκφραση: πράσινο χρώμα, απουσία έκφρασης: μαύρο χρώμα). Η ένταση του χρώματος αντικατοπτρίζει το βαθμό παρουσίας/έκφρασης.



Εικόνα 19: Θερμικοί χάρτες ανάλυσης της ανάθεσης των απορρυθμισμένων mRNAs και πρωτεϊνών σε μεταβολικά μονοπάτια (Top-20 enriched KEGG terms). Τα αποτελέσματα της μεταγραφωματικής και πρωτεωμικής ανάλυσης ομαδοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τους αλγόριθμους της βάσης δεδομένων KEGG PATHWAY analysis και ακολούθως ανακτήθηκαν οι εικόνες των μεταβολικών μονοπατιών σύμφωνα με το βαθμό εμπλουτισμού τους στα συμμετέχοντα μόρια. Αριστερά κάθε εικόνας ((α), (β), (γ)) απεικονίζεται η ομαδοποίηση των μεταγραφημάτων βάσει της συμμετοχής τους σε μοριακά μεταβολικά μονοπάτια. Με κόκκινο και μαύρο χρώμα επισημαίνεται, αντίστοιχα, η συσχέτιση ή μη ομάδας μεταγραφημάτων/πρωτεϊνών με συγκεκριμένες

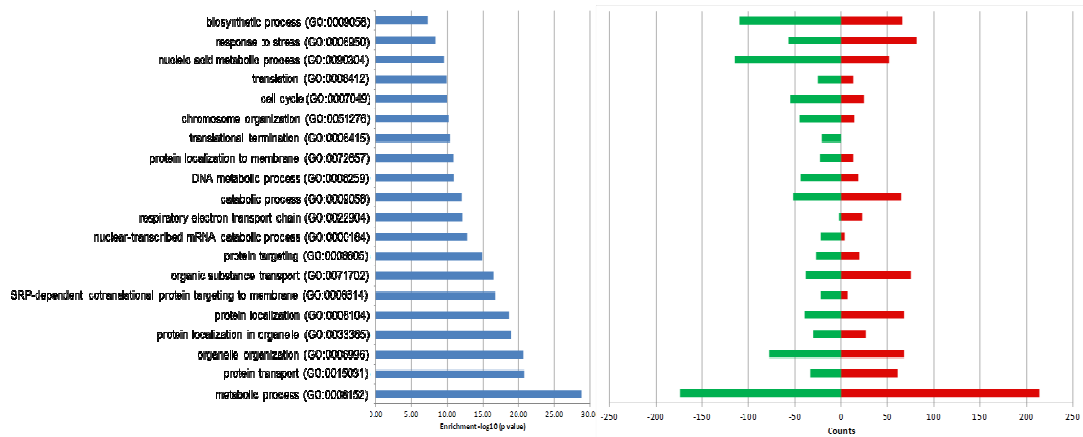
μεταβολικές κατηγορίες. Στα δεξιά κάθε εικόνας ((α), (β), (γ)), απεικονίζεται η διακύμανση στην έκφραση των ομαδοποιημένων mRNAs/πρωτεϊνών κάθε κατηγορίας (υπερ-έκφραση: κόκκινο χρώμα, υπο-έκφραση: πράσινο χρώμα, απουσία έκφρασης: μάρμο χρώμα). Η ένταση του χρώματος αντικατοπτρίζει το βαθμό παρουσίας/έκφρασης.

Συγκριτική λειτουργική ανάλυση των απορρυθμισμένων πρωτεϊνών που είναι κοινές στις κυτταρικές σειρές μετά από Ν3Α.

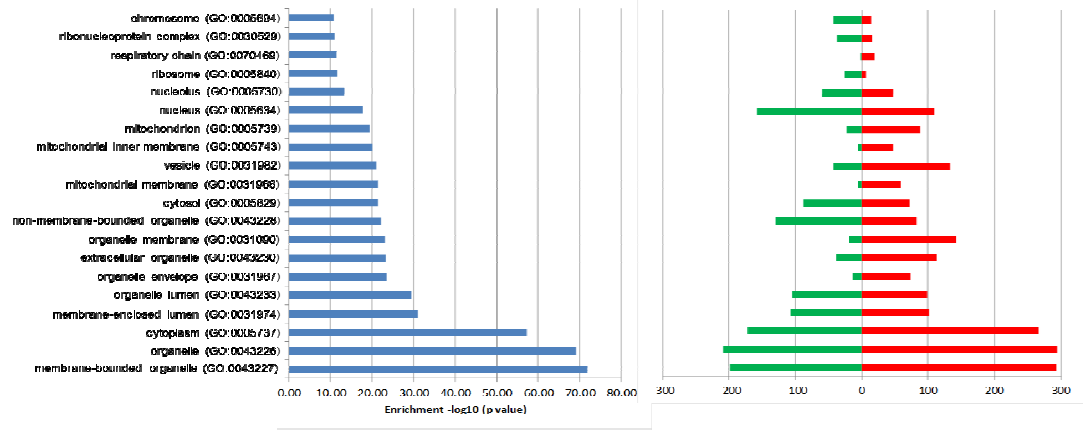
Ακολούθως, εφαρμόστηκε περαιτέρω ανάλυση στις στατιστικά σημαντικές απορρυθμισμένες πρωτεΐνες που είναι κοινές στα τρία είδη λεμφώματος, χρησιμοποιώντας και πάλι τα λογισμικά προγράμματα GOC και DAVID, εξετάζοντας τη συμμετοχή των πρωτεϊνών σε κατηγορίες Γενετικής Οντολογίας. Σκοπός μας ήταν η αποσαφήνιση του πρωτεωμικού τους προφίλ και των πρωτεϊνικών αλλαγών που προωθεί η ενεργοποίηση του p53, χαρακτηρίζοντας τη βιοπαθολογία των λεμφωμάτων.

Η GOC ανάλυση ως προς BP (Εικόνα 20α, Παράρτημα II/Πίνακας 5) έδειξε πως ένας αριθμός των στατιστικά σημαντικών πρωτεϊνών εμπλέκεται σε μεταβολικές διεργασίες, σε πρωτεϊνική μεταφορά/θέση/στόχευση και στην οργάνωση οργανιδίων. Η GO ανάλυση ως προς CC (Εικόνα 20β, Παράρτημα II/Πίνακας 5) έδειξε εμπλουτισμό των στατιστικά σημαντικών πρωτεϊνών που εκφράζονται στην κυτταροπλασματική περιοχή και σε περιοχές (κυτταρικές ή οργανιδίων) που σχετίζονται με μεμβράνες. Η GO ανάλυση ως προς MF (Εικόνα 20γ, Παράρτημα II/Πίνακας 5) έδειξε στατιστικά σημαντικές πρωτεΐνες που σχετίζονται με πρωτεϊνική/poly(A)RNA/καταλυτική πρόσδεση. Τέλος, ο εμπλουτισμός των στατιστικά σημαντικών πρωτεϊνών στο DAVID κατά KEGG (Εικόνα 20δ, Παραρτήματα/Πίνακας 5) ανέδειξε ποικίλλα μονοπάτια, όπως αυτό της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, των ριβοσωμάτων, μεταβολισμού, της πρωτεϊνικής εξαγωγής, των φαγοσωμάτων, του p53. Η ανάλυση των κοινών απορρυθμισμένων πρωτεϊνών στην κατά GOC και DAVID μελέτη παρατίθεται αναλυτικότερα στα παραρτήματα και στην εικόνα που ακολουθεί (Εικόνα 20; Παράρτημα II/Πίνακας 5).

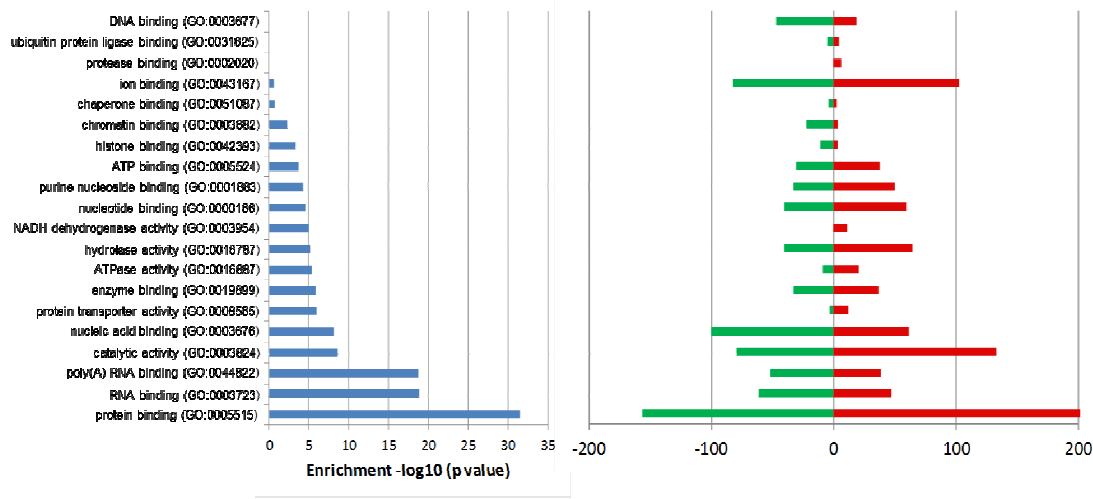
α.



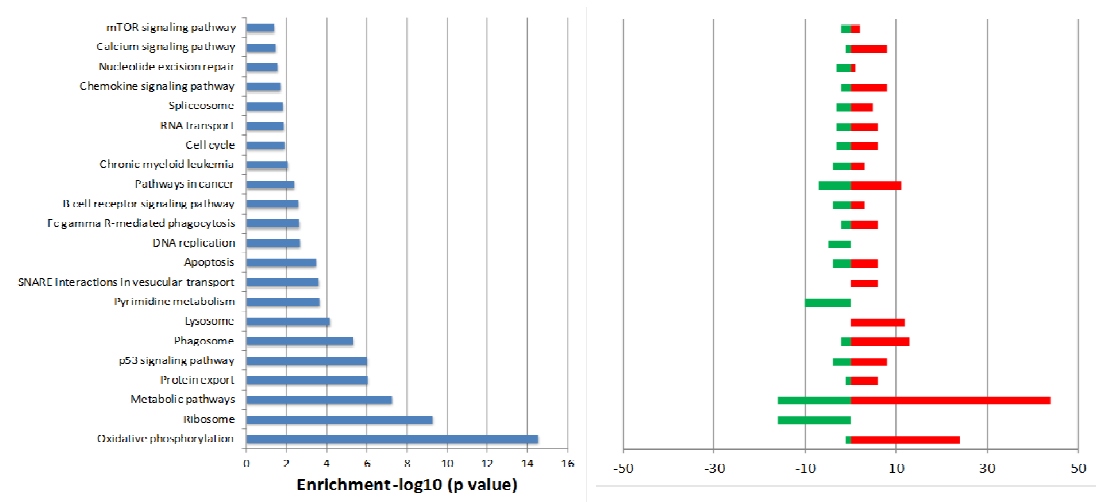
β.



γ.



δ.



Εικόνα 20: Διαγραμματική αποτύπωση της ανάλυσης Γονιδιακής Οντολογίας των πρωτεϊνών που είναι κοινές στα λεμφώματα HL, MCL, ALCL, ως προς τους όρους BP (α), CC (β), MF (γ). Στην τελευταία εικόνα (δ) αποτυπώνεται διαγραμματικά η κατηγοριοποίηση των κοινών πρωτεϊνών σε μονοπάτια, σύμφωνα με τη βάση δεδομένων KEGG. Τα αποτελέσματα της πρωτεωμικής ανάλυσης ομαδοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τους αλγόριθμους της βάσης δεδομένων GOC και KEGG PATHWAY analysis και σύμφωνα με το βαθμό εμπλουτισμού τους στα συμμετέχοντα μόρια. Αριστερά κάθε εικόνας (α-δ) απεικονίζεται η ομαδοποίηση των πρωτεϊνών βάσει της συμμετοχής τους σε τους σε βιολογικές διαδικασίες (BP; α), σε κυτταρικά οργανίδια/δομές (CC; β), σε μοριακές λειτουργίες (MF; γ) και σε μεταβολικά μονοπάτια (KEGG PATHWAY analysis; δ). Δεξιά κάθε εικόνας (α-δ) αποτυπώνεται με χρωματική σήμανση (κόκκινο: θετική; πράσινο: αρνητική) η ρύθμιση των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στις διάφορες οντολογικές και μεταβολικές κατηγορίες που έχουν δημιουργηθεί.

Συγκριτική λειτουργική ανάλυση των απορρυθμισμένων mRNAs και πρωτεϊνών που είναι μοναδικά στις κυτταρικές σειρές μετά από Ν3Α.

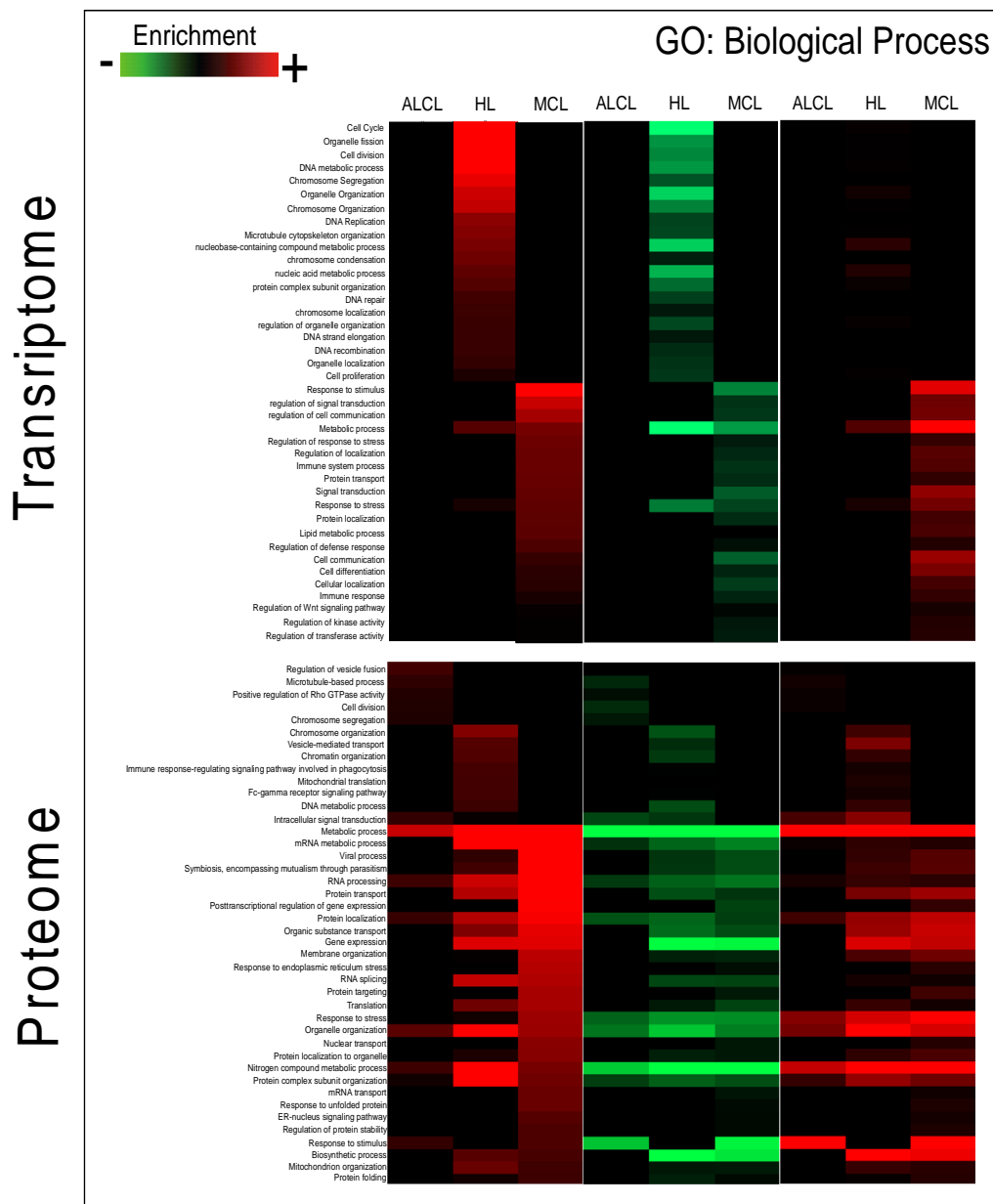
Ακολούθως, η λίστα των στατιστικά σημαντικών γονιδίων και πρωτεϊνών που είναι μοναδικά στα τρία είδη λεμφώματος τέθηκε σε εκ νέου ανάλυση κατά GO και DAVID, εξετάζοντας τη συμμετοχή τους σε κατηγορίες Γενετικής Οντολογίας. Σκοπός μας ήταν η αποσαφήνιση του γονιδιακού/πρωτεωμικού προφίλ και των γονιδιακών/πρωτεϊνικών αλλαγών που προωθεί η ενεργοποίηση του p53 μετά από Ν3Α και χαρακτηρίζουν τους διαφορετικούς υποτύπους λεμφώματος. Τα αποτελέσματα της συγκριτική λειτουργικής ανάλυσης των στατιστικά σημαντικών απορρυθμισμένων mRNAs και πρωτεϊνών που είναι μοναδικά στα τρία είδη λεμφώματος μετά από Ν3Α παρατίθενται αναλυτικά στο αντίστοιχο παράρτημα (Παράρτημα Ι/Πίνακας 6, 7), ενώ στις εικόνες που ακολουθούν παρουσιάζονται τα πιο σημαντικά (συμπεριλαμβάνονται κατηγορίες ταξινόμησης με τις πιο υψηλές τιμές εμπλουτισμού) (Εικόνα 21, 22).

Η GO ανάλυση ως προς τον όρο BP των μοναδικών γονιδίων στο λέμφωμα HL, MCL και ALCL (Εικόνα 21α, Παράρτημα Ι/Πίνακας 6, 7) αποκάλυψε ότι συγκριτικά με τα δύο NHLs, τα 152 γονίδια του λεμφώματος Hodgkin συμμετέχουν κυρίως στον κυτταρικό κύκλο (μίτωση), στην οργανωτική οργάνωση, στην κυτταρική διαίρεση, στον ενδοκυτταρικό σηματοδοτικό καταρράκτη και στην οργάνωση χρωμοσώματος. Αναφορικά με τα 268 μοναδικά γονίδια του μανδύα, η ανάλυση έδειξε ότι σχετίζονται με την κυτταρική διαφοροποίηση, τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, τη μεταφορά/εντοπισμό πρωτεϊνών και την απόπτωση, ενώ τα 66 γονίδια που βρέθηκαν να εκφράζονται μόνο στο ALCL εμπλέκονται στη χημική ομοιότητα. Επιπλέον, τα γονίδια που εμπλέκονται σε μεταβολικά μονοπάτια και βιοσυνθετικές διεργασίες βρέθηκαν πιο εμπλουτισμένα στο HL από ότι στο ALCL και τα γονίδια που συμμετέχουν στην κυτταρική διαφοροποίηση βρέθηκαν πιο εμπλουτισμένα στο ALCL από ότι στις άλλες δύο σειρές. Τέλος, τα γονίδια που συνδέονται με την απόκριση σε ερέθισμα βρέθηκαν ελαφρώς πιο εμπλουτισμένα στο ALCL έναντι του HL, ενώ αυτά που συνδέονται με την απόκριση σε στρες βρέθηκαν ελαφρώς πιο εμπλουτισμένα στο HL αντί του ALCL.

Στη συνέχεια, η GO ανάλυση ως προς τον όρο CC (Εικόνα 21β, Παράρτημα Ι/Πίνακας 6, 7) έδειξε ότι τα γονίδια του λεμφώματος Hodgkin σχετίζονται με τον πυρήνα και το χρωμόσωμα και τα γονίδια του μανδύα συμμετέχουν στο Golgi, στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στο ριβόσωμα. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι τα απορρυθμισμένα γονίδια του λεμφώματος ALCL εντοπίστηκαν να δρουν μόνο στην ακτίνη του κυτταροσκελετού.

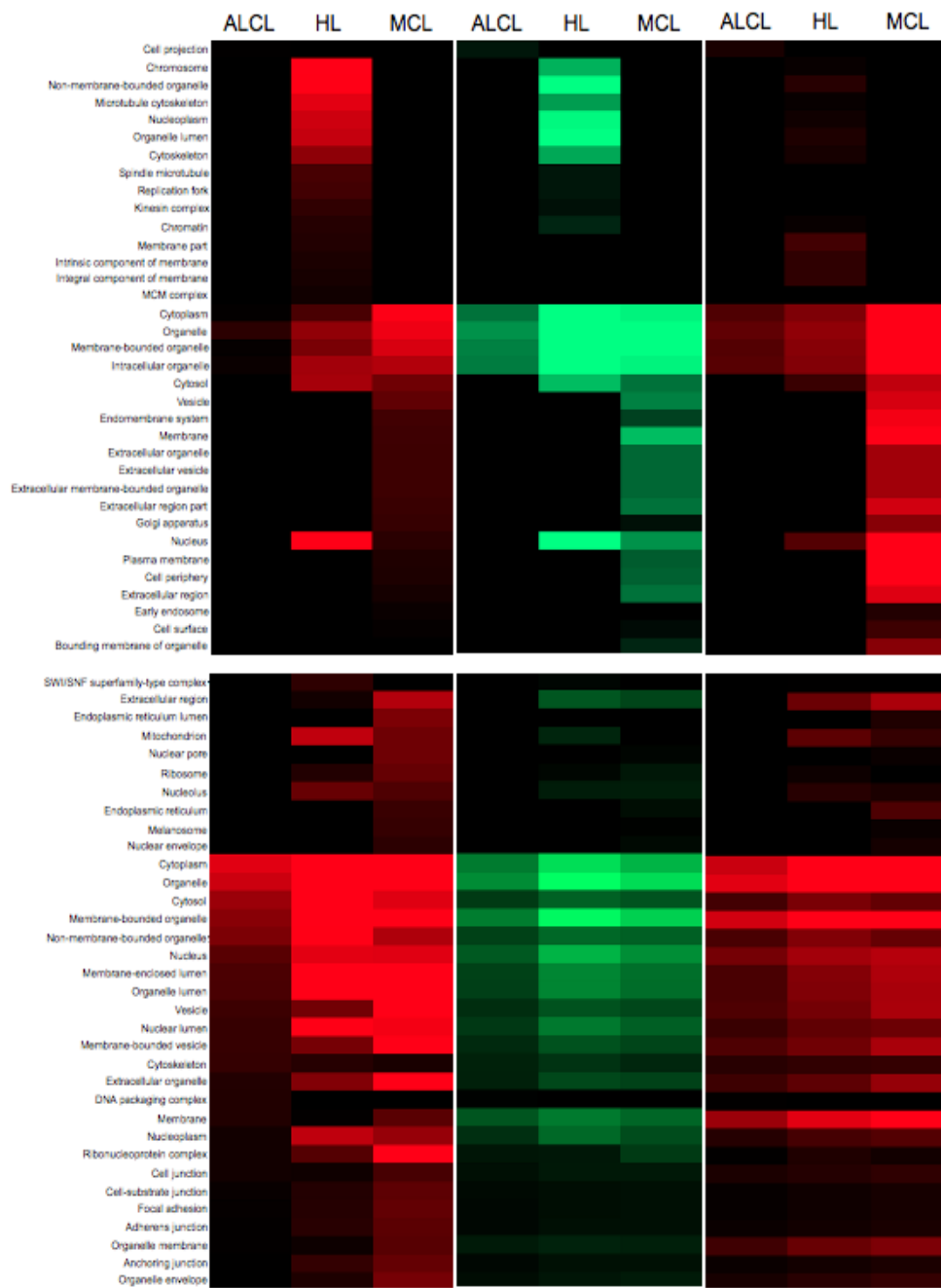
Τέλος, ως προς τον όρο MF (Εικόνα 21γ, Παράρτημα Ι/Πίνακας 6, 7) η ανάλυση έδειξε πως τα στατιστικώς σημαντικά γονίδια της λίστας του HL εμπλέκονται στη διεργασία της πρόσδεσης νουκλεϊκού οξέος και ATP, τα γονίδια του MCL στην καταλυτική δραστηριότητα και τα γονίδια του ALCL στη μεταβατική πρόσδεση μεταλλικού ιόντος, στην πρόσδεση σε συγκεκριμένη αλληλουχία DNA και στην πρόσδεση ακτίνης. Επίσης, γονίδια που αφορούν σε διαδικασίες υδρολάσης είχαν μεγαλύτερη συμμετοχή στο HL συγκριτικά με το MCL, γονίδια που εμπλέκονταν στην πρόσδεση πρωτεϊνών κυτταροσκελετού βρέθηκαν πιο εμπλουτισμένα στο ALCL αντί του MCL και γονίδια που συμμετέχουν στην ενζυμική πρόσδεση είχαν ελαφρώς πιο μεγάλη παρουσία στο ALCL, ακολούθως στο HL και τελικά στο MCL.

(α)

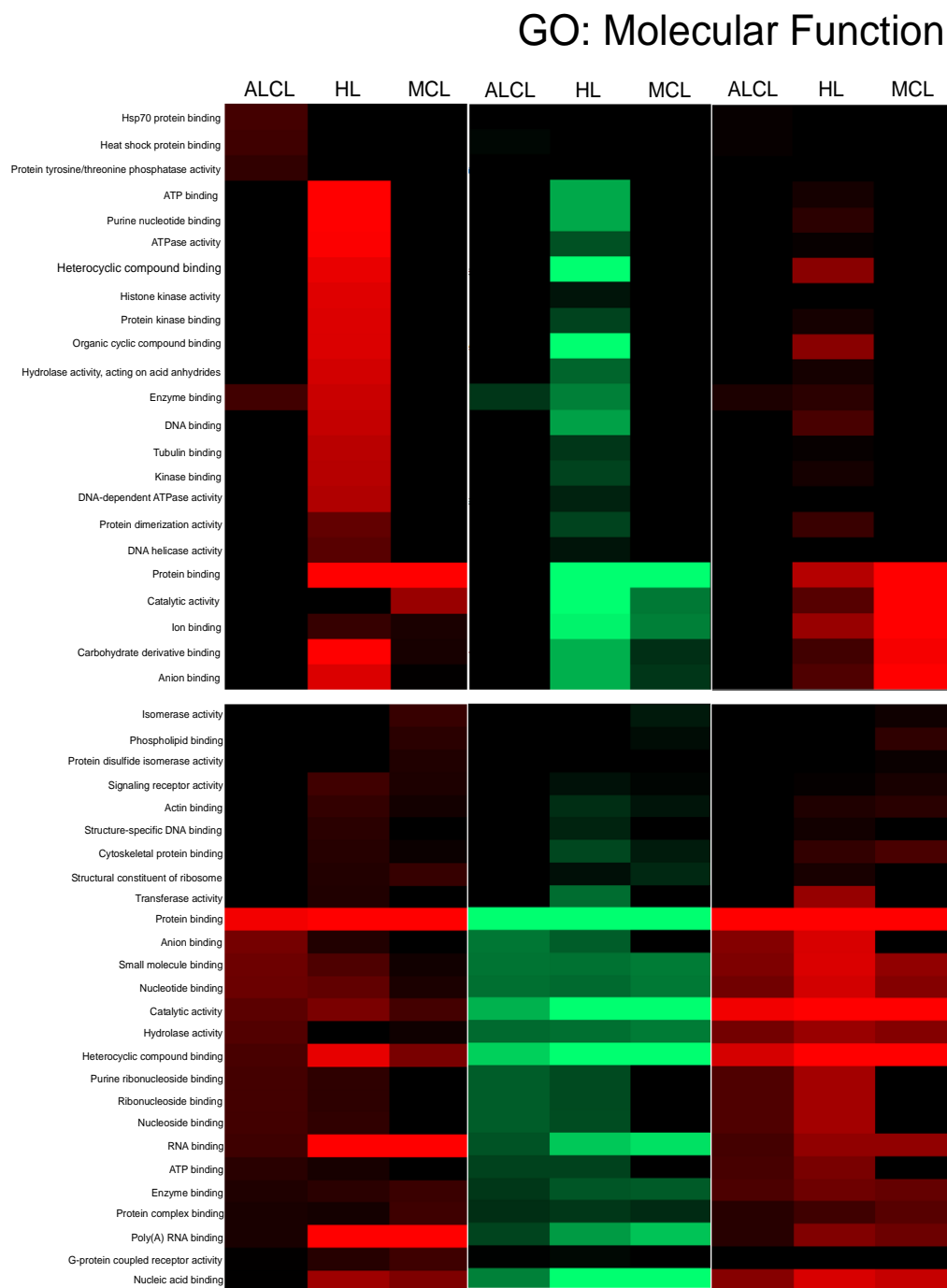


(β)

GO: Cellular Compartment

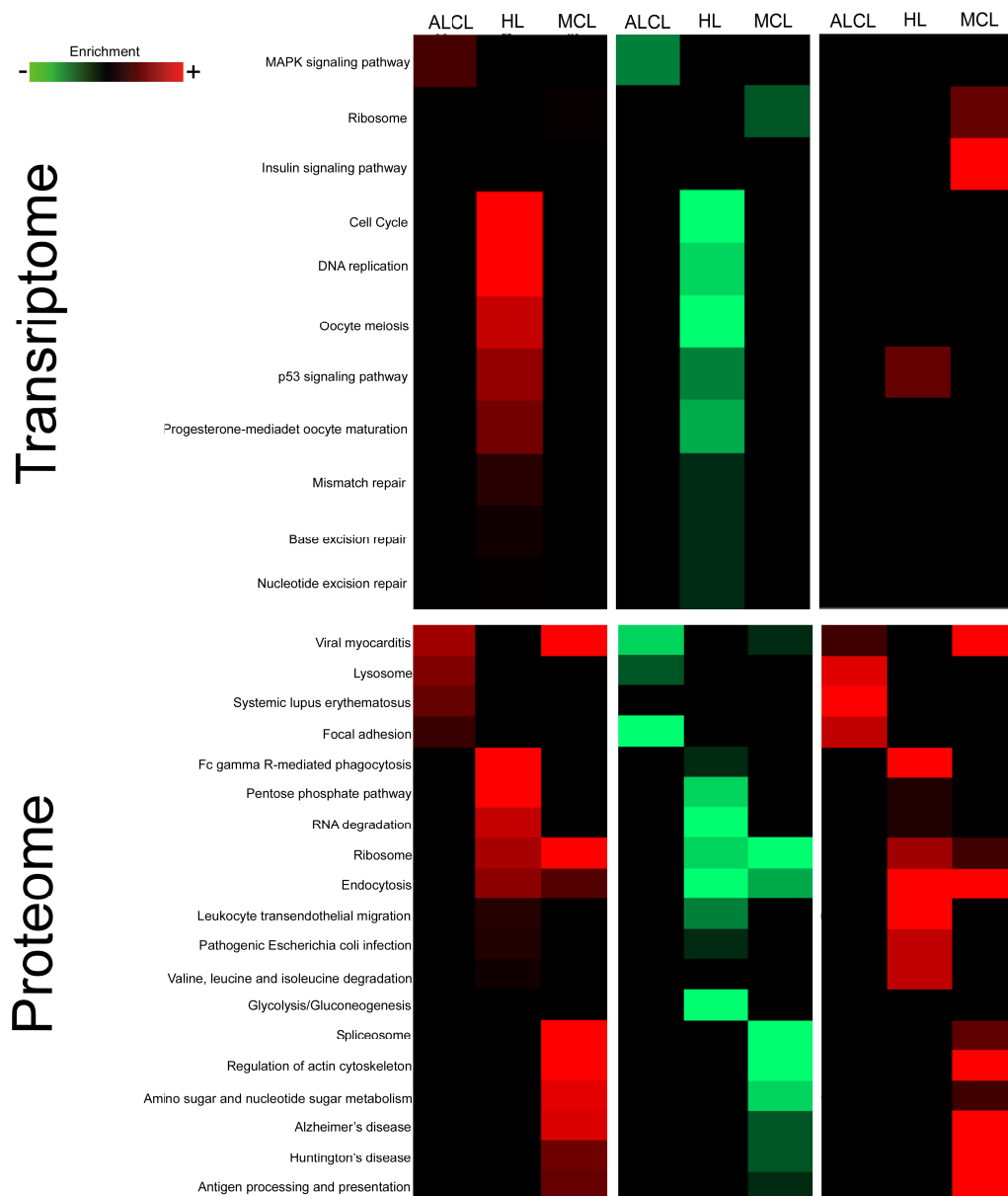


(γ)



Εικόνα 21: Θερμικοί χάρτες ανάλυσης Γονιδιακής Οντολογίας των mRNAs που είναι μοναδικά στα λεμφώματα HL, MCL, ALCL, ως προς τους όρους BP (α), CC (β), MF (γ). Αριστερά κάθε εικόνας ((α), (β), (γ)) απεικονίζεται η ομαδοποίηση των μεταγραφημάτων βάσει της συμμετοχής τους σε βιολογικές διαδικασίες (BP), σε κυτταρικά οργανίδια/δομές (CC) και σε μοριακές λειτουργίες (MF). Με κόκκινο και μαύρο χρώμα επισημαίνεται, αντίστοιχα, η συσχέτιση ή μη των ομαδοποιημένων mRNAs με συγκεκριμένες οντολογικές κατηγορίες. Επιπλέον, στα δεξιά κάθε εικόνας (α-γ), αποτυπώνεται η διακύμανση στην έκφραση των ομαδοποιημένων μεταγραφημάτων κάθε οντολογικής κατηγορίας (υπερ-έκφραση: κόκκινο χρώμα, υπο-έκφραση: πράσινο χρώμα, απουσία

έκφρασης: μύρο χρώμα). Η ένταση του χρώματος αντικατοπτρίζει το βαθμό ρύθμισης κάθε μεταγραφήματος.



Εικόνα 22: Θερμικοί χάρτες ανάλυσης της ανάθεσης των απορρυθμισμένων μεταγραφημάτων και πρωτεϊνών που είναι μοναδικά στα λεμφώματα HL, MCL, ALCL, σε μονοπάτια, σύμφωνα με τη βάση δεδομένων KEGG. Τα αποτελέσματα της πρωτεωμικής ανάλυσης ομαδοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τους αλγόριθμους της βάσης δεδομένων KEGG PATHWAY analysis, σύμφωνα με το βαθμό εμπλουτισμού τους στα συμμετέχοντα μόρια. Αριστερά της εικόνας απεικονίζεται η ομαδοποίηση των πρωτεϊνών βάσει της συμμετοχής τους σε τους σε μεταβολικά μονοπάτια (KEGG PATHWAY analysis). Δεξιά κάθε εικόνας αποτυπώνεται με χρωματική σήμανση (κόκκινο: θετική; πράσινο: αρνητική) η ρύθμιση των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στις διάφορες μεταβολικές κατηγορίες που έχουν δημιουργηθεί

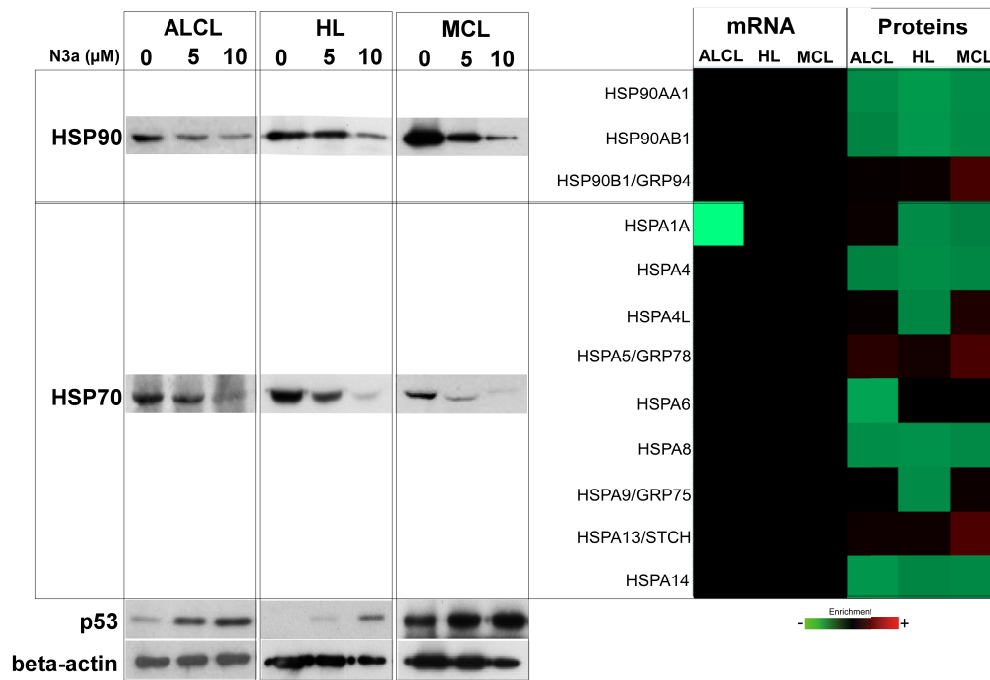
4^η Δραστηριότητα

Επιβεβαίωση επιλεγμένων πρωτεϊνικών μεταβολών με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

Η διαφορική έκφραση συγκεκριμένων πρωτεϊνών ενδιαφέροντος, όπως αυτή προέκυψε από τα αποτελέσματα της πρωτεωμικής ανάλυσης, επιβεβαιώθηκε εφαρμόζοντας την ανάλυση κατά Western. Βασικό κριτήριο επιλογής τους αποτέλεσε η συσχέτιση της λειτουργία τους με μηχανισμούς παθογένειας διαφόρων μορφών καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και του λεμφώματος και το ποσοστό μεταβολής των επιπέδων έκφρασής τους στα αποτελέσματά μας. Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας έχουν εντοπίσει την ύπαρξη δι-επικοινωνιών (crosstalks) μεταξύ του μεταγωγικού μονοπατιού της p53 και μεριστικών αυτών των σημαντικών ογκογόνων οδών.

Έτσι, αρχικά, επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη τα επίπεδα έκφρασης δύο μελών της οικογένειας των Heat-Shock-Proteins (HSPs), της Hsp70 και της Hsp90 στα τρία είδη λεμφώματος, στο λέμφωμα του Hodgkin (MDA-V), στο λέμφωμα του μανδύα (JMP-1) και στο αναπλαστικό λέμφωμα από μεγάλα κύτταρα (SUP-M2).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της πρωτεωμικής ανάλυσης, οι Hsp70 και Hsp90 βρέθηκαν κυρίως με μειωμένα τα επίπεδά τους σε όλα τα λεμφώματα. Κατ'αντιστοιχία, και όπως αποτυπώνεται και στην Εικόνα 23, τα επίπεδα της Hsp70 και Hsp90 μειώθηκαν σημαντικά μετά την εφαρμογή της Nutlin-3A στη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε κατά την πρωτεωμική ανάλυση στις τρεις λεμφωκυτταρικές σειρές μελέτης (0-5μM). Η μεγαλύτερη μείωση των επιπέδων των Hsp70/Hsp90 σημειώθηκε στη σειρά JMP-1. Η αύξηση των επιπέδων της p53 μετά από Nutlin-3A (εκτός της KM-H2, mt p53) διασφάλισε τη λειτουργικότητα του πειράματος, πιστοποιώντας ότι το μεταγωγικό μονοπάτι της p53 είναι σταθεροποιημένο και ενεργοποιημένο. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο ελέγχου, διατηρώντας την έκφρασή της σταθερή, πριν και μετά τη δράση της Nutlin-3A.

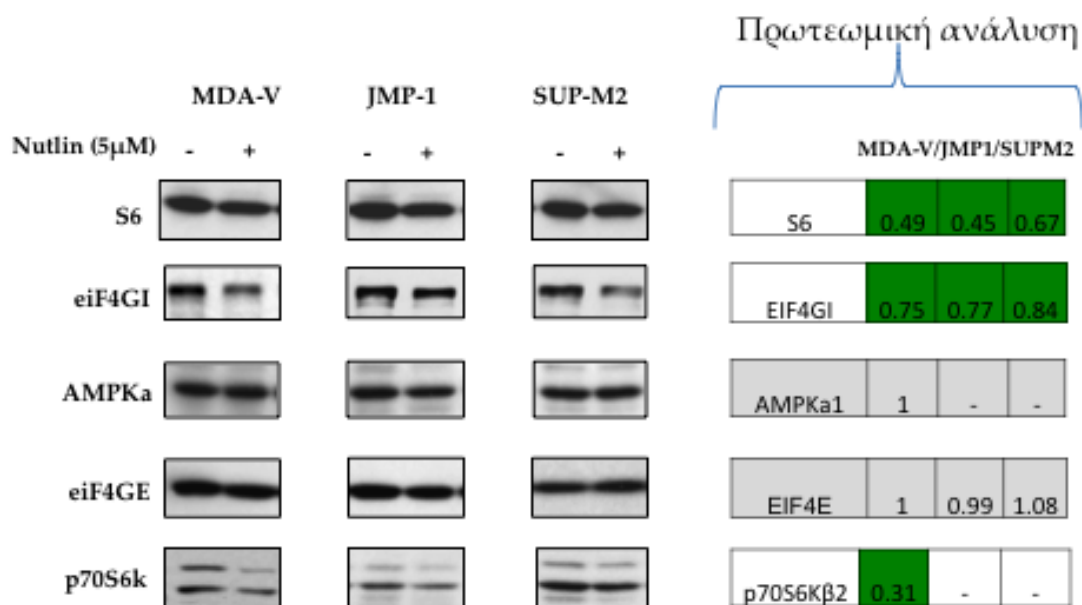


Εικόνα 23: Επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων πρωτεωμικής ανάλυσης που σχετίζονται με τις HSPs με ανοσοαποτύπωση. Η εφαρμογή της Nutlin-3A σε κύτταρα λεμφώματος Hodgkin και μη-Hodgkin με wt *p53* οδήγησε σε μείωση των επιπέδων έκφρασης των Hsp70 και Hsp90, σε αναλογία με την αυξανόμενη συγκέντρωση του ανταγωνιστή του MDM2.

Στη συνέχεια, προκειμένου να έχουμε καλύτερη εικόνα της επίδρασης της Nutlin-3A στις τρεις σειρές μελέτης, εφαρμόσαμε ανοσοαποτύπωση και διαβάθμιση συγκέντρωσης της N3A (0-10μM). Εφαρμόζοντας από 2,5μM έως και 10μM Nutlin-3A, διαπιστώθηκε καλύτερα ότι τα επίπεδα της Hsp70 και Hsp90 μειώθηκαν σημαντικά και σε αναλογία με την εφαρμογή διαβαθμισμένης συγκέντρωσης της Nutlin-3A (2.5-10μM) σε όλες τις λεμφωκυτταρικές σειρές μελέτης. Αντίθετα, τα επίπεδα των πρωτεϊνών Hsp70/Hsp90 της σειράς αναφοράς KM-H2 (mt *p53*) δεν έδειξαν να επηρεάζονται από τη Nutlin-3A. Και πάλι, τη μεγαλύτερη μείωση των επιπέδων των Hsp70/Hsp90 παρουσίασε η σειρά JMP-1. Στην MDA-V, επειδή διαπιστώσαμε ότι η εφαρμογή της Nutlin-3A σε συγκέντρωση 5μM δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές στα επίπεδα των HSP70, HSP90, γι' αυτό και στη συγκεκριμένη σειρά, η διακύμανση της συγκέντρωσης της Nutlin-3A προσαρμόστηκε στις τιμές 0-5-10μM, αντί 0-2.5-5μM. Η *β-ακτίνη* χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο ελέγχου, διατηρώντας την έκφρασή της σταθερή, πριν και μετά τη δράση της Nutlin-3A.

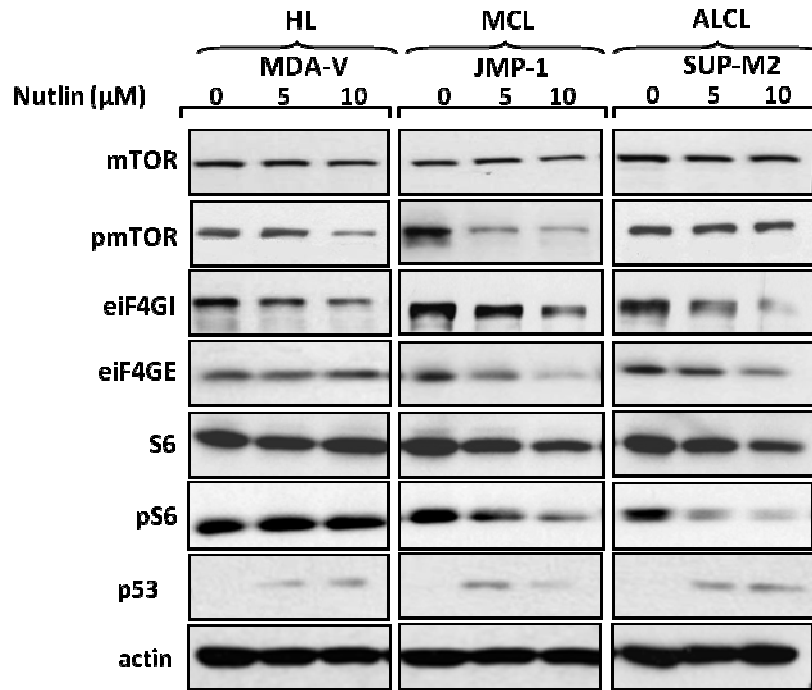
Ακολούθως, ελέγχθηκε η έκφραση πρωτεϊνών που ελέγχονται από τον κομβικό δέκτη και ρυθμιστή ενδοκυτταρικών μεταβολικών σημάτων mTOR (Mammalian Target of Rapamycin), καθώς και πρωτεϊνών που συμμετέχουν ή σχετίζονται με το συγκεκριμένο μονοπάτι αγωγής σήματος (π.χ. AMPKa, eiF4GI, eiF4E), όπως αυτή προέκυψε από τα αποτελέσματα της πρωτεωμικής

ανάλυσης. Με την ανάλυση κατά Western επιβεβαιώθηκε ότι όντως υπάρχει συμφωνία με τις αναλύσεις του πρωτεωμικού προφίλ των κυτταρικών σειρών λεμφώματος μελέτης, όπου τα επίπεδα των S6, eiF4GI και P70S6K μειώθηκαν μετά από N3A, ενώ τα επίπεδα έκφρασης των AMPKa, eiF4GE διατηρήθηκαν σταθερά (Εικόνα 27).



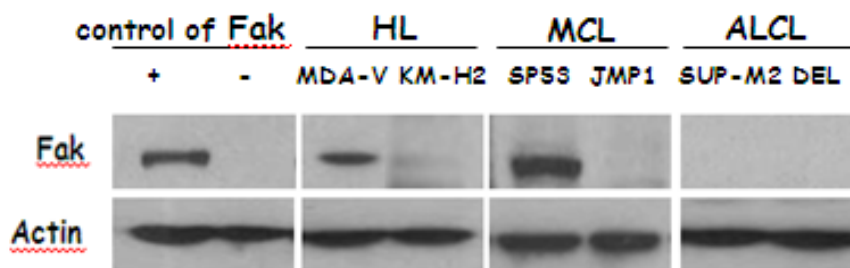
Εικόνα 24: Επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων πρωτεωμικής ανάλυσης που σχετίζονται με το mTOR με ανοσοαποτύπωση. Η εφαρμογή της Nutlin-3A σε κύτταρα λεμφώματος Hodgkin και μη-Hodgkin με wt p53 οδήγησε σε μείωση των επιπέδων έκφρασης των S6, eiF4GI, P70S6K, ενώ διατήρησε σταθερά τα επίπεδα έκφρασης των AMPKa, eiF4GE σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της πρωτεωμικής ανάλυσης.

Στη συνέχεια, για να γίνει καλύτερη αξιολόγηση του μοτίβου ρύθμισης του σηματοδοτικού μονοπατιού του mTOR από την ενεργοποιημένη p53, ελέγχθηκαν τα ολικά και τα φωσφορυλιωμένα επίπεδα του mTOR και πρωτεϊνών που ελέγχονται από αυτήν (p-S6), σε διαβάθμιση συγκέντρωσης της Nutlin-3A (0, 5, 10µM) (π.χ. mTOR, p-mTOR, p-S6, eiF4GI, eiF4E). Παράλληλα, η επαγωγή της p53 μετά από προσθήκη της Nutlin-3A και η σταθερή έκφραση της β-ακτίνης διασφάλισαν την έλλειψη σφάλματος στο πείραμα. Με την ανάλυση ανοσοαποτύπωσης διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα των εμπλεκόμενων πρωτεϊνών επηρεάζονται μετά τη χορήγηση της Nutlin-3A, προκαλώντας μείωση στη δράση του σηματοδοτικού μονοπατιού του mTOR και στους τρεις τύπους λεμφώματος μελέτης, καθώς μειώνονται τα επίπεδα της p-mTOR και της p-S6 (Εικόνα 25).



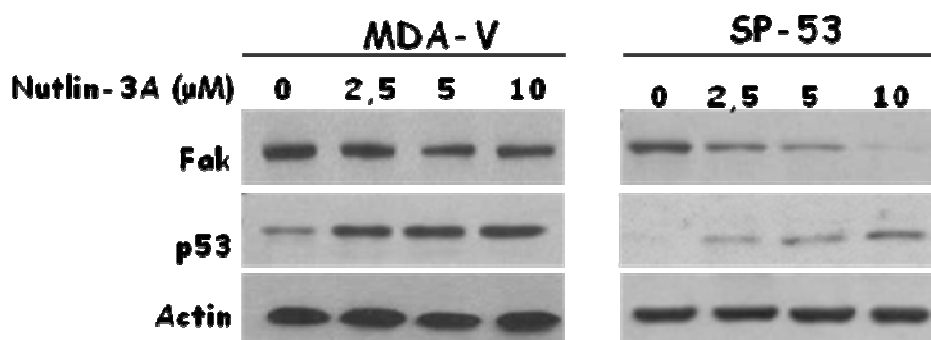
Εικόνα 25: Διερεύνηση της επίδρασης της Nutlin-3A στο σηματοδοτικό μονοπάτι του mTOR με ανοσοαποτύπωση. Η ρύθμιση της πρωτεΐνης mTOR στα τρία είδη λεμφώματος, στο λέμφωμα του Hodgkin (MDA-V), στο λέμφωμα του μανδύα (JMP-1) και στο αναπλαστικό λέμφωμα από μεγάλα κύτταρα (SUP-M2) μειώνεται (pmTOR), όπως φαίνεται και κατά τον έλεγχο πρωτεϊνών που ρυθμίζονται από την mTOR (S6, pS6, eiF4GI, eiF4E).

Συμπληρωματικά, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της έκφρασης ενός μέλους της οικογένειας των πρωτεϊνικών κινασών τυροσίνης (Protein Tyrosine Kinase, PTKs) ο οποίος δρα ως υποδοχέας των κυτταρικών επιφανειών, της πρωτεΐνης FAK, (Focal Adhesion Kinase). Ενεργοποίηση της FAK έχει βρεθεί ότι ενισχύει ποικίλα βιολογικά αποτελέσματα σε λεμφώματα, όπως κυτταρική προσκόλληση, μετανάστευση, ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και επιβίωση. Στην αρχική διερευνητική πρωτεωμική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε σε έξι κυτταρικές σειρές λεμφώματος, είχε προκύψει ότι η συγκεκριμένη πρωτεΐνη απορρυθμίζεται (μειώνεται) σημαντικά στο λέμφωμα του μανδύα, και ειδικότερα, στη σειρά SP-53. Για να διερευνηθούν (και κατόπιν να επιβεβαιωθούν) καλύτερα τα αποτελέσματα αυτά, αρχικά ελέγχθηκε η έκφραση της πρωτεΐνης σε όλες τις σειρές του *in vitro* συστήματος μελέτης. Η εικόνα ανοσοαποτύπωσης (Εικόνα 26) έδειξε ότι η FAK εκφράζεται στο λέμφωμα Hodgkin και του μανδύα, στις κυτταρικές σειρές MDA-V και SP-53 αντίστοιχα.



Εικόνα 26: Η πρωτεΐνη FAK εκφράζεται σε δύο wt p53 κυτταρικές σειρές λεμφώματος στο λέμφωμα του Hodgkin (MDA-V) και στο λέμφωμα του μανδύα (SP53). Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν δύο μάρτυρες ελέγχου (θετικός (+) και αρνητικός (-)) της έκφρασης της FAK, με γονίδιο αναφοράς τη β-ακτίνη.

Οι εν λόγω σειρές επεξεργάστηκαν με Nutlin-3A για 24 ώρες και το πρωτεϊνικό τους εκχύλισμα αναλύθηκε περαιτέρω για την έκφραση της πρωτεΐνης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (0, 2,5, 5, 10μM). Η ανάλυση κατά Western Blott έδειξε ότι μόνο στη μία σειρά που υπάρχει έκφραση της πρωτεΐνης FAK, στην SP53 (MCL), τα επίπεδά της επηρεάζονται και ειδικότερα μειώνονται μετά την εφαρμογή της Nutlin-3A. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο ελέγχου, διαπιστώνοντας ότι η έκφρασή της παραμένει σταθερή, πριν και μετά τη δράση της Nutlin-3A (Εικόνα 27).



Εικόνα 27: Τα κύτταρα του λεμφώματος του μανδύα με wt p53 δείχνουν μείωση στα επίπεδα έκφρασης της FAK, σε αναλογία με τη διαβάθμιση της συγκέντρωσης του ανταγωνιστή του MDM2.

Π.Ε.3 Αξιοποίηση των γενωμικών/μεταγραφικών και πρωτεωμικών δεδομένων για την μελέτη οδών δι-επικοινωνίας μεταξύ της p53 και άλλων ογκογόνων μηχανισμών σε Hodgkin και μη Hodgkin λεμφώματα.

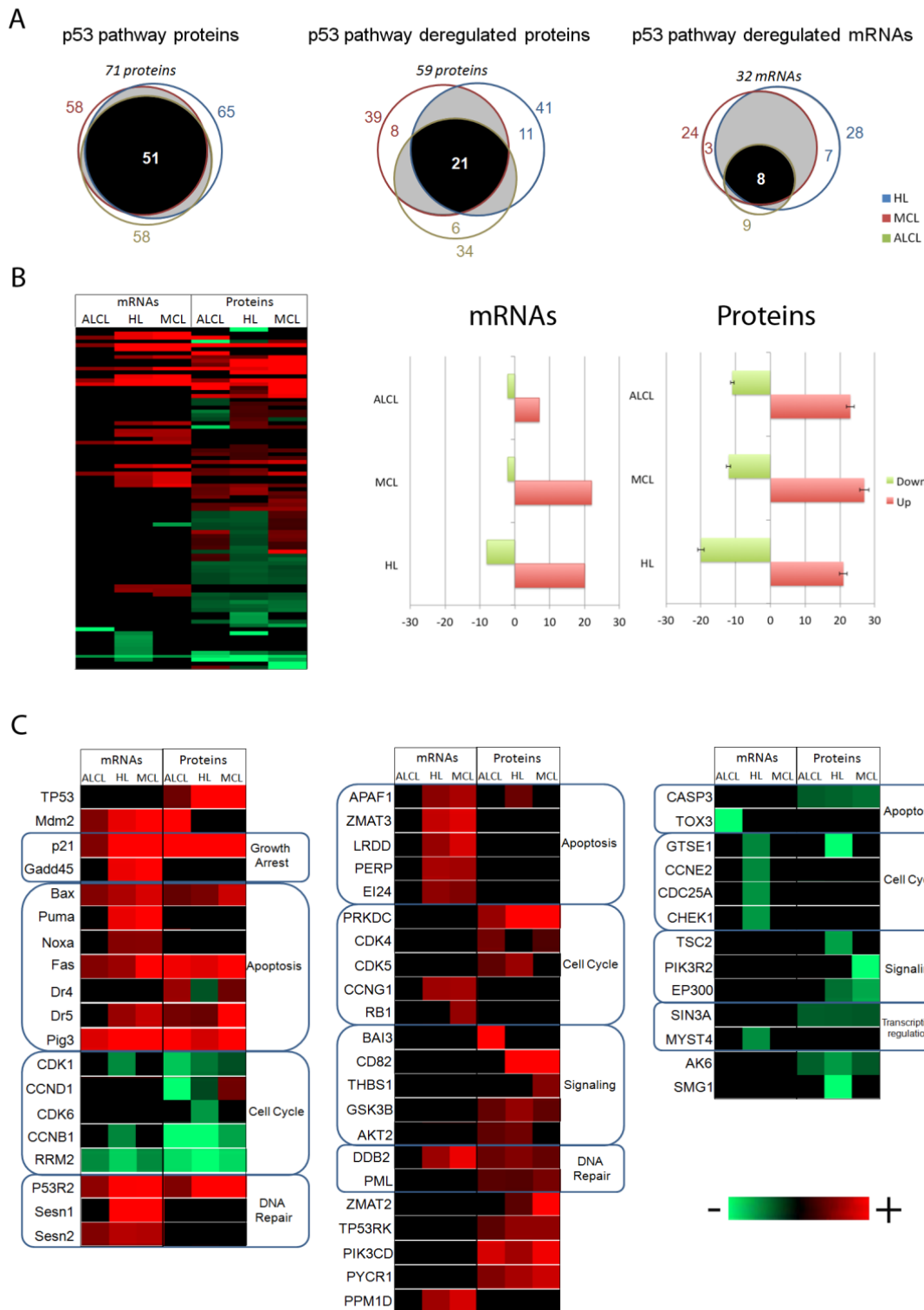
1^η Δραστηριότητα

Ανάδειξη ομάδων πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και πιθανώς μετέχουν στην ίδια οδό μεταγωγής σήματος.

Τα αποτελέσματα από τη μεταγραφωματική και πρωτεωμική ανάλυση για την καλύτερη αξιολόγησή τους υποβλήθηκαν σε περαιτέρω επεξεργασία χρησιμοποιώντας χειροκίνητη αναζήτηση αλλά και ειδικά λογισμικά προγράμματα (DAVID, Perseus) προκειμένου να επιτευχθεί η ταυτοποίηση πιθανών αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών για τις οποίες παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή των επιπέδων τους, μετά από ενεργοποίηση της p53 λόγω N3A. Έμφαση δόθηκε στις πρωτεϊνικές ομάδες που βρέθηκαν ότι συμμετέχουν σε κοινές ογκογόνες οδούς. Έτσι προσδιορίστηκαν τα μεταβολικά μονοπάτια που απορρυθμίζονται από τη N3A στις διαφορετικές λεμφωματικές κυτταρικές σειρές.

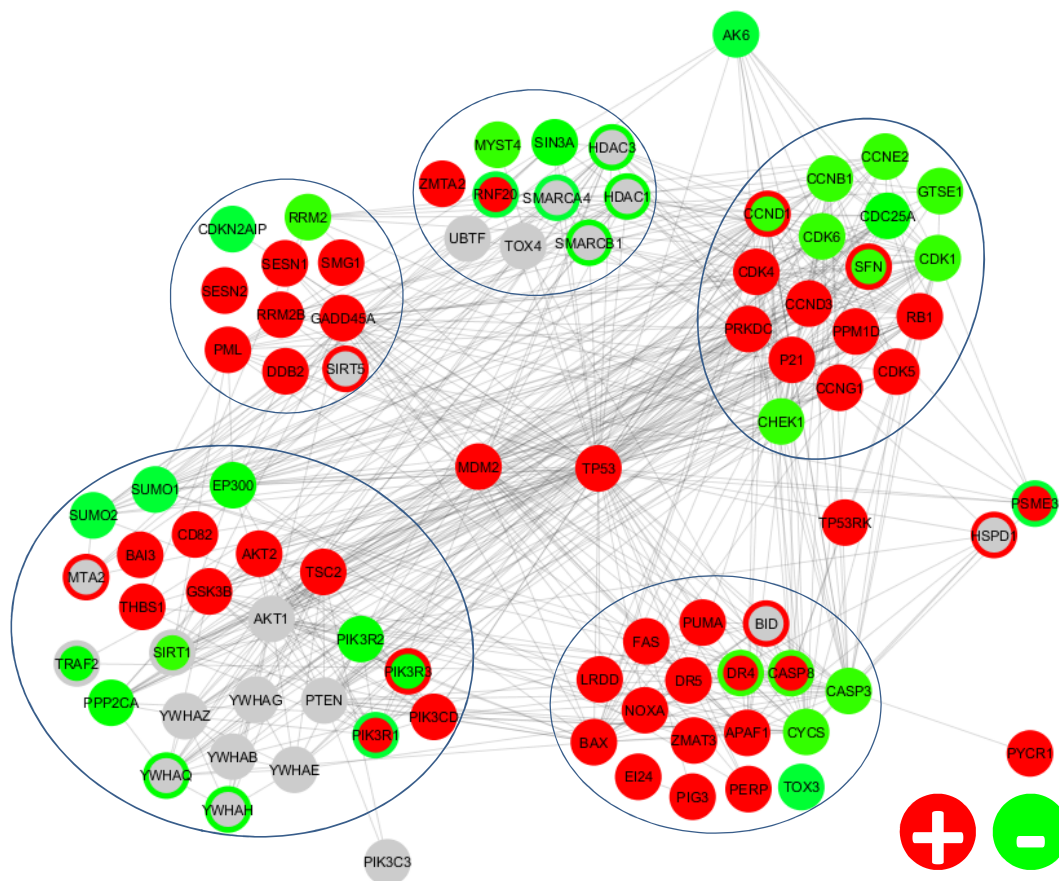
Προσδιορισμός απορρυθμισμένων γονιδίων/πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο μονοπάτι του p53 (Εικόνα 28-29; ΠαράρτημαIII/Πίνακας 10).

Ο τρόπος δράσης της N3A βασίζεται στη σταθεροποίηση και ενεργοποίηση της p53, συνεπώς το πρώτο πράγμα που εξετάσαμε ήταν μεταβολές στη γονιδιακή έκφραση/mRNA που σχετίζονται με το σηματοδοτικό μονοπάτι του p53, την επαγωγή της απόπτωσης και τη μεταγραφική ρύθμιση στόχων του p53. 32 γονίδια βρέθηκαν να κατηγοριοποιούνται άμεσα στο μονοπάτι του p53. Τα απορρυθμισμένα γονίδια έδειξαν το ίδιο πρότυπο έκφρασης στους τρεις τύπους λεμφώματος της μελέτης μας (όταν και όπου ταυτοποιήθηκαν) ((Εικόνα 28-29; ΠαράρτημαIII/Πίνακας 10). Το p53, μέσω του ρόλου του ως μεταγραφικός παράγοντας αλλά και μέσω των μη-μεταγραφικών του δραστηριοτήτων οδήγησε στην ενεργοποίηση πολλών γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τη ρύθμιση διεργασιών, όπως είναι η επιδιόρθωση του DNA, η παύση του κυτταρικού κύκλου, η απόπτωση κλπ., ενώ παράλληλα περιορίσε την έκφραση των γονιδίων που προωθούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.



Εικόνα 28: Ιστογράμματα, θερμικός χάρτης και επιβεβαίωση των απορρυθμισμένων μεταγραφημάτων και πρωτεωμάτων που συμμετέχουν στο μονοπάτι του p53 σε HL, MCL, ALCL λεμφώματα. (α) Στη διαγραμματική αποτύπωση (Venn diagram) συνοψίζονται οι μοναδικές και κοινές σχέσεις που δημιουργούνται κατά τη σύγκριση των omics αποτελεσμάτων των λεμφωματικών κυτταρικών σειρών HL, MCL και ALK+ ALCL +/- N3A. Συνοπτικά, 32 μεταγραφήματα και 59 πρωτεΐνες βρέθηκαν να συμμετέχουν στο μονοπάτι του p53, εκ των οποίων 8 mRNAs και 21 πρωτεΐνες ήταν κοινά και στα τρία λεμφώματα. (β) Στο ραβδόγραμμα απεικονίζεται η διακύμανση στη ρύθμιση των απορρυθμισμένων γονιδίων και πρωτεϊνών κάθε κυτταρικής σειράς (υπερ-έκφραση:

κόκκινο χρώμα, υπο- έκφραση: πράσινο χρώμα). Τα διαγράμματα δείχνουν ότι το λέμφωμα του μανδύα παρουσίασε τη μεγαλύτερη αύξηση και το λέμφωμα του Hodgkin παρουσίασε τη μεγαλύτερη μείωση στη ρύθμιση των συμμετέχοντων μορίων στο μονοπάτι του p53 τόσο στη μεταγραφική όσο και στην πρωτεωμική ανάλυση. (γ) Το χρώμα κάθε κελιού αντιστοιχεί στη \log_2 υπερ-έκφραση (κόκκινο) ή υπο-έκφραση (πράσινο) κάθε μορίου μετά από N3A (όπως αυτή προκύπτει μετά τη σύγκρισή του με την τιμή που είχε πριν τη χορήγηση της N3A). Το μαύρο χρώμα αντιστοιχεί σε απουσία έκφρασης, ενώ η ένταση του χρώματος αντικατοπτρίζει το βαθμό ρύθμισης. Κάθε είδος ανάλυσης και κάθε κυτταρική σειρά λεμφώματος έχει εντελώς διαφορετικά προφίλ ρύθμισης, δηλώνοντας ότι περιλαμβάνουν γονίδια και πρωτεΐνες που ρυθμίζονται σε διαφορετικό επίπεδο (μεταγραφή/μετάφραση) και χαρακτηρίζουν μοριακά την κάθε λεμφωματική σειρά. (δ) Επιβεβαίωση των απορρυθμισμένων γονιδίων και πρωτεϊνών που εμπλέκονται στο μονοπάτι του p53 της ανάλυσής μας, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία.



Εικόνα 29: Απεικόνιση αλληλεπιδράσεων μεταξύ των απορρυθμισμένων γονιδίων και πρωτεϊνών που εμπλέκονται στο μονοπάτι του p53, στις τρεις ομάδες λεμφώματος και με τις δύο μεθόδους ανάλυσης, κατά STRING. Το γράφημα οπτικοποίησης αλληλεπιδράσεων αποτυπώνεται με κυκλικά σημεία για τους κόμβους και με τόξα ανάμεσα σε κόμβους που συνδέονται. Κάθε κόμβος αναπαριστά ένα μόριο. Οι κόμβοι είναι χρωματισμένοι βάσει της αύξησης (κόκκινο χρώμα), της μείωσης (πράσινο χρώμα) ή της απουσίας ρύθμισης (γκρι χρώμα) των επιπέδων έκφρασής τους. Μερικοί κόμβοι συμμετέχουν σε πολλαπλές ρυθμίσεις και υποδομές, ενώ κάποιοι άλλοι διαθέτουν μεγαλύτερο μέγεθος, αντιστοιχώντας σε γονιδιακές οικογένειες όπου η

πρωτεϊνική δομή είναι διαθέσιμη. Τα τόξα πιο μεγάλου πάχους αντιστοιχούν σε αλληλεπιδράσεις υψηλότερης εμπιστοσύνης.

Προσδιορισμός απορρυθμισμένων γονιδίων/πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο μονοπάτι κυτταρικού κύκλου (Εικόνα 3; Παράρτημα III/Πίνακας 11).

Η σύγκριση του μεταγραφικού προφίλ των λεμφωμάτων μετά την εφαρμογή της Nutlin-3A σε τρία είδη λεμφώματος έδειξε ότι σύμφωνα με την ανάλυση Γονιδιακής Οντολογίας 91 διαφορετικά εκφραζόμενα γονίδια σχετίζονται με τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (GO:0007049). Τα 74, 27 και 11 βρέθηκαν διαφορετικά εκφρασμένα στο HL, στο MCL και στο ALCL αντίστοιχα. Συγκρίνοντας τις τρεις ομάδες γονιδίων μεταξύ τους αποκάλυψε ότι 58 γονίδια, 15 και 1 απορρυθμίστηκαν αποκλειστικά στο λέμφωμα HL, MCL και ALCL κατά αντιστοιχία, επιβεβαιώνοντας ότι η Nutlin-3A προκαλεί παύση του κυτταρικού κύκλου με κυτταρο-ειδικό τρόπο.

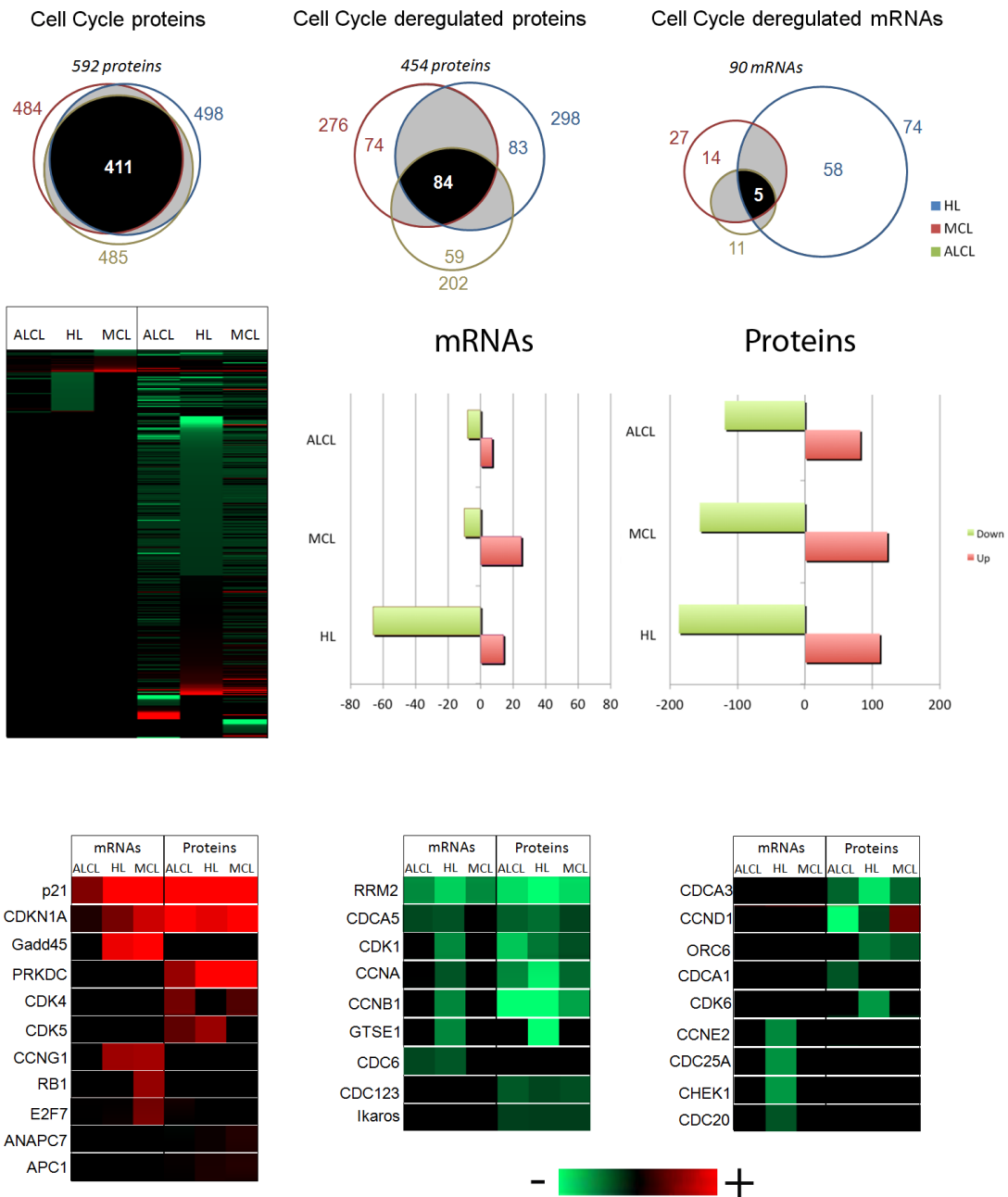
Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, χορήγηση της Nutlin-3A οδηγεί αρχικά σε παύση στις φάσεις κυτταρικού κύκλου G1/S και/ή στις G2/M, ρυθμίζοντας την έκφραση γονιδίων όπως είναι το *p21* και το *GADD45* που συμμετέχουν στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου. Σε συμφωνία με τα παραπάνω, η ενεργοποίηση του *p53* μέσω της Nutlin-3A είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων του *p21*^{CIP1/WAF1} (HL/MCL/ALCL), και του *GADD45* (HL/MCL), την παύση της κυτταρικής ανάπτυξης και των γονιδίων που ανταποκρίνονται στη δράση του *p53*, όπως έχει δειχθεί και σε άλλες αιματολογικές κακοήθειες. Η έκφραση διαφόρων μελών του μηχανισμού δράσης των CDK-κυκλινών έχει βρεθεί ότι ρυθμίζει στενά την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Σε συμφωνία με τα παραπάνω, η εφαρμογή της Nutlin-3A (μερικώς μέσω επαγωγής του *p21*) προώθησε την καταστολή ρυθμιστών των G1/S και G2/M φάσεων του κυτταρικού κύκλου, όπως είναι τα γονίδια *CCNB1*, *CCNA2*, *CDKN3*, *CDC20*, *CDK1* (Table S6) Το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος (*Rb*) εντοπίστηκε (μόνο) στο λέμφωμα του Hodgkin να διαθέτει αυξημένα επίπεδα mRNA. Πρόκειται για ένα μόριο σημαντικό στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της κυτταρικής διαφοροποίησης και απόπτωσης. Η λειτουργία του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *Rb* ρυθμίζεται σημαντικά από το σύστημα κυκλινών/CDKs.

Η επακόλουθη της Nutlin-3A ενεργοποίηση του *p53* αύξησε τα επίπεδα του mRNA του γονιδίου *E2F7*, ενός γονιδίου-στόχου που επάγεται από το *p53* και εμπλέκεται στην απόκριση στη βλάβη του DNA και στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου από γονίδια-στόχους του *E2F* (Panagiotis Zalmas et al. 2008). Πρόσφατα, βρέθηκε ότι το *E2F7* ρυθμίζει την πρόοδο της φάσης S του κυτταρικού κύκλου, ρυθμίζοντας ένα σύνολο από αμφιταλαντευόμενα γονίδια (array of oscillating

genes) κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (Westendorp et al. 2012) και στοχεύοντας γονίδια που συμμετέχουν μόνο στις φάσεις G1 και S (Luis A. Carvajal Genes & Dev. 2012. 26: 1533-1545). Δύο μέλη της οικογενείας των Sestrins, οι Sesn1 και Sesn2, βρέθηκαν μεταγραφικά υπερ-εκφρασμένες στο λέμφωμα του Hodgkin και του μανδύα. Ενδιαφέρον αποτελεί ότι η μεταγραφική ανάλυση της σειράς του αναπλαστικού λεμφώματος έδειξε σημαντική μεταβολή μόνο στο μεταγραφικό προφίλ της Sestrin 1. Οι ενεργοποιημένες Sestrins είναι γνωστό ότι προωθούν τη συγκέντρωση των κυττάρων στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου, αναστέλλοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Επιπλέον, η μεταγραφική έκφραση των γονιδίων MCM (*MCM4*, *MCM5*, *MCM7*) που σχετίζονται με την αντιγραφή του DNA σημείωσε μείωση στα λεμφώματα που εφαρμόστηκε Nutlin-3A, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με πρότερες μελέτες.

Συνολικά, τα τρία είδη λεμφώματος παρουσίασαν παρόμοιο τρόπο απόκρισης στην ενεργοποίηση του *p53*, σημειώνοντας αύξηση στις φάσεις G1 και/ή G2, υποδεικνύοντας παύση στις φάσεις αυτές, μειώνοντας το ποσοστό των κυττάρων στη φάση S-phase. Ειδικότερα, η παύση στη φάση G1 επιτεύχθηκε μέσω αύξησης των μεταγραφικών επιπέδων του *p21*, μείωση του συστήματος των κυκλινών/CDKs (όπως είναι τα γονίδια *CDK1*, *CDC45*, *CCNE2*, *CDC25A*) και παύση στις φάσεις G2-M μέσω των αυξημένων επιπέδων του mRNA του *GADD45* και τη μείωση των επιπέδων άλλων κυκλινών/CDKs (όπως είναι τα γονίδια *CDK1*, *CCNB1*, *CCNA2*, *CDC5L*).

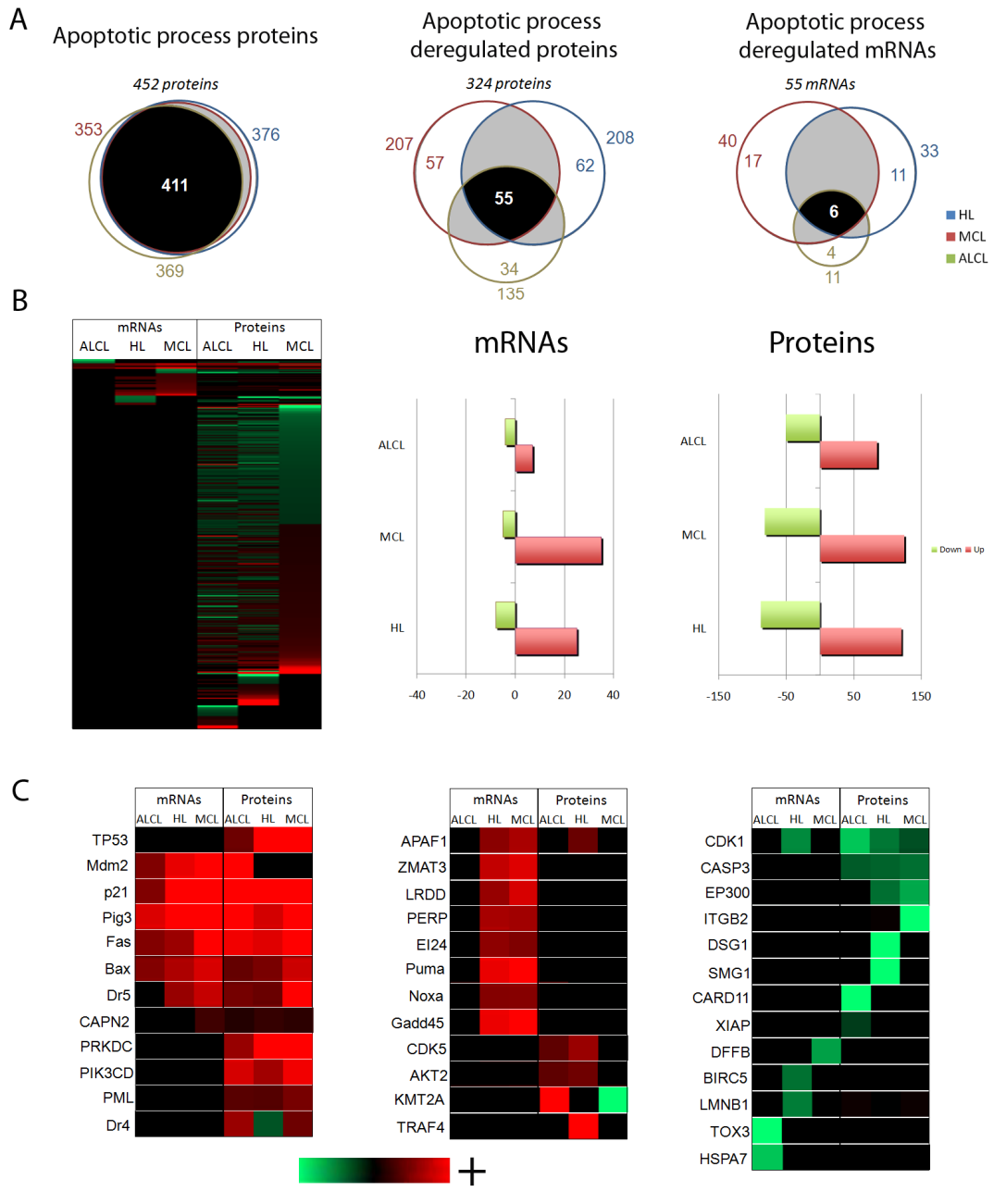
Ακολούθως, έγινε μια προσπάθεια συσχέτισης της μεταβολής των λεμφωματικών κυττάρων πριν και μετά τη χορήγηση της Nutlin-3A όπως αυτό προσδιορίστηκε μέσω της ανάλυσης του κυτταρικού κύκλου και της διαφορικής έκφρασης του mRNA τους. Η ανάλυση του κυτταρικού κύκλου παρουσίασε ότι η Nutlin-3A αναβάλλει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, διατηρώντας τα κύτταρα κυρίως στη φάση G1, με τα μεγάλα κύτταρα αναπλαστικού λεμφώματος να παρουσιάζουν το υψηλότερο ποσοστό κατανομής στη φάση G1 και το μικρότερο ποσοστό κατανομής στη φάση S. Η φάση G2/M έδειξε μια πολλή μικρή αύξηση μόνο στα κύτταρα του μανδύα. Από την άλλη, η πλειοψηφία των γονιδιακών μεταβολών σε επίπεδο mRNA βρέθηκε να αφορά την κυτταρική σειρά του λεμφώματος Hodgkin, υποδεικνύοντας αυξημένη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου, και μια μικρή αύξηση στη φάση G2 του λεμφώματος Hodgkin και του μανδύα.



Εικόνα 30: Απεικόνιση γονιδίων/πρωτεϊνών που εμπλέκονται στο μονοπάτι του κυτταρικού κύκλου

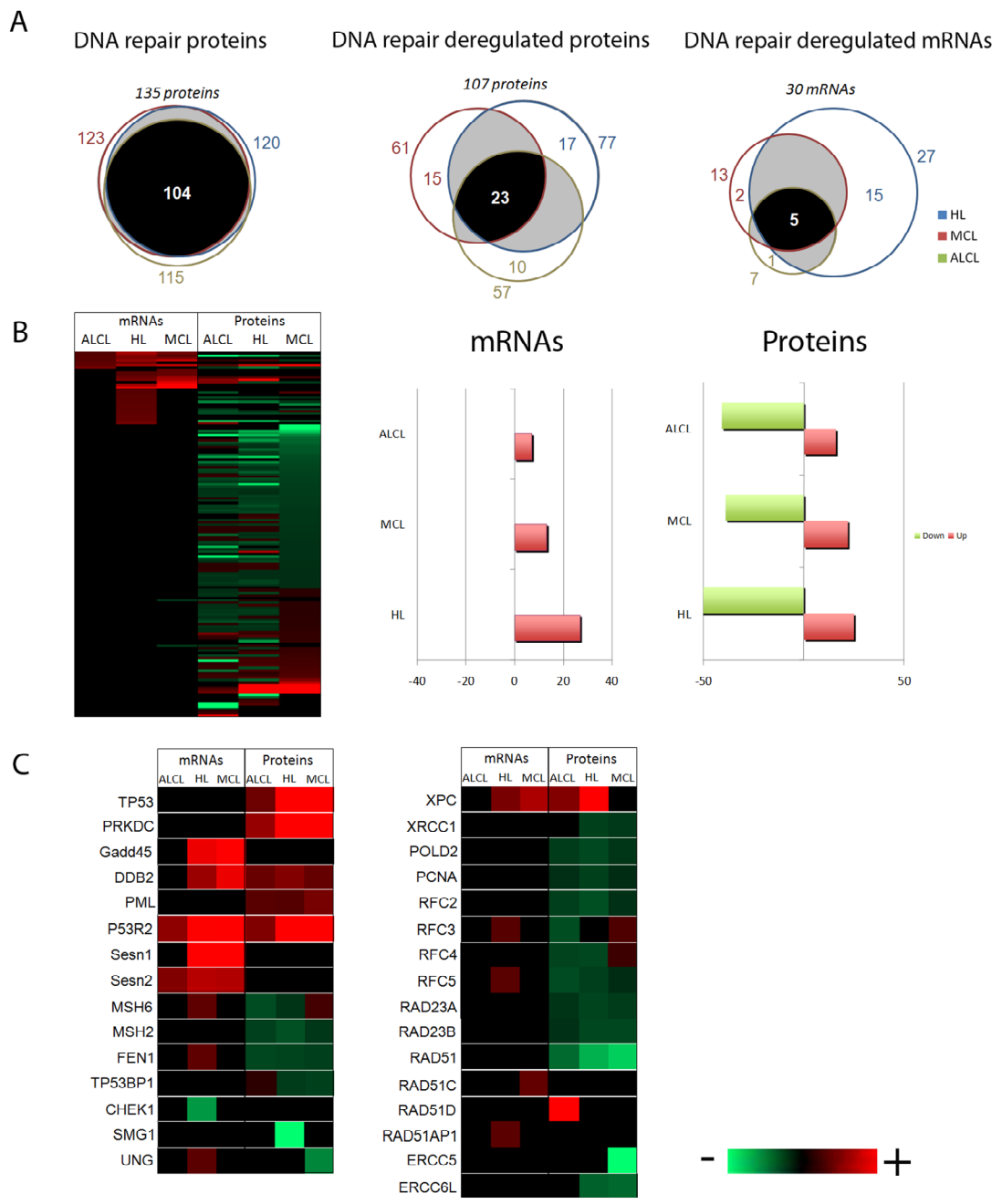
Προσδιορισμός απορρυθμισμένων γονιδίων/πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο μονοπάτι της απόπτωσης (Εικόνα 31; Παράρτημα III/Πίνακας 12).

Η μεταγραφική ανάλυση που επιτελέστηκε ταυτοποίησε 82 γονίδια που σχετίζονται με τον προγραμματισμένο θάνατο, εντοπίζοντας διάφορες αλλαγές στα επίπεδα έκφρασής τους. Από αυτά τα γονίδια, τα 47 κατηγοριοποιήθηκαν άμεσα στο αποπτωτικό πρόγραμμα, παρουσιάζοντας το ίδιο πρότυπο έκφρασης σε όλες τις κυτταρικές σειρές (όταν/όπου ταυτοποιήθηκαν). Ειδικότερα, οι συγκρίσεις των προτύπων έκφρασης των γονιδίων στις τρεις τύπους λεμφώματος κατέδειξαν 36 γονίδια από τα 47 να εκφράζονται στο MCL, 26 στο HL και 5 στο ALCL. Συνολικά, τα 35 προ-αποπτωτικά ή θετικά ρυθμιστικά γονίδια της απόπτωσης βρέθηκαν υπερ-εκφρασμένα, ενώ 12 αντι-αποπτωτικά γονίδια ή αρνητικά ρυθμιστικά γονίδια της απόπτωσης βρέθηκαν υπο-εκφρασμένα. Οι διαφορετικοί τύποι λεμφώματος παρουσίασαν διαφορές στον αριθμό και στο είδος των απορρυθμισμένων αποπτωτικών γονιδίων (Εικόνα 31). Το γεγονός αυτό ενισχύει την επικρατούσα ιδέα ότι η απόπτωση ενεργοποιείται και ρυθμίζεται με τρόπο κυτταρο-ειδικό. Τα 47 αποπτωτικά γονίδια μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε ποικίλες ομάδες πρωτεϊνών. Ενδεικτικά αναφέρονται: η οικογένεια του υποδοχέα TNF (Tnfrsf6, Tnfrsf10b), της Bcl-2 (Bax, Bbc3), των heat shock πρωτεϊνών (Hsp77, Hsp71), των κασπασών (Casp2), των IAPs (Birc5, Xaf1), των περιοχών πρόσληψης κασπασών (CARD) (Casp1, Casp2, Apaf1), του ογκογονιδίου Ras (hRas), της περιοχής θανάτου (DD) (Pidd, Tnfrsf6, and Tnfrsf10b), της περιοχής-CIDE (Dffb), των μεταγραφικών παραγόντων Jun (c-Jun), των MAPKKK (Map3k5), και του p53- και των γονιδίων που προκαλούν απόπτωση λόγω βλάβης του DNA (Bax, Trp53inp1, Casp1, Casp2, Aen, Dram1, Pidd and Noxa). Από τα 47 γονίδια τα 19 έχουν περιγραφεί ότι εμπλέκονται σε διάφορους τύπους αιματολογικών νεοπλασιών. Ειδικότερα, τα γονίδια Bbc3 (Puma), Bax, Noxa, Dr5, Apaf1, Perp, Tnfrsf6 (Fas), Dram1 συμβάλλουν άμεσα στον κυτταρικό θάνατο μέσω της δράσης του p53 και βρέθηκαν υπερ-εκφρασμένα στο λέμφωμα του HL και του μανδύα. Από τα παραπάνω γονίδια, τα επίπεδα mRNA των Fas και Bax βρέθηκαν επίσης αυξημένα στο αναπλαστικό λέμφωμα. Επιπλέον, σημειώθηκε αισθητή μείωση των επιπέδων mRNA σε γονίδια που ρυθμίζουν αρνητικά την απόπτωση στα λεμφώματα του Hodgkin και του αναπλαστικού (Birc5/Survivin, Bub1, Ect2 στο HL και Hsp70 στο ALCL).



Εικόνα 31: Απεικόνιση γονιδίων/πρωτεϊνών που εμπλέκονται στο μονοπάτι της απόπτωσης

Προσδιορισμός απορρυθμισμένων γονιδίων/πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο μονοπάτι της επιδιόρθωσης του DNA (Εικόνα 32; ΠαράρτημαIII/Πίνακας 13).



Εικόνα 32: Απεικόνιση γονιδίων/πρωτεϊνών που εμπλέκονται στο μονοπάτι της επιδιόρθωσης του DNA

Η μεταγραφική ανάλυση που επιτελέστηκε ταυτοποίησε 135 γονίδια που σχετίζονται με επιδιόρθωση του DNA, εντοπίζοντας διάφορες αλλαγές στα επίπεδα έκφρασής τους. Από αυτά τα γονίδια, τα 30 κατηγοριοποιήθηκαν άμεσα στο μονοπάτι επιδιόρθωσης του DNA, παρουσιάζοντας το ίδιο πρότυπο έκφρασης σε όλες τις κυτταρικές σειρές (όταν/όπου ταυτοποιήθηκαν).

Προσδιορισμός απορρυθμισμένων γονιδίων/πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο μονοπάτι του PI3K/AKT/mTOR (Εικόνα 33; ΠαράρτημαIII/Πίνακας 14).

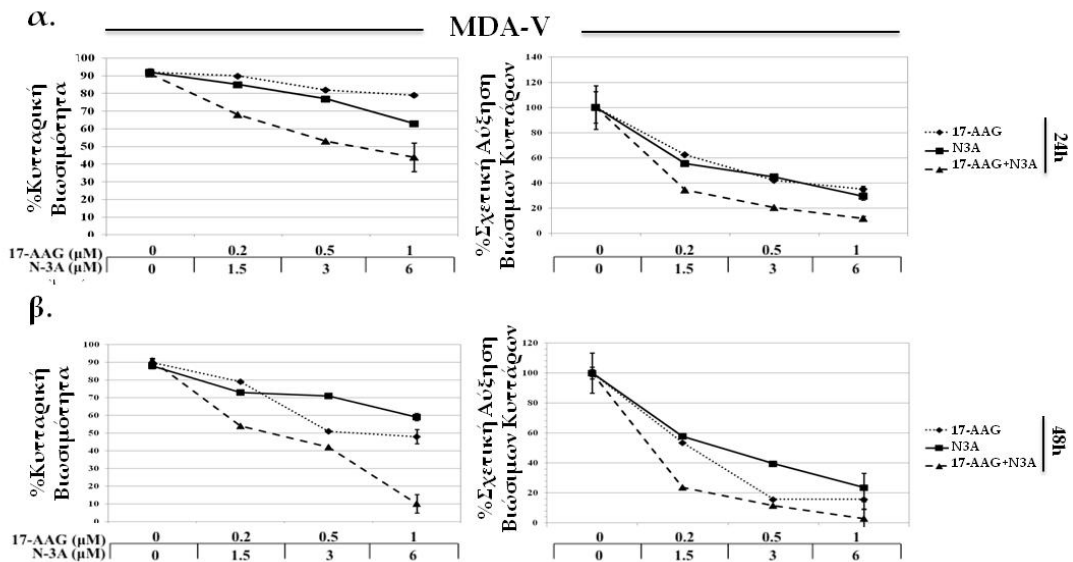
Μεταξύ των απορρυθμισμένων γονιδίων που αποκάλυψε η μεταγραφική ανάλυση του *in vitro* μας συστήματος μετά από Nutlin-3A ήταν τα εννιά γονίδια που σχετίζονται με ή υπάγονται στο μονοπάτι του mTOR. Το σηματοδοτικό μονοπάτι του mTOR είναι ένα σημαντικό μονοπάτι που ρυθμίζει τον κυτταρικό μεταβολισμό, την κυτταρική ανάπτυξη, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση. Το mTOR συχνά απαντάται ενεργοποιημένο σε λεμφώματα HL, αλλά και σε διάφορα NHL B-κυτταρικής προέλευσης. Οκτώ γονίδια (*PI3KR3*, *PRAS40*, *AMPKB1/2*, *Sesn1/2*, *PHLDA3* και *eIF4B*) βρέθηκαν να εκφράζονται στο MCL, πέντε στο HL (*PRAS40*, *Sesn1/2*, *PHLDA3* και *PGF*) και δύο (*PRAS40*, *Sesn1*) στο ALCL. Τα 8/9 γονίδια βρέθηκαν υπερ-εκφρασμένα, με τα τέσσερα από αυτά να υπόκεινται στη μεταγραφική ρύθμιση του *p53*. Τα γονίδια-στόχοι του *p53* παρουσίασαν ένα παρόμοιο πρότυπο ενεργοποίησης. Ειδικότερα, τα γονίδια *AMPKβ1/2*, οι δύο ισομορφές της β-ρυθμιστικής υπομονάδας της AMP-ενεργοποιημένης κινάσης (AMPK), ενός αναρροϊκού τελεστή του mTOR, βρέθηκαν να διαθέτουν αυξημένα επίπεδα στο MCL. Η ενεργοποίηση των *Sesn1/2* (στο ALCL βρέθηκε μόνο η *Sesn1*) είναι γνωστό ότι προωθούν την ανασταλτική επίδραση του *p53* στο mTORC1 (Budanon AV et al, Cell 134, 451-460). Το γονίδιο *PHLDA3*, ένα γονίδιο που περιέχει την περιοχή PH και αναστέλει την ενεργοποίηση του AKT, βρέθηκε να είναι υπερ-εκφρασμένο στο HL και MCL. Γονίδια που κωδικοποιούν μέλη του μονοπατιού PI3K/mTOR βρέθηκαν να είναι και υπερ- και υπο-εκφρασμένα. Ενδιαφέρον αποτελεί ότι η ομάδα IA της ρυθμιστικής υπομονάδας της φωσφατιδυλινοσιτόλης 3-κινάσης *PI3KR3* (*p55γ*) βρέθηκε να εκφράζεται στα MCL κύτταρα, παρουσιάζοντας μία οριακή αύξηση στα μεταγραφικά της επίπεδα. Επιπλέον, το γονίδιο *Pras40*, που αποτελεί ρυθμιστικό στοιχείο του mTORC1 βρέθηκε να έχει αυξημένα τα μεταγραφικά του επίπεδα σε όλες τις κυτταρικές σειρές, ενισχύοντας, το ρόλο του ως αρνητικός ρυθμιστής της δράσης του mTORC1. Το γονίδιο του αυξητικού παράγοντα του πλακούντα (PGF), που αποτελεί μέλος της οικογένειας του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) και έχει αναφερθεί ότι παράγεται στο αγγειακό μικροπεριβάλλον λεμφωμάτων προωθώντας τη νεο-αγγειογένεση βρέθηκε επίσης να διαθέτει αυξημένα τα μεταγραφικά του επίπεδα μετά από Nutlin-3A στο HL. Τέλος, το μεταγράφημα του γονιδίου *eIF4B*, που αποτελεί έναν καταρροϊκό τελεστή του mTOR, βρέθηκε μειωμένο στο HL, υποδεικνύοντας μια διακοπή στη φωσφορυλίωση των 4EBP1, S6K1 από το mTOR, που έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της εξαρτώμενης από το κάλυμμα μετάφρασης του mRNA (cap-dependent mRNA translation).

2° Παραδοτέο

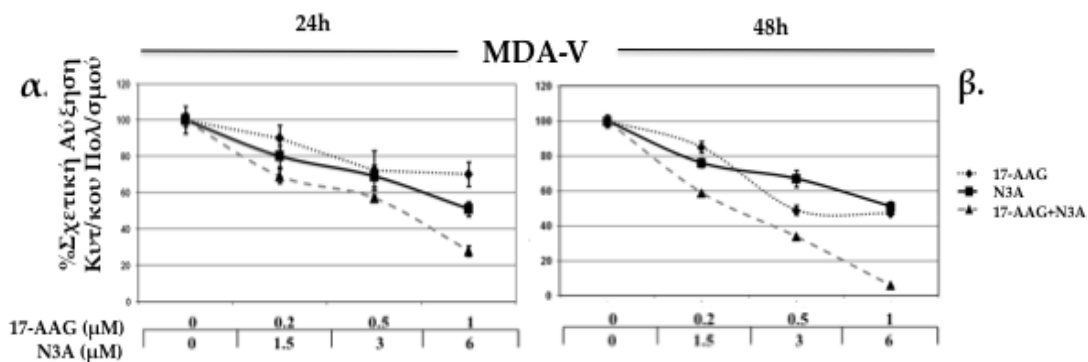
Παρουσίαση βιολογικών αποτελεσμάτων μετά από ταυτόχρονη αναστολή ογκογόνων οδών και επίδραση με Nutlin-3A.

Με βάση τα δεδομένα που προέκυψαν από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων της μεταγραφικής και πρωτεωμικής ανάλυσης, πραγματοποιήθηκε μια σειρά λειτουργικών μελετών, με ταυτόχρονη επίδραση φαρμακευτικών αναστολέων της HSP90, του mTOR και της Nutlin-3A στο ίδιο *in vitro* σύστημα. Έτσι, διερευνήθηκε κατά πόσο η συνδυασμένη εφαρμογή της Nutlin-3A επιδρώντας ταυτόχρονα με άλλους φαρμακευτικούς αναστολείς μπορεί να επιδράσουν στον κυτταρικό φαινότυπο και να ενισχύσουν το βιολογικό αποτέλεσμα της απόπτωσης.

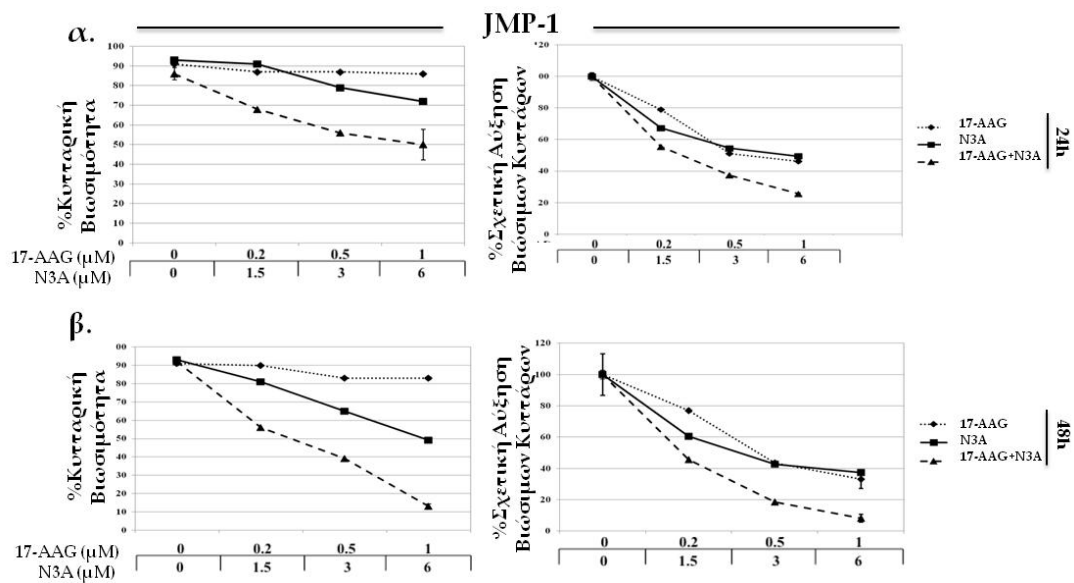
Για το σκοπό αυτό, επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί ένα αντιβιοτικό ανσαμυκίνης (ansamycin) που αποτελεί έναν ειδικό αναστολέα της HSP90, ανάλογο της γκελνταναμυκίνης (geldanamycin, GA) που συγκριτικά είναι περισσότερο σταθερό και λιγότερο τοξικό, η 17-(Allylamino)-17-demethoxygeldanamycin (17AAG, telatinib). Ο εξειδικευμένος αναστολέας αυτός βρίσκεται ήδη σε κλινικές δοκιμές στη φάση I-III, σε διάφορες μορφές καρκίνου (καρκίνο του μαστού, πολλαπλό μυέλωμα κλπ.). Η αρχή λειτουργίας του 17-AAG είναι ότι προσδένεται στη θέση δέσμευσης του ATP στο αμινοτελικό άκρο της HSP90, σταματά τον κύκλο των συνοδών μορίων (chaperone cycle) εμποδίζοντας το σχηματισμό του όψιμου συμπλόκου μοριακών συνοδών. Έτσι, τα υποστρώματα της HSP90 οδηγούνται σε αποδιάταξη, όπως είναι σημαντικά μέλη μιτογενετικών σηματοδοτικών μονοπατιών και διάφορες ογκοπρωτεΐνες. Η μη-γενετοξική ενεργοποίηση του p53 μονοπατιού από τη Nutlin-3A, σε συνδυασμό με την αναστολή της HSP90 από τη 17-AAG σε μη-τοξικές δόσεις, εφαρμόστηκε σε μία κυτταρική σειρά κάθε τύπου λεμφώματος, οδηγώντας σε ενισχυμένο αντινεοπλασματικό αποτέλεσμα και αυξημένο θάνατο κυττάρων με wt p53. Ειδικότερα, εφαρμόστηκαν διαβαθμισμένες δόσεις του ανταγωνιστή του MDM2 (0 μM, 1,5μM, 3μM, 6μM) και του αναστολέα της HSP90 (0 μM, 0,2μM, 0,5μM, 1μM) στην κυτταρική σειρά λεμφώματος Hodgkin, MDA-V. Τα αποτελέσματα της συνδυαστικής δράσης των προαναφερθεισών ουσιών και συγκεντρώσεων στη βιωσιμότητα των κυττάρων (α, β) και στην % σχετική αύξηση των βιώσιμων κυττάρων του λεμφώματος Hodgkin (Aiii-Aiv), μετά από 24 και 48 ώρες επώαση, παραθέτονται στα διαγράμματα που ακολουθούν.



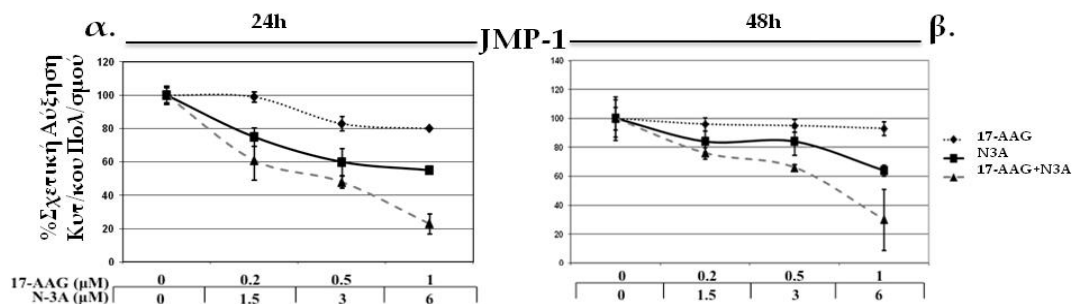
Εικόνα 33: Απεικόνιση της μεταβολής της βιωσιμότητας σε διαφορετικές κυτταρικές συνθήκες εφαρμόζοντας Nutlin-3A, το φαρμακευτικό αναστολέα 17-AAG και το συνδυασμό τους σε κύτταρα λεμφώματος Hodgkin (MDA-V) με wt *p53*, όπως ανιχνεύεται με τη μέθοδο Trypan Blue (α, β). Η μη-γενετοξική ενεργοποίηση του *p53* και αναστολή της HSP90 οδηγεί σε αυξημένο κυτταρικό θάνατο. Η 17-AAG και Nutlin-3A εφαρμόστηκαν για 24 και 48 ώρες σε διαβάθμιση συγκεντρώσεων, όπως αυτές φαίνονται στο διάγραμμα, οδηγώντας στη μέγιστη αύξηση κυτταρικού θανάτου στο συνδυασμό τους.



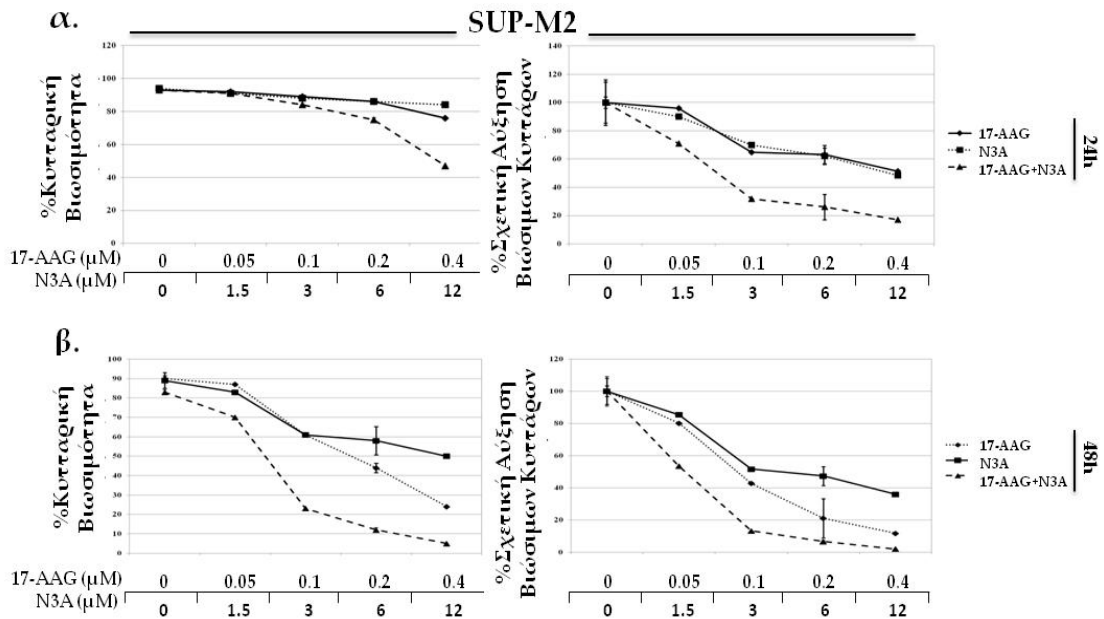
Εικόνα 34: Απεικόνιση της μεταβολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε διαφορετικές κυτταρικές συνθήκες εφαρμόζοντας Nutlin-3A, 17-AAG και το συνδυασμό τους σε κύτταρα λεμφώματος Hodgkin (MDA-V) με wt *p53*, όπως ανιχνεύεται με τη μέθοδο MTT (α, β). Η μη-γενετοξική ενεργοποίηση του *p53* και αναστολή της HSP90 οδηγεί σε αυξημένο κυτταρικό θάνατο. Η 17-AAG και Nutlin-3A εφαρμόστηκαν για 24 και 48 ώρες σε διαβάθμιση συγκεντρώσεων, όπως αυτές φαίνονται στο διάγραμμα, οδηγώντας στη μέγιστη μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στο συνδυασμό τους.



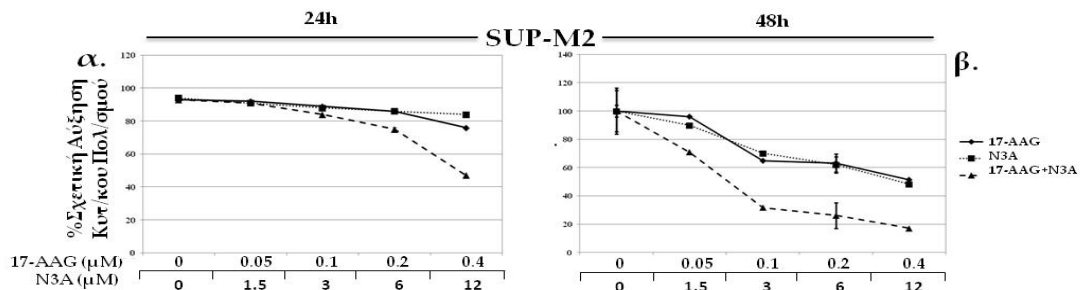
Εικόνα 35: Απεικόνιση της μεταβολής της βιωσιμότητας σε διαφορετικές κυτταρικές συνθήκες εφαρμόζοντας Nutlin-3A, το φαρμακευτικό αναστολέα 17-AAG και το συνδυασμό τους σε κύτταρα μανδύα (MCL, JMP-1) με wt p53, όπως ανιχνεύεται με τη μέθοδο Trypan Blue (α, β). Η μη-γενετοξική ενεργοποίηση του p53 και αναστολή της HSP90 οδηγεί σε αυξημένο κυτταρικό θάνατο. Η 17-AAG και Nutlin-3A εφαρμόστηκαν για 24 και 48 ώρες σε διαβάθμιση συγκεντρώσεων, όπως αυτές φαίνονται στο διάγραμμα, οδηγώντας στη μέγιστη αύξηση κυτταρικού θανάτου στο συνδυασμό τους.



Εικόνα 36: Απεικόνιση της μεταβολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε διαφορετικές κυτταρικές συνθήκες εφαρμόζοντας Nutlin-3A, 17-AAG και το συνδυασμό τους σε κύτταρα μανδύα (MCL, JMP-1) με wt p53, όπως ανιχνεύεται με τη μέθοδο MTT (α, β). Η μη-γενετοξική ενεργοποίηση του p53 και η ταυτόχρονη αναστολή της HSP90 οδηγεί στη μέγιστη μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η 17-AAG και Nutlin-3A εφαρμόστηκαν για 24 και 48 ώρες σε διαβάθμιση συγκεντρώσεων, όπως αυτές φαίνονται στο διάγραμμα.



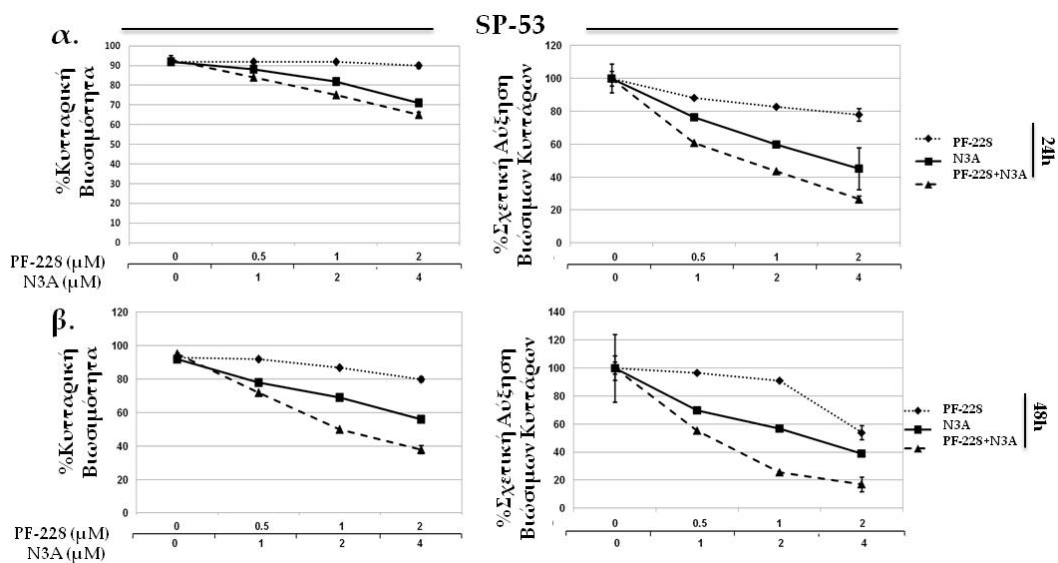
Εικόνα 37 Απεικόνιση της μεταβολής της βιωσιμότητας σε διαφορετικές κυτταρικές συνθήκες εφαρμόζοντας Nutlin-3A, το φαρμακευτικό αναστολέα 17-AAG και το συνδυασμό τους σε κύτταρα αναπλαστικού λεμφώματος (ALCL, SUP-M2) με wt p53, όπως ανιχνεύεται με τη μέθοδο Trypan Blue (α, β). Η μη-γενοτοξική ενεργοποίηση του p53 και αναστολή της HSP90 οδηγεί σε αυξημένο κυτταρικό θάνατο. Η 17-AAG και Nutlin-3A εφαρμόστηκαν για 24 και 48 ώρες σε διαβάθμιση συγκεντρώσεων, όπως αυτές φαίνονται στο διάγραμμα, οδηγώντας στη μέγιστη αύξηση κυτταρικού θανάτου στο συνδυασμό τους.



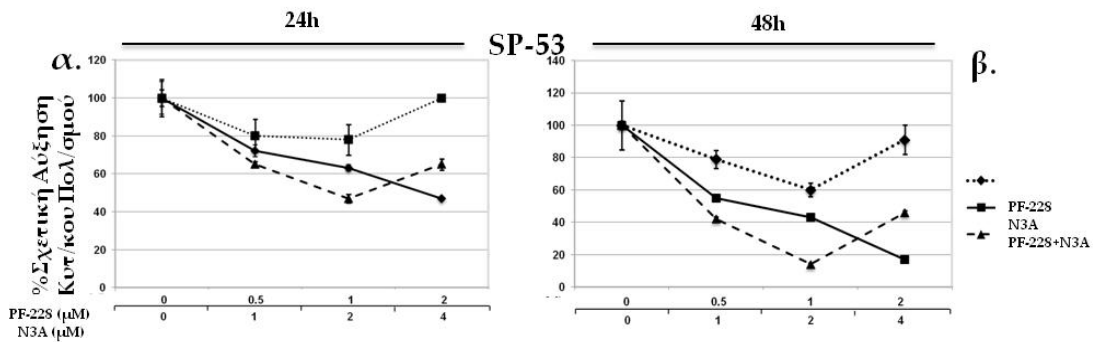
Εικόνα 38: Απεικόνιση της μεταβολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε διαφορετικές κυτταρικές συνθήκες εφαρμόζοντας Nutlin-3A, 17-AAG και το συνδυασμό τους σε κύτταρα αναπλαστικού λεμφώματος (ALCL, SUP-M2) με wt p53, όπως ανιχνεύεται με τη μέθοδο MTT (α, β). Η μη-γενοτοξική ενεργοποίηση του p53 και αναστολή της HSP90 οδηγεί σε αυξημένο κυτταρικό θάνατο. Η 17-AAG και Nutlin-3A εφαρμόστηκαν για 24 και 48 ώρες σε διαβάθμιση συγκεντρώσεων, όπως αυτές φαίνονται στο διάγραμμα, οδηγώντας στη μέγιστη μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στο συνδυασμό τους.

Στη συνέχεια, επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί ένας μικρομοριακός αναστολέας της καταλυτικής δραστηριότητας της πρωτεΐνης FAK, ο PF-573,228 ((3,4-dihydro-6-[[4-[[[3-(methylsulfonyl)phenyl]methyl]amino]-5-(trifluoromethyl)-2-pyrimidinyl] amino]-2(1H)-quinolinone, PF-228). Πρόκειται για ένα μόριο που

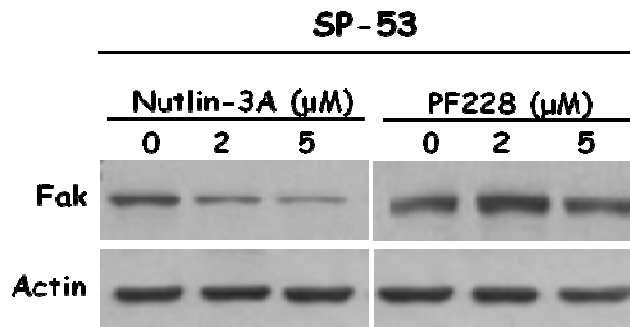
εμφανίζει εκλεκτική δράση προς τη FAK, τουλάχιστον *in vitro*, και την αναστέλλει σε πλειάδα κυτταρικών σειρών σε ένα εύρος συγκεντρώσεων 0.3–3μM. Η αρχή λειτουργίας του αναστολέα PF-228 είναι ότι προσδένεται στη θέση δέσμευσης του ATP στο αμινοτελικό άκρο της FAK, εμποδίζοντας της καταλυτική δράση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης ή την ενδογενή της έκφραση σε ποικίλες φυσιολογικές και καρκινικές κυτταρικές σειρές. Η μη-γενετοξική ενεργοποίηση του p53 μονοπατιού από τη Nutlin-3A, σε συνδυασμό με τη μη-γενετοξική αναστολή της FAK από τη PF-228, εφαρμόστηκε στην κυτταρική σειρά του λεμφώματος με wt p53 με τη μεγαλύτερη πρωτεϊνική έκφραση, με βάση τα αποτελέσματα ανάλυσης της πρωτεωμικής ανάλυσης, οδηγώντας σε ενισχυμένο αντινεοπλασματικό αποτέλεσμα και αυξημένο θάνατο κυττάρων. Ειδικότερα, εφαρμόστηκαν διαβαθμισμένες δόσεις του ανταγωνιστή του MDM2 (0 μM, 1μM, 2μM, 4μM) και του αναστολέα της FAK (0 μM, 0,5μM, 1μM, 2μM) στην κυτταρική σειρά λεμφώματος μανδύα, SP-53. Τα αποτελέσματα της συνδυαστικής δράσης των προαναφερθεισών ουσιών και συγκεντρώσεων στη βιωσιμότητα των κυττάρων (Δi-Aii) και στην % σχετική αύξηση των βιώσιμων κυττάρων του λεμφώματος Hodgkin (Δiii-Aiv), μετά από 24 και 48 ώρες επώαση, παραθέτονται στα διαγράμματα που ακολουθούν.



Εικόνα 39: Απεικόνιση της μεταβολής της βιωσιμότητας σε διαφορετικές κυτταρικές συνθήκες εφαρμόζοντας Nutlin-3A, το φαρμακευτικό αναστολέα Pf-228 και το συνδυασμό τους σε κύτταρα λεμφώματος του μανδύα (MCL, SP-53) με wt p53, όπως ανιχνεύεται με τη δοκιμασία αποκλεισμού της χρωστικής τρυπανού του κυανίου (α, β). Σε κάθε δείγμα εφαρμόστηκαν οι ουσίες PF-228 και Nutlin-3A για 24 και 48 ώρες σε διαβάθμιση συγκεντρώσεων, σύμφωνα με το διάγραμμα. Η σταθεροποίηση και ενεργοποίηση της p53 σε συνδυασμό με την αναστολή της FAK οδήγησε στον πιο αυξημένο κυτταρικό θάνατο, κυρίως μετά από 48 ώρες.

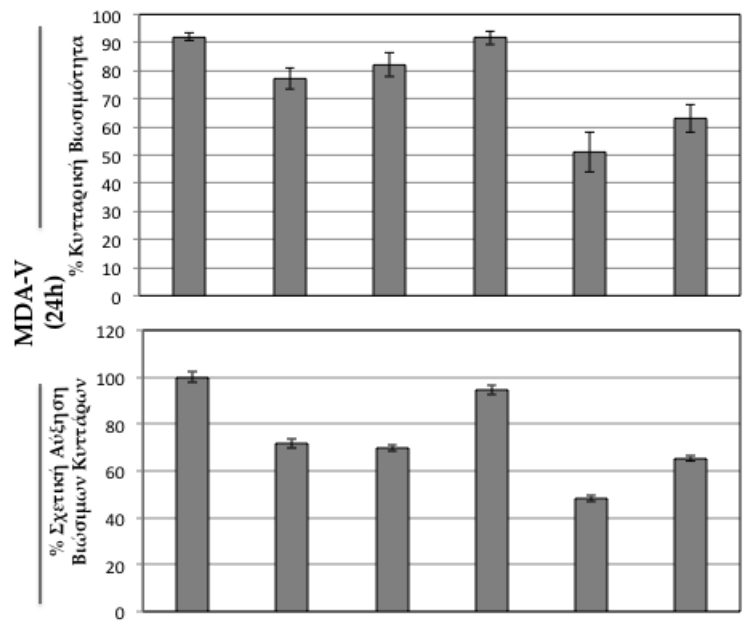


Εικόνα 40: Απεικόνιση της μεταβολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε διαφορετικές κυτταρικές συνθήκες εφαρμόζοντας Nutlin-3A, το φαρμακευτικό αναστολέα Pf-228 και το συνδυασμό τους σε κύτταρα λεμφώματος του μανδύα (MCL, SP-53) με wt p53, όπως ανιχνεύεται με τη μέθοδο MTT (α, β). Σε κάθε δείγμα εφαρμόστηκαν οι ουσίες PF-228 και Nutlin-3A για 24 και 48 ώρες σε διαβάθμιση συγκεντρώσεων, σύμφωνα με το διάγραμμα. Η δράση των δύο ουσίων δείχνει να φθάνει σε κορεσμό κατά την εφαρμογή του 3ου συνδυασμού συγκεντρώσεων, όπου σημειώνεται η μέγιστη μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.



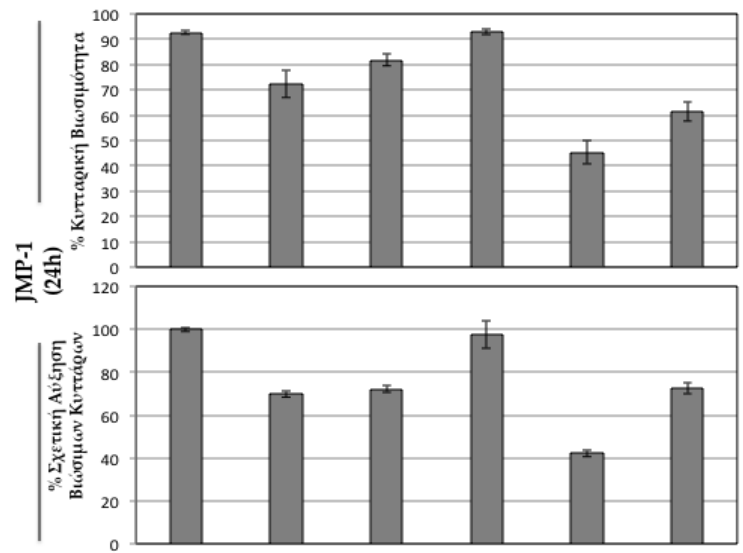
Εικόνα 41: Η Nutlin-3A προκαλεί σταθεροποίηση της πρωτεΐνης του p53 στα κύτταρα του μανδύα (SP53) με μη μεταλλαγμένο p53. Ο αναστολέας της Fak, PF228, και η Nutlin-3A εφαρμόστηκαν για 24 ώρες και τα αποτελέσματα έδειξαν να προκαλείται μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης Fak με τη χορήγηση της Nutlin-3A.

(α)



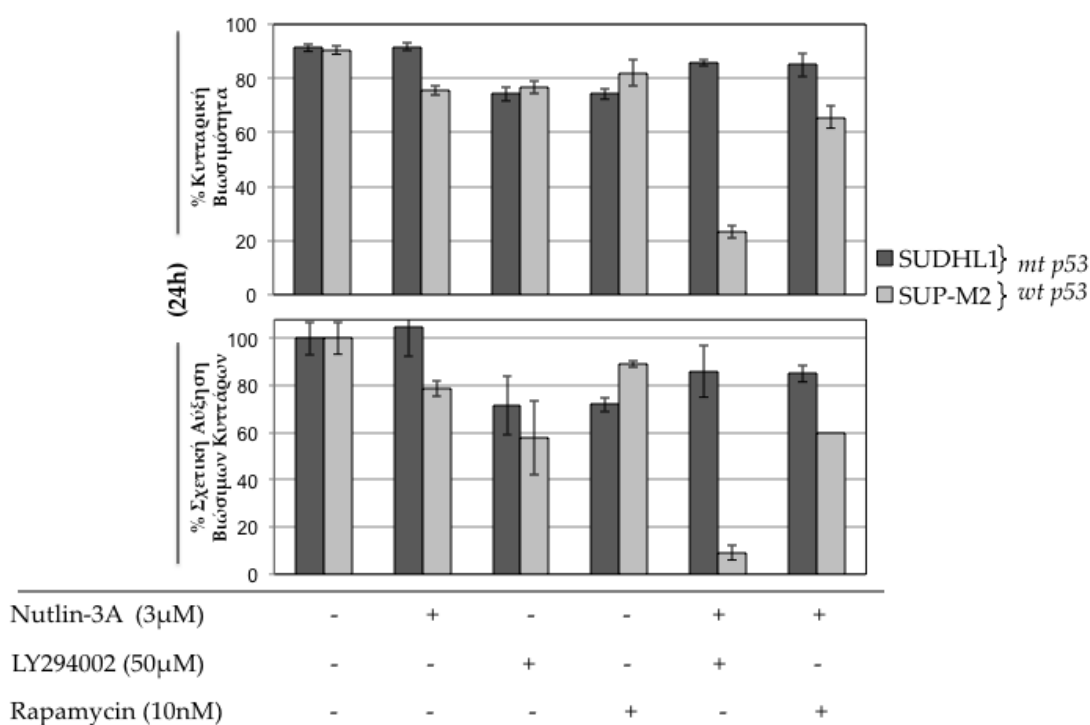
Nutlin-3A (3μM)	-	+	-	-	+	+
LY294002 (50μM)	-	-	+	-	+	-
Rapamycin (10nM)	-	-	-	+	-	+

(β)



Nutlin-3A (3μM)	-	+	-	-	+	+
LY294002 (50μM)	-	-	+	-	+	-
Rapamycin (10nM)	-	-	-	+	-	+

(γ)



Εικόνα 42: Μελέτη της μεταβολής της κυτταρικής βιωσιμότητας (εικόνες α-γ, πάνω) και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (εικόνες α-γ, κάτω) σε διαφορετικές κυτταρικές συνθήκες εφαρμόζοντας Nutlin-3A, το φαρμακευτικό αναστολέα LY294002 και Rapamycin και το συνδυασμό τους, όπως ανιχνεύεται με τη μέθοδο trypan-blue (εικόνες α-γ, πάνω) και MTT (εικόνες α-γ, κάτω) αντίστοιχα. Οι τρεις ουσίες εφαρμόστηκαν είτε μόνες τους είτε ανά δύο για 24 ώρες, σε κύτταρα λεμφώματος με wt p53, στο λέμφωμα του Hodgkin (α; HL), του μανδύα (β; MCL) και του αναπλαστικού (γ; ALCL). Η δράση των δύο πρώτων ουσιών (Nutlin-3A/LY294002) δείχνει να είναι πιο αποτελεσματική συγκριτικά με τον συνδυασμό Nutlin-3A/ Rapamycin και με την εφαρμογή κάθε ουσίας ξεχωριστά.

Ο αναστολέας της PI3K, LY294002, το φάρμακο Rapamycin (μακρολίδη με ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες και η Nutlin-3A εφαρμόστηκαν για 24 ώρες και προκάλεσαν μείωση των επιπέδων των βιώσιμων κυττάρων. Συνδυασμένη εφαρμογή των παραπάνω παραγόντων είχε σαν αποτέλεσμα την ενίσχυση της αποπτωτικής δράσης της N3A, ιδιαίτερα κατά την δράση της N3A με το φαρμακευτικό αναστολέα LY294002.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Συμπεράσματα

Στην παρούσα ερευνητική εργασία διερευνήθηκε η επίδραση που έχει στο μεταφράφημα και πρωτέωμα η σταθεροποίηση και ενεργοποίηση της φυσιολογικής p53 μέσω N3A σε Hodgkin και μη-Hodgkin λεμφώματα του ανθρώπου, με απώτερο σκοπό την ταυτοποίηση νέων μηχανισμών που εξαρτώνται από την p53 και την ανάδειξη νέας στοχευμένης, μη-γενετοξικής θεραπείας στα νεοπλάσματα αυτά. Από τις πειραματικές διαδικασίες που διεξήχθησαν κατά τη διάρκεια της μελέτης μας, χρησιμοποιώντας ένα *in vitro* σύστημα κυτταρικών σειρών λεμφώματος HL και NHL, καταλήξαμε στα παρακάτω συμπεράσματα:

I. Π.Ε.1: Γονιδιωματική (μεταγραφωματική) μελέτη του p53 σε Hodgkin και μη Hodgkin λεμφώματα

1. Κατά την πρώτη φάση του Π.Ε.1 πραγματοποιήθηκε:

- i. «Μελέτη του κυτταρικού κύκλου μετά από εφαρμογή της Nutlin-3A σε κυτταρικές σειρές λεμφώματος Hodgkin και μη-Hodgkin» και
- ii. «Διερεύνηση με ανοσοαποτύπωση κατά Western των αλλαγών έκφρασης της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 σε κυτταρικές σειρές ανθρώπινου λεμφώματος Hodgkin και μη-Hodgkin».

(i) Η εξουδετέρωση της ανασταλτικής δράσης της πρωτεΐνης MDM2 στη φυσιολογική p53 με τη Nutlin-3A είχε σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μονοπατιού της p53 και της οδού σηματοδότησης που ελέγχεται από αυτήν, στο *in vitro* σύστημα μελέτης Hodgkin και μη-Hodgkin ανθρώπινων λεμφωμάτων. Ειδικότερα, ανάλυση του κυτταρικού κύκλου κατέδειξε αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1/S. Επιπλέον, μελέτες επιβίωσης και απόπτωσης των εξεταζόμενων κυττάρων έδειξαν μείωση της βιωσιμότητας και αύξηση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου αντίστοιχα, διαπιστώνοντας τη σταθεροποίηση και την επανενεργοποίηση του μονοπατιού της φυσιολογικής p53 (Εικόνα 1-3).

(ii) Το εύρημα της ενεργοποίησης του μονοπατιού της p53 μετά από την επίδραση με Nutlin-3A υποστηρίχτηκε, χρησιμοποιώντας κατάλληλα αντισώματα, από την εύρεση αυξημένων επιπέδων της p53, καθώς και του MDM2 που είναι μεταγραφικός στόχος του p53 (Εικόνα 4).

Τα παραπάνω αποτελέσματά μας έρχονται σε συμφωνία με παρόμοιες μελέτες σε αιμοποιητικές νεοπλασίες, που δείχνουν ότι η στοχευμένη επαν-

ενεργοποίηση του p53 μέσω της Nutlin-3A οδηγεί σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου και σε αποπτωτικό θάνατο νεοπλασματικών κυττάρων με μη μεταλλαγμένο p53.

2. Κατά τη δεύτερη φάση του Π.Ε.1 πραγματοποιήθηκε «**Εκτίμηση των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης με μικροσυστοιχίες μετά τη χορήγηση της Nutlin-3A σε κυτταρικές σειρές λεμφώματος Hodgkin και μη-Hodgkin**».

Η ανάλυση των επιπέδων μεταγραφής με μικροσυστοιχίες (cDNA microarrays) για κάθε γονίδιο των κυτταρικών σειρών μελέτης ανθρώπινου λεμφώματος, προσδιόρισε ταυτόχρονα και ποιοτικά επαναλήψιμα, για πρώτη φορά, μια λίστα 675 μεταγραφημάτων που επηρεάζονται από την επίδραση της N3A. Τα αποτελέσματά μας αυτά, δείχνουν τη διαφορική έκφραση σε επίπεδο mRNA, διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών λεμφώματος, τονίζοντας έτσι την πιθανή παρουσία διαφορετικών μεταγραφημάτων, με ιδιαίτερη λειτουργικότητα για κάθε έναν κυτταρικό πληθυσμό (Εικόνα 5-6; Παραρτήματα/Πίνακας 1). Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί παραδείγματα ανάλυσης του μοριακού αποτυπώματος λεμφωματικών σειρών, όπου επισημαίνεται η σημασία της διαφορικής μοριακής έκφρασης διαφορετικών λεμφωκυτταρικών τύπων στην ανάδειξη συγκεκριμένων μοριακών προγνωστικών και διαγνωστικών στόχων. Επίσης, έχουν πραγματοποιηθεί μεταγραφικές μελέτες σε καρκινικά κύτταρα μετά την εφαρμογή της N3A, που αντίστοιχα δείχνουν τη διαφορική επίδραση που έχει η μη-γενετοξική δράση της N3A σε wt-p53 νεοπλασματικά κύτταρα.

II. Π.Ε.2: «Ποιοτική και ποσοτική πρωτεωμική μελέτη της κυτταρικής επίδρασης της επαγόμενης από τη Nutlin-3A σταθεροποίησης και ενεργοποίησης του p53 σε Hodgkin και μη Hodgkin λεμφώματα».

1. Στο Π.Ε.2 αρχικά πραγματοποιήθηκε «**Ταυτοποίηση και σχετική ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών στους τρεις τύπους λεμφωμάτων των οποίων τα επίπεδα μεταβάλλονται σημαντικά μετά τη σταθεροποίηση και ενεργοποίηση της p53**».

Η εφαρμογή πρωτεωμικής ανάλυσης στα ανθρώπινα λεμφωματικά κύτταρα της μελέτης μας, πριν και μετά τη χορήγηση Nutlin-3A, προσδιόρισε ταυτόχρονα και ποιοτικά επαναλήψιμα για πρώτη φορά, ένα εντυπωσιακό σύνολο ταυτοποιημένων (4923) και σχετικά ποσοτικοποιημένων (3578) πρωτεϊνών που ενέχονται στη δράση του ανταγωνιστή της MDM2 (Εικόνα 9-11; Παραρτήματα/Πίνακας 2-3).

2. Ακολούθως, εφαρμόστηκε «**Χαρακτηρισμός των πρωτεϊνικών τροποποιήσεων σε κάθε λεμφωματική κυτταρική σειρά, μετά τη σταθεροποίηση και ενεργοποίηση της p53 από την Nutlin-3A**».

Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις πρωτεϊνών (PTMs, όπως είναι η φωσφορυλίωση, ακετυλίωση, μεθυλίωση, σουμυλίωση κ.α.), αποτελούν αντιστρεπτές ομοιοπολικές (ο/ο) τροποποιήσεις, που αφορούν την ο/ο προσθήκη ομάδων χαμηλού μοριακού βάρους (π.χ. φωσφορυλ-/ακετυλ-ομάδων) σε εξειδικευμένα αμινοξικά καταλοίπα, στοχεύοντας στη χρονική και τοπική αλλαγή της στερεοδιάταξης, αλληλεπίδρασης και γενικότερα εξειδίκευσης της λειτουργίας των πρωτεϊνών. Η φωσφορυλίωση αποτελεί την πλέον διαδεδομένη μετα-μεταφραστική τροποποίηση της δομής των πρωτεϊνών, που επηρεάζει τουλάχιστον το 1/3 όλων των κυτταρικών πρωτεϊνών. Η ακετυλίωση της λυσίνης έχει πρωτεύοντα ρόλο στη γονιδιακή ρύθμιση και έχει βρεθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία και τις αλληλεπιδράσεις της p53. Σε περίπτωση βλάβης, έχει βρεθεί ότι η ακετυλίωση της p53 επηρεάζει τη διαδικασία επιδιόρθωσης του DNA.

Επίσης, ρυθμίζει τη σταθερότητα της p53 μέσω δι-επικοινωνιών (crosstalk) με τη μηχανή ουμπικιτινιλίωσης, τροποποιώντας την αλληλεπίδρασή της με την TAF1 και ρυθμίζοντας τη μεταγραφική της δραστηριότητα. Η εφαρμογή πρωτεωμικών ποσοτικών μεθόδων ανάλυσης έχει επιτρέψει την αποτίμηση της σχετικής μεταβολής στα επίπεδα φωσφορυλίωσης, ακετυλίωσης για χιλιάδες πρωτεΐνες με αυτές τις PTMs, με σκοπό την αποσαφήνιση του φωσφορυλ-/ακετυλ-ιωμένου προφίλ διαφορετικών κυτταρικών καταστάσεων σε διαφορετικές συνθήκες. Στην ανάλυσή μας, μετά την εξαγωγή των αποτελεσμάτων της πρωτεωμικής ανάλυσης σε HL, MCL, ALCL, προβήκαμε σε επεξεργασία των δεδομένων μας, για τον εντοπισμό των δύο μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, της φωσφορυλίωσης και ακετυλίωσης. Αναφορικά με την τροποποίηση της φωσφορυλίωσης, παρατηρήθηκε ότι η φωσφορυλίωση σε κατάλοιπα τυροσίνης, ήταν πιο μικρή αριθμητικά από ότι στα υπόλοιπα κατάλοιπα αμινοξέων (θρεονίνης και σερίνης). Η φωσφορυλίωση σε τυροσίνη απαντάται σε χαμηλή αφθονία και είναι μία εξαιρετικά μεταβατική και εύθραυστη διαδικασία, γεγονός που καθιστά την ανάλυσή της σαφώς πιο δύσκολη.

Συνολικά, ο προσδιορισμός των πρωτεϊνικών τροποποιήσεων (φωσφορυλίωση και ακετυλίωση) σε κάθε λεμφωματική κυτταρική σειρά, μετά τη σταθεροποίηση και ενεργοποίηση της p53 από την Nutlin-3A, κατέδειξε διαφορετική σηματοδοτική ενεργοποίηση στα κύτταρα HL, MCL, ALCL και κατ'επέκταση στην παθολογία τους. Τα αποτελέσματα αυτά σε ένα πρώτο επίπεδο, δίνουν πληροφορίες για το ποιές πρωτεΐνες ενεργοποιούνται ή απενεργοποιούνται με τις αντίστοιχες τροποποιήσεις στις τρεις διαφορετικές κυτταρικές καταστάσεις λεμφώματος. Στα πλαίσια μελλοντικής συνέχισης της παρούσης εργασίας, και προκειμένου να αποφευχθούν τέτοια προβλήματα που εντοπίσαμε στην ανάλυσή μας, έχουμε ήδη ξεκινήσει στο εργαστήριό μας στοχευμένη πλέον απομόνωση, εμπλουτισμό και χαρακτηρισμό των

φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών στα τρία είδη λεμφώματος, με απώτερο σκοπό να προστεθεί και η ανάλυση άλλων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (μεθυλίωση, ουμπικιτινιλίωση, σουμοιλίωση) για μια πιο ολοκληρωμένη προσέγγιση της παρούσης ερευνητικής προσέγγισης. Περαιτέρω ανάλυση θα μας δώσει σημαντικές πληροφορίες για το πώς λειτουργεί, συμπεριφέρεται και ανταποκρίνεται το κύτταρο σε διαφορετικές συνθήκες και θεραπείες, με απώτερο σκοπό την εύρεση μιας στοχευμένης και αποτελεσματικότερης προγνωστικής, διαγνωστικής και θεραπευτικής προσέγγισης.

3. Στο Π.Ε.2 στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε **«Μελέτη και σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταγραφικής και πρωτεωμικής ανάλυσης στις τρεις ομάδες λεμφώματος μελέτης μετά από N3A»**

Η μελέτη και σύγκριση των αποτελεσμάτων από τη μεταγραφωματική και πρωτεωμική ανάλυση των τριών υποτύπων λεμφώματος, πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια εργαλείων βιοπληροφορικής καθώς και με χειροκίνητο έλεγχο. Ο συνδυασμός των πληροφοριών από τις μικροσυστοιχίες και την πρωτεωμική ανάλυση που προέκυψαν, προσδιόρισε ομοιότητες, αλλά κυρίως κυτταρο-ειδικές ποσοτικές και ποιοτικές διαφορές σε διάφορα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης και ωρίμανσης (Εικόνα 5-6, 9-11, 15; Παραρτήματα/Πίνακας 1-3). Επιπλέον, αποκάλυψε τα διαφορικά ρυθμιζόμενα πρωτεϊνικά μόρια που εμπλέκονται άμεσα με τους μηχανισμούς και συμμετέχουν στα μεταγωγικά μονοπάτια που δραστηριοποιούνται μετά τη σταθεροποίηση και ενεργοποίηση της p53.

Γενικότερα, η επίδραση της N3A, χρησιμοποιώντας τις τεχνολογίες που αναλύσαμε στο 2^ο κεφάλαιο, φαίνεται να είναι πιο ισχυρή στο λεμφωματικό πρωτέωμα (3578 απορρυθμισμένες πρωτεΐνες έναντι 675 απορρυθμισμένα μεταγραφήματα), γεγονός που μπορεί να σχετίζεται με το ότι η ρύθμιση γίνεται κυρίως σε επίπεδο πρωτεϊνικής μετάφρασης. Ειδικότερα:

- Οι σειρές του μανδύα (MCL) και του Hodgkin (HL) εμφάνισαν το μεγαλύτερο αριθμό απορρυθμισμένων μεταγραφημάτων και πρωτεωμάτων, συγκριτικά με το αναπλαστικό λέμφωμα από μεγάλα κύτταρα (ALCL) (Εικόνα 5; Παραρτήματα/Πίνακας 1).
- Το μικρό ποσοστό των κοινών απορρυθμισμένων μεταγραφημάτων (4%, που αντιστοιχεί σε 28 mRNAs) και πρωτεϊνών (16%, που αντιστοιχεί σε 585 πρωτεΐνες) έναντι του σαφώς μεγαλύτερου κοινού ταυτοποιημένου πρωτεωμικού προφίλ των τριών υποτύπων λεμφώματος μετά από N3A (>80%), επισημαίνει την ουσιαστικά διαφορετική απόκριση κάθε τύπου λεμφώματος στη N3A, τη σημαντικά διαφορετική παθοβιολογία

που τα χαρακτηρίζει και τη μεγάλη ετερογένειά τους (Εικόνα 15; Παραρτήματα/Πίνακας 1, 3).

- Ο κοινός πυρήνας και των τριών κυτταρικών σειρών των δύο «omics» αναλύσεων (12 πρωτεΐνες), απαρτίστηκε, όπως ήταν αναμενόμενο, από υπερ-ρυθμισμένες πρωτεΐνες που έχουν συνάφεια με το p53, υπογραμμίζοντας την ενεργοποίηση του μονοπατιού. Η αυξημένη ρύθμιση των πρωτεϊνών αυτών επιβεβαιώνουν σε μοριακό επίπεδο την παύση του κυτταρικού κύκλου, την επαγωγή της απόπτωσης και του μηχανισμού επιδιόρθωσης στους τρεις υποτύπους λεμφωμάτων, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία. (Εικόνα 16-17).
- Η ανάλυση της γονιδιακής οντολογίας των αποτελεσμάτων μας οδήγησε στην εξόρυξη των διαφορικά ρυθμιζόμενων γονιδίων και πρωτεϊνών που σχετίζονται άμεσα ή έμμεσα με βιολογικές διαδικασίες, κυτταρικούς χώρους και μονοπάτια που επηρεάζονται μετά τη σταθεροποίηση και ενεργοποίηση της p53 μέσω Nutlin-3A. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία πιο συγκεκριμένης, αναλυτικής και νέας γνώσης στη δυνητική παθοβιολογία του απορρυθμισμένου μεταγραφώματος και πρωτεώματος σε κάθε λέμφωμα, δίνοντας βάρος σε κατηγορίες με τις στατιστικά σημαντικότερες αλλαγές (Εικόνα 14, 18-21; Παραρτήματα/Πίνακας 1, 3-7).
- Όλα τα κοινά απορρυθμισμένα γονίδια (28) παρουσίασαν παρόμοια μεταβολή στο μεταγράφημά τους, με την εξαίρεση του PREX2 (phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchanger 2 protein). Πρόκειται για ένα σημαντικό μεσολαβητή του σηματοδοτικού μονοπατιού των Rac πρωτεϊνών (ενεργοποιεί τις Rac πρωτεΐνες) και φαίνεται να εμπλέκεται στον έλεγχο προσκόλλησης κυττάρου-κυττάρου/κυττάρου-μήτρας, στην κυτταρική εξέλιξη και μετασχηματισμό και να επηρεάζει ποικιλοτρόπως την καρκινογένεση.
- Σύγκριση της λειτουργικής ανάλυσης των κοινών μεταγράφων (28) κατά STRING έδειξε ότι οι περισσότερες αλλαγές σχετίζονται με το p53 και αφορούν σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, την απόπτωση, μεταβολικά και σηματοδοτικά μονοπάτια, επιβεβαιώνοντας για μια ακόμη φορά τη ρύθμιση αυτών των δραστηριοτήτων από τον ανταγωνιστή της MDM2 (Εικόνα 8; Παραρτήματα/Πίνακας 4).

- Σύγκριση της λειτουργικής ανάλυσης των κοινών πρωτεϊνών (585) έδειξε ότι η N3A επηρεάζει ένα μεγαλύτερο εύρος πρωτεϊνικών λειτουργιών, βιολογικών διαδικασιών και μονοπατιών, υποδεικνύοντας ένα πιο σφαιρικό αποτέλεσμα σε όλες τις κυτταρικές σειρές. Ενδεικτικά αναφέρουμε ότι οι βιολογικές λειτουργίες με τις περισσότερες στατιστικά σημαντικές αλλαγές, αποτελούμενες κυρίως από πρωτεΐνες με αυξημένη ρύθμιση, αφορούν τις μεταβολικές διαδικασίες, την πρωτεϊνική μεταφορά/θέση και την αναπνευστική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Στον αντίποδα, κατηγορίες όπως η οργάνωση οργανιδίων, η πρωτεϊνική στόχευση, η χρωμοσωμική οργάνωση, η λήξη μετάφρασης, ο κυτταρικός κύκλος αποτελούνται από πρωτεΐνες μειωμένης ρύθμισης. Παράλληλα, παρατηρήθηκε εμπλουτισμός (υπερ-ρυθμισμένων) πρωτεϊνών που σχετίζονται με διάφορα οργανίδια, συμπεριλαμβανομένων των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών. Εξαίρεση αποτέλεσαν οι κυτταροπλασματικές, πυρηνικές και ριβοσωμικές πρωτεΐνες που βρέθηκαν κυρίως με υπο-ρυθμισμένα επίπεδα. Επιπλέον, παρατηρήθηκε εμπλουτισμός υπερ-ρυθμισμένων πρωτεϊνών που σχετίζονται με πρωτεϊνική και ιοντική πρόσδεση, με την εξαίρεση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη νουκλεϊκή και χρωματινική πρόσδεση. Όσον αφορά τα μονοπάτια που επηρεάστηκαν περισσότερο από τη Nutlin-3A, αναφέρουμε αυτό της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (με υπερ-ρυθμισμένες πρωτεΐνες), του ριβοσώματος (με υπο-ρυθμισμένες πρωτεΐνες), διαφόρων ασθενειών (π.χ. Huntington's, Alzheimer's and Parkinson's disease) και άλλα ενδιαφέροντα όπως το μονοπάτι του p53, της απόπτωσης, του φαγοσώματος, λυσοσώματος, καρκινικά μονοπάτια, του mTOR κ.α. (Εικόνα 14; Παραρτήματα/Πίνακας 5).
- Οι πρωτεΐνες που βρέθηκαν μοναδικές σε κάθε κυτταρική σειρά χαρακτηρίζοντας την εν λόγω σειρά, προσφέροντας σημαντική πληροφορία που αφορά τη μοριακή βάση της παθογένεσης του κάθε λεμφώματος, αποτελούν τη χαρακτηριστική μοριακή σφραγίδα τους. Με βάση τη συγκριτική λειτουργική ανάλυσή τους παρατηρήθηκε μεγαλύτερη ενεργότητα των βιολογικών διαδικασιών και μονοπατιών στο λέμφωμα του μανδύα. Το γεγονός αυτό υπογραμμίζει την πεποίθηση ότι χρησιμοποιούνται διαφορετικές πρωτεϊνικές ομάδες σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια, για την εφαρμογή βιολογικών διαδικασιών, στην προσπάθεια των λεμφοκυττάρων να αντιμετωπίσουν την εφαρμογή της N3A (Εικόνα 20-21; Παραρτήματα/Πίνακας 7).

4. Στην τελευταία φάση του Π.Ε.2 πραγματοποιήθηκε «**Επιβεβαίωση επιλεγμένων πρωτεϊνικών μεταβολών με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης κατά Western**».

Η διαφοροποίηση της μεταφραστικής δραστηριότητας επιλεγμένων πρωτεϊνών των κυτταρικών σειρών λεμφώματος μετά τη χορήγηση της N3A επιβεβαιώθηκε ελέγχοντας τα επίπεδα έκφρασης των HSP70/HSP90, της FAK και πρωτεϊνών που σχετίζονται με το σηματοδοτικό μονοπάτι του mTOR στις σειρές που εκφράζονται. Πρόκειται για πρωτεΐνες με σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα έκφρασής τους, που συμμετέχουν σε κοινές με τη p53 ογκογόνες οδούς και δραστηριοποιούνται σε μηχανισμούς παθογένειας διαφόρων μορφών αιμοποιητικών νεοπλασιών. Το μονοπάτι του mTOR συχνά υπερεκφράζεται σε διάφορους τύπους αιμοποιητικών κακοηθειών. Μελέτες έχουν δείξει ότι η HSP90 υπερεκφράζεται σε αιμοποιητικές κακοήθειες και ευοδώνει τη σταθεροποίηση και ωρίμανση σηματοδοτικών πρωτεϊνών-υποστρωμάτων (συμπεριλαμβανομένης και της p53) που απορρυθμίζονται στον καρκίνο. Επίσης, η αυξημένη έκφραση της FAK συνήθως σχετίζεται με αυξημένη κακοήθεια νεόπλασμα. Η επαλήθευση των αποτελεσμάτων της πρωτεωμικής ανάλυσης επιβεβαίωσε την εγκυρότητα της αναλυτικής μεθόδου, ενισχύοντας περαιτέρω τα δημοσιευμένα και αδημοσίευτα δεδομένα της ερευνητικής μας ομάδας.

III. Π.Ε.3: «Αξιοποίηση των γενωμικών και πρωτεωμικών δεδομένων για την μελέτη οδών δι-επικοινωνίας μεταξύ της p53 και άλλων ογκογόνων μηχανισμών σε Hodgkin και μη Hodgkin λεμφώματα».

1. Στην αρχή της τρίτης φάσης της παρούσας έρευνας (Π.Ε.3) επικεντρωθήκαμε στην «**Ανάδειξη ομάδων πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και πιθανώς μετέχουν στην ίδια οδό μεταγωγής σήματος**».

Από το σύνολο των ταυτοποιηθέντων και σχετικά ποσοτικοποιημένων πρωτεϊνών, διακρίθηκαν και μελετήθηκαν ομάδες πρωτεϊνών που επηρεάζονται από την εφαρμογή της N3A, μετέχουν στην ίδια οδό μεταγωγής σήματος. Πρόκειται για πρωτεΐνες που σχετίζονται με το μονοπάτι της p53, τον κυτταρικό κύκλο, την απόπτωση, την επιδιόρθωση του DNA, τις HSPs και το PI3K/mTOR.

2. Ακολούθως, στη δεύτερη φάση του Π.Ε.3 πραγματοποιήθηκε «**Παρουσίαση βιολογικών αποτελεσμάτων μετά από ταυτόχρονη αναστολή ογκογόνων οδών και επίδραση με Nutlin-3A**».

Λειτουργικές μελέτες στο ίδιο *in vitro* σύστημα, με ταυτόχρονη εφαρμογή της N3A με το φαρμακευτικό αναστολέα της HSP90 (17-AAG), του mTOR ή της FAK (PF-228), ενίσχυσαν τη λεμφοκυτταρική απόπτωση που επάγεται της σταθεροποίησης και ενεργοποίησης της p53. Χρησιμοποιώντας τις τρεις

παραπάνω πρωτεΐνες ως παράδειγμα συσχέτισης πρωτεώματος με λεμφωματική παθογένεια, διερευνήθηκε η στρατηγική της ενίσχυσης της μη-γενετοξικής επίδρασης της N3A με συγχορήγησή της με άλλους γνωστούς αναστολείς των πρωτεϊνών-στόχων (HSP90, mTOR, FAK). Παρεμπόδιση της HSP90 προκαλεί αποικοδόμηση των πρωτεϊνών-πελατών στο πρωτεάσωμα, καταλήγοντας σε ισχυρή δράση κατά των όγκων. Αναστολή της δράσης της κινάσης mTOR και της FAK προκαλεί κυτταροστατικά και κυτταροτοξικά αποτελέσματα σε καρκινικά κύτταρα. Συνεπώς, μελέτη της μοριακής και θεραπευτικής επίδρασης της N3A σε λεμφώματα, συνδυάζοντας τεχνολογίες συγκριτικής μεταγραφωματικής, πρωτεϊνωματικής, μοριακής βιολογίας, βιοχημείας και βιοπληροφορικής μπορεί να οδηγήσει σε νέες διαγνωστικές και θεραπευτικές στρατηγικές (μη-γενετοξικές θεραπείες) και να ενεργοποιήσει νέες στοχευμένες μελέτες για την καλύτερη κατανόηση της μοριακής βάσης των λεμφωματικών νεοπλασιών.

Συνολικά, η πρωτεωμική ανάλυση λεμφοκυττάρων μετά από Nutlin-3A φάνηκε να είναι μεγαλύτερης ακρίβειας και αναλυτικής ικανότητας από τη μεταγραφική ανάλυση, παραδίδοντας ένα αξιοσημείωτο αριθμό πρωτεϊνών με σκοπό τη μελλοντική τους διερεύνηση στη βιολογία των λεμφωμάτων.

Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε οδήγησε στην επαναλήψιμη ποιοτική ταυτοποίηση και σχετική ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών και κατέδειξε αξιοσημείωτες ομοιότητες αλλά και ιδιαίτερα διαφορές μεταξύ του μεταγραφώματος και πρωτεώματος στους διαφορετικούς τύπους λεμφώματος, παρέχοντας στοιχεία για την καλύτερη εφαρμογή των υπάρχοντων θεραπειών σε ασθενείς με λέμφωμα Hodgkin και μη-Hodgkin. Αυτό οφείλεται πρωτίστως στη μεγάλη ετερογένεια και στο πλήθος των οντοτήτων του λεμφώματος, με ιδιαιτερότητες στη βιολογία τους, στη διαφορετική ιστολογική προέλευση, κλινική πορεία και πρόγνωση της κάθε υποκατηγορίας. Σε αυτό, αν προστεθεί και ο παράγοντας της ατομικής ιδιοσυγκρασίας κάθε ασθενούς, τότε μπορούμε να αντιληφθούμε καλύτερα την ανάγκη ανάπτυξης βελτιωμένων θεραπευτικών προσεγγίσεων που να λαμβάνουν υπόψη τις παραπάνω ιδιαιτερότητες. Συνεπώς, η προσέγγιση και τα αποτελέσματα αυτής της ερευνητικής μελέτης ενισχύουν την πρόταση για την εφαρμογή τεχνολογικά εξελιγμένων αναλύσεων, όπως είναι η διαφορική μεταγραφική και πρωτεωμική ανάλυση που δίνουν συμπληρωματικές πληροφορίες στο βιολογικό μας ερώτημα, οδηγώντας πιο κοντά στη σωστή και πιο κατάλληλη θεραπευτική προσέγγιση στα λεμφώματα. Η ταυτόχρονη ποσοτική σύγκριση εκατοντάδων/χιλιάδων γονιδίων/πρωτεϊνών ανάμεσα σε διαφορετικά πειραματικά μοντέλα και σε κλινικά δείγματα, θα επιτρέψει να ανιχνευθούν νέοι παράγοντες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν, είτε ως στόχοι για την ανάπτυξη φαρμάκων, είτε ως διαγνωστικοί ή προγνωστικοί δείκτες της εξέλιξης του λεμφώματος. Επιπλέον, εφόσον οι παράγοντες αυτοί έχουν κυτταροστατική δράση, η συνδυασμένη τους χορήγηση

με άλλους αναστολείς, θα μπορούσε να σημειώσει πιο ικανοποιητική απόδοση, επιφέροντας αύξηση του θεραπευτικού αποτελέσματος, μείωση του χρόνου φαρμακευτικής αγωγής και της έκτασης πιθανών παρενεργειών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Pileri, S.A., et al., *Hodgkin's lymphoma: the pathologist's viewpoint*. J Clin Pathol, 2002. **55**(3): p. 162-76.
2. Fraga, M. and J. Forteza, *Diagnosis of Hodgkin's disease: an update on histopathological and immunophenotypical features*. Histol Histopathol, 2007. **22**(8): p. 923-35.
3. Nathwani, B.N., et al., *The critical role of histology in an era of genomics and proteomics: a commentary and reflection*. Adv Anat Pathol, 2007. **14**(6): p. 375-400.
4. McCune, R.C., S.I. Syrbu, and M.A. Vasef, *Expression profiling of transcription factors Pax-5, Oct-1, Oct-2, BOB.1, and PU.1 in Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas: a comparative study using high throughput tissue microarrays*. Mod Pathol, 2006. **19**(7): p. 1010-8.
5. Abd El All, H.S., *Bob-1 is expressed in classic Hodgkin lymphoma*. Diagn Pathol, 2007. **2**: p. 10.
6. Garcia-Cosio, M., et al., *Analysis of transcription factor OCT.1, OCT.2 and BOB.1 expression using tissue arrays in classical Hodgkin's lymphoma*. Mod Pathol, 2004. **17**(12): p. 1531-8.
7. Buettner, M., et al., *Evidence of abortive plasma cell differentiation in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma*. Hematol Oncol, 2005. **23**(3-4): p. 127-32.
8. Carbone, A., et al., *Expression status of BCL-6 and syndecan-1 identifies distinct histogenetic subtypes of Hodgkin's disease*. Blood, 1998. **92**(7): p. 2220-8.
9. Rassidakis, G.Z., et al., *CD20 Expression in Hodgkin and Reed-Sternberg Cells of Classical Hodgkin's Disease: Associations With Presenting Features and Clinical Outcome*. J Clin Oncol, 2002. **20**(5): p. 1278-87.
10. Krenacs, L., et al., *Cytotoxic cell antigen expression in anaplastic large cell lymphomas of T- and null-cell type and Hodgkin's disease: evidence for distinct cellular origin*. Blood, 1997. **89**(3): p. 980-9.
11. Oudejans, J.J., et al., *Granzyme B expression in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease*. Am J Pathol, 1996. **148**(1): p. 233-40.
12. Asano, N., et al., *Prognostic significance of T-cell or cytotoxic molecules phenotype in classical Hodgkin's lymphoma: a clinicopathologic study*. J Clin Oncol, 2006. **24**(28): p. 4626-33.
13. Atayar, C., et al., *Expression of the T-cell transcription factors, GATA-3 and T-bet, in the neoplastic cells of Hodgkin lymphomas*. Am J Pathol, 2005. **166**(1): p. 127-34.
14. Schneider, E.M., et al., *The early transcription factor GATA-2 is expressed in classical Hodgkin's lymphoma*. J Pathol, 2004. **204**(5): p. 538-45.
15. Altieri, A., J.L. Bermejo, and K. Hemminki, *Familial risk for non-Hodgkin lymphoma and other lymphoproliferative malignancies by histopathologic subtype: the Swedish Family-Cancer Database*. Blood, 2005. **106**(2): p. 668-72.
16. Bobos, M., et al., *Aberrant CCND1 copies and cyclin D1 mRNA expression do not result in the production of functional cyclin D1 protein in anaplastic large cell lymphoma*. Histol Histopathol, 2009. **24**(8): p. 1035-48.
17. Dalton, R.R., et al., *Differential expression of cyclin D3 in ALK+ and ALK- anaplastic large cell lymphoma*. Hum Pathol, 2005. **36**(7): p. 806-11.
18. Leventaki, V., et al., *NPM-ALK oncogenic kinase promotes cell-cycle progression through activation of JNK/cJun signaling in anaplastic large-cell lymphoma*. Blood, 2007. **110**(5): p. 1621-30.
19. Thompson, M.A., et al., *Differential gene expression in anaplastic lymphoma kinase-positive and anaplastic lymphoma kinase-negative anaplastic large cell lymphomas*. Hum Pathol, 2005. **36**(5): p. 494-504.

20. Rassidakis, G.Z., et al., *Expression of p27(Kip1) and c-Jun activation binding protein 1 are inversely correlated in systemic anaplastic large cell lymphoma*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(3): p. 1121-8.
21. Vega, F., et al., *Activation of mammalian target of rapamycin signaling pathway contributes to tumor cell survival in anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large cell lymphoma*. Cancer Res, 2006. **66**(13): p. 6589-97.
22. Marzec, M., et al., *Oncogenic tyrosine kinase NPM/ALK induces activation of the MEK/ERK signaling pathway independently of c-Raf*. Oncogene, 2007. **26**(6): p. 813-21.
23. Chiarle, R., et al., *The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(1): p. 11-23.
24. Savage, K.J., et al., *ALK- anaplastic large-cell lymphoma is clinically and immunophenotypically different from both ALK+ ALCL and peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified: report from the International Peripheral T-Cell Lymphoma Project*. Blood, 2008. **111**(12): p. 5496-504.
25. Morris, S.W., et al., *Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma*. Science, 1994. **263**(5151): p. 1281-4.
26. Jaffe, E.S., et al., *Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. World Health Organization Classification of Tumours. 2001, Lyon, France: IARC Press. 191-235.
27. Stein, H., et al., *CD30(+) anaplastic large cell lymphoma: a review of its histopathologic, genetic, and clinical features*. Blood, 2000. **96**(12): p. 3681-95.
28. Kinney, M.C., R.A. Higgins, and E.A. Medina, *Anaplastic large cell lymphoma: twenty-five years of discovery*. Arch Pathol Lab Med, 2011. **135**(1): p. 19-43.
29. Falini, B., et al., *CD30 (Ki-1) molecule: a new cytokine receptor of the tumor necrosis factor receptor superfamily as a tool for diagnosis and immunotherapy*. Blood, 1995. **85**(1): p. 1-14.
30. Mir, S.S., B.W. Richter, and C.S. Duckett, *Differential effects of CD30 activation in anaplastic large cell lymphoma and Hodgkin disease cells*. Blood, 2000. **96**(13): p. 4307-12.
31. Foss, H.D., et al., *Anaplastic large-cell lymphomas of T-cell and null-cell phenotype express cytotoxic molecules*. Blood, 1996. **88**(10): p. 4005-11.
32. Burns, B.F. and I. Dardick, *Ki-1-positive non-Hodgkin's lymphomas. An immunophenotypic, ultrastructural, and morphometric study*. Am J Clin Pathol, 1990. **93**(3): p. 327-32.
33. Morris, S.W., et al., *ALK, the chromosome 2 gene locus altered by the t(2;5) in non-Hodgkin's lymphoma, encodes a novel neural receptor tyrosine kinase that is highly related to leukocyte tyrosine kinase (LTK)*. Oncogene, 1997. **14**(18): p. 2175-88.
34. Vernersson, E., et al., *Characterization of the expression of the ALK receptor tyrosine kinase in mice*. Gene Expr Patterns, 2006. **6**(5): p. 448-61.
35. Liu, Q.R. and P.K. Chan, *Formation of nucleophosmin/B23 oligomers requires both the amino- and the carboxyl-terminal domains of the protein*. Eur J Biochem, 1991. **200**(3): p. 715-21.
36. Bischof, D., et al., *Role of the nucleophosmin (NPM) portion of the non-Hodgkin's lymphoma-associated NPM-anaplastic lymphoma kinase fusion protein in oncogenesis*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(4): p. 2312-25.
37. Bai, R.Y., et al., *Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase associated with anaplastic large-cell lymphoma activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt antiapoptotic signaling pathway*. Blood, 2000. **96**(13): p. 4319-27.
38. Fujimoto, J., et al., *Characterization of the transforming activity of p80, a hyperphosphorylated protein in a Ki-1 lymphoma cell line with chromosomal translocation t(2;5)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(9): p. 4181-6.
39. Kuefer, M.U., et al., *Retrovirus-mediated gene transfer of NPM-ALK causes lymphoid malignancy in mice*. Blood, 1997. **90**(8): p. 2901-10.

40. Falini, B., et al., *ALK+ lymphoma: clinico-pathological findings and outcome*. Blood, 1999. **93**(8): p. 2697-706.
41. ten Berge, R.L., et al., *Expression levels of apoptosis-related proteins predict clinical outcome in anaplastic large cell lymphoma*. Blood, 2002. **99**(12): p. 4540-6.
42. Pfreundschuh M, T.L., Kloess M, et al, *Two-weekly or 3-weekly CHOP chemotherapy with or without etoposide for the treatment of elderly patients with aggressive lymphomas: results of the NHL-B2 trial of the DSHNHL*. Blood, 2004. **104**: p. 634-641.
43. Pfreundschuh M, T.L., Kloess M, et al., *Two-weekly or 3-weekly CHOP chemotherapy with or without etoposide for the treatment of young patients with good-prognosis (normal LDH) aggressive lymphomas: results of the NHLB1 trial of the DSHNHL*. Blood, 2004. **104**: p. 626-633.
44. Willemze, R., et al., *EORTC classification for primary cutaneous lymphomas: a proposal from the Cutaneous Lymphoma Study Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer*. Blood, 1997. **90**(1): p. 354-71.
45. Beljaards, R.C., et al., *Prognostic significance of CD30 (Ki-1/Ber-H2) expression in primary cutaneous large-cell lymphomas of T-cell origin. A clinicopathologic and immunohistochemical study in 20 patients*. Am J Pathol, 1989. **135**(6): p. 1169-78.
46. Greer, J.P., *Therapy of peripheral T/NK neoplasms*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2006: p. 331-7.
47. Francisco, J.A., et al., *cAC10-vcMMAE, an anti-CD30-monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity*. Blood, 2003. **102**(4): p. 1458-65.
48. Ansell, S.M., et al., *Phase I/II study of an anti-CD30 monoclonal antibody (MDX-060) in Hodgkin's lymphoma and anaplastic large-cell lymphoma*. J Clin Oncol, 2007. **25**(19): p. 2764-9.
49. Forero-Torres, A., et al., *A Phase II study of SGN-30 (anti-CD30 mAb) in Hodgkin lymphoma or systemic anaplastic large cell lymphoma*. Br J Haematol, 2009. **146**(2): p. 171-9.
50. Hamblett, K.J., et al., *Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(20): p. 7063-70.
51. Harris, S.L. and A.J. Levine, *The p53 pathway: positive and negative feedback loops*. Oncogene, 2005. **24**(17): p. 2899-908.
52. Vogelstein, B., D. Lane, and A.J. Levine, *Surfing the p53 network*. Nature, 2000. **408**(6810): p. 307-10.
53. Secchiero, P., et al., *Antiangiogenic activity of the MDM2 antagonist nutlin-3*. Circ Res, 2007. **100**(1): p. 61-9.
54. LaRusch, G.A., et al., *Nutlin3 blocks vascular endothelial growth factor induction by preventing the interaction between hypoxia inducible factor 1alpha and Hdm2*. Cancer Res, 2007. **67**(2): p. 450-4.
55. Korkolopoulou, P., et al., *Angiogenesis in Hodgkin's lymphoma: a morphometric approach in 286 patients with prognostic implications*. Leukemia, 2005. **19**(6): p. 894-900.
56. Drakos E, R.G., Li J, Ford RJ, Medeiros JL, *Nutlin-3, an MDM2 antagonist, induces p53-dependent cell cycle arrest and apoptosis in t(14;18)-associated B-cell lymphoma*. Laboratory Investigation, 2008. **88**(Suppl.1): p. 252A.
57. Manza, L.L., et al., *Sample preparation and digestion for proteomic analyses using spin filters*. Proteomics, 2005. **5**(7): p. 1742-5.
58. Wisniewski, J.R., et al., *Universal sample preparation method for proteome analysis*. Nat Methods, 2009. **6**(5): p. 359-62.
59. Tovar, C., et al., *Small-molecule MDM2 antagonists reveal aberrant p53 signaling in cancer: implications for therapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(6): p. 1888-93.

60. Huang, B., et al., *Pharmacologic p53 activation blocks cell cycle progression but fails to induce senescence in epithelial cancer cells*. *Mol Cancer Res*, 2009. **7**(9): p. 1497-509.
61. Paris, R., et al., *Multiple p53-independent gene silencing mechanisms define the cellular response to p53 activation*. *Cell Cycle*, 2008. **7**(15): p. 2427-33.
62. Vaseva, A.V., N.D. Marchenko, and U.M. Moll, *The transcription-independent mitochondrial p53 program is a major contributor to nutlin-induced apoptosis in tumor cells*. *Cell Cycle*, 2009. **8**(11): p. 1711-9.
63. Vassilev, L.T., et al., *In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2*. *Science*, 2004. **303**(5659): p. 844-8.
64. Van Maerken, T., et al., *Small-molecule MDM2 antagonists as a new therapy concept for neuroblastoma*. *Cancer Res*, 2006. **66**(19): p. 9646-55.
65. Drakos, E., et al., *Stabilization and activation of p53 downregulates mTOR signaling through AMPK in mantle cell lymphoma*. *Leukemia*, 2009. **23**(4): p. 784-90.
66. Drakos, E., et al., *Activation of the p53 pathway by the MDM2 inhibitor nutlin-3a overcomes BCL2 overexpression in a preclinical model of diffuse large B-cell lymphoma associated with t(14;18)(q32;q21)*. *Leukemia*, 2011. **25**(5): p. 856-67.
67. Argyriou, P., P. Economopoulou, and S. Papageorgiou, *The Role of mTOR Inhibitors for the Treatment of B-Cell Lymphomas*. *Adv Hematol*, 2012. **2012**: p. 435342.
68. Wiza, C., E.B. Nascimento, and D.M. Ouwens, *Role of PRAS40 in Akt and mTOR signaling in health and disease*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2012. **302**(12): p. E1453-60.
69. Rosenfeldt, H., J. Vazquez-Prado, and J.S. Gutkind, *P-REX2, a novel PI-3-kinase sensitive Rac exchange factor*. *FEBS Lett*, 2004. **572**(1-3): p. 167-71.
70. Mack, N.A., et al., *The diverse roles of Rac signaling in tumorigenesis*. *Cell Cycle*, 2011. **10**(10): p. 1571-81.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μεταλλάξεις του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 είναι η συχνότερη γενετική βλάβη στον καρκίνο του ανθρώπου, κυρίως σε συμπαγείς όγκους. Όμως, αιμοποιητικές κακοήθειες, όπως τα Hodgkin και μη-Hodgkin λεμφώματα, χαρακτηρίζονται από την παρουσία φυσιολογικής (μη- μεταλλαγμένης) p53 προτεΐνης στην πλειονότητα των ασθενών. Η προτεΐνη MDM2 αναστέλλει την p53, ρυθμίζοντας τα επίπεδα και τη λειτουργικότητά της. Μια σειρά από *in vitro* και *in vivo* μελέτες του πιο δραστικού παράγοντα εξ αυτών, της Nutlin-3A, οδήγησαν σε θεαματικά αποτελέσματα που εμφανίζει η σταθεροποίηση και ενεργοποίηση της φυσιολογικής p53, στην επαγωγή της απόπτωσης και στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου σε καρκινικά κύτταρα. Έτσι, παρέχεται η δυνατότητα νέας, μη-γενετοξικής θεραπείας, ιδιαίτερα σε μορφές καρκίνου με μικρή συχνότητα μεταλλάξεων του γονιδίου p53, όπως είναι τα λεμφώματα. Σκοπός της προτεινόμενης έρευνας αποτέλεσε η μελέτη έκφρασης γονιδίων, μετά από σταθεροποίηση και ενεργοποίηση της φυσιολογικής p53 σε Hodgkin και μη-Hodgkin λεμφώματα του ανθρώπου, σε επίπεδο μεταγραφής και μετάφρασης. Από το σύνολο των ταυτοποιηθέντων και σχετικά ποσοτικοποιημένων μεταγραφημάτων και προτεϊνών, διακρίθηκαν και μελετήθηκαν ομάδες προτεϊνών που επηρεάζονται από την εφαρμογή της N3A, μετέχουν στην ίδια οδό μεταγωγής σήματος και σχετίζονται με το μονοπάτι της p53, τον κυτταρικό κύκλο, την απόπτωση, την επιδιόρθωση του DNA, τις HSPs και το PI3K/mTOR. Πρόκειται για έναν ολιστικό τρόπο προσέγγισης της μελέτης των μηχανισμών λεμφοματογένεσης, που συγκεράζει διαφορετικά επιστημονικά πεδία στο χώρο των βιοϊατρικών επιστημών (μεθόδους Μοριακής Βιολογίας, OMICs αναλύσεις, Βιοπληροφορική), συμβάλλοντας στη διεύρυνση της σχετικής υπάρχουσας γνώσης και προτείνοντας νέες στοχευμένες, μη-γενετοξικές θεραπείες στα λεμφώματα.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

Παράρτημα I: Π.Ε.1 Γονιδιωματική (μεταγραφική) μελέτη του p53 σε Hodgkin και μη Hodgkin λεμφώματα

3^η Δραστηριότητα

Πίνακας 1:

- Λίστα απορρυθμισμένων mRNAs μετά από N3A σε τρεις λεμφωματικές σειρές
- Αποτελέσματα ανάλυσης γονιδιακής οντολογίας (Gene Ontology, GO) των απορρυθμισμένων mRNAs στα λεμφώματα HL, MCL, ALCL

Παράρτημα II: Π.Ε.2 Πρωτεωμική μελέτη του p53 σε Hodgkin και μη Hodgkin λεμφώματα

1^η Δραστηριότητα

Πίνακας 2: Λίστα ταυτοποιημένων και σχετικά ποσοτικοποιημένων πρωτεϊνών μετά από N3A σε τρεις λεμφωματικές σειρές

Πίνακας 3:

- Λίστα απορρυθμισμένων ταυτοποιημένων και σχετικά ποσοτικοποιημένων πρωτεϊνών μετά από N3A σε τρεις λεμφωματικές σειρές
- Αποτελέσματα ανάλυσης της γονιδιακής οντολογίας (GO) που αφορά τις απορρυθμισμένες πρωτεΐνες στους τρεις λεμφωματικούς τύπους

2^η Δραστηριότητα

Πίνακας 4: Χαρακτηρισμός των πρωτεϊνών με φωσφορυλίωση σε κάθε λεμφωματική κυτταρική σειρά, μετά τη σταθεροποίηση και ενεργοποίηση της p53 από την Nutlin-3A.

Πίνακας 5: Χαρακτηρισμός των πρωτεϊνών με ακετυλίωση σε κάθε λεμφωματική κυτταρική σειρά, μετά τη σταθεροποίηση και ενεργοποίηση της p53 από την Nutlin-3A.

3^η Δραστηριότητα

Πίνακας 6: Αποτελέσματα ανάλυσης της γονιδιακής οντολογίας (GO) που αφορά τα απορρυθμισμένα μεταγραφήματα που είναι κοινά και στις τρεις ομάδες λεμφώματος

Πίνακας 7: Αποτελέσματα ανάλυσης της γονιδιακής οντολογίας (GO) που αφορά τις απορρυθμισμένες πρωτεΐνες που είναι κοινές και στις τρεις ομάδες λεμφώματος

Πίνακας 8: Αποτελέσματα ανάλυσης της γονιδιακής οντολογίας (GO) που αφορά τα απορρυθμισμένα μεταγραφήματα που είναι μοναδικά και στις τρεις ομάδες λεμφώματος

Πίνακας 9: Αποτελέσματα ανάλυσης της γονιδιακής οντολογίας (GO) που αφορά τις απορρυθμισμένες πρωτεΐνες που είναι μοναδικές και στις τρεις ομάδες λεμφώματος

Παράρτημα III: Π.Ε.3 Αξιοποίηση των γενωμικών και πρωτεωμικών δεδομένων για την μελέτη οδών δι-επικοινωνίας μεταξύ της p53 και άλλων ογκογόνων μηχανισμών σε *Hodgkin* και μη *Hodgkin* λεμφώματα.

1^η Δραστηριότητα

Πίνακας 10: Μεταγραφήματα και πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο μονοπάτι του p53

Πίνακας 11: Μεταγραφήματα και πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο μονοπάτι του κυτταρικού κύκλου

Πίνακας 12: Μεταγραφήματα και πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο μονοπάτι της απόπτωσης

Πίνακας 13: Μεταγραφήματα και πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο μονοπάτι της επιδιόρθωσης του DNA

Πίνακας 14: Μεταγραφήματα και πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο μονοπάτι του PI3K/AKT/mTOR

Πίνακας 15: Μεταγραφήματα και πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο μονοπάτι της απόκρισης HSR