

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

Σχολή Επιστημών Υγείας – Τμήμα Ιατρικής

ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Δ/ντής: Καθηγητής Γ. Σαμώνης

Και

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

Δ/ντής: Καθηγητής Α. Μαργιωρής

**Μελέτη της ενεργοποίησης των
ογκογονιδίων Trp-2 και Gfi1 σε
λεμφοειδείς νεοπλασίες**

ANNA ΧΡΙΣΤΟΦΟΡΙΔΟΥ

Ιατρός Αιματολόγος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ηράκλειο 2007

*Στον σύντροφο μου Νίκο
Και στη μικρούλα μας*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ: ΛΕΜΦΟΫΠΕΡΠΛΑΣΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

1. ΟΡΙΣΜΟΣ-ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ	1
2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΛΕΜΦΟΫΠΕΡΠΛΑΣΤΙΚΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ	2
3. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ	6
3.1. Ιστογένεση	6
3.1.1. Ιστογένεση Β λεμφοκυττάρων	6
3.1.2. Προέλευση Β-Λεμφοκυτταρικών νεοπλασιών	9
Ιστολογική προέλευση της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας	9
Ιστολογική προέλευση του λεμφώματος μανδύα	10
3.1.3. Ιστογένεση Τ-και ΝΚ-Λεμφοκυττάρων	12
3.1.4. Προέλευση Τ-και ΝΚ-Λεμφοκυτταρικών νεοπλασιών	16
Ιστολογική προέλευση της χρόνιας LGL λευχαιμίας	18
3.2. Παθογένεια	19
3.2.1. Παράγοντες κινδύνου	19
Οικογενείς παράγοντες	19
Χημικά καρκινογόνα και ιονίζουσα ακτινοβολία	21
Ανοσοανεπάρκεια	21
Ιογενείς λοιμώξεις	22
Χρόνιος αντιγονικός ερεθισμός	23
3.2.2. Γενετική βάση των λεμφοειδών νεοπλασιών	24
Ογκογονίδια	25
Μηχανισμοί ενεργοποίησης πρωτο-ογκογονιδίων	26
Ογκοκατασταλτικά γονίδια	27
Μηχανισμοί απενεργοποίησης ογκοκατασταλτικών γονιδίων	27

Γονίδια επιδιόρθωσης του DNA	28
Χρωμοσωμικές ανωμαλίες	29
Ογκογόνες κινάσες: η οδός των MAP κινασών	33
Μεταγραφικοί παράγοντες: ο κεντρικός ρόλος του NF-κΒ σε ευρύ φάσμα λεμφοειδών και μη νεοπλασιών.	36
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ: ΤΑ ΟΓΚΟΓΟΝΙΑΔΙΑ TPL2, GFI1 ΚΑΙ PIM1	
1. Tpl2	39
2. Gfi1	46
3. Pim1	50
4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	54
ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
1. ΑΣΘΕΝΕΙΣ	
Κριτήρια επιλογής και χαρακτηριστικά σθενών	57
Συλλογή αίματος από ασθενείς	59
Συλλογή αίματος από υγιείς δότες	60
2. ΜΕΘΟΔΟΙ	
2.1. Διαχωρισμός λεμφομονοκυττάρων περιφερικού αίματος	60
2.2. Εκχύλιση RNA	61
Φωτομέτρηση	62
Επεξεργασία με DNase	63
2.3. Εκχύλιση DNA	63
2.4. Σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (cDNA)	64
2.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	65
Αρχή της μεθόδου	65
Ανίχνευση των προϊόντων της PCR	67
Μέθοδοι ποσοτικής μελέτης με «κλασική» PCR	68
Ημι-ποσοτική, σχετική RT-PCR για τον προσδιορισμό της έκφρασης των γονιδίων Tpl2, Gfi1 και Pim1	71
Multiplex PCR για την ανίχνευση γονιδιακής ενίσχυσης του Tpl2	74
2.6. Real-time RT-PCR	75
2.6.1. Αρχή της μεθόδου	75
2.6.2. Μέθοδοι ποσοτικής μελέτης με real-time PCR	78
Οι εκκινητές στη real-time PCR	84
2.6.3. Σχετική, SybrGreen real-time RT-PCR για τον προσδιορισμό της έκφρασης των γονιδίων Tpl2, Gfi1 και Pim1	84
2.7. Ανοσοενζυματική μέθοδος προσδιορισμού κυτταροκινών ορού (ELISA)	87
2.8. Μέθοδος κυτταρομετρικής ανάλυσης ροής (FACS)	88
2.9. Στατιστική ανάλυση	90

ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Ασθενείς	91
2. Ημι-ποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης των γονιδίων Trp2, Gfi1 και Pim1 με κλασική RT-PCR στα περιφερικά λεμφομονοπύρηνια.	93
2.1. T-Λεμφοκυτταρικές κακοήθειες	93
2.2. B-Λεμφοκυτταρικές κακοήθειες	96
3. Προσδιορισμός έκφρασης των γονιδίων Trp2, Gfi1 και Pim1 με σχετική, ποσοτική real-time RT-PCR στα περιφερικά λεμφομονοπύρηνια.	98
3.1. Αξιοπιστία του ποσοτικού προσδιορισμού	98
3.2. T-Λεμφοκυτταρικές κακοήθειες	103
3.3. B-Λεμφοκυτταρικές κακοήθειες	106
4. Σύγκριση μεθόδων	109
5. Συσχέτιση της έκφρασης των γονιδίων Trp2, Gfi1 και Pim1 ανά νόσο	110
6. Ανίχνευση του γονιδιακού φορτίου του Trp2 σε γενωμικό επίπεδο με multiplex PCR	112
7. Εκτίμηση των επιπέδων TNF-α, IL-2, IL-12 και IFN-γ του ορού	114
TNF-α	116
IL12	118
IFN-γ	121

ΜΕΡΟΣ ΤΕΤΑΡΤΟ: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Οι χρόνιας λευχαιμίες των LGL κυττάρων παρουσιάζουν υπερέκφραση των ογκογονιδίων Trp2, Gfi1 και Pim1 και έχουν αυξημένα επίπεδα TNF-α και IL-12 στον ορό	123
2. Ασθενείς με επιθετικές ή προχωρημένου σταδίου T-λεμφοειδείς νεοπλασίες παρουσιάζουν υπερέκφραση του Pim1 αλλά όχι των Trp2 και Gfi1.	127
3. Το Trp2 παρουσιάζει αυξημένη έκφραση σε B-λεμφοειδείς νεοπλασίες και συνεργάζεται με το Pim1.	128
4. Το Gfi1 δεν παρουσιάζει αυξημένη έκφραση στις B-λεμφοειδείς νεοπλασίες	132

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

133

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

134

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

167

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Όνομα	Άννα Β. Χριστοφορίδου
Διεύθυνση κατοικίας:	Λ. Μάρκρης 33, 68100, Αλεξανδρούπολη
Τηλέφωνο	2551040388 / 6947306755
E-mail:	annachristof@yahoo.gr
Ημ/νία γέννησης	1-4-1971
Τόπος γέννησης	Θεσσαλονίκη
Οικογενειακή κατάσταση	Έγγαμη

1. ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

1995	Πτυχίο Ιατρικής με γενικό βαθμό «λίαν καλώς», 8
1995 – 1997	Υπηρεσία υπαίθρου στο Ν.Μυλότοπο, Ν.Πέλλας
6/1997 – 6/1999	Άσκηση στη Γενική Παθολογία στην Παθολογική κλινική του Γενικού Νομαρχιακού Νοσοκομείου Εδέσσης
11/1999-11/2003	Ειδίκευση στην Αιματολογία στην Αιματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου
10/2001-12/2001	Τρίμηνη εκπαίδευση στη Μονάδα Μεταμόσχευσης Αιμοποιητικών Κυττάρων του Νοσοκομείου Παπανικολάου Θεσσαλονίκης
3/03-7/03	Επιστημονική συνεργάτης στο Ινστιτούτο Μοριακής Ογκολογίας του Πανεπιστημίου TUFTS της Βοστώνης με υποτροφία της Ελλ.Αιματολογικής Εταιρείας. Δ/ντής: Καθηγητής Αιματολογίας/Ογκολογίας Φ.Τσίχλης
5/01-παρόν	Ανάληψη διδακτορικής διατριβής με θέμα: «Μελέτη της ενεργοποίησης των ογκογονιδίων Trp1-2 και Gfi1 σε λεμφοειδείς νεοπλασίες». Επιβλέπων: Καθ.Αιματολογίας κ.Γ.Ηλιόπουλος, Ιατρική σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης
9/04-2/05	Άμισθη επιστημονική συνεργάτης, Αιματολογικό Τμήμα, Γ.Ν. «Παπαγεωργίου» Θεσσαλονίκης

6/3/05-30/6/2005	Μεταδιδακτορική συνεργάτης στο τμήμα μεταμόσχευσης αιμοποιητικών κυττάρων, Νοσοκομείο MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas. Επιβλέπων Καθ. Richard Champlin.
5/06-σήμερα	Επιμελήτρια Β' Αιματολογικής κλινικής, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Αλεξανδρούπολης
Μέλος Ιατρικών Εταιρειών	Μέλος της Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρείας
Ξένες γλώσσες	Μέλος της Ευρωπαϊκής Αιματολογικής Εταιρείας (EHA) Αγγλικά, Γαλλικά

2. ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΕΡΓΟ

9/1997 - 5/1998	Διδάσκουσα στη σχολή Νοσοκόμων του Γ.Ν.Εδεσσας στο μάθημα «Εσωτερική Παθολογία»
Στρογγυλές τράπεζες	Εισηγήτρια του θέματος «Ανεπιθύμητα συμβάματα στη μετάγγιση παραγώγων αίματος», στρογγυλό τραπέζι «Κλινική χρήση παραγώγων αίματος». Συνέδριο: Ποιότητα και ασφάλεια στην ιατρική των μεταγγίσεων, Αλεξανδρούπολη 2006

3. ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ – ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

1. 1990 Υποτροφία του ΙΚΥ για την επίδοση στα μαθήματα του έτους
2. 2000 11^ο Πανελλήνιο αιματολογικό συνέδριο 2000: Βραβείο καλύτερης ανηρτημένης ανακοίνωσης
3. 2002 Υποτροφία «Αντώνης Παπαγιάννης» Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρείας 2002.
4. 2005 Υποτροφία Marie Curie Actions της Ευρωπαϊκής Κοινότητας για την παρακολούθηση του σεμιναρίου: Second ESH-EHA annual diagnostic work-up of haematological malignancies: Focus on Lymphoid Malignancies

4. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. Correlation between the uptake of Tc-99m-sestaMIBI and prognostic factors in patients with multiple myeloma. Alexandrakis MG, Kyriakou DS, Passam FH, Malliaraki N, **Christophoridou AV**, Karkavitsas N. Clin Lab Haematol. 2002 Jun; 24(3):155-9.

2. Levels of serum cytokines and acute phase proteins in patients with essential and cancer-related thrombocytosis. Alexandrakis MG, Passam FH, Moschandrea IA, **Christophoridou AV**, Pappa CA, Coulocheri SA, Kyriakou DS. Am J Clin Oncol. 2003 Apr; 26(2): 135-40.
3. Relationship between circulating serum soluble interleukin-6 receptor and the angiogenic cytokines basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in multiple myeloma.Alexandrakis MG, Passam FH, Boula A, **Christophoridou A**, Aloizos G, Roussou P, Kyriakou DS. Ann Hematol. 2003 Jan; 82(1): 19-23. Epub 2002 Dec 18.
4. Low serum gamma-glutamyltranspeptidase (GGT) in patients with chronic idiopathic neutropenia is not implicated in the pathophysiology of the disease. Papadaki HA, Kosteas T, Gemetzi C, **Christoforidou A**, Anagnou NP,EliopoulosGD. Haematologica. 2003 Nov; 88(11): ELT32.
5. Serum level of interleukin-16 in multiple myeloma patients and its relationship to disease activity. Alexandrakis MG, Passam FH, Kyriakou DS, **Christophoridou AV**, Perisinakis K, Hatzivasili A, Foudoulakis A, Castanas E. Am J Hematol. 2004 Feb;75(2):101-6.
6. Aledronate reduces serum TNF α and IL-1 β and improves bone mineral density and bone metabolism in patients with chronic idiopathic neutropenia (CIN)-associated osteopenia and osteoporosis. Papadaki HA, Tsatsanis C, **Christoforidou A**, Malliaraki N, Margioris AN, Eliopoulos GD. J Bone Miner Metab. 2004 Nov;22(6):577-587.
7. Expression of the Tpl2/Cot oncogene in human T-cell neoplasias. **Christoforidou AV**, Papadaki HA, Margioris AN, Eliopoulos GD, Tsatsanis C. Mol Cancer. 2004 Dec; 3(1):34.
8. Numb chin syndrome reflecting bad prognosis in two cases of multiple myeloma. **Anna V. Christoforidou**, Michael G. Alexandrakis, Anna Boula, Andrew Fountoulakis, Martha Spilioti, George Samonis. Haema. 2005 Apr;8(2):297-299.

9. Veno-occlusive disease of the liver associated with chronic myelomonocytic leukemia treated with vincristine and standard doses of cytarabine. Boula AM, Mantadakis E, Xilouri IM, **Christoforidou AV**, Foudoulakis AM, Samonis G. Am J Hematol. 2005 Jul;79(3):216-9.
10. Evaluation of hypochromic erythrocytes in combination with sTfR-F Index for predicting response to r-HuEPO in anemic patients with multiple myeloma. E. Katodrytou, M. Speletas, K. Zervas, D. Kapetanios, E. Georgiou, **A. Christoforidou**, A. Pavlitou, M. Sion, J. Christakis. Lab Hematol. 2006;12(1):47-54.
11. Results of a retrospective single institution analysis of targeted skeletal radiotherapy with ¹⁶⁶Holmium-DOTMP as conditioning regimen for autologous stem cell transplant for patients with multiple myeloma. Impact on transplant outcomes. **Christoforidou AV**, Saliba RM, Williams P, Qazilbash M, Roden L, Aleman A, Weber D, Mendoza F, Podoloff D, Wendt R 3rd, Breitz H, Alexanian R, Champlin R, Giralt S. Biol Blood Marrow Transplant. 2007 May;13(5):543-9.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία αυτή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κλινικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης σε συνεργασία με το Εργαστήριο Αιματολογίας κάτω από την άμεση καθοδήγηση του επίκουρου καθηγητή κ. Χ. Τσατσάνη, τον οποίο ευχαριστώ θερμά για την υπόδειξη του θέματος και την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη διάρκειά της. Η συνεργασία μαζί του αποτέλεσε μία πηγή γνώσεων και σωστού τρόπου σκέψης και εργασίας πάνω στη μοριακή βιολογία του καρκίνου, όχι μόνο θεωρητικά αλλά και με τη συνεχή του παρουσία δίπλα μας στον πάγκο του εργαστηρίου.

Επίσης θέλω να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή Αιματολογίας κ. Γ. Ηλιόπουλο, ο οποίος εκτός από την άσκησή μου στην αιματολογία μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ και με το ερευνητικό κομμάτι της τόσο συναρπαστικής αυτής ειδικότητας. Ακόμη, μου έμαθε να θέτω τα σωστά ερωτήματα στην επιστήμη και να αξιολογώ τα ευρήματα, ενώ με τις υποδείξεις και τις διορθώσεις του βοήθησε σημαντικά στη συγγραφή της διατριβής αυτής.

Η καθηγήτρια Αιματολογίας κ. Ε. Παπαδάκη υπήρξε παράδειγμα ακούραστης εργασίας και μου πρόσφερε τόσο ηθική όσο και υλική βοήθεια από τις υποδομές του εργαστηρίου Αιματολογίας. Με εισήγαγε στην κυτταρομετρία ροής, ενώ πολύωρες υπήρξαν οι συζητήσεις μας σχετικά με την πορεία της μελέτης, καθώς και την τελική μορφή της συγγραφής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Γ. Σαμώνη που δέχτηκε να αντικαταστήσει τον κ. Ηλιόπουλο μετά τη συνταξιοδότησή του τελευταίου σαν μέλος της τριμελούς επιτροπής. Η συμβολή του στη διαδικασία αξιολόγησης της εργασίας και η παρότρυνσή του για τη συνέχιση των σπουδών μου στην Αμερική υπήρξαν πολύτιμες.

Ευχαριστώ ακόμη την Αιματολογική Εταιρεία που με την υποτροφία «Α.Παπαγιάννης» που μου χορήγησε, ύστερα από διαγωνισμό, μου δόθηκε η ευκαιρία να συνεχίσω την έρευνά μου για το γονίδιο Trp12 στο Πανεπιστήμιο TUFTS της Βοστώνης υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Φ. Τσίχλη. Ο καθηγητής κ. Τσίχλης, αλλά και ο αναπληρωτής καθηγητής κ. Α. Ηλιόπουλος που γνώρισα εκεί αποτέλεσαν κινητήριους μοχλούς για την εμπάθунση της έρευνας αυτής, αλλά και αστείρευτη πηγή γνώσεων και νέων ιδεών.

Ακόμη, ευχαριστώ τον καθηγητή Κλινικής Χημείας κ. Α. Μαργιωρή για την προσφορά των χώρων του εργαστηρίου και την ευγενική του συμπαράσταση σε όλη τη διάρκεια της μελέτης. Όλα τα μέλη του εργαστηρίου και ιδιαίτερα την Αριάδνη Ανδρουλιδάκη και τη Ρ. Δερμιτζάκη για τη βοήθειά τους στη επίλυση διαφόρων τεχνικών προβλημάτων και τη θετική τους ενέργεια. Το εργαστήριο του τμήματος Ρευματολογίας και ιδιαίτερα τη Χριστίνα Χουλάκη για τις συζητήσεις πάνω στη real-time PCR που βοήθησαν στη βελτιστοποίηση της μεθόδου. Το Δημήτρη Πανουτσόπουλο και το λοιπό προσωπικό του εργαστηρίου Κλινικής Ιολογίας για την άριστη γνώση της κλασικής PCR και την προθυμία τους να τη μεταδώσουν.

Πολλές ευχαριστίες οφείλω στον αναπληρωτή καθηγητή κ. Μ. Αλεξανδράκη και στους επιμελητές της Αιματολογικής Κλινικής κ. Α. Φουντουλάκη και Ει. Ευλούρη για την υπόδειξη των ασθενών.

Τέλος, ένα ιδιαίτερα μεγάλο ευχαριστώ στο σύντροφό μου Νίκο για την πραγματικά τεράστια υπομονή του αλλά και την αισιοδοξία που μου μεταδίδει και στους γονείς μου που στάθηκαν πάντα στο πλάι μου.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

- ADCC:** Antibody-dependent cellular cytotoxicity, *Εξαρτώμενη από αντισώματα κυτταροτοξικότητα*
- APC:** Antigen-presenting cell, *Αντιγόνο-παρουσιαστικό κύτταρο*
- COT:** Cancer Osaka Thyroid oncogene
- CTCL:** Cutaneous T cell Lymphoma, *T-Δερματικό λέμφωμα*
- DS:** Δενδριτικά κύτταρα
- DLCL:** Diffuse Large Cell Lymphoma, *Διάχυτο Λέμφωμα από Μεγάλα Β κύτταρα*
- EBV:** Epstein-Barr Virus, *Ιός Epstein-Barr*
- Gfi1:** Growth Factor Independence Factor-1
- Granzyme:** Γρανέζυμο
- HCV:** Hepatitis C Virus, *Ιός ηπατίτιδος C*
- HD:** Hodgkin's Lymphoma
- HIV:** Human Immunodeficiency Virus
- HTLV:** Human T-cell Lymphotropic Virus
- ILSG:** International Lymphoma Study Group
- LGL:** Large Granular Lymphocytes, *Μεγάλα κοκκιώδη λεμφοκύτταρα*
- LGL-PD:** Large Granular Lymphocyte Proliferative Disease, *Λεμφοϋπερπλαστική νόσος από μεγάλα κοκκιώδη λεμφοκύτταρα*
- MAP2K ή MAPKK:** Mitogen Activated Protein Kinase Kinase
- MAP3K ή MAPKKK:** Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase
- MHC:** Major Histocompatibility Complex, *Μείζον σύστημα αντιγόνων ιστοσυμβατότητας*
- MoMuLV:** Moloney Murine Leukemia Virus
- MAPK:** Mitogen Activated Protein Kinase, *Πρωτεϊνικές κινάσες ενεργοποιούμενες από μιτογόνα*
- NFAT:** Nuclear Factor of Activated T cells
- NF-κB:** Nuclear Factor of kappa light chain gene enhancer in B cells
- NF-κB1:** Nuclear Factor of kappa light chain gene enhancer in B cells 1 ή p50/p105
- NHL:** Non Hodgkin's Lymphoma
- NIK:** NF-κB inducing kinase
- NK:** Natural Killer, *Φυσικό κυτταροκτόνο κύτταρο*
- Pim1:** Proviral Integration site for MuLV
- Primer:** *εκκινητής*
- PTCL:** Peripheral T-cell lymphoma, *Περιφερικό T λέμφωμα*

REAL: Revised European American Classification of Lymphoid Neoplasms

Real-time PCR: αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο

SS: Σύνδρομο *Sezary*

TCR: T cell Receptor, υποδοχέας του T λεμφοκυττάρου

Tp12: Tumor Progression Locus-2.Εναλλακτικές ονομασίες *MAP3K8, Cot*

WHO: World Health organization, Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας

ΛΜ: Λέμφωμα τύπου Μανδύα

ΛΜΑ: Λέμφωμα από μικρά λεμφοκύτταρα

ΛΜΖ: Λέμφωμα από κύτταρα της μεθοριακής ζώνης

ΛΠΚ: Λεμφοπλασματοκυτταρικό Λέμφωμα

ΟΛΛ: Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία

ΠΚ: Πλασματοκύτταρα

ΠΛ: Προλεμφοκυτταρική λευχαιμία

ΠΜ: Πολλαπλούν μυέλωμα

ΣΜΖΛ: Σπληνικό Β-λέμφωμα από κύτταρα της μεθοριακής ζώνης

T-ΠΛ: T-κυτταρικής αρχής προλεμφοκυτταρική λευχαιμία

ΧΛΛ: Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα γονίδια Trp2 και Gfi1 αποτελούν σχετικά καινούρια μέλη της οικογένειας των κυτταρικών ογκογονιδίων των οποίων ο ρόλος στην ανάπτυξη και εξέλιξη ανθρώπινων νεοπλασματικών νόσων πιθανολογείται, καθώς είναι γνωστό ότι συμβάλλουν στην ανάπτυξη λεμφοειδών νεοπλασιών, κυρίως T-λεμφοκυτταρικής αρχής σε ζωικά πειραματικά μοντέλα.

Συγκεκριμένα, η κινάση Trp2 (ή MAP3K8) όταν εκφράζεται αναδιαταγμένη (κολοβωμένη) στο καρβοξυτελικό της άκρο σε διαγονιδιακά ποντίκια προκαλεί την ανάπτυξη T-λεμφοβλαστικών λεμφωμάτων, ενώ και η υπερέκφραση της φυσικής πρωτεΐνης είναι ογκογόνος. Στον άνθρωπο έχει βρεθεί υπερέκφραση σε λέμφωμα Hodgkin's, σε ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα και σε καρκίνο του μαστού, ενώ πρόσφατα βρέθηκε μετάλλαξη που αναδιατάσσει το 3' άκρο του γονιδίου σε καρκίνο πνεύμονα. Στις φυσιολογικές της λειτουργίες συμπεριλαμβάνεται συμμετοχή στην ενεργοποίηση T-λεμφοκυττάρων, αλλά και στην παραγωγή IL-2 από T-λεμφοκύτταρα. Αναστέλλει τη ρυθμιστική του κυτταρικού κύκλου πρωτεΐνη p27^{kip} και κινητοποιεί διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες που διεγείρουν την παραγωγή κυττοκινών όπως η IL-2 και ευδοκούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Συμμετέχει ακόμη στην παραγωγή TNF-α από μακροφάγα, καθώς και στην διαβίβαση σημάτων που προέρχονται από την επίδραση TNF-α και CD40 σε μακροφάγα και B-λεμφοκύτταρα. Η αναδιαταγμένη μορφή της φαίνεται πως είναι πολύ πιο δραστική.

Αντίστοιχα, το γονίδιο που κωδικοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα Gfi1 αποτελεί επίσης θέση ενσωμάτωσης προϊόν σε MoMuLV-επαγόμενα T-λεμφώματα και προσδίδει μερική ανεξαρτησία από την IL-2 στις κυτταρικές σειρές που προέρχονται από αυτά. Σε διαγονιδιακά ποντίκια αναπτύσσονται T-λεμφώματα σε χαμηλό ποσοστό, το οποίο όμως αυξάνει κατά πολύ αν ταυτόχρονα εκφραστούν τα c-Myc ή Pim, ενώ υπερεκφράζεται και σε B-λεμφώματα που αναπτύσσονται σε διαγονιδιακά Emu-myc ποντίκια με την επίδραση MoMuLV. Ο ρόλος του στην ογκογένεση συνδέεται με την πρόοδο μάλλον παρά με την έναρξη της, ενώ κατέχει σημαντική θέση και στη ρύθμιση της αιμοποίησης. Στη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου αυτού έχει δείχθει ο επαγωγικός ρόλος της οδού ERK, πιθανόν μέσω ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα AP-1 ύστερα από TCR διέγερση. Στον άνθρωπο δεν έχει γίνει έως τώρα καμία μελέτη σχετικά με το ρόλο του στην ανάπτυξη αιματολογικών κακοηθειών, ως επίσης δεν έχει ποτέ μελετηθεί ταυτόχρονα με το γονίδιο Trp2, το οποίο είναι γνωστό ότι διεγείρει την MEK/ERK/AP-1 οδό.

Τέλος, η κινάση Pim1 ανήκει, όπως και η MAP3K8, στις κυτταροπλασματικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης και διαθέτει αντι-αποπτωτικές και επαγωγικές του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ιδιότητες. Η ογκογόνος δράση της έχει επιβεβαιωθεί τόσο σε πειραματικά μοντέλα όσο και στον άνθρωπο, όπου έχει αποκαλυφθεί η συμμετοχή της σε B-λεμφώματα, σε καρκίνο προστάτη και σε μυελοβλαστικές λευχαιμίες. Κατέχει σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση της αντι-αποπτωτικής δράσης διάφορων κυττοκινών και ιδίως όσων ενεργοποιούν την STAT3. Θεωρείται ογκογονίδιο με ρόλο στη φάση της έναρξης της κακοήθους εξαλλαγής, κατά την πρόοδο της οποίας συνεργάζεται με άλλα ογκογονίδια. Οι Mikkers και συν χρησιμοποιώντας κατευθυνόμενη μεταλλαξιογένεση με MoMuLV σε EmMyc+/Pim1-ποντίκια προκειμένου να αναλύσουν τις περιοχές ενσωμάτωσης προϊόν, ταυτοποίησαν εννέα περιοχές που σχετίζονται με σχέση αλληλοαποκλεισμού, δηλαδή μη ταυτόχρονης ενσωμάτωσης με το Pim1. Ανάμεσα σ' αυτές περιλαμβάνονταν το γονίδιο Trp2 που σημαίνει ότι το Trp2, όσον αφορά την ογκογένεση, πρέπει να δρα εν παραλλήλω ή σε κατώτερο επίπεδο από το Pim1.

Στον άνθρωπο οι B-λεμφοκυτταρικές κακοήθειες είναι κατά πολύ συχνότερες των T, τουλάχιστον στο Δυτικό κόσμο. Έτσι, στην παρούσα μελέτη συμπεριλάβαμε σειρά ασθενών με T και B λεμφοειδείς νεοπλασίες (λευχαιμίες ή λεμφώματα με λευχαιμική έκφραση) με σκοπό να μελετήσουμε: α) την έκφραση των Trp2, Gfi1 και Pim1 με ημι-ποσοτική, συμβατική RT-PCR, καθώς και με SybrGreen real-time qPCR σε λεμφομονοπύρηνγα του περιφερικού αίματος των με σκοπό την ανάδειξη πιθανής υπερέκφρασης και των μεταξύ τους σχέσεων αποκλεισμού ή συνέργειας β) την πιθανότητα γονιδιακής ενίσχυσης του Trp2 με multiplex PCR βάσει των αποτελεσμάτων των Σουρβίνος και συν σε καρκίνο του μαστού και γ) τα επίπεδα των TNF-α και IL-2 στον ορό με την ανοσοενζυματική μέθοδο ELISA, αλλά και τα επίπεδα των IL-12 και IFN-γ που συνδέονται με νόσους όπως οι LGL λευχαιμίες και η ΧΑΛ.

Επιλέχθηκαν 24 ασθενείς της αιματολογικής κλινικής του Πανεπιστημιακού νοσοκομείου Ηρακλείου, 12 από τους οποίους έπασχαν από B- και 12 από T-λεμφοκυτταρικές νεοπλασίες. Συμπεριελήφθη μία ασθενής με B-λεμφοκυττάρωση που στη συνέχεια αποδείχθηκε αντιδραστικού τύπου από ρευματοειδή αρθρίτιδα, καθώς και 22 υγιείς μάρτυρες. Από κάθε ασθενή ή μάρτυρα ελήφθησαν 18 ml περιφερικού αίματος. Από το ίζημα των λεμφομονοπυρήνων που ελήφθη με τη μέθοδο της διαβαθμισμένης φυγοκέντρησης πάνω σε στοιβάδα φικόλης έγινε απομόνωση RNA και DNA, ενώ ο ορός των ασθενών χρησιμοποιήθηκε σε αντιδράσεις ELISA.

Τα αποτελέσματα της συμβατικής RT-PCR είχαν χαμηλό δυναμικό εύρος στην εκτίμηση της σχετικής έκφρασης των γονιδίων, ωστόσο δε διέφεραν από τη real-time qPCR στην ανίχνευση των δειγμάτων με υπερέκφραση.

Από τους ασθενείς με T-λεμφοκυτταρικές κακοήθειες 33% είχαν υπερέκφραση Trp12, έως 5,2 φορές τη μέση τιμή των μαρτύρων και μάλιστα ήταν οι πάσχοντες από LGL-χρόνιες λεμφοκυτταρικές λευχαιμίες. Σε τρεις από αυτούς η νόσος συνοδεύονταν από ανοσολογικής αρχής ουδετεροπενία. Οι ίδιοι παρουσίαζαν και υπερέκφραση Gfi1. Υπερέκφραση Pim1 παρουσίασαν 6 από τους 12 ασθενείς (50%) και συγκεκριμένα η ομάδα των T-LGL καθώς και 3 ασθενείς με επιθετικού τύπου T-κακοήθειες.

Από τους ασθενείς με B-λεμφοκυτταρικές κακοήθειες υπερέκφραση Trp12 παρουσίασαν 9 ασθενείς (75%) και ήταν όλοι οι ασθενείς με B-χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ) καθώς και μια ασθενής με λέμφωμα σπληνός της μεθοριακής ζώνης, ένας με λέμφωμα μανδύα και οριακά ο ασθενής με μετατροπή ΧΛΛ σε σύνδρομο Richter. Κανένας δεν παρουσίασε υπερέκφραση Gfi1. Εννιά επίσης ασθενείς με B-λεμφοκυτταρικές κακοήθειες παρουσίασαν αυξημένη έκφραση του Pim1: οι ασθενείς με ΧΛΛ και οι ασθενείς με λέμφωμα τύπου μανδύα είχαν πολύ υψηλές τιμές καθώς και η ασθενής με λέμφωμα σπληνός της μεθοριακής ζώνης.

Ενδιαφέροντα αποτελέσματα έδειξε η συσχέτιση των 3 γονιδίων με two-tailed Spearman's rank order correlation ανάλυση. Έτσι αποδείχθηκε στατιστικά σημαντική θετική σχέση της έκφρασης και των τριών γονιδίων όσον αφορά τις T-λεμφοκυτταρικές κακοήθειες, ενώ στις B-λεμφοκυτταρικές κακοήθειες θετικά σχετίζονταν μόνο η έκφραση των Trp12 και Pim1. Δεν αποδείχθηκε κάποια αρνητική σχέση μεταξύ των γονιδίων.

Η ανάλυση του γονιδιακού φορτίου του Trp12 με multiplex PCR σε γενωμικό DNA δεν έδειξε γονιδιακή ενίσχυση σε κανένα από τα δείγματα.

Τέλος, η εκτίμηση των επιπέδων των IL-2, INF- γ , TNF- α και IL-12 στον ορό και η συσχέτισή τους με το Trp12_{NORM} έδωσε τα εξής αποτελέσματα: Η IL-2 είχε απροσδιόριστη τιμή σε όλα τα δείγματα. Οι ασθενείς με T-λεμφοκυτταρικές κακοήθειες γενικά και με LGL λευχαιμίες ειδικότερα είχαν στατιστικά υψηλότερες τιμές TNF- α σε σχέση με τους μάρτυρες, χωρίς στατιστικά σημαντική συσχέτιση TNF- α με Trp12_{NORM}, αλλά και υψηλότερες τιμές IL-12 με θετική μάλιστα συσχέτιση μεταξύ Trp12_{NORM} και IL-12. Τα επίπεδα της INF- γ δε διέφεραν μεταξύ ασθενών και μαρτύρων, ωστόσο στην ομάδα των LGL παρατηρήθηκαν μεμονωμένα υψηλότερες τιμές. Παρόμοια και οι ασθενείς με B-λεμφοκυτταρικές κακοήθειες είχαν υψηλότερες τιμές TNF- α από τους μάρτυρες, χωρίς να υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση των τιμών TNF- α με τις τιμές Trp12_{NORM}. Από αυτούς, οι ασθενείς με λέμφωμα μανδύα παρουσίαζαν μεγαλύτερη τάση αύξησης των επιπέδων TNF- α σε σχέση με τους υπόλοιπους. Επιπλέον, οι ασθενείς με B-λεμφοκυτταρικές κακοήθειες είχαν συνολικά υψηλότερες τιμές IL-12 αλλά και INF- γ από τους μάρτυρες χωρίς να ξεχωρίζει κάποια υποομάδα νόσων, καθώς και θετική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης Trp12 και των επιπέδων IL-12.

Συνοψίζοντας, δείχθηκε ότι οι χρόνιες λευχαιμίες των LGL κυττάρων παρουσιάζουν υπερέκφραση των ογκογονιδίων Trp12, Gfi1 και Pim1. Έτσι, η προαναφερθείσα πιθανή σχέση αποκλεισμού μεταξύ των Trp12 και Pim1 δεν φαίνεται να ισχύει, ενώ επιβεβαιώνεται η συνεργική σχέση των Pim1 και Gfi1. Ακόμη, η υπερέκφραση του mRNA του Trp12 δεν οφείλεται σε γονιδιακή ενίσχυση, αντίθετα από την αντίστοιχη μελέτη στον καρκίνο του μαστού, πράγμα αναμενόμενο αφού στις λεμφοειδείς νεοπλασίες το φαινόμενο αυτό σπάνια ευθύνεται για την υπερέκφραση ογκογονιδίων. Για την παθογένεια των LGL λευχαιμιών λίγα είναι γνωστά. Πρόκειται για βραδείας εξέλιξης νεοπλασία των CD3 θετικών T/NK-like λεμφοκυττάρων, με συνήθη φαινότυπο CD8+, CD4-, TCR $\alpha\beta$ +, CD16+, CD57+ ή των NK κυττάρων με φαινότυπο CD3-, TCR-, CD2+, CD16+, CD56+. Τα υπό μελέτη γονίδια έχουν πολλά επίπεδα δράσης που μπορούν να συμβάλλουν στην επαγωγή της ογκογένεσης στις παραπάνω νεοπλασίες. Έτσι, τα Trp12 και Pim1 επάγουν την παραγωγή IL-2, ενώ τόσο αυτά

όσο και το Gfi1 μετέχουν στις οδούς διέγερσης των T-λεμφοκυττάρων από την IL-2. Το Trp2 ενδεχομένως εμπλέκεται, μέσω της ενεργοποίησης της JNK και στη διαφοροποίηση των T-λεμφοκυττάρων προς την κατεύθυνση των CD8, ύστερα από επίδραση TNF- α , όπως δείχθηκε στο πειραματικό μοντέλο ανάπτυξης φλεγμονώδους νόσου του εντέρου σε Tnf^{ARE} ποντίκια. Τα αυξημένα επίπεδα IL-12 που βρέθηκαν στον ορό των ασθενών αυτών σχετίζονταν θετικά με την έκφραση του Trp2, που είναι γνωστό ότι ενεργοποιεί την p38 οδό, ενώ οι ίδιοι ασθενείς είχαν και αυξημένα επίπεδα TNF- α . Έτσι, η ουδετεροπενία που παρουσιάζουν οι παραπάνω ασθενείς θα μπορούσε να οφείλεται στη αύξηση παραγωγής TNF- α από τα κύτταρα του κλώνου, με την επίδραση των IL-12 και IL-2 και τη διαμεσολάβηση του Trp2 στην ενεργοποίηση των p38 και ERK οδών αντίστοιχα.

Σε πλέον επιθετικές κακοήθειες των T-λεμφοκυττάρων, όπως η T-προλεμφοκυτταρική λευχαιμία, το περιφερικό T-λέμφωμα και το σύνδρομο Sezary σε προϊούσα φάση βρέθηκε υπερέκφραση μόνο του Pim1, στην ανάπτυξη των οποίων πιθανόν συνεργάζεται με άλλα ογκογονίδια.

Στις B-λεμφοειδείς νεοπλασίες που μελετήθηκαν παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση Trp2 σε ασθενείς με B-ΧΛΛ και σε δύο ασθενείς με λέμφωμα σπληνός της μεθοριακής ζώνης και λέμφωμα μανδύα αντίστοιχα. Στους ίδιους παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση και Pim1. Η συμμετοχή του Pim1 σε λεμφοειδείς νεοπλασίες και ιδίως B-λεμφώματα στον άνθρωπο είναι ήδη γνωστή. Η μοριακή βιολογία της ΧΛΛ είναι ακόμα σε μεγάλο βαθμό άγνωστη. Αρκετές κυτταροκίνες έχουν αντι-αποπτωτική δράση στα κύτταρα της ΧΛΛ και παράγονται και αυτοκρινώς από τα λευχαιμικά κύτταρα. Επίσης, η υπερέκφραση NF- κ B έχει κρίσιμο ρόλο στην επιβίωση των κυττάρων της ΧΛΛ, ενώ η αναστολή της MAPK οδού MKK3/6/p38 ελαττώνει την επιβίωση ΧΛΛ κυττάρων *in vitro*. Η έκφραση της κινάσης ZAP70, που μάλιστα προσδίδει κακή πρόγνωση, επάγεται μέσω Ras/MAPK σε φυσιολογικά T λεμφοκύτταρα, μολονότι ο μηχανισμός ενεργοποίησής της στα κύτταρα της ΧΛΛ δεν είναι ακόμα γνωστός. Τα παραπάνω προσφέρουν ένα πιθανό μηχανισμό συμμετοχής του Trp2 στην ανάπτυξη της ΧΛΛ. Τα αυξημένα επίπεδα TNF- α , INF- γ και IL-12 που βρέθηκαν έχουν αντι-αποπτωτική δράση. Έτσι, το Trp2 μπορεί να επάγει την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF- κ B από διάφορες κυτταροκίνες ή μετά CD40 διέγερση. Ταυτόχρονα διεγείρει, μαζί με το Pim1 την παραγωγή IL-2 από τα λευχαιμικά κύτταρα δημιουργώντας ένα κύκλωμα θετικής ανάδρασης στην παραγωγή και δράση κυτταροκινών.

Για το Gfi1 δε βρέθηκε συμμετοχή σε B-λεμφοειδείς νεοπλασίες, εκτός από μια περίπτωση λεμφώματος σπληνός από κύτταρα της μεθοριακής ζώνης, γεγονός που συμφωνεί με αντίστοιχα πειραματικά δεδομένα.

Τέλος, το λέμφωμα μανδύα, στο οποίο βρέθηκε συμμετοχή κυρίως του Pim1 και σε λιγότερο βαθμό του Trp2, αποτελεί μια καλά μελετημένη πάθηση που χαρακτηρίζεται από την υπερέκφραση της κυκλίνης D1. Στο επιθετικό αυτό λέμφωμα έχει βρεθεί επιπλέον υπερέκφραση του NF- κ B, ενώ σημαντική στην εξέλιξη της νόσου θεωρείται η αναστολή των ρυθμιστικών της G1 φάσης πρωτεϊνών p27^{kip} ή p21^{waf1}. Για το Pim1 υπάρχουν ήδη δεδομένα σχετικά με το ρόλο του στη βλαστοειδή ποικιλία του λεμφώματος μανδύα, ενώ το Trp2, με τις δράσεις που προαναφέρθηκαν (παραγωγή IL-2 και διέγερση NF- κ B) και με την αναστολή της p27^{kip} μπορεί να διαδραματίζει συνδυαστικό ρόλο στο λέμφωμα αυτό.

Συμπερασματικά η υπερέκφραση των ογκογονιδίων Trp2 και Gfi1 μπορεί να συμμετέχει στην ανάπτυξη ορισμένων T, B, αλλά και NK λεμφοειδών νεοπλασιών, σε συνεργασία με άλλα ογκογονίδια όπως το Pim1, επιβεβαιώνοντας έτσι πειραματικά δεδομένα σε ζωικά μοντέλα και ιστικές καλλιέργειες σχετικά με το ρόλο τους στις λεμφοειδείς κακοήθειες.

ABSTRACT

Tpl2 and Gfi1 genes are considerably new members of the cell oncogene family for which we speculate a role in human cancer development as it is already understood that they contribute in the development of lymphoid neoplasms of T-cell origin mostly in animal experimental models.

Specifically, Tpl2 kinase (or MAP3K8) induces T-lymphoblastic lymphoma growth when expressed in transgenic mice rearranged (truncated) at its C-terminus, while overexpression of the wild type protein is also oncogenic. In humans it has been implicated in Hodgkin's lymphoma, in nasopharyngeal cancer and breast cancer. Recently a 3' end mutation was discovered in lung cancer. Its normal function includes participation in T-lymphocyte activation and IL-2 production. It is inhibitory for the cell-cycle regulatory protein p27^{kip} and induces various transcription factors that stimulate cytokine production like IL-2 and promote cell proliferation. Moreover it participates in TNF- α production from macrophages as well as TNF- α and CD40 signaling in macrophages and B-lymphocytes. The truncated kinase seems to be more potent.

Accordingly, the gene that encodes for Gfi1 transcription factor is also a proviral integration site in MoMuLV-induced T-cell lymphomas and confers a partial IL-2 independence in the cell lines derived from these lymphomas. Transgenic mice develop T-cell lymphomas in a low rate which can be substantially increased by the simultaneous expression of c-Myc or Pim. It is also overexpressed in B-cell lymphomas induced by MoMuLV in Emu-myc mice. Its oncogenic potential is associated with progression rather than initiation of the process. It also plays an important role in hematopoiesis regulation. ERK pathway is important for Gfi1 regulation, possibly through the transcription factor AP-1 following TCR activation. Up to date there has been no study in humans addressing its role in hematologic neoplasms and no correlation with the Tpl2 gene which is a MEK/ERK/AP-1 pathway mediator.

Finally, Pim1 kinase belongs, like MAP3K8, in the cytoplasmic serine/threonine kinases and possesses anti-apoptotic and cell proliferation induction properties. Its oncogenic capacity has been confirmed in experimental models as well as in humans, where it has been implicated in B-cell lymphomas, prostate cancer and myeloblastic leukemias. It is important for the manifestation of the anti-apoptotic properties of various cytokines, especially those that activate STAT3. It is considered an oncogene with a role in the initiation of the malignant transformation during which it can co-operate with other oncogenes. Mikkers at al. used insertional mutagenesis with MoMuLV in E μ Myc+/Pim1- mice in order to analyse proviral integration sites and they discovered 9 sites that are associated with mutual exclusion, in other words not co-current integration with Pim1. One of them was the Tpl2 gene which means that concerning oncogenesis Tpl2 should act parallel or downstream of Pim1.

In humans the B-cell malignancies are far more frequent than the T-cell ones, at least in the Western world. Thus, in the present study we included a series of patients with T- and B-cell lymphoid neoplasms (leukemias or lymphomas with a leukemic presentation) aiming in studying: a) Tpl2, Gfi1 and Pim1 expression using semi-quantitative conventional RT-PCR as well as SybrGreen real-time qPCR in peripheral blood lymphomonocytes to explore the possibility of overexpression and to reveal co-operative or mutual exclusion relations b) the possibility of gene amplification of Tpl2 with multiplex PCR based on the results by Sourvinos at al. on human breast cancer and c) TNF- α and IL-2 serum levels by ELISA technique as well as IL-12 and INF- γ levels which are associated with diseases like the LGL-leukemias and B-CLL.

We selected 24 patients from the Hematology clinic of the University Hospital of Heraclion. Twelve suffered from B- and 12 from T-cell lymphoid malignancies. We also included a patient with B-cell lymphocytosis which proved to be of reactive type due to rheumatoid arthritis and 22 healthy volunteers. 18 ml of peripheral blood was drawn from each patient. RNA and DNA were isolated from the peripheral blood mononuclear fraction which was extracted by the ficol-gradient centrifugation method.

Conventional RT-PCR results displayed a low dynamic range in the estimation of relative gene expression, although no different from real-time qPCR in distinguishing samples with overexpression.

Among patients with T-cell lymphoid malignancies 33% had overexpression of Tpl2 up to 5.2 times of mean control expression and all of these were patients with LGL- chronic lymphocytic leukemias. Three of them had co-existent immune neutropenia. The same patients displayed Gfi1 overexpression. Pim1 overexpression was found in 6 out of 12 patients, specifically the T-LGL group plus 3 patients with aggressive T-cell malignancies.

Among patients with B-cell lymphoid malignancies 9 (75%) showed Tpl2 overexpression. These were all the patients with B-CLL plus one patient with splenic lymphoma of marginal cell type, one patient with mantle cell lymphoma and marginally one patient with B-CLL/Richter's transformation. None had Gfi1 overexpression. Moreover, 9 patients had Pim1 overexpression: the CLL patients and patients with mantle cell lymphoma, as well as the patient with lymphoma of marginal cell type.

Two-tailed Spearman's rank order correlation analysis showed interesting relations between the 3 genes: a statistically significant positive correlation of the expression of all three of them in T-cell malignancies and a Tpl2 - Pim1 expression positive correlation in B-cell malignancies. In each case there was no negative correlation between them.

Tpl2 gene load analysis by multiplex PCR in genomic DNA showed no gene amplification in any sample.

Finally, evaluation of IL-2, INF- γ , TNF- α and IL-12 serum levels and correlation with Tpl2_{NORM} (e.g. Tpl2 expression) showed the following results: IL-2 was uncountable in all samples. Patients with T-cell lymphoid malignancies generally and specifically with LGL leukemias had statistically higher TNF- α levels than the control samples, without a statistically significant correlation between Tpl2_{NORM} and TNF- α . They also had higher levels of IL-12 with a positive correlation between Tpl2_{NORM} and IL-12. INF- γ levels were no different between patients and controls, although in the LGL group there were single cases with very high values. Likewise, patients with B-cell lymphoid malignancies had higher TNF- α than the controls without a statistically significant correlation between TNF- α and Tpl2_{NORM}. Among those, patients with mantle cell lymphoma had a trend towards a higher TNF- α level than the rest. Moreover, patients with B-cell lymphoid malignancies had as a whole higher IL-12 and INF- γ levels compared to the controls with no distinguishable group. There was a positive correlation between Tpl2 expression and IL-12 levels.

In summary, we showed that chronic leukemias of the LGL type show overexpression of Tpl2, Gfi1 and Pim1. Thus, the above mentioned mutual exclusion relationship between Tpl2 and Pim1 is not proven, while we confirm the co-operative relationship of Pim1 and Gfi1. Furthermore, Tpl2 mRNA overexpression is not due to gene amplification contrary to the corresponding breast cancer study, which is quite expectable, since this is a rare phenomenon in lymphoid neoplasms. Pathogenesis of the LGL malignancies is not very well understood. They are indolent neoplasms of the CD3 positive T/NK-like lymphocytes usually with a phenotype CD8+, CD4-, TCR $\alpha\beta$ +, CD16+, CD57+ or of the NK cells with CD3-, TCR- , CD2+, CD16+, CD56+ phenotype. The genes in our study function in many levels that could promote oncogenesis in these neoplasms. Thus, Tpl2 and Pim1 induce IL-2 production, while the same genes as well as Gfi1 contribute in IL-2 induced T-lymphocyte activation. Tpl2 may be implicated though JNK activation in the T-cell differentiation towards CD8+ following TNF- α stimulation, as it was shown in the experimental model of inflammatory bowel disease in the Tnf^{ARE} mice. High levels of IL-12 in these patients were positively correlated with Tpl2 expression which is a known p38 pathway activator, while the same patients had also high TNF- α levels. Thus, neutropenia in these patients could be a result of the increased TNF- α production by the malignant cells, resulting from IL-12 and IL-2 stimulation and mediated by p38 and ERK pathway activation by Tpl2 respectively.

In the most aggressive malignancies of T-cells, like T-cell prolymphocytic leukemia, peripheral T-cell lymphoma and Sezary syndrome in progression we only found overexpression of Pim1, which apparently acts in concert with other genes in the malignant process.

In the B-cell lymphoid malignancies that we studied we showed increased Tpl2 expression in patients with B-CLL and in two patients with splenic lymphoma of marginal cell type and mantle cell lymphoma respectively. In the same patients we observed Pim1 overexpression. Pim1 contribution to human lymphoid malignancies, especially B-cell lymphomas is well known. Molecular biology of B-CLL is a provocative issue, since it is still not thoroughly understood. Many cytokines have anti-apoptotic effect in CLL cells and can

also be produced by them. Moreover, NF- κ B overexpression has a critical role in CLL cell survival, while inhibition of MAPK pathway MKK3/6/p38 shortens their survival in vitro. ZAP70 kinase expression, which confers a bad prognosis, is induced through Ras/MAPK in the normal T lymphocytes, although we don't know the mechanism of its activation in the CLL cells. All of the above offer us a possible mechanism of action for the Tpl2 kinase in CLL. Increased levels of TNF- α , INF- γ and IL-12 have an anti-apoptotic effect. Tpl2 can induce NF- κ B activation by various cytokines or by CD40 activation. At the same time Tpl2 along with Pim1 can promote IL-2 production by the leukemic cell, thus creating a positive feedback circuit in cytokine production and activity.

Gfi1 was not induced in B-cell malignancies, apart from a case of splenic lymphoma, which is in accordance with experimental data.

Finally, mantle cell lymphoma, in which we basically found Pim1 and in a lesser degree Tpl2 overexpression, is a well studied disease which is characterized by cyclin D1 overexpression. Overexpression of NF- κ B has also been shown in this aggressive lymphoma, while an important step in disease progression is the inhibition of the G1 regulatory proteins p27^{kip} and p21^{waf1}. There is already data for a Pim1 role in the blastoid variant of the disease, while Tpl2, with its aforementioned activities (IL-2 production, NF- κ B induction) and its inhibitory result on p27^{kip} could play a combinational role in this lymphoma.

In conclusion, Tpl2 and Gfi1 overexpression can contribute in the development of some human T, B and NK lymphoid neoplasms, in collaboration with other oncogenes like Pim1, thus confirming experimental results in animal models and cell cultures concerning their role in lymphoid malignancies.

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ: ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΝΕΟΠΛΑΣΙΕΣ

1. Ορισμός-επιδημιολογία

Οι λεμφοκυτταρικές νεοπλασίες αποτελούν κλωνικά νοσήματα του λεμφικού ιστού που προκύπτουν από ανεξέλεγκτη ανάπτυξη λεμφικών κυττάρων είτε αώρων (λεμφοβλαστών), είτε περισσότερο διαφοροποιημένων. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι οξείες λεμφοβλαστικές λευχαιμίες και τα λεμφοβλαστικά λεμφώματα, ενώ στη δεύτερη οι χρόνιες λεμφοκυτταρικές λευχαιμίες, οι πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες και τα λεμφώματα Hodgkin και non Hodgkin, πλην των λεμφοβλαστικών.

Η ετήσια επίπτωση των non Hodgkin λεμφωμάτων είναι 5% του συνόλου των νέων περιπτώσεων καρκίνου για τους άνδρες και 4% για τις γυναίκες όλων των ηλικιών παγκοσμίως (πηγή GBD2000¹). Για την οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία η επίπτωση είναι αυξημένη στις ηλικίες 2-5 ετών (7.5/100.000), αποτελώντας έτσι την συνηθέστερη νεοπλασία της παιδικής ηλικίας και περίπου επτά φορές χαμηλότερη στους ενήλικες. Η συχνότητα του πολλαπλού μυελώματος, κυριότερου εκπροσώπου των πλασματοκυτταρικών δυσκρασιών, αυξάνει μετά την ηλικία των 50 ετών, από 6,5 έως 47/100.000 στην ηλικιακή ομάδα άνω των 80 ετών (πηγή SEER *Stat2002).

Γενικά, πρόκειται για μια ετερογενή ομάδα νοσημάτων που περιλαμβάνει από παθήσεις με ειδική γεωγραφική κατανομή, όπως η T-Λευχαιμία/Λέμφωμα των ενηλίκων, που ενδημεί στην Ιαπωνία και την Καραϊβική, το ενδημικό λέμφωμα Burkitt που σχετίζεται με λοίμωξη από EBV και απαντάται με μεγάλη συχνότητα στην υπο-σαχάριο Αφρική έως παθήσεις όπως η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία, με 20 νέες περιπτώσεις ανά 100.000 ετησίως σε πληθυσμό άνω των 65 ετών στο Δυτικό κόσμο.

2. Ταξινόμηση

Για πολλά χρόνια η ταξινόμηση των λεμφοκυτταρικών νεοπλασιών βασίστηκε σε ιστολογική-ανοσομορφολογική διάκριση και στον αδρό διαχωρισμό τους ανάλογα με την επιθετική ή όχι κλινική συμπεριφορά τους. Τέτοια συστήματα ταξινόμησης ήταν των Rappaport (1966), Luke-Collins (1974) και Κιέλου (1978). Από αυτά το πλέον επιτυχημένο ήταν το τελευταίο καθώς συνδύαζε την αναγνώριση ανοσομορφολογικών και προγνωστικών υποτύπων. Ωστόσο, κανένα από τα συστήματα αυτά δεν ήταν καθολικά αποδεκτό, πράγμα που δημιούργησε σύγχυση στη διάγνωση και θεραπεία και δυσκολία στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων κλινικών δοκιμών και στην επικοινωνία της διεθνούς αιματο-ογκολογικής κοινότητας. Μια πρώτη απόπειρα ενοποιημένης κατάταξης έγινε με την ταξινόμηση Working Formulation (1982) που ήταν αποτέλεσμα διεθνούς συνεργασίας υπό την επίβλεψη του National Cancer Institute (NCI). Και σε αυτήν όμως έγινε φανερό πως απουσίαζαν συγκεκριμένες κλινικές οντότητες, ενώ κάποια νοσήματα εμφανίζονταν κατακερματισμένα, λόγω ύπαρξης μορφολογικών ποικιλιών². Έτσι, το 1994 η Διεθνής Ομάδα Μελέτης Λεμφωμάτων (International Lymphoma Study Group, ILSG) δημοσίευσε την ταξινόμηση REAL (Revised European American Classification of Lymphoid Neoplasms)³, προϊόν συνεργασίας μιας διεθνούς ομάδας μελέτης, η οποία έγινε η πρώτη κοινής αποδοχής ταξινόμηση των λεμφοκυτταρικών νεοπλασιών. Η νέα αυτή προσέγγιση εμπεριείχε όλες τις αποκτηθείσες πληροφορίες από τη μορφολογία, τον ανοσοφαινότυπο, την κυτταρογενετική και την κλινική εικόνα στην προσπάθεια καθορισμού διακριτών νοσολογικών οντοτήτων. Αποδείχθηκε ότι ήταν σε μεγάλο βαθμό αναπαραγώγιμη και πρακτική. Ένα χρόνο μετά, ξεκίνησε το έργο της τροποποίησης της REAL κατά WHO, με την επίβλεψη της Ευρωπαϊκής Εταιρείας Αιμοπαθολογοανατομίας και της Εταιρείας Αιμοπαθολογοανατομίας στην οποία συμμετείχαν 10 επιτροπές μελέτης νοσημάτων που δημοσίευσαν την τροποποιημένη εκδοχή το 1999⁴. Η ταξινόμηση αυτή έχει γίνει ευρέως αποδεκτή από αιματολόγους, ογκολόγους και παθολογοανατόμους και είναι αυτή που χρησιμοποιείται σήμερα παγκοσμίως, Πίνακας 2.1.

A. B-κυτταρικής αρχής

- B-κυτταρικής αρχής νεοπλάσματα από πρόδρομα κύτταρα
 - B-λεμφοβλαστική λευχαιμία/λέμφωμα
- Ωριμα B-κυτταρικής αρχής νεοπλάσματα
 - B-κυτταρικής αρχής χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία/λέμφωμα από μικρά λεμφοκύτταρα
 - B-κυτταρικής αρχής προλεμφοκυτταρική λευχαιμία
 - Λεμφοπλασματοκυτταρικό λέμφωμα
 - Σπληνικό B-κυτταρικής αρχής λέμφωμα της μεθοριακής ζώνης (+/- λαχνωτά λεμφοκύτταρα)
 - Λευχαιμία εκ τριχωτών κυττάρων
 - Πλασματοκυτταρικό μνέλωμα/μονήρες πλασματοκύττωμα οστού
 - Μονοκλωνική γαμμαπάθεια απροσδιόριστης σημασίας (MGUS)
 - Εξωμυελικό πλασμοκύττωμα
 - Πρωτοπαθής αμυλοείδωση
 - Νόσος βαρέων αλύσεων
 - Εξωαδενικό B-κυτταρικής αρχής λέμφωμα της μεθοριακής ζώνης του τύπου του βλεννογονοσχετιζόμενου λεμφικού ιστού (MALT)
 - Λέμφωμα από κύτταρα της μεθοριακής ζώνης λεμφαδενικού τύπου (+/- B-μονοκυτταροειδή λεμφοκύτταρα)
 - Οζώδες λέμφωμα
 - Λέμφωμα από κύτταρα του μανδύα
 - Διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα B-κύτταρα
 - Πρωτοπαθές λέμφωμα του μεσοθωρακίου από μεγάλα B-κύτταρα
 - Πρωτοπαθές λέμφωμα των ορογόνων χιτώνων από μεγάλα B-κύτταρα
 - Ενδαγγειακό λέμφωμα από μεγάλα B-κύτταρα
 - Λέμφωμα Burkitt/Λευχαιμία Burkitt

B. T-και NK-κυτταρικής αρχής

- T-κυτταρικής αρχής νεοπλάσματα από πρόδρομα κύτταρα
 - T-λεμφοβλαστικό λέμφωμα/ λευχαιμία
- Ωριμα T-κυτταρικής αρχής νεοπλάσματα
 - Διάχυτα/λευχαιμικά
 - T-κυτταρικής αρχής προλεμφοκυτταρική λευχαιμία
 - Λεμφοκυτταρική λευχαιμία από μεγάλα κοκκιώδη λεμφοκύτταρα (LGL)/Χρόνια NK λεμφοκυττάρωση
 - Επιθετική NK Λευχαιμία
 - T-κυτταρικής αρχής λέμφωμα /λευχαιμία ενηλίκου (HTLV1+)
 - Δερματικά
 - Σπογγοειδής μυκητίαση/σ.Szary

- Αναπλαστικό λέμφωμα από μεγάλα κύτταρα (T και null), πρωτοπαθής δερματικός τύπος
- T-δερματικό λέμφωμα παρόμοιο με οζώδη υποδερματίτιδα
- Λεμφωματοειδής θήλωση **
- Άλλα εξωαδενικά
 - Εξωαδενικό NK/T-κυτταρικής αρχής λέμφωμα ρινικού τύπου
 - T-κυτταρικής αρχής λέμφωμα εντέρου τύπου εντεροπάθειας
 - Ηπατοσπληνικό γδ λέμφωμα
- Λεμφαδενικά
 - T-Περιφερικό λέμφωμα (μη ταξινομούμενο)
 - T-Αγγειοανοσοβλαστικό λέμφωμα
 - Αναπλαστικό λέμφωμα από μεγάλα κύτταρα (T και null), πρωτοπαθής συστηματικός τύπος
- Αβέβαιης προέλευσης
 - Βλαστικό NK λέμφωμα

Γ. Λέμφωμα Hodgkin

- Οζώδης λεμφοεπικρατών τύπος
- Κλασικό λέμφωμα Hodgkin
 - Τύπος οζώδους σκλήρυνσης
 - Κλασικός λεμφοεπικρατών τύπος
 - Τύπος μικτής κυτταροβρίθειας
 - Λεμφοπενικός τύπος

*Συνοπτική, χωρίς τις επιμέρους ποικιλίες

**Κλωνική διαταραχή που δεν θεωρείται νεόπλασμα

Στην ταξινόμηση αυτή, όπως και στη REAL η έμφαση δίδεται σε «πραγματικές», καλά τεκμηριωμένες κλινικές οντότητες παρά σε απλή παράθεση ιστολογικών υποτύπων. Τα νεοπλάσματα διακρίνονται καταρχήν σε 3 κατηγορίες: B, T/NK νεοπλασίες και λέμφωμα Hodgkin και κατόπιν οι δύο πρώτες κατηγορίες χωρίζονται σε νεοπλασίες που αποτελούνται από προγονικά (άωρα) κύτταρα και σε νεοπλασίες που αποτελούνται από διαφοροποιημένα κύτταρα. Συμπεριλαμβάνονται δε τόσο λεμφώματα όσο και λευχαιμίες, αφού συμπαγείς όγκοι και κυκλοφορούντα κακοήθη κύτταρα συνυπάρχουν σε πολλές περιπτώσεις, κάνοντας τη διάκρισή τους τεχνητή. Επιπλέον, στην ταξινόμηση WHO αποφεύχθηκε η κλινική κατάταξη των νοσημάτων ανάλογα με την πρόγνωσή τους και προτιμήθηκε η κατάταξη ανάλογα με την εντόπιση. Έτσι, οι B και T/NK νεοπλασίες διακρίνονται σε διάχυτες/ λευχαιμικές, σε πρωτοπαθώς εξωαδενικές και σε κατεξοχήν λεμφαδενικές.

Όσον αφορά στην διάκριση κλινικών κατηγοριών με προγνωστική αξία οι Hiddemann και συν⁶, ύστερα από διεθνή αλλά ανεπίσημη συνεργατική μελέτη πρότειναν το 1996 ένα σχήμα κλινικής ταξινόμησης βασισμένο στην ταξινόμηση REAL. Σύμφωνα με αυτό τα λεμφοειδή νεοπλάσματα ταξινομήθηκαν σε τρεις κατηγορίες: τα βραδείας εξέλιξης, τα επιθετικά και τα πολύ επιθετικά, Πίνακας 2.2.

Πίνακας 2.2. Κλινική ταξινόμηση των λεμφοειδών νεοπλασμάτων^a

A. B-κυτταρικής αρχής

- Βραδείας εξέλιξης (χαμηλού κινδύνου)
 - Χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία/λέμφωμα από μικρά λεμφοκύτταρα
 - Λεμφοπλασματοκυτταρικό λέμφωμα/μακροσφαιριναιμία του Waldenström
 - Λευχαιμία εκ τριχωτών κυττάρων
 - Λέμφωμα από κύτταρα της μεθοριακής ζώνης
Λεμφαδενικό: Μονοκυτταροειδές B λέμφωμα
Εξωαδενικό: MALT λέμφωμα
Σπλην/περιφερικό αίμα: σπληνικό λέμφωμα με λαχνωτά λεμφοκύτταρα ή σπληνικό λέμφωμα από κύτταρα της μεθοριακής ζώνης
 - Οζώδες λέμφωμα grade I και II
 - Λέμφωμα μανδύα, τύπος μανδύα
- Επιθετικά (ενδιάμεσου κινδύνου)
 - B-προλεμφοκυτταρική λευχαιμία
 - Λέμφωμα μανδύα (διάχυτος, οζώδης και βλαστικός τύπος)
 - Οζώδες λέμφωμα grade III
 - Διάχυτο από μεγάλα B-κύτταρα λέμφωμα
 - Πρωτοπαθές λέμφωμα του μεσοθωρακίου από μεγάλα B-κύτταρα
 - Πλασματοκύτταμα/πολλαπλόν μυέλωμα
- Πολύ επιθετικά (υψηλού κινδύνου)
 - Οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία από προγονικά B κύτταρα/B λεμφοβλαστικό λέμφωμα
 - Λέμφωμα Burkitt/B-ΟΛΛ
 - Πλασματοκυτταρική λευχαιμία

B. T/NK-κυτταρικής αρχής

- Βραδείας εξέλιξης (χαμηλού κινδύνου)
 - Λευχαιμία από μεγάλα κοκκιώδη λεμφοκύτταρα (LGL)/Χρόνια NK λεμφοκυττάρωση
 - Σπογγοειδής μυκητίαση/σ.Sezary
 - Έρπων και τύπος χρόνιας λευχαιμίας T- λέμφωμα /λευχαιμία ενηλίκου
- Επιθετικά (ενδιάμεσου κινδύνου)
 - T- προλεμφοκυτταρική λευχαιμία

- Περιφερικό T-λέμφωμα
 - Αγγειοκεντρικό ρινοκολπικό
 - Αγγειοανοσοβλαστικό λέμφωμα
 - T-κυτταρικό λέμφωμα εντέρου
 - Αναπλαστικό λέμφωμα από μεγάλα κύτταρα (T και Null τύπου)
- Πολύ επιθετικά (υψηλού κινδύνου)
- T-Λέμφωμα/λευχαιμία ενηλίκου
 - T λεμφοβλαστικό λέμφωμα/οξεία T λεμφοβλαστική λευχαιμία
-

^aΠολλές από τις νοσολ.οντότητες ήταν προσωρινές καταχωρήσεις στην ταξινόμηση REAL.

3. Παθοφυσιολογία

3.1. Ιστογένεση

Η ιστογένεση των λεμφοκυτταρικών κακοηθειών μπορεί να προσεγγισθεί εντοπίζοντας το ακριβές φυσιολογικό κυτταρικό ανάλογο των κυττάρων που απαρτίζουν τον κακοήθη κλώνο. Τα νεοπλάσματα αυτά προκύπτουν από την κλωνική ανάπτυξη B, T ή NK κυττάρων, τα οποία «πάγωσαν» σε ένα συγκεκριμένο στάδιο της ανάπτυξής τους. Είναι επόμενο πως το κύτταρο προέλευσης επηρεάζει τη βιολογική συμπεριφορά του όγκου, αφού λιγότερο διαφοροποιημένα κύτταρα έχουν μεγαλύτερη πολλαπλασιαστική ικανότητα και κατά συνέπεια πιο κακοήθη συμπεριφορά. Με την εξαίρεση της Άπω Ανατολής και της Καραϊβικής, στα περισσότερα σημεία του κόσμου οι κακοήθειες των B-λεμφοκυττάρων αντιπροσωπεύουν το 85% όλων των λεμφοκυτταρικών κακοηθειών⁷.

3.1.1. Ιστογένεση B λεμφοκυττάρων

Η ανάπτυξη των B λεμφοκυττάρων είναι αποτέλεσμα μιας πολυσταδιακής διαδικασίας διαφοροποίησης της οποίας το πρώτο μέρος συμβαίνει στο μυελό των οστών και είναι ανεξάρτητο από την παρουσία αντιγόνου, ενώ το δεύτερο στα δευτερογενή λεμφικά όργανα, που είναι ο σπλήνας, οι λεμφαδένες και ο βλεννογονοσχετιζόμενος λεμφικός ιστός, και είναι αντιγόνο-εξαρτώμενο, Εικόνα 3.1.

Το κοινό προγονικό κύτταρο της λεμφικής σειράς (ΚΠΛ), με φαινότυπο αντιγόνων επιφανείας CD34+/CD10+/CD45RA+/Lin^{-8;9}, διαφοροποιείται στο μυελό των οστών είτε σε πρόιμο B κύτταρο ή σε T/NK/DS τριδύναμο κύτταρο. Στη συνέχεια τα δεύτερα μεταναστεύουν και εγκαθίστανται στο θύμο όπου υφίστανται

περαιτέρω διαφοροποίηση¹⁰. Τα **πρώιμα B** κύτταρα έχουν μεν τον ίδιο φαινότυπο αντιγόνων επιφανείας με τα ΚΠΛ, ωστόσο η έναρξη της διαφοροποίησης σε αυτά σηματοδοτείται από την έναρξη του ανασυνδυασμού του γονιδιακού τόπου των βαριών αλύσων (DJ_H)¹¹. Επόμενο στη διαφοροποίηση είναι το **προ-προ B** κύτταρο, το οποίο εκφράζει CD34, CD10, CD19 και συνήθως και TdT, ενώ έχει ολοκληρώσει και τον ανασυνδυασμό των βαριών αλύσων με τον ανασυνδυασμό των τμημάτων V-D-J_H¹². Προ-προ B κύτταρα τα οποία αποτυγχάνουν να ολοκληρώσουν τον ανασυνδυασμό αυτό εξαλείφονται με απόπτωση. Ακολουθεί η διαφοροποίηση σε **προ-B** κύτταρο με απώλεια των CD34 και TdT και έκφραση κυτταροπλασματικής μ βαριάς αλύσου¹³. Η ομάδα των προ-B κυττάρων, χωρίζεται σε μεγάλα, πολλαπλασιαζόμενα **προ-B1** και μικρά ή προ-BII. Τα **προ-BII** είναι αυτά στα οποία γίνεται ο ανασυνδυασμός των τομέων V-J του γονιδιακού τόπου των ελαφρών αλύσων, ο οποίος ξεκινά από τις κ αλύσους και αν δεν επιτύχει προχωρά σε ανασυνδυασμό των λ αλύσων. Η ελαφρά αλύσος που παράγεται συνδυάζεται με τη βαριά μ αλύσο και η ολοκληρωμένη ανοσοσφαιρίνη IgM εκφράζεται στην επιφάνεια των κυττάρων που ονομάζονται πλέον **άωρα B λεμφοκύτταρα**. Τα άωρα B λεμφοκύτταρα εγκαταλείπουν τον μυελό και με εναλλακτικό μάτισμα (alternative splicing) του RNA συνθέτουν και IgD ανοσοσφαιρίνη που διαφέρει από την IgM μόνο κατά τον σταθερό τομέα C_δ (έχοντας τον ίδιο VDJ_H ανασυνδυασμό) και συνεκφράζουν τις ανοσοσφαιρίνες αυτές στην επιφάνειά τους, ως υποδοχείς αντιγόνων¹⁴. Η μεμβρανική ανοσοσφαιρίνη σχηματίζει σύμπλεγμα με το ετεροδιμερές CD79a/CD79b με το οποίο συναποτελούν τον υποδοχέα BCR. Εάν αντίθετα η διαδικασία της έκφρασης ενός λειτουργικού ανοσοσφαιρινικού υποδοχέα αποτύχει, τα κύτταρα εξαλείφονται με ενδομυελική απόπτωση. Τα sIgM+/sIgD+ κύτταρα είναι **τα ώριμα, παρθένα B λεμφοκύτταρα** που κυκλοφορούν στο αίμα και αποικίζουν τους περιφερικούς λεμφαδένες και το σπλήνα.

Τα παραπάνω ισχύουν για την μετα-εμβρυική ζωή, διότι στο έμβρυο η κύρια θέση λεμφοποίησης είναι το εμβρυικό ήπαρ και σπλην. Πιστεύεται ότι τα B λεμφοκύτταρα που παράγονται κατά την εμβρυϊκή ζωή, τα οποία καλούνται **B1 ή CD5 B-κύτταρα** είναι διαφορετικά από αυτά που παράγονται μετά τη γέννηση από το μυελό των οστών (B2)¹⁵. Τα κύτταρα αυτά εκφράζουν υψηλά επίπεδα IgM και χαμηλά IgD, εκκρίνουν κυρίως IgM, έχουν χαμηλή συχνότητα σωματικών υπερμεταλλάξεων και γι'αυτό παράγουν αντισώματα με ευρύ φάσμα αλλά ελαττωμένη ένταση σύνδεσης και εκφράζουν το αντιγόνο CD5 στην επιφάνειά τους. Η υπο-ομάδα αυτή μετά τη γέννηση αποτελεί το 5-15% του πληθυσμού των περιφερικών B λεμφοκυττάρων και εντοπίζονται στην περιοχή του λεμφοζιδιακού

μανδύα. Το αντιγόνο CD5 εκφράζεται και από πολλά αυτοαντιδρώντα B λεμφοκύτταρα, ενώ πιθανολογείται πως τα B1 κύτταρα αποτελούν τις προβαθμίδες των δύο CD5+ λεμφοϋπερπλαστικών νόσων, δηλαδή της ΧΛΛ και του λεμφώματος μανδύα¹⁶.

Τα παρθένα B λεμφοκύτταρα εισέρχονται στην φλοιώδη ουσία των λεμφαδένων όπου έρχονται σε επαφή με αντιγόνα και με τη βοήθεια ενεργοποιημένων T4 λεμφοκυττάρων διεγείρονται και μέρος αυτών διαφοροποιείται στα **βραχύβια πλασματοκύτταρα**, που εκκρίνουν IgM (πρωτογενής ανοσολογική απάντηση). Τα βραχύβια πλασματοκύτταρα αν δεν υποστούν δεύτερο αντιγονικό ερεθισμό πεθαίνουν με απόπτωση σε λίγες ημέρες¹⁷. Τα υπόλοιπα από τα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα μεταναστεύουν στα πρωτογενή λεμφοζίδια του φλοιού, όπου, εάν έρθουν εκ νέου σε επαφή με το ίδιο αντιγόνο που παρουσιάζεται από τα λεμφοζιδιακά δενδριτικά κύτταρα παρουσία T4 λεμφοκυττάρων, οδηγούνται στη φάση της δευτερογενούς ανοσολογικής απάντησης, κατά τη διάρκεια της οποίας τα πρωτογενή λεμφοζίδια μεταμορφώνονται σε δευτερογενή λεμφοζίδια που περιέχουν βλαστικό κέντρο. Μέσα στο βλαστικό κέντρο τα λεμφοκύτταρα διεγείρονται από τη σύνδεσή τους με το αντιγόνο προς πολλαπλασιασμό (**κεντροβλάστες**) και διαφοροποίηση. Κατά τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού συμβαίνουν με μεγάλη συχνότητα σωματικές μεταλλάξεις (σωματική υπερμετάλλαξη) στους μεταβλητούς τομείς των γόνων των ανοσοσφαιρινών με τις οποίες το μόριο της ανοσοσφαιρίνης τροποποιείται ώστε να παράγεται αντίσωμα υψηλής συγγένειας προς το αντιγόνο (affinity maturation), καθώς επίσης και αλλαγή Ig τάξης (Ig-class switching) με αλλαγή της τάξης της βαριάς αλύσου σε γ, α ή ε. Τα διαφοροποιημένα, μη-διαιρούμενα λεμφοκύτταρα που παράγονται μετακινούνται περιφερικότερα, στην περιοχή του μανδύα και λέγονται κεντροκύτταρα. Τα **κεντροκύτταρα** υφίστανται κλωνική επιλογή¹⁸ και, αν δεν υποστούν αποπτωτικό θάνατο, γεγονός αντιστρόφως ανάλογο με την ειδικότητα του Ig υποδοχέα τους και την έκφραση bcl-2, ωριμάζουν και διαφοροποιούνται είτε σε **κύτταρα μνήμης** - που παραμένουν στην περιοχή του μανδύα ή επανακυκλοφορούν - είτε σε **πλασμαβλάστες**¹⁹. Οι πλασμαβλάστες μεταναστεύουν στον μυελό των οστών ή στη μυελώδη μοίρα των λεμφαδένων όπου υφίστανται την τελική διαφοροποίηση σε **πλασματοκύτταρα**, τα οποία αποτελούν την κύρια πηγή παραγωγής αντισωμάτων και έχουν διάρκεια ζωής περίπου ένα μήνα².

3.1.2. Προέλευση Β-Λεμφοκυτταρικών νεοπλασιών

Η μελέτη των γονιδιακών ανασυνδυασμών στη σύνθεση της ανοσοσφαιρίνης (όπως και του υποδοχέα του T-λεμφοκυττάρου) αποτελεί σήμερα μια από τις πιο ενδιαφέρουσες παραμέτρους στη διερεύνηση των λεμφοϋπερπλαστικών νόσων. Σε συνδυασμό με τη μελέτη των δεικτών επιφανείας με κυτταρομετρία ροής ή ανοσοϊστοχημεία γίνεται δυνατή η αναγνώριση, ως ένα βαθμό, του κυττάρου προέλευσης των νοσημάτων αυτών, εάν και σε αρκετές περιπτώσεις η ανώμαλη γονιδιακή τους έκφραση δημιουργεί παραλλαγές στο φαινότυπο. Έτσι, οι λεμφοκυτταρικές νεοπλασίες της Β σειράς ταξινομούνται αδρά σε 2 ιστογενετικές κατηγορίες ανάλογα με την προ- ή μετα- λεμφοζιδιακή προέλευση των κυττάρων τους και κατά συνέπεια την παρουσία αμετάλλακτων ή μεταλλαγμένων γόνων ανοσοσφαιρινών¹⁶. Η εικόνα 3.1. συνοψίζει τα στάδια ανάπτυξης των Β λεμφοκυττάρων και την αντιστοίχιση των λεμφοκυτταρικών νεοπλασιών με το πιθανό κύτταρο προέλευσής τους.

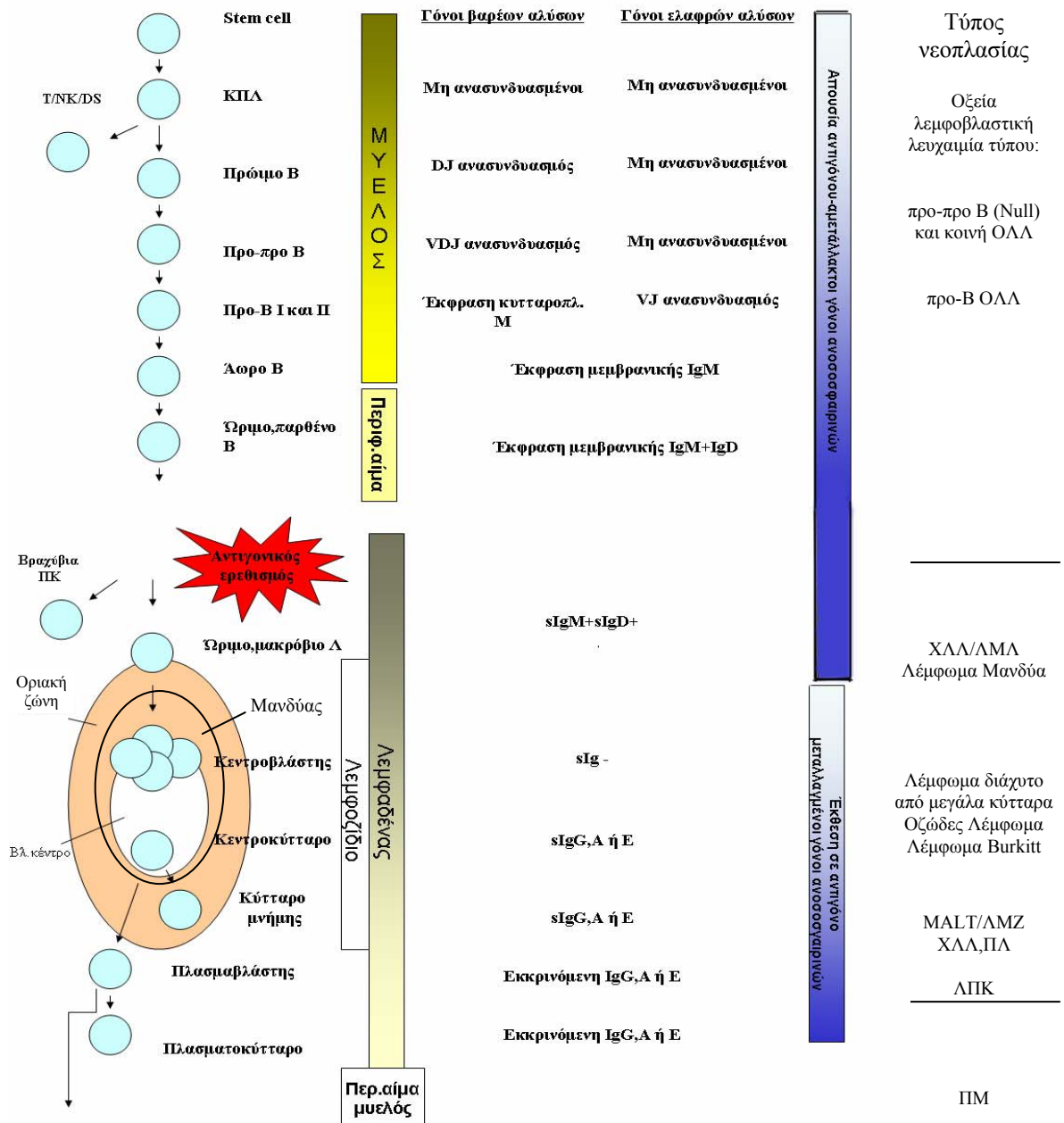
Ιστολογική προέλευση της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας

Η Β-κυτταρικής αρχής χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (Β-ΧΛΛ ή ΧΛΛ) και το λέμφωμα από μικρά Β-λεμφοκύτταρα ταξινομούνται μαζί στην WHO ταξινόμηση αφού θεωρούνται το λευχαιμικό και λεμφαδενικό ανάλογο της ίδιας νόσου⁵. Η Β-ΧΛΛ είναι το συχνότερο είδος λευχαιμίας των ενηλίκων στο δυτικό κόσμο. Σε λιγότερο από 1% των περιπτώσεων προέρχεται από T λεμφοκύτταρα. Αποτελεί μια βραδείας εξέλιξης νόσο με επιβίωση που ποικίλει από 2-3 έτη σε περιπτώσεις με κακούς προγνωστικούς παράγοντες, έως πάνω από 20 έτη. Ο επιφανειακός ανοσοφαινότυπος της Β-ΧΛΛ είναι χαρακτηριστικός και την ξεχωρίζει εύκολα από τα άλλα νοσήματα της κατηγορίας: CD19+, CD20 ασθενώς +, CD23+, CD5+, CD10-, CD22-, FMC7-, sIgM+D ασθενώς θετικά με κ > λ μονοκλωνικότητα. Αρχικά πιστευόταν πως όλες οι περιπτώσεις προέρχονταν από ένα ώριμο, παρθένο Β λεμφοκύτταρο που δεν έχει έρθει σε επαφή με αντιγόνο και δε φέρει σωματικές υπερμεταλλάξεις, προερχόμενο από τον CD5+ πληθυσμό των κυττάρων του μανδύα. Πρόσφατες μελέτες συνέβαλαν στην περαιτέρω κατανόηση της ιστογένεσης της νόσου και τον καθορισμό υποτύπων με κλινική σημασία. Βρέθηκε ότι το 50% περίπου των περιπτώσεων ΧΛΛ φέρουν μεταλλάξεις των Ig και/ή του BCL6 (μεταγραφικός αναστολέας που εκφράζεται φυσιολογικά μόνο από τα κύτταρα του βλαστικού κέντρου) και προέρχονται από λεμφοζιδιακά κύτταρα που έχουν υποστεί

αντιγονικό ερεθισμό. Οι περιπτώσεις αυτές συνδέονται σαφώς με πιο ευνοϊκή πρόγνωση²⁰. Στη συνέχεια πιο εύχρηστοι δείκτες συσχετίστηκαν με την μεταλλακτική κατάσταση της νόσου. Έτσι, το επιφανειακό αντιγόνο CD38²¹ και η κυτταροπλασματική κινάση Zap70²² αντικατοπτρίζουν ως ένα βαθμό το μεταλλακτικό υπότυπο της νόσου αφού είναι αυξημένα σε αμετάλλακτη νόσο και συνδέονται με χαμηλότερη επιβίωση. Περαιτέρω προσπάθεια διάκρισης των 2 τύπων της νόσου με ανίχνευση του γονιδιακού τους προφίλ με microarrays δεν έδωσε σαφή αποτελέσματα²³.

Ιστολογική προέλευση του λεμφώματος μανδύα

Το λέμφωμα από κύτταρα μανδύα (ΛΜ) είναι ένα επαρκώς χαρακτηρισμένο επιθετικό B-λέμφωμα με συχνότητα 6% μεταξύ των λεμφοειδών νεοπλασιών και μέση επιβίωση 3 με 4 έτη²⁴. Έχει τη χειρότερη πρόγνωση μεταξύ των λεμφωμάτων διότι δεν υπάρχει ακόμα ικανοποιητική θεραπεία. Το κύτταρο προέλευσης φαίνεται πως είναι ένα προλεμφοζιδιακό ώριμο, παρθένο λεμφοκύτταρο με αμετάλλακτους γόνους ανοσοσφαιρινών που ομοιάζει με τα CD5+ κύτταρα της ζώνης του μανδύα. Ο ανοσοφαινότυπος επιφανείας των κυττάρων του ΛΜ είναι CD19+, CD20+, CD5+, CD10-, CD23-, CD22+, FMC7+, sIgM+ εντονότερο από sIgD, λ μονοκλωνικότητα συχνότερη από κ.



Εικόνα 3.1. Ο κύκλος ζωής των B λεμφοκυττάρων και η αντιστοίχιση με τα κυριότερα νεοπλάσματα της B σειράς. Στη δεξιά στήλη δίδεται η αντιστοίχιση λεμφοκυτταρικών κακοηθειών για τις οποίες υπάρχουν τεκμηριωμένες αποδείξεις όσον αφορά στο κύτταρο προέλευσής τους. Η αντιστοίχιση αυτή δεν είναι απόλυτη αλλά αφορά τις συχνότερες κλινικές οντότητες, καθόσον υπάρχουν παραλλαγές των νοσημάτων, πχ. το ΔΠΚ μπορεί να προέρχεται από το βραχύβιο IgM-παραγωγό πλασματοκύτταρο. Stem cell: αρχέγονο προγονικό αιμοποιητικό κύτταρο, DS: Δενδριτικά κύτταρα, ΠΚ: Πλασματοκύτταρα, ΑΜΛ: Λέμφωμα από μικρά λεμφοκύτταρα, ΑΜΖ: Λέμφωμα από κύτταρα της μεθοριακής ζώνης, ΔΠΚ: Λεμφοπλασματοκυτταρικό Λέμφωμα, ΠΛ: Προλεμφοκυτταρική λευχαιμία, ΠΜ: Πολλαπλούν μυέλωμα.

3.1.3. Ιστογένεση T και NK Λεμφοκυττάρων

Η πρώτη φάση της διαφοροποίησης των T λεμφοκυττάρων ξεκινά, όπως και στην περίπτωση των B, από τα πρωτογενή λεμφικά όργανα και είναι ανεξάρτητη από αντιγονικά ερεθίσματα. Από τα ΚΠΛ κύτταρα του μυελού ή του εμβρυϊκού ήπατος προέρχεται το τριδύναμο προγονικό κύτταρο T/NK/DS που μεταναστεύει στη φλοιώδη μοίρα του θύμου αδένου, Εικόνα 3.2. Ωστόσο, και τα ίδια τα ΚΠΛ φαίνεται πως μπορούν να μεταναστεύουν στο θύμο¹⁰. Το προγονικό αυτό κύτταρο εκφράζει TdT, CD44, CD117 και CD7. Στη συνέχεια, ωριμάζει σε **προ-προ θυμοκύτταρο**, εκφράζοντας παράλληλα CD25²⁵. Τα προ-προ T με την επίδραση κυτταροκινών του στρώματος πολλαπλασιάζονται ταχέως και αρχίζουν τον ανασυνδυασμό των γονιδιακών τόπων των γ , β και δ -αλύσων του TCR (T cell receptor, υποδοχέας του T κυττάρου), αποτελώντας τα πρώτα δεσμευμένα κύτταρα της T σειράς. Κατά τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού το κύτταρο μετατρέπεται σε **πρώιμο προ-θυμοκύτταρο**, με μείωση της έκφρασης CD44 και CD117, έκφραση του αντιγόνου Thy-1 και ολοκλήρωση του ανασυνδυασμού των γονιδιακών τόπων των γ , β και δ -αλύσων. Στο στάδιο αυτό γίνεται η σύνθεση του pre-TCR, που είναι μεμβρανικό σύμπλεγμα του ανασυνδυασμένου TCR- β με την πρωτεΐνη pre-Ta²⁶ ή του TCR1 που αποτελείται από γ - δ αλύσους. Ο ασύμμετρος υποδοχέας pre-TCR φαίνεται πως επιτρέπει την επιλογή για επιβίωση των κυττάρων με ανασυνδυασμένη β αλυσίδα, ώστε να υπάρχουν αρκετά κύτταρα για να προχωρήσουν σε ανασυνδυασμούς της α -αλύσου, οι οποίοι οδηγούν σε πολύ μεγαλύτερη ποικιλία. Αυτό γίνεται με την σύνδεση του pre-TCR με ενδοθυμικούς προσδέτες. Επόμενο στη διαφοροποίηση είναι το **ώριμο προ-θυμοκύτταρο**, το οποίο είναι CD25-, CD3+, pre-TCR+ και έχει αρχίσει τον ανασυνδυασμό και της α -αλύσου. Η α -άλυσος αντικαθιστά την pre-Ta και σχηματίζει τον ώριμο υποδοχέα TCR $\alpha\beta$ (TCR2) που εκφράζεται στον επόμενο πληθυσμό των **διπλά θετικών (DP) ή σταδίου II** κυττάρων CD4+/CD8+. Αν ο ανασυνδυασμός αποτύχει το κύτταρο πεθαίνει με απόπτωση. Σε αντίθεση με τους γόνους των ανοσοσφαιρινών, οι γόνιμοι του TCR δεν υφίστανται σωματικές μεταλλάξεις. Ο υποδοχέας TCR σχηματίζει σύμπλεγμα στην επιφάνεια των λεμφοκυττάρων με το αντιγόνο CD3. Αλληλεπίδραση του TCR $\alpha\beta$ /CD3 με συμπλέγματα πεπτιδίων/MHC στην επιφάνεια επιθηλιακών κυττάρων του στρώματος και μακροφάγων/δενδριτικών κυττάρων διεγείρει τη διαφοροποίηση του διπλά θετικού θυμοκυττάρου σε CD4+ βοηθητικό ή σε CD8+ κυτταροτοξικό/κατασταλτικό **ώριμο, παρθένο T-λεμφοκύτταρο ή σταδίου III**, το οποίο εμφανίζει ειδικότητα τόσο όσο προς τα αντιγόνα MHC όσο και ως προς τα παρουσιαζόμενα πεπτίδια. Κατά

τη διάρκεια αυτής της αλληλεπίδρασης γίνεται θετική και αρνητική επιλογή των T λεμφοκυττάρων. Με τη θετική επιλογή, επιλέγονται οι κλώνοι που αναγνωρίζουν και συνδέουν τα αυτόλογα MHC τάξης I ή II αντιγόνα, ενώ οι υπόλοιποι κλώνοι αποπίπτουν (MHC restriction)²⁷. Με την αρνητική επιλογή προγραμματίζονται για απόπτωση οι κλώνοι που έχουν πολύ υψηλή συγγένεια με τα MHC Ag ή με συμπλέγματα αυτολόγων MHC με αυτοαντιγόνα, ώστε να αποφεύγονται φαινόμενα αυτοανοσίας (self-tolerance)²⁸, Εικόνα 3.3. Μόνο το 1-5% των λεμφοκυττάρων επιβιώνουν από τη διπλή διαδικασία επιλογής!²⁹ Τα ώριμα λεμφοκύτταρα παράγονται στη μυελώδη μοίρα του θύμου, την οποία εγκαταλείπουν και εισέρχονται στην κυκλοφορία όπου περιπολούν σε όλο τον οργανισμό για αλλοαντιγόνα ή και αυτόλογα αλλοιωμένα αντιγόνα και αποικίζουν το σπλήνα και τους λεμφαδένες. Η πλειονότητά τους παράγεται στη διάρκεια της εμβρυϊκής και της παιδικής ηλικίας. Έχουν μεγάλη διάρκεια ζωής, με επιβίωση ίσως ίση με την επιβίωση του οργανισμού³⁰.

Τα περιφερικά ώριμα, παρθένα αβ T λεμφοκύτταρα (CD45RA θετικά), αναγνωρίζουν αντιγόνα που παρουσιάζονται από αντιγονο-παρουσιαστικά κύτταρα (APCs), όπως τα B λεμφοκύτταρα, τα δενδριτικά κύτταρα και τα μακροφάγα, οπότε πολλαπλασιάζονται και ωριμάζουν σε «επιδραστικά» κύτταρα (effector cells)²⁵. Αυτό γίνεται με αλληλεπίδραση του συμπλέγματος του υποδοχέα TCR/CD3 με το σύμπλεγμα αντιγόνου/MHC στην επιφάνεια του APC. Η μεταγωγή σήματος κατά την ενεργοποίηση του TCR τροποποιείται από διάφορα μόρια συν-διέγερσης. Έτσι, οι μεμβρανικές πρωτεΐνες CD28 και CD40L που εκφράζονται από τα T-λεμφοκύτταρα, συνδέονται με μέλη της οικογένειας του B7 ή με το CD40 αντίστοιχα στην επιφάνεια των APCs και ενισχύουν την ανοσολογική απάντηση. Τα CD4+ αλληλεπιδρούν με αντιγόνα MHC τάξης II, ενώ τα CD8+ με MHC τάξης I. Τα επιδραστικά CD4+ λεμφοκύτταρα διακρίνονται στα Th0 και στα διαφοροποιημένα Th1, Th2 και Th3 που χαρακτηρίζονται από το είδος των κυτταροκινών που παράγουν³¹. Έτσι τα Th1 παράγουν τις προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες ιντερλευκίνη (IL)-2, ιντερφερόνη (IFN)- γ και TNF- α και διεγείρουν τα μακροφάγα και την άμυνα έναντι ιών, τα Th2 παράγουν IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 και IL-13 και διεγείρουν την παραγωγή αντισώματος, ενώ τα Th3 παράγουν TGF και ενισχύουν την παραγωγή IgA. Για την Th1 διαφοροποίηση είναι απαραίτητη η ενεργοποίηση της οδού p38/JNK^{32;33} (βλέπε Κεφ.3.2.2/MAP κινάσες). Παρουσία IL-4 στο μικροπεριβάλλον προάγει τη διαφοροποίηση σε Th2, ενώ η παρουσία IL-12 και IFN- γ σε Th1. Η δραστηριότητα των CD4+ λεμφοκυττάρων εκδηλώνεται δια μέσου της έκκρισης κυτταροκινών και της ενεργοποίησης των B-λεμφοκυττάρων στους λεμφαδένες για παραγωγή

αντισωμάτων αλλά και της υποβοήθησης της ενεργοποίησης των **CD8+**. Τα τελευταία, αφού ενεργοποιηθούν, προκαλούν λύση αλλογενών ως προς το MHC I-κυττάρων ή αυτολόγων κυττάρων τα οποία εκφράζουν πεπτίδια ξένων αντιγόνων σε συνδυασμό με MHC I στην επιφάνειά τους ή αλλοιωμένων αυτολόγων κυττάρων. Αυτό επιτυγχάνεται με την παραγωγή και απελευθέρωση κυτταρολυτικών πρωτεϊνών (περφορίνη, γρανένζυμα-granzymes) και σε μικρότερο βαθμό με την έκφραση FasL³⁴. Η κύρια δράση τους είναι η εξουδετέρωση ιών. Μετά την εκδήλωση της ανοσολογικής απάντησης, τα περισσότερα από τα ενεργοποιημένα κύτταρα αποπίπτουν με μηχανισμό Fas-FasL (activation-induced cell death), αλλά μέρος τους μετατρέπεται σε **κύτταρα μνήμης** που κατακρατούνται στα λεμφικά όργανα και χαρακτηρίζονται από αυξημένη ευαισθησία στα αντίστοιχα αντιγόνα³⁰. Τα κύτταρα μνήμης είναι CD45RO θετικά.

Ας σημειωθεί ότι στον άνθρωπο ένα μικρό μέρος (5%) των T λεμφοκυττάρων εκφράζουν **TCR γδ**³⁵. Ο TCR γδ σχηματίζει και αυτός σύμπλεγμα με το CD3. Τα ώριμα γδ λεμφοκύτταρα είναι κυρίως διπλά αρνητικά, αλλά ένας υποπληθυσμός τους είναι CD8+. Δεν πολλαπλασιάζονται σε μεγάλο αριθμό στο θύμο, ωστόσο μπορούν να πολλαπλασιαστούν στην περιφέρεια μετά από διέγερση του TCR. Εντοπίζονται κυρίως σε εξωαδενικές θέσεις, όπως τα επιθήλια και οι βλεννογόνοι και κινητοποιούνται ταχέως κατά τη μικροβιακή φλεγμονή. Τα κύτταρα αυτά διαφέρουν από τα TCR αβ κατά το ότι δεν είναι MHC-εξαρτώμενα και μπορούν να αναγνωρίζουν πρωτεϊνικά πεπτίδια και μη πρωτεϊνικά αντιγόνα βακτηρίων και άλλων παθογόνων τόσο με MHC-εξαρτώμενο όσο και με MHC-ανεξάρτητο μηχανισμό, χωρίς τη μεσολάβηση αντιγονο-παρουσιαστικών κυττάρων. Ακόμη, έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν μη τροποποιημένα αντιγόνα (πλήρεις πρωτεΐνες), να συμμετέχουν στη ρύθμιση της πρώιμης ανοσολογικής απάντησης με έκκριση κυττοκινών όπως IL-4 και να εκδηλώνουν κυτταροτοξικότητα³⁶.

Τα φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα **NK** (Natural killers) αναπτύσσονται πιθανόν από το αρχέγονο τριδύναμο κύτταρο T/NK/DS κυρίως στο μυελό των οστών³⁷. Το τρέχον μοντέλο της οντογένεσης των NK κυττάρων περιλαμβάνει τρία στάδια³⁸. Αρχικά το πολυδύναμο αιμοποιητικό κύτταρο δεσμεύεται προς την NK-σειρά με την επίδραση του SCF και του Flt3 συνδέτη. Στη συνέχεια το κύτταρο διαφοροποιείται με την επίδραση IL-15 σε **άωρο NK** που ωριμάζει τελικά εκφράζοντας τους υποδοχείς διέγερσης NKR-P1 και τους MHC-εξαρτώμενους ανασταλτικούς υποδοχείς (KIR, Killer Inhibitory Receptors). Οι τελευταίοι ασκούν ανασταλτική επίδραση στα NK κύτταρα εφόσον προσδεθούν σε συγκεκριμένα MHC τάξης I αντιγόνα, ενώ το αντίθετο συμβαίνει όταν τα αντιγόνα αυτά απουσιάζουν.

Έτσι, κακοήθη κύτταρα ή κύτταρα μολυσμένα με ιούς που έχουν ελαττωμένη έκφραση των MHC γίνονται πιο επιρρεπή στην καταστροφή τους από τα NK. Τα **ώριμα NK** κύτταρα δεν εκφράζουν TCR αλλά εκφράζουν την ε-άλυσσο του CD3 στο κυτταρόπλασμα³⁹. Επίσης εκφράζουν CD2, CD7, CD16, CD56, CD161, CD94 και μερικές φορές CD57, CD8 και κυτταροτοξικές πρωτεΐνες όπως περφορίνη, granzyme B και TIA-1, ενώ μετά από διέγερση (πχ. με IL-12, IL-15) παράγουν κυτταροκίνες όπως η IFN- γ , TNF- α,β και IL-10⁴⁰. Εκφράζουν ακόμη υποδοχείς αντισωμάτων (Fc γ RIII ή CD16) και εκδηλώνουν εξαρτώμενη από αντισώματα κυτταροτοξικότητα ή ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity). Παράλληλα μπορούν να διεγείρουν την απόπτωση με μηχανισμό Fas-FasL. Αποτελούν μέρος της φυσικής ανοσίας. Αντιδρούν σε αντιγονικά ερεθίσματα και χωρίς τη μεσολάβηση του MHC συστήματος πχ. αναγνωρίζουν γλυκοπρωτεΐνες στην επιφάνεια κυττάρων μολυσμένων από ιούς μέσω υποδοχέων τύπου λεκτίνης και συμμετέχουν σε κυτταροτοξικές αντιδράσεις έναντι ιών, κυττάρων μολυσμένων με ενδοκυττάρια βακτηρίδια και κακοηθών κυττάρων, ιδίως μετά από διέγερση από IL-2 (LAK, lymphokine-activated killer cells), καθώς και στην αντίδραση του μοσχεύματος κατά του όγκου (Graft Versus Tumor, GVT) σε αλλογενείς μεταμοσχεύσεις αιμοποιητικών κυττάρων. Αποτελούν το 10% των περιφερικών λεμφοκυττάρων.

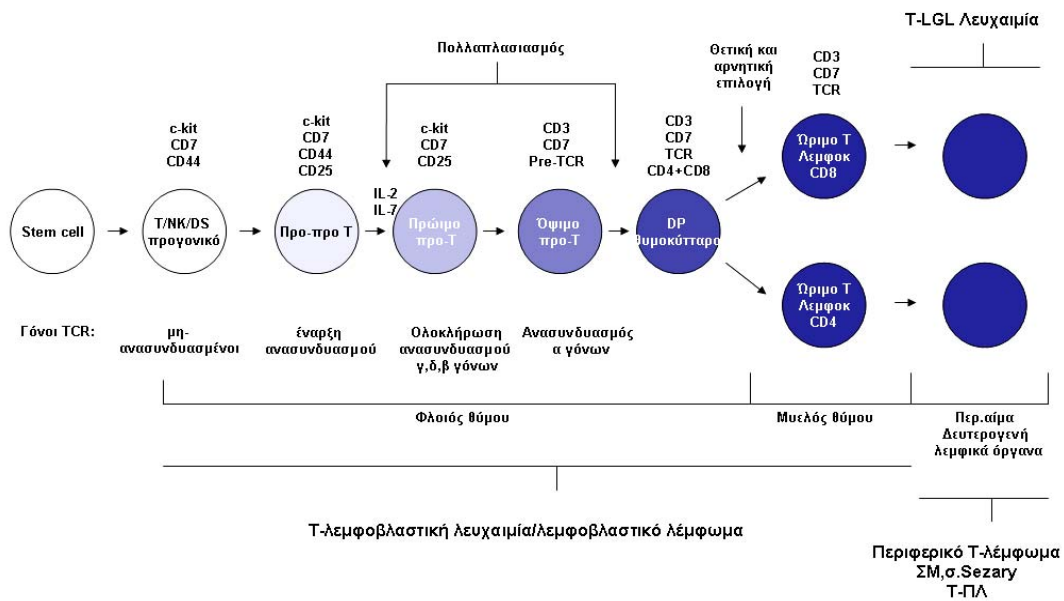
Ένας υποπληθυσμός CD8+ λεμφοκυττάρων εκφράζει παράλληλα και NK δείκτες όπως το CD57 και μερικές φορές το CD16. Τα κύτταρα αυτά ονομάζονται **NK-like T κύτταρα ή NKT**, είναι CD3+, έχουν αναδιαταγμένο TCR $\alpha\beta$ ή $\gamma\delta$ και έχουν φαινότυπο ενεργοποιημένων κυττάρων CD45RO+. Εκφράζουν NK υποδοχείς και περιέχουν κυτταροπλασματικά κοκκία με περφορίνη και γρανένζυμα τα οποία απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους σε αντιδράσεις κυτταρόλυσης χωρίς να προηγηθεί παρουσίαση αντιγόνου από το MHC όπως συμβαίνει και στα NK κύτταρα⁴¹. Μετά από διέγερση συνθέτουν κυτταροκίνες όπως IFN- γ και IL-4. Αποτελούν δηλαδή γέφυρα ανάμεσα στη φυσική και την επίκτητη ανοσία⁴². Υπάρχουν ενδείξεις ότι πρόκειται για ολιγκλωνικούς ή μονοκλωνικούς υποπληθυσμούς που αναπτύσσονται ύστερα από χρόνια αντιγονικό ερεθισμό^{43;44}, ενώ έχουν ρυθμιστικό ρόλο και σε αντιδράσεις αυτοανοσίας. Στο κοινό μικροσκόπιο τόσο τα NK-like όσο και τα NK φαίνονται συνήθως σαν μεγάλα λεμφοκύτταρα με έντονα αζουρόφιλα κυτταροπλασματικά κοκκία γι' αυτό και ονομάζονται μεγάλα κοκκιώδη λεμφοκύτταρα (LGL, Large Granular Lymphocytes). Συνολικά τα LGL κύτταρα αποτελούν το 10-15% των περιφερικών μονοπύρηνων κυττάρων, τα περισσότερα από τα οποία είναι CD3- NK κύτταρα⁴⁵.

3.1.4. Προέλευση T- και NK-Λεμφοκυτταρικών νεοπλασιών

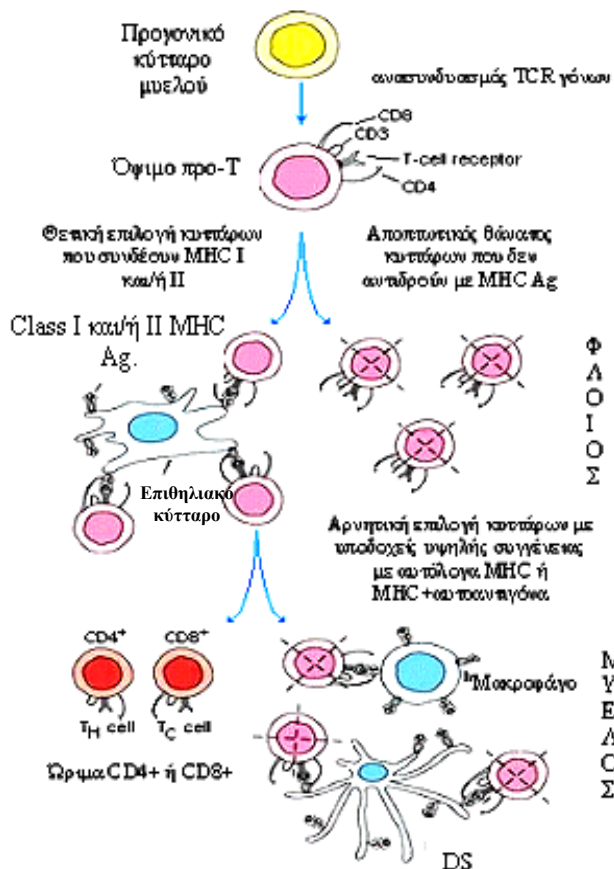
Η ιστολογική προέλευση των T-λεμφοκυτταρικών νεοπλασιών δεν είναι τόσο καλά μελετημένη όσο αυτή των B. Σε γενικές γραμμές τα νεοπλάσματα αυτά χωρίζονται σε θυμικά, που προέρχονται από προβαθμίδες των T λεμφοκυττάρων και είναι η οξεία T-λεμφοβλαστική λευχαιμία και το T-λεμφοβλαστικό λέμφωμα και σε μετα-θυμικά που είναι όλα τα υπόλοιπα. Περαιτέρω οι μετα-θυμικές νεοπλασίες μπορούν να χωριστούν σε αυτές που προέρχονται από κύτταρα με TCRαβ και σε αυτές που προέρχονται από TCRγδ θετικά κύτταρα. Τα CD4+ κύτταρα υπερτερούν στην περιφέρεια σε σχέση με τα CD8 και αποτελούν την κύρια δεξαμενή προέλευσης των ενδοαδενικών περιφερικών λεμφωμάτων, Εικόνα 3.2. Σε αντίθεση με τα B-νεοπλάσματα ο ανοσοφαινότυπος δεν βοηθά ιδιαίτερα στη διάγνωση και πολλές φορές απαιτούνται μοριακές μελέτες, όπως η μελέτη του ανασυνδυασμού των γόνων του TCR για την επιβεβαίωση της κλωνικότητας. Επιπλέον για τα περισσότερα δεν έχουν βρεθεί ειδικές κυτταρογενετικές ανωμαλίες. Έτσι ο καθορισμός διακριτών οντοτήτων των ωρίμων T-λεμφοκυτταρικών νεοπλασιών παραμένει σε μεγάλο βαθμό βασισμένος σε κλινικούς χαρακτήρες.

Ομοίως οι NK κακοήθειες είναι σπανιότερες νόσοι, χωρίς ξεκάθαρη ακόμη οριοθέτηση με αποτέλεσμα πολλές από αυτές να αποτελούν προσωρινές καταχωρήσεις στην ταξινόμηση WHO.

Οι περισσότερες από τις T και NK νεοπλασίες είναι επιθετικά νοσήματα με πολύ πιο φτωγή ανταπόκριση στη θεραπεία και χειρότερη πρόγνωση σε σχέση με τα B-κυτταρικά νεοπλάσματα.



Εικόνα 3.2. Στάδια διαφοροποίησης Τ-λεμφοκυττάρων. Στην εικόνα δίδεται η αντιστοίχιση μερικών από τις Τ-λεμφοκυτταρικές νεοπλασίες με το κύτταρο προέλευσης. Stem cell: αρχέγονο προγονικό αιμοποιητικό κύτταρο μυελού, DP: διπλά θετικό θυμοκύτταρο, ΣΜ: σπογγοειδής μυκητίαση, Τ-ΠΛ: Τ-προλεμφοκυτταρική λευχαιμία.



Εικόνα 3.3. Κλωνική επιλογή Τ-λεμφοκυττάρων στο θύμο. DS: δενδριτικό κύτταρο.

Ιστολογική προέλευση της χρόνιας LGL λευχαιμίας

Οι LGL λευχαιμίες είναι σχετικά σπάνια νοσήματα των οποίων η κατανόηση βρίσκεται σε φάση εξέλιξης, ενώ υπάρχουν διχογνωμίες ακόμα και για τον ορισμό τους. Στην ταξινόμηση REAL στην κατηγορία αυτή κατατάσσονταν τόσο T- όσο και NK- χρόνιες λευχαιμίες. Στην ταξινόμηση WHO ως LGL ορίζονται μόνο οι CD3+ περιπτώσεις, ενώ οι CD3- ταξινομούνται χωριστά και διακρίνονται σε «Χρόνια NK-λεμφοκυττάρωση» που είναι βραδείας εξέλιξης και «Επιθετική λευχαιμία από NK κύτταρα» που είναι πιο επιθετικές. Το κύτταρο προέλευσής των CD3 θετικών είναι ένα ώριμο επιδραστικό κυτταροτοξικό λεμφοκύτταρο όπως φαίνεται από το συνήθη φαινότυπο αντιγόνων επιφανείας τους που είναι CD8+, CD4-, TCR αβ+, CD16+, CD57+, CD45RA+. Εκφράζουν ακόμη CD2, IL-2Rβ (CD122), τον NK υποδοχέα CD94, γρανένζυμα, περφορίνη και FasL⁴⁶, ενώ ορισμένοι συγγραφείς αναφέρουν εκλεκτική χρήση του Vβ ρεπερτορίου⁴⁷. Σπάνια, εκφράζουν το CD56 ή τον TCRγδ αντί του αβ ή είναι CD8-/CD4+ ή CD8-/CD4-. Η κλωνική τους προέλευση επιβεβαιώνεται από την ανεύρεση κλωνικών αναδιατάξεων της β ή γ αλυσού του TCR, ενώ υπάρχουν και σποραδικές αναφορές για κυτταρογενετικές αλλοιώσεις με αναδιατάξεις των chr.8 και 14^{48;49}. Στο περιφερικό αίμα συχνά, αλλά όχι πάντα, φαίνονται σαν μεγάλα κοκκιώδη λεμφοκύτταρα (LGL). Πρόκειται για νοσήματα βραδείας εξέλιξης αν και υπάρχουν και περιπτώσεις με πιο επιθετική κλινική πορεία ή και με εξέλιξη σε υψηλής κακοήθειας λέμφωμα^{50;51}.

Στο 15% των περιπτώσεων των LGL-λεμφοϋπερπλαστικών νοσημάτων τα κύτταρα είναι CD3-, TCR- δηλαδή έχουν φαινότυπο NK κυττάρων⁵². Οι περιπτώσεις αυτές είναι CD2+, CD16+, CD56+, ενώ το CD57, σήμα κατατεθέν των T-LGL, μπορεί να έχει ασθενή έκφραση. Εκφράζουν ειδικά αντιγόνα NK κυττάρων⁵³, ενώ ορισμένες φορές εκφράζουν το CD8 και συνδέονται με τη λεγόμενη «επιθετική λευχαιμία από NK κύτταρα», η οποία έχει πιο κακή πρόγνωση. Η κλωνικότητά τους δε μπορεί να διαπιστωθεί εύκολα, αλλά μόνο με ειδικές μεθόδους (X- linked restriction fragment-length polymorphisms).

3.2. Παθογένεια

Όπως αναφέρθηκε τα νεοπλάσματα αυτά προκύπτουν από την κλωνική ανάπτυξη Β, Τ ή ΝΚ κυττάρων, τα οποία «πάγωσαν» σε ένα συγκεκριμένο στάδιο της ανάπτυξής τους. Η αιτία που αναστέλει την ανάπτυξη των κυττάρων και προκαλεί ανεξέλεγκτο κλωνικό πολλαπλασιασμό και συσσώρευση κυττάρων χωρίς ικανότητα περαιτέρω διαφοροποίησης είναι άγνωστη. Παρακάτω αναλύονται ωρισμένες από τις ισχύουσες υποθέσεις.

3.2.1. Παράγοντες κινδύνου

Η κακοήθης εξαλλαγή ενός κυττάρου οφείλεται σε κληρονομούμενες και επίκτητες μεταβολές γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση. Οι παράγοντες κινδύνου που αποτελούν το υπόστρωμα των μεταβολών αυτών είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστοι, ωστόσο ορισμένοι έχουν συσχετιστεί αιτιοπαθογενετικά τόσο με την καρκινογένεση όσο και με τη λευχαιμογένεση/λεμφωματογένεση ειδικότερα και δίδονται στον πίνακα 3.1.

Πίνακας 3.1. Παράγοντες κινδύνου ανάπτυξης λευχαιμίας-λεμφώματος

Οικογενείς, συγγενείς και κληρονομικοί παράγοντες
Χημικά καρκινογόνα
Ιονίζουσα ακτινοβολία
Ιογενείς λοιμώξεις
Χρόνιος αντιγονικός ερεθισμός
Ανοσοανεπάρκεια

Οικογενείς παράγοντες

Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην οικογενή προδιάθεση για κακοήθεια μπορούν να χωριστούν στους εξής: α) τυχαία γεγονότα, β) κληρονομούμενες μεταλλάξεις πρωτο-ογκογονιδίων ή ογκοκατασταλτικών γονιδίων και γ)

κληρονομούμενες ή συγγενείς γενετικές βλάβες ή μεταλλάξεις γονιδίων που προδιαθέτουν, μετά από αλληλεπίδραση με περιβαλλοντικούς παράγοντες, στην συσσώρευση επιπλέον γενετικών βλαβών, ικανών να προκαλέσουν καρκίνο. Από πλευράς φαινοτύπου υπάρχουν περιπτώσεις με τη λεγόμενη «αμιγή οικογενή προδιάθεση», που σημαίνει την εμφάνιση κακοήθειας σε κατά τα άλλα υγιή μέλη μιας οικογένειας και η «συνδρομική προδιάθεση» σε έδαφος διαφόρων συγγενών συνδρόμων.

Παραδείγματα συνδρόμων με υψηλή επίπτωση λεμφοβλαστικής λευχαιμίας ή λεμφώματος είναι τα παρακάτω⁵⁴:

- Σύνδρομα με διαταραχή στην επιδιόρθωση του DNA
Αταξία-τηλαγγειεκτασία
Σύνδρομο Bloom
Σύνδρομο Fanconi
- Σύνδρομα με διαταραχή που οδηγεί σε επιπλέον μεταλλάξεις
Σύνδρομο Shwachman –Diamond
- Σύνδρομα με ανωμαλίες σε ογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά γονίδια
Σύνδρομο Down
Σύνδρομο Li-Fraumeni (p53)
- Πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες
Κοινή ποικίλλουσα ανοσοανεπάρκεια
Βαριά συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια
Σύνδρομο Wiskott-Aldrich
Σύνδρομο φυλοσύνδετης υπερανοσοσφαιριναιμίας IgM
Φυλοσύνδετο λεμφοϋπερπλαστικό σύνδρομο (EBV-σχετιζόμενα B λεμφώματα)
- Άγνωστη αιτιολογία
Σύνδρομο Dubowitz

Όσον αφορά την αμιγή οικογενή προδιάθεση οι περισσότερες περιπτώσεις έχουν καταγραφεί στην Β χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία, σε σημείο να διακρίνεται μορφή «οικογενούς ΧΛΛ»⁵⁵, χωρίς ωστόσο να υπάρχει ακόμη μια επίσημα σχετιζόμενη γενετική διαταραχή⁵⁶, εκτός από ποσοστό περιπτώσεων που οφείλονται σε κληρονομούμενες μεταλλάξεις του γονιδίου ATM⁵⁷. Η ΧΛΛ έχει μεταξύ όλων των μορφών καρκίνου τον υψηλότερο βαθμό οικογενειακής επίπτωσης με 7 φορές αυξημένο κίνδυνο στους συγγενείς πρώτου βαθμού των πασχόντων⁵⁸. Οι

Rawstron και συν. χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής ανακάλυψαν αυξημένη συχνότητα κυκλοφορούντων κλωνικών πληθυσμών Β-λεμφοκυττάρων στο αίμα υγιών ατόμων που ήταν συγγενείς πρώτου βαθμού ασθενών με Β-ΧΛΛ (σε ποσοστό 13,5% των συγγενών)⁵⁹. Ακολουθούν σε συχνότητα οικογενούς κινδύνου το πολλαπλούν μυέλωμα⁶⁰, το non-Hodgkin λέμφωμα⁵⁴ και η ΟΛΛ⁶¹, παρόλο που σύμφωνα με κάποιες πληθυσμιακές μελέτες οι σχέσεις αυτές δεν αποδεικνύονται⁶².

Χημικά καρκινογόνα και ιονίζουσα ακτινοβολία

Το αιμοποιητικό σύστημα λόγω του συνεχούς κυτταρικού πολλαπλασιασμού είναι πολύ ευαίσθητο σε τοξικές ουσίες. Ωστόσο οι αναφορές για ανάπτυξη συγκεκριμένων νεοπλασιών είναι σποραδικές. Ελάχιστα στοιχεία υπάρχουν για την ΟΛΛ και μεγαλύτερος αριθμός για τα NHL, τα οποία έχουν συσχετισθεί με την έκθεση σε διαλύτες όπως το βενζένιο, οξείδια εθυλενίου, εντομοκτόνα και παρασιτοκτόνα, ενώ δεν αναφέρεται ανάλογη επαγγελματική ή περιβαλλοντική έκθεση σε περιπτώσεις ΧΛΛ⁶³. Το πολλαπλούν μυέλωμα έχει συσχετισθεί ιδιαίτερα με αγροτικές εργασίες και επαγγελματική έκθεση σε μέταλλα. Επανελημμένες αναφορές υπάρχουν επίσης για τη σχέση της βαφής μαλλιών με διάφορες αιματολογικές κακοήθειες, χωρίς όμως στατιστική απόδειξη⁶⁴. Επιπλέον, είναι γνωστή η σχέση της ανάπτυξης δεύτερων κακοηθειών αρκετά χρόνια ύστερα από χημειοθεραπεία με ορισμένα κυτταροστατικά φάρμακα, ιδίως σε συνδυασμό με θεραπευτική ακτινοβολία, πχ. μετά από θεραπεία νόσου Hodgkin με το σχήμα MOPP αναπτύσσονται non Hodgkin λεμφώματα σε ποσοστό έως 39%.

Η ιονίζουσα ακτινοβολία είναι μια από τις πιο καλά μελετημένες αιτίες ανάπτυξης διαφόρων μορφών καρκίνου, ιδίως λευχαιμίας⁶⁵, αλλά και λεμφωμάτων, πολλαπλού μυελώματος. Σε κίνδυνο, πέρα από τις περιπτώσεις πυρηνικών ατυχημάτων, είναι άτομα με επαγγελματική έκθεση στην ακτινοβολία και πιθανώς και κάτοικοι περιοχών που βρίσκονται κοντά σε εργοστάσια παραγωγής ατομικής ενέργειας καθώς και άτομα που έχουν δεχθεί θεραπευτική ακτινοβολία για κακοήθη νεοπλάσματα ή και μη κακοήθη νοσήματα όπως η αγγυλοποιητική σπονδυλίτιδα.

Ανοσοανεπάρκεια

Ο σημαντικότερος γνωστός παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη λεμφοκυτταρικών κακοηθειών είναι η διαταραχή του ανοσολογικού συστήματος είτε

με τη μορφή ανοσοανεπάρκειας ή αυτοάνοσης νόσου. Τα λεμφώματα που προκύπτουν είναι κυρίως υψηλής κακοήθειας με συχνή εκπροσώπηση των εξωαδενικών τοιούτων και ανήκουν ως επί το πλείστον στη Β σειρά. Στην ταξινόμηση WHO αναγνωρίζονται τέσσερις κατηγορίες ανοσοανεπαρκειών που σχετίζονται με αυξημένη επίπτωση λεμφοϋπερπλαστικών συνδρόμων. Αυτές είναι: α) οι πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες, β) το AIDS, γ) η ιατρογενής ανοσοκαταστολή σε άτομα που έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων ή αιμοποιητικών κυττάρων και δ) ιατρογενής ανοσοκαταστολή από χρήση μεθοτρεξάτης για αυτοάνοσες παθήσεις⁵. Το φάσμα όπως και ο παθογενετικός μηχανισμός των νεοπλασιών που προκύπτουν ποικίλει ανάλογα με το είδος της ανεπάρκειας.

Στα αυτοάνοσα νοσήματα που προδιαθέτουν στην ανάπτυξη λεμφωμάτων ανήκουν το σύνδρομο Sjogren και η θυρεοειδίτιδα Hashimoto με ανάπτυξη MALT λεμφωμάτων της παρωτίδας και του τραχήλου^{66;67}.

Ιογενείς λοιμώξεις

Ιοί που έχουν εμπλακεί στην παθογένεση των NHL είναι: ο Epstein-Barr (EBV), ο ανθρώπινος ερπητοϊός τύπου 8 (HHV-8), ο HTLV-I, ο ιός της ηπατίτιδος C (HCV) και ο HIV. Οι τρεις πρώτοι θεωρούνται απευθείας ογκογόνοι και ανευρίσκονται μέσα σε κακοήθη κύτταρα, ενώ οι 2 τελευταίοι φαίνεται πως συμβάλλουν στην λεμφωματογένεση με άλλους μηχανισμούς όπως ο χρόνιος αντιγονικός ερεθισμός και η πρόκληση ανοσολογικής ανεπάρκειας.

Ο EBV είναι ένας DNA ερπητοϊός που σχετίζεται με το λέμφωμα Burkitt (με το 100% του Αφρικανικού-ενδημικού τύπου και το 20% του σποραδικού), με το εξωαδενικό T/NK λέμφωμα ρινικού τύπου και άλλες T/NK κακοήθειες, με το 50% του κλασικού λεμφώματος Hodgkin, με το αγγειοανοσοβλαστικό λέμφωμα, με τη λεμφωματοειδή κοκκιωμάτωση, με το σχετιζόμενο με AIDS NHL αλλά και με την πλειονότητα των B-NHL που αναπτύσσονται σε έδαφος ανοσοανεπάρκειας (όπως το B-NHL που αναπτύσσεται κατά την πρόιμη φάση της λήψης ανοσοκατασταλτικών μετά από αλλογενή μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων ή συμπαγών οργάνων). Το DNA του ιού EBV κωδικοποιεί 2 πρωτεΐνες που μπορούν να προκαλέσουν κυτταρική μεταμόρφωση, τις LMP-1 και EBNA-2. Ο ιός λανθάνει μέσα σε μνημονικά Β λεμφοκύτταρα ως επισωμάτιο. Σε περίπτωση ενεργοποίησής του το κύτταρο εκφράζει μια σειρά από ικές πρωτεΐνες οι οποίες προκαλούν άμεση ενεργοποίηση του ανοσολογικού συστήματος και εξουδετέρωση του ιού. Εάν όμως η

ενεργοποίηση συμβεί σε έδαφος εμμένουσας ανοσοανεπάρκειας, ιδιαίτερα της κυτταρικής ανοσίας, τότε ο ιός δεν εξουδετερώνεται και προκαλεί βλαστική μεταμόρφωση των Β κυττάρων. Ο μηχανισμός αυτός εξηγεί τις περιπτώσεις με ανοσοανεπάρκεια, ωστόσο υπάρχουν ακόμη πολλά κενά στην ερμηνεία των λοιπών περιπτώσεων^{68,69}.

Ο HHV-8 ή ιός του σαρκόματος Karosi προκαλεί το σχετιζόμενο με HIV λοίμωξη σάρκωμα Karosi και έχει επίσης απομονωθεί από λεμφοκύτταρα της νόσου Castleman σε ασθενείς με AIDS και από πρωτοπαθές λέμφωμα των ορογόνων χιτώνων από μεγάλα Β-κύτταρα. Ο ιός αυτός επίσης λανθάνει ως επισωμάτιο και κωδικοποιεί ογκογόνες πρωτεΐνες, όπως πρωτεΐνες ομόλογες με τις κυκλίνες D, κυτταροκίνες και χημειοκίνες⁷⁰.

Ο HTLV-1 είναι ένας RNA ρετροϊός που ενσωματώνεται σε τυχαίες θέσεις μέσα στο γονιδίωμα και μπορεί να προκαλέσει το T-λέμφωμα /λευχαιμία ενηλίκου. Δεν κωδικοποιεί ογκογονίδια αλλά φαίνεται πως η πρωτεΐνη HTLV-1 tax μπορεί να ενεργοποιεί απομακρυσμένα γονίδια του κυττάρου υπεύθυνα για την σύνθεση αυξητικών παραγόντων και άλλων μορίων σχετιζόμενων με τον κυτταρικό κύκλο⁷¹.

Ο HCV ανευρίσκεται στις περισσότερες περιπτώσεις μικτής κρουσφαιριναιμίας τύπου II, είτε πρωτοπαθούς είτε σε έδαφος λεμφοπλασματοκυτταρικού λεμφώματος. Είναι ένας RNA ιός που διεγείρει την πολυκλωνική αρχικά ανάπτυξη Β-λεμφοκυττάρων από τα οποία μπορεί να προκύψει ένας μονοκλωνικός πληθυσμός, ίσως μέσω της υπερέκφρασης Bcl-2. Για την ανάπτυξη λεμφώματος φαίνεται πως απαιτούνται επιπρόσθετα γεγονότα, αλλά η ιοφορία υποβοηθά την εξέλιξη της νόσου με τον συνεχή αντιγονικό ερεθισμό⁷². Τέλος ο HIV είναι ένας ρετροϊός ο οποίος δεν είναι άμεσα ογκογόνος, αλλά μέσω της ανοσοκαταστολής που προκαλεί, συμβάλλει στην ανάπτυξη non Hodgkin λεμφωμάτων όλων των τύπων, συχνά σε σχέση με άλλες ιικές λοιμώξεις (EBV, HHV8), με σχετικό κίνδυνο έως και 600 φορές περισσότερο από τον γενικό πληθυσμό⁷³!

Χρόνιος αντιγονικός ερεθισμός

Η μελέτη των αναδιατάξεων των ανοσοσφαιρινών επιφανείας των Β λεμφοκυττάρων παρέχει ενδείξεις για το ρόλο του αντιγονικού ερεθισμού στην κλωνική ανάπτυξη. Στην πλειονότητα των Β λεμφωμάτων οι γόνιμοι των ανοσοσφαιρινών φέρουν γενετικές μεταλλάξεις και πολλές φορές γίνεται εκλεκτική

χρήση ορισμένων οικογενειών των Ig γόνων, γεγονός που υπαινίσσεται προηγηθείσα επαφή και **επιλογή** από άγνωστο αντιγόνο. Ο χρόνιος αντιγονικός ερεθισμός ιδιαίτερα στα πλαίσια διαταραχής της ανοσοεπίβλεψης μπορεί να συμβάλλει στην ανάπτυξη ή την πρόοδο κακοήθους εξαλλαγής των λεμφοειδών κυττάρων. Έτσι, για παράδειγμα ο χρόνιος αντιγονικός ερεθισμός από HCV μπορεί να πυροδοτήσει την ανάπτυξη κλωνικών υποπληθυσμών B κυττάρων, όπως αναφέρθηκε. Για ορισμένα λεμφώματα έχει δειχθεί η εξάρτηση της επιβίωσης των κυττάρων τους από τη συνεχιζόμενη επαφή με το αντιγόνο. Τέτοιες σχέσεις υπάρχουν μεταξύ MALT λεμφωμάτων του στομάχου και χρόνιας λοίμωξης από ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού, δερματικών MALT και χρόνιας λοίμωξης από *Borrelia Burgdorferi* και μεταξύ της νόσου α-βαρέων αλύσεων του εντέρου και μικτών βακτηριακών λοιμώξεων⁷⁴.

Η μελέτη της ειδικότητας των ανοσοσφαιρινών και η αποκάλυψη των υπεύθυνων αντιγόνων προσφέρει πολλά στην κατανόηση της διεργασίας της λεμφωματογένεσης.

3.2.2. Γενετική βάση των λεμφοειδών νεοπλασιών

Η διαδικασία της αναδιάταξης των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών ή του TCR αποτελεί την «**αχίλλειο πτέρνα**» του λεμφοκυττάρου. Η δραστηριοποίηση αφενός ενός ισχυρότατου ενζυματικού μηχανισμού τομής και ανασυνδυασμού του DNA και αφετέρου ενός μηχανισμού πρόκλησης σωματικών μεταλλάξεων σε κύτταρα που χαρακτηρίζονται από φάσεις ταχύτατου πολλαπλασιασμού καθιστά τα κύτταρα αυτά ευάλωτα σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες, ενώ η παρουσία ισχυρότατων ενισχυτών στην περιοχή των μεταθέσεων δημιουργεί συνθήκες υπερέκφρασης ογκογονιδίων. Στον άνθρωπο οι νεοπλασίες των B λεμφοκυττάρων είναι κατά πολύ συχνότερες απ'ότι των T και μάλιστα οι προερχόμενες από ώριμα, λεμφο- ή μετα-λεμφοζιδιακά λεμφοκύτταρα¹⁶. Αυτό προφανώς σχετίζεται με το γεγονός ότι τα T λεμφοκύτταρα δεν υφίστανται σωματικές υπερμεταλλάξεις κατά την ωρίμανσή τους, ενώ τα ώριμα B λεμφοκύτταρα που εισέρχονται στο βλαστικό κέντρο είναι εκείνα που πολλαπλασιάζονται κλωνικά και παρουσιάζουν τα φαινόμενα της σωματικής υπερμετάλλαξης και της αλλαγής ισοτύπου που προδιαθέτουν σε γενετικά λάθη και κακοήθη εξαλλαγή. Το γεγονός ότι οι λεμφοειδείς νεοπλασίες δεν είναι πολύ συχνότερες οφείλεται πιθανώς σε ογκοκατασταλτικούς μηχανισμούς που προστατεύουν το κύτταρο από μη φυσιολογικούς ανασυνδυασμούς του DNA.

Η μοριακή βιολογία των λεμφοκυτταρικών κακοηθειών ακολουθεί το γενικά παραδεκτό πρότυπο ανάπτυξης της νεοπλασίας⁷⁵. Η κακοήθης εξαλλαγή είναι μια δυναμική, πολύπλοκη και κλιμακωτή διαδικασία μετατροπής φυσιολογικών κυττάρων σε νεοπλασματικά, η οποία διακρίνεται σε δύο φάσεις, την φάση της έναρξης και την φάση της προαγωγής. Κατά την φάση της έναρξης συμβαίνουν μη αναστρέψιμες αλλοιώσεις στο κυτταρικό DNA οι οποίες όμως δε δίνουν στο κύτταρο δυνατότητες αυτόνομης ανάπτυξης. Στην φάση της προαγωγής το κύτταρο με την εμφάνιση νέων μεταλλάξεων αποκτά χαρακτήρες νεοπλασματικού κυττάρου με αυτόνομη ανάπτυξη, η οποία δεν ελέγχεται από τους φυσιολογικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς και οδηγεί στη δημιουργία κακοήθους νεοπλασίας. Οι αλλοιώσεις περιλαμβάνουν από μικροσκοπικά ορατές χρωμοσωμικές ανωμαλίες έως αλλοιώσεις που ανιχνεύονται μόνο με τεχνικές μοριακής βιολογίας. Έτσι λοιπόν το γεγονός ότι όγκοι προερχόμενοι από μια μικρή ποικιλία κυττάρων, όπως για παράδειγμα τα κύτταρα του βλαστικού κέντρου, μπορούν να παρουσιάζουν τέτοια κλινική και ιστοπαθολογική ετερογένεια οφείλεται στους συνδυασμούς διαφορετικών παραγόντων κυτταρικής μεταμόρφωσης που επιδρούν σε διαφορετικά στάδια της κυτταρικής διαφοροποίησης.

Οι τρεις κύριες ομάδες γονιδίων που εμπλέκονται στη διαδικασία αυτή είναι τα ογκογονίδια, τα ογκοκατασταλτικά γονίδια και τα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA.

Ογκογονίδια

Τα φυσιολογικά κύτταρα περιέχουν γονίδια ανάλογα των ρετροϊκών ογκογονιδίων (v-onc) τα οποία ονομάζονται πρωτο-ογκογονίδια (c-onc). Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν παίζουν βασικό ρόλο στη λειτουργία των κυττάρων και κυρίως στην κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση. Τα πρωτο-ογκογονίδια με την επίδραση φυσικών, χημικών ή βιολογικών παραγόντων μπορούν να μετατραπούν σε ογκογονίδια μέσω μεταβολών της δομής και της λειτουργίας τους. Ογκογονίδιο καλείται ένα γονίδιο το οποίο όταν μεταλλάσσεται ή εκφράζεται σε μη φυσιολογικά υψηλά επίπεδα μπορεί να συμβάλλει στην καρκινική μεταμόρφωση ενός κυττάρου. Διακρίνονται πέντε ευρείες κλάσεις πρωτο-ογκοπρωτεϊνών⁷⁶:

- εκκρινόμενοι αυξητικοί παράγοντες (πχ. PDGFB, IL-2, IL-3)
- μεμβρανικοί υποδοχείς (πχ. τυροσινικές κινάσες όπως PDGFRB, ALK, SRC)

- πρωτεΐνες που μετέχουν στην ενδοκυττάρια αγωγή σήματος (πχ. HRAS, κινάσες τυροσίνης όπως ABL, κινάσες σερίνης-θρεονίνης όπως Pim1, αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες όπως BCL-2)
- πυρηνικοί μεταγραφικοί παράγοντες με ευοδωτική ή ανασταλτική δράση στη μεταγραφή των γονιδίων-υποστρωμάτων τους (πχ. JUN, FOS, MYC, MYB, GFI1, BCL6, NFκB)
- ένζυμα που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο (πχ. κυκλίνη D1, CDKs/κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες)

Μηχανισμοί ενεργοποίησης πρωτο-ογκογονιδίων στις λεμφοειδείς νεοπλασίες

Η ενεργοποίηση πρωτο-ογκογονιδίων στις λεμφοειδείς νεοπλασίες μπορεί να έχει ποσοτικό ή ποιοτικό χαρακτήρα και γίνεται με δύο βασικούς μηχανισμούς⁷⁷: α) αντιμεταθέσεις στις οποίες δύο ή περισσότερα χρωμοσώματα ανταλλάσσουν αμοιβαία γενετικό υλικό, οπότε ένα πρωτο-ογκογονίδιο μετατίθεται κοντά σε ρυθμιστικές αλληλουχίες στο χρωμόσωμα υποδοχής με αποτέλεσμα την αυξημένη μεταγραφή του, για παράδειγμα του c-MYC στην t(8;14) και β) αντιμεταθέσεις με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός νέου χμαιρικού γονιδίου κατόπιν συνένωσης αλληλουχιών ενός μεταγραφικού παράγοντα από το ένα χρωμόσωμα με αλληλουχίες ενός άλλου γονιδίου στο άλλο χρωμόσωμα. Το προϊόν του χμαιρικού γονιδίου είναι μια υβριδική πρωτεΐνη με ιδιότητες συνήθως μεταγραφικού παράγοντα και ογκογόνο δράση για τα λεμφοειδή κύτταρα. Αυτός ο τύπος αντιμετάθεσης χαρακτηρίζει κυρίως τις οξείες λευχαιμίες, όπως πχ. οι MLL (11q23) χμαιρικές πρωτεΐνες. Σπάνια μια χμαιρική πρωτεΐνη μπορεί να είναι το αποτέλεσμα αναστροφής (inversion) χρωμοσωμικού τμήματος. Λιγότερο συχνός τρόπος ενεργοποίησης πρωτο-ογκογονιδίων, σε αντίθεση με ό,τι συμβαίνει στις μη αιματολογικές νεοπλασίες, είναι ο αυτοπολλαπλασιασμός τους με δημιουργία πολλαπλών αντιγράφων του ίδιου γονιδίου και κατά συνέπεια αυξημένη σύνθεση της κωδικοποιούμενης πρωτεΐνης (πχ. των MYC, BCL-2, REL σε B-NHL^{78;79}). Επιπλέον, σημειακές μεταλλάξεις της κωδικοποιητικής αλληλουχίας μπορεί να αλλάξουν τις ιδιότητες της πρωτο-ογκοπρωτεΐνης (πχ. του RAS στην ΟΛΛ⁸⁰ και πολλαπλόν μύελομα⁸¹, των BCL-2⁸², Pim1⁸³ σε NHL), ενώ μεταλλάξεις ρυθμιστικών περιοχών μπορούν να καταργήσουν τη φυσιολογική ρύθμιση της έκφρασης του πρωτο-ογκογονιδίου (πχ. c-MYC⁸³, BCL-6⁸⁴, Pim1⁸³). Τέλος ογκογονίδια μπορεί να μεταφερθούν στον ξενιστή ύστερα από μόλυνση με ογκογόνους ιούς (LMP-1, EBNA-2 του EBV⁶⁹).

Οι αλλαγές αυτές έχουν επικρατούντα χαρακτήρα και επηρεάζουν το ένα από τα δύο αλληλία του πρωτο-ογκογονιδίου. Είναι δε πάντα σωματικές δηλαδή επίκτητες, διότι πιθανόν κληρονομούμενες τούτες θα ήταν θανατηφόρες (εξαιρέση αποτελεί το γονίδιο RET που εμπλέκεται στην πολλαπλή ενδοκρινική νεοπλασία και τον οικογενή καρκίνο του θυρεοειδούς).

Ογκοκατασταλτικά γονίδια

Πειράματα σύντηξης κυττάρων έδειξαν ότι ο καρκινικός φαινότυπος μπορούσε να αναστραφεί *in vitro* με σύντηξη ενός κακοήθους κυττάρου με ένα φυσιολογικό. Αυτό οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η κυτταρική μεταμόρφωση μπορούσε να οφείλεται στην αδρανοποίηση κάποιων γονιδίων που ονομάστηκαν γι' αυτό ογκοκατασταλτικά. Ο φυσιολογικός ρόλος των γονιδίων αυτών δεν είναι τόσο εμφανής όσο των πρωτο-ογκογονιδίων. Πολλά από αυτά συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, κυρίως με ανασταλτική επίδραση ή προάγουν την κυτταρική διαφοροποίηση ή την απόπτωση. Επίσης μπορεί να ρυθμίζουν την κυτταρική προσκόλληση και μετανάστευση⁸⁵.

Μηχανισμοί απενεργοποίησης ογκοκατασταλτικών γονιδίων στις λεμφοειδείς νεοπλασίες

Οι τρόποι με τους οποίους συμβαίνει αδρανοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων στις λεμφοειδείς νεοπλασίες δεν διαφέρουν από αυτούς που σχετίζονται με άλλες μορφές καρκίνου. Σύμφωνα με την θεωρία των δυο κτυπημάτων του Knudson για την αδρανοποίηση ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου είναι απαραίτητη η αδρανοποίηση και των δυο αλληλομόρφων του συγκεκριμένου γονιδίου⁸⁶. Αυτό είναι συνήθως αποτέλεσμα μετάλλαξης του ενός αλληλομόρφου και απώλειας τμήματος ή και ολοκλήρου του άλλου με απάλειψη (deletion), ενώ στο ίδιο αποτέλεσμα μπορεί να οδηγήσει και η μεθυλίωση. Το γονίδιο που επηρεάζεται συχνότερα σε non Hodgkin λεμφώματα είναι το p53⁸⁷ στην περιοχή 17p13, το οποίο προκαλεί παύση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 και προάγει την απόπτωση των κυττάρων με αλλοιωμένο DNA⁸⁵. Σε διάφορες οξείες και χρόνιες λεμφοειδείς νεοπλασίες έχει βρεθεί απώλεια των ογκοκατασταλτικών γονιδίων p53⁸⁸, p27^{KIP1}, p16/p14 (της ομάδος των CDKIs, cyclin-dependent kinase inhibitors)^{89;90} και απαλείψεις των

περιοχών 6q⁹¹, 12p⁹² όπου εντοπίζονται πιθανά ογκοκατασταλτικά γονίδια. Η περιοχή 13q14 που εξαλείφεται συχνά στη Β-ΧΛΛ φαίνεται πως εμπεριέχει κάποιο ογκοκατασταλτικό γονίδιο που δεν έχει ταυτοποιηθεί ακόμα⁹³, ενώ στην ίδια περιοχή ανευρίσκονται ελλείψεις και σε πολλαπλούν μυέλωμα, αποτελώντας μάλιστα στοιχείο κακής πρόγνωσης στο τελευταίο⁹⁴. Αξίζει να σημειωθεί ότι στις λεμφοειδείς νεοπλασίες ανευρίσκονται συχνά χρωμοσωμικές ελλείψεις οι οποίες πιθανολογείται ότι συμπεριλαμβάνουν άγνωστα ακόμα ογκοκατασταλτικά γονίδια. Η απαλοιφή ογκοκατασταλτικών γονιδίων είναι συχνά ένα όψιμο γεγονός στην ανάπτυξη των λεμφωμάτων που επιπροστίθεται στη διαταραχή των ογκογονιδίων προσδίδοντας αυξητικό πλεονέκτημα στα κύτταρα που τη φέρουν και είναι συχνότερη στα επιθετικά λεμφώματα⁹⁵.

Γονίδια επιδιόρθωσης του DNA

Τα γονίδια αυτά επιβλέπουν τη διαδικασία επιδιόρθωσης του DNA και διακόπτουν τον κυτταρικό κύκλο όταν υπάρχει βλάβη του DNA. Κυριότερος εκπρόσωπος της κατηγορίας είναι το γονίδιο ATM (ataxia telangiectasia mutated) στη θέση 11q23 που πήρε το όνομά του από τη νόσο αταξία-τηλαγγειεκτασία στην οποία είναι μεταλλαγμένο. Οι ομοζυγώτες είναι σε αυξημένο κίνδυνο για διάφορες μορφές καρκίνου σε νεαρή ηλικία. Μεταλλάξεις και των 2 αλληλίων του γονιδίου βρέθηκαν στην Τ-προλεμφοκυτταρική λευχαιμία⁹⁶, ενώ μερικές φορές αποτελεί μέρος της del(11)(q22-q23) στην Β-ΧΛΛ ή το Β-μικροκυτταρικό λέμφωμα^{57,97}. Υπάρχουν ενδείξεις ότι και ετεροζυγώτες για μεταλλάξεις του ATM βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο⁹⁸. Όπως αναφέρθηκε τα λεμφοειδή κύτταρα χρησιμοποιούν μηχανισμούς «φυσιολογικής» γενετικής αστάθειας στη διαδικασία του ανασυνδυασμού των αντιγονικών υποδοχέων τους, η οποία υπόκειται σε αυστηρή ρύθμιση προκειμένου να αποφευχθεί η επιβίωση ανωμάτων κυττάρων. Στη ρύθμιση αυτή συμμετέχουν γονίδια τόσο της προηγούμενης κατηγορίας (ογκοκατασταλτικά) όσο και της παρούσας. Η μελέτη των φαινομένων που λαμβάνουν χώρα κατά τον ανασυνδυασμό των αντιγονικών υποδοχέων και η σημασία τους στη λεμφωματογένεση αποτελεί πεδίο εκτεταμένης έρευνας⁹⁹.

Χρωμοσωμικές ανωμαλίες

Χρωμοσωμικές ανωμαλίες ανευρίσκονται στο 75% των ΟΛΛ⁹², στο 40-50% των ΧΛΛ¹⁰⁰, ενώ στα λεμφώματα η συχνότητά τους δε μπορεί επακριβώς να προσδιορισθεί λόγω τεχνικών δυσκολιών στην κλασική καρυοτυπική ανάλυση (G-banding). Το ποσοστό αυτό αυξάνει με την εφαρμογή της τεχνικής FISH (Fluorescent In Situ Hybridism) που μπορεί να αποκαλύψει χρωμοσωμικές ανωμαλίες και σε μη πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα (μεσοφασικά), ενώ οι αναδιατάξεις γνωστών ογκογονιδίων μπορούν να ανιχνευτούν με PCR. Οι ανωμαλίες αυτές μπορεί να είναι τυχαίες ή επαναλαμβανόμενες, δηλαδή να παρατηρούνται σε μεγάλο αριθμό περιπτώσεων της ίδιας νόσου. Μπορούν να είναι δομικές ή αριθμητικές και αποτελούν σημαντικό εργαλείο για την επιβεβαίωση της κλωνικότητας, την τυποποίηση και την πρόγνωση της νόσου. Σήμερα η μελέτη των δομικών ανωμαλιών των χρωμοσωμάτων και ιδίως των αντιμεταθέσεων στις αιματολογικές κακοήθειες αποτελεί ένα συνεχιζόμενο πεδίο μελέτης που αποδίδει σημαντικές πληροφορίες για την ταυτοποίηση πιθανών ογκογονιδίων και τη διεκρίνηση του ρόλου τους στην κακοήθη ανάπτυξη αλλά και στη φυσιολογική κυτταρική λειτουργία.

Οι αντιμεταθέσεις στην περίπτωση των non Hodgkin λεμφωμάτων είναι οι κυρίαρχες γενετικές ανωμαλίες και αφορούν σχεδόν πάντα την μετάθεση ενός πρωτοογκογονιδίου μέσα ή κοντά στα γονίδια που κωδικοποιούν τις αλυσούς των ανοσοσφαιρινών στην περίπτωση των B-NHL ή τις αλυσούς του υποδοχέα TCR στην περίπτωση των T-NHL. Εξάιρεση αποτελούν το αναπλαστικό λέμφωμα στο οποίο η μετάθεση t(2;5) έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία της χμαιορικής πρωτεΐνης NPM-ALK, η t(11;18) σε MALT λεμφώματα και η t(4;16) σε T λεμφώματα με δημιουργία των υβριδικών AP1-MALT1 και IL-2-BCM αντίστοιχα. Αντίθετα στις οξείες λευχαιμίες λειτουργούν και οι 2 μηχανισμοί δηλαδή η αντιμετάθεση με ή χωρίς τη δημιουργία χμαιορικού γονιδίου.

Στους πίνακες 3.2^{99;101} και 3.3¹⁰² φαίνονται οι κυριότερες γνωστές μεταθέσεις σε B- και T-κυτταρικής αρχής κακοήθειες και τα ογκογονίδια που ενεργοποιούν.

Πίνακας 3.2. Χρωμοσωμικές μεταθέσεις και τα ογκογονίδια που εμπλέκονται σε Β-κυτταρικής αρχής νεοπλασίες.

Ιστολογικός τύπος	Χρωμοσωμική μετάθεση	Ενεργοποιημένο ογκογονίδιο ή χιμαιρικό γονίδιο	Γονίδιο υπεύθυνο για τη διαταραχή έκφρασης ογκογονιδίου	Κατηγορία παραγόμενης πρωτεΐνης	Συχνότητα ^ε
Οζώδες λέμφωμα ^α	t(14; 18)(q32;q21) , t(2;18)(p12;q21), t(18;22)(q21;q11)	<i>BCL-2</i>	IgH, IgK, IgL	Αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη	80%
Λέμφωμα/λευχαιμία Burkitt ^β	Αντιμετάθεση 8q24 με 14q32,2p12,22q11	<i>cMYC</i>	IgH, IgK, IgL	bHLH/zip μεταγραφικός παράγων	100%
DLCL	Μεταθέσεις που συμπεριλαμβάνουν τη θέση 3q27 t(14;15)(q32;q11-13)	<i>BCL6</i> ^γ <i>BCL8</i>	IgH,IgL IgH	Zinc finger μεταγραφικός παράγων Καμία ομολογία με γνωστές πρωτεΐνες	30-40% <5%
ΛΜ	t(11;14)(q13;q32)	<i>BCL1</i> ^δ / <i>κωκλίνη D1</i>	IgH	G1 κυκλίνη	>95%
ΛΠΑ	t(9;14)(p13;q32)	<i>PAX5</i>	IgH	Paired homeobox μεταγραφικός παράγων	50%
MALT	t(11;18)(q21;q21)	<i>API2-MLT/MALT1</i>	Χιμαιρική πρωτεΐνη	Αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη (API2), άγνωστη (MLT/MALT1)	19-36%
	t(1;14)(p22;q32)	<i>BCL10</i>	IgH	Ρυθμιστικός παράγων απόπτωσης	<5%
Σπληνικό ΛΜΖ	t(2;7)(p12;q21)	<i>CDK6</i>	IgK	Κινάση κυκλίνης	<5%
B-ΧΛΛ	t(7;14)(q21;q32)	<i>CDK6</i>	IgH	Κινάση κυκλίνης	
B-NHL	t(14;19)(q32;q13.1) t(10;14)(q24;q32)	<i>BCL3</i> <i>LYT10(NFKB2)</i>	IgH IgH	IκB ομόλογη Ομόλογη με τον REL	<1% <1%
B-NHL	ins(2;2)(p13;p11.2-14)	<i>REL-NRG</i>	Χιμαιρική πρωτεΐνη	μεταγραφικό παράγοντα Μεταγραφικός παράγων(REL), άγνωστη (NRG)	<1%
προ-B ΟΛΛ/B-NHL	t(1;14)(q21;q32)	<i>BCL9</i>	IgH	Καμία ομολογία με γνωστές πρωτεΐνες	<1%
B-NHL	t(1;14)(q21;q32)	<i>MUC1</i>	IgH	Γλυκοπρωτεΐνη τύπου μουκίνης	~5%
Π.Μυέλωμα/B-NHL	t(1;14)(q21;q32)	<i>MUM-2</i>	IgH	πρωτεΐνη σχετιζόμενη με τον υποδοχέα Fc	άγνωστη
B-NHL	t(11;14)(q23;q32)	<i>DDX6/RCK</i>	IgH	πρωτεΐνη	<1%

B-NHL	t(12;22)(q13;q11)	<i>CCND2</i> (κυκλίνη D2)	IgL	DEAD box/RNA ελικάση G1 κυκλίνη	<1%
B-NHL	t(12;14)(q24;q32)	<i>BCL7A</i>	IgH	Άγνωστη λειτουργία	<1%
Προ-B ΟΛΛ	t(4;11)(q21;q23)	<i>MLL/AF4</i>	Χιμαιρική πρωτεΐνη	A-T Hook μεταγραφικός παράγων	>80% ΟΛΛ της παιδικής ηλικίας
	t(1;19)(q23;p13)	<i>E2A/PBX1</i>	Χιμαιρική πρωτεΐνη	Μεταγραφικός παράγων τύπου Homeobox	6%
	t(17;19)	<i>E2A/HLF</i>	Χιμαιρική πρωτεΐνη	b ZIP μεταγραφικός παράγων	<1%
	t(9;22)(q34;q11)	<i>BCR/ABL</i>	Χιμαιρική πρωτεΐνη	Τυροσινική κινάση	30-35% ΟΛΛ ενηλίκων
	t(12;21)(p13;q22)	<i>TEL1/AML1</i>	Χιμαιρική πρωτεΐνη	ETS-like μεταγραφικός παράγων	1-3% ΟΛΛ ενηλίκων
	t(5;14)(q31;q32)	<i>IL3</i>	IgH	Αυξητικός παράγων	<1%

^α Αρρυθμιστη έκφραση BCL-2 επίσης στο 10-30% των DLCL στο ~30% των ΛΜΖ.

^β Αρρυθμιστη έκφραση cMYC επίσης στο ~10% των DLCL.

^γ Περίπου το 6-15% των οζωδών και το 10% των ΛΜΖ παρουσιάζουν επίσης αρρυθμιστη έκφραση BCL6 .

^δ Γνωστό και ως PRAD1 ή CCND1.

^ε Η συχνότητα εκφράζεται ως ποσοστό ανεύρεσης της ανωμαλίας στο αντίστοιχο νόσημα.

DLCL: Λέμφωμα διάχυτο από μεγάλα Β-κύτταρα (diffuse large B- cell lymphoma),

ΛΜ: Λέμφωμα τύπου μανδύα, ΛΠΛ: λεμφοπλασματοκυτταρικό λέμφωμα, ΛΜΖ:

λέμφωμα από Β κύτταρα της μεθοριακής ζώνης, Β-ΧΛΛ: Β-κυτταρικής αρχής χρόνια

λεμφοκυτταρική λευχαιμία.

Πίνακας 3.3. Χρωμοσωμικές ανωμαλίες και τα ογκογονίδια που εμπλέκονται σε Τ-κυτταρικής αρχής νεοπλασίες.

Ιστολογικός τύπος	Χρωμοσωμική μετάθεση	Ενεργοποιημένο ογκογονίδιο ή χιμαιρικό γονίδιο	Γονίδιο υπεύθυνο για τη διαταραχή έκφρασης του ογκογονιδίου	Κατηγορία παραγόμενης πρωτεΐνης
Τ-ΟΛΛ	t(8; 14)(q24;q2111)	<i>cMYC</i>	TCRα	bHLH/zip μεταγραφικός παράγων
	t(7;19)(q35;p13)	<i>LYL1</i>	TCRβ	bHLH/zip μεταγραφικός παράγων
	t(1;14)(p32;q11)	<i>TAL1/SCL</i>	TCRα	bHLH/zip μεταγραφικός παράγων
	t(7;9)(q35;q34)	<i>TAL2</i>	TCRβ	bHLH/zip μεταγραφικός παράγων
	t(11;14)(p15;q11)	<i>RBTN1Tgt1</i>	TCRδ	LIM domain μεταγραφικός παράγων
	t(10;14)(q24;q11), t(7;10)(q35;q24)	<i>HOX11</i>	TCRα, TCRβ	Μεταγραφικός παράγων τύπου Homeobox
	t(7;9)(q34;q34.3)	<i>NOTCH1</i>	TCRβ	Μεμβρανικός υποδοχέας
	t(11;19)(q23;p13)	<i>MLL/ENL</i>	Χιμαιρική πρωτεΐνη	A-T Hook/ Zinc finger μεταγραφικός παράγων
t(1;7)(p34;q34)	<i>LCK</i>	TCRβ	Τυροσινική κινάση	
Τ-ΠΛ, Τ-Λευχαιμία/Λέμφωμα ενηλίκων Τ-NHL	t(14;14)(q11;q32.1) και inv(14)(q11q32.1)	<i>TCL1</i>	TCR-Cα	Αδιευκρίνιστη
	t(4;16)(q26;p13)	<i>IL-2/BCM</i>	Χιμαιρική πρωτεΐνη	Αυξητικός παράγων
Αναπλαστικό NHL	t(2;5)(p23;q35) t(2;Var)	<i>NPM/ALK</i>	Χιμαιρική πρωτεΐνη	Τυροσινική κινάση

Τ-ΟΛΛ: Τ-οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία, Τ-ΠΛ: Τ-κυτταρικής αρχής προλεμφοκυτταρική λευχαιμία.

Όσον αφορά άλλες δομικές ανωμαλίες που ανευρίσκονται σε λεμφοειδείς νεοπλασίες θα αναφέρουμε τις **υπερδιπλοειδίες** όπως είναι η τρισωμία 3 σε Τ¹⁰³ και Β-NHL (στο 50% του ΛΜΖ), η τρισωμία 7 σε Β-NHL, η τρισωμία 12 στο 15% της Β-ΧΛΛ¹⁰⁴, η τρισωμία 18¹⁰⁵, αλλά και ο πολλαπλασιασμός της περιοχής του BCL-2 σε ΟΛΛ, πολλαπλούν μυέλωμα και οζώδες λέμφωμα, ποικιλία υπερδιπλοειδικών κλώνων στην ΟΛΛ, **απαλείψεις** όπως η del(7q) σε Β-NHL, η del(6q) σε Β- και Τ-

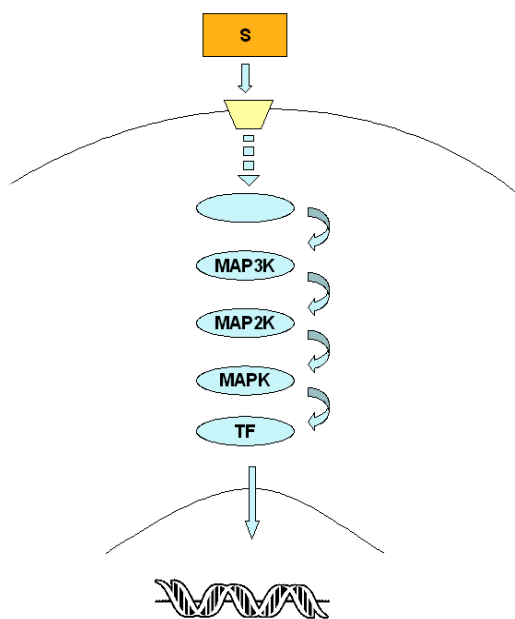
κυτταρικής αρχής οξείες και χρόνιες λευχαιμίες ή λεμφώματα¹⁰³, η del(13q14) και η del(11q22) που αφορά το ATM σε ΧΛΛ, del(17p13) που αφορά το p53 και έχει ανευρεθεί σε όλα σχεδόν τα Β-NHL ενώ είναι σπάνια σε Τ-NHL, σπάνια **μονοσωμίες** όπως του χρ.13 σε Τ-NHL¹⁰³, **αναδιατάξεις** του 1p21-23 (όπου εδράζεται και το Gfi1) σε Τ-NHL¹⁰⁶, αναδιατάξεις του 6q21 (όπου εδράζεται το Pim1) σε Β-NHL¹⁰⁷ κλπ. Γενικά, πολύ λιγότερα είναι γνωστά για τις κυτταρογενετικές ανωμαλίες αλλά και τα εμπλεκόμενα ογκογονίδια στις Τ-κυτταρικές νεοπλασίες σε σχέση με τις Β-κυτταρικές τούτες.

Ογκογόνες κινάσες: η οδός των MAP κινασών

Η οικογένεια των κυτταρικών κινασών περιλαμβάνει τις κινάσες τυροσίνης, τις κινάσες σερίνης-θρεονίνης και τις κινάσες με διπλή ειδικότητα. Η ενζυματική λειτουργία τους συνίσταται στη φωσφορυλίωση υποστρωμάτων σε θέσεις τυροσίνης ή σερίνης ή/και θρεονίνης. Η φωσφορυλίωση πρωτεϊνών αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους μηχανισμούς της ενδοκυττάριας μεταγωγής σήματος με τη βοήθεια του οποίου γίνεται μεταξύ άλλων η ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης, της διαφοροποίησης, της κυτταρικής μετανάστευσης .

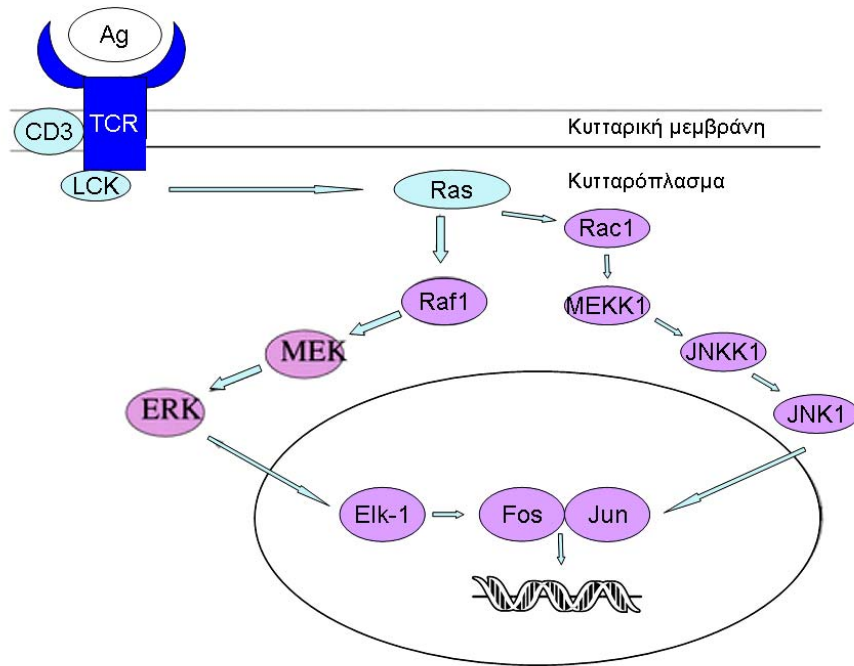
Οι κινάσες σερίνης-θρεονίνης διακρίνονται σε έχουσες και μη έχουσες λειτουργία υποδοχέα. Για πολλά από τα μέλη τους έχει δειχθεί ότι όταν υπερεκφράζονται ή όταν εκφράζονται σε αλλοιωμένη μορφή εξαιτίας μετάλλαξης αποκτούν ογκογόνο δυναμικό, όπως η Akt, μέλη της οικογένειας των MAP κινασών (Trp2, Raf1), οι κινάσες Pim, Mos και AURORA .

Η οικογένεια των MAP κινασών (mitogen activated protein kinase) μετέχει στην ενδοκυττάρια μεταγωγή σημάτων σχετικών με τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την αντίδραση σε παράγοντες stress. Ο πυρήνας μιας MAPK οδού είναι η διαδοχική ενεργοποίηση 3 κινασών: μια ενεργοποιημένη MAPK κινάση (MAP3K) φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί μια ειδική MAPK κινάση (MAP2K), η οποία στη συνέχεια διεγείρει μια ειδική MAP κινάση (MAPK)¹⁰⁸,
Εικόνα 3.5.

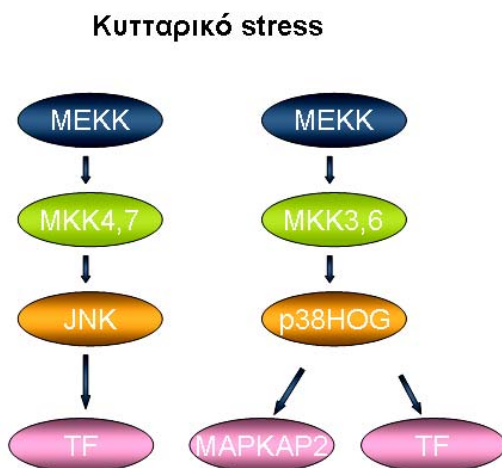


Εικόνα 3.5. Διαγραμματική απεικόνιση μιας MAPK οδού. S: Stimulus, εξωγενής παράγοντας που διεγείρει αντίστοιχο κυτταρικό υποδοχέα, πχ. αυξητικός παράγων, LPS. TF: Transcription Factor, μεταγραφικός παράγων που εισέρχεται στον πηρύνα.

Οι κύριες MAPK οδοί είναι τέσσερις: η «κλασική» MAPK οδός **ERK-1/2**¹⁰⁹ που διεγείρεται από αυξητικούς παράγοντες, οι **JNK/SAPK**¹¹⁰ (c-Jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase) και **p38**¹¹¹ που διεγείρονται από κυτταρικό stress, προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες και ενδοτοξίνες και ο **ERK5**¹¹², που διεγείρεται από αυξητικούς παράγοντες και οξειδωτικό stress. Η οδός ERK1/2 κατέχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και αντιρροπεί την αποπτωτική δραστηριότητα των JNK και p38. Στην εικόνα 3.6. φαίνεται η ενεργοποίηση των ERK1/2 και JNK μετά από αντιγονική διέγερση μέσω των Ras, Rac ενώ στην εικόνα 3.7. απεικονίζονται σχηματικά τα βασικά μέλη των JNK και p38 οδών.



Εικόνα 3.6. Η οδός Ras-MAPK στην ενεργοποίηση του TCR στα CD4 λεμφοκύτταρα. Αντιγόνα (Ag) συνδέονται με το σύμπλεγμα του υποδοχέα TCR/CD3. Ακολουθεί η ενεργοποίηση της τυροσινικής κινάσης Lck που ενεργοποιεί τον Ras. Ο Ras διεγείρει τις Raf1 και MEKK1 (MAP3K) κινάσες, που ενεργοποιούν αντίστοιχα τις MEK και JNKK1 (MAP2K) και στη συνέχεια ενεργοποιούνται οι ERK, JNK1 (MAPK) που εισέρχονται στον πυρήνα και φωσφορυλιώνουν τους μεταγραφικούς παράγοντες Elk-1, Fos και Jun με αποτέλεσμα τη διέγερση της μεταγραφής διαφόρων γονιδίων.



Εικόνα 3.7. JNK/SAPK και p38 MAPK οδοί. TF: transcription factor, μεταγραφικός παράγων

Μεταγραφικοί παράγοντες: ο κεντρικός ρόλος του NF-κB σε ευρύ φάσμα λεμφοειδών και μη νεοπλασιών

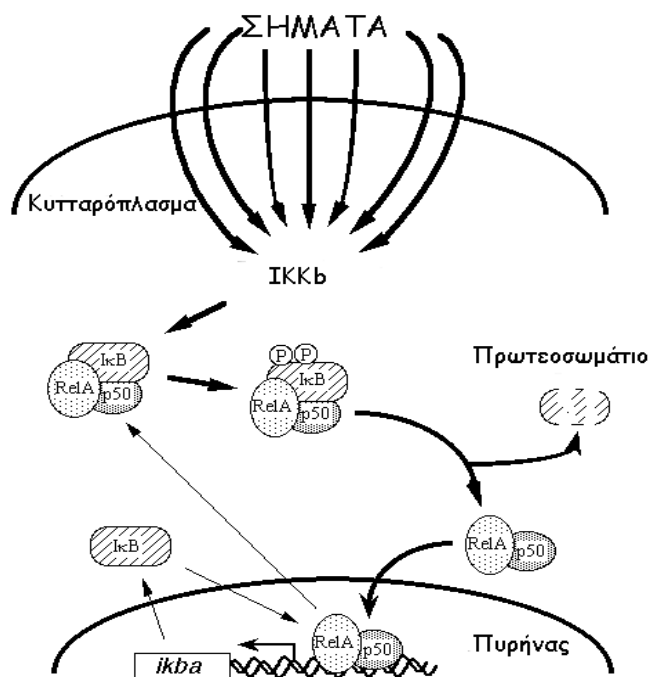
Όπως έχουμε ήδη σημειώσει, οι μεταγραφικοί παράγοντες κατέχουν κεντρικό ρόλο στην ογκογένεση και μερικοί εξ'αυτών θεωρούνται ογκογονίδια, αφού μεταλλάξεις ή υπερέκφρασή τους που οδηγούν σε επίταση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ή αναστολή της απόπτωσης έχουν βρεθεί σε πολλές κακοήθειες.

Οι πρωτεΐνες της ομάδος REL/NFKB (Nuclear Factor of kappa light chain gene enhancer in B cells) είναι μεταγραφικοί παράγοντες με ρόλο-κλειδί στη ρύθμιση μεγάλου αριθμού κυτταρικών λειτουργιών, όπως ανοσολογικές και φλεγμονώδεις αντιδράσεις, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η απόπτωση, καθώς επίσης και στη ρύθμιση της αγγειογένεσης και κυτταρικής προσκόλλησης. Είναι ίσως η πιο καλά μελετημένη ομάδα μεταγραφικών παραγόντων.

Αποτελούν ομάδα πρωτεϊνών με υψηλό βαθμό εξελικτικής συντήρησης μεταξύ ποικίλων οργανισμών. Μπορούν να διακριθούν σε δύο κλάσεις ανάλογα με την περιοχή που συνδέεται στο DNA δηλ. την περιοχή RH. Τα μέλη της πρώτης κλάσης (p105, p100) έχουν καρβοξυλική ουρά η οποία αναστέλλει τη λειτουργία τους και ενεργοποιούνται μετά από πρωτεόλυση (σε p50, p52). Η σύνδεσή τους με το DNA (σε περιοχές 9-10 βάσεων) επιτυγχάνεται μόνο όταν δημιουργούν ετεροδιμερή με τα ενεργά μέλη της δεύτερης κλάσης (RelA, RelB)¹¹³.

Η ρύθμιση των παραγόντων αυτών γίνεται με την επίδραση των ανασταλτικών πρωτεϊνών IκB (p105, p100, IκBa, IκBb, IκBg, IκBe, IκBz, Bcl-3)¹¹³. Η καλύτερα μελετημένη αλληλεπίδραση είναι αυτή του IκBa με το διμερές p50/RelA η οποία οδηγεί σε κυτταροπλασματική κατακράτηση του συμπλέγματος. Φυσιολογικά στα περισσότερα κύτταρα ο NF-κB διατηρείται στην ανενεργό αυτή μορφή στο κυτταρόπλασμα και μόνο όταν υπάρξει ορισμένο εξωτερικό σήμα εισέρχεται στον πυρήνα. Στην ενεργοποίηση αυτή συμμετέχει το σύμπλεγμα των IKK (IKKa, IKKb, IKKg). Συγκεκριμένα η κινάση IKKb διεγείρεται και φωσφορυλιώνει την IκBa στο αμινοτελικό της άκρο, πράγμα που τη μετατρέπει σε στόχο για ουβικιωτινίωση και αποδόμηση από το 26S πρωτεοσωμάτιο. Εναλλακτικά η NIK (NF-kappaB-Inducing Kinase) φωσφορυλιώνει την p100¹¹⁴, ενώ η IKKβ την p105¹¹⁵ με αποτέλεσμα την ουβικιωτινίωση και τη διάσπασή τους σε p52 και p50 αντίστοιχα. Αποτέλεσμα και των 2 μηχανισμών είναι η ενεργοποίηση του NF-κB είτε ως p50 ή ως p52 και η είσοδός του στον πυρήνα, όπου συνδέεται με τον κB enhancer και ενεργοποιεί τη μεταγραφή διαφόρων γονιδίων. Ένα από τα γονίδια-στόχοι είναι και η

ίδια η IκBa, οπότε η νεοσυντεθειμένη IκBa εισέρχεται στον πυρήνα και δεσμεύει τον NF-κB, αναστέλλοντας γρήγορα τη δράση του, Εικόνα 3.8.



Εικόνα 3.8. Κλασική Rel/NF-κB ενδοκυττάρια οδός μεταβίβασης σήματος. Στην κλασική οδό διάφορα σήματα καταλήγουν στην ενεργοποίηση του συμπλέγματος της IKKb κινάσης η οποία στη συνέχεια φωσφορυλιώνει την IκB σε 2 αμινοτελικές σερίνες. Αυτό στοχοθετεί την IκB για ουβικιωτινίωση και αποδόμηση από το πρωτεοσωμάτιο. Ο ελεύθερος NF-κB (p50-RelA σ' αυτή την περίπτωση) εισέρχεται στον πυρήνα και διεγείρει τη μεταγραφή γονιδίων. Μεταξύ αυτών επάγεται η έκφραση και IκBa η οποία θα εισέλθει στον πυρήνα και θα απομακρύνει και πάλι τον NF-κB προς το κυτταρόπλασμα. Η έντονη γραμμή αντιπροσωπεύει τον μηχανισμό ενεργοποίησης, ενώ η λεπτή γραμμή τον μηχανισμό αναστολής (Τροποποίηση από T.Gilmore: The Rel/NF-κB signal transduction pathway¹¹³).

Σε μερικά καρκινικά κύτταρα ο NF-κB εντοπίζεται ιδιοσυστασιακά μέσα στον πυρήνα. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε ενεργοποίηση οδών που δρουν σε ανώτερο επίπεδο πχ. ενεργοποίηση του IKK δρόμου από χρόνιο αντιγονικό ερεθισμό, από ογκογόνους ιούς (EBV⁶⁹, HTLV-1¹¹⁶), από το CD30 στο λέμφωμα Hodgkin¹¹⁷, από

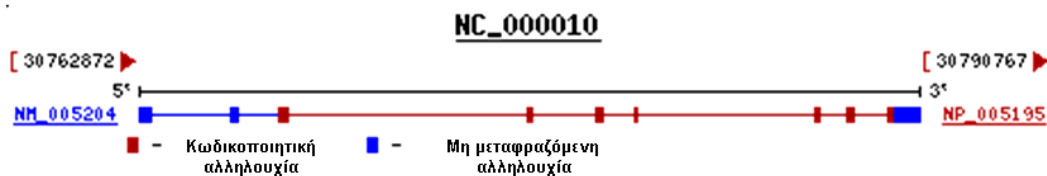
την BCL10 σε μερικά MALT λεμφώματα¹¹⁸, αλλά και εξαιτίας μεταλλάξεων των IκB αναστολέων που τους καθιστούν ανενεργούς (Λ.Hodgkin¹¹⁹, ΧΛΛ¹²⁰). Σε ορισμένες λεμφοειδείς νεοπλασίες τα κύτταρα φέρουν μεταλλάξεις ή γονιδιακή ενίσχυση του ίδιου του Rel/NF-κB (B-NHL διάχυτο από μεγάλα B κύτταρα⁷⁹, λέμφωμα Hodgkin¹²¹). Όσον αφορά δε στις T-νεοπλασίες, πρόσφατες μελέτες γονιδιακού προφίλ σε μεγάλη κλίμακα όγκων με microarrays δείχνουν πως η υπερέκφρασή του είναι σε συχνή σε περιφερικά T λεμφώματα, αλλά όχι και σε οξείες T-λεμφοβλαστικές λευχαιμίες¹²².

Είναι πλέον βέβαιο ότι οι NF-κB μεταγραφικοί παράγοντες έχουν καρκινογενετικές ιδιότητες και αντιθέτως οι IκB μπορούν να δρουν ογκοκατασταλτικά. Υποστρώματά τους είναι εκατοντάδες γονίδια, μεταξύ των οποίων ογκογονίδια που δρουν σαν αντι-αποπτωτικοί παράγοντες και γονίδια που διεγείρουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Κλινικές δοκιμές με αναστολείς του δρόμου αυτού, με σημαντικότερο το φάρμακο βορτέζομιμπ, που είναι αναστολέας του πρωτεασώματος έχουν δώσει θεαματικά αποτελέσματα ακόμα και σε ανθεκτικά νεοπλάσματα όπως το πολλαπλούν μυέλωμα και το λέμφωμα μανδύα¹²³.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ: ΤΑ ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ TPL2, GF11 ΚΑΙ PIM1

1. TPL2

Το πρωτο-ογκογονίδιο γονίδιο Trp2 (tumor progression locus) ανακαλύφθηκε το 1991 και είναι γνωστό σαν COT (Cancer Osaka Thyroid oncogene) ή MAP3K8. Κλωνοποιήθηκε αρχικά από εστίες μεταμορφωμένων κυττάρων σε πειράματα έκτοπης έκφρασης ανθρώπινου γενωμικού DNA από κυτταρική σειρά καρκίνου του θυρεοειδούς στην κυτταρική σειρά εμβρυονικών κυττάρων SHOCK (Syrian Hamster Osaka Kanazawa)¹²⁴. Η μορφή αυτή δεν ήταν η φυσική μορφή του γονιδίου αλλά ένας αναδιαταγμένος, ελλιπής (truncated) τύπος που προέκυψε σαν artifact κατά την κλωνοποίηση. Εντοπίζεται στην περιοχή 10p11.23 και αποτελείται από 9 εξόνια (8 στην αρχική δημοσίευση)^{125;126}, Εικόνα 1. Το ανάλογο του στον αρουραίο (chr.17) ανακαλύφθηκε το 1993 από τους Patriotis και συν¹²⁷ σαν θέση ενσωμάτωσης προϊόν σε MoMuLV (Moloney Murine Leukemia Virus) - επαγόμενα λεμφώματα τρωκτικών. Η ενσωμάτωση των προϊόν συμβαίνει στο τελευταίο ιντρόνιο του Trp2 οδηγώντας στην παραγωγή πρωτεΐνης βραχύτερης από τη φυσιολογική με αντικατάσταση των τελευταίων 43 αμινοξέων από αλληλουχία 7 άσχετων αμινοξέων. Το ομόλογό του στο ποντίκι εδράζεται στο chr.18^{128;129}.



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση του γονιδίου Trp-2. Προβλεπόμενη αλληλουχία εξονίων-ιντρονίων από το Ensembl¹³⁰. Το πρώτο από τα μη μεταφραζόμενα εξόνια του 5' άκρου δεν είχε συμπεριληφθεί στην αρχική ταυτοποίηση.

Πρωτεϊνική δομή

Όπως προέκυψε από την προβλεπόμενη αλληλουχία αμινοξέων που κωδικοποιείται από το cDNA των γονιδίων Trp2 (τρωκτικά) και Trp2 (άνθρωπος), το πρωτεϊνικό προϊόν των γονιδίων αυτών είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης ομόλογη κατά περίπου 95% ανάμεσα στα 2 είδη^{125;129}. Η ανθρώπινης προέλευσης Trp2 κινάση αποτελείται από 467 αμινοξέα. Η περιοχή με δραστηριότητα κινάσης της πρωτεΐνης είναι ομόλογη με την αντίστοιχη της STE11 του *S.cerevisiae* που είναι **MAP3K** κινάση σερίνης/θρεονίνης. Τόσο η φυσική κινάση Cot όσο και η κολοβωμένη φάνηκε πως συμμετέχουν στην ενεργοποίηση σχεδόν όλων των MAPK οδών, όπως της ERK-1/2^{131;132}, των JNK/SAPK και p38¹³² και της ERK5¹³³.

Εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Πλούσιοι στο μετάγραφο αυτό βρέθηκαν ο σπλην, ο θύμος, το ήπαρ και οι πνεύμονες φυσιολογικών ποντικών¹³⁴, καθώς και οι σιελογόνοι, γαστρικοί και εντερικοί αδένες ποντικών¹³⁵, ενώ σε χαμηλά επίπεδα υπάρχει σε όλους τους ιστούς. Υπάρχουν 2 ισόμορφες πρωτεΐνες διαφορετικού μήκους (58- και 52-kDa) οι οποίες διαφέρουν στο αμινοτελικό τους άκρο και προέρχονται από το ίδιο μητρικό RNA κατόπιν μετάφρασης που ξεκινά από δύο διαφορετικά AUGs. Η 58-kDa πρωτεΐνη έχει βραχύτερο χρόνο ημιζωής και είναι κινάση σερίνης ενώ η 52-kDa είναι κινάση σερίνης/θρεονίνης και είναι το κυριότερο προϊόν σε ηρεμία, έχει δε χαμηλότερη ικανότητα να επάγει κυτταρική μεταμόρφωση¹²⁵. Στο N-τελικό άκρο δηλαδή εντοπίζεται περιοχή απαραίτητη για την επαγωγή κυτταρικής μεταμόρφωσης.

Στο καρβοξυτελικό άκρο της φαίνεται ότι υπάρχει περιοχή που ρυθμίζει τη σταθερότητα και την καταλυτική δραστηριότητα. Έτσι, η κολοβωμένη πρωτεΐνη των αρχικών πειραμάτων εκφράζονταν σε **υψηλότερο βασικό επίπεδο**, αλλά και παρουσίαζε αυτόματη ενεργοποίηση (αυτοφωσφορύλιωση)¹²⁷ και υψηλότερη δραστηριότητα κινάσης¹³⁶. Αυτό δείχθηκε ότι οφείλεται σε σταθεροποίηση του RNA αφού απαλείφονται αποσταθεροποιητικές αλληλουχίες^{127;137}, καθώς και σε χαμηλότερο ρυθμό καταβολισμού της πρωτεΐνης αφού με την απαλοιφή των αμινοξέων 435-457 προστατεύεται από την μέσω του πρωτεασώματος αποδόμηση (περιοχή με ιδιότητα ντεγκρονίου που επάγει αποδόμηση χωρίς ουβικουτινίωση¹³⁸). **Η υψηλότερη καταλυτική ικανότητα** της κολοβωμένης Trp2 κινάσης οφείλεται αφενός στα υψηλότερα φυσιολογικά επίπεδα αυτής και αφετέρου στην απαλοιφή περιοχής του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης (43 τελευταία αμινοξέα) η οποία ασκεί πιθανώς ρόλο ανασταλτικού ρυθμιστή με ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις που περιορίζουν την διαθεσιμότητα της καταλυτικής περιοχής για σύνδεση με υπόστρωμα και ATP¹³⁸ ή με

διαμοριακές αλληλεπιδράσεις, όπως η δέσμευση και αναστολή του Trp2, μέσω της COOH-ουράς του από την p105 πρόδρομο πρωτεΐνη του NF-κB1¹³⁹.

Λειτουργία

Ενεργοποίηση και πολλαπλασιασμός λεμφοκυττάρων. Η έκφραση της κινάσης Cot σε σπληνικά κύτταρα αυξάνεται μέσα σε 1 ώρα μετά την έκθεση τους σε κονκαβαλαμίνη A κατά τη μετάβαση των κυττάρων από τη φάση ηρεμίας G0 στη φάση G1¹²⁷. Οι Velasco-Sampayo και συν¹⁴⁰ έδειξαν σε κύτταρα CTLL-2, τα οποία δεν παράγουν IL-2 και εξαρτώνται από την προσθήκη της για τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωσή τους, τον ευοδατικό ρόλο της Cot κινάσης στη μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S με την επίδραση IL-2. Αυτή η δράση ασκείται μέσω ελάττωσης του αναστολέα p27^{kip} (ή CDKN1B) της CDK2 κυκλινο-εξαρτώμενης κινάσης και συνακόλουθης διέγερσης του μεταγραφικού παράγοντα E2F, ο οποίος επάγει την έκφραση γονιδίων που ρυθμίζουν τη G1/S μετάβαση. Η δράση αυτή είναι, τουλάχιστον εν μέρει, MEK/ERK εξαρτώμενη.

Παραγωγή IL-2. Οι Ballester A και συν¹⁴¹ έδειξαν επαγωγή της σύνθεσης IL-2 με επίδραση αντι-CD3 (το οποίο φυσιολογικά δεν επάγει μόνο του την παραγωγή IL-2) σε κύτταρα Jurkat (human T cell leukemia) που εξέφραζαν Trp2 αναδιαταγμένο στο 3'-άκρο, μέσω αύξησης της μεταγραφής του επαγωγέα της. Για την επαγωγή της IL-2 στη διάρκεια της ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων απαιτείται συνεργασία αρκετών μεταγραφικών παραγόντων. Συγκεκριμένα, ο επαγωγέας της IL-2 περιλαμβάνει 5 θέσεις σύνδεσης για τον NFAT, μια για τον NF-κB και δυο για τον OCT-1. Απο αυτούς ο NFAT (nuclear factor of activated T cells) σε συνεργασία με τον AP1, καθώς και ο NF-κB είναι υποχρεωτικοί για την μεταγραφή. Ο AP1 αποτελείται από τις υπο-ομάδες JUN και FOS και συνδέεται με τον ενεργοποιημένο NFAT μέσα στον πυρήνα. Ο NFAT είναι απαραίτητος για την έναρξη της μεταγραφής πολλών κυττοκινών όπως IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, TNF-α, IFN-γ και ενεργοποιείται από την καλσινευρίνη¹⁴². Οι Τσατσάνης και συν^{143;144} σε διάφορες κυτταρικές σειρές με σταθερή έκφραση Trp2, είτε φυσικού ή αναδιαταγμένου στο 3'-άκρο, έδειξαν ότι και οι δύο μορφές ενεργοποιούν τον NFAT σε πολλά είδη κυττάρων (με μετακίνηση του NFATp στον πυρήνα) καθώς και τον NF-κB. Το μοντέλο που πρότειναν για την παραγωγή IL-2, ήταν η συμμετοχή της κινάσης τόσο στην, μέσω καλσινευρίνης, ενεργοποίηση του NFAT όσο και στην ενεργοποίηση του AP1 μέσω της οδού Raf1/MEK σε ανώτερο επίπεδο ή ανεξάρτητα από το Ras.

NFκB. Οι Xin Lin και συν¹⁴⁵ μελέτησαν περαιτέρω τη συμβολή της Cot κινάσης στην ενεργοποίηση του NF-κΒ σε T-λεμφοκύτταρα. Συγκεκριμένα έδειξαν ότι μετά από ερεθισμό του συμπλέγματος CD3/CD28 η Cot ενεργοποιεί την κινάση NIK (NF-κΒ inducing kinase, MAP3K), η οποία συμμετέχει μέσω των IKK στην φωσφορυλίωση και αποδόμηση από το πρωτεοσωμάτιο του αναστολέα IκΒα, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του NF-κΒ. Επιπλέον έδειξαν ότι για την ενεργοποίηση του NF-κΒ με μηχανισμούς διαφορετικούς της TCR/CD3 διέγερσης σε T-λεμφοκύτταρα πχ. με επίδραση TNF-α δεν είναι απαραίτητο το Trl2. Αντίθετα, σε άλλα κύτταρα όπως οι εμβρυικοί ινοβλάστες, το Trl2 είναι απαραίτητο για την ενεργοποίηση του NF-κΒ από τον TNF-α¹⁴⁶. Αργότερα δείχθηκε ότι για την επαγόμενη από Trl2 ενεργοποίηση του NF-κΒ σε T-λεμφοκύτταρα απαραίτητη είναι η φωσφορυλίωση του Trl2 από τη Akt, μια κινάση σερίνης/θρεονίνης που δρα σε ανώτερο επίπεδο και έχει γνωστή επαγωγική δράση στον NF-κΒ¹⁴⁷. Οι Belich και συν¹⁴⁸ έδειξαν την ύπαρξη ενός πιθανού διαφορετικού τρόπου ενεργοποίησης του NF-κΒ που είναι η, μέσω σύνδεσης με Trl2, επιτάχυνση της αποδόμησης της p105 προδρόμου πρωτεΐνης (η οποία δρα σαν ανασταλτής της μεταφοράς της ενεργού υπομονάδας p50 στον πυρήνα, IκB-like activity) από το πρωτεοσωμάτιο. Σε B-λεμφοκύτταρα, συμμετέχει στην ενεργοποίηση του NF-κΒ που επάγεται από την LMP1 του EBV ή από τη διέγερση του CD40 δρώντας σε κατώτερο επίπεδο από τους TRAF2 και TRAF6 αντίστοιχα και χρησιμοποιώντας μάλλον και τους δύο προαναφερθέντες δρόμους^{149;150}. Επιπλέον, η p105 υποομάδα του NF-κΒ1 αποτελεί ανασταλτή του Trl2 αφού συνδέεται στοιχειομετρικά με το COOH άκρο του Trl2 στο κυτταρόπλασμα και αναστέλλει την καταλυτική του δράση^{139;151}, ενώ για απελευθέρωση και δράση του Trl2 απαιτείται η πρωτεοσωματική διάσπαση της p105 με την επίδραση της IκΒ (ρυθμιστικός ρόλος IκΒ σε ενεργοποίηση Trl2)^{152;153}. Μάλιστα θεωρείται πλέον ότι η φυσική μορφή του Trl2 στο κυτταρόπλασμα διατηρείται μόνο σε σύμπλεγμα με την p105¹⁵⁴.

Φαινότυπος διαγονιδιακών ποντικών με έλλειψη Trl2 και TNFα επιδράσεις.

Περαιτέρω ανάλυση της φυσιολογίας του Trl2 έγινε από τους Ballester και συν¹⁵⁵ και Dumitru και συν¹⁵⁶ με τη μελέτη της σημασίας του στην παραγωγή TNF-α από ενεργοποιημένα κύτταρα Jurkat οι πρώτοι, και από μακροφάγα ή σπληνοκύτταρα διεγερμένα με βακτηριακό λιποπολυσακχαρίτη LPS, οι δεύτεροι. Αποδείχθηκε ότι διαγονιδιακά ποντικά με εξουδετερωμένο το γονίδιο Trl2 είναι ανθεκτικά στο σηπτικό σοκ που επάγουν οι LPS λόγω μη παραγωγής TNF-α, ενώ παράγουν TNF-α ως απάντηση σε άλλα ερεθίσματα πχ. anti-CD3/anti-CD28 ή PMA/ιονομυκίνη. Ο ρόλος της τοποθετείται κατά πάσα πιθανότητα στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση του

TNF-α με μεταφορά του mRNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, την οποία ευοδώνει μέσω του ERK δρόμου. Αποδείχθηκε ότι το Trl2 είναι αναγκαίο για την ενεργοποίηση του ERK1/2 δρόμου από LPS, αλλά όχι και των JNK και p38 οδών. Παράλληλα, έδειξαν ότι η ενεργοποίηση του NF-κB από LPS δεν απαιτεί Trl2. Άλλες μελέτες έδειξαν ότι το Trl2 είναι απαραίτητο στην, μέσω TNFα/TNFR1/TRAF2, ενεργοποίηση της ERK οδού σε μακροφάγα¹⁵⁰ και των ERK, JNK οδών σε εμβρυικούς ινοβλάστες¹⁴⁶, πράγμα που εξηγεί γιατί σε διπλά διαγονιδιακά ποντίκια $Tnf^{\Delta ARE}Trl2^{-/-}$ δεν αναπτύσσεται το TNFα-επαγόμενο σύνδρομο φλεγμονώδους νόσου του εντέρου, όπως συμβαίνει στα $Tnf^{\Delta ARE}$ ποντίκια¹⁵⁷.

Προ-αποπτωτική δράση. Πειράματα έκτοπης έκφρασης του Trl-2 σε μη μεταμορφωμένα κύτταρα HEK293 και REF52 έδειξαν ότι μπορεί να διεγείρει την απόπτωση προάγοντας τη δημιουργία προαποπτωτικού συμπλέγματος με προκασπάση 9, Tvl-1 και Trl-2¹⁵⁸. Για τη λειτουργία αυτή απαραίτητη είναι η περιοχή της πρωτεΐνης με δραστηριότητα κινάσης.

COX-2. Το Trl2 μεσολαβεί στην έκφραση COX-2 σε ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα μέσω NFAT¹⁵⁹, στην επαγόμενη από LPS έκφραση COX-2 και παραγωγή PGE2 σε μακροφάγα πιθανώς μέσω ERK1/2 ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα CREB¹⁶⁰, καθώς και στην επαγόμενη από LPM1 έκφραση COX-2 πιθανώς μέσω του NF-κB¹⁴⁹, συμβάλλοντας έτσι στην ογκογόνο δράση του EBV.

IL-8. Επάγει την IL-8 προφλεγμονώδη χημειοκίνη, μέσω ERK/NFκB¹⁶¹.

IL-12. Ανασταλτική ρύθμιση της IL-12 δείχθηκε σε μονοκύτταρα-μακροφάγα, αφού Trl2^{-/-} κύτταρα που διεγείρονται με βακτηριδιακό DNA ή LPS¹⁶² παράγουν αυξημένη ποσότητα IL-12 εξαιτίας αναστολής των αναστολέων της.

Ρύθμιση

Η έκφρασή του αυξάνεται με την επίδραση σημάτων που ενεργοποιούν τα T-λεμφοκύτταρα. Αυτό γίνεται πιθανώς με διέγερση του μεταγραφικού παράγοντα AP1 μέσω της οδού JNK/SAPK¹⁶³. Η δραστηριότητά της κινάσης αλλά και τα επίπεδά της στο κυτταρόπλασμα καθορίζονται από τη δέσμευσή της από την p105 μέσω τμήματος της καρβοξυτελικής ουράς της^{138;151}, όπως αναφέρθηκε. Έτσι, για την ενεργοποίησή της είναι απαραίτητη η δράση της IKKβ που οδηγεί σε αποδόμηση της p105 ανασταλτικής πρωτεΐνης^{139;152}. Για την ενεργοποίηση της καταλυτικής της

δραστικότητας είναι απαραίτητη- αλλά πιθανώς όχι αρκετή- η φωσφορυλίωσή στη θέση Thr-290¹⁶⁴, ενώ ενεργοποιείται με Ser-400 φωσφορυλίωση από την Akt στην κατεύθυνση της διέγερσης του NFκB¹⁴⁷. Οι Ηλιόπουλος και συν¹⁶⁵ έδειξαν πρόσφατα ότι η τυροσινική κινάση Syk αποτελεί πιθανόν τον παράγοντα που ενεργοποιεί την Cot στην οδό της διέγερσης της ERK από τον TNFα. Οι Padma και συν¹⁶¹ ταυτοποίησαν τον hKSR-2 (kinase supporter of Ras) που αποτελεί ένα νέο μέλος της οικογένειας των μορίων προσαρμογής του Ras και έδειξαν ότι αναστέλλει την καταλυτική ικανότητα του Trp2 στον ERK δρόμο καθώς και την ικανότητα ενεργοποίησης του NFκB.

Η αποδόμηση της πρωτεΐνης γίνεται από το πρωτεοσωμάτιο, μετά την απελευθέρωσή της από την p105. Η αναδιαταγμένη μορφή Trp2 στην οποία λείπει τμήμα της καρβοξυτελικής ουράς είναι πιο δραστική, αφού δε δεσμεύεται από την ανασταλτική p105, αλλά και πιο σταθερή αφού έχει χάσει την αλληλουχία που διευκολύνει την αποδόμηση από το πρωτεοσωμάτιο.

Ογκογένεση

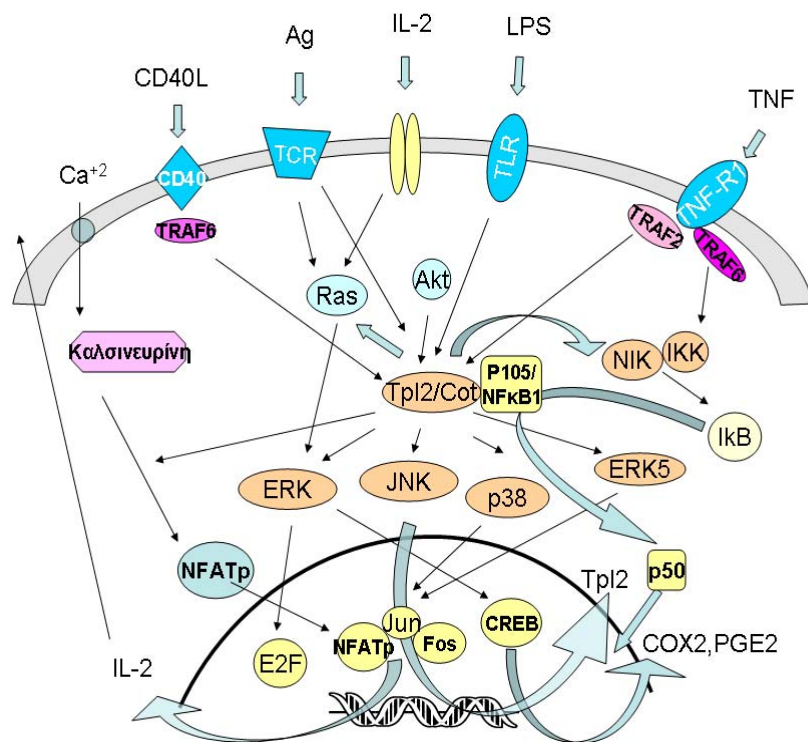
Πειραματικά δεδομένα. Τόσο η υπερέκφραση της φυσικής ογκοπρωτεΐνης Cot όσο και η παρουσία της αναδιαταγμένης στο καρβοξυτελικό της άκρο πρωτεΐνης μπορούν να προκαλέσουν σε κυτταρική μεταμόρφωση. Σε NIH 3T3 ινοβλάστες με σταθερή έκφραση της αναδιαταγμένης¹²⁴ ή της φυσικής^{126;133} Cot αναπτύσσονται εστίες μεταμορφωμένων κυττάρων και το ίδιο συμβαίνει με υπερέκφραση της φυσικής πρωτεΐνης σε κύτταρα SHOCK¹²⁵. Σε αρουραίους μολυσμένους με MoMuLV αναπτύσσονται T-κυτταρικά λεμφώματα, ενώ ποντίκια που μολύνονται με MMTV(mouse mammary tumor virus) αναπτύσσουν καρκινώματα μαστού. Στη διάρκεια της καλλιέργειας κύτταρων από τους όγκους αυτούς αποκαλύπτονται αυξανόμενοι αριθμοί προϊόν ενσωματωμένων στο DNA. Το γονίδιο Trp2 είναι μία από τις περιοχές όπου συμβαίνει η ενσωμάτωση, σε ποσοστό 22.5% των T-λεμφωμάτων που μελετήθηκαν¹²⁷ και σε 1 από 18 καρκινώματα μαστού¹³⁷. Η ενσωμάτωση συμβαίνει μεταξύ των 2 τελευταίων εξονίων και προκαλεί την έκφραση κολοβωμένης πρωτεΐνης. Οι Ceci και συν¹³⁶, σε θυμοκύτταρα διαγονιδιακών ποντικών στα οποία εκφράστηκε Trp2, είτε φυσικού τύπου είτε ελλιπούς στο C-άκρο, υπό τη ρύθμιση του Ick επαγωγέα, έδειξαν την ανάπτυξη T-λεμφοβλαστικών λεμφωμάτων στα δεύτερα, η οποία μάλιστα σχετιζόταν θετικά με υψηλότερα επίπεδα έκφρασης αυτής, αποδεικνύοντας έτσι την ογκογενετική δράση του γονιδίου.

Σε ιστούς ανθρώπινης προέλευσης, σε επίπεδο mRNA, αυξημένη έκφραση βρέθηκε σποραδικά σε κυτταρικές σειρές ηπατοκυτταρικού καρκινώματος¹²⁵, σε ιστικά παρασκευάσματα από καρκίνο στομάχου και παχέος εντέρου¹³⁵ και στο 40% των ιστικών παρασκευασμάτων από καρκίνο του μαστού που μελετήθηκαν¹⁶⁶. Σε επίπεδο πρωτεΐνης, με ανοσοϊστοχημικές χρώσεις, το Trp2 εκφράζεται από τα κύτταρα Reed-Sternberg του λεμφώματος Hodgkin's και σε ρινοφαρυγγικό καρκίνο¹⁴⁹. Τέλος, οι Clark και συν¹⁶⁷ ταυτοποίησαν την πρώτη μετάλλαξη του γονιδίου σε ανθρώπινη κακοήθεια. Πρόκειται για μετάλλαξη που προκαλεί αναδιάταξη του 3' άκρου του, πιθανόν ύστερα από σύντηξη με αλληλουχίες από το χρ.9, σε κακοήθη κύτταρα από πρωτοπαθές αδenoκαρκίνωμα πνεύμονα.

Μηχανισμοί ογκογένεσης. Έχει υποστηριχθεί ότι η ικανότητα της Cot να προκαλεί κυτταρική μεταμόρφωση οφείλεται στην ικανότητά της να ενεργοποιεί το c-Jun, μέλος της οικογένειας του μεταγραφικού παράγοντα AP-1, μέσω JNK-εξαρτώμενων αλλά και ανεξάρτητων οδών (p38, ERK5)¹³³. Ακόμη, η διαταραχή της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου με την αναστολή του p27^{kip} και τη διέγερση του E2F, η συμμετοχή της στην παραγωγή IL-2 από λεμφωματικά κύτταρα, η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB και ο ρόλος της στην έκφραση COX-2 είναι μερικοί από τους γνωστούς μηχανισμούς με τους οποίους η Cot κινάση μπορεί να συμβάλλει στην ογκογένεση.

Σύνοψη

Συνοπτικά ο ρόλος του γονιδίου περιλαμβάνει: Διέγερση MAP κινασών (ERK, p38, JNK, ERK5), αλλά και άλλων οδών (NFκB, NFAT) κάτω από την επίδραση IL-2, LPS, TNFα, CD40 ligand, LPM1, CD3/CD28 με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων όπως των CREB, E2F, AP-1 και την παραγωγή IL-2, TNF-α, COX-2 και PGE2 από LPS. Δηλαδή συμμετέχει σε πολύπλοκες διαδικασίες κατά την ενεργοποίηση λεμφοκυττάρων, τη φλεγμονή και την ογκογένεση, Εικόνα 2.



Εικόνα 2. Συνοπτική απεικόνιση των οδών μεταγωγής σήματος στις οποίες συμμετέχει η κινάση Tpl2/Cot.

2. Gfi1

Το πρωτο-ογκογονίδιο Gfi1 (Growth Factor Independence-1) κλωνοποιήθηκε το 1993 από περιοχές ενσωμάτωσης προϊόντων σε T-λεμφώματα επαγόμενα από MuLV σε αρουραίους, στις κυτταρικές σειρές που επιλέχθηκαν από τον αρχικό κλώνο για την ανάπτυξή τους ανεξάρτητα από την προσθήκη IL-2¹⁶⁸. Το ομόλογό του στον άνθρωπο κλωνοποιήθηκε το 1995, εντοπίζεται στη θέση 1p22, αποτελείται από 7 εξόνια και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με M.B. 45kDa και 422 αμινοξέα, ενώ το ομόλογό του στο ποντίκι εντοπίζεται στο κεντρικό τμήμα του χρ.5 και στον αρουραίο στη θέση 14p22¹⁶⁹, με τα οποία παρουσιάζει 81% ομολογία¹⁷⁰.

Πρωτεϊνική δομή

Η πρωτεΐνη Gfi1 περιέχει 6 περιοχές θυλάκων ψευδαργύρου (zinc finger domains) στο καρβοξυτελικό της άκρο με τις οποίες συνδέει το DNA και μια περιοχή

με δραστικότητα μεταγραφικού αναστολέα (SNAG) στο αμινοτελικό της άκρο^{171;172}. Οι περιοχές αυτές ομοιάζουν με τις αντίστοιχες του Gfi1b, του Gsh1 και της σχετιζόμενης με ινσουλίωμα πρωτεΐνης IA-1, με τις οποίες ανήκει σε κοινή οικογένεια μεταγραφικών αναστολέων. Πρόσφατα αναφέρθηκε η συνεργασία της με τον συν-καταστολέα ETO¹⁷³.

Πλούσιοι στο μετάγραφο αυτό βρέθηκαν ο μυελός¹⁷⁴, ο θύμος (αρχέγονα και ώριμα λεμφοκύτταρα¹⁷⁵), το εμβρυονικό έσω ους¹⁷⁶ και λιγότερο ο σπλήνας και οι όρχεις τρωκτικών¹⁶⁸, ενώ στον άνθρωπο εκφράζεται από πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα, είτε αρχέγονα, πολυδύναμα είτε και δεσμευμένα, τόσο της μυελικής όσο και της λεμφικής σειράς^{177;178} και από νευροενδοκρινικά κύτταρα πνεύμονα¹⁷⁹.

Παρόλη την τεκμηριωμένη σχέση του με λεμφωματογένεση σε πειραματικά μοντέλα, δεν έχει ακόμα μελετηθεί in vivo σε ανθρώπινης προέλευσης αιματολογικές κακοήθειες.

Λειτουργία

Ενεργοποίηση και πολλαπλασιασμός ωρίμων λεμφοκυττάρων. Το Gfi1 εκφράζεται σε πρώιμα T λεμφοκύτταρα, έως το στάδιο των διπλά θετικών CD4/CD8 κυττάρων^{180;181}. Στα ώριμα λεμφοκύτταρα επάγεται νωρίς μετά από διέγερση με αντι-CD3 ή con A^{182;183}, και επιταχύνει την είσοδο των T-λεμφοκυττάρων σε S φάση, πιθανόν μέσω καταστολής του p21^{waf1} ή CDKN1A, αναστολέα της κυκλινο-εξαρτώμενης κινάσης CDK2, ο οποίος ρυθμίζει την παύση σε G1¹⁸³. Παράλληλα, αναστέλλει την απόπτωση των ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων¹⁸³ καταστέλλοντας τη μεταγραφή των προαποπτωτικών Bax και Bak¹⁸⁴. Ακόμη, το Gfi1 συμμετέχει σε οδούς ενεργοποίησης από κυτταροκίνες: στη μέσω STAT-3 ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων από την IL-6¹⁸², στην αύξηση της ευαισθησίας T-λεμφοκυττάρων στην IL-2¹⁷⁵ και στη μέσω STAT-6 Th2 διαφοροποίηση των CD4 λεμφοκυττάρων υπό την επίδραση της IL-4¹⁸⁵.

Λεμφοποίηση. Υπερέκφρασή του σε διαγονιδιακά ποντίκια έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση του αριθμού των περιφερικών CD4 και CD8 θετικών κυττάρων, σαν αποτέλεσμα της αναστολής της διαδικασίας TCR β-επιλογής των DN θυμοκυττάρων¹⁸¹ φαινόμενο το οποίο αναστρέφεται αν ταυτόχρονα υπερεκφραστεί και το Pim1¹⁸⁰. Ποντίκια στα οποία έχει απαλειφθεί το Gfi1 έχουν ελαττωμένο αριθμό θυμοκυττάρων και αυξημένο ποσοστό CD8 κυττάρων¹⁸⁶ εξαιτίας αυξημένης απόπτωσης, ελάττωσης του πολλαπλασιασμού και απορρύθμισης του μηχανισμού επιλογής των MHC-περιορισμένων κυττάρων. Ωστόσο οι Doan LL και συν¹⁷⁵ έδειξαν

το αντίθετο: ποντίκια διαγονιδιακά για Gfi1b έχουν χαμηλότερο ποσοστό CD8 λεμφοκυττάρων, εξαιτίας ελάττωσης των υποδοχέων της IL-7 σε αυτά, πράγμα που διορθώνεται στο επίπεδο του θύμου (δηλ. των πρωίμων CD8) όταν υπερεκφραστεί ταυτόχρονα και το Gfi1. Παρόμοια σε ανθρώπους με μεταλλάξεις του Gfi1 παρατηρείται ελαττωμένος αριθμός περιφερικών T- και B- λεμφοκυττάρων και ελαττωμένη ενεργοποίηση αυτών μετά από διέγερση με PHA ή αλλοαντιγόνα¹⁸⁷.

Κοκκιοποίηση. Ποντίκια από τα οποία έχει απαλειφθεί το Gfi1 παρουσιάζουν ουδετεροπενία και λοιμώξεις από gram+ βακτηρίδια^{188;189}. Το κοινό προγονικό κύτταρο των μονοπύρηνων-μακροφάγων/κοκκιοκυττάρων είναι ανίκανο να διαφοροποιηθεί προς την κοκκιοκυτταρική σειρά μετά από επίδραση G-CSF, αλλά διαφοροποιείται προς μονοπύρηννα/μακροφάγα, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση αώρων μονοπυρηνικών κυττάρων στο αίμα και τον μυελό αυτών. Η δράση του στα προγονικά κύτταρα ασκείται πιθανώς μέσω ρύθμισης άλλων μεταγραφικών παραγόντων, όπως οι C/ERBa και Ets¹⁹⁰. Πρόσφατα βρέθηκε πως το Gfi1 καταστέλλει την Ela2, η οποία αποτελεί τη συχνότερη αιτία της βαριάς συγγενούς ουδετεροπενίας και της κυκλικής ουδετεροπενίας. Σε 2 ασθενείς με συγγενή ουδετεροπενία βρέθηκαν μεταλλάξεις του Gfi1 με επικρατούντα χαρακτήρα¹⁸⁷.

Αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (Haemopoietic Stem Cells, HSC). Οι Hock H και συν¹⁹¹ έδειξαν πως ποντίκια από τα οποία έχει απαλειφθεί το Gfi1 έχουν υψηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού των HSC, τα οποία όμως έχουν ελαττωματική λειτουργικότητα και αδυναμία να συντηρήσουν τη μυελοποίηση σε μεταμοσχευμένα ζώα, όπως φάνηκε σε πειράματα σειριακών μεταμοσχεύσεων και μεταμοσχεύσεων με μείγματα Gfi1^{-/-} και Gfi1⁺ HSC. Τα νεαρά ποντίκια έχουν καλή μυελοποίηση αλλά αργότερα εμφανίζουν λειτουργικές ανωμαλίες των HSC, πιθανώς λόγω της εξάντλησης της ικανότητας αυτοανανέωσης των HSC σαν αποτέλεσμα υπερβολικού πολλαπλασιασμού. Ένας από τους πιθανούς μηχανισμούς με τους οποίους το Gfi1 ρυθμίζει τη αιμοποίηση είναι η καταστολή του p21^{Cip1/Waf1}.

Νευρικό σύστημα. Κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη ποντικών Gfi1 mRNA εκφράζεται σε πολλές περιοχές του ΚΝΣ και ΠΝΣ, αλλά αργότερα στην ανάπτυξη η πρωτεΐνη ανευρίσκεται κυρίως σε περιοχές αισθητηρίων οργάνων. Έτσι, ποντίκια Gfi1^{-/-} παρουσιάζουν διαταραχή συμπεριφοράς που σχετίζεται με κώφωση, εξαιτίας βλάβης στα κοχλιακά κύτταρα¹⁷⁶.

Ο μηχανισμός με τον οποίο εκδηλώνεται η ανασταλτική δράση του Gfi1 στη μεταγραφή ορισμένων γονιδίων φαίνεται ότι περιλαμβάνει συνεργασία με την αποακετυλάση ιστόνης 1 (HDAC1) και τη μεθυλτρανσφεράση G9a¹⁹².

Ρύθμιση

Ο επαγωγέας του Gfi1 περιέχει AP-1¹⁹³ δεσμευτικές περιοχές και η μεταγραφή του διεγείρεται μέσω της MAPK/ERK οδού κατά την ενεργοποίηση του TCR¹⁸³. Επίσης, παρατηρείται και αυτορύθμιση με αρνητικό feedback από το Gfi1¹⁹⁴, ενώ καταστέλλεται και από το Gfi1b¹⁹⁴.

Ογκογένεση

Πειραματικά δεδομένα. Όπως αναφέρθηκε, το γονίδιο Gfi1 αποτελεί θέση ενσωμάτωσης προϊόν σε MoMuLV- επαγόμενα T-λεμφώματα, η ενεργοποίηση του οποίου προσδίδει ανεξαρτησία από την IL-2 στις κυτταρικές σειρές που προέρχονται από τα λεμφώματα αυτά¹⁶⁸. Σε διπλά διαγονιδιακά E-mu L-myc/Pim1 ποντίκια που μολύνονται με MoMuLV αναπτύσσονται T και B λεμφώματα, στο 53% των οποίων ανευρίσκονται προϊόι ενσωματωμένοι στην περιοχή του Gfi1, γεγονός που οδηγεί στην αυξημένη του έκφραση^{195;196}. Παρόμοια σε διαγονιδιακά E-mu-myc ποντίκια που μολύνονται με MoMuLV αναπτύσσονται B-λεμφώματα, στο 20% των οποίων ανευρίσκονται προϊόι ενσωματωμένοι στην περιοχή του Gfi1¹⁹⁷. Οι Schmidt T και συν¹⁸⁰ έδειξαν ότι η σταθερή έκφραση του Gfi1 σε T-λεμφοκύτταρα ποντικών κάτω από τη ρύθμιση του Ick επαγωγέα προδιαθέτει σε ανάπτυξη T-λεμφομάτων με χαμηλή συχνότητα, η οποία αυξάνεται αν υπερεκφραστεί ταυτόχρονα το Pim-1 ή το L-myc. Με microarrays βρέθηκε να υπερεκφράζεται σε σπληνικό B-λέμφωμα τρωκτικών από κύτταρα της μεθοριακής ζώνης¹⁹⁸. Στον άνθρωπο αναφέρεται συμμετοχή του στη διαδικασία ανάπτυξης νευροενδοκρινικών όγκων πνεύμονα¹⁷⁹ και στην αναστολή της παραγωγής 1,25 διυδροξυβιταμίνης D από κυτταρικές σειρές καρκίνου προστάτη πράγμα που συμβάλλει στην κακοήθη μεταμόρφωσή τους¹⁹⁹.

Μηχανισμοί ογκογένεσης. Σταθερή έκτοπη έκφραση Gfi1 σε λεμφοκύτταρα που εξαρτώνται για την επιβίωσή τους από την IL-2 τα καθιστά προσωρινώς ανεξάρτητα από αυτήν. Αυτό συμβαίνει πιθανώς λόγω καταστολής γονιδίων που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο (πχ. p21^{Waf1}) επιτρέποντας στα κύτταρα να διαφύγουν από την παύση σε G1 που προκαλεί η απόσυρση της IL-2^{171;196}, καθώς και με την καταστολή προ-αποπτωτικών γονιδίων (Bax, Bak)¹⁸⁴. Μελετώντας περαιτέρω τους μηχανισμούς ογκογένεσης βρέθηκε ότι μπλοκάρει την ανασταλτική δράση της πρωτεΐνης PIAS3 στην STAT-3, μεγεθύνοντας τη δραστηριότητα της τελευταίας στη μεταγωγή σημάτων από μιτογόνες κυτταροκίνες¹⁸². Σε κύτταρα Jurkat διεγείρει την είσοδο στην S φάση και τον πολλαπλασιασμό και αναστέλλει την μετά από αντι-CD3

ενεργοποίηση επαγόμενη απόπτωση, με ρυθμιστική επίδραση (αναστολή) στη G1 παύση και βράχυνση όλων των φάσεων του κυτταρικού κύκλου¹⁸³. Τα παραπάνω δείχνουν πως το Gfi1 είναι ένα πρωτο-ογκογονίδιο με χαμηλή ογκογόνο δραστηριότητα που συνεργάζεται με άλλες ογκοπρωτεΐνες, όπως οι Pim1 και Myc στην επαγωγή της λεμφωματογένεσης.

3. Pim1

Το ογκογονίδιο Pim1 (Proviral Integration site for MuLV) ανακαλύφθηκε το 1984 από τους Cuypers και συν²⁰⁰ ως θέση ενσωμάτωσης προϊόν σε T-λεμφώματα ποντικών επαγόμενα από MoMuLV. Η ενσωμάτωση συμβαίνει συνήθως (>70%) στο 3' άκρο του γονιδίου μετά το τέλος της περιοχής που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη και έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή αναλλοίωτης πρωτεΐνης σε υψηλότερα από τα φυσιολογικά επίπεδα (σταθεροποίηση mRNA), αλλά ενίοτε και στο 5' άκρο, οδηγώντας όμως σε λιγότερο υψηλά επίπεδα έκφρασης^{200;201}.

Το ομόλογό του στον άνθρωπο εντοπίζεται στη θέση 6q21^{202;203}, έχει 6 εξόνια και παρουσιάζει ομολογία κατά 94% με το αντίστοιχο του ποντικού²⁰⁴⁻²⁰⁶, το οποίο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17²⁰¹ (Pim2 στο X, Pim3 στο 22). Νουκλεοτιδική και πρωτεϊνική ομολογία του Pim1 μεταξύ των διαφόρων ειδών δείχνει τον υψηλό βαθμό της εξελικτικής του συντήρησης και κατά συνέπεια την εξελικτική του σημασία.

Πρωτεϊνική δομή

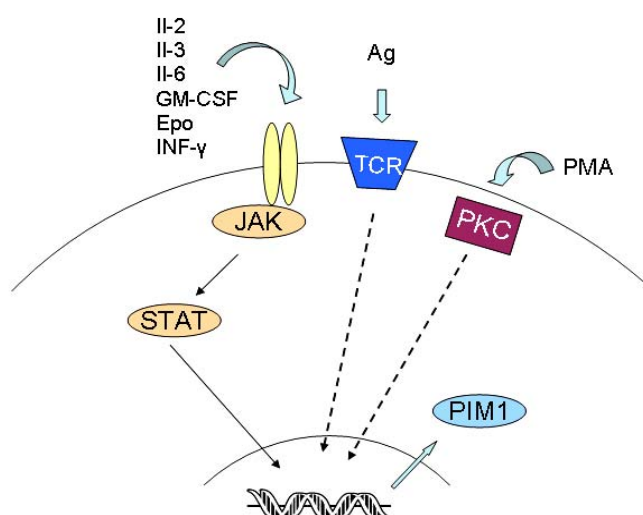
Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με M.B. 34 kDa και 313 αμινοξέα, η οποία είναι κινάση σερίνης-θρεονίνης, βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα²⁰⁷ και ανήκει στην ομάδα των κυτταροπλασματικών πρωτο-ογκοπρωτεϊνών που είναι κινάσες σερίνης-θρεονίνης, ωστόσο, αντίθετα από αυτές δεν απαιτείται ενεργοποίηση από άλλες κινάσες για τη δράση του. Μπορεί να μεταναστεύει και στον πυρήνα ανάλογα με το είδος του κυττάρου και τη φάση ωρίμανσης²⁰⁸.

Εκφράζεται από μια ποικιλία φυσιολογικών και κακοηθών κυττάρων. Υψηλή έκφραση βρέθηκε σε αιμοποιητικά κύτταρα και στους όρχεις²⁰⁹⁻²¹¹.

Αιμοποίηση και διαφοροποίηση αιμοποιητικών κυττάρων. Η κινάση Pim1 συμμετέχει στην, μέσω IL-7, ωρίμανση προγονικών θυμοκυττάρων από CD4-/CD8- σε CD4+/CD8+²¹². Αναστέλλει τη διακοπή στην ωρίμανση των DN θυμοκυττάρων που προκαλεί το Gfi1 σε διαγονιδιακά Pim1/Gfi1 ποντίκια¹⁸¹. Για τις επιδράσεις αυτές φαίνεται ο μεταγραφικός παράγων c-Myb είναι απαραίτητο υπόστρωμα²¹³. Το Pim1 συμμετέχει επίσης με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο στη ρύθμιση του μεγέθους του πληθυσμού των πρωίμων B-λεμφοκυττάρων του μυελού²¹⁴. Ακόμη, στην μονοβλαστική κυτταρική σειρά U937 βρέθηκε πως αναστέλλει την PMA- επαγόμενη διαφοροποίηση²¹⁵.

Η έκφρασή του Pim1 επάγεται από αυξητικούς παράγοντες αιμοποιητικών κυττάρων (Εικόνα 3) όπως η IL-3, η IL-7 και η Epo²¹⁶⁻²²⁰ (μέσω JAK2/STAT-5), ο GM-CSF²²¹ (ο υποδοχέας του μοιράζεται την β άλυσο με τον υποδοχέα της IL-3 και IL-5), η IL-6²²² (μέσω STAT3), η INF-γ και ο SCF (Stem Cell factor) στη MO7e κυτ.σειρά μυελοειδούς λευχαιμίας (μέσω STAT-1)²²³. Σε T-λεμφοκύτταρα επάγεται από conA²²⁴, IL-2^{225;226}, αντι CD3, PMA (μέσω PKC)²²⁷.

Συμμετέχει ακόμα στην ενεργοποίηση λεμφοκυττάρων διεγείροντας την παραγωγή IL-2 (κύτταρα Jurkat) με άμεση επίδραση (φωσφορυλίωση) στον NFATc²²⁸.



Εικόνα 3. Οι οδοί ενεργοποίησης της έκφρασης Pim1. Ag = αντιγόνο, TCR = υποδοχέας T-λεμφοκυττάρου, PKC = πρωτεϊνική κινάση C.

Ρύθμιση κυτταρικού κύκλου. Η έκφρασή της αυξάνεται κατά τη μετάβαση από πρόιμη σε όψιμη G1 φάση και παραμένει υψηλή στις S, G2 φάσεις²²⁹, ενώ στη διάρκεια της μίτωσης επάγει τη δημιουργία του απαραίτητου για τη μίτωση συμπλόκου μεταξύ των πρωτεϊνών NuMA, HP1beta, dynein και dynactin²³⁰.

Επιβίωση. Ευαισθητοποιεί τα κύτταρα στη c-myc-επαγόμενη απόπτωση μέσω της ενεργοποίησης της κασπάσης-3²³¹ και της φωσφατάσης Cdc25A²³², αλλά κυρίως έχει αντι-αποπτωτική δράση όπως φαίνεται από την αυξημένη επιβίωση κυττάρων με υψηλή έκφραση Pim1 μετά από απόσυρση κυτταροκινών από τις οποίες φυσιολογικά εξαρτώνται, όπως η IL-3²³³. Η αντι-αποπτωτική δράση συνδέεται ως ένα βαθμό με ρύθμιση του Bcl-2^{234;235}.

Φαινότυπος διαγονιδιακών ποντικών με έλλειψη Pim1. Διαγονιδιακά ποντίκια με έλλειψη του Pim1 δεν έχουν προφανείς ανωμαλίες, εκτός από ελαττωμένο MCV ερυθροκυττάρων²³⁶ και ελαττωματική απάντηση μυελικών μαστοκυττάρων σε IL-3 σε καλλιέργειες^{216;217}. Επίσης, παρουσιάζουν ελαττωματική απάντηση των προγονικών B-λεμφοκυττάρων σε IL-7 και SCF²¹⁴.

Ρύθμιση

Οι αιμοποιητικοί αυξητικοί παράγοντες διεγείρουν τη μεταγραφή του, όπως αναφέρθηκε. Μπορεί να υποστεί και μετα-μεταγραφική ρύθμιση με επιδράσεις στην 3'-UTR περιοχή και σταθεροποίηση του mRNA πχ. μετά ενσωμάτωση του MuLV στην αντίστοιχη περιοχή του DNA του γονιδίου. Με μετα-μεταγραφική ρύθμιση φαίνεται να δρα εν μέρει και η ConA διέγερση. Ακόμη, μπορεί να ρυθμίζεται σε επίπεδο μετάφρασης με επιδράσεις στην ανασταλτική 5'-UTR περιοχή του mRNA και μετα-μεταφραστικώς με αύξηση της σταθερότητας του μορίου πχ. με αναστολή της ουβικιουτινίωσης και αποδόμησης από το πρωτεοσωμάτιο²⁰⁸.

Ογκογένεση

Πειραματικά δεδομένα. Σε επαγόμενα από προιούς T-cell λεμφώματα ποντικών ενσωμάτωση στην περιοχή του Pim ανευρίσκεται στο 50% των πρώιμα αναπτυσσόμενων λεμφωμάτων (πρώτο 6μηνο)²⁰⁰. Πιο σπάνια ανευρίσκεται σε επαγόμενα από προιούς B-cell λεμφώματα^{237;238}. Επίσης αποτελεί περιοχή ενσωμάτωσης προιών σε Friend helper leukemia virus (F-MuLV)-επαγόμενη ερυθρολευχαιμία ποντικών (ταυτόχρονα με myc)²³⁹. Σε διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν Pim1 στα λεμφοκύτταρά τους κάτω από τη μεταγραφική ρύθμιση του

ενισχυτή της βαριάς αλύσου των ανοσοσφαιρινών (Emu) αναπτύσσονται λεμφώματα, κυρίως T, σε χαμηλή συχνότητα (5-10%) και με μακρά περίοδο επώασης 7 μηνών, η οποία όμως βραχύνεται σημαντικά μετά από έκθεση σε MuLV²⁴⁰ ή ακτινοβολία²⁴¹ ή χημικά καρκινογόνα^{242;243}. Σε πολλές περιπτώσεις επιβεβαιώθηκε η συνεργασία των Pim και Myc σε T και B νεοπλασίες^{244;245}. Αυτές οι παρατηρήσεις ενισχύθηκαν και με διασταυρώσεις ποντικών διαγονιδιακών είτε για Myc ή για Pim1 οπότε παρατηρήθηκε τεράστια επιτάχυνση της λεμφωματογένεσης (προ-B λευχαιμία ενδομητρικώς)²⁴⁶.

Ευρήματα στον άνθρωπο συμπεριλαμβάνουν την ανεύρεση υψηλής έκφρασης ή αναδιατάξεων του Pim1 στην κυτ.σειρά CML K562²⁰³, σε δείγματα από διάφορες οξείες μυελοβλαστικές και λεμφοβλαστικές λευχαιμίες²⁰⁹, όπως και σε B-NHL σε μεταθέσεις όπου εμπλέκεται το BCL6¹⁰⁷. Σε μια δευτεροπαθή από ακτινοβολία OMA βρέθηκε να συμμετέχει στη μετάθεση (1;6)(p12;p23) που περιελάμβανε επίσης το *pras-1*²⁴⁷. Υπερεκφράζεται σε καρκίνο προστάτη (μαζί με *myc*)²⁴⁸⁻²⁵¹, στη CML²⁵², σε *myc*-related κακοήθειες, όπως το *Λ.Burkitt*²⁵³, στη βλαστοειδή ποικιλία του λεμφώματος μανδύα^{254;255}. Υπερμεταλλάξεις του γονιδίου έχουν βρεθεί σε λέμφωμα από μεγάλα B-κύτταρα του ΚΝΣ²⁵⁶ και άλλων ιστών⁸³.

Μηχανισμοί ογκογένεσης. *Επίδραση σε απόπτωση και κυτταρικό πολλαπλασιασμό.* Οι Moroy και συν²⁵⁷ έδειξαν ότι η έκφραση του Pim1 σε διπλά διαγονιδιακά ποντίκια Emu-Pim1/Ipr διασώζει τα προερχόμενα από λεμφαδένες λεμφοκύτταρα από τη γρήγορη απόπτωση που υφίστανται φυσιολογικά *in vitro*, ενώ τα CD4/CD8 θετικά προγονικά θυμοκύτταρα επιβιώνουν από την επαγόμενη από δεξαμεθαζόνη απόπτωση *in vivo*. Παράλληλα, πειράματα σε μυελικές κυτταρικές σειρές ποντικών έδειξαν ότι η IL-3-εξαρτώμενη μυελοειδής κυτ.σειρά FDCP1 επιβιώνει μετά απόσυρση IL-3 ή έκθεση σε κυτταροτοξικά φάρμακα, όταν σε αυτήν υπερεκφραστεί το Pim1²³³ εξαιτίας αντι-αποπτωτικής δράσης σε συνεργασία με το Bcl-2^{234;235}. Δηλαδή η αυξημένη έκφραση του Pim1 μπορεί να διασώσει τα κύτταρα από το φαινόμενο της απόπτωσης μετά από απόσυρση κυτταροκινών. Επίσης, η υπερέκφραση του στη μονοβλαστική κυτταρική σειρά U937, έχει σαν αποτέλεσμα την σημαντική επιβράδυνση της PMA-επαγόμενης διαφοροποίησης και απόπτωσης των κυττάρων, λόγω αναστολής της PTP-U2S φωσφατάσης²¹⁵.

Όπως φάνηκε από τη χαμηλή συχνότητα με την οποία αναπτύσσουν λεμφώματα τα διαγονιδιακά ποντίκια και το μακρό λανθάνοντα χρόνο ανάπτυξης αυτών, το γονίδιο Pim1 δεν είναι ικανό από μόνο του να επάγει τη λεμφωματογένεση, αλλά μάλλον απαιτούνται επιπλέον γεγονότα, όπως η ενεργοποίηση άλλων ογκογονιδίων. Έτσι βρέθηκε ότι συνεργάζεται με ογκογονίδια όπως το Frat1²⁵⁸, το Gfi1^{180;197}, το E2a-Pbx1²⁵⁹, το *tiam-1*²⁶⁰, το *runx-2*²⁶¹, το c-Myb²⁶² και το c-myc²²².

Επίσης, ενεργοποιεί την φωσφατάση Cdc25A η οποία αποτελεί υπόστρωμα και του myc και αυξάνει την ογκογενετική της ικανότητα²³², ενώ μετά από επίδραση καρκινογόνων ουσιών αυξάνει την έκφραση της πυρηνικής πρωτεΐνης HDM2, η οποία ανταγωνίζεται το ογκοκατασταλτικό p53²⁵³.

4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Τα γονίδια Trp2 και Gfi1 αποτελούν, όπως αναφέρθηκε, σχετικά καινούρια μέλη της οικογένειας των κυτταρικών ογκογονιδίων για τα οποία υπάρχουν ενδείξεις για την πιθανή συμβολή τους στην διαδικασία ανάπτυξης και εξέλιξης ανθρώπινων νεοπλασματικών νόσων. Πρόκειται για γονίδια που συμβάλλουν στην ανάπτυξη λεμφοειδών νεοπλασιών κυρίως T- λεμφοκυτταρικής αρχής σε ζωικά πειραματικά μοντέλα.

Συγκεκριμένα η κινάση Trp2 όταν εκφράζεται με αναδιαταγμένο το καρβοξυτελικό της άκρο σε διαγονιδιακά ποντίκια προκαλεί την ανάπτυξη T-λεμφοβλαστικών λεμφωμάτων, ενώ και η υπερέκφραση της φυσικής πρωτεΐνης σε κυτταρικές σειρές επάγει κυτταρική μεταμόρφωση, μέσω MAPK εξαρτώμενων αλλά και MAPK ανεξάρτητων οδών. Στον άνθρωπο έχει βρεθεί υπερέκφραση σε EBV-σχετιζόμενους όγκους (Hodgkin's και ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα) και σε προχωρημένα στάδια καρκίνου μαστού, ενώ πρόσφατα βρέθηκε μετάλλαξη που αναδιατάσσει το 3' άκρο του γονιδίου σε καρκίνο πνεύμονα.

Αντίστοιχα, το γονίδιο που κωδικοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα Gfi1 αποτελεί επίσης θέση ενσωμάτωσης προϊόν σε MoMuLV-επαγόμενα T-λεμφώματα και προσδίδει μερική ανεξαρτησία από την IL-2 στις κυτταρικές σειρές που προέρχονται από αυτά, οι οποίες φυσιολογικά εξαρτώνται από την IL-2 για την επιβίωσή τους. Σε διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν Gfi1, αναπτύσσονται T-λεμφώματα σε χαμηλό ποσοστό, το οποίο όμως αυξάνει κατά πολύ αν ταυτόχρονα εκφραστούν τα c-Myc ή Pim1, ενώ υπερεκφράζεται και σε B-λεμφώματα που αναπτύσσονται σε διαγονιδιακά Emu-myc ποντίκια με την επίδραση MoMuLV. Στη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου αυτού έχει δειχθεί ο επαγωγικός ρόλος της οδού ERK, πιθανόν μέσω ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα AP-1 ύστερα από TCR διέγερση^{183;193}. Στον άνθρωπο δεν έχει γίνει έως τώρα καμία μελέτη σχετικά με το ρόλο του στην ανάπτυξη αιματολογικών κακοηθειών, ως επίσης δεν έχει ποτέ μελετηθεί ταυτόχρονα με το γονίδιο Trp2, το οποίο είναι γνωστό ότι διεγείρει την MEK/ERK/AP-1 οδό.

Τέλος, η κινάση Pim1 ανήκει, όπως και η Trp2, στις κυτταροπλασματικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης και διαθέτει αντι-αποπτωτικές και επαγωγικές του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ιδιότητες. Η ογκογόνος δράση της έχει επιβεβαιωθεί τόσο σε πειραματικά μοντέλα όσο και στον άνθρωπο, όπου έχει αποκαλυφθεί η συμμετοχή της σε μεταθέσεις σε Β-λεμφώματα, υπερέκφραση σε λεμφώματα σχετιζόμενα με Myc και σε λεμφώματα μανδύα, μεταλλάξεις σε λεμφώματα ΚΝΣ, αλλά και υπερέκφραση σε καρκίνο προστάτη και σε μυελοβλαστικές λευχαιμίες. Θεωρείται ογκογονίδιο με ρόλο στη φάση της έναρξης της κακοήθους εξαλλαγής, το οποίο απαιτεί προσθήκη άλλων γενετικών βλαβών, πχ. σε ογκογονίδια με τα οποία έχει βρεθεί ότι συνεργάζεται. Σε μια ενδιαφέρουσα προσέγγιση οι Mikkers και συν²⁶³ χρησιμοποίησαν κατευθυνόμενη μεταλλαξιογένεση (insertional mutagenesis) με MoMuLV σε ΕμMyc+/Pim1- ποντίκια προκειμένου να αναλύσουν από το DNA των λεμφωμάτων που αναπτύχθηκαν τις περιοχές ενσωμάτωσης προϊόν με sequencing σε μεγάλη κλίμακα. Αυτή η μέθοδος θα επέτρεπε την αποκάλυψη γονιδίων που μπορούν να υποκαταστήσουν το Pim1 στη συνέργειά του με το Myc. Από την ποικιλία των περιοχών που εντοπίστηκαν 9 βρέθηκαν να σχετίζονται με σχέση αλληλοαποκλεισμού, δηλαδή μη ταυτόχρονης ενσωμάτωσης με το Pim1, ανάμεσα στις οποίες περιλαμβάνονταν το γονίδιο Trp2. Αυτό σημαίνει ότι το Trp2, όσον αφορά την ογκογένεση, πρέπει να δρα εν παραλλήλω ή σε κατώτερο επίπεδο από το Pim1.

Στον άνθρωπο οι Β-λεμφοκυτταρικές κακοήθειες είναι κατά πολύ συχνότερες των Τ-, τουλάχιστον στο Δυτικό κόσμο. Έτσι, στην παρούσα μελέτη συμπεριλάβαμε σειρά ασθενών με Τ και Β λεμφοειδείς νεοπλασίες (λευχαιμίες ή λεμφώματα με λευχαιμική έκφραση) στις οποίες μελετήσαμε:

1. Την έκφραση των Trp2 και Gfi1. Η μελέτη έγινε χρησιμοποιώντας ημι-ποσοτική, συμβατική RT-PCR, καθώς και SybrGreen real-time RT-PCR σε λευκομονοπύρνα κύτταρα του περιφερικού αίματος των ασθενών.

2. Την πιθανότητα ύπαρξης σχέσης αποκλεισμού μεταξύ Trp2 και Pim1 ή η συνεργικής σχέσης μεταξύ Pim1 και Gfi1.

3. Με δεδομένη τη μελέτη των Σουρβίνος και συν¹⁶⁶ στην οποία η υπερέκφραση Trp2 στο 40% ιστολογικών δειγμάτων καρκίνου μαστού αποδόθηκε κατά το ήμισυ σε γονιδιακή ενίσχυση με αυτοπολλαπλασιασμό του γονιδίου, μελετήσαμε την πιθανότητα γονιδιακής ενίσχυσης του Trp2 δείγματα με multiplex PCR στο DNA που απομονώθηκε από τα δείγματα.

4. Με βάση τον ήδη γνωστό ρόλο του Trp2 στην παραγωγή TNF-α και IL-2, προχωρήσαμε στην ανίχνευση των επιπέδων των κυτταροκινών αυτών στα υπό

μελέτη δείγματα. Η μελέτη έγινε με την ανοσοενζυματική μέθοδο ELISA σε δείγματα ορού των ασθενών.

5. Με δεδομένη την ύπαρξη αναφορών που συνδέουν κάποιες από τις κακοήθειες αυτές, όπως οι LGL λεμφοϋπερπλαστικές νόσοι και η ΧΛΛ, με τις IL-12 και IFN- γ , αλλά και του Trp12 με την επαγωγή έκφρασης των κυτταροκινών αυτών μέσω ενεργοποίησης μεταγραφικών παραγόντων που ελέγχουν την έκφρασή τους (NF κ B, NFAT, CREB), προχωρήσαμε σε ανίχνευση και των κυτταροκινών αυτών στις συγκεκριμένες κακοήθειες με ELISA και σε διερεύνηση πιθανής συσχέτισης της έκφρασής τους με την έκφραση των υπο εξέταση γονιδίων.

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ:ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1.ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Κριτήρια επιλογής και χαρακτηριστικά ασθενών

Δείγματα αίματος συλλέχθηκαν από ασθενείς που παρακολουθούνταν στην Αιματολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης. Οι ασθενείς έπασχαν από διάφορες T- και B- λεμφοκυτταρικές κακοήθειες, είτε στην αρχική φάση της διάγνωσης ή σε διάφορα στάδια της νόσου. Η διάγνωση έγινε με βάση μορφολογική, ανοσοφαινοτυπική και κυτταρογενετική μελέτη αίματος και/ή μυελού, καθώς και τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημικής μελέτης υλικού από βιοψία οστικού μυελού ή λεμφαδένων. Για την κατάταξη των T- και B- νεοπλασιών χρησιμοποιήθηκε η ταξινόμηση κατά WHO⁴. Προϋπόθεση εισόδου στη μελέτη ήταν η παρουσία κακοήθων κυττάρων στο περιφερικό αίμα, επιβεβαιωμένη με κυτταρομετρία ροής ή με μοριακές τεχνικές. Κριτήρια αποκλεισμού ήταν οι ενδείξεις λοίμωξης και η πρόσφατη, σε χρονική περίοδο λιγότερη του ενός μήνα από την αιμοληψία, αντινεοπλασματική θεραπεία.

Επιπλέον στοιχεία, όπως προγνωστικοί παράγοντες της νόσου λαμβάνονταν από τους φακέλους των ασθενών που διατηρεί η Αιματολογική κλινική. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών με T- και B- κακοήθειες αναφέρονται στους πίνακες 1.1 και 1.2 αντίστοιχα.

Πίνακας 1.1. Χαρακτηριστικά ασθενών με T-λεμφοκυτταρικές νεοπλασίες.

Ασθενής αριθ.	Νόσος	Φύλο	Ηλικία	%T+NK /PBMC	Φάση νόσου	Συνοδές διαταραχές
1	Προ-T-ΟΛΛ	A	37	95 ΛΒ	Δ	
2	CTCL με μονοκλωνική T- LGL λεμφοκυττάρωση	A	63	86	Δ	
3	T-LGL λευχαιμία	Θ	75	93	Δ	Ουδετεροπενία
4	SS	A	91	65	Δ	
5	SS	A	85	71	Δ	
6	T-LGL λευχαιμία με αντιδραστική NK λεμφοκυττάρωση	Θ	60	71	Σταθερή νόσος	Σαρκοείδωση (παρελθούσα), ουδετεροπενία
7	T-ΠΛ	A	85	67	Δ	Μυοσίτις
8	Χρόνια NK-λεμφοκυττάρωση	Θ	67	64	Σταθερή νόσος	Ουδετεροπενία
9	T-ΟΛΛ	A	16	95 ΛΒ	Δ	
10	T-ΟΛΛ	Θ	35	77ΛΒ	Δ	
11	PTCL δευτεροπαθές από ΣΜ	A	52	85	ΜΥ	
12	SS	Θ	88	87	ΠΠ	

Συντομογραφίες: PBMC: Peripheral blood mononuclear cells/λεμφομονοπύρηνια περιφερικού αίματος, SS: Σύνδρομο Σέζαρυ, CTCL: Cutaneous T-cell Lymphoma/T-δερματικό λέμφωμα, T-ΛΛ: T-Λεμφοβλαστικό λέμφωμα, T-ΠΛ: T-Προλεμφοκυτταρική λευχαιμία, T-ΟΛΛ: T-οξεία λεμφοβλαστική Λευχαιμία, ΣΜ: Σπογγοειδής Μυκητίαση, PTCL: Peripheral T-cell lymphoma/περιφερικό T λέμφωμα, Δ: Πρωτοδιαγνωσθείσα, ΜΥ: Μερική ύφεση, ΠΠ: Πρωτοπαθώς Προϊούσα.

Πίνακας 1.2. Χαρακτηριστικά ασθενών με Β-λεμφοκυτταρικές νεοπλασίες.

Ασθενής αριθ.	Νόσος	Φύλο	Ηλικία	%B-κύτταρα /PBMC	Φάση νόσου	Συνοδές διαταραχές
1	ΛΜΖ σπληνός	Θ	38	74	Σταθερή νόσος	
2	ΧΛΛ	Θ	86	88	ΠΠ	
3	ΧΛΛ	Α	56	93	ΠΠ	
4	ΧΛΛ	Α	88	94	Δ	
5	ΧΛΛ	Α	83	96	Δ	
6	Αντιδραστική Β-λεμφοκυττάρωση	Θ	58	24	Δ	ΡΑ, ουδετεροπενία
7	ΛΜ	Α	57	71	Δ	
8	N.Waldenström	Α	87	93	Δ	
9	ΧΛΛ/σ.Richter	Θ	62	82	ΠΑ	
10	ΧΛΛ*	Α	81	91	ΠΠ	
11	ΛΜ	Θ	84	62	Δ	
12	Κοινή- ΟΛΛ ρh ¹	Α	40	70 ΛΒ	ΠΑ	
13	ΧΛΛ	Θ	72	89	Σταθερή νόσος	

* από μετατροπή λεμφώματος από μικρά λεμφοκύτταρα

Συντομογραφίες: ΛΜΖ: Λέμφωμα από κύτταρα της μεθοριακής ζώνης, ΧΛΛ: Β-Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία, ΛΜ: Λέμφωμα από κύτταρα Μανδύα, ρh¹:χρωμόσωμα Φιλαδέλφειας, ΛΒ: Λεμφοβλάστες, ΠΑ: Πρωτοπαθώς ανθεκτική, ΡΑ: Ρευματοειδής αρθρίτις.

Συλλογή αίματος από ασθενείς

Από κάθε ασθενή ελήφθησαν, άσηπτα, 18 ml αίματος, από τα οποία 12ml φυλάσσονταν σε σωληνάρια με EDTA-K₃ αντιπηκτικό μέσο στους 4⁰C μέχρι το διαχωρισμό των λεμφομονοκυττάρων και 6 ml σε σωληνάριο χωρίς αντιπηκτικό για την λήψη του ορού. Ο ορός λαμβάνονταν με άμεση φυγοκέντρηση του δείγματος χωρίς αντιπηκτικό σε 2.500 rpm για 10 λεπτά, λήψη του υπερκειμένου ορού και φύλαξη αυτού σε 2 σωληνάρια κρυοκατάψυξης σε θερμοκρασία -80⁰ C. Η επεξεργασία γινόταν σε διάστημα 4 ωρών από τη λήψη.

Συλλογή αίματος από υγιείς δότες

Με τον ίδιο τρόπο συλλέχτηκε αίμα από 22 υγιείς μάρτυρες από το προσωπικό της κλινικής και εθελοντές αιμοδότες από το τμήμα Αιμοδοσίας του Νοσοκομείου.

Η παρούσα μελέτη ενεκρίθη από την Επιτροπή Δεοντολογίας του Πα.Γ.Ν.Η. Από τους ασθενείς και τους υγιείς δότες ζητήθηκε προφορική άδεια για τη λήψη αίματος ύστερα από ενημέρωση για τους σκοπούς της μελέτης αυτής. Η έρευνα έγινε σύμφωνα με τις αρχές που αναφέρονται στη Διακήρυξη του Ελσίνκι.

2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΛΕΜΦΟΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

Ο διαχωρισμός των λεμφομονοπυρήνων έγινε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της διαβαθμισμένης φυγοκέντρησης πάνω σε στοιβάδα φικόλης, η οποία έχει σαν αποτέλεσμα το διαχωρισμό των συστατικών με βάση την πυκνότητά τους. Συγκεκριμένα, 12 ml αίματος αραιώνονται 1:1 με στείρο διάλυμα PBS (8 gr/l NaCl, 0,2gr/l KCl, 1,15gr/l Na₂HPO₄, 0,2 gr/l KH₂PO₄) και επιστοιβάζονται σε σωληνάριο πολυπροπυλενίου τύπου falcon των 50 ml στο οποίο έχουν προηγουμένως τοποθετηθεί 12 ml φικόλης (Lymphoprep Nycomed Pharma AS, Norway). Οι σωλήνες φυγοκεντρώνται σε 1800 rpm για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου χωρίς φρένο. Η φυγοκέντρηση διαχωρίζει το μίγμα σε 4 φάσεις, οι οποίες από κάτω προς τα επάνω είναι: κόκκινη, αποτελούμενη από ερυθρά και πολυμορφοπύρηνα, λευκή διαυγής αποτελούμενη από φικόλη, λευκή θολερή αποτελούμενη από λεμφομονοπύρηνα και κίτρινοπορτοκαλί αποτελούμενη από πλάσμα. Στη συνέχεια αναρροφάται η λευκή στοιβάδα των λεμφομονοπύρηνων και μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο. Το διάλυμα των κυττάρων εκπλύνεται 1 φορά με PBS, φυγοκεντρείται σε 1800 rpm για 10 λεπτά στους 4⁰C σε κρυοφυγόκεντρο, το ίζημα επαναδυναμύεται με ανάδευση και ακολουθεί καταμέτρηση των ζώντων κυττάρων. Αυτό γίνεται με

ανάμιξη 20μL από το διαλυμένο ίζημα με 180 μL της χρωστικής κυανού του τρυπανίου και μικροσκόπηση σε πλάκα κυτταρομέτρησης, οπότε αποπτωτικά κύτταρα προσλαμβάνουν χρωστική και φαίνονται σκούρα μπλε και εξαιρούνται από τη μέτρηση, ως επίσης εξαιρούνται και τα ερυθρά βάση μεγέθους και σχήματος. 10×10^6 κύτταρα αφαιρούνται και φυλάσσονται σε σωληνάρια erpendorf στους -80°C προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για απομόνωση DNA. Το υπόλοιπο από το διάλυμα των κυττάρων χωρίζεται σε 2 ίσες ποσότητες σε 2 falcon tubes των 15 ml και εκπλύνεται εκ νέου με PBS όπως προηγουμένως. Στο τέλος απομακρύνεται από το ίζημα όλο το PBS εκτός από 200μL στα οποία επαναδυσώμε τα κύτταρα και προσθέτουμε ποσότητα του αντιδραστήριου Trizol LS (Invitrogen, U.K.), ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων (750μL έως 4 ml). Αναμιγνύουμε με ήπιες αναρροφήσεις με πιπέττα και στη συνέχεια είτε προχωρούμε απευθείας στην απομόνωση του RNA είτε φυλάσσουμε τα σωληνάρια στους -80°C .

2.2. ΕΚΧΥΛΙΣΗ RNA

Για την απομόνωση του RNA χρησιμοποιείται η μέθοδος που αναπτύχθηκε από τους Chomczynski και Sacchi²⁶⁴. Με τη μέθοδο αυτή μπορεί να απομονωθεί το ολικό RNA από 0,1 έως 15 kb σε μήκος. Η εκχύλιση του RNA γίνεται με μίγμα φαινόλης/ισοθειοκυανικής γουανιδίνης, χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Trizol LS (Invitrogen/Life Technologies, U.K.). Η ισοθειοκυανική γουανιδίνη είναι αποδιατακτικός παράγοντας, ο οποίος βοηθάει στην απομάκρυνση των πρωτεϊνών από τα σύμπλοκά τους με το RNA και επιπλέον αναστέλλει τις ριβονουκλεάσες (RNases) που ελευθερώνονται κατά τη λύση των κυττάρων, ανακτώντας έτσι μη αποικοδομημένο RNA. Ο ελάχιστος αριθμός κυττάρων που χρειάζεται είναι περίπου 5×10^6 .

Θα περιγραφεί η μέθοδος για αρχικό αριθμό κυττάρων 20×10^6 . Η διαδικασία γίνεται πάνω σε πάγο με πιπέττες που χρησιμοποιούνται αποκλειστικά για RNA και σε απαγωγό κάθετης νηματικής ροής για εξασφάλιση συνθηκών ελεύθερων από μολύνσεις. Προσθέτουμε μέσα στο σωλήνα Falcon των 15ml που περιέχει τα κύτταρα 1,5ml Trizol και λύουμε τα κύτταρα με ήπιες αναρροφήσεις της πιπέττας. Επιάζουμε για 5 λεπτά σε πάγο και προσθέτουμε 400ml χλωροφορμίου, ανακατεύουμε με περιδίνηση (vortex) για 15'' και φυγοκεντρούμε σε 4.000 rpm, 4°C για 15 λεπτά χωρίς φρένο. Το χλωροφόρμιο διαλύει τη φαινόλη και μετά τη φυγοκέντρωση

διαχωρίζονται 3 φάσεις του δείγματος που από κάτω προς τα πάνω είναι : η οργανική ροζ φάση όπου παραμένουν οι πρωτεΐνες και όλα τα κυτταρικά υπολείμματα, μια λευκωπή μεσόφαση που περιέχει DNA και η ανώτερη διαφανής υδατώδης φάση που περιέχει το RNA. Μεταφέρουμε την ανώτερη φάση σε ένα στείρο, RNase-free σωληνάριο πολυπροπυλενίου προσέχοντας να μη διασπασθεί η μεμβράνη που σχηματίζει το DNA στη μεσόφαση. Προσθέτουμε ίσο όγκο 100% ισοπροπυλικής αλκοόλης και, μετά από ανάδευση, αφήνουμε στον πάγο για 15 λεπτά. Φυγοκεντρούμε σε 12.000xg, στους 4⁰C για 10 λεπτά, οπότε η ισοπροπυλική αλκοόλη προκαλεί κατακρίμνηση του RNA με τη μορφή ενός καθαρού ηζήματος. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και εκπλύνουμε το ίζημα με 1ml αιθανόλης 75%, σε επεξεργασμένο με DEPC (αναστολέας νουκλεασών, διεθυλπυροκαρβονικό άλας 97%, Sigma) δισαπεσταγμένο νερό (ddH₂O) και φυγοκεντρούμε σε 7.500xg για 5 λεπτά στους 4⁰C. Αν το ίζημα είναι έντονα λευκό, δηλαδή με αρκετές προσμίξεις, επαναλαμβάνουμε την έκπλυση άλλη μια φορά. Απορρίπτουμε πλήρως την εθανόλη με αναστροφή του σωληναρίου πάνω σε απορροφητικό χαρτί και αφήνουμε να στεγνώσει στον αέρα για περίπου 15 λεπτά. Τέλος επαναδουαλύνουμε το ίζημα του RNA σε 20-100μL DEPC-ddH₂O αναμιγνύοντας με την πιπέττα και επωάζοντας για 10 λεπτά σε 65⁰C.

Ακολούθως, υπολογίζουμε τη συγκέντρωση του RNA με φωτομέτρηση σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους και φυλάσσουμε το RNA στους -80⁰C, σε 2 κλάσματα, εφόσον είναι >20 μL.

Φωτομέτρηση

4μL διαλύματος RNA αραιώνονται 1:250 με 1ml δισαπεσταγμένο νερό και προσδιορίζεται η απορροφητικότητά του (A) σε μήκος κύματος 260nm. Με βάση την παραδοχή ότι $A_{260} = 1$ αντιστοιχεί σε συγκέντρωση RNA 40μg/ml, άρα $C_{RNA}(\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A_{260} \times 40 \times 250 = A_{260} \times 10^4 / 10^3 (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = A_{260} \times 10$. Χρησιμοποιώντας επιπλέον μέτρηση στα 280nm (η οποία μπορεί να γίνει αυτόματα στο φασματοφωτόμετρο Hitachi U-2001, USA) υπολογίζουμε το λόγο A_{260}/A_{280} ο οποίος σε καλά διαλυμένο, καθαρό RNA πρέπει να είναι μεταξύ 1.6-1.8.

Επεξεργασία με DNase

Για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων DNA χρησιμοποιήθηκε το DNase I, amplification grade κιτ της Invitrogen. Μέσα σε RNase-free σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης του 0.5ml και πάνω σε πάγο αναμιγνύονται 1μg RNA με 1 μL DNase I Reaction Buffer, 1 μL DNase I (1 U/ μL) και DEPC- ddH₂O έως τα 10 μL και επωάζονται για όχι περισσότερο από 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Απενεργοποιούμε την DNase I με προσθήκη 1 μL EDTA 25mM και θέρμανση για 10 λεπτά στους 65⁰C. Στη συνέχεια το προϊόν είναι έτοιμο να χρησιμοποιηθεί σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

2.3. ΕΚΧΥΛΙΣΗ DNA

Η εκχύλιση γενωμικού, υψηλού μοριακού βάρους DNA γίνεται με τη μέθοδο φαινόλης-χλωροφορμίου²⁶⁵ ως εξής: ξεπαγώνουμε το φυλαγμένο σε -80⁰C ίζημα των κυττάρων και το επαναδουλεύουμε με 465 μL NTE (NaCl 100mM, Tris-HCl 10mM, pH 8, EDTA 1mM), με ήπιο vortex. Για την ομογενοποίηση των κυττάρων προσθέτουμε 25μL SDS 10% (τελική συγκέντρωση 0,5%) και 10 μL πρωτεΐνάσης K 20 mg/ml, αναμιγνύουμε με vortex και επωάζουμε σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 55⁰C για 1 ώρα ή 37⁰C για 16 ώρες. Φυγοκεντρούμε σε 12.000xg για 10 λεπτά και μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο σωληνάριο erpendorf όπου προσθέτουμε ίσο όγκο φαινόλης και αναμιγνύουμε με vortex για 30''. Φυγοκεντρούμε σε 12.000xg για 5 λεπτά και μεταφέρουμε την υπερκείμενη υδατική φάση που περιέχει το DNA σε νέο σωληνάριο. Επαναλαμβάνουμε την εκχύλιση με φαινόλη άλλη μια φορά. Προσθέτουμε στο υπερκείμενο ίσο όγκο χλωροφορμίου, αναμιγνύουμε και φυγοκεντρούμε όπως προηγουμένως και μεταφέρουμε την ανώτερη, υδατική φάση σε νέο σωληνάριο. Προσθέτουμε 1ml κρύας απόλυτης εθανόλης (-20⁰), ανακινούμε καλά και αφήνουμε για 15 λεπτά σε -20⁰C. Κατόπιν το DNA κατακρημνίζεται με φυγοκέντρωση σε 12.000xg για 10 λεπτά σε 4⁰C. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και στεγνώνουμε το ίζημα στον αέρα. Επαναδουλεύουμε το ίζημα σε 180 μL TE (10:1 Tris 10mM, EDTA 1mM, pH8) και επωάζουμε για 10 λεπτά σε 55⁰C. Για να αποτρέψουμε τη κατακρήμνιση μονονουκλεοτιδίων προσθέτουμε 20 μL 2M οξικού νατρίου (acetate) και επαναλαμβάνουμε την εκχύλιση με 500 μL κρύας απόλυτης εθανόλης και φυγοκέντρωση σε 12.000xg για 5 λεπτά. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και εκπλύνουμε το ίζημα 2 φορές με 1ml εθανόλης 70% (σε DEPC-H₂O),

φυγοκεντρώντας σε 12.000g για 1 λεπτό. Τέλος, απορρίπτουμε το υπερκείμενο και στεγνώνουμε στον αέρα για 15 λεπτά. Επαναδιαλύουμε σε 100-200μL TE, pH 8 με ολονύκτια επώαση σε υδατόλουτρο 55⁰C. Φυλάσσουμε σε 2 κλάσματα στους -20⁰C , αφού πρώτα αφαιρέσουμε ποσότητα 5μL, προκειμένου να γίνει προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA σε φασματοφωτόμετρο.

Για το σκοπό αυτό 5μL αραιώνονται σε 1ml απεσταγμένου νερού (αραίωση 1:200) και προσδιορίζεται η απορροφητικότητα σε μήκος κύματος 260nm (A_{260}). Εφόσον $A_{260} = 1$ αντιστοιχεί σε συγκέντρωση DNA 50μg/ml, άρα $C_{DNA}(\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 50 \times 200 = A_{260} \times 10^4/10^3(\mu\text{g}/\mu\text{L}) = A_{260} \times 10$. Η καθαρότητα του DNA εκτιμάται με προσδιορισμό του λόγου A_{260}/A_{280} , ο οποίος πρέπει να είναι μεταξύ 1.7-1.9.

2.4. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA (cDNA)

Η αντίστροφη μεταγραφή του αγγελιοφόρου RNA (mRNA) πραγματοποιείται με τη βοήθεια του ενζύμου ανάστροφη μεταγραφάση του MoMLV. Σε σωληνάριο τύπου erpendorf απαλλαγμένο από DNάσες προστίθενται ολικό RNA 100ng έως 5μg και εκκινητές που, ανάλογα με το πρωτόκολλο, είναι είτε τυχαία εξαμερή (εξανουκλεοτίδια που προσδένονται τυχαία σε ολικό RNA ,χρήσιμα για υπόστρωμα RNA αμφίβολης ποιότητας) ή ολιγοdT (σύνδεση μόνο με mRNA) ή ειδικοί εκκινητές καθώς και DEPC-H₂O έως τα 10μl. Ακολουθεί (προκειμένου για αντίδραση με τυχαία εξαμερή) αποδιάταξη RNA και εκκινητών με θέρμανση του μίγματος στους 65⁰C για 5 λεπτά σε θερμικό κυκλοποιητή και άμεση τοποθέτησή του σε πάγο. Κατόπιν προετοιμάζεται το κύριο μίγμα της αντίδρασης σε τελικό όγκο 10 μL το οποίο περιλαμβάνει ρυθμιστικό διάλυμα για cDNA, ισομοριακό μίγμα τριφωσφορικών δεσοξυριβονουκλεοτιδίων, DTT (διθειοθρεϊτόλη), αναστολέα RNAsών, μεταγραφάση (thermoscript) και DEPC-H₂O. Το παραπάνω μίγμα προστίθεται στο αρχικό και στη συνέχεια γίνεται επώαση του δείγματος στους 25⁰C για 10 λεπτά και ακολούθως στους 50⁰C για 50 λεπτά, οπότε πραγματοποιείται υβριδισμός των εκκινητών και πολυμερισμός με δράση της μεταγραφάση. Η αντίδραση τερματίζεται με θέρμανση στους 85⁰C για 5 λεπτά όπου αποδιατάσσονται τα υβρίδια RNA-cDNA και απενεργοποιείται η αντίστροφη μεταγραφάση, ενώ τελικά στο διάλυμα προστίθεται 1 μL RNase H με επακόλουθη επώαση για 20 min, στους 37 °C για αποδόμηση του συμπληρωματικού RNA. Τελικό προϊόν είναι το συμπληρωματικό DNA (cDNA) το οποίο είναι έτοιμο να χρησιμοποιηθεί σε αντίδραση PCR ή να αποθηκευτεί σε -20⁰C για μελλοντική χρήση.

2.5. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Αρχή της μεθόδου

Η αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση (PCR) είναι μια μέθοδος με την οποία επιτυγχάνεται η παραγωγή πολλών αντιγράφων συγκεκριμένου τμήματος DNA ξεκινώντας ακόμα και από απειροελάχιστη ποσότητα αρχικού DNA, όπως το περιεχόμενο ενός μόνο κυττάρου. Η αντίδραση καθαυτή είχε περιγραφεί από τον Khorana και συν. το 1974²⁶⁶, πέρασε όμως στην εργαστηριακή πράξη το 1985 όταν η επιστημονική ομάδα του Mullis^{267;268} την χρησιμοποίησε αποδοτικά στη μελέτη του γενετικού υλικού των έμβιων οργανισμών.

Η συγκεκριμένη μέθοδος επιτυγχάνει εύκολα και σε μικρό χρόνο, που δεν υπερβαίνει τις 2-3h, την ειδική ενίσχυση, με εκθετικό τρόπο, συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA, ώστε να είναι δυνατή η μελέτη τους και ο περαιτέρω χειρισμός τους ακόμα και όταν η ποιότητα του δείγματος είναι φτωχή. Το μήκος της αλληλουχίας που μπορεί να πολλαπλασιαστεί κυμαίνεται από 50 έως πάνω από 2000 βάσεις.

Η PCR βασίζεται στη δράση του ενζύμου DNA πολυμεράση I. Στη θέση του χρησιμοποιείται η ανασυνδυασμένη θερμοανθεκτική Taq DNA πολυμεράση του βακτηριδίου *Thermus Aquaticus* η οποία είναι πολύ χρήσιμη στις υψηλές θερμοκρασίες που χρησιμοποιούνται στις αντιδράσεις PCR για την αποδιάταξη του DNA, αλλά και ελαττώνει τα σφάλματα αντιγραφής που μπορούν να συμβούν σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Το υπόστρωμα DNA επωάζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα με μαγνήσιο που περιέχει Taq DNA πολυμεράση, ισομοριακό μίγμα των τεσσάρων δεσοξυριβονουκλεοτιδίων (ATGC) και το ζεύγος των εκκινητών (primers) σε περίσσεια. Οι εκκινητές είναι ζεύγος συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων με μήκος 20-30 βάσεις και αλληλουχία συμπληρωματική με τη μία μόνο από τις 2 αλυσίδες του DNA, εκατέρωθεν της αλληλουχίας-στόχου. Η Taq DNA πολυμεράση αντιγράφει μονόκλωνο DNA με κατεύθυνση 5'-3' αρχίζοντας πάντα με την τοποθέτηση ενός νουκλεοτιδίου στο 3' άκρο ενός εκκινητή συνδεδεμένου στο υπόστρωμα. Η αντίδραση περιλαμβάνει την κυκλική επανάληψη (20-35 κύκλοι) 3 απλών αντιδράσεων που εκτελούνται μέσα στο ίδιο σωληνάριο και είναι οι εξής: αποδιάταξη σε θερμοκρασία 94-96⁰C, υβριδισμός (σύνδεση) των εκκινητών σε 50-65⁰C και

πολυμερισμός του DNA με επιμήκυνση των συνδεδεμένων εκκινητών σε 72°C (θερμοκρασία δράσης της Taq) για 30'' περίπου η καθεμία. Έτσι, κάθε νεοσυντιθέμενος κλώνος DNA αποτελεί εκμαγείο για τον επόμενο κύκλο ενίσχυσης με αποτέλεσμα τη γεωμετρική αύξηση των μεταγράφων κατά τη διάρκεια των επαναλήψεων και την παραγωγή, θεωρητικά, 2ⁿ δίκλωνων μορίων DNA, μετά από n κύκλους που είναι πιστά αντίγραφα της αλληλουχίας του DNA που περικλείεται από τους εκκινητές.

Η ειδικότητα της PCR εξαρτάται από τους **εκκινητές**, οι οποίοι πρέπει να έχουν σχεδιαστεί έτσι ώστε να είναι ειδικοί για την αλληλουχία-στόχο, χωρίς παραπροϊόντα από μη ειδικές συνδέσεις. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται ορισμένοι κανόνες στο σχεδιασμό τους όπως:

α) αποφυγή της συμπληρωματικότητας άνω των 3 συνεχόμενων βάσεων μεταξύ τους ιδιαίτερα στο 3' άκρο, η οποία μπορεί να προκαλέσει την εμφάνιση “διμερών εκκινητών” (primer dimer), φαινόμενο το οποίο προκαλείται όταν ο ένας εκκινητής προεκτείνεται από την πολυμεράση χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο τον άλλον εκκινητή ή και τον εαυτό του, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός λανθασμένου μικρού προϊόντος²⁶⁹

β) περιεκτικότητα σε GC παρόμοια με την αλληλουχία-στόχο και μεταξύ 40-60%

γ) αποφυγή εκτάσεων με πολυπυρίνες, πολυπυριμιδίνες ή επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες

δ) παραπλήσιο μεταξύ τους μέγεθος 18-24 βάσεων

δ) T_m* (θερμοκρασία τήξης) μεταξύ 55-70°C που να μη διαφέρει περισσότερο από 2°C ανάμεσά τους.

ε) για ανάστροφη PCR οι εκκινητές πρέπει να περιβάλουν περιοχή που περιέχει ιντρόνιο, δηλαδή να υβριδίζονται σε διαφορετικά εξόνια εξασφαλίζοντας έτσι την παραγωγή διαφορετικού προϊόντος σε περίπτωση επιμόλυνσης του RNA με γενωμικό DNA.

Για το σχεδιασμό των εκκινητών υπάρχουν αρκετά βοηθητικά προγράμματα λογισμικού, όπως το Primer Express v.2 (Applied Biosystems), το οποίο και χρησιμοποιήσαμε.

Η ειδικότητα της PCR εξαρτάται ακόμα από τη συγκέντρωση του μαγνησίου (όσο πιο χαμηλή, τόσο αυξάνεται η πιστότητα), το χρόνο και τη θερμοκρασία σύνδεσης (όσο πιο μικρός χρόνος και υψηλότερη θερμοκρασία τόσο μεγαλύτερη η

*T_m: η θερμοκρασία στην οποία το 50% των μορίων του DNA είναι αποσυνδεδεμένα και το 50% είναι συνδεδεμένα.

πιστότητα) καθώς και την αραιώση των εκκινητών και των αριθμό των κύκλων (>30 κύκλοι οδηγούν στη δημιουργία διμερών μεταξύ των εκκινητών) τα οποία πρέπει να καθοριστούν με σειρά πειραμάτων για κάθε νέο ζεύγος εκκινητών.

Αφού καθοριστούν οι παράμετροι της αντίδρασης πρέπει να προσδιοριστεί η ευαισθησία της με τη χρήση διαδοχικών αραιώσεων υποστρώματος, ώστε να βρεθούν τα όρια εντός των οποίων το σήμα ανίχνευσης της αλληλουχίας στόχου παραμένει σε γραμμική σχέση με την αρχική συγκέντρωση αυτής. Η ευαισθησία της PCR μπορεί να αυξηθεί με την τεχνική της «φωλιασμένης» (nested) PCR στην οποία σε 2 ή περισσότερες διαδοχικές αντιδράσεις το προϊόν της προηγούμενης αποτελεί υπόστρωμα για την επόμενη, χρησιμοποιώντας εκκινητές που προσδένονται σε εσωτερικότερα σημεία της αλληλουχίας-στόχου. Το μήκος του μεταγράφου, προκειμένου η αντίδραση να έχει ικανή ευαισθησία πρέπει να είναι μεταξύ 100-1000 βάσεων.

Όλες οι αντιδράσεις PCR εκτελούνται μέσα σε μηχανικούς θερμικούς κυκλοποιητές (thermal cyclers) που έχουν την ικανότητα να αυξομειώνουν τη θερμοκρασία σε ελάχιστο χρόνο, βασιζόμενοι στο φαινόμενο Peltier.

Ανίχνευση των προϊόντων της PCR

Η ανίχνευση και ταυτοποίηση του προϊόντος της PCR μπορεί να γίνει : α) με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης ή ακρυλαμίδης και κατάλληλη χρώση, β) με υβριδισμό με κατάλληλους ανιχνευτές και ανίχνευση με απλή ή φθορίζουσα χρωστική (τεχνική SSO), γ) με χρήση σεσημασμένων εκκινητών ή σεσημασμένων νουκλεοτιδίων. Οι τεχνικές β και γ χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση μεταλλάξεων και πολυμορφισμών.

Στην παρούσα μελέτη, για τα προϊόντα της RT-PCR χρησιμοποιήσαμε την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2,5%(w/v) ως εξής: το πήκτωμα παρασκευάζεται με διάλυση 2,5gr αγαρόζης σε 100ml διαλύματος 0,5xTBE (5xTBE: 54g Tris base, 27,5g βορικό οξύ, 20 ml 0,5M EDTA pH 8, H₂O έως 1L) το οποίο θερμαίνεται μέχρι βρασμού και αφήνεται να κρυώσει έως τους 60⁰C οπότε προστίθεται η φθορίζουσα χρωστική βρωμιούχο εθίδιο σε τελική συγκέντρωση 0.2μg/ml. Η χρωστική αυτή έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται στην διπλή έλικα και να σχηματίζει σύμπλοκο με το DNA που αποδίδει φθορισμό υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας. Το στερεοποιημένο πήκτωμα εμβαπτίζεται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει 0,5xTBE. Δέκα μl από το προϊόν της PCR

αναμιγνύονται με 2 μL διαλύματος πλήρωσης 6x (ή loading buffer: 0,25% κυανού του ξυλενίου, 30% γλυκερόλη σε H_2O) και φορτώνονται στις οπές του πηκτώματος, ενώ σε ξεχωριστή οπή φορτώνονται 0,1 μg δείκτη μοριακού βάρους DNA των 100bp. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται υπό σταθερή τάση 100V για μισή ώρα οπότε τα τμήματα DNA διαχωρίζονται σε ζώνες (bands), ανάλογα με το μοριακό τους βάρος, λόγω της διαφορετικής ηλεκτροφορητικής κινητικότητάς των αρνητικά φορτισμένων μορίων του DNA. Ακολουθεί ψηφιακή σάρωση του πηκτώματος με το σύστημα Gel Doc 1000 (Bio RAD, USA) που διαθέτει λάμπα υπεριώδους, με την επίδραση της οποίας γίνονται ορατές οι ζώνες και μεταφορά σε αρχείο υπολογιστή. Με τη μέθοδο αυτή μπορεί να ανιχνευθεί κατ'ελάχιστον 1ng DNA.

Η ενοποιημένη πυκνότητα των ζωνών χρησιμοποιήθηκε ως ποσοτική παράμετρος και υπολογίστηκε με ψηφιακή ανάλυση εικόνας με το πρόγραμμα Tina-PCBAS software 2.0 (Raytest, Straubenhardt, Germany). Ο λόγος της ενοποιημένης πυκνότητας της ζώνης του υπό εξέταση γονιδίου προς αυτήν της β -ακτίνης χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση των δειγμάτων μεταξύ τους και την ημι-ποσοτική έκφραση των αποτελεσμάτων.

Μέθοδοι ποσοτικής μελέτης με «κλασική» PCR

Για την ποσοτικοποίηση της PCR, προκειμένου να υπολογιστεί η συγκέντρωση της αλληλουχίας-στόχου, υπάρχουν απόλυτες και σχετικές μέθοδοι.

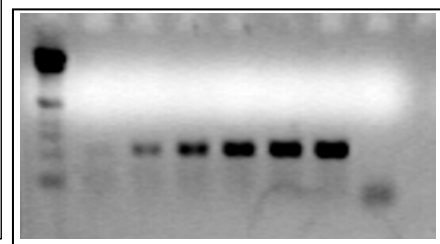
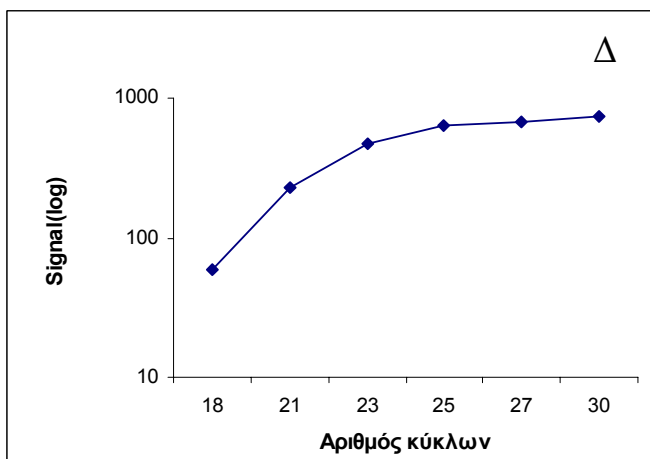
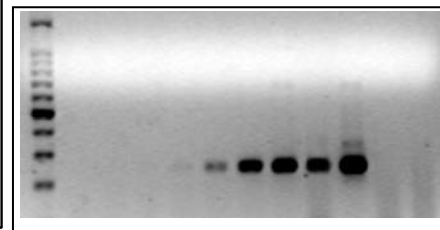
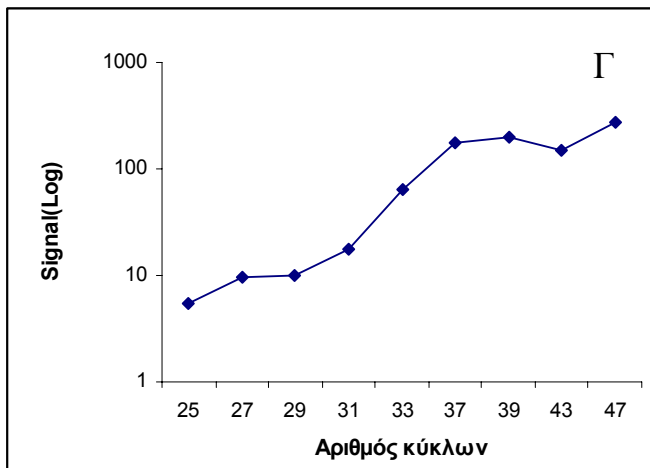
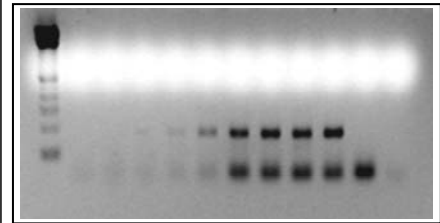
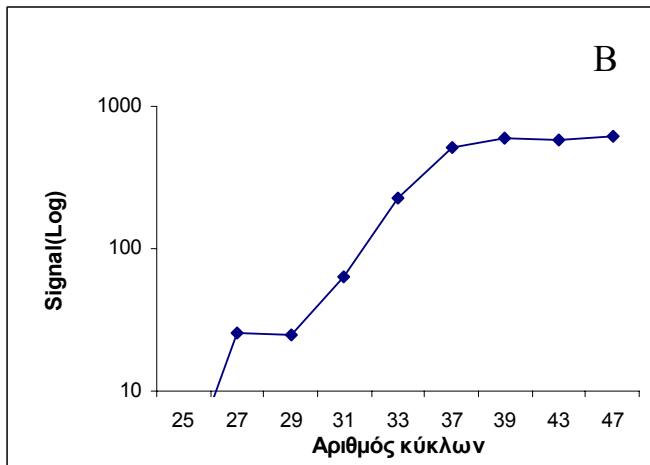
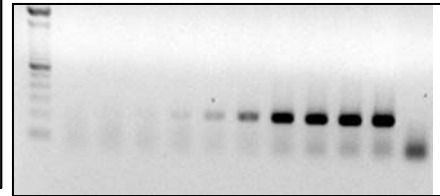
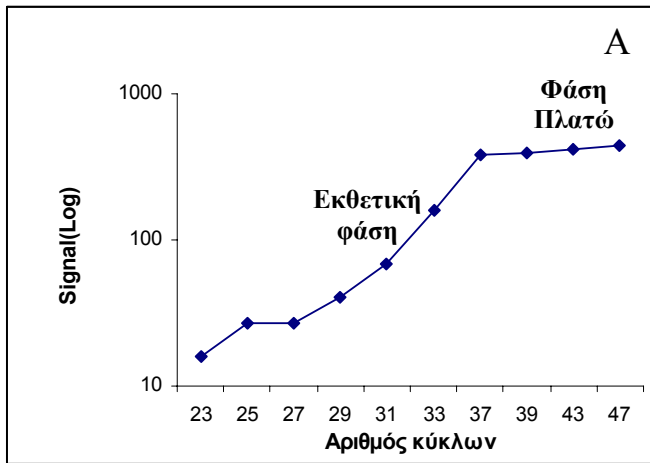
Απόλυτη ποσοτικοποίηση γίνεται με την τεχνική της συναγωνιστικής (competitive) PCR στην οποία ένα συνθετικό νουκλεοτίδιο-ανταγωνιστής (competitor RNA προκειμένου για RT-PCR ή DNA) γνωστής συγκέντρωσης, με αλληλουχία παρόμοια αλλά όχι ταυτόσημη με το υπό εξέταση τμήμα, προστίθεται μέσα στο ίδιο σωληνάριο και πολλαπλασιάζεται χρησιμοποιώντας τους ίδιους εκκινητές, ενώ τα τελικά προϊόντα διαχωρίζονται από το ελαφρά διαφορετικό τους μήκος ή από τα διαφορετικά προϊόντα τους ύστερα από πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Για κάθε δείγμα γίνεται σειρά αντιδράσεων στις οποίες το νουκλεοτίδιο-ανταγωνιστής προστίθεται σε διαδοχικές αραιώσεις. Τελικά τα προϊόντα ηλεκτροφορούνται και αφού σαρωθούν και αναλυθούν με πρόγραμμα ανάλυσης εικόνας κατασκευάζεται γραφική παράσταση που έχει στο X άξονα το λόγο ανταγωνιστή/στόχου και στον Y τον αριθμό μορίων του ανταγωνιστή. Το σημείο της καμπύλης στο οποίο ανταγωνιστής και στόχος είναι ίσοι, δηλ. έχουν λόγο 1 μας δίνει τον αριθμό των μεταγράφων του στόχου.

Με σχετική ή ημι-ποσοτική RT-PCR υπολογίζεται η μεταβολή της έκφρασης του υπό εξέταση γονιδίου σε σχέση με δείγματα-μάρτυρες. Ταυτόχρονα ενισχύεται μέσα στο ίδιο ή σε διαφορετικά σωληνάρια αλληλουχία αναφοράς, δηλαδή αλληλουχία από κάποιο γονίδιο βασικής λειτουργίας (housekeeping gene) που εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα σε σταθερή ποσότητα όπως πχ. η β-ακτίνη ή η GAPDH, χρησιμοποιώντας το ανάλογο ζεύγος εκκινητών, με σκοπό την εξομάλυνση των διαφορών στην αρχική ποσότητα RNA μεταξύ των δειγμάτων. Για τη σύγκριση των δειγμάτων χρησιμοποιείται ο λόγος:

$$\frac{\text{ποσότητα αλληλουχίας στόχου (δείγμα)}}{\text{ποσότητα αλληλουχίας αναφοράς(δείγμα)}} : \frac{\text{ποσότητα αλληλουχίας στόχου (μ μαρτύρων)}}{\text{ποσότητα αλληλουχίας αναφοράς(μ μαρτύρων)}}$$

όπου μ : η μέση τιμή των μαρτύρων

Σε κάθε περίπτωση, για λήψη αξιόπιστων αποτελεσμάτων, είναι απαραίτητη η δημιουργία καμπύλης απόδοσης της PCR με σειρά αντιδράσεων προοδευτικά αυξανόμενου αριθμού κύκλων, ώστε να επιλεγεί ο κατάλληλος αριθμός κύκλων στους οποίους η αντίδραση παραμένει εκθετική. Τα προϊόντα των αντιδράσεων αυτών ηλεκτροφορούνται και η ένταση του σήματος προσδιορίζεται με ηλεκτρονικό τρόπο. Η γραφική παράσταση του αριθμού των κύκλων προς τον λογάριθμο της έντασης του σήματος είναι μια σιγμοειδής καμπύλη, η οποία αποτελείται από τη φάση του θορύβου, την εκθετική φάση αύξησης και τέλος τη φάση πλατώ στην οποία δε συμβαίνει πλέον επιμήκυνση των εκκινητών, λόγω της εξάντλησης των υλικών, της φθοράς της Taq πολυμεράσης στη διάρκεια της αντίδρασης και, κυρίως, του ανταγωνισμού εκκινητών-μεταγράφων για υβριδισμό με το cDNA, Εικόνα 2.2.



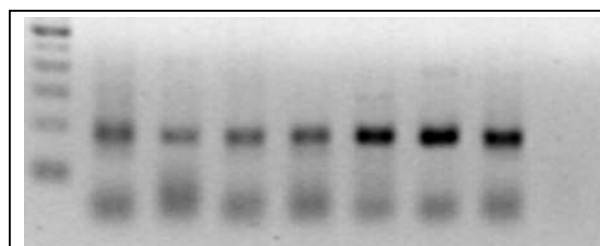
Εικόνα 2.2. Καμπύλες απόδοσης PCR για τα γονίδια Trp2 (A), Gfi1 (B) , Pim1 (Γ) και β-ακτίνη (Δ). Ο κατάλληλος για κάθε μετάγραφο αριθμός επαναλήψεων (κύκλων) στις οποίες η απόδοση της αντίδρασης παραμένει εκθετική επιλέχθηκε από τη μεσότητα της γραμμικής φάσης κάθε καμπύλης.

Ημι-ποσοτική, σχετική RT-PCR για τον προσδιορισμό της έκφρασης των γονιδίων Trp2, Gfi1 και Pim1

Η σύνθεση του cDNA έγινε με το kit Thermoscript™ RT (Invitrogen, UK) χρησιμοποιώντας 1 μg RNA επεξεργασμένο με DNase και τυχαία εξαμερή ως εκκινήτες (50ng) σε τελικό όγκο 10μL σε DEPC-H₂O. Μετά από αποδιάταξη του μίγματος RNA και εκκινήτων στους 65⁰C για 5 λεπτά σε θερμικό κυκλοποιητή (PTC-200 με θερμαινόμενο κάλυμμα, MJ Research) ακολουθεί προσθήκη 10μL από το βασικό μίγμα σύνθεσης cDNA, το οποίο παρασκευάζεται σε όγκο κατάλληλο για τον ολικό αριθμό των αντιδράσεων που θα εκτελεστούν συν 5% επιπλέον. Αυτό αποτελείται από 1x ρυθμιστικό διάλυμα σύνθεσης cDNA, 1μL 0,1M DTT, 40 U αναστολέα RNasών, 1mM από κάθε dNTP, 15U αντίστροφη μεταγραφή Thermoscript και DEPC-επεξεργασμένο νερό. Το τελικό μίγμα των 20μL επωάζεται στους 25⁰C για 10 λεπτά και ακολούθως στους 50⁰C για 50 λεπτά και η αντίδραση τερματίζεται με θέρμανση στους 85⁰C για 5 λεπτά. Μετά το τέλος της αντίδρασης γίνεται επεξεργασία με 2U RNase H στους 37⁰C για 20 λεπτά για την αποδόμηση των υπολειμμάτων RNA που δε μετατράπηκαν σε DNA.

Στη συνέχεια 0,8μl από το cDNA εφαρμόζονται σε συνολικό όγκο αντίδρασης PCR 20 μL μαζί με 250nM από κάθε εκκινήτη, 200nM dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 0,5 IU Taq πολυμεράση και 1x ρυθμιστικό διάλυμα PCR χωρίς μαγνήσιο (Platinum Taq DNA Polymerase kit, Invitrogen, UK), Πίνακας 2.1. Η σύνθεση των εκκινήτων φαίνεται στον Πίνακα 2.2. Οι εκκινήτες παρασκευάστηκαν και αγοράστηκαν από την εταιρεία MWG-Biotech AG, Γερμανία. Οι αντιδράσεις αρχικά βελτιστοποιήθηκαν για κάθε ζεύγος εκκινήτων για τη συγκέντρωση των ιόντων μαγνησίου, τη θερμοκρασία σύνδεσης (Εικόνα 2.3), την αραιώση των εκκινήτων και τον αριθμό των κύκλων στον οποίο η αντίδραση φτάνει στο μέσον της λογαριθμικής φάσης σύνθεσης (Εικόνα 2.2). Ο Πίνακας 2.3 δείχνει τη θερμοκρασία σύνδεσης και τον αριθμό των κύκλων που καθορίστηκαν για κάθε ζεύγος εκκινήτων. Τελικά οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν: αποδιάταξη σε 94⁰C για 5 λεπτά ακολουθούμενη από

τον ορισμένο για κάθε γονίδιο αριθμό επαναλήψεων των διαδοχικών σταδίων επώασης στους 94⁰ C για 30'', επώασης στην προκαθορισμένη θερμοκρασία σύνδεσης για 30'' και στους 72⁰C για 30''. Η αντίδραση τερματίζεται με επώαση στους 72⁰C για 7 λεπτά. Σε κάθε αντίδραση προστέθηκαν 2 αρνητικοί μάρτυρες παραλείποντας την μεταγραφή από την αντίδραση RT ή το cDNA από την αντίδραση PCR αντίστοιχα. Για κάθε δείγμα η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε σε ξεχωριστή αντίδραση για την κανονικοποίηση της αρχικής συγκέντρωσης RNA.



Εικόνα 2.3. Παράδειγμα διαβάθμισης θερμοκρασίας σύνδεσης για τους εκκινητές του Gfi1. Από αριστερά προς τα δεξιά οι θερμοκρασίες ήταν: 55-55,8-56,4-57,2-58-59,3-60⁰C. Τελικά επιλέχθηκαν οι 58⁰C.

Πίνακας 2.1. Συστατικά της αντίδρασης PCR.

Διαλύματα	Προστιθέμενος όγκος (μL)
Μίγμα εκκινητών 10μM	0,5
dNTPs, 10mM	0,4
MgCl ₂ , 50 mM	0,6
10x PCR ρυθμιστικό	2
διάλυμα (χωρίς MgCl ₂)	
cDNA	0,8
Taq πολυμεράση, 5 U/μL	0,1
DEPC-treated H ₂ O	15,6
Συνολικός όγκος	20

Πίνακας 2.2. Χαρακτηριστικά των εκκινητών της RT-PCR για την ανίχνευση της έκφρασης των γονιδίων Trp2, Gfi1 και Pim1.

Γονίδιο	Εκκινητές	Αλληλουχία (5'-3')	Μέγεθος μεταγράφου (bp)	Περιοχή ενίσχυσης	Genbank accession no
β-ακτίνη	Πρόσθιος	CAA GGC CAA CCG CGA GAA GAT G	214	Εξόνια 3-4	NM001101
	Ανάστροφος	CCG GCC AGC CAG GTC CAG A			
Trp2	Πρόσθιος	CAG TAA TCA AAA CGA TGA GCG TTC TAA	228	Εξόνια 3-4	AL547407
	Ανάστροφος	GAA CAT CGG AAT CTA TTT GGT AAC GTC			
Gfi1	Πρόσθιος	CGG AGT TTG AGG ACT TCT GG	177	Εξόνια 3-4	BC032751
	Ανάστροφος	CAC ACG GTC GGT AGC TCT G			
Pim1	Πρόσθιος	CCG AGT GTA TAG CCC TCC AG	243	Εξόνια 5-6	BC020224
	Ανάστροφος	TGG ATT TCT TCG AAG GTT GG			

Πίνακας 2.3. Συνθήκες PCR.

Γονίδιο	Θερμοκρασία σύνδεσης	Αριθμός κύκλων
β-ακτίνη	54°C	23
Trp2	54°C	34
Gfi1	58°C	34
Pim1	54°C	33

Τα προϊόντα της PCR έγιναν ορατά με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2,5% σε TBE 0,5x, σαρώθηκαν και αναλύθηκαν όπως περιγράφηκε παραπάνω. Το πηλίκο του λόγου της ενοποιημένης πυκνότητας της ζώνης του Trp2 προς αυτήν της β-ακτίνης κάθε δείγματος, προς τον αντίστοιχη μέση τιμή του λόγου των μαρτύρων χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση των δειγμάτων μεταξύ τους και την ημι-ποσοτική έκφραση των αποτελεσμάτων.

Multiplex PCR για την ανίχνευση γονιδιακής ενίσχυσης του Trp12

Η multiplex PCR είναι μια παραλλαγή της PCR με την οποία μελετώνται ταυτόχρονα 2 ή περισσότερες αλληλουχίες διαφορετικού μήκους στο ίδιο δείγμα με την προσθήκη των αντίστοιχων εκκινητών στο ίδιο σωληνάριο. Απαιτείται βελτιστοποίηση ώστε η απόδοση της αντίδρασης να είναι παρόμοια και για τα 2 ζεύγη εκκινητών, ώστε να φτάνουν με τον ίδιο αριθμό κύκλων στο ίδιο σημείο της εκθετικής φάσης της καμπύλης απόδοσης. Για το σκοπό αυτό οι εκκινητές σχεδιάζονται έτσι ώστε να έχουν παρόμοια T_m , ενώ και τα μετάγραφα πρέπει κατά το δυνατόν να έχουν παρόμοια περιεκτικότητα σε GC με αυτούς. Αρχικά η βελτιστοποίηση γίνεται σε ξεχωριστές αντιδράσεις για το κάθε ζεύγος εκκινητών. Επιλέγεται ο κατάλληλος αριθμός κύκλων με δημιουργία καμπυλών απόδοσης από αντιδράσεις με προοδευτικά αυξανόμενο αριθμό κύκλων, όπως δείξαμε και προηγουμένως. Τέλος, δοκιμάζονται διάφοροι συνδυασμοί αραιώσεων των εκκινητών και επιλέγονται οι αναλογίες με τις οποίες, σε δείγματα-μάρτυρες, οι δύο αλληλουχίες-στόχοι καταλήγουν σε παρόμοια συγκέντρωση στο τέλος της αντίδρασης, έτσι ώστε να μην υπάρχει ανταγωνισμός μεταξύ τους.

Τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιήσαμε για τη μελέτη πιθανής γονιδιακής ενίσχυσης του Trp12 σε επίπεδο DNA. Ως αλληλουχία αναφοράς χρησιμοποιήσαμε τμήμα μεταξύ των εξονίων 2 και 3 του γονιδίου της ιντερφερόνης- γ (IFN- γ), ενώ για το Trp12 τμήμα του πρώτου του ιντρονίου. Η σύνθεση των εκκινητών φαίνεται στον Πίνακα 2.4. Δύο μL γενωμικού DNA αραιωμένου στα $25\text{ng}/\mu\text{l}$ προστέθηκαν σε αντίδραση τελικού όγκου $20\mu\text{L}$, η οποία περιείχε επίσης $10\mu\text{l}$ Platinum qPCR Supermix-UDG 2x (Invitrogen,UK), 250nM από τους εκκινητές του Trp12 σε όγκο $0,5\mu\text{l}$, 100nM από τους εκκινητές της IFN- γ σε όγκο $0,25\mu\text{l}$ και DEPC- treated H_2O $7,25\mu\text{l}$. Η πολυμεράση αυτή είναι τροποποιημένη ώστε να λειτουργεί ως «hot start», δηλαδή βρίσκεται σε σύμπλοκο με μονοκλωνικά αντισώματα-αναστολείς από τα οποία απελευθερώνεται μόνο στους 95°C , πράγμα που παρεμποδίζει τη μη ειδική σύνδεση και αυξάνει την ευαισθησία και την απόδοση της αντίδρασης. Το θερμικό προφίλ της αντίδρασης ήταν: αποδιάταξη στους 95°C για 10 λεπτά ακολουθούμενη από 29 κύκλους αποδιάταξης στους 95°C για $15''$, σύνδεσης στους 58°C για $30''$ και πολυμερισμού στους 72°C για $30''$ και τελική επέκταση των εκκινητών με επώαση στους 72°C για 7 λεπτά. Στην αντίδραση περιλαμβάνονταν 2 αρνητικοί μάρτυρες χωρίς υπόστρωμα.

Τα προϊόντα της PCR έγιναν ορατά με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 3% σε TBE $0,5x$, σαρώθηκαν και αναλύθηκαν όπως περιγράφηκε παραπάνω. Το

πηλίκου του λόγου της ενοποιημένης πυκνότητας της ζώνης του Trp2 προς αυτήν της IFN- γ κάθε δείγματος, προς την αντίστοιχη μέση τιμή του λόγου των μαρτύρων χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση των δειγμάτων μεταξύ τους και την ημι-ποσοτική έκφραση των αποτελεσμάτων.

Πίνακας 2.4. Αλληλουχίες των εκκινητών της multiplex PCR για την ανίχνευση του αριθμού αντιγράφων του γονιδίου Trp-2 στο γενωμικό DNA.

Γονίδιο	Εκκινητές	Αλληλουχία (5'-3')	Μέγεθος μεταγράφου (bp)	Genbank accession no
Trp2	Πρόσθιος	GCG ACG GAT TGA GGT TTG	139	AY309013
	Ανάστροφος	GCG TTT CAG GCG TAT GGA		
IFN- γ	Πρόσθιος	ATG CAG GTC ATT CAG ATG TAG C	250	J00219
	Ανάστροφος	TTG GAT GCT CTG GTC ATC TTT A		

2.6. Real-time RT-PCR

2.6.1. Αρχή της μεθόδου

Η συμβατική RT-PCR, ενώ αποτελεί σημαντικό εργαλείο για για την εργαστηριακή διερεύνηση της έκφρασης γονιδίων, είναι ωστόσο μία χρονοβόρα μέθοδος η οποία απαιτεί κοπιώδεις διεργασίες βελτιστοποίησης προκειμένου να δώσει αξιόπιστα αποτελέσματα, απαλλαγμένα κατά το δυνατόν από τα ανθρώπινα λάθη εξαιτίας των χειρισμών στα διάφορα στάδιά της. Ακόμη, έχει χαμηλή ευαισθησία, απαιτεί αρκετό RNA και είναι αναποτελεσματική στη διάκριση μεταβολών μικρότερων του 2x. Με την PCR πραγματικού χρόνου (real-time PCR), η οποία αναπτύχθηκε το 1992 με την πρωτοποριακή εργασία των Higuchi και συν^{270;271}, παραλείπεται το βήμα της ηλεκτροφόρησης και η ανάλυση των αποτελεσμάτων γίνεται σε πραγματικό χρόνο με τη βοήθεια λογισμικού που αναπαράγει το σήμα που εκπέμπεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης από φθορίζουσες ουσίες.

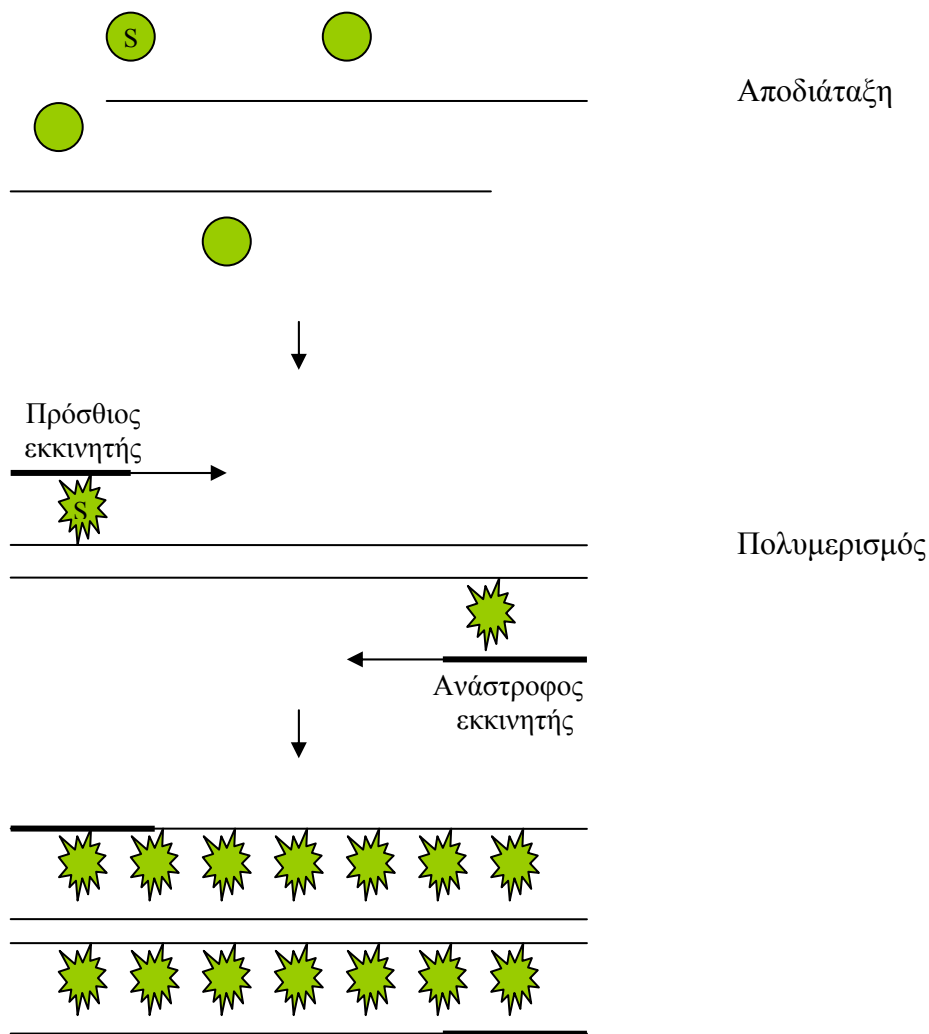
Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση της αλληλουχίας-στόχου είναι: α) φθορίζουσες χρωστικές που ενσωματώνονται οι ίδιες στο δίκλωνο DNA που παράγεται στη διάρκεια της αντίδρασης PCR και β) σεσημασμένοι ολιγονουκλεοτιδικοί φορείς, εκκινητές ή ανιχνευτές, με συμπληρωματική προς το

στόχο αλληλουχία οι οποίοι παράγουν φθορισμό κατά τον υβριδισμό τους (molecular beacons και scorpions) ή μετά από υδρόλυση (Taqman probes). Στην πρώτη περίπτωση ανήκει η χρωστική SYBRgreen, την οποία και χρησιμοποιήσαμε. Η χρωστική αυτή ενώ εκπέμπει ελάχιστο φθορισμό όταν είναι διαλυμένη, έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μη ειδικά στο δίκλωνο DNA που παράγεται κατά την αντίδραση πολυμερισμού, με αποτέλεσμα τη δραματική αύξηση της εκπομπής φθορισμού, Εικόνα 2.4. Ταυτόχρονα όμως συνδέεται και με τα παραπροϊόντα της αντίδρασης όπως τα primer-dimers γι' αυτό και είναι απαραίτητη η δημιουργία, μετά το τέλος της αντίδρασης, μιας καμπύλης τήξης που είναι ειδική για κάθε δίκλωνο προϊόν, όπως θα δούμε παρακάτω, καθώς και η προσεκτική επιλογή εκκινητών με μεγάλη ειδικότητα .

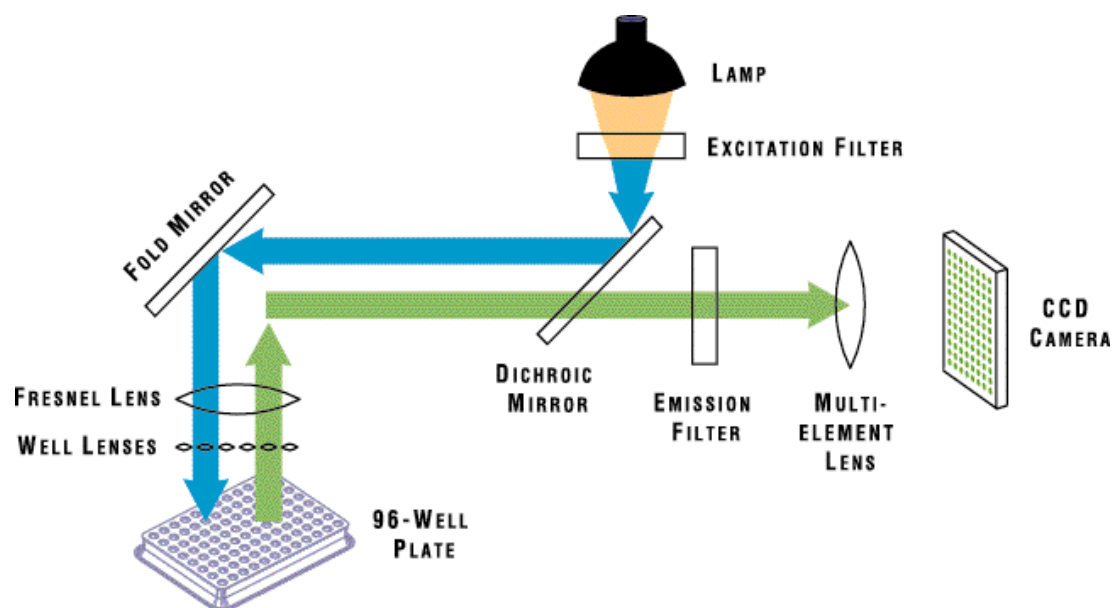
Περισσότερο ειδικοί (αλλά και πιο δαπανηροί) είναι οι οι ανιχνευτές τύπου Taqman^{272;273} (Taqman probes, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Πρόκειται για ολιγονουκλεοτίδια σεσημασμένα στο 5' άκρο τους με χρωστική δείκτη (reporter dye) και στο 3' άκρο τους με τη χρωστική- αδρανοποιητή (quencher dye) που εκμεταλλεύονται την ιδιότητα 5'-εξωνουκλεάσης που διαθέτει η Taq DNA πολυμεράση. Η χρωστική-αδρανοποιητής, όσο βρίσκεται σε κοντινή απόσταση από τη χρωστική-δείκτη καταστέλλει τη εκπομπή φθορισμού από αυτή μέσω του φαινομένου FRET (Förster/fluorescence resonance energy transfer). Κατά τη διάρκεια της φάσης του πολυμερισμού ο ανιχνευτής, που υβριδίζεται περιφερικότερα του προσθίου εκκινητή, διασπάται με αποτέλεσμα την αυξημένη εκπομπή φθορισμού από τη χρωστική-δείκτη.

Με τη real-time PCR είναι δυνατή η ταυτόχρονη μελέτη πάρα πολλών δειγμάτων (96 στο ABI Prism 7000), ενώ αν χρησιμοποιηθούν πρωτόκολλα ενός βήματος (δηλαδή συνεχόμενης σύνθεσης cDNA και PCR) ο απαιτούμενος χρόνος μειώνεται ακόμα περισσότερο. Απαιτείται 1000 φορές λιγότερο RNA σε σχέση με τη συμβατική RT-PCR, έχει μεγαλύτερη ευαισθησία, εντυπωσιακό δυναμικό εύρος έως 7 λογαρίθμους, ενώ η χρήση αυτοματισμού και η καθιέρωση της χρήσης ομοιόμορφων βασικών μιγμάτων μειώνει προφανώς τα λάθη και τις επιμολύνσεις.

Οι αντιδράσεις έγιναν στο όργανο ABI Prism 7000 sequence detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Στην εικόνα 2.5. φαίνεται σχηματικά η διάταξη του συστήματος ανίχνευσης φθορισμού που αποτελείται από τη λυχνία υπεριώδους, φίλτρα και τη CCD κάμερα που καταγράφει το φθορίζον σήμα.



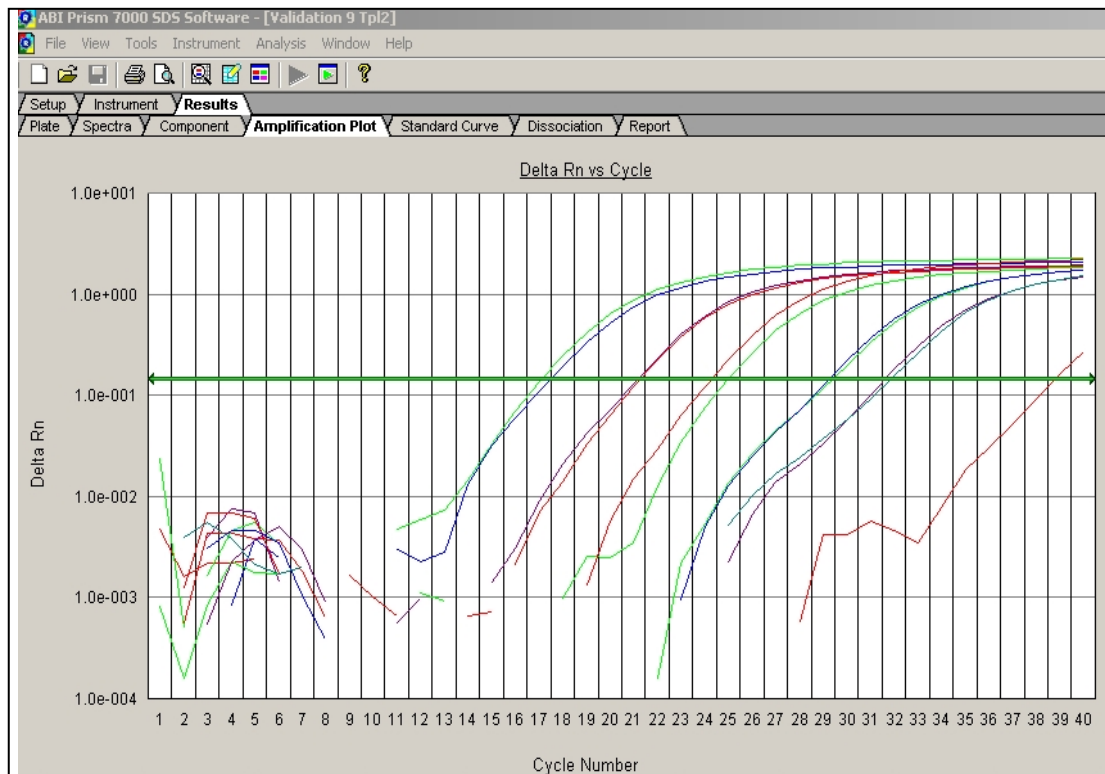
Εικόνα 2.4. Σχηματική απόδοση της δράσης της χρωστικής SYBRgreen (S).



Εικόνα 2.5. Η διάταξη ανίχνευσης φθορισμού στη μηχανή *real-time PCR* ABI Prism 7000.

2.6.2. Μέθοδοι ποσοτικής μελέτης με *real-time PCR*

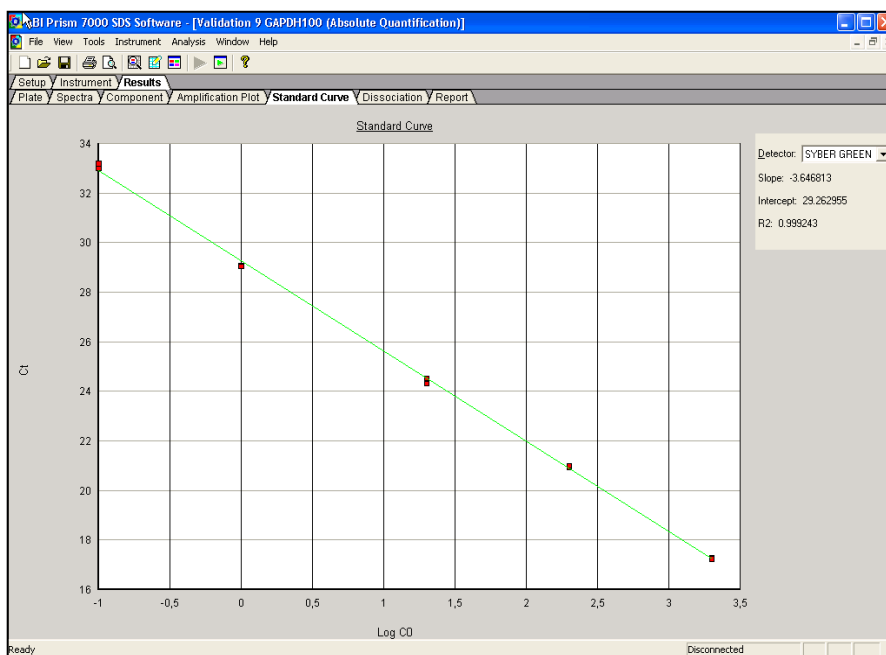
Σε μια τυπική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, το υπόστρωμα διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο. Επειδή όμως χρειάζονται αρκετοί κύκλοι πριν παραχθεί ανιχνεύσιμο προϊόν, η καμπύλη του σήματος φθορισμού έναντι του αριθμού κύκλων αρχικά είναι σιγμοειδής, ενώ αργότερα, όταν η συγκέντρωση του προϊόντος είναι πλέον πολύ μεγάλη επέρχεται κορεσμός και η καμπύλη μεταπίπτει σε πλατώ. Το σημείο της καμπύλης στο οποίο το ποσό του φθορισμού είναι εμφανώς πάνω από το θόρυβο (συνήθως ένας λογάριθμος πάνω από την καμπύλη του θορύβου) λέγεται κατώφλι αύξησης (*threshold cycle* ή *Ct*) και χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων. Όσα περισσότερα είναι τα αντίγραφα της αλληλουχίας-στόχου στο αρχικά προστιθέμενο mRNA τόσο νωρίτερα γίνεται ανιχνεύσιμη, επομένως έχει και χαμηλότερο *Ct*, Εικόνα 2.6.



Εικόνα 2.6. Τυπικές καμπύλες αύξησης που προκύπτουν από διαδοχικές αραιώσεις του υποστρώματος 1:10 από αριστερά προς τα δεξιά, όπου φαίνεται ότι η υψηλότερη συγκέντρωση αντιστοιχεί σε χαμηλότερο Ct. Η τιμή ΔRn στον Y άξονα αντιστοιχεί στη διαφορά του φθορισμού του χωρίς υπόστρωμα αρνητικού μάρτυρα από το φθορισμό του δείγματος .

Το προϊόν της PCR μπορεί να μετρηθεί με απόλυτες και σχετικές μεθόδους, όπως προαναφέρθηκε. Στην περίπτωση της real-time PCR, για την απόλυτη ποσοτικοποίηση χρησιμοποιούμε **καμπύλη αναφοράς**, η οποία προκύπτει από γραφική παράσταση της Ct προς τον λογάριθμο της συγκέντρωσης δειγμάτων με διαδοχικές αραιώσεις γνωστής ποσότητας πρότυπης αλληλουχίας και είναι μια ευθεία²⁷¹. Η καμπύλη αυτή δημιουργείται αυτόματα από το λογισμικό του μηχανήματος μετά το τέλος της αντίδρασης. Η πρότυπη αλληλουχία μπορεί να είναι πλασμιδιακό DNA ή άλλη μορφή DNA ή RNA που φέρει την αλληλουχία-στόχο. Η μάζα της μετράται με φασματοφωτόμετρο και εφόσον είναι γνωστό το μοριακό της βάρος η μάζα μετατρέπεται σε αριθμό μεταγράφων. Κάθε φορά ωστόσο, όπως και στην κλασική PCR, πρέπει παράλληλα να γίνεται και έλεγχος με αλληλουχία αναφοράς (πχ. housekeeping gene) για την εξομάλυνση τυχόν διαφορών στην αρχική ποσότητα cDNA και για την πιστοποίηση της επιτυχίας της αντίδρασης. Στην εικόνα 2.7. φαίνεται η καμπύλη αναφοράς που πήραμε από την ενίσχυση με real-time PCR του γονιδίου της GAPDH σε διαδοχικές αραιώσεις προτύπου DNA 1:10,

χρησιμοποιώντας το σύστημα SYBRgreen στο ABI Prism 7000. Κάθε αραιώση τέθηκε 3 φορές. Όπως βλέπουμε πρόκειται για ευθεία γραμμή, με σαφή την σύμπτωση των αποτελεσμάτων για κάθε τριάδα, ενώ το λογισμικό υπολογίζει αυτόματα μετά από εφαρμογή ανάλυσης γραμμικής παλινδρόμησης (linear regression) την κλίση της καμπύλης (slope) και το r^2 (regression coefficient, συντελεστής γραμμικότητας), το οποίο πρέπει να είναι >0.99 για την πιστοποίηση καλής σχέσης γραμμικότητας μεταξύ Ct και συγκέντρωσης.



Εικόνα 2.7. Καμπύλη αναφοράς από real-time RT-PCR για το γονίδιο της GAPDH ύστερα από σειριακές αραιώσεις 1:10 του προτύπου DNA, σε τριπλέτες. Άξονας X: ο δεκαδικός λογάριθμος της συγκέντρωσης (ή της αραιώσης) του υποστρώματος. Άξονας Y: οι τιμές Ct των δειγμάτων. Οι κόκκινες κουκίδες αντιστοιχούν στις τιμές Ct του κάθε δείγματος. Slope (κλίση): -3.64, r^2 : 0.999, intercept (σημείο τομής): 29,26. Η συνάρτηση που περιγράφει την γραφική παράσταση είναι $Y = -3,64X + 29,26$, από την οποία μπορεί να υπολογισθεί για κάθε τιμή Ct δείγματος (Y) η τιμή του X που ισούται με το λογάριθμο της συγκέντρωσης του δείγματος.

Η καμπύλη αναφοράς μπορεί να χρησιμοποιηθεί και χωρίς να είναι γνωστή η πραγματική συγκέντρωση της πρότυπης αλληλουχίας για ημι-ποσοτική, σχετική μελέτη δειγμάτων. Δεύτερος τρόπος σχετικής ποσοτικοποίησης, χωρίς πρότυπη καμπύλη, είναι η μέθοδος του «συγκριτικού Ct» (**comparative Ct method**). Με τη μέθοδο αυτή οι τιμές Ct δειγμάτων και μαρτύρων κανονικοποιούνται ως προς μία αλληλουχία αναφοράς (η συγκέντρωση της οποίας παραμένει σταθερή ανά κύτταρο), και στη συνέχεια συγκρίνονται με μάρτυρα υπολογίζοντας το πηλίκο του λόγου του φθορισμού που προέρχεται από την αλληλουχία-στόχο στο υπό εξέταση δείγμα προς το φθορισμό που προέρχεται από την αλληλουχία αναφοράς, προς τον αντίστοιχο λόγο του μάρτυρα. Οι μάρτυρες δηλαδή ορίζονται ως τα δείγματα στα οποία η συγκέντρωση είναι 1x. Το πηλίκο αυτό υπολογίζεται με τον τύπο²⁷⁴:

$$(1) R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

όπου $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{δείγματος}}(\text{μέση } Ct_{\text{στόχου}} - \text{μέση } Ct_{\text{αναφοράς}}) - \Delta Ct_{\text{μάρτυρα}}(\text{μέση } Ct_{\text{στόχου}} - \text{μέση } Ct_{\text{αναφοράς}})$. Μέση Ct είναι η μέση τιμή της τριάδας κάθε δείγματος.

[Η εξίσωση αυτή προκύπτει ως εξής: ο γενικός τύπος που περιγράφει τον αριθμό μεταγράφων X_n αλληλουχίας-στόχου μετά από n κύκλους PCR για δείγμα με αρχικό αριθμό μεταγράφων X_0 είναι: $X_n = X_0(1 + E)^n$ ή $X_{Ct \sigma} = X_{0\sigma}(1 + E_\sigma)^{Ct \sigma}$, όπου E_σ η απόδοση των εκκινητών για την αλληλουχία-στόχο σ και $X_{Ct \sigma}$ ο αριθμός μεταγράφων μετά από αριθμό κύκλων ίσο με Ct.

Παρομοίως για την αλληλουχία αναφοράς α ο τύπος είναι $X_{Ct \alpha} = X_{0\alpha}(1 + E_\alpha)^{Ct \alpha}$. Αντί για αριθμό μεταγράφων μπορούμε να θεωρήσουμε το ποσό του φθορισμού. Ο λόγος μεταξύ τους, που αντικατοπτρίζει την κανονικοποιημένη ως προς την αλληλουχία αναφοράς τιμή φθορισμού της αλληλουχίας-στόχου είναι:

$$R = \frac{X_{0\sigma}(1 + E_\sigma)^{Ct \sigma}}{X_{0\alpha}(1 + E_\alpha)^{Ct \alpha}} \quad \text{. Αν } E_\sigma = E_\alpha = E \text{ τότε η εξίσωση γίνεται } R = \frac{X_{0\sigma}}{X_{0\alpha}} (1 + E)^{Ct \sigma - Ct \alpha} = \frac{X_{0\sigma}}{X_{0\alpha}} (1 + E)^{\Delta Ct \alpha} \Rightarrow$$

$$\frac{X_{0\sigma}}{X_{0\alpha}} = R(1 + E)^{-\Delta Ct \alpha} = R_{NORM} \text{ (κανονικοποιημένη τιμή φθορισμού δείγματος).}$$

Αν γράψουμε τις ίδιες εξισώσεις για ένα μάρτυρα M τότε $M_{NORM} = R'(1 + E)^{-\Delta Ct M}$. Εφόσον όμως οι μετρήσεις λαμβάνονται σε αριθμό κύκλων ίσο με το Ct, στο σημείο αυτό ο φθορισμός είναι εξ'ορισμού ίσος σε όλα τα δείγματα της ίδιας αντίδρασης δηλαδή $R = R'$. Έτσι, το πηλίκο δείγματος-μάρτυρα R_{NORM} θα είναι:

$$R_{NORM} = \frac{X_{NORM}}{M_{NORM}} = \frac{R(1 + E)^{-\Delta Ct X}}{R'(1 + E)^{-\Delta Ct M}} = \frac{(1 + E)^{-\Delta Ct X}}{(1 + E)^{-\Delta Ct M}} = (1 + E)^{-\Delta \Delta Ct}$$

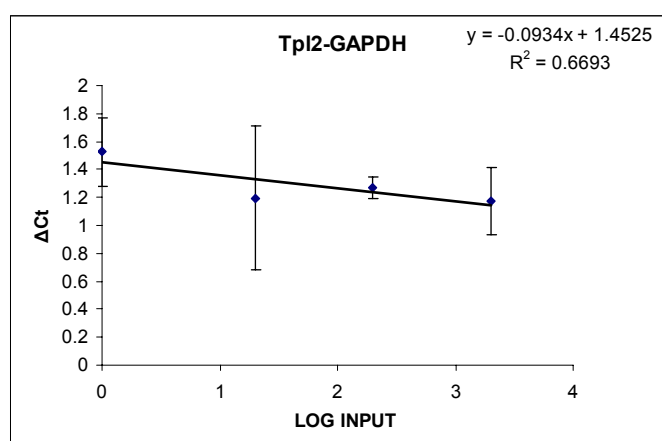
Για εκκινητές σχεδιασμένους με ιδανική απόδοση $E=1$ η εξίσωση μετατρέπεται στον τύπο (1)].

Σημαντική παράμετρος για την ποσοτικοποίηση είναι ο υπολογισμός της απόδοσης (efficiency) της αντίδρασης για ένα δεδομένο ζεύγος εκκινητών, δηλαδή

του αριθμού νέων μεταγράφων ανά κύκλο. Η κλίση της καμπύλης αναφοράς παρέχει την εκτίμηση της απόδοσης και συγκεκριμένα :

$$\text{Efficiency} = 10^{(-1/\text{κλίση})}$$

Προκειμένου να εφαρμοστεί η μέθοδος του συγκριτικού Ct, οι εκκινητές για την αλληλουχία αναφοράς και για την αλληλουχία-στόχο πρέπει να έχουν ίση απόδοση. Αυτό μπορεί να πιστοποιηθεί απλά με τον έλεγχο της γραφικής παράστασης των ΔCt μεταξύ των γονιδίων αναφοράς και στόχου σε διαδοχικές αραιώσεις υποστρώματος. Αν η κλίση της καμπύλης αυτής είναι σχεδόν μηδενική (<0.1), τότε οι αποδόσεις είναι παραπλήσιες, όπως στην Εικόνα 2.8.



Εικόνα 2.8. Καμπύλη ΔCt (Trp12-GAPDH) προς το λογάριθμο της συγκέντρωσης διαδοχικών αραιώσεων προτύπου DNA (1:10). Η κλίση της καμπύλης είναι -0,0934, επομένως οι αποδόσεις είναι παραπλήσιες για τα δύο γονίδια και μπορεί να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Στην αντίθετη περίπτωση πρέπει να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος της καμπύλης αναφοράς ή να υπολογιστούν και να ληφθούν υπόψη οι διαφορετικές τους αποδόσεις. Αυτό γίνεται με τη **μαθηματική μέθοδο του Pfaffl** ²⁷⁵, σύμφωνα με την οποία :

$$(2)R = \frac{E_{\sigma}^{\Delta Ct_{\sigma}(\mu_{M} - \mu_{X})}}{E_{\alpha}^{\Delta Ct_{\alpha}(\mu_{M} - \mu_{X})}}$$

όπου E_{σ} και E_{α} είναι οι αποδόσεις των γονιδίων στόχου σ και αναφοράς α αντίστοιχα, C_{tM} , C_{tX} είναι το C_t μάρτυρα M και δείγματος X και $\Delta C_{t\sigma}$, $\Delta C_{t\alpha}$ είναι η διαφορά $C_{tM} - C_{tX}$ των γονιδίων στόχου ή αναφοράς αντίστοιχα.

Βλέπουμε πως εάν $E_{\sigma} = E_{\alpha} = 2$ (ιδανική περίπτωση 100% απόδοσης), τότε η εξίσωση (2) γίνεται ταυτόσημη με την εξίσωση (1).

Ο παραπάνω λόγος προκύπτει από το λόγο της έκφρασης του γονιδίου-στόχου (σ) σε ένα δεδομένο δείγμα, κανονικοποιημένης ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς (α), δια την αντίστοιχη κανονικοποιημένη έκφραση δεδομένου μάρτυρα. Η κανονικοποιημένη έκφραση ενός δείγματος X δίδεται από τον τύπο :

$$(3) X_{NORM} = \frac{E_{\sigma}^{-\text{μέση}C_{t\sigma}}}{E_{\alpha}^{-\text{μέση}C_{t\alpha}}}$$

Για την εφαρμογή της μεθόδου αυτής χρειάζεται η δημιουργία καμπύλης αναφοράς προκειμένου να υπολογιστεί η απόδοση. Μετά από βελτιστοποίηση των συνθηκών και αφού βεβαιωθούμε για την επαναληψιμότητα της τιμής E σε αλληλάλληλες αντιδράσεις, μπορούμε πλέον να την εφαρμόζουμε κρατώντας μια πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

Τέλος, μια ακόμη μέθοδος σχετικής ποσοτικοποίησης είναι η μέθοδος της «**απόλυτης αύξησης φθορισμού**»²⁷⁶, η οποία εφαρμόζεται χρησιμοποιώντας ειδικά προγράμματα λογισμικού. Χρησιμοποιήσαμε το LinRegPCR software v.7.5 με το οποίο είναι θεωρητικά δυνατή η ακριβής μέτρηση της απόδοσης της αντίδρασης για κάθε δείγμα χωριστά (δηλαδή όχι συνολικά για ένα ζεύγος εκκινητών). Αυτό γίνεται δημιουργώντας μια προσομοίωση της καμπύλης αύξησης του δείγματος (παράγωγος καμπύλη), η οποία απεικονίζει το $\text{Log}(\text{φθορισμού})$ προς τον αριθμό των κύκλων. Με εφαρμογή ανάλυσης γραμμικής παλινδρόμησης (linear regression) στο κεντρικό, εκθετικό τμήμα της σιγμοειδούς καμπύλης προκύπτει μια γραμμική καμπύλη, από την κλίση της οποίας υπολογίζεται αυτόματα η απόδοση E . Στη συνέχεια μπορεί να υπολογιστεί μια μέση E και να αντικατασταθεί στην εξίσωση (2), ή να υπολογισθεί η αρχική συγκέντρωση κάθε δείγματος χωριστά χρησιμοποιώντας το ξεχωριστό E κάθε δείγματος. Να σημειωθεί ότι η μέθοδος αυτή είναι ανάλογη της δημοφιλούς μεθόδου «fit point» που χρησιμοποιείται στη μηχανή real-time PCR LightCycler.

Οι εκκινητές στη real-time PCR

Για τη βελτιστοποίηση της ποσοτικής μελέτης με real-time PCR και γενικότερα για τη σωστή λειτουργία της μεθόδου ο σχεδιασμός των εκκινητών έχει ιδιαίτερη σημασία. Εκτός από τους γενικούς κανόνες σχεδιασμού (βλέπε κεφ.2.5.), λαμβάνονται υπόψη και τα εξής :

- Μέγεθος μεταγράφου 80-150bp
- Μήκος εκκινητών περίπου 20 βάσεις
- %GC μεταξύ 40-60
- Όχι περισσότερα από 3 G ή C στο 3' άκρο, κατά προτίμηση τερματισμός του 3' άκρου σε G ή C
- Tm εκκινητών μεταξύ 60⁰ C-65⁰ C, διαφορά μεταξύ τους έως 1⁰ C
- Επιστάμενος έλεγχος απουσίας δευτεροταγών δομών

Για το σχεδιασμό των εκκινητών της real-time PCR χρησιμοποιήσαμε το πρόγραμμα Primer Express Software v.2 (Applied Biosystems). Για την επιβεβαίωση της μη ειδικής ενίσχυσης ψευδογονιδίων ή άλλων τμημάτων χρησιμοποιήσαμε το Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) του National Center for Biotechnology Information (NCBI). Για την τελευταία συνθήκη χρησιμοποιήσαμε το πρόγραμμα Qiagen Oligo Analysis & Plotting Tool (Qiagen web site). Τέλος, η απουσία μη ειδικής ενίσχυσης και δημιουργίας παραπροϊόντων ελέγχθηκε με τις καμπύλες τήξης των προϊόντων στο τέλος κάθε αντίδρασης real-time PCR, Εικόνα 2.9.

2.6.3. Σχετική, SybrGreen real-time RT-PCR για τον προσδιορισμό της έκφρασης των γονιδίων Tpl2, Gfi1 και Pim1

Η αντίστροφη μεταγραφή του RNA πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφηκε παραπάνω, από τα συντηρημένα σε -80⁰C κλάσματα του RNA, μετά από επεξεργασία με DNase I. Τα χαρακτηριστικά των εκκινητών που σχεδιάσαμε φαίνονται στον Πίνακα 2.5.

Πίνακας 2.5. Χαρακτηριστικά των εκκινητών της real-time RT-PCR για την ανίχνευση της έκφρασης των γονιδίων Trp2, Gfi1 και Pim1

Γονίδιο	Εκκινητές	Αλληλουχία (5'-3')	Μέγεθος μεταγράφου (bp)	Περιοχή ενίσχυσης	Genbank accession no
GAPDH	Πρόσθιος	GGA AGG TGA AGG TCG GAG TCA	101	Εξόνια 2-3	BC023632
	Ανάστροφος	GTC ATT GAT GGC AAC AAT ATC CA C T			
Trp2	Πρόσθιος	TCC TAA GGA CCT CCG AGG AAC	93	Εξόνια 6-7	AL547407
	Ανάστροφος	CCC AGG CTG TAG ATG TCT GCT			
Gfi1	Πρόσθιος	ACT GTG GCA AGA GGT TCC ACC	84	Εξόνια 6-7	BC032751
	Ανάστροφος	CCT GGC ACT TGT GAG GCT TC			
Pim1	Πρόσθιος	CTG CTC AAG GAC ACC GTC TAC A	143	Εξόνια 4-5	BC020224
	Ανάστροφος	TCT CCA CAC ACC ATA TCA TAC AGC			

Η συγκέντρωση των εκκινητών, του μαγνησίου, η αραιώση του cDNA και η θερμοκρασία σύνδεσης βελτιστοποιήθηκαν για μέγιστη απόδοση, χωρίς αναστολή από τα συστατικά της αντίδρασης RT και έτσι ώστε τα προϊόντα του γονιδίου αναφοράς (GAPDH) να βρίσκονται σε παρόμοιο δυναμικό εύρος με τα προϊόντα των υπό εξέταση γονιδίων. Το cDNA αραιώθηκε 1:20 με απεσταγμένο νερό απαλλαγμένο από Dnάσες, από το οποίο 5μl χρησιμοποιήθηκαν σε αντίδραση των 20μl που περιείχε επίσης 10μl 2x Platinum SybrGreen qPCR Supermix UDG (Invitrogen,UK), 1x χρωστική αναφοράς ROX, 6mM τελική συγκέντρωση MgCl₂ (το ρυθμιστικό διάλυμα περιέχει ήδη συγκέντρωση 3mM), 500nM εκκινητών προκειμένου για τα γονίδια Trp2, Gfi1 και Pim1 ή 100nM για την GAPDH και ανάλογη ποσότητα νερού (Πίνακας 2.6.). Ας σημειωθεί ότι το Supermix περιέχει dUTP (ουρακίλη) αντί για dTTP, καθώς και το ένζυμο ουρακίλ-N-γλυκοσυλάση ή UDG. Έτσι το προϊόν της PCR περιέχει ουρακίλη και σε περίπτωση που αυτό επιμολύνει τα αντιδραστήρια είναι εύκολη η απομάκρυνσή του με την ενεργοποίηση του ενζύμου UDG στους 50°C στο πρώτο στάδιο της PCR. Στη συνέχεια το ένζυμο αδρανοποιείται στις υψηλές θερμοκρασίες.

Πίνακας 2.6. Συστατικά της αντίδρασης SybrGreen real-time RT-PCR

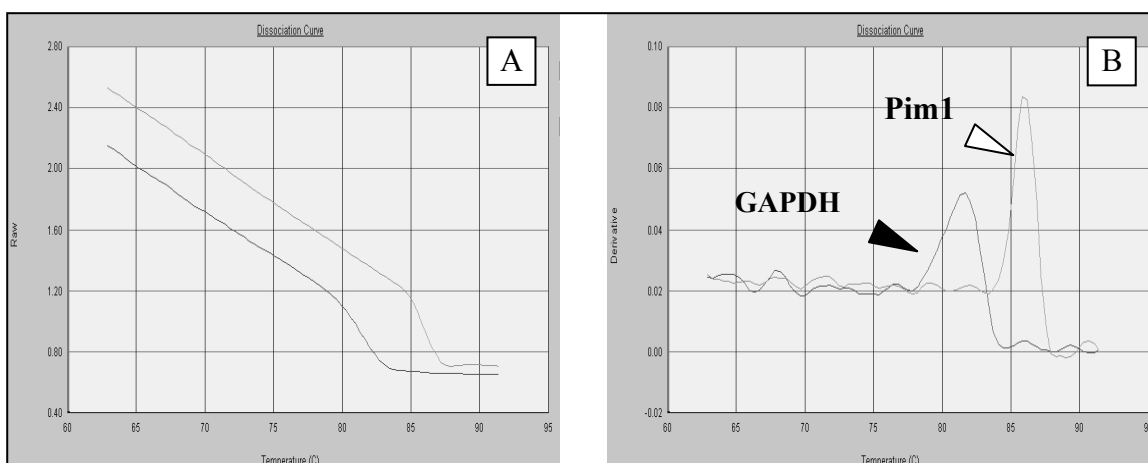
Διαλύματα	Προστιθέμενος όγκος (μL)
Platinum SybrGreen qPCR Supermix UDG	10
ROX	0,4
MgCl ₂ 50mM	1,2
Μίγμα εκκινητών 10μM (Tpl2 ή Gfi1 ή Pim1) ή 2 μM (GAPDH)	1
cDNA 1:20	5
DEPC-treated H ₂ O	2,4

Οι θερμικές παράμετροι της αντίδρασης ήταν: 2 λεπτά στους 50°C, 10 λεπτά στους 95°C και 40 επαναλήψεις αποδιάταξης στους 95°C για 15 δευτέρα και στους 60°C για 1 λεπτό, όπου πραγματοποιείται σύνδεση εκκινητών, πολυμερισμός και καταγραφή του σήματος φθορισμού. Μετά το τέλος της αντίδρασης ακολουθεί το στάδιο της δημιουργίας της καμπύλης τήξης (melting curve) με καταγραφή του φθορισμού που αποδίδεται κατά τη διάρκεια σταδιακής αποδιάταξης των προϊόντων, χρησιμοποιώντας πρόγραμμα προοδευτικής επώασης από τους 60°C έως τους 95°C για 20 λεπτά. Κάθε προϊόν διαφορετικού μήκους και περιεκτικότητας σε GC έχει χαρακτηριστική σταθερότητα και χαρακτηριστική T_m και δημιουργεί ειδική καμπύλη, η απότομη πτώση της οποίας αντιστοιχεί στην T_m της αλληλουχίας. Στην αρνητική παράγωγο της καμπύλης αυτής ξεχωρίζουν εύκολα τα προϊόντα από τις χαρακτηριστικές τους κορυφές σε διαφορετικές θερμοκρασίες, Εικόνα 2.9.

Οι αντιδράσεις έγιναν μέσα σε οπτικά σωληνάρια PCR των 0,2 ml, το κάθε δείγμα 3 φορές (τριπλέτα) ανά αντίδραση, με δύο αρνητικούς μάρτυρες είτε χωρίς υπόστρωμα είτε με υπόστρωμα από το οποίο παραλείφθηκε η μεταγραφή κατά την αντίδραση RT. Επίσης τα ίδια δείγματα εξετάστηκαν με τις ίδιες συνθήκες σε διαφορετικές μέρες άλλη μία φορά. Όλες οι αντιδράσεις έγιναν στο ABI Prism 7000 sequence detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τέλος, τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 3% για να επιβεβαιωθεί η παρουσία ειδικού μεταγράφου.

Για την επίτευξη της σχετικής ποσοτικοποίησης χρησιμοποιήσαμε και τις 3 προαναφερθείσες μεθόδους (καμπύλη αναφοράς, μέθοδος Pfaffl και μέθοδος απόλυτης αύξησης φθορισμού). Απαραίτητη και στις 3 ήταν η δημιουργία πρότυπων καμπύλων προκειμένου να υπολογίσουμε απευθείας τα αποτελέσματα στην πρώτη ή για τον υπολογισμό της απόδοσης της αντίδρασης στις 2 τελευταίες. Για το σκοπό

αυτό χρειάστηκε να παρασκευάσουμε πρότυπο DNA (standard), το οποίο αποτελούνταν από μίγμα 1:1 cDNA/DNA- προϊόν συμβατικής PCR, αραιωμένο τόσο ώστε να αντιστοιχεί σε λογαριθμική συγκέντρωση μεγαλύτερη κατά 1 λογάριθμο από την υψηλότερη που πήραμε σε δοκιμαστικά πειράματα στα δείγματα. Ακολούθως παρασκευάσαμε διαδοχικές αραιώσεις 1:10 από τα standards κάθε γονιδίου χωριστά και τις φυλάξαμε σε κλάσματα στους -20°C . Το κάθε κλάσμα χρησιμοποιούνταν έως 2 φορές λόγω της χαμηλής σταθερότητας του PCR προϊόντος.



Εικόνα 2.9. Καμπύλες τήξης (A) και αρνητικές παράγωγοι (B) Pim1, GAPDH.

Είναι ορατές οι 2 διαφορετικές κορυφές, στους 81.6°C για την GAPDH και στους 86°C για το Pim1 καθώς και η απουσία παραπροϊόντων.

2.7. ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΩΝ ΟΡΟΥ (ELISA)

Οι τιμές των κυτταροκινών ιντερλευκίνης (IL)-2, ιντερφερόνης (IFN)- γ , TNF- α και IL-12 στον ορό των ασθενών προσδιορίστηκαν με ανοσοενζυματική μέθοδο ELISA τύπου «sandwich». Η μέθοδος χρησιμοποιεί δύο αντισώματα που συνδέονται με την υπό εξέταση πρωτεΐνη δημιουργώντας ένα σύμπλοκο. Το ένα αντίσωμα είναι συνδεδεμένο σε σταθερή επιφάνεια και το άλλο είναι συνδεδεμένο με το ένζυμο HPR (Horseradish peroxidase), το οποίο καταλύει την αντίδραση της

τετρα-μεθυλβενζιδίνης από άχρωμο σε μπλε διάλυμα. Η ένταση του χρώματος μετράται σε φωτόμετρο και είναι ευθέως ανάλογη της ποσότητας του υποστρώματος. Για τον TNF- α και την IL-12, χρησιμοποιήσαμε κιτ υψηλής ευαισθησίας (Quantikine HS human TNF- α /TNFSF1A και IL-12 immunoassay αντίστοιχα, R&D systems inc), στα οποία το πρωτοταγές αντίσωμα είναι μονοκλωνικό, ενώ το δευτεροταγές αντίσωμα είναι συνδεδεμένο με αλκαλική φωσφατάση, που καταλύει την μετατροπή του NADPH σε NADH. Ακολουθεί προσθήκη δευτέρου ενζύμου-ενισχυτή που καταλύει τη μετατροπή του υποστρώματος INT-violet (μαζί με NADH) σε χρωστική φορμαζάνης, οπότε αναπτύσσεται χρώμα, του οποίου η ένταση μετράται σε φωτόμετρο.

Θα περιγραφεί η διαδικασία για την IFN- γ . 200 μ l από διάλυμα 1:2 ορού του υπό εξέταση ατόμου σε ειδικό διαλύτη που παρατίθεται στο κιτ (Quantikine human IFN- γ immunoassay, R&D systems inc), προστίθενται σε μικροβοθρία ειδικής πλάκας ο πυθμένας των οποίων είναι επιστρωμένος με πολυκλωνικό αντίσωμα αντι-IFN- γ . Ύστερα από επώαση 2 ωρών σε θερμοκρασία δωματίου τα βοθρία πλένονται 4 φορές, απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθενται 200 μ l πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της IFN- γ συνδεδεμένου με υπεροξειδάση. Ακολουθεί επώαση 2 ωρών, πλύσιμο και προσθήκη 200 μ l χρωμογόνου υποστρώματος που αφήνεται να αντιδράσει στο σκοτάδι. Μετά από 30 λεπτά η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη διαλύματος θειικού οξέος 2 N. Η ένταση του χρώματος μετράται στα 450 nm με μήκος κύματος αναφοράς τα 540 nm σε φωτόμετρο ELISA (BioRad, USA).

Παράλληλα με τη μέτρηση των αγνώστων δειγμάτων, μετρούνται γνωστές συγκεντρώσεις IFN- γ , από τις οποίες και σχεδιάζεται καμπύλη αναφοράς. Οι συγκεντρώσεις των αγνώστων δειγμάτων υπολογίζονται με βάση την καμπύλη αναφοράς του εκάστοτε πειράματος. Η ευαισθησία της μεθόδου είναι 8 pg/ml. Αντίστοιχα η ευαισθησία για τις IL-2, TNF- α και IL-12 είναι 7 pg/ml, 0,12 pg/mL και 0,5 pg/mL.

2.8. ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΡΟΗΣ (FACS)

Ο ανοσοφαινότυπος των λεμφοκυττάρων και NK κυττάρων του περιφερικού αίματος μελετήθηκε με κυτταρομετρία ροής, προκειμένου να καθοριστούν οι υποπληθυσμοί κακοηθών κυττάρων στο αίμα. Χρησιμοποιήθηκαν μονοκλωνικά

αντισώματα μύος, συνδεδεμένα με φθορίζουσες χρωστικές PE ή FITC, έναντι των ακόλουθων μεμβρανικών αντιγόνων: CD2, CD3, CD4, CD8, CD5, CD7, CD16, CD56, CD57, CD25, TCRαβ/γδ για τα T και NK λεμφοκύτταρα και CD19, CD20, CD23, CD22, CD5, CD11c, CD79b, FMC7, HLA-DR, (Beckman Coulter, Marseille, France), CD10, κ, λ (Becton Dickinson [BD] Biosciences, San Jose, CA) για τα B καθώς και το IntraPrep intracellular staining kit (Beckman Coulter, Marseille, France) για χρώση των ενδοκυττάρων TdT και CD3.

Εν συντομία 100μl αίματος σε EDTA-K₃ αντιπηκτικό μέσο επωάζονται με 20μl από το κάθε αντίσωμα για 20 λεπτά στο σκοτάδι. Μετά από έκπλυση με διάλυμα PBS που περιέχει επίσης 1% ορό εμβρύου βοός (FBS) και 0.05% αζίδιο, ακολουθεί λύση των ερυθροκυττάρων με 0.12% φορμικό οξύ και μονιμοποίηση με 0.2% παραφορμαλδεΐδη σε τελικό όγκο 500μl, χρησιμοποιώντας με το Q-prep reagent system (Beckman Coulter). Τα κατάλληλα ισοτυπικά control συνδεδεμένα με PE ή FITC χρησιμοποιήθηκαν σαν αρνητικοί μάρτυρες. Η ανάλυση λεμφοκυτταρικού παραθύρου 10.000 κυττάρων έγινε στον κυτταρομετρητή ροής Epics Elite (Coulter, Miami, FL). Χρησιμοποιήθηκε ανάλυση 2 χρωμάτων (PE και FITC) με τους συνδυασμούς α) του αντι-CD3 (UCHT1) με τα αντι- CD4 (13B8.2), CD8 (B9.11), CD5 (BL1a), CD7 (8H8.1) CD16 (3G8), CD56 (N901), CD57 (NC1), CD25 (B1.49.9), TCRαβ (BMA031), TCRγδ (IMMU510), TdT (HT1+HT4+HT8+HT9), β) του αντι-CD8 ή αντι-CD4 με αντι-CD16, CD56, CD57 και γ) αντι-CD19 (J4.119) με αντι- CD20 (HRC20), CD23 (9P25), CD22 (SJ10.1H11), CD5, CD11c (BU15), CD79b (CB3.1), FMC7 (FMC7), CD10 (HI10a), HLA-DR (B8.12.2), κ(TB28-2), λ(1-155-2). Για τη χρώση των κυτταροπλασματικών TdT και CD3, μετά τη χρώση με το επιθυμητό επιφανειακό αντίσωμα ακολουθεί μονιμοποίηση και αύξηση της διαπερατότητας των κυτταρικών μεμβρανών χρησιμοποιώντας το IntraPrep intracellular staining kit (Beckman Coulter, Marseille, France) και στη συνέχεια επώαση με το μονοκλωνικό αντι- TdT ή το αντι- CD3.

Για τη μελέτη της κλωνικότητας των T πληθυσμών έγινε ποσοτική ανάλυση των μεταβλητών περιοχών της β αλυσού του T-cell-receptor των CD3 θετικών κυττάρων με το IOTest Beta Mark kit (Beckman Coulter) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, ενώ σε περιπτώσεις υποψίας κλωνικότητας TCR γδ ή σε αδιευκρίνιστα αποτελέσματα γινόταν επιπλέον ανάλυση με DNA-PCR της V(D)J περιοχής του γονδιακού τύπου του TCR σε εργαστήριο αναφοράς.

2.9. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Τα αποτελέσματα της κλασικής RT-PCR παρουσιάζονται σαν μέσες τιμές του $X_{\text{NORM}} \pm \text{SD}$ και σαν μέσες τιμές $X(\text{ασθ}/\text{μαρτ})_{\text{NORM}}$. Τα αποτελέσματα της real-time RT-PCR παρουσιάζονται σαν μέσες τιμές του X_{NORM} (βλέπε κεφ.2.6.2.) από κάθε τριάδα υποστρώματος $\pm \text{SEM}$ (Standard error of mean) και σαν κανονικοποιημένες ως προς τους μάρτυρες τιμές $X(\text{ασθ}/\text{μαρτ})_{\text{NORM}} \pm \text{SEM}$. Για την εκτίμηση της επαναληψιμότητας της μεθόδου υπολογίστηκαν οι συντελεστές μεταβλητότητας (coefficient variance, CV) της μέσης Ct δειγμάτων που τέθηκαν τρεις φορές μέσα στην ίδια αντίδραση, ενώ η επαναληψιμότητα μεταξύ διαφορετικών αντιδράσεων ελέγχθηκε με το CV της μέσης Ct δειγμάτων προτύπου DNA που επαναλήφθηκαν σε τέσσερις διαφορετικές αντιδράσεις, οι οποίες έγιναν σε τέσσερις διαφορετικές μέρες. Σύγκριση μεταξύ κλασικής και real-time PCR έγινε με το Student's t-test. Για τη σύγκριση ασθενών και μαρτύρων οι ασθενείς χωρίστηκαν καταρχήν σε δυο ομάδες ανάλογα με το αν έπασχαν από B- ή T-λεμφοκυτταρικές κακοήθειες και στη συνέχεια σε υπο-ομάδες νοσημάτων ανά κατηγορία. Η σύγκριση μεταξύ των ομάδων αυτών και των μαρτύρων, ως προς την έκφραση του mRNA καθενός από τα 3 γονίδια καθώς και ως προς τα επίπεδα TNF- α του ορού, έγινε χρησιμοποιώντας την μη παραμετρική ανάλυση Mann Whitney U two-tailed test προκειμένου για δύο ομάδες ή το Kruskal-Wallis test για περισσότερες από δύο ομάδες. Σύγκριση ως προς την παρουσία των κυτταροκινών IL-12 και IFN- γ που φυσιολογικά είναι μηδενικές στον ορό έγινε εφαρμόζοντας τα χ^2 και Fisher's exact test. Η συσχέτιση μεταξύ των μετρούμενων παραμέτρων εκτιμήθηκε με το two-tailed Spearman's rank order correlation coefficient. Όλα τα test που εφαρμόστηκαν ήταν διπλής κατεύθυνσης (two-tailed). Η στατιστική επεξεργασία έγινε με το πρόγραμμα SPSSv12.0.

ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Ασθενείς

Από το Μάιο του 2001 έως τον Ιανουάριο του 2004 συλλέξαμε 24 δείγματα ασθενών και 22 δείγματα υγιών μαρτύρων. 12 ασθενείς έπασχαν από T- και 12 ασθενείς από B-λεμφοκυτταρικές κακοήθειες. Ακόμη, συμπεριελήφθη μία ασθενής με B-λεμφοκυττάρωση που στη συνέχεια αποδείχθηκε αντιδραστικού τύπου από ρευματοειδή αρθρίτιδα. Η διάμεση ηλικία των ασθενών ήταν τα 65 έτη (16-91) για τους ασθενείς με T- λεμφοκυτταρικές κακοήθειες και τα 76,5 έτη (38-88) για τους ασθενείς με B-λεμφοκυτταρικές κακοήθειες. Η μέση αναλογία κακοήθων κυττάρων στο κλάσμα των λεμφομονοκυττάρων, όπως προκύπτει από την ανάλυση με κυτταρομετρία ροής ήταν 81% και κυμαινόταν από 62% έως 96%. 14 ασθενείς ήταν άνδρες και 11 ήταν γυναίκες. Οι νοσολογικές οντότητες που μελετήθηκαν ήταν: χρόνια T-LGL ή NK λεμφοκυττάρωση ή λευχαιμία (n=4), οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία T-κυτταρικής αρχής (n=3), σύνδρομο Sezary (n=3), T-προλεμφοκυτταρική λευχαιμία (n=1), περιφερικό T-κυτταρικό λέμφωμα σε έδαφος σπογγιοειδούς μυκητίασης (n=1), B-χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (n=6), ΧΛΛ/σ.Richter (n=1), λέμφωμα σπληνός από κύτταρα της μεθοριακής ζώνης (n=1), λέμφωμα μανδύα (n=2), οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία από προγονικά B-κύτταρα (n=1) και λεμφοπλασματοκυτταρικό λέμφωμα/N.Waldenström's (n=1).

Συνολικά 4 από τις νεοπλασίες αυτές ανήκαν στις πολύ επιθετικού τύπου (ΟΛΛ), 5 στις επιθετικού τύπου (T-ΠΛ, περιφερικό T-λέμφωμα, λέμφωμα μανδύα και σ.Richter) και 15 στις βραδείας εξέλιξης (χαμηλού κινδύνου).

Από τις T-λεμφοκυτταρικές κακοήθειες 3 ανήκαν στις προερχόμενες από πρόδρομα κύτταρα (T-ΟΛΛ) και 9 στις προερχόμενες από ώριμα T-λεμφοκύτταρα. Οι τελευταίες αποτελούνταν από 4 εξωαδενικά λεμφώματα (σ. Σέζαρυ και δερματικό T-λέμφωμα σε έδαφος LGL λεμφοκυττάρωσης) και 5 χρόνιες λευχαιμίες/λεμφοϋπερπλασίες (χρόνια NK-λεμφοκυττάρωση, LGL λεμφοκυτταρική λευχαιμία και T-προλεμφοκυτταρική λευχαιμία).

Από τις B- λεμφοκυτταρικές κακοήθειες μια ανήκε στις προερχόμενες από πρόδρομα κύτταρα (κοινή ΟΛΛ) και οι υπόλοιπες 11 προέρχονταν από ώριμα B-λεμφοκύτταρα. Στις τελευταίες συμπεριλαμβάνονταν 5 λεμφώματα (λέμφωμα

μανδύα, λέμφωμα σπληνός της μεθοριακής ζώνης, λεμφοπλασματοκυτταρικό λέμφωμα/N.Waldenström's και σύνδρομο Richter) και 6 χρόνιας λευχαιμίας (ΧΛΛ).

Ο χαρακτηριστικός ανοσοφαινότυπος των περιφερικών λεμφοκυττάρων των ασθενών φαίνεται στους πίνακες 1.1. και 1.2. Δύο ασθενείς παρουσίαζαν κλωνικότητα στη γ άλυσσο του TCR, η ασθενής 6, πάσχουσα από T-LGL λευχαιμία με αντιδραστική NK λεμφοκυττάρωση και ο ασθενής 7, πάσχων από T-ΠΛ. Και οι δύο παρουσίασαν φαινόμενα αυτοανοσίας (ουδετεροπενία και μυοσίτιδα αντίστοιχα). Δύο από τους 3 ασθενείς με T-LGL λευχαιμία είχαν συνοδό ουδετεροπενία, μη οφειλόμενη σε διήθηση μυελού, με μέσο αριθμό ουδετεροφίλων 950/μλ.

Πίνακας 1.1. Ανοσοφαινότυπος περιφερικών λεμφοκυττάρων ασθενών με T-λεμφοκυτταρικές κακοήθειες

Ασθενής αριθ.	Νόσος	Ανοσοφαινότυπος
1	Προ-T-ΟΛΛ	TdT+,cCD3+,CD7+,CD4-CD8-
2	CTCL με μονοκλωνική T-LGL λεμφοκυττάρωση	CD3+,CD8+,CD56+,CD57+,TCRαβ+
3	T-LGL λευχαιμία	CD3+,CD8+,CD57+,TCRαβ+
4	SS	CD3+, CD4+, CD5+, CD7-
5	SS	CD3+, CD4+, CD7- 2 πληθυσμοί:
6	T-LGL λευχαιμία με αντιδραστική NK-λεμφοκυττάρωση	α) T-LGL: CD3+,CD8+,CD56+,CD57+, TCR γ+ β) NK: CD2+,CD3-,CD56+,57+
7	T-ΠΛ	CD3+CD4+CD25-TCRγ+
8	Χρόνια NK-λεμφοκυττάρωση	CD2+,CD3-,CD16+,CD56-, CD57-, TCR-
9	T-ΟΛΛ	TdT+,CD2+,CD3+,CD7+, CD4-, CD8-
10	T-ΟΛΛ	TdT+, CD3+,CD5+,CD2+,CD7+, CD4-, CD8-
11	PTCL δευτεροπαθές από ΣΜ	CD3+,CD4+,CD7-,CD25-, TCRαβ+
12	SS	CD3+,CD4+,CD7-

Πίνακας 1.2. Ανοσοφαινότυπος περιφερικών λεμφοκυττάρων ασθενών με Β-λεμφοκυτταρικές κακοήθειες

Ασθενής αριθ.	Νόσος	Ανοσοφαινότυπος
1	ΛΜΖ σπληνός	CD19+,CD5-,CD23-,CD11c-,CD10-,FMC7+
2	ΧΛΛ	CD19+,CD5+,CD23+,FMC7-, CD22-
3	ΧΛΛ	CD19+,CD5+,CD23+,FMC7-, CD22-
4	ΧΛΛ	CD19+,CD5+,CD23+,FMC7-, CD22-
5	ΧΛΛ	CD19+,CD5+,CD23+,FMC7-, CD22-
6	Αντιδραστική λεμφοκυττάρωση	CD19+,CD5-,CD23-
7	ΛΜ	CD19+,CD5+,CD23-, CD22+,CD10-
8	N.Waldenström	CD19+, CD5-, CD23-, CD10-,FMC7+, CD22+
9	ΧΛΛ/σ.Richter	CD19+,CD5+,CD23+, FMC7+, CD22-
10	ΧΛΛ	CD19+,CD5+,CD23+,FMC7-, CD22-
11	ΛΜ	CD19+,CD5+,CD23-, CD22+,CD10-
12	Κοινή- ΟΛΛ ph ¹⁺	CD19+,TdT+,CD20-, CD10+, sIg-, cIgM-
13	ΧΛΛ	CD19+,CD5+,CD23+, FMC7-, CD22-

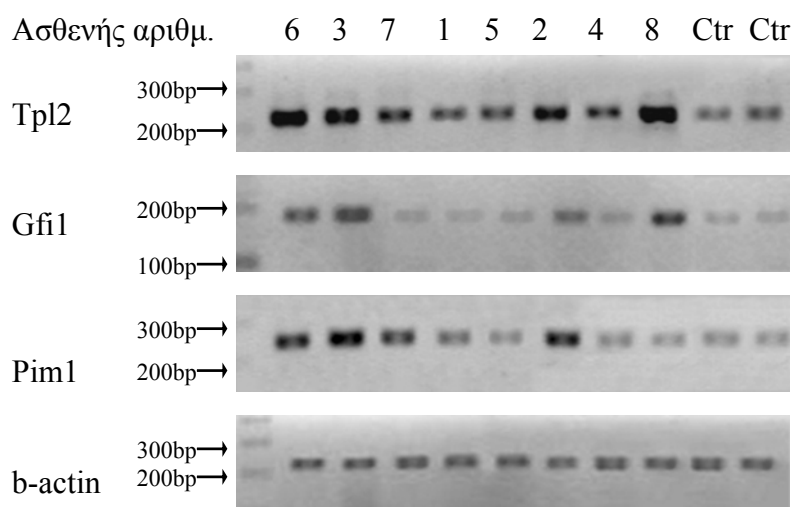
2. Ημι-ποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης των γονιδίων *Trp2*, *Gfi1* και *Pim1* με κλασική RT-PCR στα περιφερικά λεμφομονοκύτταρα.

2.1. T-Λεμφοκυτταρικές κακοήθειες

Όπως αναφέρθηκε, σε ζωικά πειραματικά μοντέλα, έχει βρεθεί συμμετοχή των γονιδίων *Trp2*, *Gfi1* και *Pim1* στην ανάπτυξη T-λεμφομάτων. Η ρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα *Gfi1* στα T-λεμφοκύτταρα γίνεται μέσω του MAPK/ERK δρόμου κατά την ενεργοποίηση του TCR^{183;193}, οδός την οποία είναι γνωστό ότι ενεργοποιεί το *Trp2*. Τα *Trp2* και *Pim1* σε μια μελέτη συνδέονταν με σχέση αλληλο-αποκλεισμού σε MoMuLV-επαγόμενα λεμφώματα ποντικών²⁶³, ενώ συνέκφραση *Pim1* και *Gfi1* έχει βρεθεί σε T λεμφώματα^{180;197}. Με βάση τα δεδομένα αυτά και επειδή οι μοναδικές μελέτες στον άνθρωπο έχουν γίνει με πειράματα έκτοπης έκφρασης σε κυτταρικές σειρές, αποφασίσαμε να διαπιστώσουμε *in vivo* εάν τα

γονίδια αυτά ενέχονται στην ανάπτυξη T-λεμφοκυτταρικών νεοπλασιών του ανθρώπου, χρησιμοποιώντας λεμφομονοπύρηνα από το περιφερικό αίμα ασθενών με T-λευχαιμίες ή λεμφώματα με λευχαιμική έκφραση.

Αρχικά έγιναν αντιδράσεις RT-PCR για τον έλεγχο της έκφρασης των 3 γονιδίων στους 22 μάρτυρες. Όλοι οι μάρτυρες είχαν παρόμοια, χαμηλή έκφραση εκτός από έναν ο οποίος και απορρίφθηκε. Η εικόνα 2.1 δείχνει μια αντιπροσωπευτική ανάστροφη PCR από RNA περιφερικών λεμφομονοπυρήνων ασθενών με T-λεμφοκυτταρικές κακοήθειες για την έκφραση των γονιδίων Trp2, Gfi1 και Pim1 με τη β-ακτίνη ως παράγοντα κανονικοποίησης. Σε κάθε σει αντιδράσεων περιλαμβάνονταν 4 έως 6 μάρτυρες. Ο λόγος της κανονικοποιημένης ως προς την β-ακτίνη οπτικής πυκνότητας της ζώνης του υπό εξέταση γονιδίου σε κάθε δείγμα, προς τη μέση τιμή των λόγων των μαρτύρων χρησιμοποιήθηκε για την ημι-ποσοτική έκφραση των αποτελεσμάτων. Ως κατώφλι αύξησης σε σχέση με τους μάρτυρες θεωρήσαμε την μεγαλύτερη από 2x αύξηση όπως γίνεται συνήθως σε μελέτες υπερέκφρασης γονιδίων.



Εικόνα 2.1. Ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αγαρόζης 2.5% των προϊόντων της RT-PCR από 8 ασθενείς με T-λεμφοκυτταρικές κακοήθειες και 2 υγιείς μάρτυρες (Ctr). Οι ασθενείς υπ' αριθμόν 6, 3, 2, 8 έχουν αυξημένη έκφραση Trp2, οι ίδιοι ασθενείς έχουν αυξημένη έκφραση Gfi1, ενώ οι 6, 3, 7, 2 έχουν αυξημένη έκφραση Pim1.

Συνολικά τα αποτελέσματα των ασθενών με T-Λεμφοκυτταρικές κακοήθειες φαίνονται στον πίνακα 2.1. Με κλασική RT-PCR δουλεύτηκαν τα δείγματα 1 έως και

8, διότι τα δείγματα των ασθενών 9 έως 12 ήταν μεταγενέστερα οπότε η μελέτη γινόταν μόνο με real-time PCR χρησιμοποιώντας τη συμβατική PCR μόνο σαν επιβεβαιωτική μέθοδο, με τους εκκινήτες της real-time PCR. Αυτό έγινε διότι διαπιστώθηκε η πολύ μεγαλύτερη ευαισθησία της real-time PCR στην ανίχνευση διαφορών μικρού εύρους. Κατόπιν τούτου επιλέχθηκε να γίνει στατιστική ανάλυση μόνο στα αποτελέσματα της real-time PCR.

Πίνακας 2.1. Αποτελέσματα της έκφρασης του mRNA των Trp2, Gfi1 και Pim1 με κλασσική RT-PCR στα περιφερικά λεμφομονοκύτταρα των ασθενών 1-8 με T-Λεμφοκυτταρικές κακοήθειες.

Ασθενής αριθ.	Trp2 _{NOPM} ¹ ±SD ²	Trp2 (Ασθ/Ctr) NOPM ³	Gfi1 _{NOPM} ±SD	Gfi1 (Ασθ/Ctr) NOPM	Pim1 _{NOPM} ±SD	Pim1 (Ασθ/Ctr) NOPM
CTR $\bar{\mu}$ (n=4)	1,09±0,213	1	0,51±0,054	1	0,85±0,188	1
1	1,17±0,043	1,1	0,44±0,016	0,9	0,72±0,027	1,3
2	2,44±0,090	2,2	1,46±0,053	2,9	2,35±0,087	2,6
3	2,34±0,087	2,1	1,73±0,024	3,4	2,17±0,080	2,7
4	1,24±0,046	1,1	0,38±0,066	0,7	1,00±0,037	0,9
5	1,37±0,051	1,2	0,43±0,020	0,8	1,12±0,041	0,8
6	3,53±0,134	3,3	1,44±0,020	2,8	0,64±0,024	2,8
7	1,92±0,088	1,7	0,65±0,020	1,3	0,87±0,032	2,6
8	3,12±0,115	2,8	1,78±0,016	3,5	0,76±0,028	1,2

¹ Trp2_{NOPM}: η μέση τιμή του λόγου της οπτικής πυκνότητας της ζώνης Trp2 προς την αντίστοιχη ζώνη της β-ακτίνης στο ίδιο δείγμα.

²SD : η σταθερά απόκλιση της μέσης τιμής του παραπάνω λόγου

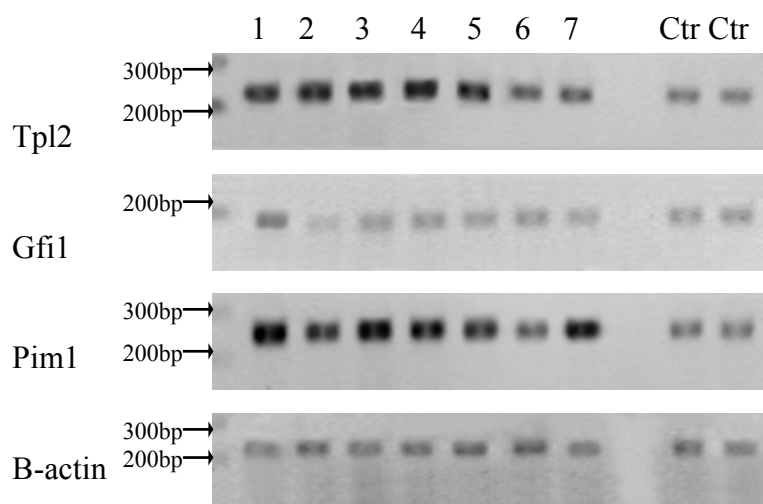
³Trp2(Ασθ/Ctr)_{NOPM}: ο λόγος Trp2_{NOPM} δείγματος προς τη μέση Trp2_{NOPM} των 4 μαρτύρων.

Παρατηρούμε ότι οι ασθενείς με χρόνια T-LGL λεμφοκυττάρωση ή λευχαιμία έχουν αυξημένη έκφραση (Asth/Ctr)_{NORM} και των 3 γονιδίων, ο ασθενής με χρόνια NK-λεμφοκυττάρωση (αριθ.8) έχει υπερέκφραση μόνο Trp2 και Gfi1 και επιπλέον το δείγμα αριθ.7 (T-ΠΛ) έχει αυξημένη έκφραση Pim1. Όπως προαναφέρθηκε επιφυλάξαμε τη στατιστική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων του συνόλου των δειγμάτων για την επόμενη φάση της μελέτης που ήταν η μελέτη με real-time PCR.

2.2. B-Λεμφοκυτταρικές κακοήθειες

Στον άνθρωπο έχει βρεθεί υπερέκφραση της Trp2 στο EBV-σχετιζόμενο λέμφωμα Hodgkin's¹⁴⁹, ενώ δεν έχει μελετηθεί σε άλλα B-NHL. Το Gfi1 υπερεκφράζεται σε B-λεμφώματα ποντικών που αναπτύσσονται σε διαγονιδιακά Eμυ-myc ποντίκια με την επίδραση MoMuLV, καθώς και σε σπληνικό B-λέμφωμα από κύτταρα της μεθοριακής ζώνης που αναπτύσσουν τα NF.V⁺ ποντίκια, εξαιτίας του MoMuLV^{197;198}. Από την άλλη, η κινάση Pim1 έχει επιβεβαιωμένη συμμετοχή σε χρωμοσωμικές μεταθέσεις σε B-λεμφώματα, υπερέκφραση σε λεμφώματα σχετιζόμενα με Myc, σε λεμφώματα μανδύα και σε οξείες λεμφοβλαστικές λευχαιμίες, ενώ μεταλλάξεις της ανευρίσκονται σε λεμφώματα του ΚΝΣ και άλλων ιστών^{83;107;209;253-256}. Βάσει των στοιχείων αυτών και θέλοντας επίσης να διαπιστώσουμε αν πιθανές σχέσεις των γονιδίων στην ανάπτυξη των T- λεμφομάτων επεκτείνονται και στις B-λεμφοειδείς νεοπλασίες, μελετήσαμε σειρά ασθενών με διάφορες B-κυτταρικής αρχής οξείες και χρόνιες λευχαιμίες και λεμφώματα.

Η εικόνα 2.2. δείχνει μια αντιπροσωπευτική ανάστροφη PCR από RNA περιφερικών λεμφομονοκυττάρων ασθενών με B-λεμφοκυτταρικές κακοήθειες για την έκφραση των γονιδίων Trp2, Gfi1 και Pim1.



Εικόνα 2.2. Ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αγαρόζης 2.5% των προϊόντων της RT-PCR από 7 ασθενείς με Β-λεμφοκυτταρικές κακοήθειες και 2 υγιείς μάρτυρες (Ctr). Οι ασθενείς υπ' αριθμόν 1-5 φαίνεται να έχουν αυξημένη έκφραση Trp2, ο ασθενής 1 έχει αυξημένη έκφραση Gfi1, ενώ οι 1-5 και 7 έχουν αυξημένη έκφραση Pim1.

Για τον ίδιο λόγο που αναφέρθηκε παραπάνω, τα δείγματα 8-13 αναλύθηκαν, (με επανάληψη και των 1-7) μόνο με real-time PCR. Συνολικά τα αποτελέσματα των ασθενών με Β-Λεμφοκυτταρικές κακοήθειες φαίνονται στον πίνακα 2.2. Παρατηρούμε ότι οι ασθενείς 1-4 (ΛΜΖ σπληνός και Β-ΧΛΛ) έχουν έκφραση Trp2 μεγαλύτερη του 2x τη μέση τιμή των μαρτύρων, ενώ οι ασθενείς 1, 3, 4 και 7 παρουσιάζουν αυξημένη Pim1. Τα υπόλοιπα δείγματα που φαινονταν θετικά στην ηλεκτροφόρηση είχαν ποσοτική έκφραση κάτω του 2x μετά από ανάλυση της οπτικής πυκνότητας και θεωρήθηκαν αρνητικά.

Πίνακας 2.2. Αποτελέσματα της έκφρασης του mRNA των Trp2, Gfi1 και Pim1 με κλασσική RT-PCR στα περιφερικά λεμφομονοπύρρηνα των ασθενών 1-7 με Β-Λεμφοκυτταρικές κακοήθειες.

Ασθενής αριθ.	Trp2 _{NOPM} ±SD	Trp2 (Ασθ/Ctr) NOPM	Gfi1 _{NOPM} ±SD	Gfi1 (Ασθ/Ctr) NOPM	Pim1 _{NOPM} ±SD	Pim1 (Ασθ/Ctr) NOPM
CTR $\bar{\mu}$ (n=4)	1,30±0,182	1	0,88±0,196	1	1,70±0,194	1
1	3,10±0,115	2,4	1,37±0,003	1,6	4,97±0,184	2,9
2	3,24±0,120	2,5	0,50±0,019	0,6	2,84±0,105	1,7
3	2,77±0,102	2,1	0,82±0,030	0,9	3,62±0,134	2,1
4	3,31±0,122	2,5	0,90±0,033	1,0	3,66±0,135	2,2
5	2,33±0,086	1,8	0,67±0,025	0,8	2,64±0,098	1,6
6	1,34±0,050	1,0	0,59±0,022	0,7	1,34±0,049	0,8
7	1,99±0,074	1,5	0,57±0,021	0,6	3,4±0,114	2

3. Προσδιορισμός έκφρασης των γονιδίων Trp2, Gfi1 και Pim1 με σχετική, ποσοτική real-time RT-PCR στα περιφερικά λεμφομονοπύρρηνα ασθενών με λεμφοειδείς νεοπλασίες.

3.1. Αξιοπιστία του ποσοτικού προσδιορισμού

Για την λήψη (σχετικών) ποσοτικών αποτελεσμάτων με real-time RT-PCR χρησιμοποιήσαμε και τις 3 προαναφερθείσες μεθόδους, δηλαδή την καμπύλη αναφοράς (Α), τη μέθοδο Pfaffl (Β) και τη μέθοδο της απόλυτης αύξησης φθορισμού (Γ). Τα πειράματα δημιουργίας καμπύλης αναφοράς επαναλήφθηκαν αρκετές φορές για το κάθε γονίδιο, χρησιμοποιώντας πέντε διαδοχικές αραιώσεις προτύπου DNA, η σύνθεση του οποίου περιγράφεται στο κεφάλαιο 2.6.3, για κάθε γονίδιο χωριστά συμπεριλαμβανομένης της GAPDH.

Κατόπιν εφαρμογής ανάλυσης γραμμικής παλινδρόμησης (linear regression) ο συντελεστής r^2 ήταν άνω του 0,997 και για τις 4 καμπύλες σε όλες τις περιπτώσεις δηλαδή η συσχέτιση των τιμών Ct-log(input) ήταν γραμμική.

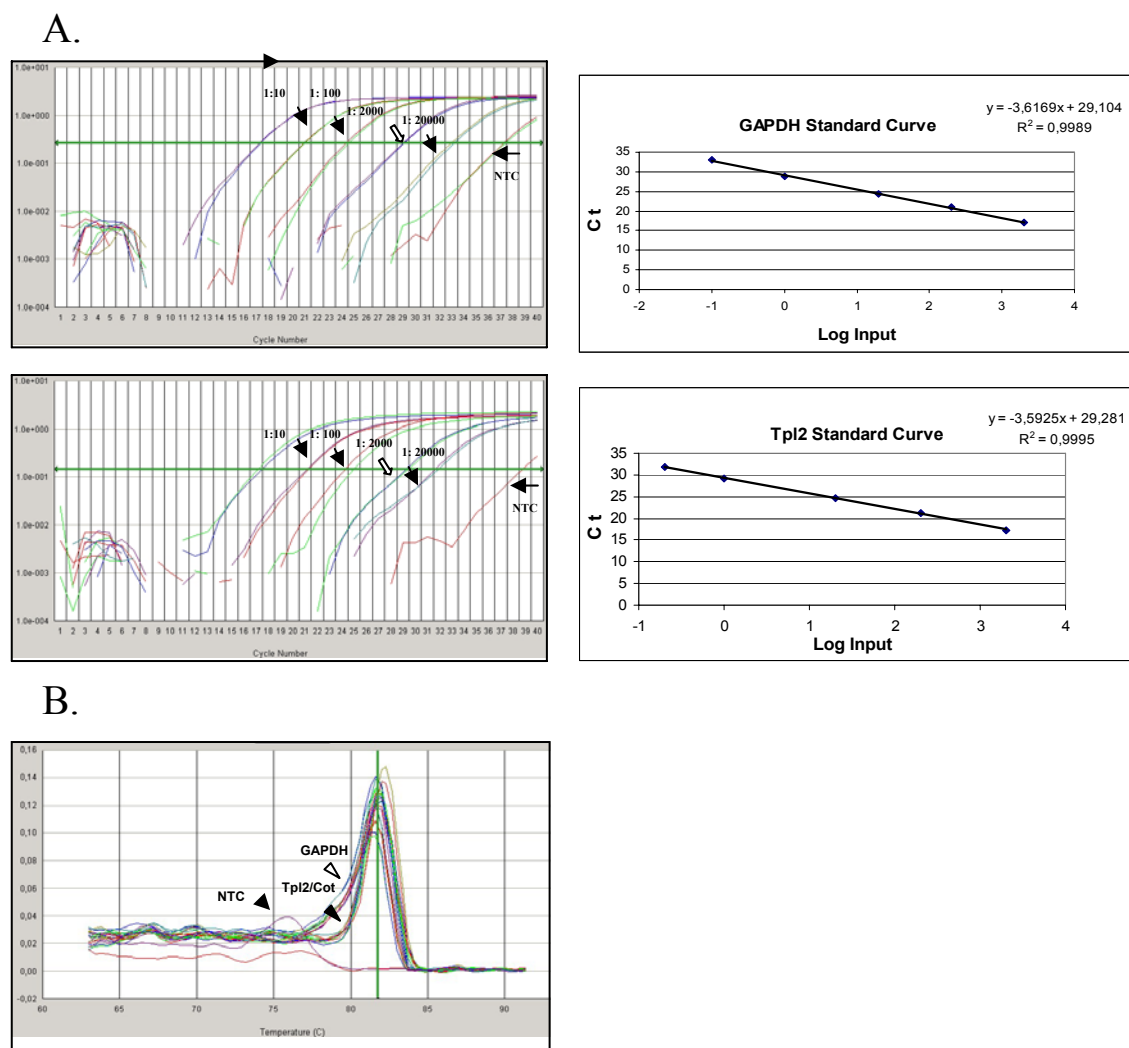
Μέθοδος (A): Η συνάρτηση που περιγράφει την κάθε καμπύλη έχει τη μορφή $y=ax+b$ και χρησιμοποιήθηκε αρχικά για τον απευθείας υπολογισμό του λογαρίθμου της συγκέντρωσης (x) από την τιμή του Ct (y) κάθε δείγματος. Ακολούθως η τιμή αυτή διαιρείται με τη αντίστοιχη του γονιδίου αναφοράς (GAPDH) και ο λόγος του κάθε δείγματος διαιρείται με τον αντίστοιχο μέσο λόγο των μαρτύρων, οπότε προκύπτει η σχετική έκφραση του δείγματος.

Μέθοδος (B): Η κλίση της καμπύλης αναφοράς δίδεται από το a και χρησιμοποιήθηκε στην εξίσωση $E=10^{-1/κλίση}$ για τον υπολογισμό της απόδοσης E της αντίδρασης για κάθε ζεύγος εκκινητών και την αντικατάστασή της στη συνέχεια στην εξίσωση 2 (βλέπε κεφ.2.6.2.) που δίνει τη σχετική έκφραση του κάθε δείγματος. Ειδικά για το Tpl-2 βρέθηκε πως η μέση E ήταν σχεδόν ίση με την E της GAPDH (1,89-1,9) επομένως δεν ήταν απαραίτητη η επανάληψη της καμπύλης αναφοράς σε κάθε πείραμα, αλλά μπορούσε να χρησιμοποιηθεί η μέση τιμή της E. Η εικόνα 3.1. δείχνει τις προπαρασκευαστικές αντιδράσεις για το Tpl2 και την GAPDH με τη δημιουργία καμπυλών αναφοράς και καμπυλών τήξης, ενώ στην εικόνα 3.3. παρατίθεται παράδειγμα δύο δειγμάτων και ο τρόπος υπολογισμού της σχετικής συγκέντρωσης.

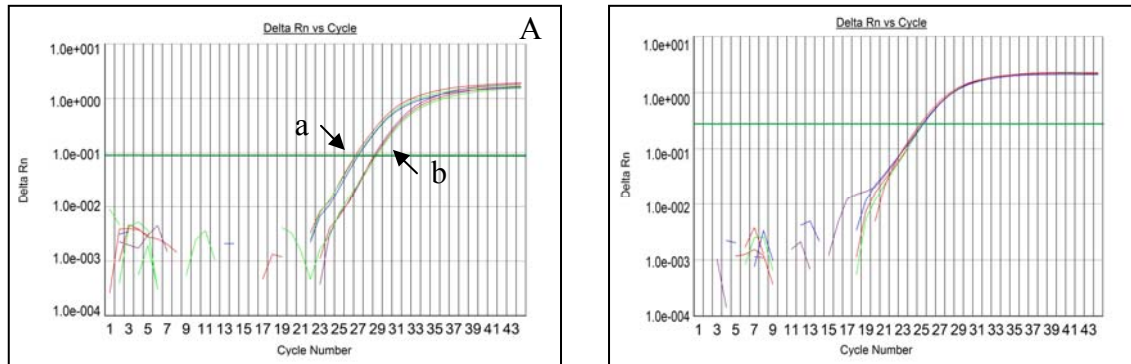
Οι συντελεστές μεταβλητότητας (CV%) για τη μέση τιμή E κάθε ζεύγους εκκινητών υπολογίστηκαν από τις τιμές E που πήραμε από τέσσερις καμπύλες αναφοράς χρησιμοποιώντας τις ίδιες αραιώσεις προτύπου DNA και παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1.

Πίνακας 3.1. Μέση απόδοση (E) εκκινητών

	TPL2	Pim1	Gfi1	GAPDH
Μέση E	1,9	2	2	1,9
CV	0,25%	2,5%	2%	0,5%



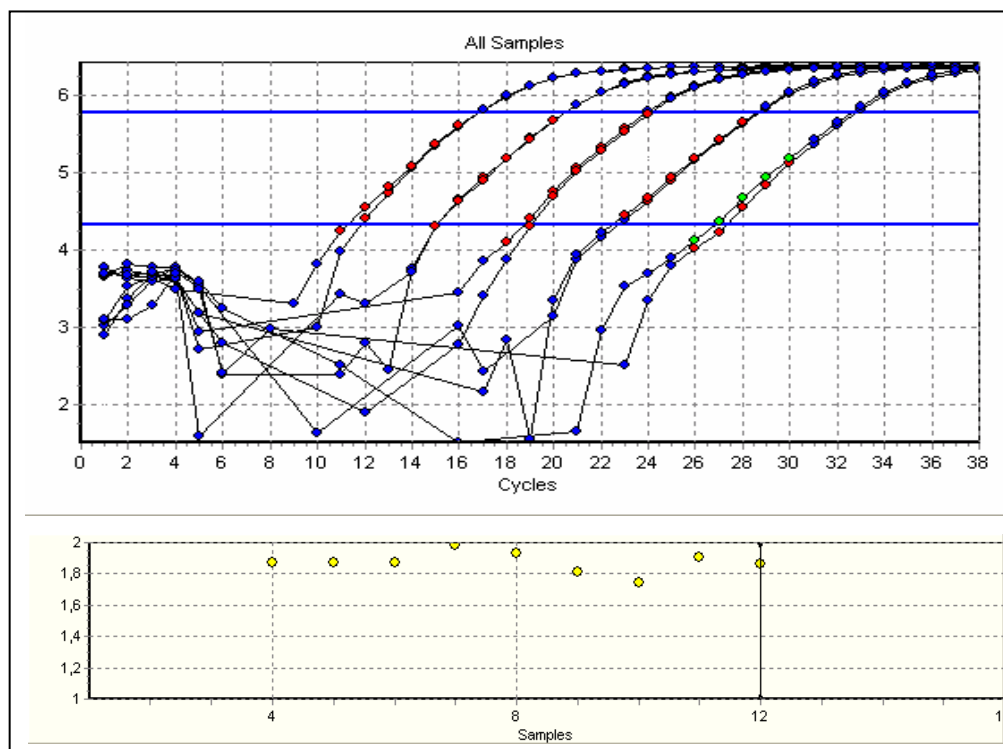
Εικόνα 3.1. Προπαρασκευαστικές αντιδράσεις real-time PCR. **A.** Σειριακές αραιώσεις προτύπου DNA GAPDH και Tpl2/Cot. Τα μαύρα βέλη αντιστοιχούν σε αραιώση 1:10, τα λευκά σε 1:20. NTC (no-template control): αντιδράσεις με παράλειψη του υποστρώματος. Η κλίση κάθε καμπύλης φαίνεται στο δεξί άνω τεταρτημόριο κάθε διαγράμματος και είναι -3.61 και -3.59 αντίστοιχα. Οι άξονες X αντιπροσωπεύουν το λογάριθμο της αραιώσης, οι άξονες Y το μέσο Ct των δειγμάτων. **B.** Καμπύλες τήξης που δείχνουν μια κορυφή στους 81.7°C και για τα δύο γονίδια (λευκό βέλος: GAPDH, μαύρο βέλος: Tpl2), ενώ τα NTC έχουν κορυφή σε πολύ χαμηλότερη θερμοκρασία ή δεν δημιουργούν κορυφή.



Εικόνα 3.2. Παράδειγμα καμπυλών αύξησης Trp12 και GAPDH 2 δειγμάτων στο ABI Prism 7000. Η οριζόντια πράσινη γραμμή αντιστοιχεί στο κατώφλι αύξησης ή Ct. Η τριπλέτα του δείγματος a έχει Ct 26.68, 26.87 και 27.04 στο Trp12 (διάγραμμα A) και 25.18, 25.19 και 25.17 στην GAPDH (διάγραμμα B), ενώ η τριπλέτα του δείγματος b έχει Ct 28.62, 28.75 και 28.93 στο Trp12 και 25.06, 24.85 και 25.08 στην GAPDH. Το δείγμα a, με τη μέθοδο της καμπύλης αναφοράς, έχει απόλυτη συγκέντρωση Trp-2 4.71 και GAPDH 12.16, ενώ το δείγμα b έχει απόλυτη συγκέντρωση Trp-2 1.39 και GAPDH 13.66 (μονάδες ανάλογα με τις μονάδες του standard). Οι μονάδες στη συνέχεια απλοποιούνται αφού γίνει κανονικοποίηση δια την GAPDH, οπότε $a=3,8 \times 10^{-1}$ και $b=1 \times 10^{-1}$. Η μέθοδος Pfaffl αντίστοιχα δίνει $a_{NORM}=3 \times 10^{-1}$ και $b_{NORM}=0,8 \times 10^{-1}$.

Μέθοδος (Γ): Επειδή πιστεύεται ότι η E που παίρνουμε σε πειράματα με πρότυπο DNA ενδεχομένως διαφέρει από την E των δειγμάτων, χρησιμοποιήσαμε το πρόγραμμα LinRegPCR το οποίο υπολογίζει απευθείας την E της αντίδρασης για κάθε δείγμα χωριστά, ώστε να ελέγξουμε τυχόν αποκλίσεις. Η εφαρμογή αυτής της μεθόδου για τον υπολογισμό για παράδειγμα της μέσης E για την GAPDH σε δεδομένη αντίδραση με αραιώσεις προτύπου DNA έδωσε μέση τιμή E 1,87 με CV 4,6%, Εικόνα 3.3. Ο συντελεστής μεταβλητότητας με τη μέθοδο αυτή είναι πάντα υψηλότερος αφού ο υπολογισμός της E γίνεται για κάθε δείγμα χωριστά. Κατόπιν τούτου αποφασίσαμε να μην την εφαρμόσουμε για τη λήψη των τελικών ποσοτικών αποτελεσμάτων, εφόσον μάλιστα εμπεριέχει και τον κίνδυνο υποκειμενικού χειρισμού του προγράμματος (η ανάλυση είναι μη-αυτόματη), αλλά να τη χρησιμοποιήσουμε ως επιβεβαιωτική των προηγούμενων μεθόδων. Με τον τρόπο αυτό αποκλείστηκαν ορισμένα δείγματα με μεγάλη απόκλιση και παρασκευάστηκε

γι'αυτά νέο cDNA και συγκρίθηκαν οι μέσες τιμές E κάθε ζεύγους εκκινητών με την τιμή που πήραμε από τις καμπύλες αναφοράς με τη εξίσωση $E=10^{-1/κλίση}$.



Εικόνα 3.3. Μέθοδος απόλυτης αύξησης φθορισμού. Η εικόνα δείχνει τα αποτελέσματα του LinReg μετά από εισαγωγή στο πρόγραμμα των αποτελεσμάτων του ABI Prism 7000 για την GAPDH από την αντίδραση που περιγράφεται στην εικόνα 3.1. Τα αποτελέσματα εισάγονται ως τιμές φθορισμού ανά κύκλο, από τις οποίες ανακατασκευάζονται οι καμπύλες. Στο κάτω μέρος της εικόνας με κίτρινες κουκκίδες σημειώνεται η προσαρμοσμένη E κάθε δείγματος.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήσαμε έδωσαν μια μοναδική κορυφή, ειδική για το κάθε ζεύγος στην καμπύλη τήξης, πράγμα που επιβεβαίωσε την απουσία μη ειδικής σύνδεσης ή παραπροϊόντων που θα μπορούσαν να αλλοιώσουν τα αποτελέσματα.

Η επαναληψιμότητα της μεθόδου ελέγχθηκε με τον υπολογισμό του CV της μέσης Ct όλων των δειγμάτων που είχαν τεθεί τρεις φορές μέσα στην ίδια αντίδραση, το οποίο κυμαινόταν από 0,1% έως 0,98%, ενώ η επαναληψιμότητα μεταξύ διαφορετικών αντιδράσεων ελέγχθηκε με το CV της μέσης Ct δειγμάτων προτύπου DNA που επαναλήφθηκαν σε τέσσερις διαφορετικές αντιδράσεις, οι οποίες έγιναν σε τέσσερις διαφορετικές μέρες το οποίο κυμαινόταν από 1% έως 2,9%.

Οι πίνακες 3.2 και 3.3 συνοψίζουν τα αποτελέσματα της real-time qPCR για την έκφραση των γονιδίων *Trp2*, *Gfi1* και *Pim1* στα λεμφοκύτταρα ασθενών με T- και B-λεμφοκυτταρικές κακοήθειες αντίστοιχα. Ο υπολογισμός του SEM (Standard Error of Mean) έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος Q-Gene 1.2.²⁷⁷, με ειδικό μαθηματικό λογισμό προκειμένου για λόγους. Ως κατώφλι αύξησης χρησιμοποιήθηκε η τιμή $R \geq 2$. Η σύγκριση των μέσων τιμών έγινε με το unpaired 2-tailed Mann-Whitney U test.

3.2. T-λεμφοκυτταρικές κακοήθειες

Η μέση έκφραση **Trp2** στους ασθενείς με T-κακοήθειες (n=12) ήταν $0,07 \pm \text{SEM } 0,02$ (όρια με 95%CI από 0,035 έως 0,11) με διάμεση τιμή 0,047, ενώ η μέση έκφρασή του στους μάρτυρες (n=3) ήταν $0,03 \pm 0,006$ (95%CI από -0,01 έως 0,08), με διάμεση τιμή 0,033. Συνολικά η διαφορά των διάμεσων τιμών δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0,312$). Τέσσερις ασθενείς (33% του συνόλου) είχαν υπερέκφραση *Trp2*, με R από 3,9 έως 5,2x μέση τιμή μαρτύρων (μ.τ.μ.). Παρατηρώντας ότι στην ομάδα αυτή ανήκαν οι ασθενείς με LGL/NK κακοήθειες αποφασίσαμε να ορίσουμε 3 ομάδες ασθενών για να διαπιστώσουμε αν υπήρχε πράγματι διαφορά μεταξύ τους: την ομάδα μαρτύρων (n=3), την ομάδα non-LGL/NK (n=8) και την ομάδα LGL/NK (n=4). Η μέση τιμή της πρώτης ομάδας είναι αυτή που προαναφέρθηκε, η μέση τιμή της δεύτερης ήταν $0,035 \pm 0,006$ (0,02 έως 0,05), με διάμεση τιμή 0,038, ενώ η μέση τιμή της τρίτης ήταν $0,15 \pm 0,011$ (0,11 έως 0,19), με διάμεση τιμή 0,015. Μεταξύ μαρτύρων και non-LGL/NK η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p = 0,92$). Ωστόσο, οι ασθενείς με LGL/NK κακοήθειες είχαν στατιστικά σημαντική υπερέκφραση τόσο σε σχέση με τους μάρτυρες όσο και σε σχέση με τους λοιπούς ασθενείς ($p = 0,034$ και $p = 0,007$ αντίστοιχα). Σημειώνουμε εδώ ότι και οι 4 ασθενείς με LGL/NK κακοήθειες (100%) είχαν υψηλή έκφραση *Trp2*.

Η μέση έκφραση **Gfi1** ήταν $0,05 \pm 0,01$ (0,026 έως 0,07) με διάμεση τιμή 0,035, ενώ η μέση έκφραση των μαρτύρων (n=4) ήταν $0,03 \pm 0,005$ (0,013 έως 0,05) με διάμεση τιμή 0,03. Ασθενείς και μάρτυρες δεν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0,46$). Τέσσερις ασθενείς είχαν υπερέκφραση (33%) και μάλιστα οι ίδιοι που παρουσίαζαν υπερέκφραση και *Trp2*. Η ομάδα των ασθενών με LGL/NK

κακοήθειες είχε μέση έκφραση $0,09 \pm 0,011$ (0,05 έως 0,13) και διάμεση έκφραση 0,09, η ομάδα των nonLGL/NK είχε μέση έκφραση 0,03 (0,017 έως 0,037) και διάμεση έκφραση 0,03. Οι nonLGL/NK δεν διέφεραν σημαντικά από τους μάρτυρες ($p=0,7$), ενώ η ομάδα LGL/NK είχε στατιστικά σημαντική υπερέκφραση τόσο σε σχέση με τους μάρτυρες ($p=0,021$), όσο και σε σχέση με τους λοιπούς ασθενείς ($p=0,007$). Όπως και στην περίπτωση του Trp2 όλοι οι ασθενείς της ομάδας LGL/NK (100%) είχαν αυξημένη έκφραση, από 2,3 έως 4,1x μ.τ.μ.

Η μέση έκφραση **Pim1** στους ασθενείς αυτούς ήταν $0,04 \pm 0,009$ (0,023 έως 0,062) με διάμεση τιμή 0,035, ενώ στους αντίστοιχους μάρτυρες ($n=3$) ήταν $0,02 \pm 0,003$ (0,008 έως 0,032) με διάμεση τιμή 0,02. Ασθενείς και μάρτυρες δεν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0,13$). Η ομάδα των ασθενών με LGL/NK κακοήθειες είχε μέση έκφραση $0,07 \pm 0,02$ (0,01 έως 0,13) και διάμεση έκφραση 0,074, η ομάδα των nonLGL/NK είχε μέση έκφραση 0,03 (0,016 έως 0,04) και διάμεση 0,026. Η LGL/NK ομάδα παρουσίαζε και πάλι υψηλότερη έκφραση από τους μάρτυρες με $p=0,032$, αλλά όχι από τους λοιπούς ασθενείς ($p = 0,062$). Τέλος, οι nonLGL/NK ασθενείς δεν διέφεραν σημαντικά από τους μάρτυρες ($p = 0,36$). Σημειώνουμε ακόμη ότι ο ασθενής 7 με T-Προλεμφοκυτταρική λευχαιμία και μυοσίτιδα, ο ασθενής 11 με περιφερικό T-λέμφωμα σε έδαφος σπογγοειδούς μυκητίασης καθώς και ο ασθενής 12 με σύνδρομο Sezary σε προϊούσα φάση είχαν επίσης αυξημένη έκφραση (2,6 , 2 και 2,3 φορές υψηλότερη των μαρτύρων αντίστοιχα). Συνολικά 6 από τους 12 ασθενείς (50%) είχαν υπερέκφραση Pim-1, από 2 έως 4,9x μ.τ.μ.

Πίνακας 3.2. Αποτελέσματα της real-time qPCR για τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης των Tpl2, Gfi1 και Pim1 στα περιφερικά λεμφομονοπύρηνια ασθενών με T-Λεμφοκυτταρικές κακοήθειες.

Δείγμα αρ.	Tpl2			Gfi1			Pim1		
	Tpl2 _{NOPM} ¹ ±SEM _{NOPM} ²	R ³ ±SEM _R ⁴	SEM(%) _R ⁵	Gfi1 _{NOPM} ±SEM _{NOPM}	R± SEM _R	SEM(%) _R	Pim1 _{NOPM} ±SEM _{NOPM}	R± SEM _R	SEM(%) _R
CTR $\bar{\mu}$	0,03±0,006 (n=3)	1,0±0,261	26,1	0,03±0,005 (n=4)	1,0±0,263	26,3	0,02± 0,003 (n=3)	1,0±0,229	22,9
1	0,04±0,006	1,2±0,293	24,1	0,05±0,004	1,8±0,351	20,0	0,02±0,003	1,2±0,233	19,6
2	0,13±0,008	3,9 ±0,763	19,6	0,07±0,004	2,3 ±0,453	19,6	0,10±0,023	4,9 ±1,379	28,3
3	0,13±0,008	4,0 ±0,787	19,5	0,08±0,006	2,8 ±0,562	20,3	0,10±0,015	4,9 ±1,065	21,8
4	0,02±0,002	0,7±0,132	20,2	0,02±0,001	0,6±0,117	18,9	0,02±0,001	1,0±0,171	17,1
5	0,04±0,007	1,2±0,303	24,9	0,02±0,001	0,6±0,122	20,1	0,02±0,003	0,9±0,198	21,1
6	0,16±0,011	5,0 ±0,990	19,6	0,10±0,007	3,5 ±0,709	20,0	0,05±0,004	2,4 ±0,436	18,5
7	0,06±0,004	1,8±0,359	19,9	0,03±0,002	1,2±0,232	19,4	0,05±0,008	2,6 ±0,561	21,9
8	0,17±0,014	5,2 ±1,055	20,3	0,12±0,018	4,1 ±1,013	24,5	0,03±0,007	1,3±0,400	30,5
9	0,01±0,000	0,3±0,062	18,8	0,03±0,003	1,0±0,208	21,3	0,00±0,001	0,1±0,049	36,0
10	0,06±0,005	1,7±0,347	20,4	0,01±0,004	0,5±0,168	35,1	0,03±0,005	1,3±0,315	23,6
11	0,04±0,002	1,1±0,212	19,4	0,03±0,008	0,9±0,325	34,8	0,04±0,010	2,0 ±0,584	28,8
12	0,02±0,001	0,6±0,110	18,7	0,04±0,002	1,3±0,250	19,4	0,05±0,003	2,3 ±0,398	17,1

¹ Tpl2_{NOPM}: η μέση τιμή της έκφρασης του Tpl2 κανονικοποιημένης ως προς την αντίστοιχη της GAPDH στο ίδιο δείγμα (εξίσωση 3 στο κείμενο).

² SEM_{NOPM}: Standard Error of Mean, το σταθερό λάθος της μέσης τιμής του παραπάνω λόγου.

³R: Ratio, ο λόγος Tpl2_{NOPM} δείγματος προς την μέση Tpl2_{NOPM} όλων των μαρτύρων, υπολογισμένος με τη μέθοδο Pfaffl (εξίσωση 2 στο κείμενο).

⁴SEM_R: το σταθερό λάθος της μέσης τιμής του παραπάνω λόγου. ⁵SEM(%)_R: SEM/R*100.

Με έντονη γραφή τα δείγματα που παρουσιάζουν υπερέκφραση.

3.3. B-λεμφοκυτταρικές κακοήθειες

Στους ασθενείς με B-κακοήθειες παραλήφθηκε από την ανάλυση ο ασθενής 6 που είχε αντιδραστική B-λεμφοκυττάρωση.

Οι υπόλοιποι (n=12) είχαν μέση έκφραση **Tp12** $0,1 \pm 0,015$ (0,07 έως 0,14) με διάμεση τιμή 0,113, ενώ οι αντίστοιχοι μάρτυρες (n=3) είχαν $0,04 \pm 0,005$ (0,01 έως 0,06) και διάμεση τιμή 0,034. Η διαφορά της διάμεσης τιμής ήταν στατιστικά σημαντική ($p = 0,043$) ανάμεσα σε ασθενείς και μάρτυρες. Συνολικά είχαμε 8 ασθενείς (67%) με υπερέκφραση από 2,3 έως 5,2x μ.τ.μ. Στη συνέχεια διαχωρίσαμε τους ασθενείς ανάλογα με το νόσημα. Έτσι, οι ασθενείς με B-XΛΛ (n=6) είχαν μέση τιμή $0,14 \pm 0,012$ (0,11 έως 0,17) και διάμεση τιμή 0,137, τιμές σημαντικά υψηλότερες σε σχέση τόσο με τους μάρτυρες ($p = 0,02$), όσο και με τους λοιπούς ασθενείς (διάμεση 0,06, $p=0,016$). Συγκεκριμένα, όλοι οι ασθενείς με B-XΛΛ (100%) είχαν υπερέκφραση, από 3 έως 5,2x μ.τ.μ. Οι 2 ασθενείς με λέμφωμα τύπου μανδύα είχαν διάμεση τιμή 0,067 και δεν διέφεραν από τους μάρτυρες ($p= 0,083$). Συνολικά, στους 8 ασθενείς με υπερέκφραση συμπεριλαμβάνονται, εκτός από αυτούς με B-XΛΛ, μια ασθενής με λέμφωμα σπληνός από κύτταρα της μεθοριακής ζώνης (3,8x, ασθενής 1) και ένας ασθενής με λέμφωμα μανδύα (2,3x, ασθενής 11).

Η μέση έκφραση του **Gfi1** ήταν $0,021 \pm 0,004$ (0,011 έως 0,03) με διάμεση τιμή 0,014, ενώ στους αντίστοιχους μάρτυρες (n=3) ήταν $0,03 \pm 0,006$ (0,027 έως 0,032) με διάμεση τιμή 0,03. Ασθενείς και μάρτυρες δεν είχαν διαφορά έκφρασης ($p=0,3$). Ομοίως ασθενείς με B-XΛΛ και ασθενείς με λέμφωμα μανδύα δεν παρουσίαζαν διαφορετική έκφραση από τους μάρτυρες ($p= 0,2$ και 0,083 αντίστοιχα). Μόνο η ασθενής 1, πάσχουσα από λέμφωμα σπληνός από κύτταρα της μεθοριακής ζώνης, είχε μια μη αξιολογήσιμη αύξηση έκφρασης στο 2x μ.τ.μ.

Η μέση έκφραση του **Pim1** ήταν $0,25 \pm 0,05$ (0,13 έως 0,35) με διάμεση τιμή 0,25, ενώ στους αντίστοιχους μάρτυρες (n=3) ήταν $0,07 \pm 0,009$ (0,06 έως 0,09) με διάμεση τιμή 0,07. Οι ασθενείς είχαν στατιστικά υψηλότερη διάμεση τιμή από τους μάρτυρες ($p=0,043$). Εννιά ασθενείς (75%) είχαν υπερέκφραση Pim-1, από 2,3 έως 9,8x μ.τ.μ, ενώ ενδιαφέρον παρουσιάζει και η ασθενής 6 με αντιδραστική B-λεμφοκυττάρωση από ρευματοειδή αρθρίτιδα συνοδευόμενη από ουδετεροπενία, η οποία επίσης είχε αυξημένη τιμή κατά 2,8x μ.τ.μ. Η ομάδα των 6 ασθενών με B-XΛΛ είχε μέση τιμή $0,24 \pm 0,045$ (0,13 έως 0,36) και διάμεση τιμή 0,25, ενώ οι λοιποί ασθενείς είχαν μέση τιμή $0,25 \pm 0,097$ (-0,0021 έως 0,5) και διάμεση τιμή 0,19.

Προφανώς οι 2 αυτές ομάδες δεν διέφεραν μεταξύ τους ($p = 0,522$), ενώ η διαφορά τους από τους μάρτυρες για τους μεν ασθενείς με Β-ΧΛΛ ήταν σημαντική ($p = 0,039$), ενώ για τους λοιπούς όχι ($p = 0,12$). Συγκεκριμένα, από τους ασθενείς με Β-ΧΛΛ πέντε εκ των έξι παρουσίαζαν υπερέκφραση (83%). Οι 2 ασθενείς με λέμφωμα μανδύα είχαν μέση τιμή $0,47 \pm 0,3$ και διάμεση τιμή $0,47$ με μη στατιστικά σημαντική διαφορά από τους μάρτυρες ($p=0,08$), προφανώς λόγω του μικρού αριθμού τους. Εάν και η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική, ωστόσο και οι δύο ασθενείς με λέμφωμα μανδύα είχαν υψηλές τιμές Pim1 (3,5x έως 9,8x) και μάλιστα ο ένας από αυτούς είχε την υψηλότερη τιμή που παρατηρήθηκε σε αυτά τα πειράματα (9,8x, ασθενής 11). Τέλος, η ασθενής με λέμφωμα σπληνός από κύτταρα της μεθοριακής ζώνης παρουσιάζει επίσης αυξημένη έκφραση Pim-1 (4,2x μ.τ.μ, ασθενής 1).

Πίνακας 3.3. Αποτελέσματα της real-time qPCR για τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης των Tpl2, Gfi1 και Pim1 στα περιφερικά λεμφομονοπύρρηνα ασθενών με Β-Λεμφοκυτταρικές κακοήθειες.

Δείγμα αρ.	Tpl2			Gfi1			Pim1		
	Tpl2 _{NOPM} ±SEM _{NOPM}	R±SEM _R	SEM(%) _R	Gfi1 _{NOPM} ±SEM _{NOPM}	R±SEM _R	SEM(%) _R	Pim1 _{NOPM} ±SEM _{NOPM}	R±SEM _R	SEM(%) _R
CTR $\bar{\mu}$ (n=3)	0,04±0,005	1,0±0,211	21,1	0,03±0,006	1,0±0,278	27,8	0,07±0,009	1,0±0,264	26,4
1	0,14±0,006	3,8 ±0,592	15,5	0,06±0,004	2 ±0,355	21,7	0,30±0,030	4,2 ±0,893	21,3
2	0,17±0,007	4,7 ±0,730	15,4	0,04±0,002	1,3±0,273	20,4	0,25±0,019	3,6 ±0,720	20,1
3	0,12±0,007	3,4 ±0,545	15,9	0,01±0,001	0,2±0,042	23,1	0,34±0,028	4,8 ±0,982	20,3
4	0,14±0,006	4,0 ±0,620	15,5	0,01±0,001	0,4±0,073	20,6	0,25±0,021	3,6 ±0,734	20,5
5	0,11±0,011	3,0 ±0,544	18,3	0,03±0,003	1,0±0,227	23,0	0,36±0,017	5,2 ±0,992	19,2
6	0,05±0,004	1,5±0,245	16,3	0,04±0,006	1,4±0,338	23,7	0,20±0,017	2,8 ±0,569	20,5
7	0,05±0,004	1,5±0,251	16,6	0,01±0,002	0,4±0,113	26,3	0,25±0,018	3,5 ±0,702	20,0
8	0,04±0,001	1,1±0,160	15,1	0,01±0,001	0,4±0,088	22,5	0,09±0,009	1,2±0,261	21,3
9	0,07±0,003	1,9±0,294	15,4	0,04±0,008	1,4±0,393	27,1	0,14±0,008	1,9±0,377	19,5
10	0,13±0,007	3,8 ±0,596	15,7	0,01±0,000	0,3±0,056	20,0	0,08±0,005	1,1±0,213	20,0
11	0,08±0,008	2,3 ±0,405	17,9	0,02±0,002	0,7±0,151	22,2	0,69±0,032	9,8 ±1,889	19,2
12	0,02±0,001	0,6±0,097	15,7	0,02±0,001	0,5±0,108	20,7	0,03±0,005	0,5±0,110	23,7
13	0,18±0,008	5,2 ±0,805	15,5	0,01±0,002	0,3±0,089	27,7	0,16±0,013	2,3 ±0,463	20,5

4. Σύγκριση μεθόδων

Είναι παραδεκτό ότι η real-time PCR πλεονεκτεί ως προς την «κλασική» PCR σε ευαισθησία, επαναληψιμότητα, δυναμικό εύρος ανίχνευσης, ως επίσης και σε ταχύτητα και απόδοση.

Στον πίνακα 4.1 συνοψίζονται τα αποτελέσματα της έκφρασης των τριών γονιδίων και με τις δύο μεθόδους (για τους πρώτους 15 ασθενείς). Η μέση τιμή της σχετικής ως προς τους μάρτυρες έκφρασης R είναι σημαντικά υψηλότερη με τη real-time PCR σε σχέση με τη συμβατική PCR, πράγμα που δείχνει την υψηλότερη ευαισθησία της τουλάχιστον για τα Trp2 και Pim1 ιδίως σε μικρές μεταβολές όπως είναι τα *in vivo* συστήματα και μάλιστα, πέντε περιπτώσεις δειγμάτων με οριακή, χαμηλότερη του 2x έκφραση με συμβατική PCR τα οποία θεωρήθηκαν αρνητικά, η real-time PCR έδωσε σαφή υπερέκφραση.

Το γεγονός ότι οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στη real-time για την ανίχνευση του Gfi1 δεν έδωσαν διαφορά ευαισθησίας σε σχέση με τους αντίστοιχους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην κλασική PCR για το ίδιο γονίδιο αποδίδεται στο γεγονός ότι το γονίδιο αυτό έχει μόνο ένα μεγάλο ιντρόνιο μεταξύ των εξονίων 6-7 πράγμα που περιόρισε την επιλογή του ιδανικού ζεύγους εκκινητών προκειμένου να επιλεγεί το ζεύγος που δεν ενισχύει γενωμικό DNA, σε βάρος άλλων χαρακτηριστικών όπως η σύνθεση του 3' άκρου και η απουσία διμερών.

Πίνακας 4.1. Συγκριτικά αποτελέσματα συμβατικής RT-PCR και real-time PCR

ΔΕΙΓΜΑ	Trp2 R		Gfi1 R		Pim1 R	
	CPCR	RTPCR	CPCR	RTPCR	CPCR	RTPCR
T1	1,1	1,2	0,9	1,8	1,3	1,2
T2	2,2	3,9	2,9	2,3	2,6	4,9
T3	2,1	4	3,4	2,8	2,7	4,9
T4	1,1	0,7	0,7	0,6	0,9	1
T5	1,2	1,2	0,8	0,6	0,8	0,9
T6	3,3	5	2,8	3,5	2,8	2,4
T7	1,7	1,8	1,3	1,2	2,6	2,6
T8	2,8	5,2	3,5	4,1	1,2	1,3
B1	2,4	3,8	1,6	2	2,9	4,2
B2	2,5	4,7	0,6	1,3	1,7	3,6
B3	2,1	3,4	0,9	0,2	2,1	4,8
B4	2,5	4	1	0,4	2,2	3,6
B5	1,8	3	0,8	1	1,6	5,2
B6	1	1,5	0,7	1,4	0,8	2,8
B7	1,5	1,5	0,6	0,4	2	3,5
Μέση τιμή	2,0	3,0	1,5	1,6	1,9	3,1
<i>P</i> *	0,03		0,9		0,01	

*Σύγκριση της μέσης τιμής R μεταξύ των δύο μεθόδων με t-test

Συντομογραφίες: CPCR: conventional (κλασική PCR), RTPCR: real-time PCR, Trp2 R: η σχετική ως προς τη μέση τιμή μαρτύρων έκφραση Trp2, T1-T8: δείγματα 1-8 ασθενών με T-λεμφοκυτταρικές κακοήθειες, B1-B7: δείγματα 1-7 ασθενών με B- λεμφοκυτταρικές κακοήθειες.

5. Συσχέτιση της έκφρασης των γονιδίων Trp2, Gfi1 και Pim1 ανά νόσο

Στη συνέχεια εφαρμόσαμε την two-tailed Spearman's rank order correlation ανάλυση προκειμένου να εντοπίσουμε συσχετίσεις μεταξύ των 3 γονιδίων. Το αποτέλεσμα ήταν, προκειμένου για T-Λεμφοκυτταρικές κακοήθειες, στατιστικά σημαντικές θετικές σχέσεις της έκφρασης mRNA ανάμεσα και στα 3 γονίδια, με $r = 0,558$, $p = 0,031$ μεταξύ Trp2 και Gfi1, $r = 0,617$, $p = 0,014$ μεταξύ Trp2 και Pim1 και

$r=0,56$, $p=0,03$ μεταξύ Gfi1 και Pim1, ενώ στις B-Λεμφοκυτταρικές κακοήθειες, στατιστικά σημαντική αποδείχθηκε μόνο η θετική σχέση μεταξύ Trp2 και Pim-1, με $r=0,624$, $p=0,01$, πράγμα αναμενόμενο αφού το Gfi1 δεν είχε καμία υπερέκφραση σε αυτές.

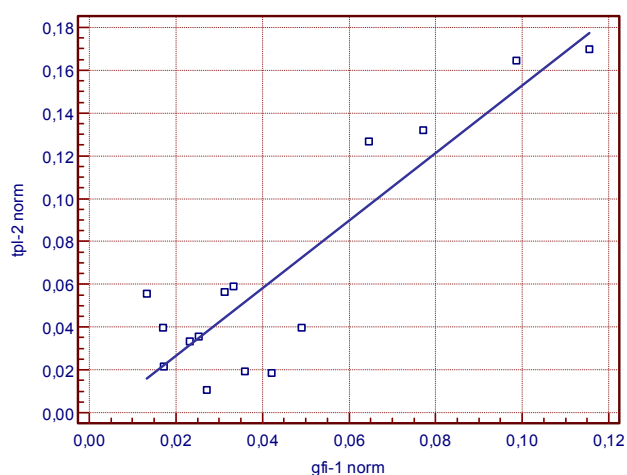
Οι πίνακες 5.1 και 5.2 δείχνουν τα αποτελέσματα αυτά, ενώ στην εικόνα 5.1. βλέπουμε τη γραφική παράσταση διασποράς των τιμών $Trp2_{NORM}$ και $Gfi1_{NORM}$ σε ασθενείς με T-Λεμφοκυτταρικές κακοήθειες.

Πίνακας 5.1. Spearman's correlation ανάλυση της συσχέτισης της έκφρασης Trp2, Gfi1 και Pim1 σε ασθενείς με T-Λεμφοκυτταρικές κακοήθειες.

	Trp2 (n=15)		Gfi1(n=15)		Pim1(n=15)	
	r	p	r	p	r	p
Trp2			0,558	0,031	0,617	0,014
Gfi1	0,558	0,031			0,56	0,03
Pim1	0,617	0,014	0,56	0,03		

Πίνακας 5.2. Spearman's correlation ανάλυση της συσχέτισης της έκφρασης Trp2, Gfi1 και Pim1 σε ασθενείς με B-Λεμφοκυτταρικές κακοήθειες.

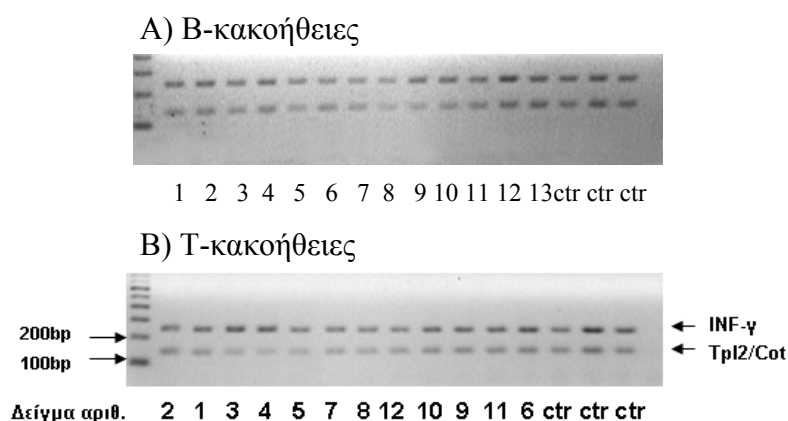
	Trp2 (n=16)		Gfi1(n=16)		Pim1(n=16)	
	r	p	r	p	r	p
Trp2			-0,049	0,858	0,573	0,02
Gfi1	-0,049	0,858			0,062	0,82
Pim1	0,573	0,02	0,062	0,82		



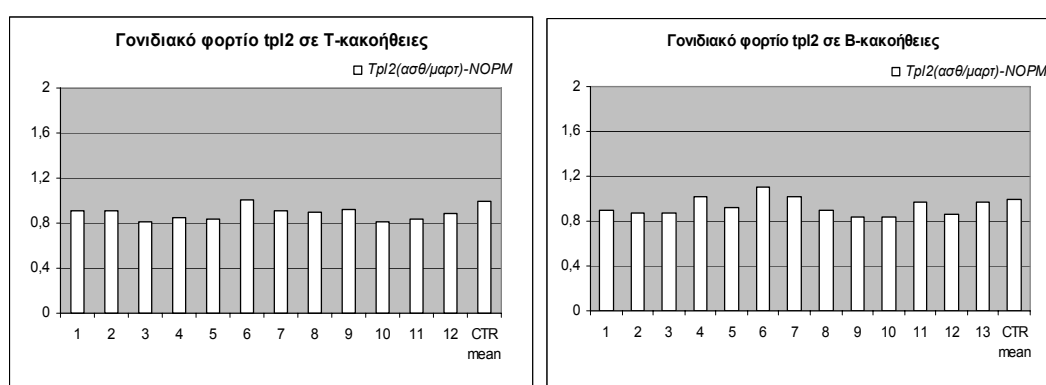
Εικόνα 5.1. Διάγραμμα διασποράς των τιμών $Tpl2_{NORM}$ και $Gfi1_{NORM}$ σε ασθενείς με Τ-Λεμφοκυτταρικές κακοήθειες.

6. Ανίχνευση του γονιδιακού φορτίου του $Tpl2$ σε γενωμικό επίπεδο με multiplex PCR.

Βασιζόμενοι σε αντίστοιχο εύρημα σε περιπτώσεις καρκίνου του μαστού¹⁶⁶ θελήσαμε να διερευνήσουμε αν η παρατηρούμενη υπερέκφραση του RNA του $Tpl2$ οφειλόταν σε γονιδιακή ενίσχυση σε επίπεδο DNA. Για το σκοπό αυτό έγινε multiplex PCR σε DNA που απομονώθηκε από περιφερικά λεμφομονοκύτταρα χρησιμοποιώντας την IFN- γ ως γονίδιο αναφοράς για την ομαλοποίηση τυχόν διαφορών στο αρχικό ποσό DNA. Καμία γονιδιακή ενίσχυση δεν παρατηρήθηκε (Εικόνες 6.1 και 6.2).



Εικόνα 6.1. Η γονιδιακή περιοχή *Trp2* δεν παρουσιάζει ενίσχυση στις κακοήθειες που μελετήθηκαν. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων multiplex PCR για ποσοτικοποίηση του γονιδιακού φορτίου του *Trp2*, σε σχέση με το γονίδιο της ιντερφερόνης- γ σε DNA ασθενών και μαρτύρων: το προϊόν της PCR ανιχνεύεται στις 139bp για το *Trp2* και στις 250bp για την *INF- γ* . Είναι εμφανής η απουσία ποσοτικών διαφορών.



Εικόνα 6.2. Ιστογράμματα σχετικής ποσότητας γονιδίου *Trp2* σε γενωμικό DNA. Το διάγραμμα αριστερά αντιστοιχεί στην PCR της εικόνας 6.1.B, ενώ το διάγραμμα δεξιά στην PCR 6.1.A. Δεν βρέθηκε αύξηση σε κάποιο από τα δείγματα.

7. Εκτίμηση των επιπέδων TNF- α , IL-2, IL-12 και IFN- γ του ορού

Με βάση τον ήδη γνωστό ρόλο του Trp12 στην παραγωγή, αλλά και τη διαμεταγωγή σημάτων από TNF- α και IL-2 προχωρήσαμε στην ανίχνευση των επιπέδων των κυτταροκινών αυτών στα υπό μελέτη δείγματα. Ακόμη, δεδομένης της ύπαρξης αναφορών που συνδέουν την παθογένεια ή τις κλινικές εκδηλώσεις ορισμένων από τις κακοήθειες αυτές με τις IL-12 και IFN- γ , αλλά και το Trp12 είτε με την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων που ελέγχουν την έκφρασή τους (NFAT, NF- κ B, CREB)^{162;278-281} είτε με τις οδούς διαμεταγωγής σήματος που ενεργοποιούν οι κυτταροκίνες αυτές θεωρήσαμε σημαντικό να διερευνήσουμε την έκφραση των κυτταροκινών αυτών στις συγκεκριμένες νόσους και να τις συσχετίσουμε με την έκφραση των υπο εξέταση γονιδίων.

Η IL-12 παράγεται φυσιολογικά από μακροφάγα και B λεμφοκύτταρα, είναι ετεροδιμερές p35/p40, ενεργοποιεί τις οδούς JAK2/STAT4, MKK6/p38 και τον NF- κ B²⁸² και αυξάνει τον πολλαπλασιασμό, την κυτταροτοξική ικανότητα και την παραγωγή IFN- γ και TNF- α , β στα T (Th1 διαφοροποίηση) και NK κύτταρα, σε συνέργεια και με την IL-2, ενώ ενεργοποιεί και τα B-λεμφοκύτταρα, διαθέτει δηλαδή ανοσορρυθμιστικές και αντι-νεοπλασματικές ιδιότητες²⁸³. Πολλά κακοήθη κύτταρα B-λεμφοϋπερπλαστικών νοσημάτων παράγουν τις υπο-ομάδες p35 και p40, αλλά ενδεχομένως αδυνατούν να παράγουν την πλήρη πρωτεΐνη²⁸⁴. Η IFN- γ παράγεται από ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα και NK κύτταρα, ενεργοποιεί τις JAK1,2/STAT1 και έχει αντικές και ανοσορρυθμιστικές ιδιότητες²⁸⁵. Συγκεκριμένα, ενεργοποιεί B-λεμφοκύτταρα και μακροφάγα αυξάνοντας την ικανότητα παραγωγής αντισώματος, παρουσίασης αντιγόνων και εξουδετέρωσης ιών και μικροβίων και επιπλέον ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση υπο-ομάδων κυττάρων, όπως τα Th1 κύτταρα και τα κοκκιοκύτταρα και συμμετέχει στην εκδήλωση αντι-νεοπλασματικών αντιδράσεων και σε φλεγμονώδεις αντιδράσεις, επάγοντας και ενισχύοντας τη δράση άλλων κυττοκινών όπως ο TNF- α ²⁸⁶. Η IFN- γ ενεργοποιεί την απελευθέρωση IL-12 (και TNF- α) από μακροφάγα που μετέχουν στη διαφοροποίηση των Th0 κυττάρων σε Th1²⁸⁷ και αντίστροφα η παραγωγή INF- γ από T και NK κύτταρα επάγεται από την IL-12 και την IL-2. Για την παραγωγή τόσο της IL-12 όσο και της IFN- γ είναι απαραίτητη η ενεργοποίηση της οδού p38/JNK^{32;33}. Συγκεκριμένα, η IL-12 ρυθμίζεται θετικά από τους μεταγραφικούς παράγοντες NF- κ B, C/EBP β , και Ets²⁸⁸.

Η IL-2 έδωσε απροσδιόριστες, μηδενικές τιμές τόσο σε μάρτυρες όσο και σε ασθενείς και δε συμπεριελήφθη στα αποτελέσματα. Στους πίνακες 7.1 και 7.2 συνοψίζονται τα αποτελέσματα της μέτρησης των επιπέδων των TNF-α, IL-12 και IFN-γ στον ορό ασθενών με T- και B- κακοήθειες και αντιπαρατίθενται οι αντίστοιχες τιμές των Tpl2, Gfi1 και Pim1 ως λόγοι έκφρασης (R) προς τη μέση τιμή των μαρτύρων όπως προκύπτουν από τα αποτελέσματα της real-time PCR (Πίνακες 3.2 και 3.3).

Πίνακας 7.1. Μέση συγκέντρωση ορού ανά ασθενή των TNF-α, IL-12 και IFN-γ και αντιπαράθεση με την έκφραση mRNA των Tpl2, Gfi1, Pim1 σε ασθενείς με T-λεμφοκυτταρικές νεοπλασίες.

Ασθενής αριθ.	T-Νεοπλασίες					
	TNF-α ¹	IL-12	IFN-γ	R-Tpl2	R-Gfi1	R-Pim1
CTR $\bar{\mu}$	0,64±0,32 (n=7)	0 (n=6)	0 (n=6)	1,0	1,0	1,0
1	2,86	0	0	1,2	1,8	1,2
2	1,83	0,45	0	3,9	2,3	4,9
3	1,80	1,57	17,07	4,0	2,8	4,9
4	1,50	0	0	0,7	0,6	1,0
5	1,93	0,51	0	1,2	0,6	0,9
6	1,93	0,72	0	5,0	3,5	2,4
7	3,70	1,25	0	1,8	1,2	2,6
8	5,10	0	13,14	5,2	4,1	1,3
9	2,60	0	0	0,3	1,0	0,1
10	2,25	0,63	0	1,7	0,5	1,3
11	1,25	0	0	1,1	0,9	2,0
12	1,70	0	0	0,6	1,3	2,3

¹Η μέση συγκέντρωση δίδεται σε pg/ml ± SD (για μάρτυρες)

ΑΔ: Δεν υπάρχει αντίστοιχο δείγμα

Πίνακας 7.2. Μέση συγκέντρωση ορού ανά ασθενή των TNF- α , IL-12 και IFN- γ και αντιπαράθεση με την έκφραση mRNA των Trp2, Gfi1, Pim1 σε ασθενείς με Β-λεμφοκυτταρικές νεοπλασίες.

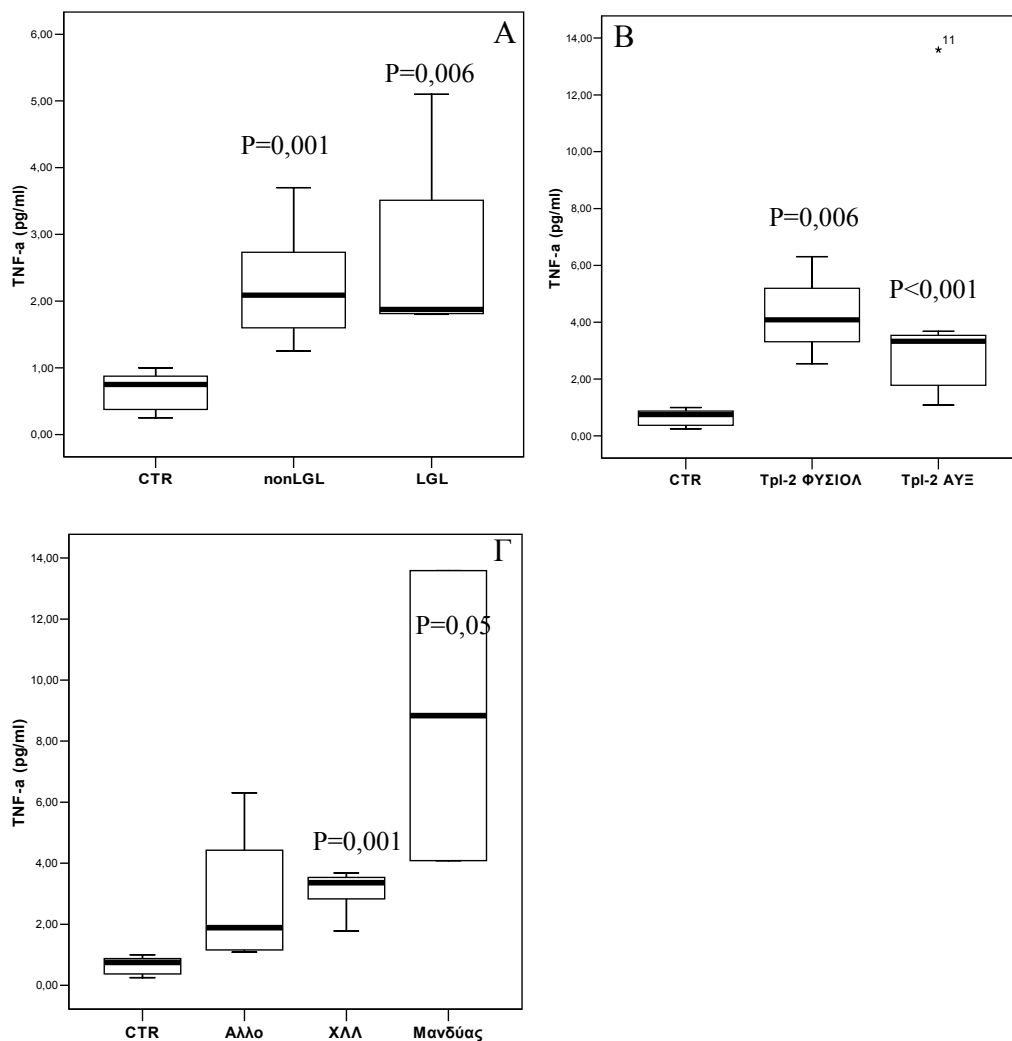
Ασθενής αριθ.	Β-Νεοπλασίες					
	TNF- α	IL-12	IFN- γ	R-Trp2	R-Gfi1	R-Pim1
CTR $\bar{\mu}$	0,64 \pm 0,32 (n=7)	0 (n=6)	0 (n=6)	1,0	1,0	1,0
1	1,09	0	0	3,8	2	4,2
2	3,39	1,96	11,36	4,7	1,3	3,6
3	3,68	0,92	0	3,4	0,2	4,8
4	1,78	1,43	0	4,0	0,4	3,6
5	3,33	1,13	12,79	3,0	1,0	5,2
6	1,04	1,72	0	1,5	1,4	2,8
7	4,08	0,80	0	1,5	0,4	3,5
8	6,31	0	0	1,1	0,4	1,2
9	1,24	1,31	0	1,9	1,4	1,9
10	3,54	0	0	3,8	0,3	1,1
11	13,59	0	0	2,3	0,7	9,8
12	2,54	1,13	0	0,6	0,5	0,5
13	2,83	1,37	0	5,2	0,3	2,3

TNF- α

Η μέση συγκέντρωση TNF- α στον ορό των μαρτύρων (n = 7) ήταν 0,7 \pm 0,31 pg/ml (0,35-0,93 pg/ml με 95% CI) με διάμεση τιμή 0,75 pg/ml, ενώ στους ασθενείς με Τ-λεμφοκυτταρικές κακοήθειες (n=12) ήταν 2,4 \pm 1 pg/ml (1,7-3) με διάμεση τιμή 1,93 pg/ml, p<0,001 (Mann-Whitney test). Οι 4 ασθενείς με αυξημένη έκφραση Trp2 δηλαδή οι ασθενείς με LGL/NK κακοήθειες είχαν διάμεση τιμή TNF- α 1,9 pg/ml και υπερέιχαν σε σχέση με τους μάρτυρες, p = 0,006, αλλά όχι και σε σχέση με τους

λοιπούς ασθενείς (διάμεση τιμή 2,09 pg/ml), $p = 0,8$ (Εικόνα 7.1.A). Ωστόσο, ο ασθενής αριθ. 8 με χρόνια NK-λεμφοκυττάρωση είχε την υψηλότερη έκφραση της σειράς (5,1 pg/ml). Ο συντελεστής συσχέτισης r κατά Spearman μεταξύ Trp1-2_{NORM} και TNF- α ήταν 0,44, χωρίς στατιστική σημαντικότητα ($p = 0,1$). Ομοίως δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα Gfi1_{NORM}, Pim1_{NORM} και TNF- α .

Στους ασθενείς με B-λεμφοκυτταρικές κακοήθειες ($n=12$) η μέση συγκέντρωση ήταν $4\pm 3,3$ pg/ml (από 1,8 έως 6 pg/ml με 95% CI) με διάμεση τιμή 3,4 pg/ml και διέφερε σημαντικά από τους παραπάνω μάρτυρες με $p < 0,001$. Οι ασθενείς με υπερέκφραση Trp12 είχαν αυξημένα επίπεδα TNF- α (διάμεση τιμή 3,3 pg/ml) σε σχέση με τους μάρτυρες ($p < 0,001$) αλλά όχι και σε σχέση με τους λοιπούς ασθενείς ($p = 0,9$), Εικόνα 7.1.B. Όσον αφορά τις υπο-ομάδες των νόσων, οι ασθενείς με B-XLL και λέμφωμα τύπου μανδύα είχαν αυξημένα επίπεδα TNF- α (διάμεσες τιμές 3,4 και 8,8 pg/ml αντίστοιχα) σε σχέση με τους μάρτυρες ($p = 0,001$ και 0,05). Η διαφορά αυτή για τη μεν B-XLL δεν διατηρούνταν και ως προς τους λοιπούς ασθενείς ($p = 0,9$), για το δε LM ήταν οριακά σημαντική ($p = 0,06$), Εικόνα 7.1.Γ. Ο συντελεστής συσχέτισης r κατά Spearman μεταξύ Trp1-2_{NORM} και TNF- α ήταν 0,166 χωρίς στατιστική σημαντικότητα ($p = 0,5$). Ομοίως δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα Gfi1_{NORM}, Pim1_{NORM} και TNF- α .



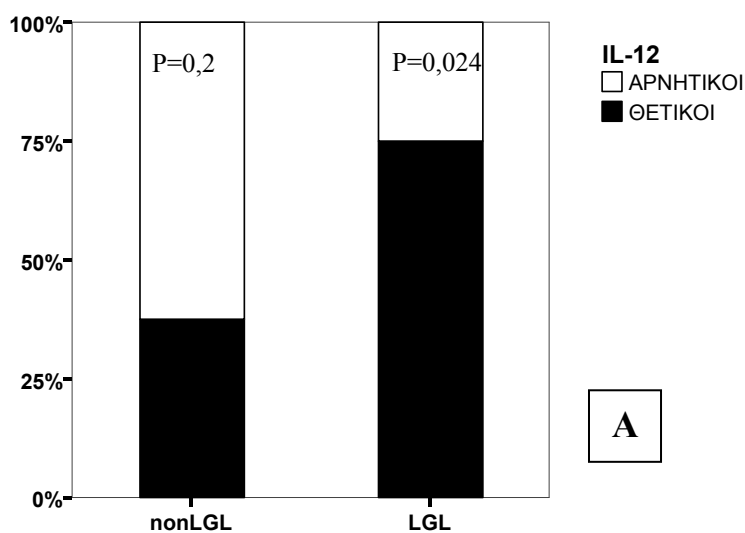
Εικόνα 7.1. Box plots των επιπέδων TNF-α στον ορό των ασθενών. Τα p αφορούν συγκρίσεις με τους μάρτυρες κατά ζεύγη (Mann-Whitney test). A) Ασθενείς με T-Λεμφοκυτταρικές κακοήθειες, ομαδοποίηση ανάλογα με τη φυσιολογική ή αυξημένη έκφραση Tpl-2 (η οποία ταυτίζεται με το διαχωρισμό σε nonLGL και LGL). B) Ασθενείς με B-Λεμφοκυτταρικές κακοήθειες, ομαδοποίηση ανάλογα με την φυσιολογική ή αυξημένη έκφραση Tpl-2. Γ) Ασθενείς με B-Λεμφοκυτταρικές κακοήθειες, ομαδοποίηση ανάλογα με το νόσημα.

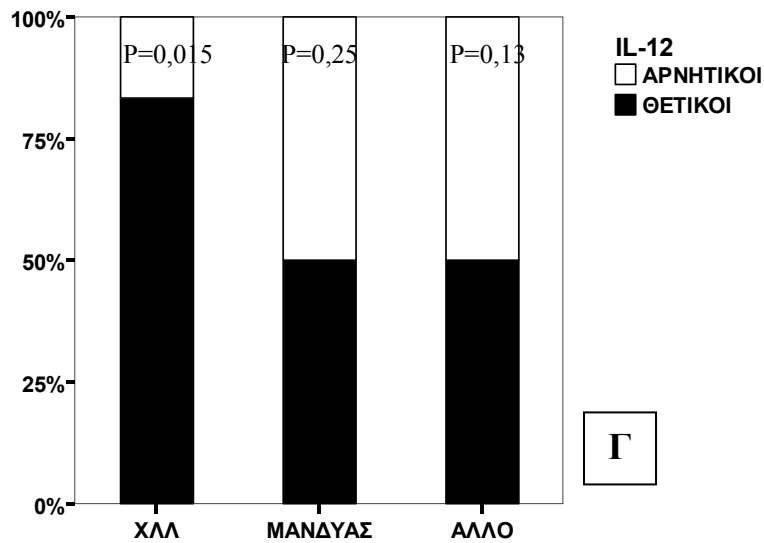
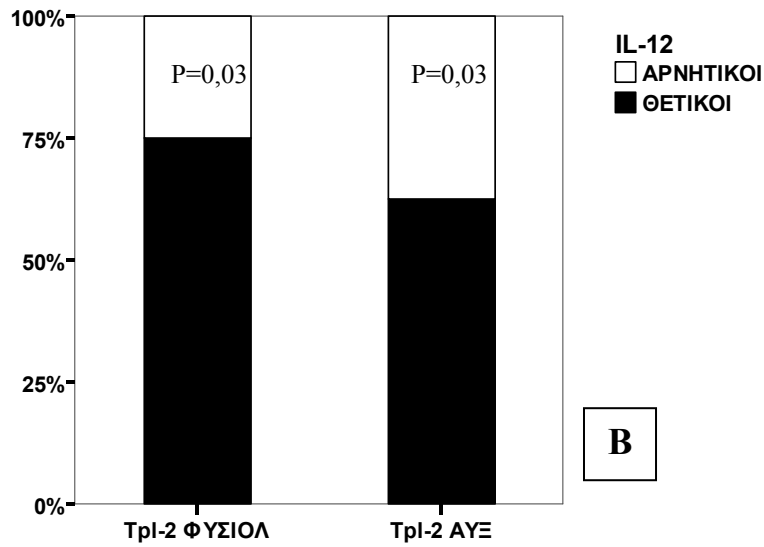
IL-12

Η μέση συγκέντρωση IL-12 στον ορό των μαρτύρων (n = 6) ήταν 0, ενώ οι μισοί (n = 6) από τους ασθενείς με T-λεμφοκυτταρικές κακοήθειες είχαν ανιχνεύσιμη IL-12, p = 0,044 (Fisher's exact test). Οι ασθενείς με αυξημένη έκφραση Tpl2 ήταν

κατά 75% θετικοί στην IL-12 ($p = 0,024$), ενώ οι λοιποί ασθενείς κατά 38% ($p = 0,2$), Εικόνα 7.2Α. Ωστόσο, δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων LGL/NK και non-LGL. Ο συντελεστής συσχέτισης r μεταξύ $Trp2_{NORM}$ και IL-12 ήταν 0,57 με $p = 0,026$, ενώ στατιστικά σημαντική ήταν και η συσχέτιση $Pim1_{NORM}$ και IL-12 με $r = 0,503$ και $p = 0,05$.

Οκτώ ασθενείς (67%) με Β-λεμφοκυτταρικές κακοήθειες είχαν ανιχνεύσιμη IL-12, $p = 0,012$. Οι 8 ασθενείς με αυξημένη έκφραση $Trp2$ είχαν ποσοστό ανίχνευσης IL-12 63% ($p = 0,03$), αλλά δε διέφεραν ($p = 1$) από τους υπόλοιπους ασθενείς στους οποίους το αντίστοιχο ποσοστό ήταν 75% ($p = 0,03$), Εικόνα 7.2Β. Ομοίως οι ασθενείς με Β-ΧΛΛ είχαν στατιστικά σημαντικό ποσοστό ανίχνευσης IL-12 (83%) σε σχέση με τους μάρτυρες ($p = 0,015$), αλλά όχι και σε σχέση με τους υπόλοιπους (50%, $p = 0,55$), ενώ οι ασθενείς με ΛΜ δε διέφεραν σημαντικά από τους μάρτυρες ($p = 0,25$), Εικόνα 7.2Γ. Ο συντελεστής συσχέτισης r μεταξύ $Trp2_{NORM}$ και IL-12 ήταν 0,431, με $p = 0,15$. Ομοίως δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα $Gfi1_{NORM}$, $Pim1_{NORM}$ και IL-12.



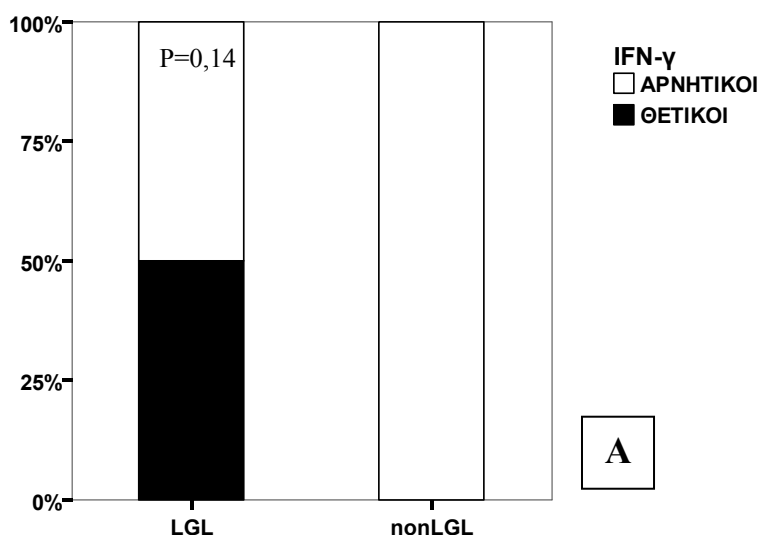


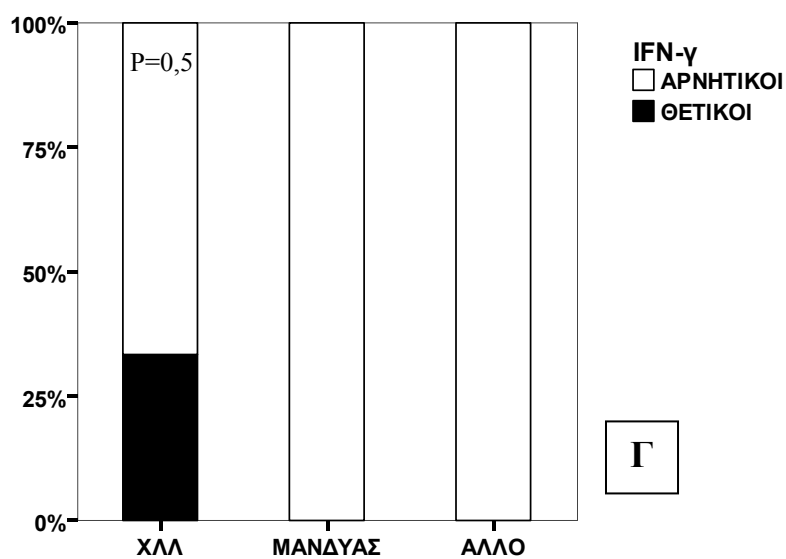
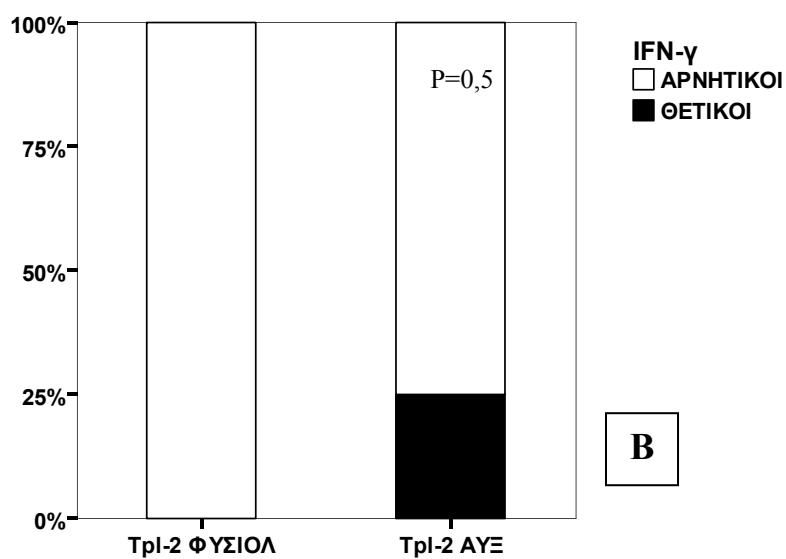
Εικόνα 7.2. Ιστόγραμμα εκατοστιαίας αναλογίας IL-12 θετικότητας. Τα p αφορούν συγκρίσεις με τους μάρτυρες κατά ζεύγη (Fisher's exact test). Με μαύρο χρώμα απεικονίζεται το ποσοστό των θετικών για IL-12. Α) Ασθενείς με T-Λεμφοκυτταρικές κακοήθειες, ομαδοποίηση ανάλογα με τη φυσιολογική ή αυξημένη έκφραση Trp-2 (η οποία ταυτίζεται με το διαχωρισμό σε nonLGL και LGL). Β) Ασθενείς με B-Λεμφοκυτταρικές κακοήθειες, ομαδοποίηση ανάλογα με την φυσιολογική ή αυξημένη έκφραση Trp-2. Γ) Ασθενείς με B-Λεμφοκυτταρικές κακοήθειες, ομαδοποίηση ανάλογα με το νόσημα.

IFN- γ

Οι μάρτυρες (n=6) δεν είχαν ανιχνεύσιμα επίπεδα IFN- γ , ενώ από τους ασθενείς με T-λεμφοκυτταρικές κακοήθειες 2 είχαν ανιχνεύσιμα επίπεδα ($p = 0,5$). Και οι 2 ανήκαν στην ομάδα LGL/NK και μάλιστα ο ασθενής αριθ. 8 με χρόνια NK λεμφοκυττάρωση είχε και τις υψηλότερες τιμές Trp2 και Gfi1. Ωστόσο η διαφορά της ομάδος αυτής σαν σύνολο από τους μάρτυρες δεν ήταν στατιστικά σημαντική, $p = 0,14$, Εικόνα 7.3A. Ο συντελεστής συσχέτισης r μεταξύ Trp1-2_{NORM} και IFN- γ ήταν 0,588 με $p = 0,021$, ενώ και το Gfi1 είχε θετική συσχέτιση ($r = 0,571$, $p = 0,021$). Το Pim1_{NORM} τέλος δε σχετίζεται με τα επίπεδα INF- γ .

Από τους ασθενείς με B-λεμφοκυτταρικές κακοήθειες ανιχνεύσιμα επίπεδα IFN- γ είχαν 2 εξ'αυτών ($p = 0,5$). Και οι δύο έπασχαν από ΧΛΛ και είχαν επίσης αυξημένη έκφραση Trp2 και Pim1. Η ομάδα των ασθενών με ΧΛΛ σαν σύνολο, με ποσοστό 34% και η ομάδα με υπερέκφραση Trp2 με ποσοστό 25% δε διέφεραν από τους μάρτυρες ($p = 0,5$), Εικόνα 7.3.B-Γ. Ο συντελεστής συσχέτισης r μεταξύ Trp1-2_{NORM} και IFN- γ ήταν 0,315 με $p = 0,24$, ενώ και τα Gfi1_{NORM}, Pim1_{NORM} δε σχετίζονται με τα επίπεδα IFN- γ .





Εικόνα 7.3. Ιστόγραμμα εκατοστιαίας αναλογίας IFN-γ θετικότητας. Α) Ασθενείς με Τ-Λεμφοκυτταρικές κακοήθειες, ομαδοποίηση ανάλογα με τη φυσιολογική ή αυξημένη έκφραση Tpl-2 (η οποία ταυτίζεται με το διαχωρισμό σε nonLGL και LGL). Β) Ασθενείς με Β-Λεμφοκυτταρικές κακοήθειες, ομαδοποίηση ανάλογα με την φυσιολογική ή αυξημένη έκφραση Tpl-2. Γ) Ασθενείς με Β-Λεμφοκυτταρικές κακοήθειες, ομαδοποίηση ανάλογα με το νόσημα.

ΜΕΡΟΣ ΤΕΤΑΡΤΟ: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι λεμφοειδείς νεοπλασίες προέρχονται από άωρα ή ώριμα T- ή B-λεμφοκύτταρα τα οποία «πάγωσαν» σε κάποιο στάδιο της εξέλιξής τους και πολλαπλασιάζονται αυτόνομα χωρίς δυνατότητα περαιτέρω διαφοροποίησης. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η έκφραση των ογκογονιδίων Trp2, Gfi1 και Pim1 σε 25 ασθενείς, 12 με T-λεμφοκυτταρικές κακοήθειες, 12 με B-λεμφοκυτταρικές κακοήθειες και έναν με αντιδραστική B-λεμφοκυττάρωση από ρευματοειδή αρθρίτιδα. Οι ασθενείς έπασχαν από οξείες ή χρόνιες λευχαιμίες ή λεμφώματα με λευχαιμική έκφραση. Η μελέτη έγινε με συμβατική ημι-ποσοτική RT-PCR ή με SybrGreen real-time RT-PCR σε λεμφονομοπύρηνια περιφερικού αίματος των ασθενών. Παράλληλα μετρήθηκαν τα επίπεδα κυτταροκινών που επηρεάζονται από την έκφραση των ογκογονιδίων αυτών όπως η IL-2, TNF-α, IL-12 και IFN-γ. Τέλος έγινε συνολική ανάλυση των αποτελεσμάτων με γνώμονα την κλινικοπαθολογική τους εικόνα και το αιματολογικό τους προφίλ.

1. Οι χρόνιες λευχαιμίες των LGL κυττάρων παρουσιάζουν υπερέκφραση των ογκογονιδίων Trp2, Gfi1 και Pim1 και έχουν αυξημένα επίπεδα TNF-α και IL-12 στον ορό

Από τις T-λεμφοκυτταρικές νεοπλασίες που μελετήθηκαν σημαντικά αυξημένη έκφραση Trp2 παρουσίασαν 4 από τους 12 ασθενείς (33%). Η έκφρασή του mRNA ήταν από 3,9 έως 5,2 φορές υψηλότερη από αυτή των μαρτύρων. Και οι τέσσερις έπασχαν από λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα των LGL λεμφοκυττάρων (LGL-PD), και συγκεκριμένα τρεις από CD3+CD8+ T-LGL λευχαιμία και ένας από CD3-TCR- χρόνια NK λεμφοκυττάρωση. Ένας από τους ασθενείς με T-LGL είχε γ μονοκλωνικότητα του υποδοχέα TCR, ενώ οι άλλοι δύο είχαν β. Οι ίδιοι ασθενείς παρουσίασαν σημαντικά αυξημένη έκφραση Gfi1, ενώ οι ασθενείς με T-LGL αλλά όχι και ο ασθενής με χρόνια NK λεμφοκυττάρωση είχαν επίσης σημαντικά αυξημένη έκφραση Pim1. Τις υψηλότερες τιμές, τόσο στο Trp2 όσο και στο Gfi1, παρουσίασε ο ασθενής 8 με χρόνια NK λεμφοκυττάρωση και ουδετεροπενία. Η εφαρμογή της two-

tailed Spearman's rank order correlation ανάλυσης έδειξε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση της έκφρασης και των τριών γονιδίων στις T-κακοήθειες. Η προαναφερθείσα δηλαδή πιθανή σχέση αποκλεισμού μεταξύ των Trp2 και Pim1 δεν αποδείχθηκε²⁶³. Αντίθετα, η θετική αυτή σχέση υποδηλώνει συνεργασία των γονιδίων τουλάχιστον στις LGL λεμφοϋπερπλαστικές νόσους. Συνεργασία μεταξύ των Pim1 και Gfi1 έχει δειχθεί και σε T-λεμφώματα που αναπτύσσονται σε διαγονιδιακά ποντίκια, χωρίς ωστόσο προτίμηση σε κάποιο συγκεκριμένο είδος λεμφώματος^{180;197}. Η έκφραση του Gfi1 επάγεται μεταξύ άλλων από τον AP-1, ύστερα από TCR-εξαρτώμενη ενεργοποίηση της ERK^{183;193}, αλλά και η Trp2 κίνηση είναι γνωστό ότι διεγείρει την MEK/ERK/AP-1 οδό, τουλάχιστο στην κατεύθυνση της παραγωγής IL-2^{144;289}. Ανέκδοτα πειράματα διέγερσης CD3+ σπληνοκυττάρων με αντι-CD3/CD28 προερχόμενων από Trp2-/- ποντίκια έδειξαν αναστολή της επαγωγής Gfi1 στα κύτταρα αυτά σε αντίθεση με την επαγωγή του σε κύτταρα από φυσιολογικούς μάρτυρες 1 ώρα μετά τη διέγερση (Χ.Τσατσάνης, προσωπική επικοινωνία). Παρόλο που στην παρούσα μελέτη δεν είναι δυνατό να διερευνηθεί πιθανή επαγωγική δράση της Trp2 στην ενεργοποίηση του Gfi1 το σημείο αυτό θα μπορούσε να αποτελεί το συνδετικό κρίκο μεταξύ τους.

Η παθογένεια των LGL λευχαιμιών είναι ως επί το πλείστον άγνωστη. Προέρχονται από κατηγορία T λεμφοκυττάρων τα οποία είναι συνήθως κυτταροτοξικά, CD8 θετικά, ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα με ιδιότητες τόσο T όσο και NK κυττάρων και αποτελούν τη γέφυρα ανάμεσα στη φυσική και την επίκτητη ανοσία⁴². Παλαιότερα στην ομάδα αυτή κατατάσσονταν και η πιο σπάνια χρόνια λευχαιμία από CD3-, NK κύτταρα, η οποία τώρα καλείται χρόνια NK λεμφοκυττάρωση και ταξινομείται χωριστά, έχει ωστόσο παρόμοια κλινική εικόνα και πιθανώς παρεμφερή αιτιοπαθογένεια με τις LGL λευχαιμίες. Συχνά, ιδίως οι T-LGL λευχαιμίες συνοδεύονται από εκδηλώσεις αυτοανοσίας όπως ρευματοειδή αρθρίτιδα με ή χωρίς ουδετεροπενία (σύνδρομο ψευδο-Felty²⁹⁰), θετικό ρευματοειδή παράγοντα, αμιγή απλασία ερυθράς σειράς, ενώ το 80% των ασθενών εμφανίζει ουδετεροπενία είτε χρόνια είτε κυκλική της οποίας η αιτιολογία δεν είναι σαφής^{50;291}. Σχετικά με την παθογένεια της ουδετεροπενίας έχουν αναφερθεί περιπτώσεις με αντι-ουδετεροφιλικά αντισώματα ως επίσης και απευθείας κυτταροτοξικότητα με μηχανισμό Fas-FasL²⁹¹. Οι Shvidel και συν²⁹² έδειξαν αυξημένη παραγωγή TNF-α, IL-6, IL-10 και IL-8, αλλά όχι IL-12 από PHA-διεγερμένα LGL λεμφοκύτταρα

ασθενών, που μπορεί να σχετίζονται με τα φαινόμενα αυτοανοσίας που παρατηρούνται.

Τρεις από τους τέσσερις ασθενείς με LGL-PD που μελετήσαμε (\neq 3, 6, 8) είχαν συνοδό χρόνια ουδετεροπενία που δεν οφειλόταν σε διήθηση του μυελού από το νόσημα. Η ομάδα των ασθενών με LGL-PD είχε συνολικά στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων TNF- α και IL-12 ορού, αλλά όχι και IL-2 και INF- γ , εάν και η INF- γ βρέθηκε αυξημένη σε δύο εξ'αυτών. Μάλιστα, η ασθενής αριθ. 8 πάσχουσα από χρόνια NK λεμφοκυττάρωση και χρόνια, ανοσολογικής αρχής ουδετεροπενία είχε την υψηλότερη τιμή TNF- α , αλλά και Trp2 και Gfi1 που παρατηρήθηκε σε αυτά τα πειράματα, ενώ παρουσίαζε και αυξημένη INF- γ . Τα μη μετρήσιμα επίπεδα IL-2 σε ασθενείς και μάρτυρες αποδίδονται στο γεγονός ότι τα T-κύτταρα των ασθενών δε βρίσκονταν σε κατάσταση διέγερσης και επομένως δεν ήταν ανιχνεύσιμα με την τεχνική που μετρήθηκαν (ELISA).

Η υπερέκφραση Trp2 και Gfi1 περιορίζονταν στους ασθενείς με LGL-PD, ενώ υπερέκφραση Pim1 παρουσίασαν και άλλοι. Βρέθηκε επίσης θετική συσχέτιση μεταξύ Trp2, Pim1 και IL-12. Το γεγονός ότι η υπερέκφραση Trp2 και Gfi1 περιορίστηκε σε κακοήθειες βραδείας εξέλιξης, από ώριμα κύτταρα προεχόμενα από υπο-ομάδα κυττάρων με φαινότυπο κυτταροτοξικών/NK-like ή φυσικών φονέων (NK) δείχνει ότι μπορεί να σχετίζεται με φαινόμενα που λαμβάνουν χώρα κατά τη διαφοροποίηση ή την ενεργοποίηση των κυττάρων αυτών. Φυσιολογικά, οι IL-2 και IL-12 είναι κυτταροκίνες που διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση και των δύο κατηγοριών κυττάρων, τα οποία είναι επίσης ικανά να ενεργοποιούνται από αντιγόνα άμεσα, χωρίς να προηγηθεί παρουσίαση αντιγόνου από το MHC⁴¹. Συγκεκριμένα, IL-12 παράγεται από μακροφάγα και B-λεμφοκύτταρα και ενεργοποιεί τις οδούς JAK2/STAT4 και MKK6/p38 αυξάνοντας τον πολλαπλασιασμό, την κυτταροτοξική ικανότητα και την παραγωγή INF- γ , TNF- α , β από T και NK κύτταρα, σε συνέργεια και με την IL-2 (Th1 διαφοροποίηση). Έτσι, η κινάση Trp2 ενδεχομένως συμμετέχει στην παθογένεια τόσο της κλωνικής ανάπτυξης των κυττάρων αυτών όσο και στην εκδήλωση των συνοδών αυτοάνοσων φαινομένων. Η ουδετεροπενία που παρουσιάζουν οι παραπάνω ασθενείς θα μπορούσε να οφείλεται στη αύξηση παραγωγής TNF- α από τα κύτταρα του κλώνου, με την επίδραση των IL-12 και IL-2 και τη διαμεσολάβηση του Trp2 στην ενεργοποίηση των p38 και ERK οδών αντίστοιχα. Το ενδεχόμενο η υπερέκφραση Trp2 να σχετίζεται αποκλειστικά με την αυτοάνοση ουδετεροπενία των ασθενών δε φαίνεται πιθανό αφενός διότι δεν

είχαν όλοι οι ασθενείς αυτοί ουδετεροπενία ή άλλη αυτοάνοση εκδήλωση και αφετέρου διότι τα αυξημένα επίπεδα TNF- α δεν περιορίζονταν στους ασθενείς με LGL-PD.

Σχετικά με την κλωνική ανάπτυξη των κυττάρων αυτών έχουν διατυπωθεί διάφορες θεωρίες όπως η εμπλοκή ιών (ο ορός των ασθενών με T- ή NK- LGL λευχαιμία αντιδρά με την p21 του HTLV^{293;294}, ενώ EBV DNA έχει βρεθεί μέσα στα CD3- κύτταρα από NK-LGL λεμφοϋπερπλαστικές νόσους²⁹⁵), η διέγερση από IL-12 (αντι-IL-12 αντισώματα αναστέλλουν μερικώς την αντι-CD3-επαγόμενη ανάπτυξη των κυττάρων σε καλλιέργεια, ενώ διεγερμένα CD3+ LGL κύτταρα παράγουν την p40 της IL-12 και IL-12R^{296;297}), η διέγερση από IL-2²⁹⁷ και η STAT3-επαγόμενη υπερέκφραση του αντι-αποπτωτικού Mcl1²⁹⁸.

Η συνεργασία των Trp2, Gfi1 και Pim1 στις CD3+CD8+ νεοπλασίες και των Trp2 και Gfi1 στις NK δείχνει πως η εκλεκτική συνέκφρασή τους ενδεχομένως δίνει αυξητικό πλεονέκτημα σε συγκεκριμένη κατηγορία κυττάρων, τα οποία με την επίδραση άλλων γεγονότων, όπως η απορρύθμιση αντι-αποπτωτικών γονιδίων μπορούν να αποκτήσουν κακοήγη φαινότυπο. Τα υπό μελέτη γονίδια έχουν πολλά επίπεδα δράσης που σχετίζονται με όσα είναι έως τώρα γνωστά για την ογκογένεση των LGL-PD: οι κινάσες Trp2 και Pim1 επάγουν την παραγωγή IL-2, ενώ τόσο αυτές όσο και ο Gfi1 μετέχουν στις οδούς διέγερσης των T-λεμφοκυττάρων από την IL-2 και μάλιστα η υπερέκφραση Gfi1 μπορεί υποκαταστήσει την IL-2 στην ανάπτυξη κυτταρικών σειρών που εξαρτώνται από αυτήν για την επιβίωσή τους. Το Pim1 ενεργοποιείται ακόμα μετά από επίδραση ποικίλων αυξητικών παραγόντων αιμοποιητικών κυττάρων, μεταξύ των οποίων και κυτταροκινών που επάγουν την JAK2. Η IL-12 επάγει την JAK2 πράγμα που μπορεί να εξηγήσει τη θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων Pim1 και IL-12 την οποία βρήκαμε. Το Gfi1, μέσω αναστολής του αναστολέα PIAS3, αυξάνει σημαντικά την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα STAT3¹⁸², ο οποίος έχει συσχετισθεί με την επιβίωση των κυττάρων LGL. Λαμβάνει επίσης μέρος στη φυσιολογική ρύθμιση της T λεμφοποίησης. Στη μελέτη των Doan LL και συν¹⁷⁵ η ταυτόχρονη έκφρασή του με το Gfi1b σε διαγονιδιακά ποντίκια μπορούσε να αναστρέψει την ελάττωση των CD8 που προκαλεί το Gfi1b. Gfi1 διαγονιδιακά ποντίκια έχουν ελαττωμένα περιφερικά CD4 και CD8 φαινόμενο το οποίο αναστρέφεται αν ταυτόχρονα υπερεκφραστεί και το Pim1¹⁸¹. Τέλος, το Trp2 εμπλέκεται και αυτό, μέσω της ενεργοποίησης της JNK, στη διαφοροποίηση των T-λεμφοκυττάρων προς την κατεύθυνση των CD8 ύστερα από

επίδραση TNF- α , όπως δείχθηκε στο πειραματικό μοντέλο ανάπτυξης φλεγμονώδους νόσου του εντέρου σε Tnf ^{Δ ARE} ποντίκια¹⁵⁷.

Η ανάλυση του γονιδιακού φορτίου του Tpl2 δεν έδειξε γονιδιακή ενίσχυση, αντίθετα με αντίστοιχη μελέτη στον καρκίνο του μαστού¹⁶⁶. Αυτό ήταν αναμενόμενο εύρημα διότι στις λεμφοειδείς νεοπλασίες το φαινόμενο αυτό σπάνια ευθύνεται για την υπερέκφραση ογκογονιδίων. Μάλιστα η πρόσφατη ανεύρεση, σε καρκίνο πνεύμονα, μετάλλαξης που οδηγεί σε αυξημένη έκφραση Tpl2, ύστερα από αναδιάταξη του προτελευταίου εξονίου του, παρέχει ένα εναλλακτικό μηχανισμό απορρύθμισης της έκφρασής του¹⁶⁷. Βέβαια, η αυξημένη έκφραση του mRNA του γονιδίου μπορεί να είναι είτε πρωτογενές φαινόμενο, δηλαδή απευθείας αλλοίωση του ίδιου του γονιδίου σε επίπεδο ρυθμιστικών αλληλουχιών ή αλληλουχιών που σχετίζονται με τη σταθερότητα του mRNA, είτε να οφείλεται σε δευτερογενείς επιδράσεις όπως ενεργοποίηση ειδικών μεταγραφικών παραγόντων που αυξάνουν τη μεταγραφή του, όπως είναι ο AP1¹⁶³. Έτσι, η υπερέκφρασή του μπορεί να αντικατοπτρίζει το χρόνιο αντιγονικό ερεθισμό και διέγερση των T ή NK κυττάρων που κατά τη θεωρία του Loughran είναι αυτό που οδηγεί στην κλωνική επέκτασή των κυτταροτοξικών ή NK κυττάρων στις νόσους αυτές²⁹⁹.

2. Ασθενείς με επιθετικές ή προχωρημένου σταδίου T-λεμφοειδείς νεοπλασίες παρουσιάζουν υπερέκφραση του Pim1 αλλά όχι των Tpl2 και Gfi1.

Στη σειρά των ασθενών που μελετήσαμε η έκφραση του Pim1 στις T-λεμφοειδείς νεοπλασίες ήταν ευρύτερη από εκείνη των άλλων 2 γονιδίων. Έτσι το 50% αυτών παρουσίασαν σημαντική αύξηση του Pim1, από 2 έως 4,9. Υπερέκφραση του Pim1, εκτός από τους ασθενείς με LGL-PD, είχαν και οι ασθενείς με T-προλεμφοκυτταρική λευχαιμία, περιφερικό T-λέμφωμα και σύνδρομο Sezary (SS) σε προϊούσα φάση. Τα δύο πρώτα ανήκουν στις επιθετικές T-νεοπλασίες, ενώ από τους ασθενείς με SS που μελετήσαμε, μόνο ο ασθενής με προχωρημένη, ανθεκτική νόσο παρουσίασε υπερέκφραση του Pim1. Δε βρέθηκε συνέκφραση των Pim1 και Gfi1 στα επιθετικά T-λεμφώματα. Οι παρατηρήσεις αυτές, χωρίς να είναι στατιστικά σημαντικές δείχνουν μια τάση, όπου τα μεν Tpl2 και Gfi1 εκφράζονται σε νεοπλασίες βραδείας ανάπτυξης, στις οποίες κυριαρχεί συνήθως η απορρύθμιση της απόπτωσης, ενώ το Pim1 εκφράζεται επιπλέον και σε πιο επιθετικά νεοπλάσματα, στα οποία κυριαρχεί η επίταση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού⁹⁵.

3. Το Trp2 παρουσιάζει αυξημένη έκφραση σε Β-λεμφοειδείς νεοπλασίες και συνεργάζεται με το Pim1.

Οκτώ από τους 12 ασθενείς με Β-λεμφοκυτταρικές κακοήθειες (67%) είχαν σημαντικά αυξημένη έκφραση Trp2 από 2,3 έως 5,2 φορές σε σχέση με αυτή των μαρτύρων και συγκεκριμένα όλοι οι ασθενείς με Β-χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ), ένας ασθενής με λέμφωμα σπληνός της μεθοριακής ζώνης και ένας ασθενής με λέμφωμα μανδύα. Οι ίδιοι ασθενείς, με εξαίρεση του ασθενούς αριθ.10 με ΧΛΛ προερχόμενη από μετατροπή λεμφώματος από μικρά λεμφοκύτταρα, είχαν στατιστικά σημαντική υπερέκφραση Pim1. Επιπλέον, και οι δύο ασθενείς με λέμφωμα μανδύα είχαν σαφή υπερέκφραση Pim1 (3,5 και 9,8) η οποία αν και όχι στατιστικά σημαντική, λόγω του μικρού αριθμού τους, περιελάμβανε ωστόσο την υψηλότερη τιμή Pim1 που παρατηρήθηκε στη μελέτη αυτή. Αυξημένη έκφραση Pim1 είχε και η ασθενής με καλοήγη Β-λεμφοκυττάρωση από ρευματοειδή αρθρίτιδα. Η two-tailed Spearman's rank order correlation ανάλυσης έδειξε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης Trp2 και Pim1 στις Β-λεμφοκυτταρικές νεοπλασίες.

Η μοριακή βιολογία της ΧΛΛ είναι ακόμα σε μεγάλο βαθμό άγνωστη. Στο 40-50% των περιπτώσεων ανευρίσκονται χρωμοσωμικές ανωμαλίες με την κλασική μέθοδο του καρυοτύπου³⁰⁰. Τρισωμία 12, απαλοιφή του 17p13 (γονίδιο p53) ή απαλοιφή του 11q23 βρίσκονται σε χαμηλό ποσοστό (10-15%) και σχετίζονται με φτωχή πρόγνωση, ενώ είναι συχνότερες ύστερα από μετατροπή της νόσου σε επιθετικό λέμφωμα, το γνωστό σύνδρομο Richter³⁰¹. Στην απαλοιφή της 11q23 περιοχής μερικές φορές περιλαμβάνεται το γονίδιο ATM^{57;97}. Αντίθετα, η πιο κοινή ανωμαλία είναι η απαλοιφή της περιοχής 13q14, όπου εντοπίζεται πιθανά ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο, και συνδέεται με καλή πρόγνωση³⁰².

Τα κύτταρα της ΧΛΛ δεν παρουσιάζουν αυξημένο πολλαπλασιασμό. Αρκετές μελέτες συγκλίνουν στο γεγονός ότι η κύρια βλάβη στη ΧΛΛ, ιδίως στις βραδείας εξέλιξης περιπτώσεις, είναι η ελαττωματική απόπτωση⁹⁵. Κυτταροκίνες που έχουν αντι-αποπτωτική δράση στα κύτταρα της ΧΛΛ είναι οι IL-2, IL-4, IL-8, IFN- γ , TNF- α που παράγονται και αυτοκρινώς από τα λευχαιμικά κύτταρα^{300;303}. Ειδικότερα ο TNF- α που βρίσκεται συχνά αυξημένος στον ορό, παράγεται τόσο από τα ίδια τα κύτταρα όσο και παρακρινώς και τα επίπεδά του σχετίζονται με το στάδιο της νόσου³⁰⁴. Μια άλλη κυτταροκίνη, η IL-12 αναστέλλει την απόπτωση των κυττάρων

αυτών *ex vivo*, αλλά δεν παράγεται από τα ίδια τα λευχαιμικά κύτταρα^{305;306}. Τα επίπεδα IL-12 έχουν βρεθεί αυξημένα στον ορό ασθενών με ΧΛΛ³⁰⁷. Η IL-4 ενεργοποιεί τον NF-κB σε λευχαιμικά κύτταρα *in vitro*³⁰⁸, ενώ ελαττώνει και την έκφραση Fas³⁰⁹. Έχειδειχθεί ότι η υπερέκφραση NF-κB έχει κρίσιμο ρόλο στην επιβίωση των κυττάρων της ΧΛΛ και επάγεται μέσω της PI3 οδού^{308;310}. Σε ενεργοποίηση του NF-κB καταλήγει και η διέγερση του CD40 στην επιφάνεια των λευχαιμικών κυττάρων από τον CD40L³¹¹. Ο NF-κB συμμετέχει σε αντι-αποπτωτικά φαινόμενα όπως η διέγερση της έκφρασης Bcl-2 σε κύτταρα ΧΛΛ^{312;313}. Πράγματι στη νόσο αυτή πολύ συχνά παρατηρείται υπερέκφραση Bcl-2 που δεν οφείλεται σε χρωμοσωμική μετάθεση³¹⁴. Τέλος, η επιβίωση των λευχαιμικών κυττάρων φαίνεται πως σχετίζεται και με υπερλειτουργία της MAPK οδού MKK3/6/p38, αφού αναστολή της ελαττώνει σημαντικά την επιβίωση ΧΛΛ κυττάρων που συγκαλλιεργούνται με κύτταρα στρώματος του μυελού³¹⁵.

Ο αντιγονικός υποδοχέας στη Β-ΧΛΛ παραμένει λειτουργικός. Η τυροσινική κινάση ZAP70, που φυσιολογικά εκφράζεται μόνο από T- και NK κύτταρα στα οποία ενεργοποιείται μετά από TCR διέγερση μέσω της Ras/MAPK οδού, στα λευχαιμικά κύτταρα της Β-ΧΛΛ φαίνεται πως συμμετέχει στη μεταγωγή σήματος από τον BCR, οδηγώντας σε συντήρηση της αντιγονικής διέγερσης, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της διαδικασίας της υπερμετάλλαξης³¹⁶. Η συνεχιζόμενη αντιγονική διέγερση από ξένα ή ενδογενή αντιγόνα ως παράγοντας συντήρησης του κλωνικού πολλαπλασιασμού αποτελεί ένα νέο ελκυστικό πεδίο μελέτης της λευχαιμογένεσης στη ΧΛΛ.

Τα παραπάνω προσφέρουν ένα πιθανό μηχανισμό συμμετοχής των Trp2 και Pim1 στην ανάπτυξη της ΧΛΛ. Η κινάση Trp2 έχει την ικανότητα να ενεργοποιεί τον NF-κB μετά από CD40 διέγερση¹⁴⁹, ο οποίος αυξάνει την μεταγραφή του Bcl-2 και πιθανώς και άλλων ογκογονιδίων, καθώς και τον NFAT^{143;144}, ο οποίος είναι απαραίτητος στην έναρξη της μεταγραφής διαφόρων κυττοκινών μεταξύ των οποίων οι IL-2, IL-4, TNF-α και IFN-γ¹⁴². Οι ασθενείς μας με Β-ΧΛΛ παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων των TNF-α και IL-12 που έχουν αντι-αποπτωτική δράση στα λευχαιμικά κύτταρα της ΧΛΛ. Για την παραγωγή της IL-12 είναι απαραίτητη η ενεργοποίηση της οδού p38/JNK³³. Η MAPK οδός p38 που συμμετέχει σε αντι-αποπτωτικές επιδράσεις στη ΧΛΛ είναι μια από τις οδούς που ενεργοποιεί η κινάση Trp2¹³². Σημειώνεται ότι η μόνη έως τώρα μελέτη που συσχετίζει το Trp2 με Β-λεμφώματα αναφέρεται στο EBV-επαγόμενο λέμφωμα

Hodgkin's¹⁴⁹. Από την άλλη μεριά, η συμμετοχή της κινάσης Pim1 σε λεμφοειδείς νεοπλασίες και ιδίως Β λεμφώματα στον άνθρωπο είναι γνωστή. Διεγείρει και αυτή τον NFAT και την παραγωγή IL-2²²⁸, αλλά και ενεργοποιείται από την IL-2^{225;226} και την IFN- γ ²²³. Πολλές φορές συνεργάζεται με άλλα ογκογονίδια όπως με τα c-Myb, c-Myc, Bcl-2 και εκδηλώνει αντι-αποπτωτική δράση σε κυτταρικές σειρές μετά από απόσυρση κυτταροκινών.

Έτσι, τόσο το Pim1 όσο και το Trp2 συμμετέχουν σε σειρά οδών που μπορεί να σχετίζονται με την διαταραχή της απόπτωσης που χαρακτηρίζει την ΧΛΛ, όπως η συμμετοχή τους στην παραγωγή και τη δράση της IL-2, η ενεργοποίηση του Pim1 από την IFN- γ , η συμμετοχή του Trp2 στη διαδικασία παραγωγής αλλά και δράσης κυτταροκινών με αντι-αποπτωτικές ιδιότητες, όπως οι TNF- α και IL-12, η ενεργοποίηση της αντι-αποπτωτικής-στην περίπτωση της ΧΧΛ-οδού p38 από το Trp2 και η συμμετοχή του στην CD40/TRAF6/NF- κ B ενεργοποίηση, η συνεργική δράση του Pim1 με το Bcl-2. Τέλος, οι οδοί διαμεταγωγής σήματος της πρωτεΐνης ZAP70, που σχετίζεται με αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων, ενώ μένει να διαλευκανθούν στη ΧΛΛ, στα Τ λεμφοκύτταρα είναι γνωστό ότι συμπεριλαμβάνουν την οδό των MAP κινασών που ενεργοποιείται από TCR διέγερση.

Σε ασθενείς με **λέμφωμα μανδύα** βρέθηκε συμμετοχή κυρίως του Pim1 και σε λιγότερο βαθμό του Trp2, καθώς και αυξημένα επίπεδα TNF- α . Το λέμφωμα αυτό χαρακτηρίζεται από τη χρωμοσωμική μετάθεση t(11;14)(q13;q32), κατά την οποία η περιοχή BCL1 μετατίθεται κοντά στους γόνους των IgH οδηγώντας στο 95% των περιπτώσεων σε υπερέκφραση του ογκογονιδίου κυκλίνη D1 (ή PRAD1), κAIRIU ρυθμιστή της G1 φάσης, που φυσιολογικά δεν εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα από Β λεμφοκύτταρα. Η υπερέκφραση της κυκλίνης D1 δεν είναι ωστόσο αρκετή για την πρόκληση κακοήθους εξαλλαγής³¹⁷. Έχουν περιγραφεί και επιπρόσθετες γενετικές ανωμαλίες που διαχωρίζουν το νόσημα σε προγνωστικούς υποτύπους. Έτσι, η απαλοιφή του γονιδίου ATM είναι πρώιμο γεγονός, ενώ η απαλοιφή των ογκοκατασταλτικών p53, p16 και p14 ανευρίσκεται σε περιπτώσεις με ταχεία επιδείνωση και βραχεία επιβίωση, όπως είναι η βλαστοειδής ποικιλία του ΛΜ^{24;318}. Πρόκειται για νόσημα στην παθογένεια του οποίου κυριαρχεί η απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Στη μελέτη των Rosenwald και συν³¹⁸ με microarrays το επίπεδο έκφρασης της κυκλίνης D1 καθώς και παράγοντες που το αυξάνουν, όπως η απαλοιφή ή η καταστολή των p16^{INK4a} και p14^{ARF}, βρέθηκε ότι σχετίζονται με υψηλότερο δείκτη πολλαπλασιασμού και χαμηλότερη επιβίωση. Η κυκλίνη D1 σε

σύμπλοκο με την CDK4, δεσμεύει τους CDK αναστολείς p27^{kip} και p21^{waf1}. Επειδή όμως η D1 υπερεκφράζεται, δεν αφήνει περίσσεια των p27^{kip} και p21^{waf1} να συνδέσουν και να αναστείλουν το σύμπλοκο κυκλίνης E/CDK2, με αποτέλεσμα την περαιτέρω απορρύθμιση του G1 σημείου ελέγχου. Επομένως, παράγοντες που ελαττώνουν περαιτέρω την έκφραση των αναστολέων p27^{kip} ή p21^{waf1} επιτείνουν την απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και συντείνουν σε χειρότερη πρόγνωση⁹⁰.

Το σύμπλοκο κυκλίνης D1/CDK4 εκδηλώνει τη δράση του στον κυτταρικό κύκλο μέσω της διέγερσης του E2F, ο οποίος εκφράζεται σε υψηλό ποσοστό από τα κύτταρα ΛΜ³¹⁹. Σε κυτταρικές σειρές και βιοπτικό υλικό από ΛΜ έχει βρεθεί υπερέκφραση των CDK2 και CDK4, του Bcl-2 και του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB³²⁰⁻³²². Επίσης, έχει βρεθεί υπερέκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη διασύνδεση των οδών NF-κB και TNF, όπως τα TNFR1, DR3, TNFRSF7, IKKB, TANK, TRAF5, TRAF6^{322;323}. Η ενεργοποίηση από TNFR-σχετιζόμενα σήματα φαίνεται πως οδηγεί σε διέγερση του NF-κB και όχι σε επαγωγή απόπτωσης στα κύτταρα αυτά. Στο πλαίσιο αυτό εξηγούνται και τα πρόσφατα θετικά αποτελέσματα της χρήσης αναστολέων του πρωτεασώματος σε ανθεκτικά ΛΜ³²⁴ αφού, μεταξύ άλλων, δρουν κατασταλτικά στον NF-κB και αυξάνουν τα επίπεδα του p27^{kip}.

Στους εξωτερικούς παράγοντες που έχουν αυξητική δράση στα κύτταρα του λεμφώματος μανδύα ανήκει η IL-10 που παράγεται και αυτοκρινώς σαν αποτέλεσμα της έκφρασης του CD5 και παρατείνει την επιβίωση των κυττάρων του ΛΜ εξασκώντας τη δράση της μέσω της STAT3^{325;326}. Ακόμη, σε πρόσφατη μελέτη οι Fu L και συν³²⁷ έδειξαν την παραγωγή από κύτταρα ΛΜ της πρωτεΐνης BLyS της ομάδος του TNF, η οποία αυξάνει τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωσή τους, ενώ στη σύνθεσή της εμπλέκονται οι μεταγραφικοί παράγοντες NF-κB και NFAT. Τέλος, το CD40 υπερεκφράζεται στα ΛΜ³²⁰ και ο CD40L μπορεί να επάγει τον πολλαπλασιασμό κυττάρων ΛΜ σε καλλιέργεια χωρίς την προσθήκη άλλου αυξητικού παράγοντα³²⁸. Οι ασθενείς με λέμφωμα μανδύα που μελετήσαμε είχαν σημαντική αύξηση των επιπέδων TNF-α ορού, γεγονός που μπορεί να σχετίζεται με την ενεργοποίηση του NF-κB δια μέσω του Tpl-2 και την εκδήλωση αντι-αποπτωτικών και μιτογόνων γεγονότων.

Για το Pim1 υπάρχουν ήδη δεδομένα σχετικά με την υπερέκφρασή του στη βλαστοειδή ποικιλία του λεμφώματος μανδύα^{254;255}, ενώ για το Tpl2, εκτός από τη σημασία του στην ενεργοποίηση του NFAT, έχει δειχθεί και η ανασταλτική του δράση στον αναστολέα p27^{KIP}, με αποτέλεσμα τη διέγερση CDK2 και E2F¹⁴⁰, καθώς

και ο ρόλος του στη διαμεταγωγή σήματος στις οδούς CD40/TRAF6/NF-κB και TNF-α/NF-κB. Υπάρχουν επίσης στοιχεία ότι μπορεί να ευοδώνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω της επαγωγής κυκλινών και ιδίως της κυκλίνης E (Eliopoulos A. και Tsatsanis C., προσωπική επικοινωνία). Οι επιδράσεις αυτές δείχνουν το συνδυαστικό ρόλο που μπορεί να διαδραματίζει το Trp2 στο λέμφωμα τύπου μανδύα.

4. Το Gfi1 δεν παρουσιάζει αυξημένη έκφραση στις B-λεμφοειδείς νεοπλασίες

Από τις B-λεμφοειδείς νεοπλασίες που μελετήθηκαν αποκαλύφθηκε αυξημένη έκφραση του Gfi1 μόνο σε μια ασθενή (μαζί και με τα Trp2, Pim1) με λέμφωμα σπληνός από κύτταρα της μεθοριακής ζώνης (ΣΜΖΛ), η οποία βέβαια δεν αξιολογείται στατιστικά. Ωστόσο, πρέπει να σημειώσουμε πως στη μελέτη των Shin MS και συν¹⁹⁸ το Gfi1 ήταν ένα από τα 7 γονίδια που βρέθηκαν να υπερεκφράζονται σε ΣΜΖΛ που αναπτύσσουν τα NF.V⁺ ποντίκια, εξαιτίας του MuLV και μάλιστα ήταν το μοναδικό γονίδιο που ξεχώριζε το λέμφωμα αυτό από διάφορα B λεμφώματα που μελετήθηκαν. Τα σπάνια αυτά λεμφώματα ανήκουν στα βραδείας εξέλιξης, προέρχονται από B- λεμφοκύτταρα της μεθοριακής ζώνης του σπληνός, είναι sIg+, CD19+, CD20+, CD22+, CD5-, CD23-, CD11c-, CD10- και FMC7+ και μπορεί να έχουν μεταλλαγμένες ή αμετάλλακτες βαριές αλυσούς. Έχουν βρεθεί αναδιατάξεις των CDK6 και κυκλίνης D3 και μερικές φορές και της κυκλίνης D1³²⁹. Για το ρόλο του Gfi1 στη διαφοροποίηση των B-λεμφοκυττάρων δεν υπάρχουν καθόλου στοιχεία, παρά μόνο μια παρατηρούμενη ελάττωση των περιφερικών B-λεμφοκυττάρων σε άτομα με μεταλλάξεις που εξουδετερώνουν το Gfi1¹⁸⁷. Σε πειραματικά μοντέλα, εκτός από το λέμφωμα σπληνός, ο μεταγραφικός αυτός παράγοντας συμμετέχει στην ανάπτυξη T λεμφομάτων μαζί με το Pim1¹⁸⁰ και σε B-λεμφοβλαστικά λεμφώματα που αναπτύσσονται εξαιτίας ενεργοποίησης του Myc¹⁹⁷, ενός ογκογονιδίου που δε σχετίζεται με λεμφώματα χαμηλής κακοήθειας όπως το προαναφερθέν ΣΜΖΛ. Η θετική σχέση μεταξύ των γονιδίων Trp2, Gfi1 και Pim1 που δείξαμε σε ομάδα T-λεμφοκυτταρικών νεοπλασιών φαίνεται να υπάρχει και εδώ.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη για πρώτη φορά εμπλέκει την κινάση Trp2 στην παθογένεια T- λεμφοκυτταρικών νεοπλασιών του ανθρώπου *in vivo*. Δείξαμε τη σχέση της με υπο-ομάδα λευχαιμιών βραδείας εξέλιξης, τις LGL λευχαιμίες ή «λευχαιμίες από μεγάλα κοκκιώδη λεμφοκύτταρα» και το συγγενές νόσημα «χρόνια NK λεμφοκυττάρωση». Η σχέση αυτή, με βάση τους γνωστούς μηχανισμούς με τους οποίους το Trp2 προάγει την T- λεμφοματογένεση, αλλά και τα όσα γνωρίζουμε για την παθογένεια της κλωνικής ανάπτυξης και των ανοσολογικών εκδηλώσεων που συνοδεύουν αυτά τα νοσήματα, μπορεί να αφορά τόσο στο επίπεδο της νεοπλασματικής διεργασίας, όσο και στη, μέσω κυτταροκινών ανάπτυξη της ουδετεροπενίας που παρουσίαζαν οι ασθενείς μας. Βρέθηκε θετική συσχέτιση της έκφρασης του γονιδίου Trp2 με τα γονίδια Gfi1 και Pim1 στις T- λεμφοκυτταρικές νεοπλασίες. Τα δύο πρώτα ωστόσο περιορίζονταν στις LGL-PD, ενώ το Pim1 είχε ευρύτερη έκφραση.

Αναφορικά με B-κυτταρικές νεοπλασίες, δείξαμε μια πιθανή συνεργασία των Trp2 και Pim1 στην ανάπτυξη της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας, καθώς και στο επιθετικό λέμφωμα από κύτταρα μανδύα. Η συμμετοχή του Pim1 σε λεμφοειδείς νεοπλασίες από B-κύτταρα έχει τεκμηριωθεί σε πολλές περιπτώσεις στον άνθρωπο, ενώ για την εκδήλωση του ογκογόνου δυναμικού του φαίνεται πως απαιτείται συνεργασία με άλλα ογκογονίδια. Στον αντίποδα, οι μέχρι τώρα μελέτες για το Trp2 δε συμπεριλαμβάνουν B-κυτταρικής αρχής νεοπλασίες, με εξαίρεση την πιθανή σχέση του με το EBV-σχετιζόμενο λέμφωμα Hodgkin. Έτσι, για πρώτη φορά βρίσκεται να μετέχει και σε άλλες κατηγορίες B νεοπλασμάτων, των οποίων η παθογένεια σχετίζεται με αναστολή της απόπτωσης και απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου αντίστοιχα για τη ΧΛΛ και το ΛΜ.

Η υπερέκφραση του Trp2 στα νοσήματα αυτά δεν οφείλεται σε γονιδιακή ενίσχυση και ο μηχανισμός της πρέπει να αναζητηθεί σε επίπεδο μετάλλαξης ή δευτερογενούς αποτελέσματος στο πλαίσιο της ενεργοποίησης άλλων ογκογονιδίων.

Τέλος, το Gfi1 δε βρέθηκε σε B-κυτταρικές νεοπλασίες, εκτός από μια μεμονωμένη περίπτωση του βραδείας εξέλιξης λεμφώματος σπληνός από κύτταρα της μεθοριακής ζώνης, γεγονός ωστόσο που συμφωνεί με αντίστοιχα πειραματικά δεδομένα.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Shibuya K, Mathers C, Boschi-Pinto C, Lopez A, Murray C. Global and regional estimates of cancer mortality and incidence by site: II. results for the global burden of disease 2000. *BMC Cancer* 2002;2:37.
2. Pugh WC, McBride A. The pathologic basis for the classification of non-Hodgkin Lymphoma. In: Hoffman Ronald, Benz Edward J., Shattil Sanford J. et al., eds. *Hematology:basic principles and practice*. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000:1263.
3. Harris NL, Jaffe ES, Stein H et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994;84:1361-1392.
4. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J.Clin.Oncol.* 1999;17:3835-3849.
5. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman J. World Health Organization Classification of tumors.Pathology and genetics of tumors of Haematopoietic and Lymphoid tissues. Lyon: IARC Press; 2001.
6. Hiddemann W, Longo DL, Coiffier B et al. Lymphoma classification--the gap between biology and clinical management is closing. *Blood* 1996;88:4085-4089.
7. Lin AY, Tucker MA. Epidemiology of Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma. In: Canellos GP, Lister TA, Sklar JL, eds. *The lymphomas*. Philadelphia: WB Saunders; 1998:43.
8. Galy A, Travis M, Cen D, Chen B. Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity*. 1995;3:459-473.
9. Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 1997;91:661-672.

10. Spits H, Blom B, Jaleco AC et al. Early stages in the development of human T, natural killer and thymic dendritic cells. *Immunol.Rev.* 1998;165:75-86.
11. Bertrand FE, III, Billips LG, Burrows PD et al. Ig D(H) gene segment transcription and rearrangement before surface expression of the pan-B-cell marker CD19 in normal human bone marrow. *Blood* 1997;90:736-744.
12. Davi F, Faili A, Gritti C et al. Early onset of immunoglobulin heavy chain gene rearrangements in normal human bone marrow CD34+ cells. *Blood* 1997;90:4014-4021.
13. Ghia P, ten BE, Sanz E et al. Ordering of human bone marrow B lymphocyte precursors by single-cell polymerase chain reaction analyses of the rearrangement status of the immunoglobulin H and L chain gene loci. *J.Exp.Med.* 1996;184:2217-2229.
14. Davis MM, Kim SK, Hood LE. DNA sequences mediating class switching in alpha-immunoglobulins. *Science* 1980;209:1360-1365.
15. Kantor AB, Herzenberg LA. Origin of murine B cell lineages. *Annu.Rev.Immunol.* 1993;11:501-538.
16. Kuppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N.Engl.J Med.* 1999;341:1520-1529.
17. Ηλιόπουλος Γ. Λεμφοκύτταρα και πλασματοκύτταρα. In: Ηλιόπουλος Γ, ed. *Φυσιολογία και φυσιοπαθολογία του αίματος και των αιμοποιητικών οργάνων.*: Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ.Πασχαλίδης; 1999:393-436.
18. Burnet FM. A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *Australian Journal of Science* 1957;20:67-69.
19. Liu YJ, Joshua DE, Williams GT et al. Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature* 1989;342:929-931.
20. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:1848-1854.

21. Damle RN, Wasil T, Fais F et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:1840-1847.
22. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood* 2003;101:4944-4951.
23. Tschumper RC, Kay NE, Turria SJ. Gene expression profiling of germline (GL)/CD38lo, GL/CD38hi, somatic mutation (SM)/CD38lo, and SM/CD38hi subsets of B-CLL. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2001;98:471a.
24. Campo E, Raffeld M, Jaffe ES. Mantle-cell lymphoma. *Semin.Hematol.* 1999;36:115-127.
25. Clayberger C, Krensky AM. T-cell immunity. In: Hoffman Ronald, Benz Edward J., Shattil Sanford J. et al., eds. *Hematology:basic principles and practice*. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000:90-100.
26. Saint-Ruf C, Ungewiss K, Groettrup M et al. Analysis and expression of a cloned pre-T cell receptor gene. *Science* 1994;266:1208-1212.
27. Sebzda E, Mariathasan S, Ohteki T et al. Selection of the T cell repertoire. *Annu.Rev.Immunol.* 1999;17:829-874.
28. Pircher H, Rohrer UH, Moskophidis D, Zinkernagel RM, Hengartner H. Lower receptor avidity required for thymic clonal deletion than for effector T-cell function. *Nature* 1991;351:482-485.
29. Palmer E. Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat.Rev.Immunol.* 2003;3:383-391.
30. Sprent J, Tough DF. Lymphocyte life-span and memory. *Science* 1994;265:1395-1400.
31. Bach JF. Non-Th2 regulatory T-cell control of Th1 autoimmunity. *Scand.J.Immunol.* 2001;54:21-29.

32. Rincon M, Enslin H, Raingeaud J et al. Interferon-gamma expression by Th1 effector T cells mediated by the p38 MAP kinase signaling pathway. *EMBO J* 1998;17:2817-2829.
33. Yang DD, Conze D, Whitmarsh AJ et al. Differentiation of CD4+ T cells to Th1 cells requires MAP kinase JNK2. *Immunity*. 1998;9:575-585.
34. Moulian N, Berrih-Aknin S. Fas/APO-1/CD95 in health and autoimmune disease: thymic and peripheral aspects. *Semin.Immunol.* 1998;10:449-456.
35. Haas W, Pereira P, Tonegawa S. Gamma/delta cells. *Annu.Rev.Immunol.* 1993;11:637-685.
36. Kaufmann SH. gamma/delta and other unconventional T lymphocytes: what do they see and what do they do? *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1996;93:2272-2279.
37. Spits H, Lanier LL, Phillips JH. Development of human T and natural killer cells. *Blood* 1995;85:2654-2670.
38. Colucci F, Caligiuri MA, Di Santo JP. What does it take to make a natural killer? *Nat.Rev.Immunol.* 2003;3:413-425.
39. Phillips JH, Hori T, Nagler A et al. Ontogeny of human natural killer (NK) cells: fetal NK cells mediate cytolytic function and express cytoplasmic CD3 epsilon,delta proteins. *The Journal of Experimental Medicine* 1992;175:1055-1066.
40. Ritz J. NK cell cytokine secretion regulated by SHIP1. *Blood* 2005;105:3003.
41. Ortaldo JR, Winkler-Pickett RT, Yagita H, Young HA. Comparative studies of CD3- and CD3+ CD56+ cells: examination of morphology, functions, T cell receptor rearrangement, and pore-forming protein expression. *Cell Immunol.* 1991;136:486-495.
42. Ken-ichiro S, Masaru T. NKT Cells: A Regulator in Both Innate and Acquired Immunity. *Current Medicinal Chemistry - Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents* 2005;4:59-64.

43. Mingari MC, Schiavetti F, Ponte M et al. Human CD8+ T lymphocyte subsets that express HLA class I-specific inhibitory receptors represent oligoclonally or monoclonally expanded cell populations. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1996;93:12433-12438.
44. Wang EC, Moss PA, Frodsham P et al. CD8highCD57+ T lymphocytes in normal, healthy individuals are oligoclonal and respond to human cytomegalovirus. *J.Immunol.* 1995;155:5046-5056.
45. Rose MG, Berliner N. T-cell large granular lymphocyte leukemia and related disorders. *Oncologist.* 2004;9:247-258.
46. Bigouret V, Hoffmann T, Arlettaz L et al. Monoclonal T cell expansions in asymptomatic individuals and in patients with Large Granular Leukemia consist of cytotoxic effector T cells expressing the activating CD94-NKG2C/E and NKD2D Killer Cell Receptors. *Blood* 2002
47. Zambello R, Trentin L, Facco M et al. Analysis of the T cell receptor in the lymphoproliferative disease of granular lymphocytes: superantigen activation of clonal CD3+ granular lymphocytes. *Cancer Res.* 1995;55:6140-6145.
48. Loughran TP, Jr., Kadin ME, Starkebaum G et al. Leukemia of large granular lymphocytes: association with clonal chromosomal abnormalities and autoimmune neutropenia, thrombocytopenia, and hemolytic anemia. *Ann.Intern.Med.* 1985;102:169-175.
49. Wong KF, Chan JC, Liu HS, Man C, Kwong YL. Chromosomal abnormalities in T-cell large granular lymphocyte leukaemia: report of two cases and review of the literature. *Br.J.Haematol.* 2002;116:598-600.
50. Kingreen D, Siegert W. Chronic lymphatic leukemias of T and NK cell type. *Leukemia* 1997;11 Suppl 2:46-49.
51. Matutes E, Wotherspoon AC, Parker NE et al. Transformation of T-cell large granular lymphocyte leukaemia into a high-grade large T-cell lymphoma. *Br.J.Haematol.* 2001;115:801-806.

52. Tefferi A. Chronic natural killer cell lymphocytosis. *Leuk.Lymphoma* 1996;20:245-248.
53. Zambello R, Trentin L, Ciccone E et al. Phenotypic diversity of natural killer (NK) populations in patients with NK-type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *Blood* 1993;81:2381-2385.
54. Segel GB, Lichtman MA. Familial (inherited) leukemia, lymphoma, and myeloma: an overview. *Blood Cells Mol.Dis.* 2004;32:246-261.
55. Cuttner J. Increased incidence of hematologic malignancies in first-degree relatives of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Invest* 1992;10:103-109.
56. Catovsky D. Definition and diagnosis of sporadic and familial chronic lymphocytic leukemia. *Hematol.Oncol.Clin.North Am.* 2004;18:783-94, vii.
57. Stankovic T, Kidd AM, Sutcliffe A et al. ATM mutations and phenotypes in ataxia-telangiectasia families in the British Isles: expression of mutant ATM and the risk of leukemia, lymphoma, and breast cancer. *Am.J Hum.Genet* 1998;62:334-345.
58. Goldin LR, Pfeiffer RM, Li X, Hemminki K. Familial risk of lymphoproliferative tumors in families of patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the Swedish Family-Cancer Database. *Blood* 2004;104:1850-1854.
59. Rawstron AC, Yuille MR, Fuller J et al. Inherited predisposition to CLL is detectable as subclinical monoclonal B-lymphocyte expansion. *Blood* 2002;100:2289-2290.
60. Ogmundsdottir HM, Haraldsdottir V, Johannesson GM et al. Familiality of benign and malignant paraproteinemias. A population-based cancer-registry study of multiple myeloma families. *Haematologica* 2005;90:66-71.
61. Kende G, Toren A, Mandel M et al. Familial leukemia: description of two kindreds and a review of the genetic aspects of the disease. *Acta Haematol.* 1994;92:208-211.

62. Daugherty SE, Pfeiffer RM, Mellekjær L, Hemminki K, Goldin LR. No evidence for anticipation in lymphoproliferative tumors in population-based samples. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 2005;14:1245-1250.
63. Pyszel A, Wrobel T, Szuba A, Andrzejak R. [Effect of metals, benzene, pesticides and ethylene oxide on the haematopoietic system]. *Med.Pr* 2005;56:249-255.
64. Tavani A, Negri E, Franceschi S et al. Hair dye use and risk of lymphoid neoplasms and soft tissue sarcomas. *Int.J.Cancer* 2005;113:629-631.
65. Wright EG. Ionizing radiation and leukaemia: more questions than answers. *Hematol.Oncol.* 2005;23:119-126.
66. Kassan SS, Thomas TL, Moutsopoulos HM et al. Increased risk of lymphoma in sicca syndrome. *Ann.Intern.Med.* 1978;89:888-892.
67. Kato I, Tajima K, Suchi T et al. Chronic thyroiditis as a risk factor of B-cell lymphoma in the thyroid gland. *Jpn.J.Cancer Res.* 1985;76:1085-1090.
68. Heslop HE. Biology and treatment of epstein-barr virus-associated non-hodgkin lymphomas. *Hematology (Am.Soc.Hematol.Educ.Program.)* 2005;260-266.
69. Knecht H, Berger C, Rothenberger S, Odermatt BF, Brousset P. The role of Epstein-Barr virus in neoplastic transformation. *Oncology* 2001;60:289-302.
70. Gaidano G, Pastore C, Gloghini A et al. Human herpesvirus type-8 (HHV-8) in haematopoietic neoplasia. *Leuk.Lymphoma* 1997;24:257-266.
71. Gaidano G, Dalla-Favera R. Pathobiology of non-Hodgkin lymphomas. In: Hoffman Ronald, Benz Edward J., Shattil Sanford J. et al., eds. *Hematology:basic principles and practice.* Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000:1213-1229.
72. Morra E. Cryoglobulinemia. *Hematology* 2005;2005:368-372.

73. Cote TR, Biggar RJ, Rosenberg PS et al. Non-Hodgkin's lymphoma among people with AIDS: incidence, presentation and public health burden. AIDS/Cancer Study Group. *Int.J.Cancer* 1997;73:645-650.
74. Harris NL. Mature B-cell neoplasms:introduction. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman J, eds. World Health Organization Classification of tumors.Pathology and genetics of tumors of Haematopoietic and Lymphoid tissues. Lyon: IARC Press; 2001:121.
75. Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA, Liotta LA. The molecular basis of cancer. Philadelphia: W.B.Saunders Company; 2001.
76. Somatic mutations and cancer. In: Strachan T, Read A, eds. Human molecular genetics. Oxford: Bios Scientific Publishers Ltd.; 1996:
77. Shaffer AL, Rosenwald A, Staudt LM. Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation. *Nat.Rev.Immunol.* 2002;2:920-932.
78. Rao PH, Houldsworth J, Dyomina K et al. Chromosomal and gene amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 1998;92:234-240.
79. Houldsworth J, Mathew S, Rao PH et al. REL proto-oncogene is frequently amplified in extranodal diffuse large cell lymphoma. *Blood* 1996;87:25-29.
80. Wiemels JL, Zhang Y, Chang J et al. RAS mutation is associated with hyperdiploidy and parental characteristics in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2005;19:415-419.
81. Kalakonda N, Rothwell DG, Scarffe JH, Norton JD. Detection of N-Ras codon 61 mutations in subpopulations of tumor cells in multiple myeloma at presentation. *Blood* 2001;98:1555-1560.
82. Tanaka S, Louie DC, Kant JA, Reed JC. Frequent incidence of somatic mutations in translocated BCL2 oncogenes of non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1992;79:229-237.
83. Pasqualucci L, Neumeister P, Goossens T et al. Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 2001;412:341-346.

84. Chaganti SR, Chen W, Parsa N et al. Involvement of BCL6 in chromosomal aberrations affecting band 3q27 in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Genes Chromosomes.Cancer* 1998;23:323-327.
85. Murphy M, Lenine A. Tumor supressor genes. In: Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA, Liotta LA, eds. *The molecular basis of cancer*. Philadelphia: W.B.Saunders Company; 2001:95-114.
86. Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1971;68:820-823.
87. Lo CF, Gaidano G, Louie DC et al. p53 mutations are associated with histologic transformation of follicular lymphoma. *Blood* 1993;82:2289-2295.
88. Gaidano G, Ballerini P, Gong JZ et al. p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1991;88:5413-5417.
89. Cairns P, Mao L, Merlo A et al. Rates of p16 (MTS1) mutations in primary tumors with 9p loss. *Science* 1994;265:415-417.
90. Chiarle R, Budel LM, Skolnik J et al. Increased proteasome degradation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 is associated with a decreased overall survival in mantle cell lymphoma. *Blood* 2000;95:619-626.
91. Gaidano G, Hauptschein RS, Parsa NZ et al. Deletions involving two distinct regions of 6q in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 1992;80:1781-1787.
92. Raimondi SC. Current status of cytogenetic research in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1993;81:2237-2251.
93. Kalachikov S, Migliazza A, Cayanis E et al. Cloning and gene mapping of the chromosome 13q14 region deleted in chronic lymphocytic leukemia. *Genomics* 1997;42:369-377.
94. Seong C, Delasalle K, Hayes K et al. Prognostic value of cytogenetics in multiple myeloma. *British Journal of Haematology* 1998;101:189-194.

95. Sanchez-Beato M, Sanchez-Aguilera A, Piris MA. Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas. *Blood* 2003;101:1220-1235.
96. Vorechovsky I, Luo L, Dyer MJ et al. Clustering of missense mutations in the ataxia-telangiectasia gene in a sporadic T-cell leukaemia. *Nat.Genet.* 1997;17:96-99.
97. Neilson JR, Auer R, White D et al. Deletions at 11q identify a subset of patients with typical CLL who show consistent disease progression and reduced survival. *Leukemia* 1997;11:1929-1932.
98. Easton DF. Cancer risks in A-T heterozygotes. *Int.J.Radiat.Biol.* 1994;66:S177-S182.
99. Macintyre E, Willerford D, Morris SW. Non-Hodgkin's Lymphoma: Molecular Features of B Cell Lymphoma. *Hematology (Am.Soc.Hematol.Educ.Program.)* 2000;180-204.
100. Juliusson G, Oscier DG, Fitchett M et al. Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *N.Engl.J.Med.* 1990;323:720-724.
101. Hoelzer D, Gokbuget N, Ottmann O et al. Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematology* 2002;2002:162-192.
102. Rabbitts TH. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 1994;372:143-149.
103. Schlegelberger B, Himmler A, Godde E et al. Cytogenetic findings in peripheral T-cell lymphomas as a basis for distinguishing low-grade and high-grade lymphomas. *Blood* 1994;83:505-511.
104. Que TH, Marco JG, Ellis J et al. Trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia detected by fluorescence in situ hybridization: analysis by stage, immunophenotype, and morphology. *Blood* 1993;82:571-575.
105. Schouten HC, Sanger WG, Weisenburger DD, Anderson J, Armitage JO. Chromosomal abnormalities in untreated patients with non-Hodgkin's

- lymphoma: associations with histology, clinical characteristics, and treatment outcome. The Nebraska Lymphoma Study Group. *Blood* 1990;75:1841-1847.
106. Itoyama T, Chaganti RS, Yamada Y et al. Cytogenetic analysis and clinical significance in adult T-cell leukemia/lymphoma: a study of 50 cases from the human T-cell leukemia virus type-1 endemic area, Nagasaki. *Blood* 2001;97:3612-3620.
 107. Akasaka H, Akasaka T, Kurata M et al. Molecular anatomy of BCL6 translocations revealed by long-distance polymerase chain reaction-based assays. *Cancer Res.* 2000;60:2335-2341.
 108. Kimmelman A, Bafico A, Aaronson SA. Oncogenes and signal transduction. In: Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA, Liotta LA, eds. *The molecular basis of cancer*. Philadelphia: W.B.Saunders Company; 2001:115-133.
 109. Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv.Cancer Res.* 1998;74:49-139.
 110. Ip YT, Davis RJ. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Curr.Opin.Cell Biol.* 1998;10:205-219.
 111. Cohen P. The search for physiological substrates of MAP and SAP kinases in mammalian cells. *Trends in Cell Biology* 1997;7:353-361.
 112. Zhou G, Bao ZQ, Dixon JE. Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J.Biol.Chem.* 1995;270:12665-12669.
 113. Gilmore TD. The Rel/NF-kappaB signal transduction pathway: introduction. *Oncogene* 1999;18:6842-6844.
 114. Xiao G, Harhaj EW, Sun SC. NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. *Mol.Cell* 2001;7:401-409.
 115. Heissmeyer V, Krappmann D, Wulczyn FG, Scheidereit C. NF-kappaB p105 is a target of IkappaB kinases and controls signal induction of Bcl-3-p50 complexes. *EMBO J* 1999;18:4766-4778.

116. Arima N, Tei C. HTLV-I Tax related dysfunction of cell cycle regulators and oncogenesis of adult T cell leukemia. *Leuk.Lymphoma* 2001;40:267-278.
117. Horie R, Watanabe T, Morishita Y et al. Ligand-independent signaling by overexpressed CD30 drives NF-kappaB activation in Hodgkin-Reed-Sternberg cells. *Oncogene* 2002;21:2493-2503.
118. Zhou H, Wertz I, O'Rourke K et al. Bcl10 activates the NF-kappaB pathway through ubiquitination of NEMO. *Nature* 2004;427:167-171.
119. Cabannes E, Khan G, Aillet F, Jarrett RF, Hay RT. Mutations in the Ikbalpha gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for Ikbalpha. *Oncogene* 1999;18:3063-3070.
120. Michaux L, Dierlamm J, Wlodarska I et al. t(14;19)/BCL3 rearrangements in lymphoproliferative disorders: a review of 23 cases. *Cancer Genet Cytogenet* 1997;94:36-43.
121. Barth TF, Martin-Subero JI, Joos S et al. Gains of 2p involving the REL locus correlate with nuclear c-Rel protein accumulation in neoplastic cells of classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2003;101:3681-3686.
122. Martinez-Delgado B, Melendez B, Cuadros M et al. Expression Profiling of T-Cell Lymphomas Differentiates Peripheral and Lymphoblastic Lymphomas and Defines Survival Related Genes. *Clin Cancer Res* 2004;10:4971-4982.
123. Richardson P. Clinical update: proteasome inhibitors in hematologic malignancies. *Cancer Treat.Rev.* 2003;29 Suppl 1:33-39.
124. Miyoshi J, Higashi T, Mukai H, Ohuchi T, Kakunaga T. Structure and transforming potential of the human cot oncogene encoding a putative protein kinase. *Mol.Cell Biol.* 1991;11:4088-4096.
125. Aoki M, Hamada F, Sugimoto T et al. The human cot proto-oncogene encodes two protein serine/threonine kinases with different transforming activities by alternative initiation of translation. *J Biol Chem* 1993;268:22723-22732.
126. Chan AM, Chedid M, McGovern ES et al. Expression cDNA cloning of a serine kinase transforming gene. *Oncogene* 1993;8:1329-1333.

127. Patriotis C, Makris A, Bear SE, Tsiichlis PN. Tumor progression locus 2 (Tpl-2) encodes a protein kinase involved in the progression of rodent T-cell lymphomas and in T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:2251-2255.
128. Justice MJ, Gilbert DJ, Kinzler KW et al. A molecular genetic linkage map of mouse chromosome 18 reveals extensive linkage conservation with human chromosomes 5 and 18. *Genomics* 1992;13:1281-8.
129. Ohara R, Miyoshi J, Aoki M, Toyoshima K. The murine cot proto-oncogene: genome structure and tissue-specific expression. *Jpn J Cancer Res* 1993;84:518-25.
130. Hubbard T, Andrews D, Caccamo M et al. Ensembl 2005. *Nucl.Acids Res.* 2005;33:D447-D453.
131. Patriotis C, Makris A, Chernoff J, Tsiichlis PN. Tpl-2 acts in concert with Ras and Raf-1 to activate mitogen-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:9755-9.
132. Salmeron A, Ahmad TB, Carlile GW et al. Activation of MEK-1 and SEK-1 by Tpl-2 proto-oncoprotein, a novel MAP kinase kinase kinase. *EMBO J* 1996;15:817-826.
133. Chiariello M, Marinissen MJ, Gutkind JS. Multiple mitogen-activated protein kinase signaling pathways connect the cot oncoprotein to the c-jun promoter and to cellular transformation. *Mol.Cell Biol.* 2000;20:1747-1758.
134. Makris A, Patriotis C, Bear SE, Tsiichlis PN. Genomic organization and expression of Tpl-2 in normal cells and Moloney murine leukemia virus-induced rat T-cell lymphomas: activation by provirus insertion. *J Virol* 1993;67:4283-4289.
135. Ohara R, Hirota S, Onoue H et al. Identification of the cells expressing cot proto-oncogene mRNA. *J Cell Sci* 1995;108 (Pt 1):97-103.
136. Ceci JD, Patriotis CP, Tsatsanis C et al. Tpl-2 is an oncogenic kinase that is activated by carboxy-terminal truncation. *Genes Dev* 1997;11:688-700.

137. Erny KM, Peli J, Lambert JF, Muller V, Diggelmann H. Involvement of the Tpl-2/cot oncogene in MMTV tumorigenesis. *Oncogene* 1996;13:2015-20.
138. Gandara ML, Lopez P, Hernando R, Castano JG, Alemany S. The COOH-terminal domain of wild-type Cot regulates its stability and kinase specific activity. *Mol.Cell Biol.* 2003;23:7377-7390.
139. Waterfield MR, Zhang M, Norman LP, Sun SC. NF-kappaB1/p105 regulates lipopolysaccharide-stimulated MAP kinase signaling by governing the stability and function of the Tpl2 kinase. *Mol.Cell* 2003;11:685-694.
140. Velasco-Sampayo A, Alemany S. p27kip protein levels and E2F activity are targets of Cot kinase during G1 phase progression in T cells. *J Immunol* 2001;166:6084-6090.
141. Ballester A, Tobena R, Lisbona C, Calvo V, Alemany S. Cot kinase regulation of IL-2 production in Jurkat T cells. *J Immunol* 1997;159:1613-1618.
142. Rao A, Luo C, Hogan PG. TRANSCRIPTION FACTORS OF THE NFAT FAMILY: Regulation and Function. *Annual Review of Immunology* 1997;15:707-747.
143. Tsatsanis C, Patriotis C, Bear SE, Tsihchlis PN. The Tpl-2 protooncogene protein activates the nuclear factor of activated T cells and induces interleukin 2 expression in T cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:3827-3832.
144. Tsatsanis C, Patriotis C, Tsihchlis PN. Tpl-2 induces IL-2 expression in T-cell lines by triggering multiple signaling pathways that activate NFAT and NF-kappaB. *Oncogene* 1998;17:2609-2618.
145. Lin X, Cunningham ET, Jr., Mu Y, Geleziunas R, Greene WC. The proto-oncogene Cot kinase participates in CD3/CD28 induction of NF-kappaB acting through the NF-kappaB-inducing kinase and IkappaB kinases. *Immunity* 1999;10:271-80.
146. Das S, Cho J, Lambertz I et al. Tpl2/cot signals activate ERK, JNK, and NF-kappaB in a cell-type and stimulus-specific manner. *J Biol.Chem.* 2005;280:23748-23757.

147. Kane LP, Mollenauer MN, Xu Z, Turck CW, Weiss A. Akt-dependent phosphorylation specifically regulates Cot induction of NF-kappa B-dependent transcription. *Mol.Cell Biol.* 2002;22:5962-5974.
148. Belich MP, Salmeron A, Johnston LH, Ley SC. TPL-2 kinase regulates the proteolysis of the NF-kappaB-inhibitory protein NF-kappaB1 p105. *Nature* 1999;397:363-8.
149. Eliopoulos AG, Davies C, Blake SS et al. The oncogenic protein kinase Tpl-2/Cot contributes to Epstein-Barr virus-encoded latent infection membrane protein 1-induced NF-kappaB signaling downstream of TRAF2. *J Virol.* 2002;76:4567-4579.
150. Eliopoulos AG, Wang CC, Dumitru CD, Tsihchlis PN. Tpl2 transduces CD40 and TNF signals that activate ERK and regulates IgE induction by CD40. *EMBO J* 2003;22:3855-3864.
151. Beinke S, Deka J, Lang V et al. NF-kappaB1 p105 negatively regulates TPL-2 MEK kinase activity. *Mol.Cell Biol.* 2003;23:4739-4752.
152. Beinke S, Robinson MJ, Hugunin M, Ley SC. Lipopolysaccharide activation of the TPL-2/MEK/extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase cascade is regulated by IkappaB kinase-induced proteolysis of NF-kappaB1 p105. *Mol.Cell Biol.* 2004;24:9658-9667.
153. Waterfield M, Jin W, Reiley W, Zhang M, Sun SC. IkappaB kinase is an essential component of the Tpl2 signaling pathway. *Mol.Cell Biol.* 2004;24:6040-6048.
154. Jia Y, Quinn CM, Bump NJ et al. Purification and kinetic characterization of recombinant human mitogen-activated protein kinase kinase kinase COT and the complexes with its cellular partner NF-kappa B1 p105. *Arch.Biochem.Biophys.* 2005;441:64-74.
155. Ballester A, Velasco A, Tobena R, Alemany S. Cot kinase activates tumor necrosis factor-alpha gene expression in a cyclosporin A-resistant manner. *J Biol Chem* 1998;273:14099-14106.

156. Dumitru CD, Ceci JD, Tsatsanis C et al. TNF-alpha induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell* 2000;103:1071-1083.
157. Kontoyiannis D, Boulougouris G, Manoloukos M et al. Genetic dissection of the cellular pathways and signaling mechanisms in modeled tumor necrosis factor-induced Crohn's-like inflammatory bowel disease. *J Exp Med* 2002;196:1563-74.
158. Patriotis C, Russeva MG, Lin JH et al. Tpl-2 induces apoptosis by promoting the assembly of protein complexes that contain caspase-9, the adapter protein Tvl-1, and procaspase-3. *J Cell Physiol* 2001;187:176-187.
159. de Gregorio R, Iniguez MA, Fresno M, Alemany S. Cot kinase induces cyclooxygenase-2 expression in T cells through activation of the nuclear factor of activated T cells. *J Biol.Chem.* 2001;276:27003-27009.
160. Eliopoulos AG, Dumitru CD, Wang CC, Cho J, Tsiichlis PN. Induction of COX-2 by LPS in macrophages is regulated by Tpl2-dependent CREB activation signals. *Embo J* 2002;21:4831-40.
161. Channavajhala PL, Wu L, Cuzzo JW et al. Identification of a novel human kinase supporter of Ras (hKSR-2) that functions as a negative regulator of Cot (Tpl2) signaling. *J Biol.Chem.* 2003;278:47089-47097.
162. Sugimoto K, Ohata M, Miyoshi J et al. A serine/threonine kinase, Cot/Tpl2, modulates bacterial DNA-induced IL-12 production and Th cell differentiation. *J Clin.Invest* 2004;114:857-866.
163. Sanchez-Gongora E, Lisbona C, de Gregorio R et al. COT kinase proto-oncogene expression in T cells: implication of the JNK/SAPK signal transduction pathway in COT promoter activation. *J Biol Chem* 2000;275:31379-86.
164. Luciano BS, Hsu S, Channavajhala PL, Lin LL, Cuzzo JW. Phosphorylation of threonine 290 in the activation loop of Tpl2/Cot is necessary but not sufficient for kinase activity. *J Biol.Chem.* 2004;279:52117-52123.

165. Eliopoulos AG, Das S, Tsihchlis PN. The tyrosine kinase Syk regulates TPL2 activation signals. *J Biol.Chem.* 2006;281:1371-1380.
166. Sourvinos G, Tsatsanis C, Spandidos DA. Overexpression of the Tpl-2/Cot oncogene in human breast cancer. *Oncogene* 1999;18:4968-4973.
167. Clark AM, Reynolds SH, Anderson M, Wiest JS. Mutational activation of the MAP3K8 protooncogene in lung cancer. *Genes Chromosomes.Cancer* 2004;41:99-108.
168. Gilks CB, Bear SE, Grimes HL, Tsihchlis PN. Progression of interleukin-2 (IL-2)-dependent rat T cell lymphoma lines to IL-2-independent growth following activation of a gene (Gfi-1) encoding a novel zinc finger protein. *Mol.Cell Biol.* 1993;13:1759-1768.
169. Bell DW, Taguchi T, Jenkins NA et al. Chromosomal localization of a gene, GF1, encoding a novel zinc finger protein reveals a new syntenic region between man and rodents. *Cytogenet.Cell Genet.* 1995;70:263-267.
170. Roberts T, Cowell JK. Cloning of the human Gfi-1 gene and its mapping to chromosome region 1p22. *Oncogene* 1997;14:1003-1005.
171. Grimes HL, Chan TO, Zweidler-McKay PA, Tong B, Tsihchlis PN. The Gfi-1 proto-oncoprotein contains a novel transcriptional repressor domain, SNAG, and inhibits G1 arrest induced by interleukin-2 withdrawal. *Mol.Cell Biol.* 1996;16:6263-6272.
172. Zweidler-Mckay PA, Grimes HL, Flubacher MM, Tsihchlis PN. Gfi-1 encodes a nuclear zinc finger protein that binds DNA and functions as a transcriptional repressor. *Mol.Cell Biol.* 1996;16:4024-4034.
173. McGhee L, Bryan J, Elliott L et al. Gfi-1 attaches to the nuclear matrix, associates with ETO (MTG8) and histone deacetylase proteins, and represses transcription using a TSA-sensitive mechanism. *J Cell Biochem.* 2003;89:1005-1018.

174. Tong B, Grimes HL, Yang TY et al. The Gfi-1B proto-oncoprotein represses p21WAF1 and inhibits myeloid cell differentiation. *Mol. Cell Biol.* 1998;18:2462-2473.
175. Doan LL, Kitay MK, Yu Q et al. Growth factor independence-1B expression leads to defects in T cell activation, IL-7 receptor alpha expression, and T cell lineage commitment. *J Immunol.* 2003;170:2356-2366.
176. Wallis D, Hamblen M, Zhou Y et al. The zinc finger transcription factor Gfi1, implicated in lymphomagenesis, is required for inner ear hair cell differentiation and survival. *Development* 2003;130:221-232.
177. Osawa M, Yamaguchi T, Nakamura Y et al. Erythroid expansion mediated by the Gfi-1B zinc finger protein: role in normal hematopoiesis. *Blood* 2002;100:2769-2777.
178. Duan Z, Horwitz M. Gfi-1 oncoproteins in hematopoiesis. *Hematology* 2003;8:339-344.
179. Kazanjian A, Wallis D, Au N et al. Growth factor independence-1 is expressed in primary human neuroendocrine lung carcinomas and mediates the differentiation of murine pulmonary neuroendocrine cells. *Cancer Res.* 2004;64:6874-6882.
180. Schmidt T, Karsunky H, Gau E et al. Zinc finger protein GFI-1 has low oncogenic potential but cooperates strongly with pim and myc genes in T-cell lymphomagenesis. *Oncogene* 1998;17:2661-2667.
181. Schmidt T, Karsunky H, Rodel B et al. Evidence implicating Gfi-1 and Pim-1 in pre-T-cell differentiation steps associated with beta-selection. *EMBO J* 1998;17:5349-5359.
182. Rodel B, Tavassoli K, Karsunky H et al. The zinc finger protein Gfi-1 can enhance STAT3 signaling by interacting with the STAT3 inhibitor PIAS3. *EMBO J* 2000;19:5845-5855.

183. Karsunky H, Mende I, Schmidt T, Moroy T. High levels of the onco-protein Gfi-1 accelerate T-cell proliferation and inhibit activation induced T-cell death in Jurkat T-cells. *Oncogene* 2002;21:1571-1579.
184. Grimes HL, Gilks CB, Chan TO, Porter S, Tschlis PN. The Gfi-1 protooncoprotein represses Bax expression and inhibits T-cell death. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1996;93:14569-14573.
185. Zhu J, Guo L, Min B et al. Growth factor independent-1 induced by IL-4 regulates Th2 cell proliferation. *Immunity*. 2002;16:733-744.
186. Yucel R, Karsunky H, Klein-Hitpass L, Moroy T. The transcriptional repressor Gfi1 affects development of early, uncommitted c-Kit⁺ T cell progenitors and CD4/CD8 lineage decision in the thymus. *J Exp.Med.* 2003;197:831-844.
187. Person RE, Li FQ, Duan Z et al. Mutations in proto-oncogene GFI1 cause human neutropenia and target ELA2. *Nat.Genet.* 2003;34:308-312.
188. Karsunky H, Zeng H, Schmidt T et al. Inflammatory reactions and severe neutropenia in mice lacking the transcriptional repressor Gfi1. *Nat.Genet.* 2002;30:295-300.
189. Hock H, Hamblen MJ, Rooke HM et al. Intrinsic requirement for zinc finger transcription factor Gfi-1 in neutrophil differentiation. *Immunity*. 2003;18:109-120.
190. Duan Z, Horwitz M. Targets of the transcriptional repressor oncoprotein Gfi-1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2003;100:5932-5937.
191. Hock H, Hamblen MJ, Rooke HM et al. Gfi-1 restricts proliferation and preserves functional integrity of haematopoietic stem cells. *Nature* 2004;431:1002-1007.
192. Duan Z, Zarebski A, Montoya-Durango D, Grimes HL, Horwitz M. Gfi1 coordinates epigenetic repression of p21Cip/WAF1 by recruitment of histone lysine methyltransferase G9a and histone deacetylase 1. *Mol.Cell Biol.* 2005;25:10338-10351.

193. Liu S, Cowell JK. Cloning and characterization of the TATA-less promoter from the human GFI1 proto-oncogene. *Ann.Hum.Genet* 2000;64:83-86.
194. Doan LL, Porter SD, Duan Z et al. Targeted transcriptional repression of Gfi1 by GFI1 and GFI1B in lymphoid cells. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:2508-2519.
195. Schmidt T, Zornig M, Beneke R, Moroy T. MoMuLV proviral integrations identified by Sup-F selection in tumors from infected myc/pim bitransgenic mice correlate with activation of the gfi-1 gene. *Nucleic Acids Res.* 1996;24:2528-2534.
196. Zornig M, Schmidt T, Karsunky H, Grzeschiczek A, Moroy T. Zinc finger protein GFI-1 cooperates with myc and pim-1 in T-cell lymphomagenesis by reducing the requirements for IL-2. *Oncogene* 1996;12:1789-1801.
197. Scheijen B, Jonkers J, Acton D, Berns A. Characterization of pal-1, a common proviral insertion site in murine leukemia virus-induced lymphomas of c-myc and Pim-1 transgenic mice. *J Virol.* 1997;71:9-16.
198. Shin MS, Fredrickson TN, Hartley JW et al. High-throughput retroviral tagging for identification of genes involved in initiation and progression of mouse splenic marginal zone lymphomas. *Cancer Res.* 2004;64:4419-4427.
199. Dwivedi PP, Anderson PH, Omdahl JL et al. Identification of growth factor independent-1 (GFI1) as a repressor of 25-hydroxyvitamin D 1-alpha hydroxylase (CYP27B1) gene expression in human prostate cancer cells. *Endocr.Relat Cancer* 2005;12:351-365.
200. Cuypers HT, Selten G, Quint W et al. Murine leukemia virus-induced T-cell lymphomagenesis: integration of proviruses in a distinct chromosomal region. *Cell* 1984;37:141-150.
201. Selten G, Cuypers HT, Boelens W et al. The primary structure of the putative oncogene pim-1 shows extensive homology with protein kinases. *Cell* 1986;46:603-611.

202. Cuypers HT, Selten G, Berns A, Geurts van Kessel AH. Assignment of the human homologue of Pim-1, a mouse gene implicated in leukemogenesis, to the pter-q12 region of chromosome 6. *Hum.Genet.* 1986;72:262-265.
203. Nagarajan L, Louie E, Tsujimoto Y et al. Localization of the human pim oncogene (PIM) to a region of chromosome 6 involved in translocations in acute leukemias. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1986;83:2556-2560.
204. Domen J, Von Lindern M, Hermans A et al. Comparison of the human and mouse PIM-1 cDNAs: nucleotide sequence and immunological identification of the in vitro synthesized PIM-1 protein. *Oncogene Res.* 1987;1:103-112.
205. Meeker TC, Nagarajan L, ar-Rushdi A, Croce CM. Cloning and characterization of the human PIM-1 gene: a putative oncogene related to the protein kinases. *J Cell Biochem.* 1987;35:105-112.
206. Zakut-Houri R, Hazum S, Givol D, Telerman A. The cDNA sequence and gene analysis of the human pim oncogene. *Gene* 1987;54:105-111.
207. Saris CJ, Domen J, Berns A. The pim-1 oncogene encodes two related protein-serine/threonine kinases by alternative initiation at AUG and CUG. *EMBO J* 1991;10:655-664.
208. Wang Z, Bhattacharya N, Weaver M et al. Pim-1: a serine/threonine kinase with a role in cell survival, proliferation, differentiation and tumorigenesis. *J Vet.Sci.* 2001;2:167-179.
209. Amson R, Sigaux F, Przedborski S et al. The human protooncogene product p33pim is expressed during fetal hematopoiesis and in diverse leukemias. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1989;86:8857-8861.
210. Meeker TC, Nagarajan L, ar-Rushdi A et al. Characterization of the human PIM-1 gene: a putative proto-oncogene coding for a tissue specific member of the protein kinase family. *Oncogene Res.* 1987;1:87-101.
211. Selten G, Cuypers HT, Berns A. Proviral activation of the putative oncogene Pim-1 in MuLV induced T-cell lymphomas. *EMBO J* 1985;4:1793-1798.

212. Jacobs H, Krimpenfort P, Haks M et al. PIM1 reconstitutes thymus cellularity in interleukin 7- and common gamma chain-mutant mice and permits thymocyte maturation in Rag- but not CD3gamma-deficient mice. *J Exp.Med.* 1999;190:1059-1068.
213. Pearson R, Weston K. c-Myb regulates the proliferation of immature thymocytes following beta-selection. *EMBO J* 2000;19:6112-6120.
214. Domen J, van der Lugt NM, Acton D et al. Pim-1 levels determine the size of early B lymphoid compartments in bone marrow. *J Exp.Med.* 1993;178:1665-1673.
215. Wang Z, Bhattacharya N, Meyer MK et al. Pim-1 negatively regulates the activity of PTP-U2S phosphatase and influences terminal differentiation and apoptosis of monoblastoid leukemia cells. *Arch.Biochem.Biophys.* 2001;390:9-18.
216. Domen J, van der Lugt NM, Laird PW et al. Impaired interleukin-3 response in Pim-1-deficient bone marrow-derived mast cells. *Blood* 1993;82:1445-1452.
217. Domen J, van der Lugt NM, Laird PW, Saris CJ, Berns A. Analysis of Pim-1 function in mutant mice. *Leukemia* 1993;7 Suppl 2:S108-S112.
218. Fox CJ, Hammerman PS, Cinalli RM et al. The serine/threonine kinase Pim-2 is a transcriptionally regulated apoptotic inhibitor. *Genes Dev.* 2003;17:1841-1854.
219. Joneja B, Chen HC, Seshasayee D, Wrentmore AL, Wojchowski DM. Mechanisms of stem cell factor and erythropoietin proliferative co-signaling in FDC2-ER cells. *Blood* 1997;90:3533-3545.
220. Miura O, Miura Y, Nakamura N et al. Induction of tyrosine phosphorylation of Vav and expression of Pim-1 correlates with Jak2-mediated growth signaling from the erythropoietin receptor. *Blood* 1994;84:4135-4141.

221. Lilly M, Le T, Holland P, Hendrickson SL. Sustained expression of the pim-1 kinase is specifically induced in myeloid cells by cytokines whose receptors are structurally related. *Oncogene* 1992;7:727-732.
222. Shirogane T, Fukada T, Muller JM et al. Synergistic roles for Pim-1 and c-Myc in STAT3-mediated cell cycle progression and antiapoptosis. *Immunity*. 1999;11:709-719.
223. Yip-Schneider MT, Horie M, Broxmeyer HE. Transcriptional induction of pim-1 protein kinase gene expression by interferon gamma and posttranscriptional effects on costimulation with steel factor. *Blood* 1995;85:3494-3502.
224. Mally MI, Vogt M, Swift SE, Haas M. Oncogene expression in murine splenic T cells and in murine T-cell neoplasms. *Virology* 1985;144:115-126.
225. Rohwer F, Todd S, McGuire KL. The effect of IL-2 treatment on transcriptional attenuation in proto-oncogenes pim-1 and c-myb in human thymic blast cells. *J Immunol*. 1996;157:643-649.
226. Dautry F, Weil D, Yu J, Dautry-Varsat A. Regulation of pim and myb mRNA accumulation by interleukin 2 and interleukin 3 in murine hematopoietic cell lines. *J Biol.Chem*. 1988;263:17615-17620.
227. Wingett D, Long A, Kelleher D, Magnuson NS. pim-1 proto-oncogene expression in anti-CD3-mediated T cell activation is associated with protein kinase C activation and is independent of Raf-1. *J Immunol*. 1996;156:549-557.
228. Rainio EM, Sandholm J, Koskinen PJ. Cutting edge: Transcriptional activity of NFATc1 is enhanced by the Pim-1 kinase. *J Immunol*. 2002;168:1524-1527.
229. Liang H, Hittelman W, Nagarajan L. Ubiquitous expression and cell cycle regulation of the protein kinase PIM-1. *Arch.Biochem.Biophys*. 1996;330:259-265.

230. Bhattacharya N, Wang Z, Davitt C et al. Pim-1 associates with protein complexes necessary for mitosis. *Chromosoma* 2002;111:80-95.
231. Mochizuki T, Kitanaka C, Noguchi K et al. Pim-1 kinase stimulates c-Myc-mediated death signaling upstream of caspase-3 (CPP32)-like protease activation. *Oncogene* 1997;15:1471-1480.
232. Mochizuki T, Kitanaka C, Noguchi K et al. Physical and functional interactions between Pim-1 kinase and Cdc25A phosphatase. Implications for the Pim-1-mediated activation of the c-Myc signaling pathway. *J Biol.Chem.* 1999;274:18659-18666.
233. Lilly M, Kraft A. Enforced expression of the Mr 33,000 Pim-1 kinase enhances factor-independent survival and inhibits apoptosis in murine myeloid cells. *Cancer Res.* 1997;57:5348-5355.
234. Acton D, Domen J, Jacobs H et al. Collaboration of pim-1 and bcl-2 in lymphomagenesis. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 1992;182:293-298.
235. Lilly M, Sandholm J, Cooper JJ, Koskinen PJ, Kraft A. The PIM-1 serine kinase prolongs survival and inhibits apoptosis-related mitochondrial dysfunction in part through a bcl-2-dependent pathway. *Oncogene* 1999;18:4022-4031.
236. Laird PW, van der Lugt NM, Clarke A et al. In vivo analysis of Pim-1 deficiency. *Nucleic Acids Res.* 1993;21:4750-4755.
237. Mucenski ML, Gilbert DJ, Taylor BA, Jenkins NA, Copeland NG. Common sites of viral integration in lymphomas arising in AKXD recombinant inbred mouse strains. *Oncogene Res.* 1987;2:33-48.
238. Matthews EA, Vasmel WL, Schoenmakers HJ, Melief CJ. Retrovirally induced murine B-cell tumors rarely show proviral integration in sites common in T-cell tumors. *Int.J Cancer* 1989;43:1120-1125.
239. Dreyfus F, Sola B, Fichelson S et al. Rearrangements of the Pim-1, c-myc, and p53 genes in Friend helper virus-induced mouse erythroleukemias. *Leukemia* 1990;4:590-594.

240. van Lohuizen M, Verbeek S, Krimpenfort P et al. Predisposition to lymphomagenesis in pim-1 transgenic mice: cooperation with c-myc and N-myc in murine leukemia virus-induced tumors. *Cell* 1989;56:673-682.
241. van der Houven van Oordt CW, Schouten TG, van Krieken JH et al. X-ray-induced lymphomagenesis in E mu-pim-1 transgenic mice: an investigation of the co-operating molecular events. *Carcinogenesis* 1998;19:847-853.
242. Breuer M, Slebos R, Verbeek S et al. Very high frequency of lymphoma induction by a chemical carcinogen in pim-1 transgenic mice. *Nature* 1989;340:61-63.
243. Breuer M, Wientjens E, Verbeek S, Slebos R, Berns A. Carcinogen-induced lymphomagenesis in pim-1 transgenic mice: dose dependence and involvement of myc and ras. *Cancer Res.* 1991;51:958-963.
244. Selten G, Cuypers HT, Zijlstra M, Melief C, Berns A. Involvement of c-myc in MuLV-induced T cell lymphomas in mice: frequency and mechanisms of activation. *EMBO J* 1984;3:3215-3222.
245. van Lohuizen M, Verbeek S, Scheijen B et al. Identification of cooperating oncogenes in E mu-myc transgenic mice by provirus tagging. *Cell* 1991;65:737-752.
246. Verbeek S, van Lohuizen M, van d, V et al. Mice bearing the E mu-myc and E mu-pim-1 transgenes develop pre-B-cell leukemia prenatally. *Mol.Cell Biol.* 1991;11:1176-1179.
247. Jacob AK, Sreekantaiah C, Baer MR, Sandberg AA. Translocation (1;6)(p12;p23) in ANLL. *Cancer Genet.Cytogenet.* 1990;45:67-71.
248. Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D et al. Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature* 2001;412:822-826.
249. Kim O, Jiang T, Xie Y et al. Synergism of cytoplasmic kinases in IL6-induced ligand-independent activation of androgen receptor in prostate cancer cells. *Oncogene* 2004;23:1838-1844.

250. Valdman A, Fang X, Pang ST, Ekman P, Egevad L. Pim-1 expression in prostatic intraepithelial neoplasia and human prostate cancer. *Prostate* 2004;60:367-371.
251. Ellwood-Yen K, Graeber TG, Wongvipat J et al. Myc-driven murine prostate cancer shares molecular features with human prostate tumors. *Cancer Cell* 2003;4:223-238.
252. Nieborowska-Skorska M, Hoser G, Kossev P, Wasik MA, Skorski T. Complementary functions of the antiapoptotic protein A1 and serine/threonine kinase pim-1 in the BCR/ABL-mediated leukemogenesis. *Blood* 2002;99:4531-4539.
253. Ionov Y, Le X, Tunquist BJ et al. Pim-1 protein kinase is nuclear in Burkitt's lymphoma: nuclear localization is necessary for its biologic effects. *Anticancer Res.* 2003;23:167-178.
254. de Vos S, Krug U, Hofmann WK et al. Cell cycle alterations in the blastoid variant of mantle cell lymphoma (MCL-BV) as detected by gene expression profiling of mantle cell lymphoma (MCL) and MCL-BV. *Diagn.Mol.Pathol.* 2003;12:35-43.
255. Zhu Y, Hollmen J, Raty R et al. Investigatory and analytical approaches to differential gene expression profiling in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* 2002;119:905-915.
256. Montesinos-Rongen M, Van Roost D, Schaller C, Wiestler OD, Deckert M. Primary diffuse large B-cell lymphomas of the central nervous system are targeted by aberrant somatic hypermutation. *Blood* 2004;103:1869-1875.
257. Moroy T, Grzeschiczek A, Petzold S, Hartmann KU. Expression of a Pim-1 transgene accelerates lymphoproliferation and inhibits apoptosis in lpr/lpr mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1993;90:10734-10738.
258. Jonkers J, Korswagen HC, Acton D, Breuer M, Berns A. Activation of a novel proto-oncogene, Frat1, contributes to progression of mouse T-cell lymphomas. *EMBO J* 1997;16:441-450.

259. Feldman BJ, Reid TR, Cleary ML. Pim1 cooperates with E2a-Pbx1 to facilitate the progression of thymic lymphomas in transgenic mice. *Oncogene* 1997;15:2735-2742.
260. Habets GG, Scholtes EH, Zuydgeest D et al. Identification of an invasion-inducing gene, Tiam-1, that encodes a protein with homology to GDP-GTP exchangers for Rho-like proteins. *Cell* 1994;77:537-549.
261. Blyth K, Terry A, Mackay N et al. Runx2: a novel oncogenic effector revealed by in vivo complementation and retroviral tagging. *Oncogene* 2001;20:295-302.
262. Levenson JD, Koskinen PJ, Orrico FC et al. Pim-1 kinase and p100 cooperate to enhance c-Myb activity. *Mol.Cell* 1998;2:417-425.
263. Mikkers H, Allen J, Knipscheer P et al. High-throughput retroviral tagging to identify components of specific signaling pathways in cancer. *Nat.Genet.* 2002;32:153-159.
264. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.* 1987;162:156-159.
265. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: CSH (Cold Spring Harbor Laboratory Press); 1989.
266. Khorana HG. Total synthesis of transfer RNA genes. *Symp.Soc.Dev.Biol.* 1974;30:193-194.
267. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987;155:335-350.
268. Saiki RK, Scharf S, Faloona F et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230:1350-1354.
269. Rychlik W. Selection of primers for polymerase chain reaction. *Mol.Biotechnol.* 1995;3:129-134.

270. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N.Y.)* 1992;10:413-417.
271. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N.Y.)* 1993;11:1026-1030.
272. Lee LG, Connell CR, Bloch W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* 1993;21:3761-3766.
273. Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* 1995;4:357-362.
274. ABI Prism 7700 Sequence Detection System. User bulletin 2. 2001. <http://docs.appliedbiosystems.com/pebiiodocs/04303859.pdf>
275. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29:e45.
276. Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci.Lett.* 2003;339:62-66.
277. Muller PY, Janovjak H, Miserez AR, Dobbie Z. Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *Biotechniques* 2002;32:1372-1379.
278. Penix LA, Sweetser MT, Weaver WM et al. The Proximal Regulatory Element of the Interferon-gamma Promoter Mediates Selective Expression in T Cells. *J.Biol.Chem.* 1996;271:31964-31972.
279. Zhu C, Rao K, Xiong H et al. Activation of the Murine Interleukin-12 p40 Promoter by Functional Interactions between NFAT and ICSBP. *J.Biol.Chem.* 2003;278:39372-39382.
280. Gri G, Savio D, Trinchieri G, Ma X. Synergistic Regulation of the Human Interleukin-12 p40 Promoter by NFkappa B and Ets Transcription Factors in

- Epstein-Barr Virus-transformed B Cells and Macrophages. *J.Biol.Chem.* 1998;273:6431-6438.
281. Sica A, Dorman L, Viggiano V et al. Interaction of NF-kappa B and NFAT with the Interferon-gamma Promoter. *J.Biol.Chem.* 1997;272:30412-30420.
282. Airoidi I, Gri G, Marshall JD et al. Expression and function of IL-12 and IL-18 receptors on human tonsillar B cells. *J Immunol* 2000;165:6880-6888.
283. D'Andrea A, Rengaraju M, Valiante NM et al. Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *J Exp.Med.* 1992;176:1387-1398.
284. Airoidi I, Guglielmino R, Carra G et al. The interleukin-12 and interleukin-12 receptor system in normal and transformed human B lymphocytes. *Haematologica* 2002;87:434-442.
285. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu.Rev.Immunol.* 1997;15:749-795.
286. Grau GE, Heremans H, Piguet PF et al. Monoclonal antibody against interferon gamma can prevent experimental cerebral malaria and its associated overproduction of tumor necrosis factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1989;86:5572-5574.
287. Das G, Sheridan S, Janeway CA, Jr. The Source of Early IFN- γ That Plays a Role in Th1 Priming. *J Immunol* 2001;167:2004-2010.
288. Becker C, Wirtz S, Ma X et al. Regulation of IL-12 p40 promoter activity in primary human monocytes: roles of NF-kappaB, CCAAT/enhancer-binding protein beta, and PU.1 and identification of a novel repressor element (GA-12) that responds to IL-4 and prostaglandin E(2). *J Immunol* 2001;167:2608-2618.
289. Tsatsanis C, Spandidos DA. The role of oncogenic kinases in human cancer (Review). *Int J Mol Med* 2000;5:583-590.
290. Toussiroot E, Lafforgue P, Harle JR et al. Pseudo Felty's syndrome. A polyclonal disease with a favorable prognosis. Report of two cases with Southern blot analysis of TCR. *Clin.Exp.Rheumatol.* 1993;11:591-595.

291. Lamy T, Loughran TP, Jr. Current concepts: large granular lymphocyte leukemia. *Blood Rev.* 1999;13:230-240.
292. Shvidel L, Duksin C, Tzimanis A et al. Cytokine release by activated T-cells in large granular lymphocytic leukemia associated with autoimmune disorders. *Hematol.J.* 2002;3:32-37.
293. Loughran TP, Jr., Hadlock KG, Perzova R et al. Epitope mapping of HTLV envelope seroreactivity in LGL leukaemia. *Br.J.Haematol.* 1998;101:318-324.
294. Loughran TP, Jr., Hadlock KG, Yang Q et al. Seroreactivity to an envelope protein of human T-cell leukemia/lymphoma virus in patients with CD3-(natural killer) lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *Blood* 1997;90:1977-1981.
295. Kawa-Ha K, Ishihara S, Ninomiya T et al. CD3-negative lymphoproliferative disease of granular lymphocytes containing Epstein-Barr viral DNA. *J Clin Invest* 1989;84:51-55.
296. Gentile TC, Loughran TP, Jr. Interleukin-12 is a costimulatory cytokine for leukemic CD3+ large granular lymphocytes. *Cell Immunol.* 1995;166:158-161.
297. Zambello R, Trentin L, Cassatella MA et al. IL-12 is involved in the activation of CD3+ granular lymphocytes in patients with lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *Br.J Haematol* 1996;92:308-314.
298. Epling-Burnette PK, Liu JH, Catlett-Falcone R et al. Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression. *J.Clin.Invest* 2001;107:351-362.
299. Greer JP, Kinney MC, Loughran TP, Jr. T cell and NK cell lymphoproliferative disorders. *Hematology.(Am.Soc.Hematol.Educ.Program.)* 2001259-281.
300. Kay NE, Hamblin TJ, Jelinek DF et al. Chronic lymphocytic leukemia. *Hematology (Am.Soc.Hematol.Educ.Program.)* 2002193-213.

301. Tsimberidou AM, Keating MJ. Richter syndrome: biology, incidence, and therapeutic strategies. *Cancer* 2005;103:216-228.
302. Kalachikov S, Migliazza A, Cayanis E et al. Cloning and gene mapping of the chromosome 13q14 region deleted in chronic lymphocytic leukemia. *Genomics* 1997;42:369-377.
303. Kay NE, Pittner BT. IL-4 biology: impact on normal and leukemic CLL B cells. *Leuk.Lymphoma* 2003;44:897-903.
304. Ferrajoli A, Keating MJ, Manshouri T et al. The clinical significance of tumor necrosis factor-alpha plasma level in patients having chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;100:1215-1219.
305. guilar-Santelises M, Gigliotti D, Osorio LM et al. Cytokine expression in B-CLL in relation to disease progression and in vitro activation. *Med.Oncol* 1999;16:289-295.
306. Schuhknecht S, Duensing S, Dallmann I et al. Interleukin-12 inhibits apoptosis in chronic lymphatic leukemia (CLL) B cells. *Cancer Biother.Radiopharm.* 2002;17:495-499.
307. Parfienczyk A, Kiersnowska-Rogowska B, Rogowski F. [Interleukin-6 and interleukin-12 blood levels in patients with chronic B-cell lymphocytic leukemia]. *Pol.Merkuriusz.Lek.* 2004;16:157-161.
308. Zaninoni A, Imperiali FG, Pasquini C, Zanella A, Barcellini W. Cytokine modulation of nuclear factor-kappaB activity in B-chronic lymphocytic leukemia. *Exp.Hematol.* 2003;31:185-190.
309. Williams JF, Petrus MJ, Wright JA et al. fas-mediated lysis of chronic lymphocytic leukaemia cells: role of type I versus type II cytokines and autologous fasL-expressing T cells. *Br.J Haematol* 1999;107:99-105.
310. Cuni S, Perez-Aciego P, Perez-Chacon G et al. A sustained activation of PI3K/NF-kappaB pathway is critical for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia* 2004;18:1391-1400.

311. Furman RR, Asgary Z, Mascarenhas JO, Liou HC, Schattner EJ. Modulation of NF-kappa B activity and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Immunol.* 2000;164:2200-2206.
312. Tracey L, Perez-Rosado A, Artiga MJ et al. Expression of the NF-kappaB targets BCL2 and BIRC5/Survivin characterizes small B-cell and aggressive B-cell lymphomas, respectively. *J Pathol.* 2005;206:123-134.
313. Viatour P, tires-Alj M, Chariot A et al. NF- kappa B2/p100 induces Bcl-2 expression. *Leukemia* 2003;17:1349-1356.
314. Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadtmauer E, Reed JC. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1993;82:1820-1828.
315. Ringshausen I, Dechow T, Schneller F et al. Constitutive activation of the MAPkinase p38 is critical for MMP-9 production and survival of B-CLL cells on bone marrow stromal cells. *Leukemia* 2004;18:1964-1970.
316. Chen L, Widhopf G, Huynh L et al. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;100:4609-4614.
317. Lovec H, Grzeschiczek A, Kowalski MB, Moroy T. Cyclin D1/bcl-1 cooperates with myc genes in the generation of B-cell lymphoma in transgenic mice. *EMBO J* 1994;13:3487-3495.
318. Rosenwald A, Wright G, Wiestner A et al. The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. *Cancer Cell* 2003;3:185-197.
319. Lai R, Medeiros LJ, Coupland R, McCourty A, Brynes RK. Immunohistochemical detection of E2F-1 in non-Hodgkin's lymphomas: a survey of 124 cases. *Mod.Pathol.* 1998;11:457-463.
320. Rummel MJ, de VS, Hoelzer D, Koeffler HP, Hofmann WK. Altered apoptosis pathways in mantle cell lymphoma. *Leuk.Lymphoma* 2004;45:49-54.

321. Pham LV, Tamayo AT, Yoshimura LC, Lo P, Ford RJ. Inhibition of constitutive NF-kappa B activation in mantle cell lymphoma B cells leads to induction of cell cycle arrest and apoptosis. *J Immunol.* 2003;171:88-95.
322. Ek S, Hogerkorp CM, Dictor M, Ehinger M, Borrebaeck CA. Mantle cell lymphomas express a distinct genetic signature affecting lymphocyte trafficking and growth regulation as compared with subpopulations of normal human B cells. *Cancer Res.* 2002;62:4398-4405.
323. Martinez N, Camacho FI, Algara P et al. The molecular signature of mantle cell lymphoma reveals multiple signals favoring cell survival. *Cancer Res.* 2003;63:8226-8232.
324. Goy A, Younes A, McLaughlin P et al. Phase II study of proteasome inhibitor bortezomib in relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2005;23:667-675.
325. Lai R, Rassidakis GZ, Medeiros LJ et al. Expression of STAT3 and its phosphorylated forms in mantle cell lymphoma cell lines and tumours. *J Pathol.* 2003;199:84-89.
326. Visser HP, Tewis M, Willemze R, Kluin-Nelemans JC. Mantle cell lymphoma proliferates upon IL-10 in the CD40 system. *Leukemia* 2000;14:1483-1489.
327. Fu L, Lin-Lee YC, Pham LV et al. Constitutive NF- κ B and NFAT Activation Leads to Stimulation of The BLyS Survival Pathway in Aggressive B Cell Lymphomas. *Blood* 20062005-2010.
328. Andersen NS, Larsen JK, Christiansen J et al. Soluble CD40 ligand induces selective proliferation of lymphoma cells in primary mantle cell lymphoma cell cultures. *Blood* 2000;96:2219-2225.
329. Oscier D, Owen R, Johnson S. Splenic marginal zone lymphoma. *Blood Rev.* 2005;19:39-51.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ