



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ**

**«ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΔΙΚΤΥΩΝ ΡΥΘΜΙΣΗΣ
ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΥΚΛΟ
ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΣΤΑ ΔΙΑΧΥΤΑ ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ
ΑΠΟ ΜΕΓΑΛΑ Β-ΚΥΤΤΑΡΑ»**

**ΠΑΠΟΥΔΟΥ-ΜΠΑΗ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ
ΙΑΤΡΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2014

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»

Ημερομηνία αίτησης της κ. Παπούδου-Μπάη Αλεξάνδρας: 22-2-2008

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 635/15-4-2008

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Μαλάμου – Μήτση Βασιλική Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας

Μέλη

Καναβάρος Παναγιώτης Καθηγητής Ανατομίας που καλύπτει και την Ιστολογία-Εμβρυολογία

Μπατιστάτου Άννα Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 23-4-2008

«Μελέτη πρωτεϊνών δικτύων ρύθμισης τα οποία εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο και στην απόπτωση στα διάχυτα Β-λεμφώματα από μεγάλα κύτταρα».

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 763^α/10-4-2014

1. Καναβάρος Παναγιώτης Καθηγητής Ανατομίας που καλύπτει και την Ιστολογία-Εμβρυολογία του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Μαλάμου-Μήτση Βασιλική Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Μπατιστάτου Άννα Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Μπριασούλης Ευάγγελος Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
5. Στεφάνου Δημήτριος Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Γούσια Άννα Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Καψάλη Ελένη Επίκουρη Καθηγήτρια Αιματολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 28-5-2014

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Φωτόπουλος Ανδρέας

Καθηγητής Πυρηνικής Ιατρικής

Η Γραμματέας του Τμήματος

ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ ΜΑΡΙΑ



Για την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής χορηγήθηκε υποτροφία από το **Εμπειρικό Ίδρυμα**.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και η ολοκλήρωσή της θα ήταν αδύνατη χωρίς της καθοριστική συμβολή σημαντικών επιστημόνων και συνεργατών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά, την Επιβλέπουσα Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής και Διευθύντρια του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής κα. Μαλάμου-Μήτση Βασιλική, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, τις εποικοδομητικές της συμβουλές, τη στήριξη και συμπαράστασή της καθ' όλη τη διάρκεια αυτής της διατριβής.

Επιπλέον, εκφράζω την ευγνωμοσύνη μου στον Καθηγητή Ιστολογίας-Ανατομίας-Εμβρυολογίας κ. Καναβάρο Παναγιώτη, που αποτελεί έναν από τους μέντορές μου στην Αιμοπαθολογοανατομία και δεν έχει πάψει ούτε στιγμή να με διδάσκει και να με κατευθύνει στον τομέα αυτό. Η βοήθεια του είναι ιδιαίτερα πολύτιμη και καθοριστική για μένα. Επίσης, ευχαριστώ θερμά την Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής κα. Μπατιστάτου Άννα, η οποία με την αστείρευτη ενέργειά της σε καθημερινό επίπεδο μου μεταδίδει, μεταξύ άλλων, το πάθος της για την διαγνωστική και ερευνητική Παθολογική Ανατομική.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες απευθύνω στον Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής κ. Στεφάνου Δημήτριο για τη στήριξη αυτής όπως και κάθε άλλης προσπάθειάς μου και στην Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής κα. Γούσια Άννα, η οποία με την επιστημονική της γνώση, τη σχολαστικότητα και την εις βάθος ενασχόλησή της με ότι και αν καταπιαστεί, με καθοδηγεί καθημερινά.

Τις ευχαριστίες μου θα ήθελα να εκφράσω και προς τα υπόλοιπα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, τον Καθηγητή Ογκολογίας και Διευθυντή της Αιματολογικής Κλινικής κ. Μπριασούλη Ευάγγελο και την Επίκουρη Καθηγήτρια της Αιματολογικής Κλινικής κα. Καψάλη Ελένη, που με τίμησαν με τη συμμετοχή και τη συμβολή τους στη διαδικασία βελτίωσης της παρούσας διατριβής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την τεχνολόγο κα. Χριστοδούλου Αντιγόνη για την άρτια τεχνική υποστήριξη που μου παρείχε και το προσωπικό του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής, με το οποίο συνεργάστηκα άριστα.

ΑΦΙΕΡΩΝΕΤΑΙ

στη μητέρα μου,
το φύλακα άγγελο μου

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τα διάχυτα λεμφώματα από μεγάλα Β-κύτταρα (Diffuse Large B-cell Lymphoma, DLBCL) είναι τα πλέον συχνά λεμφώματα στον Δυτικό κόσμο και αντιστοιχούν στο 25-30% των λεμφωμάτων των ενηλίκων. Παρουσιάζουν σημαντική ετερογένεια όσον αφορά τα κλινικά, ιστοπαθολογικά και βιολογικά χαρακτηριστικά και περιλαμβάνουν συγκεκριμένες κλινικοπαθολογοανατομικές οντότητες. Ωστόσο, η πλειονότητα των περιπτώσεων στερείται ιδιαίτερων χαρακτηριστικών και ταξινομείται ως διάχυτα λεμφώματα από μεγάλα Β-κύτταρα μη περαιτέρω προσδιοριζόμενα (DLBCL,NOS). Αναλύσεις cDNA μικροσυστοιχιών (microarrays) έδειξαν ότι υπάρχουν δύο διακριτοί ανοσοφαινοτυπικοί/ιστογενετικοί υπότυποι DLBCL, τα προερχόμενα από Β-λεμφοκύτταρα του βλαστικού κέντρου (Germinal Center B-Cell Like, GCB-DLBCL) και τα προερχόμενα από ενεργοποιημένα Β-λεμφοκύτταρα (Activated B-Cell Like, ABC-DLBCL). Περαιτέρω μελέτες πιστοποίησαν τους δύο αυτούς υπότυπους και περιέγραψαν έναν επιπλέον ανοσοφαινοτυπικό/ιστογενετικό υπότυπο, τα τύπου 3 DLBCL. Τα GCB-DLBCL χαρακτηρίζονται από την έκφραση γονιδίων του Β-κυττάρου του βλαστικού κέντρου του φυσιολογικού λεμφικού ιστού (όπως CD10, bcl-6, CD38), τα ABC-DLBCL χαρακτηρίζονται από την έκφραση γονιδίων που εκφράζονται κατά την *in vitro* ενεργοποίηση των φυσιολογικών Β-κυττάρων του περιφερικού αίματος (όπως MUM1/IRF4, FLIP, NFκB), ενώ τα τύπου 3 DLBCL δεν εκφράζουν γονίδια των δύο προηγούμενων τύπων. Η διάκριση των DLBCL σε ιστογενετικούς υπότυπους έχει ιδιαίτερη κλινική σημασία εφόσον ο υπότυπος του GCB-DLBCL χαρακτηρίζεται από σαφώς καλύτερη πρόγνωση (59%, 5ετής επιβίωση) από ότι ο υπότυπος του ABC-DLBCL (30%, 5ετής επιβίωση). Μεταγενέστερες ανοσοφαινοτυπικές μελέτες έδειξαν πως το ανοσοφαινοτυπικό προφίλ bcl-6/CD10/MUM1/CD138 μπορεί να καθορίσει τον ιστογενετικό υπότυπο των DLBCL.

Ιδιαίτερα σημαντικές για την παθογένεση των λεμφωμάτων, όπως και των DLBCL είναι οι διαταραχές των δικτύων ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι οι ιστογενετικοί τύποι των DLBCL διαφέρουν ως προς τις παθογενετικές διαδικασίες που αφορούν στα δίκτυα ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης.

Διάφορες οδοί σηματοδότησης (όπως, NF-κB, Φωσφατιδιλ-ινοσιτίδη (PI3)-κινάση/AKT, Janus kinase (Jak)/STAT, MAP-κινάσες/JNK, MAP-κινάσες/ERK κτλ) οι

οποίες ρυθμίζουν κυτταρικά φαινόμενα, συμπεριλαμβανομένων του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης, είναι ενεργοποιημένες στα DLBCL. Πιο αναλυτικά, έχει αναφερθεί ότι στην παθογένεση των DLBCL και ιδιαίτερα των ABC-DLBCL εμπλέκεται η ενεργοποίηση της οδού σηματοδότησης NF-κB, η οποία επάγει την έκφραση γονιδίων με αντι-αποπτωτική δράση όπως, cFLIP, bcl-2, bcl-xl, TRAF1 και TRAF2. Η ενεργοποίηση της οδού σηματοδότησης PI3-κινάσης/AKT μεταβάλλει την δράση πρωτεϊνών, όπως της κασπάσης 9, ορισμένων πρωτεϊνών της οικογένειας bcl-2, του NF-κB, καθώς και άλλων μεταγραφικών παραγόντων που επάγουν ή αναστέλλουν την απόπτωση. Τα αποτελέσματα πρόσφατης μελέτης έδειξαν ότι η οδός σηματοδότησης PI3-κινάσης/AKT είναι ιδιοσυστασιακά ενεργοποιημένη σε κυτταρικές σειρές DLBCL και αναστολή της PI3-κινάσης οδηγεί τα κύτταρα σε απόπτωση μέσω απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια. Ανώμαλη ενεργοποίηση της πρωτεΐνης STAT3, η οποία επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων, έχει περιγραφεί πρόσφατα σε DLBCL και ιδιαίτερα σε ABC-DLBCL. Από δεδομένα εργασιών διαφαίνεται η συμβολή των AP-1 πρωτεϊνών, και ιδιαίτερα των πρωτεϊνών της οικογένειας Jun, στην παθογένεση CD30-θετικών λεμφοϋπερπλαστικών αλλοιώσεων, συμπεριλαμβανομένων των CD30-θετικών DLBCL.

Ολοκληρωμένη συνδυαστική μελέτη των ανωτέρω οδών σηματοδότησης σε DLBCL και μελέτη που να απαντά στο ερώτημα αν οι ιστογενετικοί/ανοσοφαινοτυπικοί υπότυποι των DLBCL διαφέρουν ως προς τους παθογενετικούς μηχανισμούς που αφορούν σε ενεργοποίηση των οδών σηματοδότησης που εμπλέκονται στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης δεν έχει πραγματοποιηθεί. Επιπλέον, δεν υπάρχει μελέτη στην διεθνή βιβλιογραφία, από όσο γνωρίζουμε, που να αναλύει τη σχέση των πρωτεϊνών της οικογένειας Jun με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση σε DLBCL. Η παρούσα μελέτη έχει ως στόχο να συνεισφέρει στον καθορισμό παθογενετικών μηχανισμών των DLBCL διερευνώντας μέσω ανοσοϊστοχημικών τεχνικών την ενεργοποίηση και τις διαταραχές οδών σηματοδότησης που εμπλέκονται στα δίκτυα ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
1.1	ΔΙΑΧΥΤΟ ΛΕΜΦΩΜΑ ΑΠΟ ΜΕΓΑΛΑ Β-ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΗ ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΖΟΜΕΝΟ (DIFFUSE LARGE B-CELL LYMPHOMA, NON OTHERWISE SPECIFIED, NOS)	11
1.1.1	<i>Ορισμός.....</i>	<i>11</i>
1.1.2	<i>Επιδημιολογία, θέσεις ανάπτυξης και κλινικά χαρακτηριστικά.....</i>	<i>13</i>
1.1.3	<i>Αιτιολογία.....</i>	<i>13</i>
1.1.4	<i>Μορφολογία.....</i>	<i>13</i>
1.1.5	<i>Ανοσοφαινότυπος και γονιδιακή έκφραση.....</i>	<i>14</i>
1.1.6	<i>Γονίδια Β-κυτταρικού υποδοχέα.....</i>	<i>15</i>
1.1.7	<i>Κυτταρογενετικές ανωμαλίες και ογκογονίδια.....</i>	<i>15</i>
1.1.8	<i>Φυσιολογικό αντίστοιχο κύτταρο προέλευσης.....</i>	<i>16</i>
1.1.9	<i>Πρόγνωση.....</i>	<i>16</i>
1.2	ΙΣΤΟΓΕΝΕΣΗ ΤΩΝ DLBCL ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ Β-ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ	16
1.3	ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ.....	19
1.4	Β-ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΣΤΑ DLBCL	23
1.5	ΟΙ ΚΥΡΙΕΣ ΟΔΟΙ ΜΕΤΑΓΩΓΗΣ ΣΗΜΑΤΟΣ (NF-κB, PI-3K, JAK/STAT, MAP-ΚΙΝΑΣΕΣ), ΟΙ ΟΠΟΙΕΣ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΣΤΑ ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ.....	26
1.6	ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ STAT.....	28
1.7	ΔΕΙΚΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ CD30	30
1.8	MAP-ΚΙΝΑΣΕΣ	30
1.9	ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΤΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ-1 [ACTIVATOR PROTEIN-1 (AP-1) TRANSCRIPTION FACTOR].....	32
1.10	ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ JUN (CELLULAR-JUN).....	33
1.11	ΠΡΩΤΕΪΝΗ JUNB.....	35
1.12	ΠΡΩΤΕΪΝΗ JUND	37

1.13	ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ JUN ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ.....	37
1.14	ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ JUN ΣΤΗΝ Β-ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ.....	41
1.15	ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ.....	42
1.15.1	<i>Βασικές έννοιες επιγενετικών τροποποιήσεων.....</i>	43
1.15.2	<i>Μεθυλίωση του DNA.....</i>	44
1.15.3	<i>Κώδικας των ιστονών.....</i>	45
1.16	ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ JUN ΣΕ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ.....	46
2	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	47
3	ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	49
3.1	ΥΛΙΚΟ.....	49
3.2	ΜΕΘΟΔΟΙ.....	49
3.2.1	<i>Ανοσοϊστοχημεία.....</i>	49
3.2.2	<i>Περιγραφή της μεθόδου στρεπταβιδίνης-αβιδίνης-βιοτίνης (LSAB) με τη χρήση αυτοποιημένου μηχανήματος.....</i>	51
3.2.3	<i>Αξιολόγηση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων.....</i>	52
3.3	ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ JUNB.....	53
3.4	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	53
4	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	55
4.1	ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ JUN (PH-C-JUN, JUNB ΚΑΙ JUND) ΚΑΙ ΤΗΣ PH-STAT3 ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΥΣ ΛΕΜΦΙΚΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ.....	55
4.2	ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ JUN (PH-C-JUN, JUNB ΚΑΙ JUND) ΚΑΙ ΤΟΥ ΔΕΙΚΤΗ CD30 ΣΕ ΔΙΑΧΥΤΑ ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ ΑΠΟ ΜΕΓΑΛΑ Β-ΚΥΤΤΑΡΑ.....	56
4.3	ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΔΕΙΚΤΩΝ Β-ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ (CD10, BCL-6, MUM-1/IRF4).....	59
4.4	ΙΣΤΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ/ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΟΙ ΥΠΟΤΥΠΟΙ ΤΩΝ ΔΙΑΧΥΤΩΝ ΛΕΜΦΩΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΜΕΓΑΛΑ Β-ΚΥΤΤΑΡΑ (GC ΚΑΙ NON-GC).....	59
4.5	ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ.....	60

4.6	ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ JUN (RH-C-JUN, JUNB, JUND), ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ RH-STAT3, ΤΟΥ ΔΕΙΚΤΗ CD30 ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ (KI-67 ΚΑΙ ΚΥΚΛΙΝΕΣ A, B1, D2, D3 ΚΑΙ E).....	61
4.7	ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ JUN (RH-C-JUN, JUNB, JUND), ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ RH-STAT3 ΚΑΙ ΤΟΥ ΔΕΙΚΤΗ CD30 ΜΕ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ Β-ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ (CD10, BCL-6, MUM-1/IRF-4) ΚΑΙ ΤΟΥΣ ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΟΥΣ ΥΠΟΤΥΠΟΥΣ (GC ΚΑΙ NON-GC) ΤΩΝ ΔΙΑΧΥΤΩΝ ΛΕΜΦΩΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΜΕΓΑΛΑ Β-ΚΥΤΤΑΡΑ	61
4.8	ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ RH-C-JUN, JUNB ΚΑΙ JUND ΚΑΙ ΤΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ/ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΟΠΩΣ ΚΑΘΟΡΙΖΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ Κ-ΜΕΣΩΝ ΤΙΜΩΝ ΣΥΣΤΑΔΕΩΝ (K-MEANS CLUSTERING).....	64
4.9	ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ RH-C-JUN, JUNB, JUND Η RH-STAT3 ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΠΟΥ ΡΥΘΜΙΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ.....	67
4.10	ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ JUNB.....	67
5	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	69
6	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	77
7	ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	79
8	ABSTRACT.....	81
9	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	83

ΛΙΣΤΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

ΕΙΚΟΝΑ 1: ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΣ ΤΟΥ HANS ET. AL.	19
ΕΙΚΟΝΑ 2: Ο ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ.....	20
ΕΙΚΟΝΑ 3: ΟΙ ΚΥΡΙΕΣ ΟΔΟΙ ΜΕΤΑΓΩΓΗΣ ΣΗΜΑΤΟΣ.....	27
ΕΙΚΟΝΑ 4: ΤΟ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ JAK-STAT.....	29
ΕΙΚΟΝΑ 5: ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΣΗΜΑΤΟΣ ΜΕΣΩ ΤΟΥ «ΚΑΤΑΡΡΑΚΤΗ» ΤΩΝ ΜΑΡΚ ΚΙΝΑΣΩΝ ΠΟΥ ΟΔΗΓΕΙ ΣΕ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ C-JUN. ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑ ΣΗΜΑΤΑ ΜΕΤΑΒΙΒΑΖΟΝΤΑΙ ΜΕΣΩ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΜΑΡΚΚΚΣ ΠΡΟΚΑΛΩΝΤΑΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΚΑΙ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΜΑΡΚΚΣ. ΟΙ ΜΑΡΚΚΣ ΜΕ ΤΗ ΣΕΙΡΑ ΤΟΥΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΝΟΥΝ ΚΑΙ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΟΥΝ ΜΑΡΚΣ ΚΑΙ ΑΥΤΕΣ ΜΕ ΤΗ ΣΕΙΡΑ ΤΟΥΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΝΟΥΝ ΚΑΙ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΟΥΝ ΤΗΝ C-JUN.	31
ΕΙΚΟΝΑ 6: Η ΔΡΑΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ AP-1 ΣΤΗΝ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ.....	41
ΕΙΚΟΝΑ 7: Η ΑΛΛΑΓΗ ΣΤΗ ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ (ΑΠΟ ΕΤΕΡΟΧΡΩΜΑΤΙΝΗ ΣΕ ΕΥΧΡΩΜΑΤΙΝΗ) ΑΠΟΤΕΛΕΙ ΠΡΟΫΠΟΘΕΣΗ ΓΙΑ ΝΑ ΕΠΙΤΡΑΠΕΙ ΣΕ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ, ΑΛΛΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ RNA ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ ΝΑ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΟΥΝ ΜΕ ΤΟΝ ΕΚΚΙΝΗΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΝΑ ΞΕΚΙΝΗΣΕΙ Η ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ.....	44
ΕΙΚΟΝΑ 8: ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ JUNB (Α) ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟ ΛΕΜΦΑΔΕΝΑ ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ JUNB (Β), JUND (Γ) ΚΑΙ PH-STAT3 (Δ) ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ ΘΥΜΟ ΑΔΕΝΑ (DABX200).	55
ΕΙΚΟΝΑ 9: ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ PH-C-JUN (Α), JUNB (Β), JUND (Γ) ΚΑΙ PH-STAT3 (Δ) ΣΕ DLBCL (DABX400).	57
ΕΙΚΟΝΑ 10: ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ Β-ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ CD10 (Α), BCL-6 (Β) ΚΑΙ MUM-1/IRF4 (Γ) ΣΕ DLBCL (DABX400).	59
ΕΙΚΟΝΑ 11: ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΚΥΚΛΙΝΩΝ A (Α), B1 (Β), D2 (Γ), D3 (Δ), E (Ε) ΚΑΙ ΤΟΥ ΔΕΙΚΤΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ Ki-67 (ΣΤ) ΣΕ DLBCL (DABX400).	60
ΕΙΚΟΝΑ 12: ΙΣΤΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ PH-C-JUN, JUNB ΚΑΙ JUND ΣΤΟΥΣ ΔΥΟ ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΟΥΣ/ΙΣΤΟΓΕΝΕΤΙΚΟΥΣ ΥΠΟΤΥΠΟΥΣ ΤΩΝ DLBCL. ΣΤΑ ΙΣΤΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΕΚΦΡΑΖΕΤΑΙ Η ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΘΕΤΙΚΩΝ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΩΝ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΑ	

ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ RH-C-JUN, JUNB ΚΑΙ JUND ΣΤΟΥΣ ΔΥΟ ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΟΥΣ/ΙΣΤΟΓΕΝΕΤΙΚΟΥΣ ΥΠΟΤΥΠΟΥΣ ΤΩΝ DLBCL (ΟΜΑΔΑ 1: GCB ΚΑΙ ΟΜΑΔΑ 2: NON GCB] (ΘΕΤΙΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ JUNB / NON-GC; $p=0.006$) 62

ΕΙΚΟΝΑ 13: ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ ΠΛΑΙΣΙΟΥ ΑΠΟΛΗΞΕΩΝ. ΣΤΟΥΣ ΚΑΘΕΤΟΥΣ ΑΞΟΝΕΣ ΕΜΦΑΝΙΖΟΝΤΑΙ ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ RH-C-JUN, JUNB ΚΑΙ JUND (ΠΟΣΟΣΤΟ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ) ΚΑΙ ΣΤΟΥΣ ΟΡΙΖΟΝΤΙΟΥΣ ΟΙ ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΟΙ/ΙΣΤΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΥΠΟΤΥΠΟΙ ΤΩΝ DLBCL (ΟΜΑΔΑ 1: GCB ΚΑΙ ΟΜΑΔΑ 2: NON GCB), (ΘΕΤΙΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ JUN B / NON GCB ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ, $p=0.006$)..... 64

ΕΙΚΟΝΑ 14: ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΕΙΔΙΚΗΣ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ (MSP) ΓΙΑ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ JUNB. ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ 2% ΧΡΩΣΜΕΝΗ ΜΕ ΒΡΩΜΙΟΥΧΟ ΑΙΘΙΔΙΟ ΜΕΤΑ ΑΠΟ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΘΥΛΙΩΜΕΝΩΝ (M) Η ΜΗ ΜΕΘΥΛΙΩΜΕΝΩΝ (U) CpG ΝΗΣΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ JUNB ΣΕ DNA ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΠΟ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΙΣ DLBCL ΜΕ ΧΑΜΗΛΗ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ JUNB. "BLK": ΚΕΝΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΧΩΡΙΣ ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA (ΑΡΝΗΤΙΚΟΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ); "CNTR METH": ΘΕΤΙΚΟΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΚΑΘΟΛΙΚΑ ΜΕΘΥΛΙΩΜΕΝΟΥ DNA, ΘΕΤΙΚΟΣ ΟΠΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΤΑΝ ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΤΟ M. ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ 1-7 ΗΤΑΝ ΘΕΤΙΚΑ ΓΙΑ M ΚΑΙ U, ΕΝΩ ΤΟ ΔΕΙΓΜΑ 8 ΗΤΑΝ ΘΕΤΙΚΟ ΜΟΝΟ ΓΙΑ U. 67

ΛΙΣΤΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: ΔΙΑΧΥΤΟ ΛΕΜΦΩΜΑ ΑΠΟ ΜΕΓΑΛΑ Β-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ.....	12
ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Η ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ JUN ΣΕ ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ.....	39
ΠΙΝΑΚΑΣ 3: ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ.	50
ΠΙΝΑΚΑΣ 4: ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	54
ΠΙΝΑΚΑΣ 5: ΚΥΡΙΑ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΤΟΥ ΕΠΙΠΕΔΟΥ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ JUN, ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ PH-STAT3, ΤΟΥ ΔΕΙΚΤΗ CD30, ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΩΝ ΜΕ ΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΥΚΛΟ ΚΑΙ ΔΕΙΚΤΩΝ Β-ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΕ DLBCL.	58
ΠΙΝΑΚΑΣ 6: ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ Κι-67, ΚΥΚΛΙΝΗ Α, ΚΥΚΛΙΝΗ Β1, ΚΥΚΛΙΝΗ D2, ΚΥΚΛΙΝΗ D3 ΚΑΙ ΚΥΚΛΙΝΗ Ε ΣΤΗΝ ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΕΞΕΤΑΣΘΕΝΤΩΝ DLBCL ΣΕ ΣΥΣΤΑΔΕΣ ΥΨΗΛΟΥ ΚΑΙ ΧΑΜΗΛΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ (ANOVA TEST).	65
ΠΙΝΑΚΑΣ 7: ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΤΩΝ ΜΕΣΩΝ ΤΙΜΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΔΥΟ ΣΥΣΤΑΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΤΩΝ DLBCL (T-TEST).	66

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΔΙΑΧΥΤΟ ΛΕΜΦΩΜΑ ΑΠΟ ΜΕΓΑΛΑ Β-ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΗ ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΖΟΜΕΝΟ (Diffuse Large B-Cell Lymphoma, Non Otherwise Specified, NOS)

1.1.1 Ορισμός

Το διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β-κύτταρα (Diffuse Large B-Cell Lymphoma) είναι σύμφωνα με την ταξινόμηση της WHO (World Health Organization-2008) νεοπλασία ώριμων Β-λεμφοκυττάρων, επιθετικής βιολογικής συμπεριφοράς, με διάχυτο πρότυπο ανάπτυξης, αποτελούμενη από μεγάλα Β-λεμφοκύτταρα. Οι πυρήνες των νεοπλασματικών κυττάρων έχουν μέγεθος ίσο ή και μεγαλύτερο από αυτό των φυσιολογικών μακροφάγων, ή μεγαλύτερο από το διπλάσιο ενός φυσιολογικού λεμφοκυττάρου (μέση διάμετρος $\geq 20\mu\text{m}$), παρουσιάζουν σημαντική ποικιλομορφία, ενώ το κυτταρόπλασμα είναι έντονα βασεόφιλο (1).

Κλινικές, μορφολογικές, και μοριακές μελέτες έδειξαν ότι πρόκειται για μία ετερογενή ομάδα λεμφωμάτων, η οποία περιλαμβάνει διάφορες μορφολογικές ποικιλίες, μοριακούς και ανοσοφαινοτυπικούς υπότυπους καθώς και ξεχωριστές νοσολογικές οντότητες (Πίνακας 1). Ωστόσο, παραμένει αταξινομήτος ένας μεγάλος αριθμός περιπτώσεων που ενδέχεται να παρουσιάζει βιολογική ετερογένεια, για τις οποίες προς το παρόν δεν υπάρχουν αποδεκτά κριτήρια ταξινόμησής τους. Οι περιπτώσεις αυτές ταξινομούνται ως διάχυτα λεμφώματα από μεγάλα Β-λεμφοκύτταρα μη περαιτέρω προσδιοριζόμενα (Diffuse Large B-Cell Lymphoma, NOS).

Πίνακας 1: Διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β-κύτταρα.

Διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β-κύτταρα μη περαιτέρω προσδιοριζόμενο
<i>Συνήθεις μορφολογικές ποικιλίες</i>
Κεντροβλαστική
Ανοσοβλαστική
Αναπλαστική
Σπάνιες μορφολογικές ποικιλίες
<i>Μοριακοί υπότυποι</i>
Πρότυπο γονιδιακής έκφρασης ομοιάζον με αυτό των Β-λεμφοκυττάρων του βλαστικού κέντρου (Germinal center B-cell like, GCB)
Πρότυπο γονιδιακής έκφρασης ομοιάζον με αυτό των ενεργοποιημένων περιφερικών Β-λεμφοκυττάρων (Activated B-cell-like, ABC)
<i>Ανοσοφαινοτυπικοί υπότυποι</i>
CD5-θετικό διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β-λεμφοκύτταρα
Πρότυπο ανοσοϊστοχημικής έκφρασης ομοιάζον με αυτό των Β-λεμφοκυττάρων του βλαστικού κέντρου (Germinal Center B-cell like, GCB)
Πρότυπο ανοσοϊστοχημικής έκφρασης μη ομοιάζον με αυτό των Β-λεμφοκυττάρων του βλαστικού κέντρου (Non Germinal Center B-cell like, Non GCB)
Υπότυποι διάχυτου λεμφώματος από μεγάλα Β-λεμφοκύτταρα
Λέμφωμα από μεγάλα Β-λεμφοκύτταρα πλούσιο σε Τ-λεμφοκύτταρα/ιστιοκύτταρα
Πρωτοπαθές διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β-λεμφοκύτταρα του ΚΝΣ
Πρωτοπαθές δερματικό διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β-λεμφοκύτταρα, τύπου ποδός
EBV-θετικό διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β-λεμφοκύτταρα των ενηλίκων
Άλλα λεμφώματα από μεγάλα Β-λεμφοκύτταρα
Διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β-λεμφοκύτταρα σχετιζόμενο με χρόνια φλεγμονή
Λεμφωματοειδής κοκκιωμάτωση
Πρωτοπαθές λέμφωμα του μεσοθωρακίου από μεγάλα Β-λεμφοκύτταρα (θυμικό)
Ενδοαγγειακό λέμφωμα από μεγάλα Β-λεμφοκύτταρα
ALK-θετικό λέμφωμα από μεγάλα Β-λεμφοκύτταρα
Πλασμαβλαστικό λέμφωμα
Λέμφωμα από μεγάλα Β-λεμφοκύτταρα αναπτυσσόμενο σε HHV8-σχετιζόμενη νόσο του Castleman
Πρωτοπαθές λέμφωμα των ορογονίων κοιλοτήτων
Οριακές περιπτώσεις
Β-λέμφωμα, αταξινόμητο με χαρακτηριστικές ενδιάμεσους μεταξύ διάχυτου λεμφώματος από μεγάλα Β-λεμφοκύτταρα και λεμφώματος Burkitt
Β-λέμφωμα, αταξινόμητο, με χαρακτηριστικές ενδιάμεσους μεταξύ διάχυτου λεμφώματος από μεγάλα Β-λεμφοκύτταρα και κλασικού λεμφώματος Hodgkin

1.1.2 Επιδημιολογία, θέσεις ανάπτυξης και κλινικά χαρακτηριστικά

Το DLBCL είναι ο πιο συχνός τύπος μη-Hodgkin λεμφώματος των ενηλίκων στο δυτικό κόσμο, αντιστοιχεί στο 25-30% των μη Hodgkin λεμφωμάτων και απαντάται συχνότερα σε ηλικιωμένα άτομα (μέση ηλικία: 70 έτη). Οι ασθενείς εμφανίζουν λεμφαδενική ή εξωλεμφαδενική (40% των περιπτώσεων) νόσο συχνότερα στο ΓΕΣ (στόμαχο και ειλεοτυφλική περιοχή), αλλά κάθε εξωλεμφαδενική εντόπιση είναι δυνατόν να αποτελεί πρωτοπαθή θέση ανάπτυξης του λεμφώματος. Διήθηση του μυελού των οστών παρατηρείται στο 10-20% των περιπτώσεων και στο 1/3 αυτών ανευρίσκονται νεοπλασματικά κύτταρα στο περιφερικό αίμα. Οι ασθενείς εμφανίζουν διόγκωση ενός ή πολλαπλών λεμφαδένων ή ταχέως αναπτυσσόμενη ογκόμορφη αλλοίωση. Οι περισσότεροι εξ' αυτών είναι ασυμπτωματικοί ή εμφανίζουν συμπτώματα εξαρτώμενα από την θέση ανάπτυξης του λεμφώματος (1).

1.1.3 Αιτιολογία

Η αιτιολογία του DLBCL παραμένει άγνωστη. Συνήθως αναπτύσσεται *de novo* και αναφέρεται ως πρωτοπαθές, είναι δυνατόν να αποτελεί μεταμόρφωση/μετάπτωση ενός λιγότερο επιθετικού Β-λεμφώματος, όπως χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας/λεμφώματος από μικρά λεμφοκύτταρα, λεμφώματος της οριακής ζώνης, λεμφοπλασματοκυτταρικού λεμφώματος, λεμφοζιδιακού λεμφώματος και οζώδους λεμφοεπικρατητικού τύπου λεμφώματος Hodgkin (1).

Η ανοσοανεπάρκεια είναι ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου. Οι περιπτώσεις οι οποίες αναπτύσσονται σε ανοσοκατασταλμένα άτομα είναι συχνότερα EBV-θετικές συγκριτικά με αυτές που εμφανίζονται σποραδικά.

1.1.4 Μορφολογία

Το πρότυπο ανάπτυξης του λεμφώματος είναι διάχυτο και βάσει των κυτταρομορφολογικών του χαρακτηριστικών διακρίνεται στην συνήθη και στις σπάνιες μορφολογικές ποικιλίες. Η συνήθης ποικιλία διακρίνεται σε κεντροβλαστική, ανοσοβλαστική και αναπλαστική (Πίνακας 1).

Η κεντροβλαστική και ανοσοβλαστική ποικιλία αποτελούνται από κεντροβλάστες και ανοσοβλάστες. Στην πρώτη το ποσοστό των ανοσοβλαστών είναι <90% των κυττάρων, ενώ

στην δεύτερη >90%. Οι κεντροβλάστες είναι μέσου προς μεγάλου μεγέθους λεμφοκύτταρα με υποστρόγγυλους πυρήνες, 2-4 πυρήνια προσκολλημένα στην πυρηνική μεμβράνη και λίγο αμφίφιλο ή βασεόφιλο κυτταρόπλασμα. Οι ανοσοβλάστες έχουν ανάλογο μέγεθος και σχήμα αλλά μονήρες κεντρικά τοποθετημένο πυρήνιο και περισσότερο βασεόφιλο κυτταρόπλασμα. Σε ορισμένες περιπτώσεις οι ανοσοβλάστες παρουσιάζουν πλασματοκυτταρική διαφοροποίηση.

Στην αναπλαστική ποικιλία επικρατούν μεγάλα λεμφοκύτταρα με πλειόμορφους πυρήνες, τα οποία είναι δυνατόν εν μέρει να ομοιάζουν με κύτταρα Hodgkin ή καρκινικά κύτταρα.

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η μορφολογική ταξινόμηση του DLBCL παρουσιάζει χαμηλή αναπαραγωγικότητα και δε συσχετίζεται με ανοσοφαινοτυπικές ή γενετικές παραμέτρους.

1.1.5 Ανοσοφαινότυπος και γονιδιακή έκφραση

Τα ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά του DLBCL έχουν αποτελέσει αντικείμενο πολλών μελετών. Πλήθος πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε διάφορα βιολογικά μονοπάτια έχουν μελετηθεί σε αυτόν τον τύπο λεμφώματος, όπως πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση, πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη μεταγωγή σημάτων, μεταγραφικοί παράγοντες, προσκολλητικά μόρια καθώς και δείκτες B-κυτταρικής διαφοροποίησης (1).

Τα νεοπλασματικά κύτταρα έχουν ανοσοφαινότυπο ώριμων B-λεμφοκυττάρων και εκφράζουν τους δείκτες CD19, CD20, PAX5 και CD79a, μονοτυπικές ανοσοσφαιρίνες επιφανείας και σε ορισμένες περιπτώσεις και κυτταροπλασματικές (IgM>IgG>IgA). Επιπλέον, αυτά εκφράζουν τους δείκτες CD10, Bcl6 και MUM-1/IRF-4 στο 30-60%, 60-90% και 35-65% των περιπτώσεων, αντίστοιχα. Σπάνια παρατηρείται έκφραση του δείκτη CD5. Οι περιπτώσεις με αναπλαστική μορφολογία συχνά εκφράζουν το δείκτη CD30. Οι πρωτεΐνες Bcl-2 και p53 εκφράζονται στο 30-50% και 30-40% των περιπτώσεων, αντίστοιχα. Ο δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 εκφράζεται σε υψηλό ποσοστό νεοπλασματικών λεμφοκυττάρων και κυμαίνεται από 40-90% (1).

Μελέτες της γονιδιακής έκφρασης των νεοπλασματικών κυττάρων με την μέθοδο των μικροσυστοιχιών ταυτοποίησαν δύο διακριτούς ανοσοφαινοτυπικούς/ιστογενετικούς υπότυπους DLBCL. Του πρώτου, το πρότυπο γονιδιακής έκφρασης ομοιάζει με αυτό των B-

λεμφοκυττάρων του βλαστικού κέντρου (germinal center B-cell like, GCB) (45-50% των περιπτώσεων) και του δεύτερου με αυτό ενεργοποιημένων περιφερικών B-λεμφοκυττάρων (activated B-cell-like, ABC) (Πίνακας 1). Οι δύο αυτοί υπότυποι χαρακτηρίζονται από διαφορετικές κυτταρογενετικές ανωμαλίες και επιπλέον εμφανίζουν διαφορετική πρόγνωση. Υποστηρίζεται ότι η ιστογενετική ταξινόμηση των DLBCL επιτυγχάνεται και ανοσοϊστοχημικά με την συνδυασμένη έκφραση των αντιγονικών δεικτών CD10, Bcl6 και MUM-1/IRF4. Οι περιπτώσεις στις οποίες το CD10 εκφράζεται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 30% των νεοπλασματικών κυττάρων και αυτές με ανοσοφαινότυπο CD10-αρνητικό, Bcl6-θετικό και MUM-1/IRF4-αρνητικό ταξινομούνται στον υπότυπο του GCB, ενώ όλες οι υπόλοιπες στον non-GCB. Ωστόσο, αυτή η ανοσοφαινοτυπική υποταξινόμηση δε σχετίζεται απόλυτα με την μοριακή/ιστογενετική ταξινόμηση του λεμφώματος και προτείνεται η προσθήκη επιπλέον δεικτών, όπως του Bcl-2 και του FOXP-1 (1).

1.1.6 Γονίδια B-κυτταρικού υποδοχέα

Στα νεοπλασματικά κύτταρα ανιχνεύονται κλωνικές αναδιατάξεις των γονιδίων των βαριών και ελαφρών αλύσεων των ανοσοσφαιρινών και σωματικές υπερμεταλλάξεις των γονιδίων των μεταβλητών περιοχών των ανοσοσφαιρινών (1).

1.1.7 Κυτταρογενετικές ανωμαλίες και ογκογονίδια

Στο 30% των περιπτώσεων ανιχνεύονται αμοιβαίες μετατοπίσεις στην περιοχή 3q27, στη οποία εδράζει το γονίδιο BCL6 και στο 20-30% των περιπτώσεων αμοιβαία μετατόπιση του γονιδίου BCL2 [t(14;18)]. Αναδιάταξη του γονιδίου MYC ανευρίσκεται στο 10% των λεμφωμάτων και συνήθως συσχετίζεται με σύνθετο πρότυπο γενετικών αλλοιώσεων. Συγκεκριμένα, στο 20% των περιπτώσεων αυτών ανιχνεύεται παράλληλα μετατόπιση του BCL2 και μετατόπιση ή/και θραύση του BCL6. Αυτές οι περιπτώσεις έχουν ιδιαίτερα υψηλό δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού και επιθετικότερη βιολογική συμπεριφορά και προτείνεται να ταξινομούνται στον τύπο του αταξινόμητου B-λεμφώματος με εικόνα ενδιάμεση μεταξύ DLBCL και λεμφώματος Burkitt (1).

1.1.8 Φυσιολογικό αντίστοιχο κύτταρο προέλευσης

Το φυσιολογικό αντίστοιχο κύτταρο του λεμφώματος είναι Β-λεμφοκύτταρο του βλαστικού κέντρου ή σταδίου διαφοροποίησης μετά το βλαστικό κέντρο (ενεργοποιημένο Β-λεμφοκύτταρο) (1).

1.1.9 Πρόγνωση

Το DLBCL παρουσιάζει επιθετική βιολογική συμπεριφορά αλλά είναι δυνητικά θεραπεύσιμο. Το 50-60% των περιπτώσεων ανταποκρίνεται σε πολυπαραγοντική χημειοθεραπεία (CHOP). Η επιπρόσθετη χορήγηση αντι-CD20 αντισώματος (Rituximab) (R-CHOP) έχει βελτιώσει την επιβίωση των ασθενών. Σημαντική είναι η προγνωστική αξία του Διεθνούς Προγνωστικού Δείκτη (International Prognostic Index, IPI), ο οποίος στηρίζεται σε κλινικές παραμέτρους και της μοριακής/ιστογενετικής ταξινόμησης του λεμφώματος. Ασθενείς με λεμφώματα υπότυπου GCB παρουσιάζουν καλύτερη πρόγνωση από αυτούς με λεμφώματα ABC. Η παρουσία θραύσης του γονιδίου MYC και μεταλλάξεων του γονιδίου TP53 έχει συσχετιστεί με πολύ επιθετική κλινική πορεία και πτωχή επιβίωση, αντίστοιχα (1).

1.2 ΙΣΤΟΓΕΝΕΣΗ ΤΩΝ DLBCL ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ Β-ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ

Η σημαντική κλινική ετερογένεια των DLBCL, του πιο συχνού επιθετικού λεμφώματος, ώθησε τους ερευνητές στην μελέτη της γονιδιακής έκφρασης του λεμφώματος αυτού. Η μελέτη του προτύπου της γονιδιακής έκφρασης με την μέθοδο των μικροσυστοιχιών (microarrays) του Alizadeh και συν. (2000) ταυτοποίησε δύο μοριακά διακριτές ιστογενετικές υποομάδες DLBCL, τα προερχόμενα από τα Β-κύτταρα του βλαστικού κέντρου (Germinal B-Like, GCB-DLBCL) και τα προερχόμενα από in vitro ενεργοποιημένα περιφερικά Β-λεμφοκύτταρα (Activated B-Like, ABL-DLBCL ή non-GC DLBCL) (2). Ο διαχωρισμός των DLBCL σε δύο ιστογενετικούς υποτύπους πιστοποιήθηκε και από τους Rosenwald και συν. το 2002, οι οποίοι περιέγραψαν και έναν τρίτο ιστογενετικό υπότυπο, τα τύπου 3 DLBCL (3). Τα GCB-DLBCL χαρακτηρίζονται από την έκφραση γονιδίων του Β-κυττάρου του βλαστικού κέντρου των λεμφοζιδίων του φυσιολογικού λεμφικού ιστού, όπως CD10, bcl-6, CD38 και LMO2. Επιπρόσθετα, οι ιστογενετικοί υπότυποι χαρακτηρίζονται από

διαφορετικούς μηχανισμούς κακοήθους μεταμόρφωσης και επομένως είναι παθογενετικά ξεχωριστές νόσοι. Πράγματι, τα GCB χαρακτηρίζονται από την διαμετάθεση t(14;18) (30-40% των GCB) που εμπλέκεται το γονίδιο bcl-2, την ενίσχυση του τόπου του c-REL (στο χρωμόσωμα 2p), ανωμαλίες στο μονοπάτι PTEN (15%), καθώς και από συρρέουσες (ongoing) σωματικές μεταλλάξεις των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών. Αντίθετα, τα ABL-DLBCL χαρακτηρίζονται από την έκφραση γονιδίων που εκφράζονται κατά την *in vitro* ενεργοποίηση φυσιολογικών B-κυττάρων του περιφερικού αίματος, όπως των γονιδίων MUM-1/IRF-4 (ρυθμιστικός παράγοντας της ιντερλευκίνης 4) και CD138, καθώς και αυτόνομη ενεργοποίηση του γονιδίου του μεταγραφικού παράγοντα NFκB και γονιδίων στόχων του NFκB, όπως MUM-1/IRF-4, CD44, CD95, CD95L, κυκλίνη D1, κυκλίνη D2, c-myc, υποδοχείς TRAIL, c-FLIP, bcl-2, bcl-xl, TRAF-1, TRAF-2, c-IAP1 και c-IAP2 που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση (2). Πιθανώς το κυτταρικό αντίστοιχο στις περιπτώσεις των ABL-DLBCL να είναι ένα λεμφοκύτταρο, το οποίο έχει διέλθει και εξέλθει από το βλαστικό κέντρο (post-germinal). Ακόμη, στον υπότυπο ABL του DLBCL παρατηρείται ενίσχυση του bcl-2, απώλεια του CDKN2A ογκοκατασταλτικού τόπου, ενίσχυση ή επαύξηση (gain) του 19q, τρισωμία 3 και απάλειψη (deletion) του τόπου INK4R/ARE. Τα τύπου 3 DLBCL στερούνται γονιδίων των B-κυττάρων του βλαστικού κέντρου αλλά και γονιδίων των ενεργοποιημένων περιφερικών B- λεμφοκυττάρων (4). Παρά τις επί μέρους διαφορές, στα αποτελέσματα των διάφορων γονιδιακών μελετών η ιστογενετική ταξινόμηση των DLBCL στους υπότυπους GCB-DLBCL και non-GCB DLBCL έχει ευρεία αποδοχή.

Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι οι ιστογενετικοί μοριακοί υπότυποι παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στην ολική επιβίωση και στο διάστημα ελεύθερο νόσου μετά από θεραπεία με CHOP (Cyclophosphamide, Hydroxydaunorubicin, Oncovin, Prednisone). Τα GC-DLBCL (ανεξάρτητα του Διεθνούς προγνωστικού παράγοντα, IPI) παρουσιάζουν καλύτερη κλινική πορεία με πενταετή επιβίωση 60% και τα non-GC DLBCL 35% (3, 5).

Οι ιστογενετικοί υπότυποι των DLBCL θεωρούνται ξεχωριστές οντότητες, οι οποίες προέρχονται από B-λεμφοκύτταρα σε διαφορετικά στάδια διαφοροποίησης, διέρχονται από διαφορετικές οδούς ογκογένεσης και επιπλέον έχουν διαφορετική κλινική πορεία (6). Ως εκ τούτου, έχει ιδιαίτερη σημασία ο προσδιορισμός του σταδίου διαφοροποίησης του B-λεμφοκυττάρου, από το οποίο προέρχονται αυτά τα λεμφώματα.

Δεδομένου ότι η τεχνολογία των μικροσυστοιχειών είναι δαπανηρή και δεν είναι ευρέως διαθέσιμη, πολλές μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει επιτυχώς την ανοσοϊστοχημική

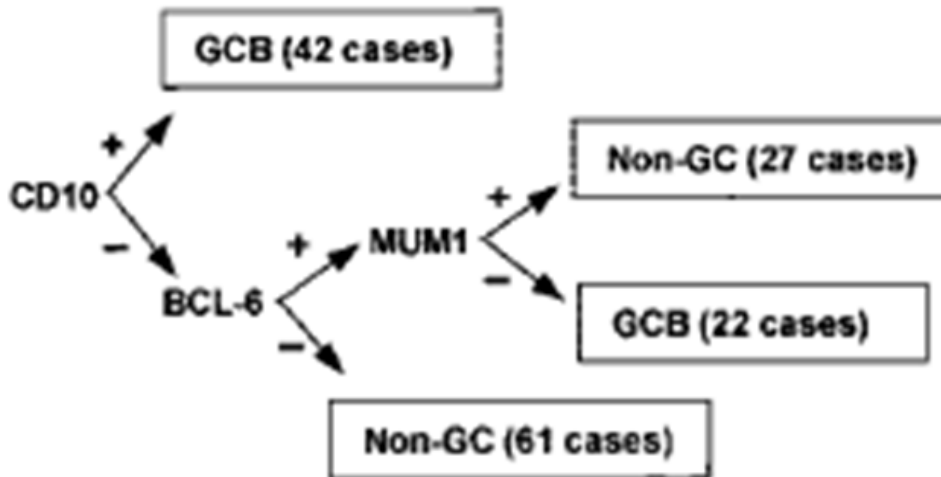
ανάλυση σε τομές παραφίνης, προκειμένου να ταξινομήσουν ιστογενετικά τα DLBCL (7-24). Βάσει της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των δεικτών CD10, bcl-6 και MUM-1/IRF-4, με ποσοστό θετικών κυττάρων >30% για το CD10, προκύπτει ανοσοφαινοτυπικός αλγόριθμος, όπως απεικονίζεται σχηματικά από τους Hans και συν. (Εικόνα 1). Αναλυτικότερα, επί τη βάσει της θετικής ανοσοέκφρασης του δείκτη CD20, αξιολογούνται οι δείκτες CD10, bcl-6 και MUM-1/IRF-4. Έκφραση του CD10 (>30%), με ή χωρίς συνέκφραση του bcl-6 και απουσία του MUM-1/IRF-4, καταδεικνύει προέλευση του DLBCL από τα κύτταρα του βλαστικού κέντρου (GC-DLBCL). Απουσία έκφρασης του δείκτη CD10 και έκφραση του bcl-6, χωρίς συνέκφραση MUM-1/IRF-4, επίσης συνηγορεί υπέρ της προέλευσης του λεμφώματος από τα κύτταρα του βλαστικού κέντρου (GC-DLBCL). Ο υπότυπος των non-GC DLBCL αποκαλύπτεται με δύο τρόπους: α) συνέκφραση των δεικτών bcl-6 και MUM-1/IRF-4, β) έκφραση μόνο του MUM-1/IRF-4 και γ) απουσία έκφρασης των δεικτών bcl-6 και MUM-1/IRF-4. Και στις τρεις τελευταίες περιπτώσεις το αντιγόνο CD10 δεν εκφράζεται (25).

Η ανοσοϊστοχημική ιστογενετική μελέτη (CD10, Bcl-6, MUM-1/IRF-4) του Hans και συν. σε περιπτώσεις DLBCL που είχαν προηγουμένως μελετηθεί με cDNA μικροσυστοιχίες έδειξε ότι έχει προγνωστική αξία. Συγκεκριμένα, προβλέπει την ταξινόμηση των μικροσυστοιχιών σε ποσοστό 71% όσον αφορά τον υπότυπο GCB-DLBCL και 88% τον υπότυπο του non GCB- DLBCL (ABC και τύπο 3).

Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι οι ιστογενετικοί υπότυποι διατηρούν την προγνωστική τους αξία και μετά την προσθήκη ανοσοθεραπείας με Rituximab στην καθιερωμένη θεραπεία με CHOP (R-CHOP) (26, 27).

Πρόσφατα προτάθηκαν αλγόριθμοι στους οποίους χρησιμοποιούνται περισσότεροι δείκτες [GCET1 (germinal center B-cell-expressed transcript-1), Bcl-2, FOXP-1 και LMO2], η αναπαραγωγικότητα των οποίων, ως προς την ανοσοϊστοχημική ταξινόμηση των δύο γονιδιακών τύπων των DLBCL, μένει να διερευνηθεί (28-32).

Πάντως, η έκφραση του LMO2 σχετίζεται με ευνοϊκότερης πρόγνωσης GCB-DLBCL, ενώ έκφραση του FOXP1 με δυσμενή πρόγνωση και non-GCB πρότυπο γονιδιακής έκφρασης (32). Επιπλέον, έκφραση της πρωτεΐνης bcl-2 παρατηρείται στην υποομάδα των non-GCB και σχετίζεται με δυσμενή πρόγνωση ακόμη και μετά θεραπείας με R-CHOP (33). Τέλος, μεταλλάξεις του p53 και υψηλός δείκτης Ki-67 έχουν περιγραφεί ως ανεξάρτητοι πτωχοί προγνωστικοί δείκτες στα DLBCL (34).

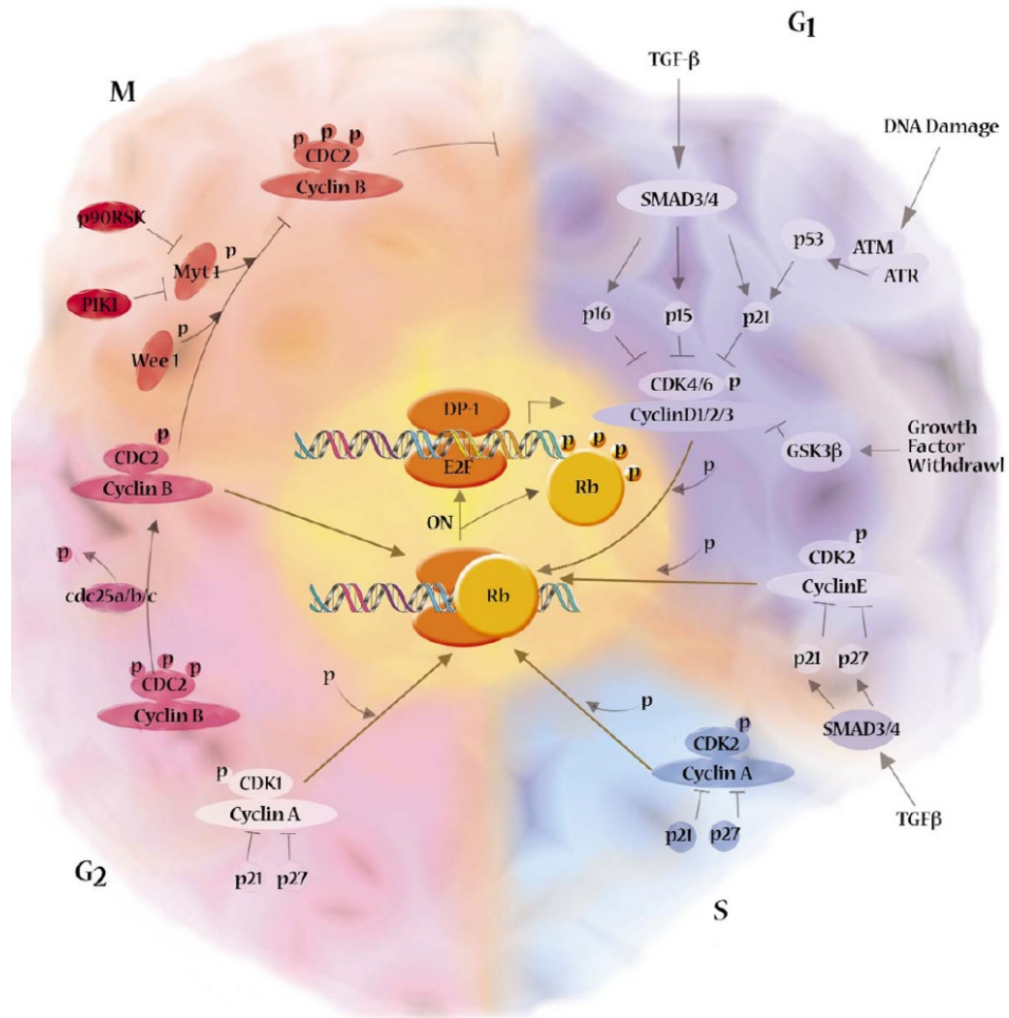


Εικόνα 1: Αλγόριθμος του Hans et. al.

1.3 ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

Η ικανότητα ενός κυττάρου να πολλαπλασιάζεται και να δημιουργεί ακριβή “αντίγραφα” του αποτελεί μία ιδιαίτερα πολύπλοκη διαδικασία η οποία απαιτεί υψηλή “πιστότητα” για κάθε οργανισμό. Οι μοριακοί μηχανισμοί ελέγχου που χρησιμοποιούν τα κύτταρα για αναδιπλασιασμό χαρακτηρίζεται από οργάνωση και σημαντικού βαθμού διατήρηση κατά τη διάρκεια της εξέλιξης. Την τελευταία δεκαετία έχει εκδηλωθεί έντονο ενδιαφέρον για τον κυτταρικό κύκλο που στηρίζεται στην άποψη ότι διαταραχές στη ρύθμισή του οδηγούν σε γενετική αστάθεια, η οποία προδιαθέτει σε νεοπλασματική εξαλλαγή (35, 36).

Ο κυτταρικός κύκλος (Εικόνα 2) ρυθμίζεται από πολλά ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια σήματα. Διάφορες μελέτες σε κυτταρικές καλλιέργειες και πειραματόζωα, οδήγησαν στη διαπίστωση πως η ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού κυρίως ρυθμίζεται μέσω μιας οικογένειας ολοενζυμικών συμπλεγμάτων κινάσων σερίνης/θρεονίνης. Συγκεκριμένα τα συμπλέγματα αυτά αποτελούνται από μια ασταθή ρυθμιστική υπομονάδα, την κυκλίνη (cyclin), η οποία ενώνεται και ενεργοποιεί μια δεύτερη, καταλυτική, υπομονάδα, την κυκλινο-εξαρτώμενη κινάση (Cyclin Dependent Kinase, CDK) (37, 38). Τα επίπεδα έκφρασης των κυκλινών μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Τα ενεργά συμπλέγματα κυκλίνης-CDK δρουν σε συγκεκριμένες φάσεις του κυτταρικού κύκλου και φωσφορυλιώνουν κατάλληλα υποστρώματα. Έχουν απομονωθεί δεκατρείς διαφορετικές CDKs και τέσσερις ομάδες κυκλινών.



Εικόνα 2: Ο κυτταρικός κύκλος.

Λειτουργικά οι κυκλίνες διακρίνονται σε δύο κύριες οικογένειες. Η οικογένεια G1/S περιλαμβάνει τις κυκλίνες C, D1, D2, D3 και E, οι οποίες είναι σημαντικές για τη διόδο του κυττάρου από τη φάση G1 και την είσοδό του στη φάση S. Η άλλη οικογένεια είναι η G2/M που περιλαμβάνει τις κυκλίνες A, B1 και B2. Η κυκλίνη A εμπλέκεται στη σύνθεση του DNA, στην ολοκλήρωση της φάσης S και στην προετοιμασία του κυττάρου για τη μετάβασή του στη μίτωση. Οι κυκλίνες B1 και B2 ρυθμίζουν τη μη αναστρέψιμη είσοδο του κυττάρου στη μίτωση, την αλληλουχία των γεγονότων κατά τη φάση της μίτωσης καθώς και την ολοκλήρωσή της (9, 39, 40).

Ο κυτταρικός κύκλος του φυσιολογικού κυττάρου συνήθως πυροδοτείται από ένα εξωκυττάριο μιτογόνο ερέθισμα (π.χ. αυξητικό παράγοντα), το οποίο ενεργοποιεί μια σειρά από ενδοκυττάρια βιοχημικές αντιδράσεις/μεταβολές, οι οποίες καλούνται “οδοί μεταγωγής σήματος” (signal transduction pathway). Το κύτταρο δέχεται εξωκυττάρια μιτογόνα σήματα

κατά την πρώιμη G1 φάση του κυτταρικού κύκλου και αποδέκτες αυτών των σημάτων είναι τα συμπλέγματα των κυκλινών D με τις CDK4 ή CDK6. Τα συμπλέγματα αυτά εμπλέκονται στη ρύθμιση της δραστηριότητας του περιοριστικού σημείου, το οποίο ρυθμίζει τη μετάβαση του κυττάρου δια μέσου της προχωρημένης G1 φάσης του κυτταρικού κύκλου. Το σύμπλεγμα κυκλίνης E/CDK2 δρα στο όριο των φάσεων G1 και S (41).

Το σύμπλεγμα κυκλίνης D1/CDK4, μέσω μερικής φωσφορυλίωσης της pRb, επιτρέπει στο μεταγραφικό παράγοντα E2F να επάγει κατά το τέλος της φάσης G1 την ενεργοποίηση του γονιδίου της κυκλίνης E και τη σύνθεση της αντίστοιχης πρωτεΐνης. Η σύνθεση του συμπλέγματος κυκλίνης E/CDK2 αρχίζει κατά το τέλος της φάσης G1 και συνεχίζεται σε μέγιστο βαθμό κατά τη μετάβαση G1-S. Το σύμπλεγμα αυτό είναι παράγοντας αναγκαίος και καθοριστικός για το ρυθμό που χαρακτηρίζει τη μετάβαση στη φάση S, καθώς οδηγεί σε περαιτέρω φωσφορυλίωση της pRb και συνεπώς απελευθέρωση του E2F. Έτσι, η συσσώρευση του συμπλέγματος κυκλίνης E/CDK2, εξαρτάται αφενός από τη δράση της E2F στο γονίδιο της κυκλίνης E και αφετέρου από την αποδόμηση της παραγόμενης πρωτεΐνης από την πρωτεολυτική οδό της ουμπικουΐτινης (ubiquitin-dependent proteolysis). Η φωσφορυλίωση του συμπλέγματος pRb/E2F-DP, σηματοδοτεί το σημείο χωρίς επιστροφή προς τη φάση S του κυτταρικού κύκλου (42, 43). Όταν το κύτταρο εισέλθει στην φάση S, η κυκλίνη E αποδομείται και την ενεργοποίηση της CDK2 αναλαμβάνει η κυκλίνη A, με το σχηματισμό του συμπλόκου κυκλίνης A/CDK2. Η δημιουργία του τελευταίου είναι απαραίτητη για τη συνέχιση της φάσης S (44).

Η σύνθεση του DNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα ξεκινά από πολλά διαφορετικά σημεία (origins of replication). Αυτό συμβαίνει για το λόγο ότι αν υπήρχε ένα μόνο σημείο έναρξης της αντιγραφής, η διάρκεια της φάσης S, θα ήταν υπερβολικά μεγάλη και οι πιθανότητες λάθους αυξημένες. Υπολογίζεται πως στο ανθρώπινο γονιδίωμα υπάρχουν περίπου 106 ανεξάρτητα σημεία έναρξης της αντιγραφής. Στα σημεία αυτά σχηματίζεται προς το τέλος της φάσης G1, το προ-αντιγραφικό σύμπλεγμα (pre-Replication Complex, pre-RC), το οποίο είναι απαραίτητο για τη δράση των CDKs της φάσης S (45).

Το σύμπλοκο κυκλίνης A/CDK2 είναι σημαντικό τόσο για την έναρξη και διατήρηση της σύνθεσης DNA, όσο και για το ότι εμποδίζει τον εκ νέου σχηματισμό προ-αντιγραφικών συμπλεγμάτων. Κατά τη διάρκεια του τέλους της φάσης S, η κυκλίνη A ενεργοποιεί την CDK1, σηματοδοτώντας έτσι την ολοκλήρωση της φάσης S και την έναρξη της φάσης G2. Εφόσον ολοκληρωθεί η αντιγραφή, το κύτταρο αρχίζει να παράγει σταδιακά κατά τη διάρκεια της φάσης G2 κυκλίνη B, η οποία συνδέεται με τη CDK1. Η μετάβαση G2/M

επάγεται από το σύμπλεγμα κυκλίνη B/CDK1. Το σύμπλεγμα αυτό αποτελεί τον παράγοντα που προάγει τη μίτωση (Mitosis-Promoting Factor, MPF) και η δράση του θεωρείται απαραίτητη για την έναρξη της μίτωσης. Η πλήρως ενεργοποιημένη CDK1 φωσφορυλιώνει μια σειρά από δομικές πρωτεΐνες (π.χ. ιστόνη H1, πυρηνικές λαμίνες, καλδεσμόνη), οι οποίες ασκούν σημαντικό ρόλο στη συσπείρωση μεταφασικών χρωμοσωμάτων, την αποδιάταξη των ενδιάμεσων ινιδίων, την αναδιάταξη των μικροϊνιδίων και αποτελούν βιοχημικά γεγονότα απαραίτητα και καθοριστικά για τη μετάβαση στη φάση M. Επιπλέον, το σύμπλεγμα κυκλίνη B/CDK1 παρουσιάζει τη μέγιστη βιολογική του δραστηριότητα, μετά από τη μετακίνησή του προς τον πυρήνα, όπου και παραμένει μέχρι τη στιγμή της μετάβασης από τη μετάφαση στην ανάφαση κατά τη διάρκεια της μίτωσης (45, 46).

Η μίτωση αρχίζει με την πρόφαση και ακολουθείται από το σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου και του μεταφασικού δίσκου. Στο στάδιο αυτό οι μιτωτικές CDKs ενεργοποιούν το πρωτεϊνικό σύμπλεγμα που προάγει την ανάφαση (Anaphase Promoting Complex, APC), το οποίο καταλύει την πρωτεόλυση των αναστολέων της ανάφασης PDS1 και CUT2, μέσω της οδού της ουμπικουΐτινης. Το σύμπλεγμα αυτό πρωτεολύει την κυκλίνη B, κάτι που είναι απαραίτητο για την έξοδο του κυττάρου από την τελόφαση (11, 47). Οι μηχανισμοί που έχουν αναφερθεί εξασφαλίζουν την αντιγραφή και την κατανομή του γενετικού υλικού, αλλά δε διασφαλίζουν την πιστότητα της αντιγραφής και της ισοκατανομής του γενετικού υλικού. Ακόμη, οι μηχανισμοί αυτοί ευοδώνουν τον πολλαπλασιασμό, αλλά δε δίνουν τη δυνατότητα μετά-μιτωτικής διαφοροποίησης στο κύτταρο. Έτσι, το κύτταρο ανέπτυξε αρνητικούς μηχανισμούς ρύθμισης και ελέγχου (checkpoints) του κυτταρικού κύκλου, οι οποίοι του επιτρέπουν τόσο να μπορεί να διαφοροποιηθεί κάτω από ορισμένες συνθήκες, όσο και να αμύνεται στο γενοτοξικό stress του περιβάλλοντος, το οποίο μπορεί να προκαλέσει είτε βλάβη του DNA, είτε διαταραχή στο σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου.

Η δράση των κινασών στα συμπλέγματα κυκλινών και CDKs ρυθμίζεται αρνητικά από τους αναστολείς των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (Cyclin-Dependent Kinase inhibitors, CDKIs). Υπάρχουν δύο γνωστές οικογένειες CDKIs. Η μία είναι η οικογένεια INK4, η οποία περιλαμβάνει τέσσερα γονίδια (p16/INK4A, p15/INK4B, p18/INK4C και p19 (p14/INK4D)). Οι κωδικοποιούμενες από αυτά πρωτεΐνες ενώνονται με την CDK4 και την CDK6 και αποτρέπουν την ένωση και ενεργοποίηση των τύπου-D κυκλινών, αναστέλλοντας τον σχηματισμό συμπλόκων. Η δεύτερη οικογένεια καλείται CIP/KIP και περιλαμβάνει τρία γονίδια (p21/CIP1, p27/KIP1 και p57/KIP2), τα οποία δρουν αναστέλλοντας κυρίως τις CDKs 2, 4 και 6 (48).

Η πρόοδος (progression) του κυτταρικού κύκλου ρυθμίζεται από τα ογκοκατασταλτικά μονοπάτια p53, Rb και p27 (49).

Το μονοπάτι p53 (p14-Hdm2-p53-p21) ρυθμίζει τη στάση του κυττάρου στις φάσεις G1 και G2. Η p53-εξαρτώμενη G1/S και G2/M στάση επιτυγχάνεται μέσω της επαγωγής του p21 και καταστολής των υποκινητών της κυκλίνης B1 και της CDK1, αντίστοιχα. Η δραστηριότητα και η σταθεροποίηση της πρωτεΐνης p53 ρυθμίζεται μέσω αλληλεπιδράσεων με πρωτεΐνες, όπως η Hdm2, που επιτρέπει την στόχευση του p53 στο πρωτεολυτικό δίκτυο της ουμπικουΐτινης (50, 51).

Το μονοπάτι Rb (p16-κυκλίνη D-CDK4-Rb) ρυθμίζει το περιοριστικό σημείο G1-S εμποδίζοντας την μεταγραφή γονιδίων απαραίτητων για την πρόοδο του κυττάρου από την φάση G1 στην φάση S. Φωσφορυλίωση (απενεργοποίηση) της πρωτεΐνης Rb, η οποία δραστηριοποιείται από το σύμπλεγμα κυκλίνης D-CDK 4/6 και αναστέλλεται από το p16, έχει ως αποτέλεσμα την ελευθέρωση τον μεταγραφικού παράγοντα E2F1 και την είσοδο του κυττάρου στην φάση S του κυτταρικού κύκλου (52, 53).

Τα μονοπάτια p53 και Rb συνδέονται μέσω του τόπου 9p21 όπου ευρίσκονται δύο γονίδια CDKI, τα CDKN2A και CDKN2B. Το γονίδιο CDKN2 κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p16, ενώ η p14/ARF συνδέεται στο Hdm2 και σταθεροποιεί την πρωτεΐνη p53 στον πυρήνα μπλοκάροντας την κυτταροπλασματική μεταφορά και την Hdm2-μεσολαβούμενη αποδόμηση της p53 (54).

Στο μονοπάτι p27 (p27-κυκλίνη E-CDK-2) κεντρικός είναι ο ρόλος της p27, η οποία δρα ως μεσολαβητής της στάσης του κυττάρου στην φάση G1-S. Η p27 φωσφορυλιώνεται από το σύμπλεγμα κυκλίνης E-CDK2. Η πρωτεΐνη SKP2 μεσολαβεί στην διάσπαση της p27 δρώντας ως λιγάση της ουμπικουΐτινης (55, 56).

1.4 Β-ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΣΤΑ DLBCL

Εργασίες της ομάδας μελέτης Ιστοπαθολογίας και Ιστολογίας του ανοσοποιητικού συστήματος της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων που αφορούν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην απόπτωση των DLBCL έδειξαν, ότι ταυτόχρονες διαταραχές πρωτεϊνών των ογκοκατασταλτικών μονοπατιών p27, p53 και Rb προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των DLBCL (49, 57). Συγκεκριμένα, ταυτόχρονη ελάττωση ή απουσία έκφρασης της πρωτεΐνης p27, αυξημένη έκφραση της p53 και ελαττωμένη έκφραση

της pRb και της p16 σχετίστηκαν σημαντικά με την έκφραση των μιτωτικών κυκλινών A και B1 (49, 57). Επιπλέον, σε άλλες μελέτες (22, 58) DLBCL της ίδιας ομάδας ανιχνεύτηκε έκφραση της κυκλίνης D3 και λιγότερο συχνά της E και ταυτοποιήθηκαν διαφορετικές συστάδες κυτταρικού πολλαπλασιασμού (χαμηλού, ενδιάμεσου και υψηλού) και απόπτωσης (χαμηλής και υψηλής), ευρήματα τα οποία δείχνουν ότι στον τύπο του DLBCL, περιλαμβάνονται ομάδες περιπτώσεων με διαφορετικές κυτταροκινητικές ιδιότητες και κατ' επέκταση διαφορετική κλινική συμπεριφορά, εφόσον αυξημένος κυτταρικός πολλαπλασιασμός και απόπτωση σχετίζονται με επιθετική συμπεριφορά.

Ο ιστογενετικός υπότυπος του ABC-DLBCL χαρακτηρίζεται από ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NFκB και από υψηλά επίπεδα έκφρασης NFκB γονιδίων-στόχων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που κωδικοποιούν το ρυθμιστικό παράγοντα 4 της ιντερφερόνης (IRF4/MUM1) και το γονίδιο της κυκλίνης D2 (59-61). Τα ευρήματα αυτά δείχνουν συσχέτιση μεταξύ της B-λεμφοκυτταρικής διαφοροποίησης και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στα DLBCL.

Πρόσφατες μελέτες ανάλυσης του συνδυασμένου προτύπου της γονιδιακής έκφρασης των DLBCL με τη μέθοδο των cDNA μικροσυστοιχιών (microarrays) και ολιγονουκλεοτιδίων πρόσθεσαν σημαντικές πληροφορίες όσον αναφορά: α) τη σχέση του προτύπου της γονιδιακής έκφρασης των DLBCL και του προτύπου γονιδιακής έκφρασης φυσιολογικών σταδίων B-κυτταρικής διαφοροποίησης και β) τη σχέση του προτύπου της γονιδιακής έκφρασης B-κυτταρικής διαφοροποίησης και έκφραση γονιδίων του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης στα DLBCL.

Συγκεκριμένα στις μελέτες των Alizadeh και συν. (2000) (2) και Rosenwald και συν. (2002) (3), διαπιστώθηκε ότι οι περιπτώσεις GCB-DLBCL χαρακτηρίζονται από τη μετάθεση t(14;18), στην οποία εμπλέκεται το γονίδιο BCL-2, την ενίσχυση του γονιδιακού τόπου του c-rel στο χρωμόσωμα 2p, και συρρέουσες σωματικές μεταλλάξεις των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών. Το c-rel γονίδιο κωδικοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα NFκB (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) που αποτελείται από διμερή υπομονάδων που ανήκουν στην πρωτεϊνική οικογένεια REL/NFκB (cREL, p65/RELA, RELB, p50/p105, και p52/p100). Τα διμερή συνδέονται σε μία κοινή αλληλουχία γνωστή ως σημείο πρόσδεσης του NFκB. Η μεταγραφική δράση του NFκB ρυθμίζεται από την πρωτεϊνική οικογένεια των IκB (Inhibitors of kappa B) αναστολέων οι οποίοι δεσμεύουν τα NFκB διμερή και τα συγκρατούν στο κυτταρόπλασμα. Η έκθεση των λεμφοκυττάρων σε πλήθος εξωκυττάρων ερεθισμάτων (π.χ. προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες) ενεργοποιεί το

σύμπλοκο των IκB κινασών που φωσφορυλιώνει την προσκολλημένη IκB υπομονάδα απελευθερώνοντας τον NFκB που με την σειρά του μετατοπίζεται στο πυρήνα. Ανάλογα με το εξωκυττάριο ερέθισμα και την ενδοκυττάρια διεργασία, ο NFκB ενεργοποιεί προ-αποπτωτικά γονίδια (π.χ. CD95, CD95L, και TRAIL), αντι-αποπτωτικά γονίδια (π.χ. c-FLIP, Bcl-2, Bcl-xL, c-IAP1 και c-IAP2) και γονίδια του κυτταρικού κύκλου (π.χ. κυκλίνη D1, κυκλίνη D2, και c-myc). Οι πρωτεΐνες REL/NFκB συμμετέχουν στη φυσιολογική B-κυτταρική διαφοροποίηση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων. Η ενεργοποίηση της μεταγωγής σήματος του Rel/NFκB μονοπατιού έχει συσχετισθεί με αρκετές νεοπλασίες και ανοσολογικές απαντήσεις.

Σε μία άλλη μελέτη, ο Davis και συν. (2001) (62) έδειξαν ότι τα ABC-DLBCL χαρακτηρίζονται από τη συνεχή και αυτόνομη ενεργοποίηση του NFκB και από υψηλά επίπεδα έκφρασης των NFκB γονιδιακών στόχων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που κωδικοποιούν το ρυθμιστικό παράγοντα 4 της ιντερφερόνης (IRF4/MUM1), το μόριο προσκόλλησης CD44, τα αντι-αποπτωτικά γονίδια, c-FLIP, Bcl-2, bcl-xl, TRAF1, TRAF2, c-IAP1 και c-IAP2 και το γονίδιο της κυκλίνης D2 που εμπλέκεται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Ο Houldsworth και συν. (2004) (63) έδωσαν περισσότερες πληροφορίες για τον ρόλο που διαδραματίζει το δίκτυο ρύθμισης του παράγοντα NFκB στα DLBCL. Ανέλυσαν τη σχέση μεταξύ ενίσχυσης και λειτουργικότητας του REL και του προτύπου γονιδιακής έκφρασης των GCB-DLBCL και των ABC-DLBCL. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι η ενίσχυση του γονιδιακού τόπου του REL (2p12-16) δεν σχετίζεται με την πυρηνική συσσώρευση, την ενεργοποιημένη μορφή της πρωτεΐνης NFκB. Η ενίσχυση του γονιδιακού τόπου του REL ανιχνεύθηκε και στις δύο ιστογενετικές υποομάδες των DLBCL (GCB-DLBCL και ABC-DLBCL) μολονότι η μετατόπιση της πρωτεΐνης στον πυρήνα ήταν σημαντικά συχνότερη στα ABC-DLBCL. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι η γονιδιακή ενίσχυση 2p12-16 δεν οδηγεί σε ανώμαλη ενεργοποίηση του γονιδίου REL, γεγονός που δείχνει ότι το γονίδιο δεν επηρεάζεται λειτουργικά από την γενωμική ενίσχυση.

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν ευρήματα, τα οποία δείχνουν ότι η έκφραση των πρωτεϊνών bcl-6 και CD10 μπορεί να σχετίζεται με την πρόοδο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης.

Ο Albagli και συν. (1999) (64) χρησιμοποίησαν μια κυτταρική σειρά ανθρώπινου οστεοσαρκώματος (U2OS), η οποία ρυθμίζεται από τετρακυκλίνες και είναι σταθερά επιμολυσμένη με το γονίδιο Bcl-6. Στη μελέτη αυτή διαπιστώθηκε, ότι η μείωση της

τετρακυκλίνης επάγει την έκφραση του γονιδίου, ενώ η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Bcl-6 επάγει τη δόσο-εξαρτώμενη αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων και επιβραδύνει την S-φάση του κυτταρικού κύκλου. Σε πιο πρόσφατη μελέτη, ο Yamoshi και συν. έδειξαν ότι κύτταρα CV1 και HeLa επιμολυσμένα με ανασυνδυασμένο αδενοϊό, τα οποία εξέφραζαν υψηλά επίπεδα της πρωτεΐνης Bcl-6 παρέμειναν στη υπο-G1 και G2/M φάση του κυτταρικού κύκλου (65).

Όσον αφορά την έκφραση της πρωτεΐνης CD10, μελέτες έδειξαν ότι η έκφραση της πρωτεΐνης συσχετίζεται θετικά με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε φυσιολογικά και νεοπλασματικά B-λεμφοκύτταρα. Πράγματι: α) τα κύτταρα του βλαστικού κέντρου τα οποία παρουσιάζουν αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό επάγουν την έκφραση της πρωτεΐνης CD10, ενώ στα ώριμα B-λεμφοκύτταρα τα οποία δεν έχουν αυτή την δυναμική πολλαπλασιασμού η πρωτεΐνη CD10 δεν ανιχνεύεται, β) τα κύτταρα του λεμφώματος Burkitt τα οποία παρουσιάζουν υψηλό δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού εκφράζουν σταθερά τη πρωτεΐνη CD10, γ) τα κύτταρα της CD10-θετικής B-λεμφοβλαστικής λευχαιμίας είναι κύτταρα που βρίσκονται σε κυτταρικό κύκλο, ενώ αντίθετα τα κύτταρα της CD10-αρνητικής B-λεμφοβλαστικής λευχαιμίας παρουσιάζουν χαμηλό κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

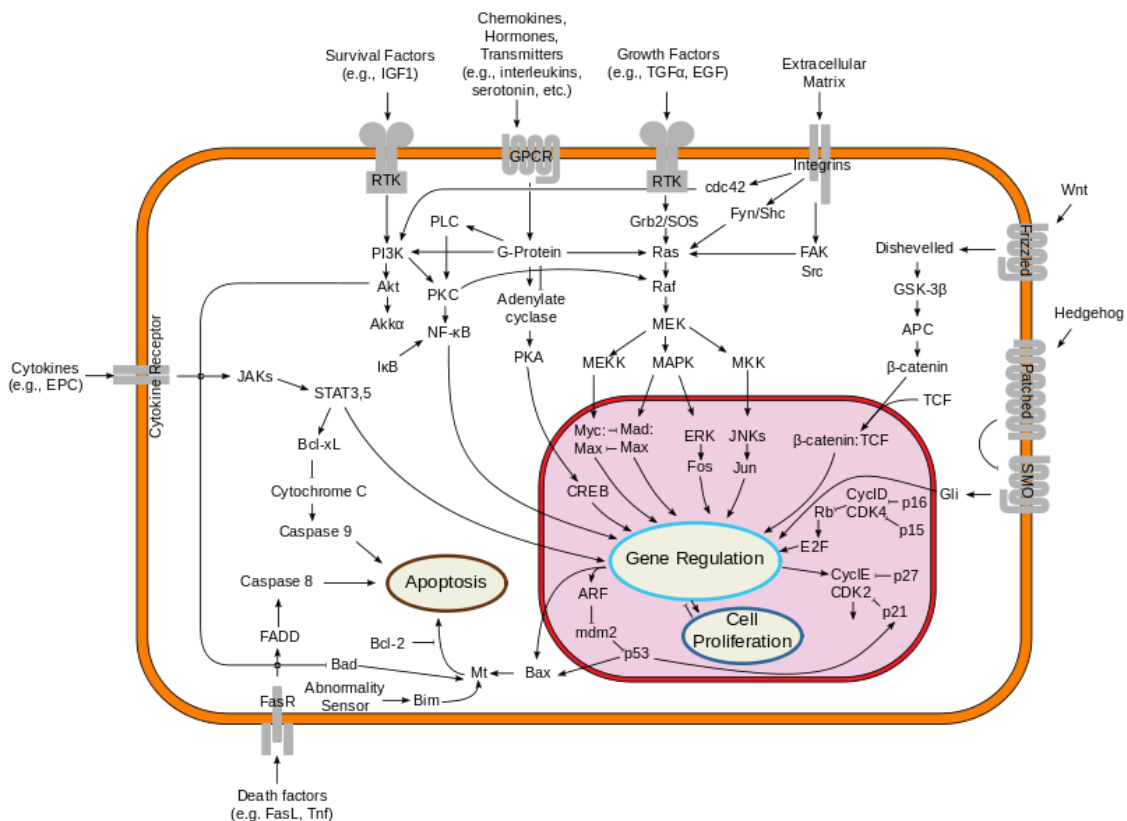
Μεταγενέστερη μελέτη της ομάδας μας επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα των ανωτέρω μελετών. Διαπιστώθηκε, ότι αυξημένη έκφραση των πρωτεϊνών B-κυτταρικής διαφοροποίησης bcl-6 και CD10 σχετίζεται με αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και απόπτωση στα DLBCL (21).

1.5 ΟΙ ΚΥΡΙΕΣ ΟΔΟΙ ΜΕΤΑΓΩΓΗΣ ΣΗΜΑΤΟΣ (NF-κB, PI-3K, JAK/STAT, MAP-κινάσες), ΟΙ ΟΠΟΙΕΣ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΣΤΑ ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ

Ιδιαίτερα σημαντικές για την παθογένεση των λεμφωμάτων, όπως και των DLBCL, είναι οι διαταραχές των δικτύων ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης (Εικόνα 3) (21, 22, 50, 57, 58, 66-74). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι οι ιστογενετικοί υπότυποι των DLBCL διαφέρουν ως προς τις παθογενετικές διαδικασίες που αφορούν στα δίκτυα ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης αλλά και στην πρόγνωση (21, 58, 66, 74, 75). Έχει αναφερθεί ότι στην παθογένεση των ABL-DLBCL και των λεμφωμάτων Hodgkin (τα οποία επίσης προέρχονται από B-λεμφοκύτταρα και υπάρχουν ενδείξεις ότι

παρουσιάζουν παθογενετικές ομοιότητες με τα ABL-DLBCL) εμπλέκεται η ενεργοποίηση της οδού σηματοδότησης NF-κB, η οποία επάγει την αυξημένη έκφραση αντι-αποπτωτικών γονιδίων (π.χ. cFLIP, bcl-2, bcl-xl) (62, 76-79).

Στα λεμφώματα Hodgkin εμπλέκεται η ενεργοποίηση οδών σηματοδότησης [Φωσφατιδυλ-ινοσιτιδίνη(PI3)-κινάση-Akt, Janus-κινάση (JAK/STAT), MAP-κινάσες (JNK, p38, ERK^{1/2})], οι οποίες επάγουν αυξημένη επιβίωση των νεοπλασματικών λεμφοκυττάρων (80-83). Η ανάλυση της ενεργοποίησης των ανωτέρω οδών σηματοδότησης στα λεμφώματα Hodgkin έγινε και μέσω μελέτης της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης σημαντικών πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε αυτές τις οδούς σηματοδότησης. Πιο συγκεκριμένα, η μελέτη της οδού Φωσφατιδυλ-ινοσιτιδίνη(PI3)-κινάσης πραγματοποιήθηκε μέσω ανάλυσης μελέτης της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης φωσφορυλιωμένης-Akt-κινάσης, η μελέτη της οδού Janus-κινάσης (JAK/STAT) μέσω ανάλυσης της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης φωσφορυλιωμένων-STAT-κινασών και η μελέτη της οδού των MAP-κινασών μέσω ανάλυσης της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης φωσφορυλιωμένων ERK^{1/2} (80-82).



Εικόνα 3: Οι κύριες οδοί μεταγωγής σήματος.

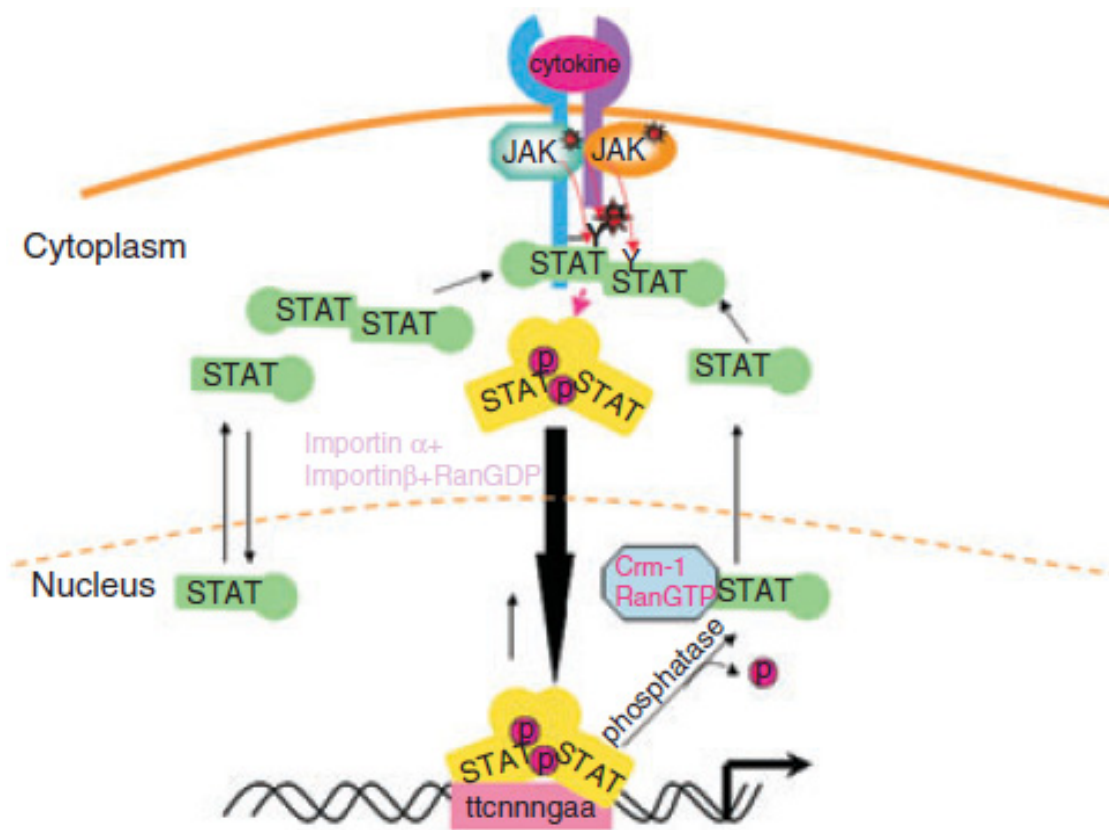
Τα αποτελέσματα πρόσφατης μελέτης έδειξαν ότι η οδός σηματοδότησης PI3-κινάσης/AKT είναι ιδιοσυστασιακά ενεργοποιημένη σε κυτταρικές σειρές DLBCL και αναστολή της PI3-κινάσης οδηγεί τα κύτταρα σε απόπτωση μέσω απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδια. Η ενεργοποίηση της οδού σηματοδότησης PI3-κινάσης/AKT μεταβάλλει την δράση πρωτεϊνών, όπως της κασπάσης 9, ορισμένων πρωτεϊνών της οικογένειας bcl-2, του NF-κB, καθώς και άλλων μεταγραφικών παραγόντων που επάγουν ή αναστέλλουν την απόπτωση. Ανώμαλη ενεργοποίηση της πρωτεΐνης STAT3, η οποία επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων, έχει περιγραφεί πρόσφατα σε DLBCL και ιδιαίτερα σε ABC-DLBCL. Από δεδομένα εργασιών, διαφαίνεται η συμβολή των AP-1 πρωτεϊνών, και ιδιαίτερα των πρωτεϊνών της οικογένειας Jun, στην παθογένεση CD30-θετικών λεμφοϋπερπλαστικών αλλοιώσεων, συμπεριλαμβανομένων των CD30-θετικών DLBCL.

1.6 ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ STAT

Η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες STAT 1, 2, 3, 4, 5a, 5b και 6. Αυτές εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση και ενεργοποιούνται μέσω του μονοπατιού Janus kinases (JAK)-STAT (84, 85). Η αλληλεπίδραση πληθώρας κυτταροκινών (π.χ. ιντερλευκίνες 6 και 13) και αυξητικών παραγόντων με τους cognate υποδοχείς τους, οδηγεί σε ενεργοποίηση μελών της οικογένειας των JAK-σχετιζόμενων υποδοχέων (JAK1, JAK2, JAK3 και TYK2) με επακόλουθη φωσφορυλίωση, διμερισμό και ενεργοποίηση των STAT. Οι τελευταίοι μεταφέρονται και παραμένουν στον πυρήνα του κυττάρου συνδεδεμένοι σε εκκινητές, με αποτέλεσμα την μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων-στόχων τους. Σε απουσία διεγερτών (π.χ. κυτταροκινών), οι μη-φωσφορυλιωμένες/ενεργοποιημένες, μονομερείς πρωτεΐνες STAT μετακινούνται παθητικά μέσω των πυρηνικών πόρων μεταξύ κυτταροπλάσματος και πυρήνα, χωρίς την ικανότητα να συνδέονται σε εκκινητές και να ενεργοποιούν γονίδια (Εικόνα 4) (84).

Βάση της λειτουργίας τους, οι πρωτεΐνες STAT μπορούν να χωριστούν σε δύο ομάδες. Η μία ομάδα περιλαμβάνει τις STAT2, STAT4 και STAT6, οι οποίες ενεργοποιούνται από μικρό αριθμό κυτταροκινών και παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των T-λεμφοκυττάρων. Η άλλη ομάδα περιλαμβάνει τις STAT1, STAT3, STAT5a και STAT5b, οι οποίες ενεργοποιούνται σε διάφορους ιστούς από πληθώρα εξωκυττάρων ερεθισμάτων και εμπλέκονται στη σηματοδότηση IFN, στην ανάπτυξη του μαζικού αδένου,

στην ανταπόκριση στο GH και στην εμβρυογένεση (86). Οι μεταγραφικοί στόχοι των πρωτεϊνών STAT και κυρίως των STAT3 και STAT5 παίζουν ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (π.χ. κυκλίνη D1, κυκλίνη D3, c-myc, p21) και την επιβίωση (π.χ. bcl-xL, mcl-1, bcl-2) (85, 87). Τα δεδομένα πολλών μελέτων υποστηρίζουν την ογκογόνο δράση των πρωτεϊνών STAT μέσω της επαγωγής: α) του κυτταρικού πολλαπλασιασμού λόγω μεταγραφικής ενεργοποίησης των κυκλινών D1 και D2 και του c-myc και καταστολής των p21 και p27 και β) της επιβίωσης λόγω μεταγραφικής ενεργοποίησης των αντι-αποπτωτικών γονιδίων mcl-1 και bcl-xL (86).



Εικόνα 4: Το σηματοδοτικό μονοπάτι JAK-STAT.

Οι πρωτεΐνες STAT φαίνεται να αλληλεπιδρούν με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, όπως με μέλη του AP-1 (88-90). Οι πρωτεΐνες STAT3 και c-Jun συνεργάζονται στη ρύθμιση της απόπτωσης (90) και η JunD συμβάλλει στην καταστολή της έκφρασης της SOCS1 (cytokine signaling 1), η οποία είναι αρνητικός ρυθμιστής του μονοπατιού JAK-STAT (91).

Η ενεργοποίηση της STAT3 επέρχεται με φωσφορυλίωσή της στην τυροσίνη 705 και η δράση της, όσον αφορά τις αιματολογικές κακοήθειες, έχει μελετηθεί καλύτερα στο πολλαπλούν μυέλωμα. Ανώμαλη ενεργοποίηση της STAT3, η οποία επάγει τον κυτταρικό

πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των νεοπλασματικών κυττάρων, έχει περιγραφεί πρόσφατα σε ABC-DLBCL, έχει συσχετιστεί με χειρότερη πρόγνωση και έχει προταθεί ως μελλοντικός χημειοθεραπευτικός στόχος (anti-STAT3) σε αυτόν τον τύπο λεμφωμάτων (92, 93). Υπερέκφραση των φωσφορυλιωμένων μορφών των STAT 3, 5 και 6 έχει παρατηρηθεί, επιπλέον, σε κλασικά λεμφώματα Hodgkin (94), της φωσφορυλιωμένης STAT3 σε ALK-θετικά DLBCL, T-λεμφώματα (π.χ. σπογγοειδής μυκητίαση), σε οξείες μυελογενείς λευχαιμίες, στο πολλαπλούν μυέλωμα και σε άλλους τύπους νεοπλασμάτων (π.χ. καρκίνωμα μαστού) (95-97) και της STAT6 σε πρωτοπαθή θυμικά B-λεμφώματα και σε πρωτοπαθή DLBCL του κεντρικού νευρικού συστήματος (98-100).

1.7 ΔΕΙΚΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ CD30

Ο δείκτης ενεργοποίησης CD30 που ανακαλύφθηκε το 1982 και αρχικά του δόθηκε η ονομασία Ki-1, είναι ένας 120-kd διαμεμβρανικός υποδοχέας κυτταροκινών (101). Βιοχημικές και μοριακές μελέτες αποκάλυψαν ότι ανήκει στην οικογένεια υποδοχέων του παράγοντα νέκρωσης όγκων (tumour necrosis factor receptor superfamily) και αναγνώρισαν τον συνδέτη του (CD30L) (102).

Παθολογική έκφραση του CD30 παρατηρείται στα νεοπλασματικά κύτταρα B και T-λεμφωμάτων καθώς και του εμβρυϊκού καρκινώματος, ενώ φυσιολογικά αυτός ο δείκτης εκφράζεται σε σπάνιες ενεργοποιημένες λεμφοβλάστες, κυρίως γύρω από δευτερογενή λεμφοζίδια (103). Το αντιγόνο CD30 εκφράζεται σε όλες τις περιπτώσεις του κλασικού λεμφώματος Hodgkin και του αναπλαστικού T-λεμφώματος από μεγάλα κύτταρα και σε μέρος περιπτώσεων του διάχυτου λεμφώματος από μεγάλα B-κύτταρα και του περιφερικού T-λεμφώματος, χωρίς ειδικούς χαρακτήρες (NOS) (1).

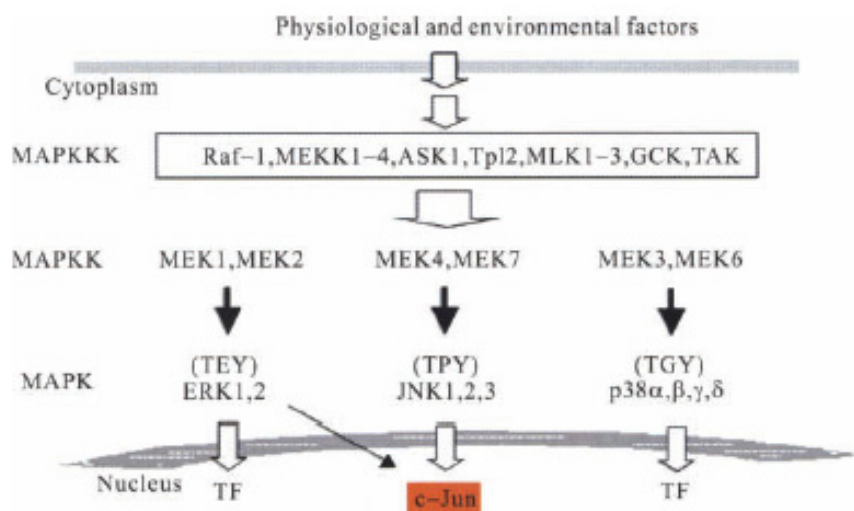
1.8 MAP-KΙΝΑΣΕΣ

Οι MAP-κινάσες (mitogen-activated protein kinases-MAPKs) είναι μία ομάδα σερίνο/θρεονικών πρωτεϊνικών κινασών, οι οποίες ενεργοποιούνται ως απάντηση σε ποικίλα εξωκυττάρια ερεθίσματα και μεσολαβούν στην μεταγωγή σημάτων από την κυτταρική μεμβράνη στον πυρήνα (104).

Οι MAPKs περιλαμβάνουν τρεις υποκατηγορίες κινασών: τις ERKs (extracellular signal-regulated kinases), τις JNKs (JUN NH₂-terminal kinases ή γνωστές ως stress-activated

protein kinase-SAPK) και τις p38. Αυτές είναι σημαντικά ένζυμα μεταγωγής σήματος, μοναδικά για τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, οι οποίες συμβάλλουν στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης (105).

Οι MAPKs φωσφορυλιώνονται από τις MAPKKs (MAP kinase kinases), στη συνέχεια φωσφορυλιώνουν διάφορους στόχους (π.χ. μεταγραφικούς παράγοντες) (Εικόνα 5) και αποφωσφορυλιώνονται / απενεργοποιούνται από διάφορες MAPK-φωσφατάσες (MKPs). Οι ERKs ενεργοποιούνται κυρίως από μιτογόνα ερεθίσματα, ενώ οι JNKs και p38 κυρίως από στρεσογόνα ερεθίσματα ή φλεγμονώδεις κυτταροκίνες (106). Ανάλογα με το ποιές ισομορφές της οικογένειας συμμετέχουν και ανάλογα με το κυτταρικό περιβάλλον, οι MAPKs διαμεσολαβούν σήματα που είτε προάγουν είτε καταστέλλουν αιματολογικές κακοήθειες. Τα τελευταία χρόνια πολυάριθμες ερευνητικές μελέτες από διαφορετικές επιστημονικές ομάδες έχουν δείξει ότι το μονοπάτι των MAPKs διαδραματίζει κύριο ρόλο στην παθογένεια ποικίλων αιματολογικών κακοηθειών (οξείες και χρόνιες λευχαιμίες, λεμφώματα, πολλαπλόν μυέλωμα) και θα μπορούσε να αποτελέσει στόχο μελλοντικών θεραπευτικών φαρμάκων (107).



Εικόνα 5: Μεταγωγή σήματος μέσω του «καταρράκτη» των MAPK κινασών που οδηγεί σε ενεργοποίηση της c-Jun. Εξωκυττάρια σήματα μεταβιβάζονται μέσω διάφορων MAPKKKs προκαλώντας φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση MAPKKs. Οι MAPKKs με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν MAPKs και αυτές με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν την c-Jun.

Οι MAPKs συμβάλλουν στην ενεργοποίηση του AP-1 μέσω φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών του (π.χ. c-Jun, ATF2) (108). Οι JNKs, οι οποίες περιλαμβάνουν τρία μέλη

(JNK1, JNK2 και JNK3), έχουν σύνθετο ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης (107). Οι JNKs μπορεί να έχουν προ-αποπτωτική, αντι-αποπτωτική ή καθόλου δράση στην απόπτωση ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και το ερέθισμα (109). Μελέτες σε ποντικούς και κυτταροκαλλιέργειες ανέδειξαν ότι ενεργοποίηση των JNKs προκαλεί φωσφορυλίωση της c-Jun στις σερίνες 63 και 73 επάγοντας κυτταρικό θάνατο μέσω του μιτοχονδριακού μονοπατιού της απόπτωσης σε νευρώνες και ινοβλάστες (110). Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι οι JNKs μπορούν να φωσφορυλιώνουν την c-Jun και στις θρεονίνες 91 και 93 και να ρυθμίσουν την δραστηριότητα και άλλων μεταγραφικών παραγόντων (JunD, ATF2, Elk-1, p53, c-Myc) εκτός του c-Jun καθώς και μη μεταγραφικών παραγόντων όπως μέλη της Bcl-2 οικογένειας πρωτεϊνών (Bcl-2, Bcl-xl, Bim και Bad) (111). Οι JNKs έχουν την ικανότητα να φωσφορυλιώνουν την JunD, αν και λιγότερο αποτελεσματικά σε σχέση με την c-Jun, ενώ τα μέχρι στιγμής γνωστά δεδομένα για το αν φωσφορυλιώνουν την JunB είναι αμφιλεγόμενα (112).

1.9 ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΤΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ-1 [ACTIVATOR PROTEIN-1 (AP-1) TRANSCRIPTION FACTOR]

Ο μεταγραφικός παράγοντας ενεργοποιητικής πρωτεΐνης-1 (activator protein-1, AP-1) είναι ένας διμερής μεταγραφικός παράγοντας, ο οποίος περιλαμβάνει μέλη των πρωτεϊνικών οικογενειών: Jun (c-Jun, JunB και JunD), Fos (c-Fos, FosB, Fra1 και Fra2), ATF (Activating Transcription Factor) (ATF2, LRF1/ATF3, B-ATF, JDP1, JDP2) και Maf (Musculoaponeurotic Fibrosarcoma) (c-Maf, MafB, MafA, MafG/F/K, Nrl) (113),(114-116).

Ο AP-1 ενεργοποιείται από διάφορα ερεθίσματα και μετατρέπει εξωκυττάρια σήματα σε μεταβολές της έκφρασης ειδικών γονιδίων-στόχων, τα οποία διαθέτουν θέσεις AP-1-σύνδεσης στις περιοχές εκκίνησης ή προαγωγής τους (117). Ο AP-1 δηλαδή μετατρέπει εξωκυττάρια σήματα σε μεταγραφικές αλλαγές διαφόρων γονιδιακών στόχων που εμπλέκονται στην κυτταρική διαφοροποίηση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την επιβίωση, την απόπτωση και την αγγειογένεση. Εκτεταμένες μελέτες σε γενετικά τροποποιημένους ποντικούς και κυτταροκαλλιέργειες έδειξαν, ότι η λειτουργική ποικιλία του AP-1 επιτυγχάνεται μέσω του σχηματισμού διμερών διαφορετικής σύστασης και με διαφορετικές βιολογικές ιδιότητες (118, 119).

Οι πρωτεΐνες του AP-1 ρυθμίζονται εν μέρει, από τα μονοπάτια των MAP-Κινασών (ERK, JNK και p38). Οι τελευταίες, λαμβάνουν σήματα προερχόμενα από αυξητικούς παράγοντες, κυτοκίνες και την εξωκυττάρια ουσία (matrix) (120). Όταν οι JNKs ενεργοποιούνται, μετακινούνται στον πυρήνα και φωσφορυλιώνουν την c-Jun. Η φωσφορυλίωση της c-Jun έχει ως αποτέλεσμα την μεταγραφική της ενεργοποίηση (121).

Ο κύριος μεταγραφικός παράγοντας της ομάδας των AP-1 πρωτεϊνών είναι η c-Jun πρωτεΐνη, η ενεργότητα της οποίας μπορεί να αμβλύνεται ή και να ανταγωνίζεται από την JunB. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας Fos δεν έχουν την ικανότητα δημιουργίας διμερών μεταξύ τους, ενώ σχηματίζουν πολύ σταθερά διμερή με τα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών Jun (122). Οι πρωτεΐνες c-Jun, JunB και Fra1 είναι σημαντικές κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, ενώ οι JunD, Fos και FosB είναι απαραίτητες μόνο μετά την γέννηση (123).

Η ρύθμιση της ενεργότητας του AP-1 είναι σύνθετη, αλλά κυρίως συμβαίνει μέσω: 1) αλλαγών στην γονιδιακή μεταγραφή των Jun και Fos και mRNA μετατροπής (turnover), 2) επιδράσεων στη σύνθεση και αποδόμηση (turnover) των πρωτεϊνών Jun και Fos, 3) φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών Jun και Fos και 4) αλληλεπιδράσεων με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες που ασκούν είτε επαγωγική είτε ανταγωνιστική δράση (124).

Οι AP-1 πρωτεΐνες παίζουν ρυθμιστικό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (όπως περιγράφεται αναλυτικότερα παρακάτω) και στην απόπτωση. Η απόπτωση φυσιολογικά χρησιμεύει στην οργανογένεση, στη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης και την καταστολή της ογκογένεσης. Οι AP-1 πρωτεΐνες είτε επάγουν την απόπτωση δρώντας ως θετικοί ρυθμιστές της, είτε την αναστέλλουν δρώντας ως αρνητικοί ρυθμιστές της ανάλογα κάθε φορά με τον κυτταρικό τύπο και το στάδιο κυτταρικής διαφοροποίησης (125). Η c-Jun επάγει την απόπτωση μέσω θετικής ρύθμισης δύο προ-αποπτωτικών μορίων, του Bim (μέλος της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών) και του Fas συνδέτη (Fas-ligand, Fas-L ή CD95L) (126, 127).

1.10 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ JUN (Cellular-JUN)

Στα θηλαστικά η οικογένεια των πρωτεϊνών Jun περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες c-Jun, JunB και JunD, οι οποίες είναι προϊόντα των αντίστοιχων πρωτο-ογκογονιδίων (78, 113). Αυτές σχηματίζουν διμερή μεταξύ τους ή με άλλες πρωτεΐνες της οικογένειας των πρωτεϊνών Fos και ATF.

Οι πρωτεΐνες c-Jun και JunB παρά την ομοιότητα τους στην πρωτοταγή δομή και στην ειδικότητα σύνδεσής τους στο DNA, διαφέρουν στην μεταγραφική τους ικανότητα. Και οι δύο έχουν την δυνατότητα να δρουν είτε ως επαγωγείς είτε ως αναστολείς μεταγραφής γονιδίων ανάλογα με τον εκκινητή και το ετεροδιμερές τους. Σε μερικούς ιστούς οι c-Jun και JunB ασκούν ανταγωνιστικές δράσεις σε βιολογικές διαδικασίες, όπως είναι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός. Για αυτό οι πρωτεΐνες αυτές είναι ικανές να ρυθμίζουν αντίθετες λειτουργίες, όπως την προαγωγή ή/και την καταστολή της ογκογένεσης.(128)

Η c-Jun είναι μεταγραφικός ενεργοποιητής και το πιο δραστικό μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών Jun. Η ενεργότητά της (αντίθετα από την JunB) έχει την ικανότητα να ρυθμίζεται απευθείας σε επίπεδο πρωτεΐνης από αμινοτελικές φωσφορυλιώσεις των σερινών στις θέσεις 63 και 73 και των θρεονινών στις θέσεις 91 και 93 που επιτυγχάνονται από τις Jun NH₂-τελικές κινάσες (JUN NH₂-terminal kinases-JNKs) (129-131). Η φωσφορυλίωση της c-Jun κυρίως στην σερίνη στη θέση 73 και λιγότερο συχνά στη θέση 63 έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της μεταγραφικής της ικανότητας και ενεργοποίησης, καθώς και την σταθεροποίησή της (116, 132).

Η c-Jun είναι ένας αποτελεσματικός ενεργοποιητής προαγωγών/εκκινητών γονιδίων που φέρουν μία μόνο AP-1-θέση σύνδεσης (133, 134). Το γονίδιο της c-Jun εκφράζεται σε πολλούς τύπους κυττάρων σε χαμηλά όμως επίπεδα και η έκφρασή του αυξάνεται ως απάντηση σε διάφορους διεγερτικούς παράγοντες όπως αυξητικοί παράγοντες, κυτταροκίνες και UV ακτινοβολία (116).

Ποντικοί στους οποίους δεν εκφράζεται η c-Jun πεθαίνουν μεταξύ δωδεκάτης και δέκατης τέταρτης ημέρας της εμβρυϊκής ζωής και παρουσιάζουν ανωμαλίες στη μορφογένεση της καρδιάς και στην ανάπτυξη του ήπατος, όπως επίσης και απόλυτη απουσία πολλαπλασιασμού ινοβλαστών (116, 135-137).

Έχει παρατηρηθεί ανώμαλη έκφραση της c-Jun στο κλασικό λέμφωμα Hodgkin και σε άλλες CD30-θετικές λεμφοϋπερπλαστικές εξεργασίες, συμπεριλαμβανομένων των κατωτέρω οντοτήτων: αναπλαστικό λέμφωμα από μεγάλα κύτταρα ALK-θετικό και ALK-αρνητικό, πρωτοπαθές δερματικό αναπλαστικό λέμφωμα από μεγάλα κύτταρα, λεμφωματοειδή βλατίδωση και CD30-θετικό DLBCL (78). Ανοσοϊστοχημική έκφραση της c-Jun σε CD30-θετικό DLBCL έχει ανιχνευτεί από τους Drakos και συν. (2007) σε μικρό όμως δείγμα, το οποίο περιελάμβανε έντεκα (11) μόνο περιπτώσεις. Οι ίδιοι μελετητές, ανίχνευσαν πιο συχνά και υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της φωσφορυλιωμένης c-Jun στην σερίνη 73 (^{Ser73}ph-c-Jun) σε κλασικά λεμφώματα Hodgkin και σε ALK-θετικά αναπλαστικά λεμφώματα από μεγάλα

κύτταρα σε σχέση με άλλα CD30-θετικά λεμφώματα. Στην μελέτη τους για p-c-Jun περιελήφθησαν πέντε (5) περιπτώσεις CD30-θετικών DLBCL (120).

Στο κλασικό λέμφωμα Hodgkin, η ενεργοποίηση της c-Jun δεν είναι MAP-κινάσοεξαρτώμενη αλλά αυτορρυθμιζόμενη μέσω σύνδεσής της σε δικό της εκκινητή.

Τρεις άλλες ερευνητικές ομάδες έχουν αναφέρει έκφραση της c-Jun σε νεοπλάσματα Β-κυτταρικής προέλευσης. Ο Mathas και συν. (2002), διαπίστωσαν μέτρια έκφραση της c-Jun σε υποομάδα πλασματοκυτταρικών μυελωμάτων, DLBCL και Τ-λεμφωμάτων χωρίς όμως να προσδιορίζουν την έκφραση του CD30 σε αυτά (78). Ο Szremska και συν. (2003) ανίχνευσαν έκφραση της c-Jun σε DLBCL, οζώδη/θυλακιώδη Β-λεμφώματα και Β-χρόνιες λεμφοκυτταρικές λευχαιμίες/λεμφώματα μικρών λεμφοκυττάρων σε ποσοστό 80%, 80% και 40% των περιπτώσεων που εξέτασαν, αντίστοιχα (138). Ο Troen και συν. (2004) δημοσίευσαν υπερέκφραση της c-Jun και άλλων μελών της οικογένειας AP-1 σε σπληνικά λεμφώματα οριακής ζώνης (139). Οι διαπιστώσεις των δύο τελευταίων ομάδων, δεν επιβεβαιώθηκαν από μεταγενέστερες δημοσιεύσεις άλλων μελετητών (120, 140).

Αποδεδειγμένη, τα τελευταία χρόνια, ογκογόνο δράση έχει η c-Jun και σε άλλους τύπους νεοπλασμάτων, όπως στο μελάνωμα, το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα και σε αδιαφοροποίητα, επιθετικά σαρκώματα (112, 141).

1.11 ΠΡΩΤΕΪΝΗ JUNB

Η JunB είναι μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών Jun και δρα τόσο ως μεταγραφικός ενεργοποιητής όσο και ως καταστολέας. Ο τύπος της δράσης της εξαρτάται από τον εκκινητή (DNA-binding) και από την σύνθεση του ετεροδιμερούς (133, 134). Η JunB (σε αντίθεση με την c-Jun) δρά περισσότερο αποτελεσματικά ενεργοποιώντας εκκινητές που περιέχουν επαναλαμβανόμενες (και όχι μία) AP-1 θέσεις σύνδεσης και είναι ικανή να ανταγωνίζεται την ενεργοποίηση της AP-1-θέσης σύνδεσης της c-Jun (133, 134). Η JunB ρυθμίζει διάφορα γονίδια-στόχους και η δράση της δεν εξαρτάται από την δράση της c-Jun (142).

Σε διαγονιδιακά ποντίκια, απενεργοποίηση της JunB έχει ως αποτέλεσμα εμβρυϊκό θάνατο περίπου την ένατη ημέρα, ο οποίος οφείλεται σε διαταραχές της αγγειογένεσης (vasculogenesis and angiogenesis) και σε εξωεμβρυϊκούς ιστούς (143). Αντίθετα, έκτοπη έκφραση της JunB (κάτω από τον έλεγχο του εκκινητή του ανθρώπινου γονιδίου της ουμπικουϊτίνης-C) δεν αναστρέφει το φαινότυπο (143-145). Επιπρόσθετα, υπερέκφραση της

JunB επάγει τη διαφοροποίηση των T-βοηθητικών λεμφοκυττάρων δια της επαγωγικής ρύθμισης της ιντερλευκίνης-4 (142, 146).

Μελέτες σε κυτταρικές σειρές και ιστούς ανέδειξαν ότι η JunB συνδεδεμένη σε AP-1 θέση υπερεκφράζεται στο κλασικό λέμφωμα Hodgkin και ότι, σε αντίθεση με την c-Jun, βρίσκεται υπό τον ρυθμιστικό έλεγχο του NFκB (78, 147). Επιπλέον, σε κυτταροκαλλιέργειες Hodgkin και Reed-Sternberg κυττάρων, η JunB βρέθηκε να συνδέεται με τον εκκινητή του γονιδίου CD30, επάγοντας την μεταγραφή του γονιδίου και την υπερέκφραση του CD30 σε επίπεδο πρωτεΐνης (147, 148).

Ο Rassidakis και συν. (2005) βρήκαν έκφραση της JunB σε 41 από τις 42 (98%) περιπτώσεις συστηματικών αναπλαστικών λεμφωμάτων από μεγάλα κύτταρα και σε όλες τις περιπτώσεις κλασικών λεμφωμάτων Hodgkin, CD30-θετικών DLBCL (11 περιπτώσεις), πρωτοπαθών δερματικών αναπλαστικών λεμφωμάτων από μεγάλα κύτταρα και λεμφωματοειδών βλατιδώσεων. Στην ίδια μελέτη περιελήφθησαν και 42 περιπτώσεις CD30-αρνητικών DLBCL, σε καμία από τις οποίες δεν παρατηρήθηκε έκφραση της JunB (149). Ακόμη, ο Mao και συν. (2003 και 2008) δημοσίευσαν ότι σε υποομάδα πρωτοπαθών δερματικών T-λεμφωμάτων (συμπεριλαμβανομένων των κατωτέρω οντοτήτων: πρωτοπαθές δερματικό αναπλαστικό λέμφωμα από μεγάλα κύτταρα, σπογγοειδής μυκητίαση, σύνδρομο Sezary) παρατηρήθηκε ανοσοϊστοχημική έκφραση της JunB (150, 151).

Η JunB εκφράζεται σταθερά στα ανθρώπινα ώριμα κοκκιοκύτταρα και έχει παρατηρηθεί έντονη επαγωγή της έκφρασής της σε τελικά στάδια διαφοροποίησης κυττάρων της μυελικής σειράς. Έχει όμως απομονωθεί και σε μελέτη ανίχνευσης γονιδίων που εμπλέκονται στα αρχικά στάδια διαφοροποίησης των κυττάρων της αιμοποιητικής αυτής σειράς. Για αυτό, μέχρι στιγμής επικρατεί η άποψη ότι η JunB διαδραματίζει ρόλο στην εκκίνηση, την εξέλιξη και τη διατήρηση της μυελικής διαφοροποίησης, χωρίς όμως να έχει ξεκαθαριστεί ακόμη ο ακριβής ρόλος της (152-154). Πρόσφατες δημοσιεύσεις υποστηρίζουν, ότι η ενεργότητα της JunB στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία είναι σημαντικά μειωμένη σε σχέση με τα κύτταρα του περιφερικού αίματος υγιών ενηλίκων (155). Επιπρόσθετα, απενεργοποίηση της JunB σε ποντίκια έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη σε αυτά μυελοϋπερπλαστικών αλλοιώσεων με χαρακτηριστικά κοινά με τη χρόνια μυελογενή λευχαιμία των ανθρώπων (156, 157).

1.12 ΠΡΩΤΕΪΝΗ JUN D

Η JunD, το τρίτο μέλος των πρωτεϊνών της οικογένειας Jun, είναι το λιγότερο μελετημένο. Ομοιάζει περισσότερο όσον αναφορά την αλληλουχία της στην c-Jun σε σχέση με την JunB (133, 158) και σε αντίθεση με τα άλλα δύο μέλη εκφράζεται συχνότερα σε φυσιολογικούς (π.χ. θύμο αδένες, σπλήνα, πνεύμονα) παρά σε νεοπλασματικούς ιστούς (159). Αυξημένη μεταγραφή της παρατηρείται σε κύτταρα που βρίσκονται σε ηρεμία και ενεργοποιείται μόνο ασθενώς ως απάντηση σε διάφορους διεγέρτες (160). Η δράση της δεν είναι απαραίτητη κατά την διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης αλλά μόνο μετά την γέννηση (161). Σε κυτταρικές σειρές ποντικών βρέθηκε ότι η JunD μπορεί να δράσει ως θετικός ρυθμιστής στην ανάπτυξη T-λεμφοκυττάρων μέσω επαγωγής της από την ιντερλευκίνη 7 (162).

Ο Mao και συν. (2008) έχουν περιγράψει ανοσοϊστοχημική έκφραση της JunD σε πάνω από το 50% του νεοπλασματικού πληθυσμού σε 16 (16/23, 70%) περιπτώσεων σπογγιοειδούς μυκητιάσης και σε 7 (7/33, 21%) περιπτώσεις συνδρόμου Sezary. Σε 2 από τις 7 θετικές περιπτώσεις συνδρόμου Sezary ανίχνευσαν, επιπλέον, αυξημένα επίπεδα JunD mRNA με τη μέθοδο της πραγματικού χρόνου RT-PCR (151). Ο Troen και συν. (2004) έχουν δημοσιεύσει υπερέκφραση της JunD σε σπληνικά λεμφώματα οριακής ζώνης (139), εύρημα το οποίο δεν επιβεβαιώθηκε από δημοσιεύσεις που ακολούθησαν (120, 140).

1.13 ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ JUN ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ

Οι πρωτεΐνες του μεταγραφικού παράγοντα AP-1 έχουν ογκογόνο δράση. Συγκεκριμένα, η c-Jun και η JunB έχουν ανταγωνιστική δράση σε διάφορα κυτταρικά φαινόμενα, όπως στην ογκογόνο μεταμόρφωση και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (118, 163). Η ισορροπία μεταξύ της ανταγωνιστικής δράσης της JunB και c-Jun κατά την διάρκεια της μίτωσης έχει ιδιαίτερη σημασία στη ρύθμιση της προόδου του κυτταρικού κύκλου (Εικόνα 6) (164). Η c-Jun είναι, κυρίως, θετικός ρυθμιστής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ενώ η JunB αρνητικός (τουλάχιστον σε μερικούς τύπους κυττάρων) (165). Μελέτες σε ινοβλάστες έδειξαν ότι η c-Jun δρα ως ογκοπρωτεΐνη ενεργοποιώντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενώ η JunB καταστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και δρα ως αντι-ογκογόνο (89).

Αποτελέσματα πολλών μελετών υποστηρίζουν, ότι η c-Jun είναι απαραίτητη για την μετάβαση των κυττάρων πέραν της μεσόφασης G1/S του κυτταρικού κύκλου. Ενδιαφέρον προκαλεί το εύρημα, ότι τα επίπεδα της c-Jun δε μεταβάλλονται σημαντικά κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, αλλά το ότι η πρωτεΐνη φωσφορυλιώνεται καθώς το κύτταρο περνάει από την φάση G2 στην M (89, 164). Από την άλλη μεριά, η JunB προκαλεί παράταση της G1 φάσης (166).

Η c-Jun ενεργοποιεί τον εκκινητή του γονιδίου CcNd1 που κωδικοποιεί την κυκλίνη D1 (θετικός ρυθμιστής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού), επομένως ελαττωμένη έκφραση της c-Jun μπορεί να συμβάλλει στη μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (164). Επιπλέον, η JunB ασκεί ανταγωνιστική δράση στη διαμεσολαβούμενη από την c-Jun ενεργοποίηση του εκκινητή του γονιδίου CcNDI, με αποτέλεσμα ελάττωση των επιπέδων έκφρασης της κυκλίνης D1 σε κύτταρα που υπερεκφράζουν την Jun B.

Η JunB καταστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω: 1) καταστολής της κυκλίνης D1 (164) 2) άμεσης μεταγραφικής ενεργοποίησης του γονιδίου P16^{INK4a} και επακόλουθης αύξησης των επιπέδων της πρωτεΐνης p16 (166), και 3) ρύθμισης της έκφρασης των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl2 και Bcl-X (157, 166).

Η c-Jun επιτυγχάνει την προαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέσω καταστολής ογκοκατασταλτικών γονιδίων (αρνητικών ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου) όπως των p53, p21cip1/waf1 και p16. Στον Πίνακα 2, παρατίθεται αναλυτικότερα η δράση της κάθε πρωτεΐνης της οικογένειας Jun σε σχέση με γονίδια που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση. Ινοβλάστες στις οποίες απουσιάζει η c-Jun παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης p53 λόγω αυξημένης μεταγραφικής δραστηριότητας του ογκοκατασταλτικού γονιδίου P53 (αρνητικού ρυθμιστή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού). Η c-Jun εκτός του ότι μειώνει την μεταγραφική δραστηριότητα του p53, καταστέλλει και την ικανότητά του p53 να ενεργοποιεί το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p21cip1/waf1. Η τελευταία, είναι αναστολέας κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (CDK) και υπεύθυνη για την δράση του p53 ως αναστολέα κυτταρικού πολλαπλασιασμού (122, 167, 168). Επιπλέον, η c-Jun συνεργάζεται με την ras (169) και αναστέλλει την προ-αποπτωτική δράση του p53 κατά την ανάπτυξη ηπατικών όγκων σε ποντικούς (135).

In vivo, η σταθερή ενεργός δράση του RAS προκαλεί, μέσω ενεργοποίησης MAPK-κινασών, φωσφορυλίωση της c-Jun με αποτέλεσμα μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων-στόχων και επακόλουθη ογκογένεση (170, 171). Από την άλλη πλευρά, η υπερέκφραση της

JunB καταστέλλει την ογκογόνο δράση του RAS και του SRC, υποδηλώνοντας πιθανή ογκοκατασταλτική δράση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης.

Πίνακας 2: Η δράση των πρωτεϊνών της οικογένειας Jun σε γονίδια που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση.

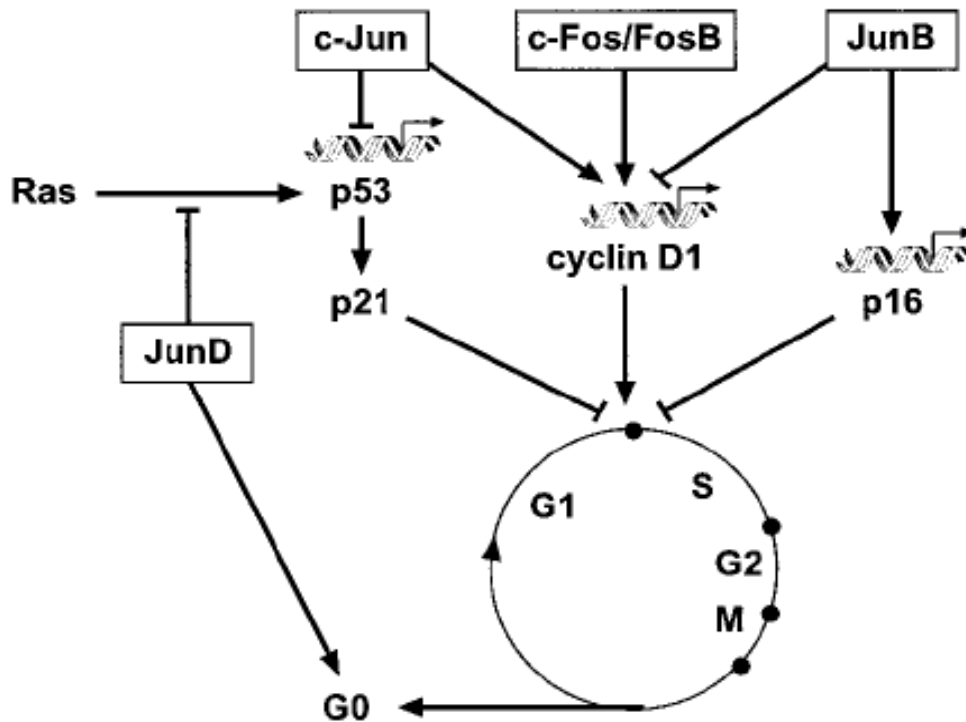
Γονίδιο	c-Jun	JunB	JunD
Κυκλίνη D1	↑	↓	-
p16	↓	↑	-
p19 ^{Arf}	-	-	↓
p53 και p21 ^{cip1/waf1}	↓	↓	-
FasL	↑	-	-

Σε ινοβλάστες του δέρματος οι c-Jun και JunB δρουν ανταγωνιστικά και ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των κυττάρων της επιδερμίδας μέσω της ρύθμισης έκφρασης των αυξητικών παραγόντων των κερατινοκυττάρων και του παράγοντα ενεργοποίησης της αποικίας των κοκκιοκυττάρων\μακροφάγων (granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF). Πιο συγκεκριμένα, σε κυτταρικές καλλιέργειες c-Jun^{-/-} ινοβλαστών παρατηρήθηκε σχηματισμός επιθηλίου με λιγότερες στιβάδες από ότι φυσιολογικά και μειωμένος αριθμός κυττάρων της βασικής στιβάδας σε κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενώ σε JunB^{-/-} υπερτροφικού επιθηλίου και αυξημένος αριθμός κυττάρων της βασικής στιβάδας σε κυτταρικό πολλαπλασιασμό (172).

Ο ρόλος της JunD στην ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού είναι πιο πολύπλοκος. Δρα επαγωγικά ή ανασταλτικά ανάλογα με τις συνθήκες και τα ερεθίσματα, αλλά κυρίως δρα ως θετικός ρυθμιστής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (89). Ινοβλάστες με έλλειψη της JunD παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p19^{Arf}, η οποία μέσω της απενεργοποίησης του Mdm2 (αρνητικού ρυθμιστή της p53) προκαλεί αύξηση των επιπέδων της p53 (173). Άλλη μελέτη όμως σε αθανатоποιημένα JunD^{-/-} κύτταρα διαπίστωσε στα κύτταρα αυτά αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, υψηλά επίπεδα της κυκλίνης D1 και επαγωγή p53-εξαρτώμενης απόπτωσης μετά από έκθεση σε UV

ακτινοβολία. Ο φαινότυπος αυτός είναι σχεδόν όμοιος με αυτόν των ινοβλαστών ποντικών που υπερεκφράζουν c-Jun, γεγονός που οδήγησε μελετητές να υποθέσουν, ότι πιθανώς η c-Jun υπερεκφράζεται μετά από αθανатоποίηση JunD^{-/-} κυττάρων για να καλυφθεί η έλλειψη της δράσης της JunD (174). Ο ρόλος της JunD στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου δεν έχει διευκρινιστεί, παρόλα αυτά οι μέχρι τώρα μελέτες έχουν καταδείξει ότι η JunD δεν έχει τόσο ικανή επαγωγική δράση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό όσο η c-Jun.

Δύο μοντέλα έχουν προταθεί με στόχο να δοθεί ερμηνεία στις διαφορούμενες και αντιφατικές επιδράσεις των AP-1 πρωτεϊνών στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση. Το πρώτο μοντέλο προτείνει ότι η επαγωγή του AP-1 έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση διαφόρων γονιδίων, τα προϊόντα των οποίων είναι είτε θετικοί είτε αρνητικοί ρυθμιστές της απόπτωσης. Η ισορροπία μεταξύ προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών γονιδίων στόχων, η οποία μεταβάλλεται ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, το ερέθισμα και την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, είναι αυτή που τελικά καθορίζει εάν το τελικό αποτέλεσμα θα είναι η κυτταρική επιβίωση ή ο θάνατος. Σύμφωνα με την δεύτερη θεωρία, το AP-1 δρα ως ομοιοστατικός ρυθμιστής, ο οποίος διατηρεί τα κύτταρα σε συγκεκριμένη κατάσταση πολλαπλασιασμού. Αλλαγές στο περιβάλλον του κυττάρου μπορεί να επιφέρουν ενίσχυση της δραστηριότητας του AP-1. Συνεχής ενεργοποίηση του AP-1 σε κύτταρα, τα οποία δεν μπορούν να πολλαπλασιασθούν, πιθανώς ενεργοποιεί την απόπτωση μέσω των ίδιων μηχανισμών που την ενεργοποιούν σε συνεχή έκφραση ογκογονιδίων. Αντιθέτως, ενεργοποίηση του AP-1 σε κύτταρα που έχουν ικανότητα πολλαπλασιασμού θα οδηγήσει σε επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και κυτταρική επιβίωση (122).



Εικόνα 6: Η δράση πρωτεϊνών AP-1 στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου.

1.14 ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ JUN ΣΤΗΝ Β-ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ

Έχει βρεθεί με μελέτες σε κυτταρικές σειρές (ποντικών και ανθρώπων) ότι Β-λεμφώματα (DLBCL, λέμφωμα Burkitt, οζώδες λέμφωμα) εκφράζουν υψηλά επίπεδα της ενεργοποιημένης (φωσφορυλιωμένης) μορφής του JNK (pJNK), ενώ δεν παρατηρούνται υψηλά επίπεδα σε Β-λεμφοκύτταρα που είναι σε ηρεμία (resting). Σπληνικά Β-λεμφοκύτταρα και Β-λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος εκφράζουν ενεργοποιημένες μορφές του JNK, όταν είτε ο Β-κυτταρικός υποδοχέας (BCR) είτε ο CD72 (συν-υποδοχέας των Β-λεμφοκυττάρων) συνδεθεί σε αυτά, γεγονός που επάγει τον φυσιολογικό Β-κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Επιπλέον, με μελέτες έκφρασης του γονιδιακού προφίλ των DLBCL διαπιστώθηκε αυξημένη έκφραση του JNK mRNA στο 60% των λεμφωμάτων αυτών (2). Ο Gururajan και συν. (2005) έδειξαν ότι οι JNKs φαίνεται ότι διαδραματίζουν έναν μοναδικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των Β-λεμφωμάτων. Στην μελέτη αυτή βρέθηκε, ότι αναστολείς των JNKs προκαλούν απόπτωση και διακοπή του κυτταρικού κύκλου των νεοπλασματικών Β-λεμφοκυττάρων στην G2/M φάση και ως εκ τούτου θα

μπορούσαν στο μέλλον να χρησιμοποιηθούν στην θεραπεία Β-λεμφομάτων, ιδιαίτερα στα DLBCLs προερχόμενα από ενεργοποιημένα Β-λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος (ABC/non-GC DLBCL). (175-178)

Ο Szremska και συν. (2003), μελετώντας διαγονιδιακά ποντίκια περιέγραψαν ότι η έκφραση της JunB διακόπτει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των Β αλλά όχι και των Τ-λεμφοκυττάρων, υποδηλώνοντας διαφορετική ικανότητα επίδρασης της JunB στις διάφορες υποομάδες λεμφοκυττάρων. Η μελέτη τους περιορίστηκε σε φυσιολογικά λεμφοκύτταρα και δεν περιέλαβε νεοπλασματικά (138).

Σημαντικό εύρημα αποτελεί η διαπίστωση ότι σε καλλιέργειες Β-λεμφοκυττάρων ποντικών ότι η JunD όχι μόνο ενισχύει την έκφραση του Bcl-6 των Β-κυττάρων του βλαστικού κέντρου αλλά και ότι είναι ο κύριος μεταγραφικός επαγωγέας της έκφρασής του σε αυτόν τον τύπο των Β-λεμφοκυττάρων (179).

Όσον αναφορά την c-Jun, φαίνεται ότι αυτή δεν διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην Β-κυτταρική διαφοροποίηση. Αρχέγονα κύτταρα γενετικά τροποποιημένων ποντικών c-Jun^{-/-} διαθέτουν φυσιολογική κυτταρική ανάπτυξη και δυνατότητα διαφοροποίησης. Επιπλέον, τα Β-λεμφοκύτταρά τους είναι σε φυσιολογικά επίπεδα και τα πλασματοκύτταρά τους έχουν την ικανότητα να παράγουν ανοσοσφαιρίνες (180, 181).

1.15 ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ

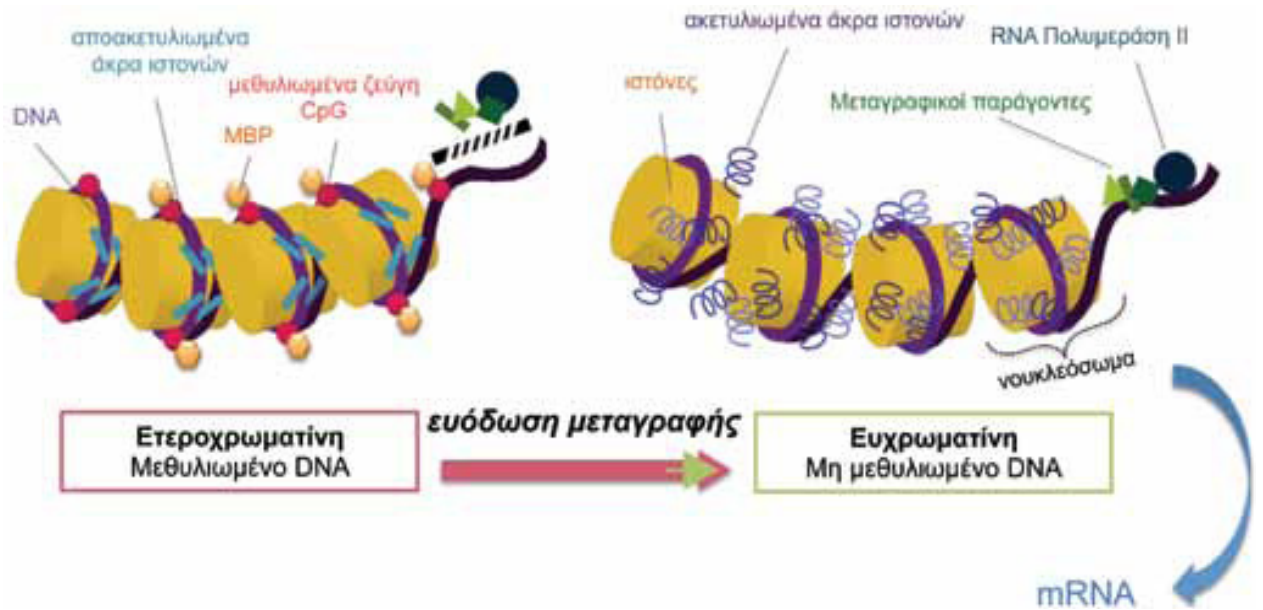
Επιγενετική είναι η μελέτη των μιτωτικών ή μειωτικών κληρονομούμενων αλλαγών της έκφρασης γονιδίων χωρίς να μεταβάλλεται η υποκείμενη αλληλουχία του DNA (182). Οι καλύτερα γνωστοί επιγενετικοί μηχανισμοί που μεταφέρουν επιγενετική πληροφορία και επηρεάζουν την γονιδιακή έκφραση είναι η μεθυλίωση του DNA και η ακετυλίωση των ιστονών (183, 184). Η μεθυλίωση νησιδίων CpG (Cytosine phospho Guanine) σε εκκινητές γονιδίων αποτελεί κεντρικό επιγενετικό μηχανισμό μεταγραφικής αποσιώπησης/αδρανοποίησης ογκοκατασταλτικών γονιδίων σε νεοπλασίες (185).

Η καρκινογένεση είναι μία διαδικασία που περιλαμβάνει πολλαπλές γενετικές διαταραχές, όπως γονιδιακές μεταλλάξεις, ελλείψεις και μεταθέσεις, οι οποίες συμβάλλουν στον προοδευτικό μετασχηματισμό φυσιολογικών κυττάρων σε νεοπλασματικά (186). Οι γενετικές διαταραχές δε μπόρεσαν ωστόσο να εξηγήσουν την εκτεταμένη φαινοτυπική πολυπλοκότητα σε δεδομένο κυτταρικό πληθυσμό ούτε και τη διαφορετική προδιάθεση σε

λοιμώξεις ή νεοπλάσματα που παρουσιάζουν κλωνοποιημένοι οργανισμοί ή μονοζυγωτικά δίδυμα, που έχουν πανομοιότυπη αλληλουχία DNA (187, 188). Μερική εξήγηση στα βιολογικά αυτά φαινόμενα έχει δώσει τα τελευταία χρόνια η επιγενετική, η οποία αναφέρεται στη μελέτη των αλλαγών της γονιδιακής έκφρασης με μηχανισμούς που δεν επηρεάζουν την γονιδιακή αλληλουχία του DNA (189). Οι αλλαγές αυτές παραμένουν κατά την κυτταρική διαίρεση, δηλαδή κληρονομούνται, είναι δυνητικά αναστρέψιμες και συμβάλλουν στη φαινοτυπική πολυπλοκότητα κατά τη μορφογένεση (187, 190). Οι επιγενετικές αλλαγές λειτουργούν σαν ένα είδος «διακόπτη», ο οποίος ενεργοποιεί μόνο όσα γονίδια πρέπει να εκφραστούν σε κάθε κυτταρικό τύπο (191). Επιπρόσθετα, αποτελούν ένα είδος μνήμης, η οποία κληρονομείται από το ένα κύτταρο στο θυγατρικό του, και ως εκ τούτου με αυτόν τον τρόπο τα νέα κύτταρα ενός ιστού διατηρούν την ταυτότητα του ιστού στον οποίο ανήκουν (192, 193).

1.15.1 Βασικές έννοιες επιγενετικών τροποποιήσεων

Στον πυρήνα των κυττάρων το DNA οργανώνεται ως χρωματίνη, στην οποία το DNA συμπλέκεται με δομικές πρωτεΐνες και οργανώνεται σε νουκλεοσώματα. Κάθε νουκλεοσώμα αποτελείται από DNA μήκους 147 ζευγών βάσεων το οποίο είναι διπλά περιτυλιγμένο γύρω από ένα οκταμερές ιστονών (2 μόρια από κάθε μια από τις ιστόνες: H2A, H2B, H3, H4) (190). Η ανοικτή δομή της χρωματίνης, η ευχρωματίνη είναι μεταγραφικά ενεργός, αντίθετα η ετεροχρωματίνη είναι μεταγραφικά ανενεργός. Η αλλαγή στη δομή της χρωματίνης (από ετεροχρωματίνη σε ευχρωματίνη) αποτελεί προϋπόθεση για να επιτραπεί σε μεταγραφικούς παράγοντες αλλά και στην RNA πολυμεράση να αλληλεπιδράσουν με τον εκκινητή του γονιδίου και να ξεκινήσει η μεταγραφή. Για να διατηρήσει η χρωματίνη την ανοικτή της δομή (ευχρωματίνη) θα πρέπει το DNA να μην είναι μεθυλιωμένο και οι ιστόνες να είναι ακετυλιωμένες (Εικόνα 7) (194).



Εικόνα 7: Η αλλαγή στη δομή της χρωματίνης (από ετεροχρωματίνη σε ευχρωματίνη) αποτελεί προϋπόθεση για να επιτραπεί σε μεταγραφικούς παράγοντες, αλλά και στην RNA πολυμεράση να αλληλεπιδράσουν με τον εκκινητή του γονιδίου και να ξεκινήσει η μεταγραφή.

1.15.2 Μεθυλίωση του DNA

Η μεθυλίωση του DNA είναι ένας τύπος χημικής τροποποίησης που, όπως προαναφέρθηκε, μπορεί να κληρονομηθεί αλλά δεν επιφέρει αλλαγή στην αλληλουχία του DNA. Η μεθυλίωση του DNA περιλαμβάνει την προσθήκη μιας μεθυλ-ομάδας στη θέση 5 του άνθρακα του δακτυλίου της κυτοσίνης με τη δράση μεθυλοτρανσφερασών (DNMTs) (195). Στον ανθρώπινο οργανισμό τη μεθυλίωση του DNA καταλύουν οι DNMT1, DNMT3a και η DNMT3b (193). Αυτή η τροποποίηση λαμβάνει χώρα μόνο όταν η κυτοσίνη ακολουθείται από μία βάση γουανίνης, δηλαδή μόνο το δινουκλεοτίδιο CpG μπορεί να είναι μεθυλιωμένο (όπου p φωσφοδιεστερικός δεσμός μεταξύ γουανίνης και κυτοσίνης) (187).

Οι περιοχές που είναι πλούσιες σε CpG δινουκλεοτίδια, ονομάζονται «CpG νησίδες». Περίπου το 70% των γονιδιακών εκκινητών στον άνθρωπο περιλαμβάνουν CpG νησίδες. Η υπερμεθυλίωση των CpG νησιδίων που βρίσκονται σε περιοχές εκκινητών ογκοκατασταλτικών γονιδίων έχει καθιερωθεί πλέον ως ένας σημαντικός μηχανισμός γονιδιακής αδρανοποίησης (196). Η σχέση μεταξύ CpG μεθυλίωσης και αποσιώπησης της γονιδιακής μεταγραφής είναι πιο έκδηλη σε δύο φυσιολογικές καταστάσεις: στην αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X και στη γονιδιακή αποτύπωση (imprinting) (197). Και

στις δύο καταστάσεις, το ένα από τα δύο αντίγραφα του εμπλεκόμενου γονιδίου είναι μεταγραφικά ανενεργό λόγω μεθυλίωσης του εκκινήτη του, ενώ το μη μεθυλιωμένο αλληλίο εκφράζεται κανονικά. Απόδειξη του άμεσου ρόλου της μεθυλίωσης στη διατήρηση μεταγραφικής αποσιώπησης προέρχεται από μελέτες, όπου άρση της μεθυλίωσης μέσω φαρμακολογικής ή γενετικής μείωσης της δραστηριότητας των DNMTs είχε ως αποτέλεσμα αποκατάσταση της έκφρασης, σε συνδυασμό με μειωμένη μεθυλίωση των υπό μελέτη εκκινήτων (184, 198-201).

Η μεθυλίωση των CpG νησιδίων των εκκινήτων των γονιδίων είναι συχνή σε διάφορα νεοπλάσματα και σχετίζεται με ανώμαλη απενεργοποίηση διάφορων ογκοκατασταλτικών γονιδίων και επέρχεται σε διάφορα στάδια ανάπτυξης τους. Συχνότερα, η μεθυλίωση αφορά γονίδια, τα οποία εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (P16INK4A, P15INK4A, Rb, P14ARF), στην απόπτωση (DAPK, TMS1), σε μεταγραφικούς παράγοντες (GATA-4, GATA-5, ID4), στις κινάσες της τυροσίνης (SOCS-1, SOCS-2, SYK) και στην επιδιόρθωση του DNA (BRCA1, MGMT).

1.15.3 Κώδικας των ιστονών

Οι ιστόνες (H2A, H2B, H3, H4) είναι μικρές πρωτεΐνες γύρω από τις οποίες περιτυλίσσεται το DNA για το σχηματισμό του νουκλεοσώματος. Οι ιστόνες H2A και H2B έχουν κυρίως δομικό ρόλο, ενώ οι ιστόνες H3 και H4 φαίνεται να έχουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής μεταγραφής (202). Συγκεκριμένα, οι ιστόνες αυτές έχουν αμινοτελικά άκρα τα οποία έρχονται σε επαφή με το DNA και μπορούν να υποστούν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως ακετυλίωση, μεθυλίωση, ουμπικουιτινίωση, φωσφορυλίωση και άλλες. Το σύνολο αυτών των τροποποιήσεων αποτελούν τον «κώδικα των ιστονών» (184). Η ακετυλίωση των ιστονών H3 και H4 σχετίζεται χαρακτηριστικά με ενεργοποίηση της μεταγραφικής δραστηριότητας (203). Αντίθετα, η μεθυλίωση των ιστονών μπορεί να σχετίζεται με ενεργοποίηση ή αποσιώπηση της μεταγραφής (204, 205).

1.16 ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ JUN ΣΕ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Τα δεδομένα στη διεθνή βιβλιογραφία για επιγενετικές διαταραχές γονιδίων της οικογενείας Jun σε αιματολογικές κακοήθειες είναι περιορισμένα και αυτά αφορούν αποκλειστικά στο JunB, όχι ακόμα στο c-Jun και JunD.

Σε δημοσίευσή τους ο Yang και συν. (2003) (155) υποστηρίζουν ότι η ενεργότητα της JunB στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία είναι σημαντικά μειωμένη σε σχέση με τα κύτταρα του περιφερικού αίματος υγιών ενηλίκων. Επιπλέον, μείωση της ενεργότητας της JunB διαπίστωσαν σε ασθενείς με βλαστική κρίση και φάση εκτροπής προς οξεία μυελογενή λευχαιμία. Έτσι διατύπωσαν την πρόταση, να χρησιμοποιείται η μέτρηση των επιπέδων της JunB στην παρακολούθηση αυτών των ασθενών. Θέλοντας να διερευνήσουν περαιτέρω τους υποκείμενους μηχανισμούς, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η μειωμένη αυτή ενεργότητα οφείλεται σε μεθυλίωση του εκκινητή του γονιδίου JunB. Δηλαδή, η απενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου JunB στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία οφείλεται σε μεθυλίωση.

Σε μεταγενέστερες δημοσιεύσεις οι Hoshimo και συν. (2009) (206) και Strathdee και συν. (2010) (207) μελετώντας περιφερικό αίμα περισσότερων ασθενών (102 και 66 άτομα, αντίστοιχα) που έπασχαν από χρόνια μυελογενή λευχαιμία επιβεβαίωσαν τα χαμηλά επίπεδα ενεργότητας της JunB, διέψευσαν όμως ότι αυτό το εύρημα οφείλεται σε ανώμαλη DNA μεθυλίωση χωρίς να καταφέρουν να καθορίσουν περαιτέρω τον υποκείμενο μηχανισμό. Οι ανωτέρω μελετητές στο σύνολο τους τόνισαν την ανάγκη για μελλοντικές και λεπτομερείς πειραματικές εργασίες στο πεδίο αυτό.

2 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Τα διάχυτα λεμφώματα από μεγάλα Β-λεμφοκύτταρα (DLBCL, Diffuse Large B-Cell Lymphoma) είναι τα πλέον συχνά λεμφώματα στο Δυτικό κόσμο. Παρουσιάζουν σημαντική ετερογένεια όσον αφορά στα κλινικά, ιστοπαθολογικά και βιολογικά χαρακτηριστικά. Μελέτες έδειξαν ότι υπάρχουν δύο διακριτοί ανοσοφαινοτυπικοί/ιστογενετικοί υπότυποι DLBCL, α) ο ομοιάζων με αυτόν των Β-κυττάρων του βλαστικού κέντρου (Germinal Center, GC) και β) ο μη ομοιάζων (non-GC) και ότι αυτοί οι υπότυποι διαφέρουν ως προς παθογενετικές διαδικασίες στις οποίες εμπλέκονται σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση.

Η οικογένεια των πρωτεϊνών Jun που περιλαμβάνει τους μεταγραφικούς παράγοντες c-Jun, JunB και JunD, αποτελεί μέλος του συμπλέγματος του μεταγραφικού παράγοντα της ενεργοποιητικής πρωτεΐνης-1 (AP-1, activator protein-1) και εμπλέκεται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην απόπτωση. Αποτελέσματα μελετών έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες c-Jun και JunB εκφράζονται στο κλασικό Hodgkin λέμφωμα και σε CD30-θετικά μη-Hodgkin λεμφώματα. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας Jun αλληλεπιδρούν με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες όπως της οικογένειας STAT. Η οικογένεια των πρωτεϊνών STAT είναι σημαντικοί μεταγραφικοί παράγοντες που εμπλέκονται στην κυτταρική διαφοροποίηση, στον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση. Η οικογένεια STAT ενεργοποιείται μέσω του JAK/STAT μονοπατιού μεταγωγής σήματος. Μελέτη της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της οικογένειας των πρωτεϊνών Jun και του p-STAT3 σε DLBCL σε σχέση με τη Β-κυτταρική διαφοροποίηση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό δεν έχει δημοσιευθεί στη διεθνή βιβλιογραφία, από όσο τουλάχιστον γνωρίζουμε.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών Ph(Phospho)-c-Jun, JunB, JunD και p-STAT3 σε 130 περιπτώσεις DLBCL σε σχέση με: 1) την ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης ενεργοποίησης CD30, 2) το πρότυπο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (κυκλίνες A, B1, D2, D3 και E και Ki-67), 3) την ανοσοϊστοχημική έκφραση πρωτεϊνών Β-κυτταρικής διαφοροποίησης (CD10, Bcl-6 και MUM-1/IRF4) και 4) τους ιστογενετικούς/ανοσοφαινοτυπικούς υπότυπους του ομοιάζοντος με αυτόν των Β-κυττάρων του βλαστικού κέντρου (Germinal Center, GC) και του μη ομοιάζοντος (non-GC), όπως αυτοί καθορίζονται από το πρότυπο έκφρασης πρωτεϊνών Β-κυτταρικής διαφοροποίησης (CD10, bcl6, MUM1/IRF4). Σε ορισμένες περιπτώσεις που

εξέφρασαν χαμηλά ή υψηλά επίπεδα πρωτεΐνης JunB, πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ειδικής της μεθυλίωσης (MSP, methylation specific PCR) με σκοπό να διερευνηθεί εάν η μεθυλίωση του εκκινητή του γονιδίου JunB σχετίζεται με σιγή του γονιδίου.

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης ευελπιστούμε να οδηγηθούμε στη περαιτέρω κατανόηση μηχανισμών παθογένεσης των DLBCL.

3 ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΥΛΙΚΟ

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε βιοπτικό υλικό 130 περιπτώσεων λεμφαδενικών και εξωλεμφαδενικών de novo DLBCL, NOS, μονιμοποιημένων σε διάλυμα φορμαλδεΐδης 10% και εγκλεισμένων σε κύβους παραφίνης (FFPE, Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded). Η ταξινόμηση των λεμφωμάτων έγινε σύμφωνα με τη ταξινόμηση των όγκων του αιμοποιητικού και λεμφικού ιστού της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (WHO, World Health Organization) (1). Οι περιπτώσεις επιλέχθηκαν από τα αρχεία του Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων (Π.Γ.Ν.Ι.) και η επιλογή του υλικού έγινε με βάση την ύπαρξη επαρκούς και κατάλληλου για ανοσοϊστοχημική μελέτη υλικού. Από την μελέτη αποκλείστηκαν δείγματα προερχόμενα από δερματικές αλλοιώσεις, εφ' όσον αυτά αποτελούν ξεχωριστή οντότητα σύμφωνα με την τελευταία ταξινόμηση της WHO (2008) (1).

3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1 Ανοσοϊστοχημεία

Πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική μελέτη: α) των πρωτεϊνών p-c-Jun, JunB και JunD, μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών Jun, β) των πρωτεϊνών B-διαφοροποίησης CD10, Bcl-6 και MUM-1/IRF-4 που καθορίζουν τους ιστογενετικούς/ανοσοφαινοτυπικούς υπότυπους του DLBCL, γ) των κυκλίνων A, B1, D2, D3 και E και του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67, δ) του δείκτη ενεργοποίησης λεμφοκυττάρων CD30 και ε) της πρωτεΐνης p-STAT3, μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών STAT. Οι πρωτεΐνες p-c-Jun, JunB, JunD, CD30 και p-STAT-3 μελετήθηκαν σε όλες τις περιπτώσεις, ενώ οι πρωτεΐνες CD10, Bcl-6, MUM-1/IRF-4, κυκλίνη A, κυκλίνη B1, κυκλίνη D2, κυκλίνη D3, κυκλίνη E και Ki-67 σε 53 από τις 130 περιπτώσεις, καθώς τα αποτελέσματα των υπολοίπων 78 περιπτώσεων ήταν ήδη διαθέσιμα από προηγούμενες ερευνητικές μελέτες (57) (21) (22). Από τους κύβους παραφίνης των υπό μελέτη περιπτώσεων ελήφθησαν ιστολογικές τομές πάχους 3-5 μm και πραγματοποιήθηκαν ανοσοϊστοχημικές χρώσεις με την κλασική μέθοδο

της στρεπταβιδίνης-αβιδίνης-βιοτίνης (LSAB, Labeled StreptAvidin Biotin) (57, 208, 209). Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη, η πηγή, ο κλώνος και η αραίωσή τους, παρατίθενται στο Πίνακα 3.

Πίνακας 3: Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη.

Αντίσωμα	Προέλευση	Κλώνος	Αραίωση
Ph-c-Jun	Cell Signaling	Ser 73	1:30
JunB	Santa Cruz Biotechnology	C-11	1:70
JunD	Santa Cruz Biotechnology	SC-74	1:100
CD30	Cell Marque	Bar-H2	1:15
Ph-STAT3	Cell Signaling	TYR705	1:300
CD10	Novocastra	56C6	1:100
Bcl-6	Dako	BG6p	1:5
MUM-1/IRF-4	Dako	Mum1p	1:20
Ki-67	Dako	MIB-1	1:75
Κυκλίνη A	Novocastra	6E6	1:10
Κυκλίνη B1	Novocasta	7A9	1:10
Κυκλίνη D2	Santa Cruz Biotechnology	SC-181	1:600
Κυκλίνη D3	Dako	DCS-22	1:50
Κυκλίνη E	Santa Cruz Biotechnology	SC-481	1:200

3.2.2 Περιγραφή της μεθόδου στρεπταβιδίνης-αβιδίνης-βιοτίνης (LSAB) με τη χρήση αυτοματοποιημένου μηχανήματος

Η ανοσοϊστοχημική μελέτη σε όλες τις περιπτώσεις πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αυτοματοποιημένου μηχανήματος ανοσοϊστοχημείας (Ventana Benchmark, Strasbourg, France) σύμφωνα με τα πρωτόκολλα και τις οδηγίες που το συνοδεύουν (Ventana Medical Systems, Inc.).

Η διαδικασία περιλαμβάνει αρχικά τη χορήγηση και τοποθέτηση, με τη μορφή αυτοκόλλητης ταινίας, ενός γραμμωκώδικα (bar code), πάνω στο πλακίδιο που θα τοποθετηθεί στο μηχάνημα, προκειμένου αυτό να αναγνωρίζεται κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας που πρόκειται να ακολουθήσει και επιπλέον να μπορεί να ελέγχεται κάθε χρονική στιγμή η πορεία της διαδικασίας σε αυτό. Στη συνέχεια ακολουθεί η πλήρως αυτοματοποιημένη, “κλειστή” λειτουργία του μηχανήματος.

Ο ιστός αρχικά θερμαίνεται και αποπαραφινώνεται σε μια διαδικασία που διαρκεί 60 λεπτά. Ακολούθως, γίνεται η αποκάλυψη του αντιγονικού επιτόπου με τη χρήση κατάλληλου κυτταρικού διαλύματος (CC1), για 60 λεπτά στους 99 °C. Κατόπιν, γίνεται ενζυματική προεπώαση για την αναστολή της δραστηριότητας της ενδογενούς υπεροξειδάσης, για 4 λεπτά στους 37°C. Έπεται η εξωγενής προσθήκη του πρωτοταγούς αντισώματος σε συγκέντρωση που προσδιορίζεται με βάση το καλύτερο των δοκιμών αποτέλεσμα. Στην παρούσα μελέτη όλα τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν επώαστηκαν σε θερμοκρασία 37°C για 62 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθεται αυτόματα το δευτεροταγές βιοτινυλιωμένο αντίσωμα, το οποίο επωάζεται για 8 λεπτά στους 37°C. Η διαδικασία συνεχίζεται με την προσθήκη του ενζυμικού συμπλόκου αβιδίνη/στρεπταβιδίνης και την επώασή του για 8 λεπτά και πάλι στους 37°C. Τα δύο επόμενα και τελευταία στάδια στην επεξεργασία του ιστού από το μηχάνημα, είναι η προσθήκη του χρωμογόνου διαλύματος διαμινοβενζιδίνης (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB) για 4 λεπτά, καθώς και η επίχρωση των τομών με αιματοξυλίνη. Σε όλα τα ενδιάμεσα στάδια της ανωτέρω διαδικασίας γίνεται αυτόματη έκπλυση των ιστολογικών τομών με TBS (Triphosphate Buffered Saline, pH 7,6).

Μετά την ολοκλήρωση της ανωτέρω διαδικασίας, τα πλακίδια αφαιρέθηκαν από το μηχάνημα και εκπλύθηκαν σε τρεχούμενο νερό βρύσης για δέκα λεπτά, καθώς και με επαναλαμβανόμενες πλύσεις σε απεσταγμένο νερό. Τέλος, τα πλακίδια οδηγήθηκαν σε ανιούσα αφυδάτωση (δύο διαδοχικές εμβαπτίσεις σε 96% αιθανόλη από δύο λεπτά έκαστη σε

θερμοκρασία δωματίου, δύο διαδοχικές εμβαπτίσεις σε 100% αιθανόλη από δύο λεπτά έκαστη σε RT, δύο διαδοχικές εμβαπτίσεις σε ξυλόλη από τρία λεπτά έκαστη σε RT), καλύφθηκαν με καλυπτρίδες και αφέθηκαν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον τρεις ώρες. Ακολούθησε η συλλογή τους, η παρατήρηση και εκτίμηση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης σε οπτικό μικροσκόπιο.

Στο σύνολο των ανοσοχρώσεων που πραγματοποιήθηκαν, έγινε χρήση ιστών θετικών και αρνητικών μαρτύρων, οι οποίοι ήταν μονιμοποιημένοι σε διάλυμα φορμαλδεΰδης 10% και εμβυθισμένοι σε παραφίνη. Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ιστολογικές τομές φυσιολογικού αντιδραστικού λεμφαδένα και φυσιολογικού θύμου, ενώ ως αρνητικοί ιστολογικές τομές αντιδραστικού λεμφαδένα στις οποίες δεν επώασθηκε πρωτοταγές αντίσωμα. Η ανοσοχρώση των πρωτεϊνών της οικογένειας Jun και της p-STAT3 είναι πυρηνική, ενώ του δείκτη CD30 μεμβρανική και κηλιδώδης παραπυρηνική.

3.2.3 Αξιολόγηση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων

Για την αξιολόγηση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων εκτιμήθηκαν τουλάχιστον δέκα επιλεγμένα οπτικά πεδία μεγάλης μεγένθυσης (X400) νεοπλασματικού ιστού που εξέφραζαν τις υπό μελέτη πρωτεΐνες. Ο αριθμός των ανοσοθετικών νεοπλασματικών κυττάρων διαιρέθηκε με το συνολικό αριθμό των νεοπλασματικών κυττάρων που μετρήθηκαν και η έκφραση προσδιορίστηκε ως το επί τις εκατό ποσοστό των θετικών νεοπλασματικών κυττάρων (0% -100%). Θετική ως προς την έκφραση των πρωτεϊνών p-c-Jun, JunB, JunD, p-STAT3 και CD30 θεωρήθηκε κάθε περίπτωση που έστω και ένα νεοπλασματικό κύτταρο παρουσίαζε θετική ανοσοαντίδραση για τις εν λόγω πρωτεΐνες.

Η αξιολόγηση της έκφρασης των πρωτεϊνών B-κυτταρικής διαφοροποίησης και του κυτταρικού κύκλου καθώς και οι αντίστοιχοι θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν έχουν περιγραφεί λεπτομερώς σε προηγούμενες δημοσιεύσεις (21, 22, 57). Επιπροσθέτως, ο ανοσοφαινότυπος CD10/Bcl-6/MUM-1 και η ταξινόμηση κάθε περίπτωσης στον ανοσοφαινοτυπικό υπότυπο τον “ομοιάζοντα με αυτόν των B-κυττάρων του βλαστικού κέντρου” (GC B-cell like type) και τον “μη ομοιάζοντα με αυτόν των B-κυττάρων του βλαστικού κέντρου” (non GC B-cell like type) πραγματοποιήθηκε λαμβάνοντας υπόψη κριτήρια που αναλύονται σε δημοσιευμένες μελέτες της ίδιας ερευνητικής ομάδας (21, 22, 57).

3.3 Μελέτη της μεθυλίωσης του γονιδίου JunB

Πραγματοποιήθηκε ακόμη μελέτη της κατάστασης μεθυλίωσης της CpG νησίδας του υποκινητή του γονιδίου JunB σε αντιπροσωπευτικό αριθμό ιστολογικών δειγμάτων. Μελετήθηκαν συνολικά τριάντα (30) από τις υπό μελέτη περιπτώσεις DLBCL, είκοσι (20) με χαμηλή ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης JunB και δέκα (10) με υψηλή, με σκοπό να διερευνηθεί εάν πιθανή μεθυλίωση του εκκινητή του γονιδίου JunB σχετίζεται με αποσιώπηση του αντίστοιχου γονιδίου. Για τη μελέτη της μεθυλίωσης έγινε απομόνωση γονιδιωματικού DNA και χημική τροποποίηση με NaHSO₃ (bisulphite treatment). Ακολούθησε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ειδικής της μεθυλίωσης (methylation specific PCR-MSP) με τη χρήση κατάλληλα σχεδιασμένων υποκινητών ειδικών για τα μεθυλωμένα και μη μεθυλωμένα αλληλία της CpG νησίδας του υπό μελέτη γονιδίου. Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων ως προς τα μοριακά βάρη των προϊόντων PCR χρησιμοποιήθηκε δείκτης μοριακών βαρών (100bp DNA ladder) από την εταιρεία Invitrogen. Η μελέτη της μεθυλίωσης του DNA πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με την Αιματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων.

3.4 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS. Προσδιορίστηκαν οι βασικές στατιστικές παράμετροι των επιπέδων έκφρασης κάθε μίας από τις πρωτεΐνες που μελετήθηκαν. Συγκεκριμένα, προσδιορίστηκαν ο μέσος όρος έκφρασης (mean value), η τυπική απόκλιση της τιμής κάθε παραμέτρου (SD, standard deviation-δείκτης που προσδιορίζει πόσο διαφέρουν κατά μέσο όρο οι τιμές της μεταβλητής από το μέσο όρο του συνόλου στο οποίο ανήκει), καθώς και η μέγιστη και η ελάχιστη τιμή (maximum-minimum values). Τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικά όταν η στατιστική σημαντικότητα p των ευρημάτων ήταν μικρότερη του 0.05 ($p < 0.05$). Συγκεντρωτικά, χρησιμοποιήθηκαν οι στατιστικές μέθοδοι που παρατίθενται στον Πίνακα 4.

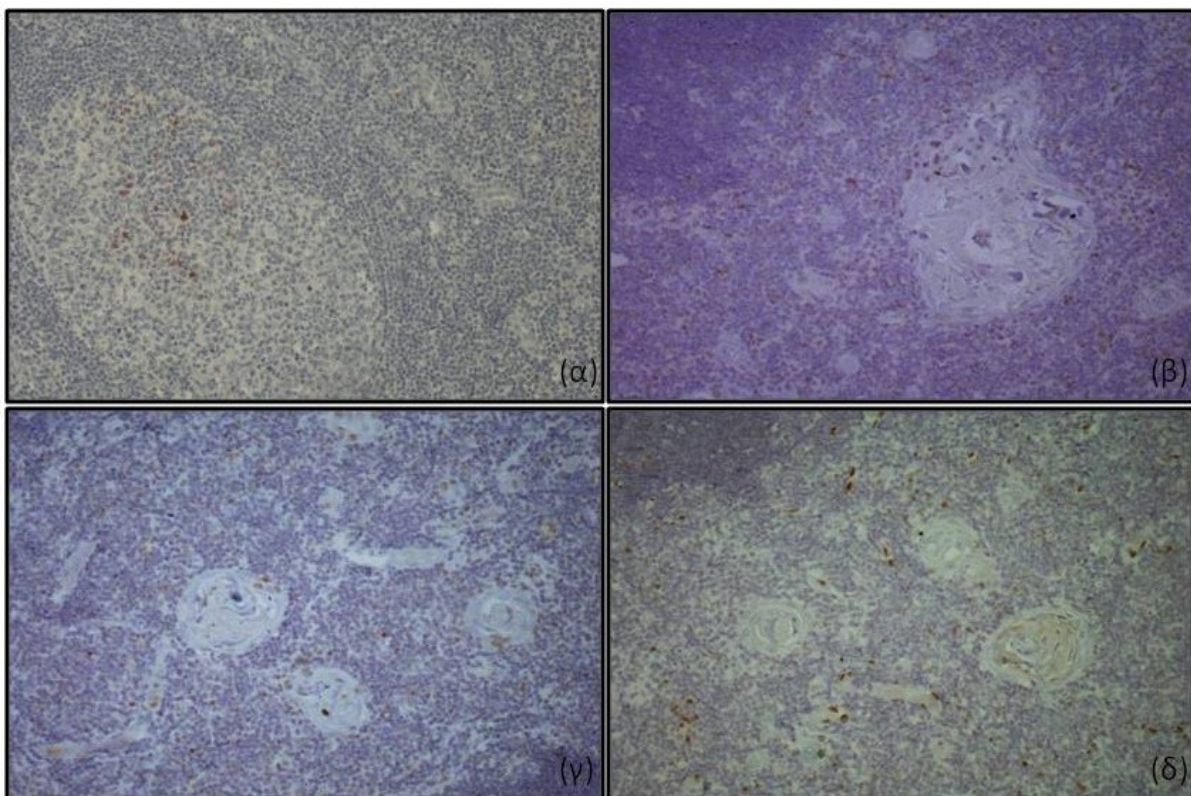
Πίνακας 4: Στατιστικές μέθοδοι.

Στατιστική μέθοδος	
Pearson's correlation coefficient test	Παραμετρική συσχέτιση δύο συνεχών μεταβλητών.
Spearman's correlation coefficient test	Μη παραμετρική συσχέτιση δύο συνεχών μεταβλητών.
t test (μη συσχετισμένο)	Παραμετρική δοκιμασία για να υπολογισθεί αν οι μέσοι όροι δύο συνόλων τιμών διαφέρουν σημαντικά.
Mann-Whitney test	Μη παραμετρική δοκιμασία αντίστοιχη του t-test.
χ^2 test	Χρησιμοποιείται για την εκτίμηση αν δύο ή περισσότερα δείγματα, τα οποία αποτελούνται από δεδομένα συχνοτήτων (ονομαστικά δεδομένα), διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους.
K means clustering	Διαχωρισμός δύο ή περισσότερων κατανομών (συνεχείς μεταβλητές) σε συστάδες.
ANOVA (ανάλυση διακύμανσης)	Χρησιμοποιείται για την εκτίμηση αν δύο ή περισσότερα σύνολα τιμών έχουν μέσους όρους που διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους.

4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Έκφραση των πρωτεϊνών της οικογένειας Jun (Ph-c-Jun, JunB και JunD) και της rh-STAT3 σε φυσιολογικούς λεμφικούς ιστούς

Σε φυσιολογικούς αντιδραστικούς λεμφαδένες η rh-c-Jun δίνει θετική ανοσοχρώση σε ενδοθηλιακά, στρωματικά και δενδριτικά κύτταρα του βλαστικού κέντρου, η JunB σε μικρά λεμφοκύτταρα κυρίως της T-ζώνης και σπάνια κύτταρα του βλαστικού κέντρου (Εικόνα 8α.), η JunD σε κύτταρα του βλαστικού κέντρου, διάσπαρα λεμφοκύτταρα της T-ζώνης, λιποκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα, η rh-STAT3 σε μικρά λεμφοκύτταρα κυρίως της T-ζώνης και ενδοθηλιακά κύτταρα και τέλος το CD30 σε ενεργοποιημένα κύτταρα του βλαστικού κέντρου και του εξωλεμφοζιδιακού ιστού.



Εικόνα 8: Ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης JunB (α) σε φυσιολογικό αντιδραστικό λεμφαδένα και των πρωτεϊνών JunB (β), JunD (γ) και rh-STAT3 (δ) σε φυσιολογικό θύμο αδέν (DABX200).

Σε φυσιολογικό θύμο αδένα (από νεογέννητα και παιδιά) οι πρωτεΐνες της οικογένειας Jun (rh-c-Jun, JunB και JunD) και η rh-STAT3 δίνουν θετική ανοσοαντίδραση σε ολιγάριθμα θυμοκύτταρα και σε επιθηλιακά κύτταρα στη φλοιώδη μοίρα, στη μυελώδη μοίρα και στα σωμάτια Hassall (Εικόνα 8β, γ και δ). Γενικά, χαμηλά επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών rh-c-Jun, JunB, JunD και rh-STAT3 ανευρέθησαν στα θυμοκύτταρα. Υψηλότερα ποσοστά έκφρασης rh-c-Jun παρατηρήθηκαν στα θυμοκύτταρα του φλοιού από ότι στα θυμοκύτταρα του μυελού, ενώ τα ποσοστά έκφρασης στην JunB και JunD ήταν υψηλότερα στα θυμοκύτταρα του μυελού. Η rh-STAT3 ανιχνεύτηκε σε λίγα διάσπαρτα θυμοκύτταρα του φλοιού και του μυελού. Οι πρωτεΐνες rh-c-Jun, JunB και JunD ανιχνεύθηκαν συχνά στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα του μυελού και στα σωμάτια Hassall. Υψηλότερα ποσοστά έκφρασης rh-c-Jun παρατηρήθηκαν στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα του φλοιού από ότι σε αυτά του μυελού. Η έκφραση του JunD ήταν χαμηλή στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα του μυελού. Υψηλότερα ποσοστά έκφρασης rh-STAT3 παρατηρήθηκαν στα θυμικά επιθηλιακά κύτταρα του φλοιού και του μυελού σε σχέση με τα σωμάτια Hassall.

4.2 Ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών της οικογένειας Jun (Ph-c-Jun, JunB και JunD) και του δείκτη CD30 σε διάχυτα λεμφώματα από μεγάλα B-κύτταρα

Η ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών της οικογένειας JUN ήταν πυρηνική (Εικόνα 9), ενώ του δείκτη CD30 μεμβρανική και κηλιδώδης παραπυρηνική.

Τα κύρια στατιστικά ευρήματα (μέση τιμή, τυπική απόκλιση, μέγιστη και ελάχιστη τιμή) των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών Ph-c-Jun, JunB, JunD και CD30 στα νεοπλασματικά λεμφοκύτταρα σε DLBCL παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.

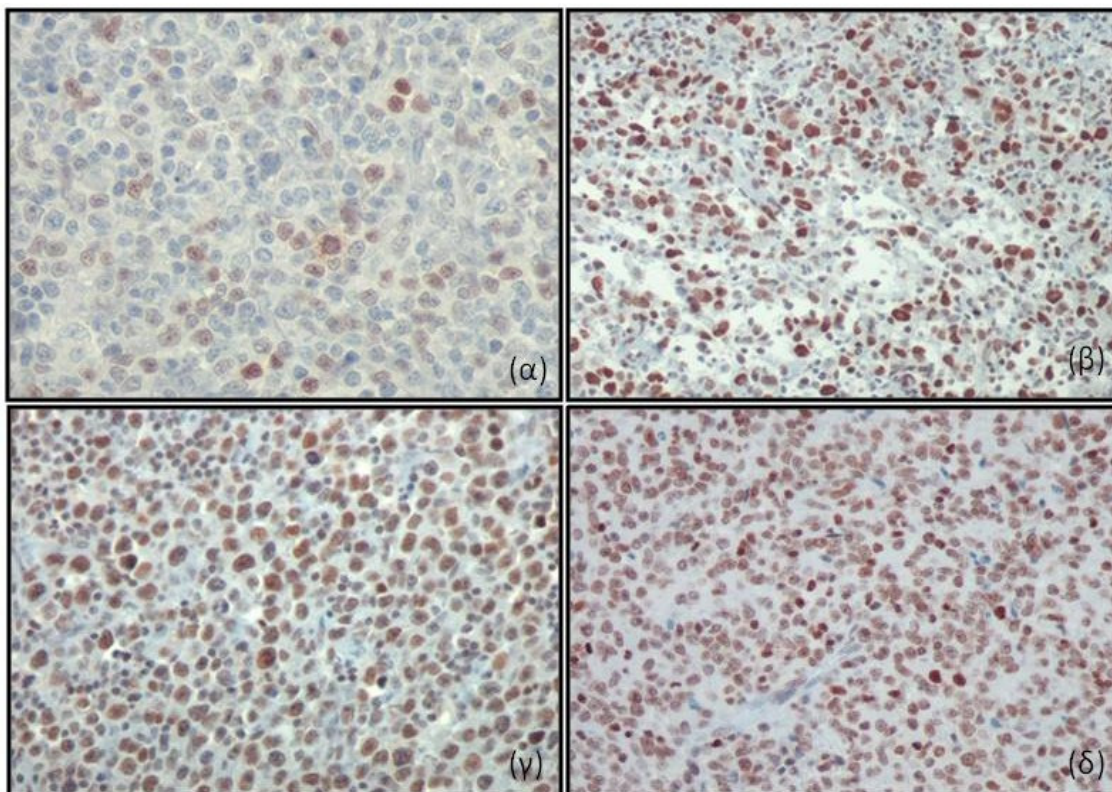
Θετική ανοσοχρώση **Ph-c-Jun** παρατηρήθηκε σε 59/103 περιπτώσεις (Εικόνα 9α). Η πρωτεΐνη αυτή εκφράστηκε κατά μέσο όρο στο 9.69% των νεοπλασματικών κυττάρων των περιπτώσεων που μελετήθηκαν. Η τυπική απόκλιση της έκφρασης ήταν 18.14%. Η ελάχιστη τιμή έκφρασης της πρωτεΐνης ήταν 0%, ενώ η μέγιστη τιμή 90% (Πίνακας 5).

Θετική ανοσοχρώση **JunB** παρατηρήθηκε σε 97/100 περιπτώσεις (Εικόνα 9β). Η πρωτεΐνη αυτή εκφράστηκε κατά μέσο όρο στο 29.39% των νεοπλασματικών κυττάρων των περιπτώσεων που μελετήθηκαν. Η τυπική απόκλιση της έκφρασης ήταν 29.54%. Η ελάχιστη τιμή έκφρασης της πρωτεΐνης ήταν 0%, ενώ η μέγιστη τιμή 95% (Πίνακας 5.).

Θετική ανοσοχρώση **JunD** παρατηρήθηκε σε 94/94 περιπτώσεις (Εικόνα 9γ). Η πρωτεΐνη αυτή εκφράστηκε κατά μέσο όρο στο 52.42% των νεοπλασματικών κυττάρων των περιπτώσεων που μελετήθηκαν. Η τυπική απόκλιση της έκφρασης ήταν 34.39%. Η ελάχιστη τιμή έκφρασης της πρωτεΐνης ήταν 0%, ενώ η μέγιστη τιμή 100% (Πίνακας 5).

Θετική ανοσοχρώση **CD30** παρατηρήθηκε σε 44/100 περιπτώσεις. Η πρωτεΐνη αυτή εκφράστηκε κατά μέσο όρο στο 17.12% των νεοπλασματικών κυττάρων των περιπτώσεων που μελετήθηκαν. Η τυπική απόκλιση της έκφρασης ήταν 29.97%. Η ελάχιστη τιμή έκφρασης της πρωτεΐνης ήταν 0%, ενώ η μέγιστη τιμή 100% (Πίνακας 5).

Θετική ανοσοχρώση **ph-STAT3** παρατηρήθηκε σε 41/ 61 περιπτώσεις (Εικόνα 9δ). Η πρωτεΐνη αυτή εκφράστηκε κατά μέσο όρο στο 15.4466% των νεοπλασματικών κυττάρων των περιπτώσεων που μελετήθηκαν. Η τυπική απόκλιση της έκφρασης ήταν 20.0753%. Η ελάχιστη τιμή έκφρασης της πρωτεΐνης ήταν 0%, ενώ η μέγιστη τιμή 70% (Πίνακας 5).



Εικόνα 9: Ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών Ph-c-Jun (α), JunB (β), JunD (γ) και ph-STAT3 (δ) σε DLBCL (DABX400).

Πίνακας 5: Κύρια στατιστικά δεδομένα του επιπέδου έκφρασης των πρωτεϊνών της οικογένειας Jun, της πρωτεΐνης p-h-STAT3, του δείκτη CD30, πρωτεϊνών σχετιζόμενων με τον κυτταρικό κύκλο και δεικτών B-κυτταρικής διαφοροποίησης σε DLBCL.

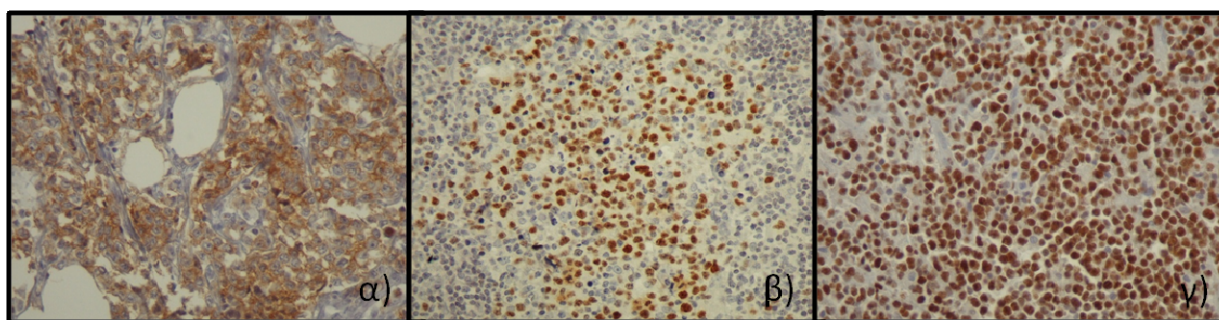
	Ποσοστό θετικών περιπτώσεων. (%) επί του συνολικού αριθμού	Μέση τιμή (%)	Τυπική απόκλιση (%)	Ελάχιστη τιμή (%)	Μέγιστη τιμή (%)
Ph-c-Jun	59/103, 67%	9.6990	18.1453	0.0	90
JunB	97/100, 97%	29.3981	29.5483	0.0	95
Jun D	94/94, 100%	52.4286	34.3964	0.0	100
CD30	44/100, 44%	17.1200	29.9799	0.0	100
Ph-STAT3	41/61, 67%	15.4466	20.0753	0.0	70
Ki67	129/129, 100%	67.5969	21.8219	8.0	100
Κυκλίνη A	122/122, 100%	33.5000	21.1485	1.0	85
Κυκλίνη B1	119/119, 100%	18.1597	14.9303	2.0	80
Κυκλίνη D2	81/121, 70%	6.5537	11.0053	0.0	60
Κυκλίνη D3	87/121, 77%	18.1983	25.7778	0.0	95
Κυκλίνη E	54/104, 50%	12.3173	18.0169	0.0	80
CD10	83/130, 70%	9.2385	17.5450	0.0	100
BCL6	119/130, 88%	26.5538	26.5415	0.0	100
MUM-1	128/130, 95%	43.1538	30.9482	0.0	100

4.3 Ανοσοϊστοχημική έκφραση δεικτών Β-κυτταρικής διαφοροποίησης (CD10, bcl-6, MUM-1/IRF4)

Οι δείκτες Β-κυτταρικής διαφοροποίησης CD10, bcl-6 και MUM-1/IRF4 μελετήθηκαν σε 52 από τις 130 περιπτώσεις, καθώς τα αποτελέσματα των υπόλοιπων 78 περιπτώσεων ήταν ήδη διαθέσιμα από προηγούμενες μελέτες της ομάδας μας (21, 66).

Η έκφραση της πρωτεΐνης CD10 ήταν κυτταροπλασματική ενώ των bcl-6 και MUM-1/IRF4 πυρηνική (Εικόνα 10).

Τα κύρια στατιστικά ευρήματα της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των δεικτών Β-κυτταρικής διαφοροποίησης στο σύνολο των περιπτώσεων παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.



Εικόνα 10: Ανοσοϊστοχημική έκφραση των δεικτών Β-κυτταρικής διαφοροποίησης CD10 (α), bcl-6 (β) και MUM-1/IRF4 (γ) σε DLBCL (DABX400).

4.4 Ιστογενετικοί/Ανοσοφαινοτυπικοί υπότυποι των διάχυτων λεμφωμάτων από μεγάλα Β-κύτταρα (GC και non-GC)

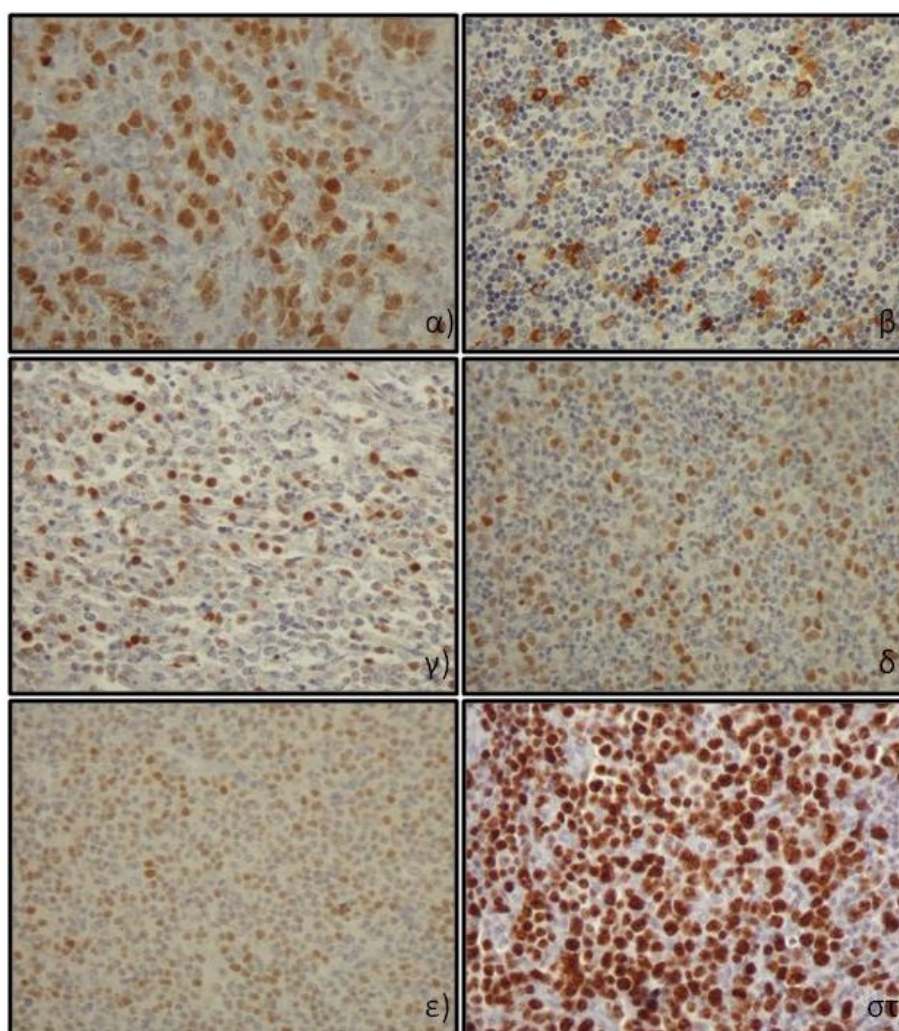
Ο CD10/bcl-6/MUM-1 ανοσοφαινότυπος και η καταχώρηση των περιπτώσεων των DLBCL στους τύπους με (GC) ή άνευ (non-GC) πρότυπο ανοσοϊστοχημικής έκφρασης Β-λεμφοκυττάρων του βλαστικού κέντρου έγινε λαμβάνοντας υπόψιν προηγουμένως δημοσιευμένα κριτήρια (21, 66).

Διαπιστώθηκε ότι 41 από τις 130 περιπτώσεις είχαν GC και 89 από τις 130 non-GC ανοσοφαινότυπο.

4.5 Ανοσοϊστοχημική έκφραση πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου

Οι πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου κυκλίνες A, B1, D2, D3, E και ο δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 (εκφράζεται σε όλες τις φάσεις πλην της G0) μελετήθηκαν σε 52 από τις 130 περιπτώσεις, καθώς τα αποτελέσματα των υπόλοιπων 78 περιπτώσεων ήταν ήδη διαθέσιμα από προηγούμενες μελέτες (22, 49, 58).

Η έκφραση όλων των ανωτέρω πρωτεϊνών ήταν πυρηνική (Εικόνα 11). Στις ανοσοχρώσεις για τις κυκλίνες A και B1 παρατηρήθηκε και εν μέρει κυτταροπλασματική έκφραση. Τα κύρια στατιστικά ευρήματα της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου στο σύνολο των περιπτώσεων παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.



Εικόνα 11: Ανοσοϊστοχημική έκφραση των κυκλινών A (α), B1 (β), D2 (γ), D3 (δ), E (ε) και του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 (στ) σε DLBCL (DABX400).

4.6 Συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης των πρωτεϊνών της οικογένειας Jun (ph-c-Jun, JunB, JunD), της πρωτεΐνης rh-STAT3, του δείκτη CD30 και πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου (Ki-67 και κυκλίνες A, B1, D2, D3 και E)

Χρησιμοποιήθηκε το μη-παραμετρικό Spearman's test για τον υπολογισμό πιθανών συσχετίσεων μεταξύ των επιπέδων έκφρασης δύο πρωτεϊνών (συνεχείς μεταβλητές).

Η έκφραση της πρωτεΐνης rh-c-Jun συσχετίστηκε θετικά με την έκφραση της πρωτεΐνης CD30 ($r=0.305$, $p=0.003$).

Η έκφραση της JunB συσχετίστηκε θετικά με την έκφραση των πρωτεϊνών Ki-67 ($r=0.213$, $p=0.032$), κυκλίνης A ($r=0.209$, $p=0.042$), κυκλίνης B1 ($r=0.251$, $p=0.016$), κυκλίνης D2 ($r=0.215$, $p=0.037$), κυκλίνης E ($r=0.217$, $p=0.001$) και CD30 ($r=0.362$, $p<0.001$).

Η έκφραση της JunD συσχετίστηκε θετικά με την έκφραση των πρωτεϊνών Ki-67 και κυκλίνης E ($r=0.361$, $p=0.01$, και $r=0.315$, $p=0.007$, αντίστοιχα).

Δεν ανευρέθησαν συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης της rh-STAT3 και των πρωτεϊνών της οικογένειας Jun, του δείκτη CD30 και των πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου.

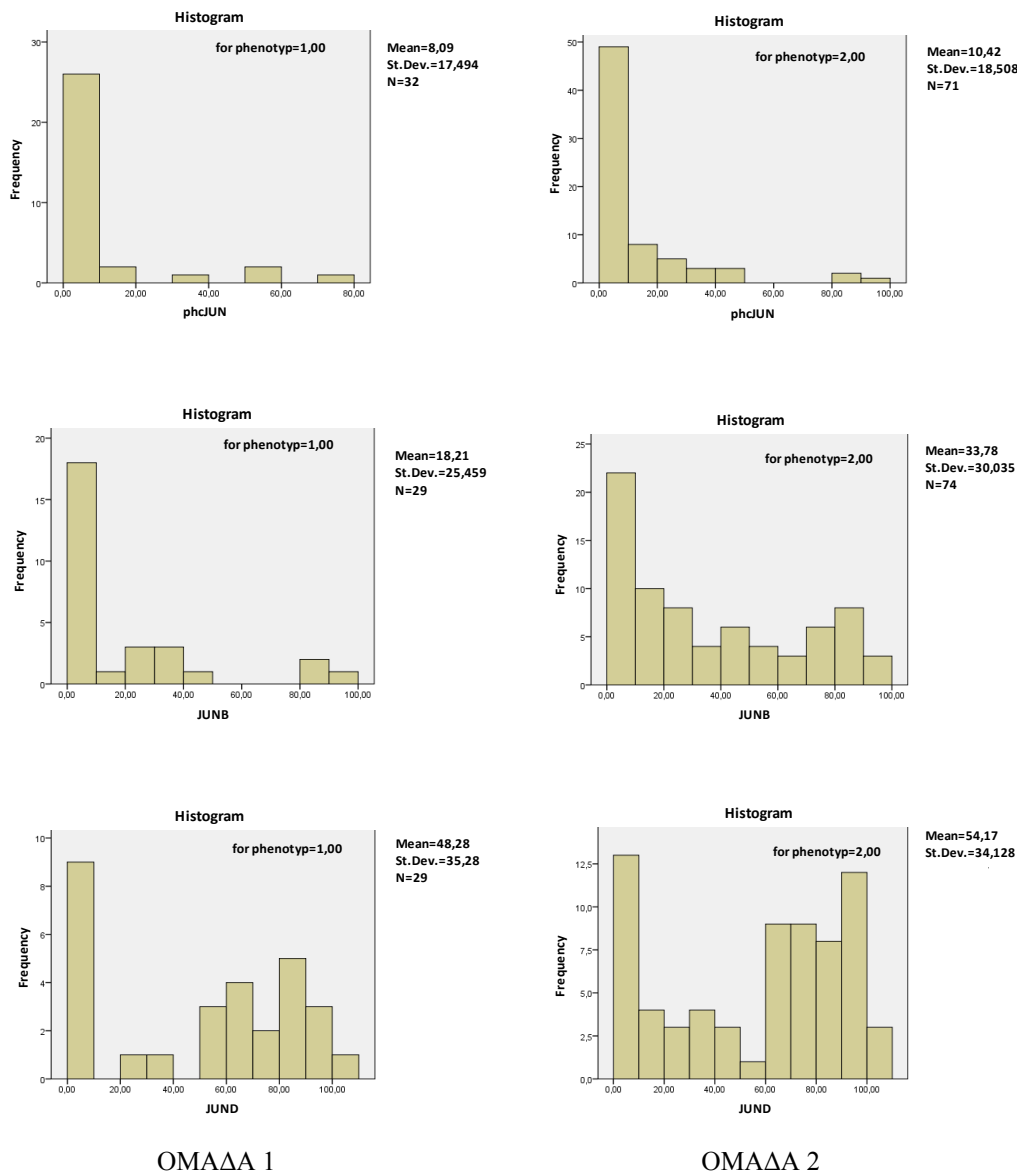
4.7 Συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης των πρωτεϊνών της οικογένειας Jun (ph-c-Jun, JunB, JunD), της πρωτεΐνης rh-STAT3 και του δείκτη CD30 με πρωτεΐνες B-κυτταρικής διαφοροποίησης (CD10, Bcl-6, MUM-1/IRF-4) και τους ανοσοφαινοτυπικούς υπότυπους (GC και non-GC) των διάχυτων λεμφωμάτων από μεγάλα B-κύτταρα

Χρησιμοποιήθηκε το μη-παραμετρικό Spearman's test για τον υπολογισμό πιθανών συσχετίσεων μεταξύ των επιπέδων έκφρασης δύο πρωτεϊνών (συνεχείς μεταβλητές).

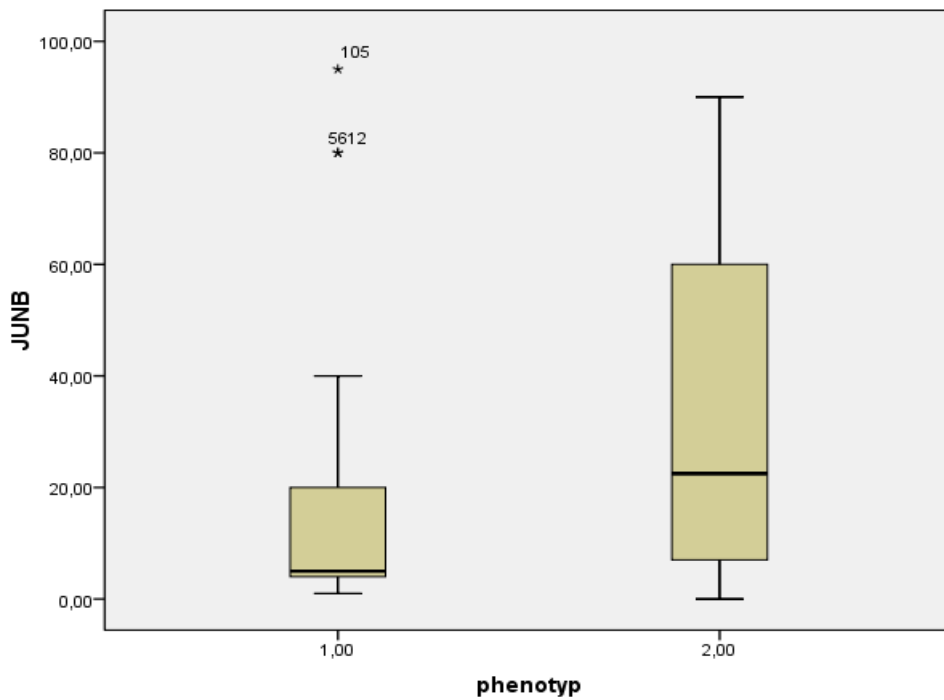
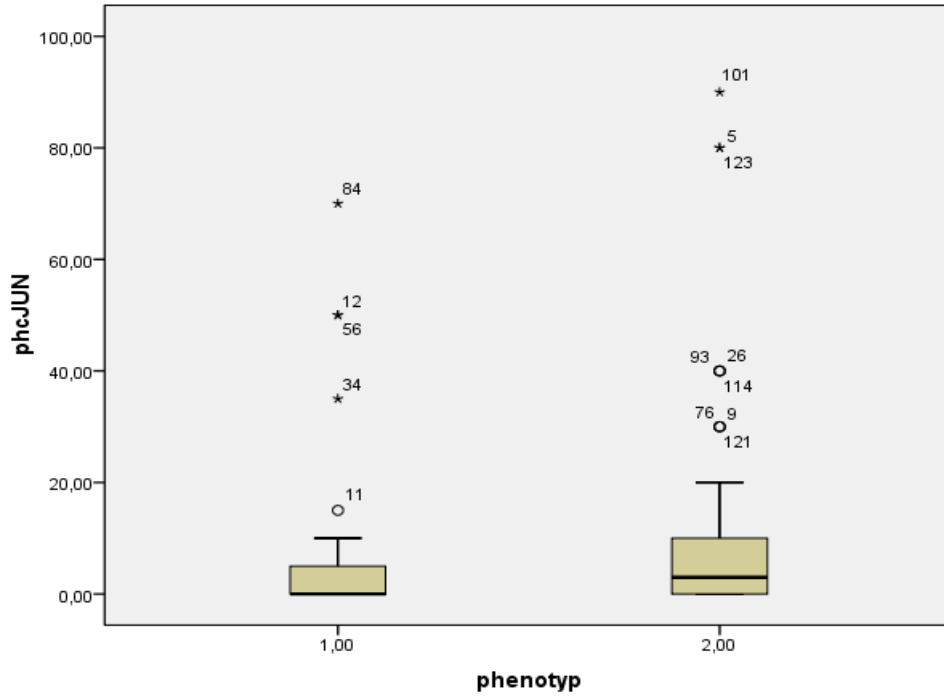
Τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης JunB συσχετίστηκαν θετικά με τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης MUM-1/IRF-4 ($r=0.321$, $p<0.001$) και αρνητικά με τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης CD10 ($r=-0.152$, $p<0.001$).

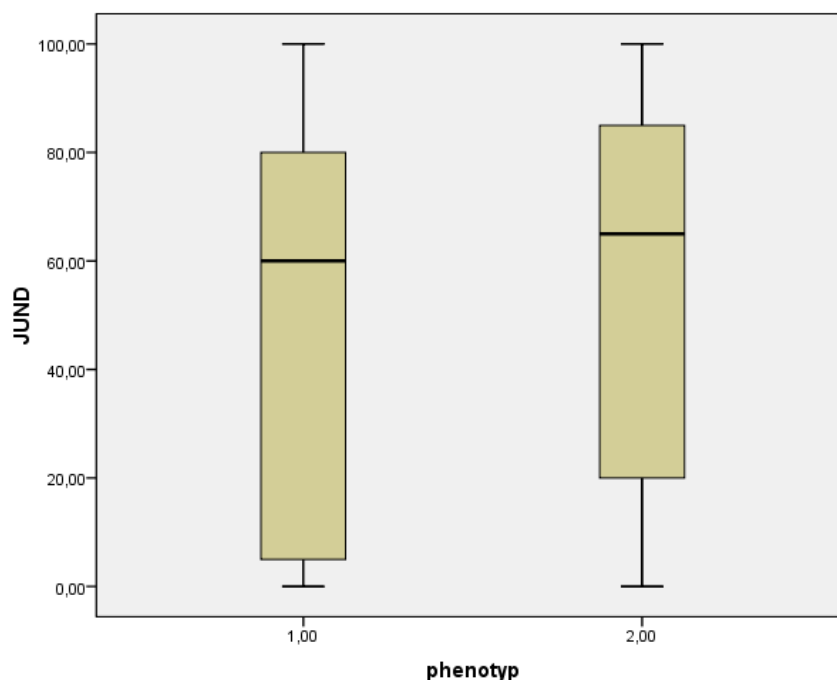
Θετικές συσχετίσεις ανευρέθηκαν μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών JunD και bcl-6 ($r=0.260$, $p=0.03$), καθώς και μεταξύ των Ph-c-Jun και MUM-1/IRF-4 ($r=0.127$, $p=0.03$). Επίσης βρέθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης JunB και του non-GC ανοσοφαινότυπου ($p=0.006$) με βάση ανάλυση Mann-Whitney. Δεν

ανευρέθησαν συσχετίσεις της έκφρασης της p α -STAT3 με πρωτεΐνες Β-κυτταρικής διαφοροποίησης και τους ανοσοφαινοτυπικούς υπότυπους (GC και non-GC) των DLBCL.



Εικόνα 12: Ιστογράμματα της πρωτεϊνικής έκφρασης των Ph-c-Jun, JunB και JunD στους δύο ανοσοφαινοτυπικούς/ιστογενετικούς υπότυπους των DLBCL. Στα ιστογράμματα εκφράζεται η συχνότητα θετικών περιπτώσεων σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών Ph-c-Jun, JunB και JunD στους δύο ανοσοφαινοτυπικούς/ιστογενετικούς υπότυπους των DLBCL (ομάδα 1: GCB και ομάδα 2: non GCB) (θετική συσχέτιση JunB / non-GC; $p = 0.006$)





Εικόνα 13: Διαγράμματα πλαισίου απολήξεων. Στους κάθετους άξονες εμφανίζονται τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών rh-c-Jun, JunB και JunD (ποσοστό θετικών κυττάρων) και στους οριζόντιους οι ανοσοφαινοτυπικοί/ιστογενετικοί υπότυποι των DLBCL (ομάδα 1: GCB και ομάδα 2: non GCB), (θετική συσχέτιση έκφρασης JunB / non GCB ανοσοφαινότυπου, $p= 0.006$).

4.8 Συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης των πρωτεϊνών rh-c-Jun, JunB και JunD και του προτύπου του κυτταρικού κύκλου/πολλαπλασιασμού όπως καθορίζονται από την μέθοδο κ-μέσων τιμών συστάδων (k-means clustering)

Οι περιπτώσεις των DLBCL διαχωρίστηκαν σε συστάδες (clusters) υψηλού (52 cases) και χαμηλού (77 cases) κυτταρικού πολλαπλασιασμού με την μέθοδο κ-μέσων τιμών συστάδων (k-means clustering), με βάση τα επίπεδα συνδυασμένης έκφρασης των πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου Ki-67 και κυκλινών A, B1, D2, D3 και E. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες αυτές ιεραρχήθηκαν με τη δοκιμασία ANOVA σύμφωνα με την συμβολή της κάθε μίας στον διαχωρισμό των DLBCL σε συστάδες υψηλού και χαμηλού κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Συγκεκριμένα η σειρά διάταξης των πρωτεϊνών ανάλογα με την ικανότητα διαχωρισμού ήταν: Ki-67, κυκλίνη A, κυκλίνη D3, κυκλίνη E και κυκλίνη B1. Η κυκλίνη D2 ήταν η μόνη από τις πρωτεΐνες ταξινόμησης που δεν παρουσίασε σημαντική ικανότητα διαχωρισμού των DLBCL σε συστάδες. (Πίνακας 6)

Η στατιστική ανάλυση των διαφορών των μέσων τιμών έκφρασης των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν μεταξύ των συστάδων υψηλού και χαμηλού κυτταρικού πολλαπλασιασμού με το T-test έδειξε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα έκφρασης των ακόλουθων πρωτεϊνών στη συστάδα των DLBCL υψηλού κυτταρικού πολλαπλασιασμού: Ki-67, κυκλίνη A, κυκλίνη B1, κυκλίνη D3, κυκλίνη E, bcl6 (όλα $p < 0.001$), Jun B ($p = 0.033$), Jun D ($p = 0.027$) και MUM-1/IRF-4 ($p = 0.006$). Τα ίδια συμπεράσματα εξήχθησαν και από το μη-παραμετρικό Mann-Whitney test. (Πίνακας 7).

Πίνακας 6: Συμβολή της έκφρασης των πρωτεϊνών Ki-67, κυκλίνη A, κυκλίνη B1, κυκλίνη D2, κυκλίνη D3 και κυκλίνη E στη διάκριση των εξετασθέντων DLBCL σε συστάδες υψηλού και χαμηλού κυτταρικού πολλαπλασιασμού (ANOVA test).

	Συστάδα		Λάθος		F	p
	Mean Square	Βαθμοί ελευθερίας	Mean Square	Βαθμοί ελευθερίας		
Ki-67	23384.889	1	295.812	127	79.053	0.000
Κυκλίνη A	16975.983	1	309.521	120	54.846	0.000
Κυκλίνη B1	3944.277	1	191.108	117	20.639	0.000
Κυκλίνη D3	20774.455	1	495.502	119	41.926	0.000
Κυκλίνη E	6218.316	1	266.826	102	23.305	0.000
Κυκλίνη D2	7.853	1	122.068	119	0.064	0.800

Επεξήγηση: Οι μεταβλητές παρουσιάζονται με την σειρά συμβολής τους (από την υψηλότερη στη χαμηλότερη) στη διαμόρφωση των συστάδων.

Πίνακας 7: Ανάλυση των διαφορών των μέσων τιμών έκφρασης των πρωτεϊνών μεταξύ των δύο συστάδων κυτταρικού πολλαπλασιασμού των DLBCL (T-test).

Group Statistics						
	Συστάδα	Αριθμός (N)	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Μέσο τυπικό σφάλμα	
Ph-c-Jun	1	58	7,9655	14,24715	1,87074	
	2	44	12,2045	22,34464	3,36858	
JunB	1	57	23,9825	26,46594	3,50550	
	2	45	36,8000	32,01534	4,77256	
JunD	1	54	46,1852	35,37779	4,81431	
	2	43	61,3721	31,10430	4,74336	
CD30	1	57	16,1579	28,43400	3,76618	
	2	42	18,8333	32,47357	5,01078	
Ki-67	1	77	56,5325	20,05032	2,28495	
	2	52	83,9808	11,72811	1,62640	
Κυκλίνη A	1	73	23,8356	14,45396	1,69171	
	2	49	47,8980	21,45756	3,06537	
Κυκλίνη B	1	70	13,3429	11,78661	1,40877	
	2	49	25,0408	16,31329	2,33047	
Κυκλίνη D2	1	72	6,7639	11,72393	1,38168	
	2	49	6,2449	9,96563	1,42366	
Κυκλίνη D3	1	72	7,3889	10,86609	1,28058	
	2	49	34,0816	32,46205	4,63744	
Κυκλίνη E	1	63	6,0794	10,53765	1,32762	
	2	41	21,9024	22,54529	3,52098	
p21	1	72	8,3056	13,33072	1,57104	
	2	47	8,9362	13,96954	2,03767	
p27	1	73	12,2603	23,11387	2,70527	
	2	49	21,2245	31,42204	4,48886	
CD10	1	77	8,3506	12,89407	1,46942	
	2	52	10,7308	22,92880	3,17965	
bcl6	1	77	18,6104	19,61683	2,23554	
	2	52	38,8269	30,75247	4,26460	
MUM-1/IRF-4	1	77	37,0390	27,20944	3,10080	
	2	52	52,7500	33,96300	4,70982	

Επεξηγήσεις: N: αριθμός περιπτώσεων, Συστάδα 1: συστάδα χαμηλού κυτταρικού πολλαπλασιασμού, Συστάδα 2: συστάδα υψηλού κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Στατιστικώς σημαντικές ήταν οι διαφορές των μέσων τιμών μεταξύ των δύο συστάδων για τις ακόλουθες μεταβλητές: Ki-67, κυκλίνες A, B, D3 και E, bcl-6 (όλες με $p < 0.001$), JunB ($p = 0.033$), JunD ($p = 0.027$) και MUM-1/IRF-4 ($p = 0.006$).

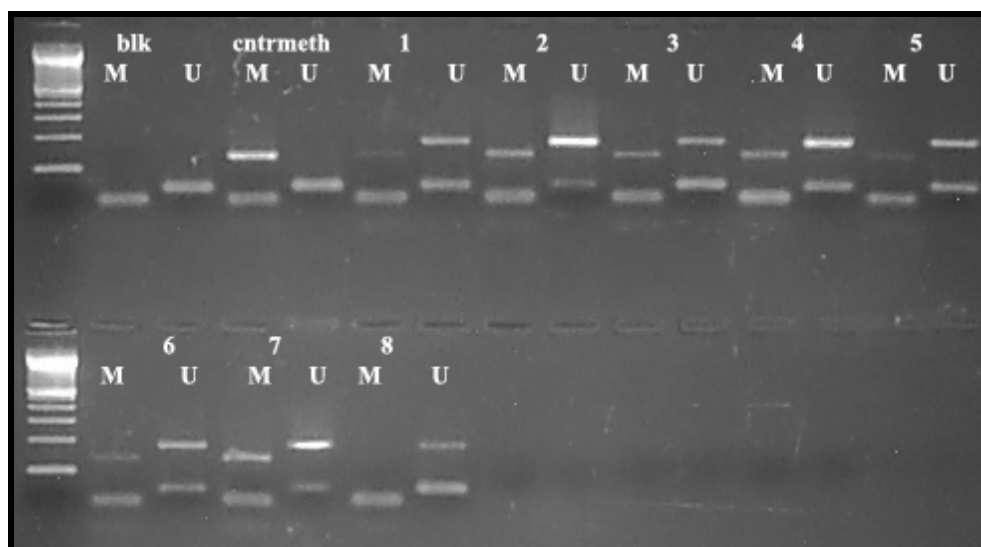
4.9 Συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης των πρωτεϊνών rh-c-Jun, JunB, JunD ή rh-STAT3 και της έκφρασης πρωτεϊνών που ρυθμίζουν την απόπτωση

Δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των rh-c-Jun, JunB, JunD ή rh-STAT3 και της έκφρασης των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση της απόπτωσης bcl-2, bcl-xl, bax, bad, bak και bid (τα αναλυτικά αποτελέσματα της έκφρασης αυτών των πρωτεϊνών αναφέρονται σε προηγούμενες μελέτες της ομάδας μας) (58, 66).

4.10 Μελέτη της μεθυλίωσης του γονιδίου JunB

Με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ειδικής της μεθυλίωσης (MSP) ανευρέθηκε μεθυλίωση του γονιδίου JunB σε δέκα επτά (17) από τις είκοσι (20) εξετασθείσες περιπτώσεις DLBCL με χαμηλή ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης JunB (Εικόνα 14).

Μεθυλίωση του γονιδίου δεν ανιχνεύτηκε σε καμία από τις δέκα περιπτώσεις με υψηλή έκφραση της πρωτεΐνης.



Εικόνα 14: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ειδικής της μεθυλίωσης (MSP) για το γονίδιο JunB. Πηκτή αгарόζης 2% χρωσμένη με βρωμιούχο αιθίδιο μετά από PCR για την ανίχνευση μεθυλιωμένων (M) ή μη μεθυλιωμένων (U) CpG νησιδίων του υποκινητή του γονιδίου Jun B σε DNA δείγματα από περιπτώσεις DLBCL με χαμηλή ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης JunB. "blk": κενή αντίδραση χωρίς προσθήκη γονιδιωματικού DNA (αρνητικός μάρτυρας); "cntr meth": θετικός μάρτυρας με χρήση καθολικά μεθυλιωμένου DNA, θετικός όπως αναμενόταν μόνο για το M. Τα δείγματα 1-7 ήταν θετικά για M και U, ενώ το δείγμα 8 ήταν θετικό μόνο για U.

5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα διάχυτα λεμφώματα από μεγάλα Β-κύτταρα (Diffuse Large B-cell Lymphoma, DLBCL) αντιστοιχούν περίπου στο 25-30% των μη-Hodgkin λεμφωμάτων των ενηλίκων του Δυτικού κόσμου και χαρακτηρίζονται από σημαντική ετερογένεια όσον αφορά τα κλινικά, ιστοπαθολογικά και βιολογικά χαρακτηριστικά τους (50, 51, 67, 210-214). Υπάρχουν ποικίλα δεδομένα, τα οποία συνηγορούν στο ότι διάφοροι μηχανισμοί απορρυθμίζουν τα μοριακά μονοπάτια που ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση και εμπλέκονται στην παθογένεση των DLBCL (50, 51, 67, 210-220).

Πρόσφατα, μελετητές χρησιμοποιώντας cDNA και ολιγονουκλεοτιδικές μικροσυστοιχίες ταυτοποίησαν τρεις μοριακά διακριτούς ιστογενετικούς υπότυπους των DLBCL όσον αφορά την έκφραση γονιδίων Β-κυτταρική διαφοροποίησης: α) τα προερχόμενα από Β-λεμφοκύτταρα του βλαστικού κέντρου (Germinal Center B-Cell Like, GCB-DLBCL), τα οποία εκφράζουν γονίδια των φυσιολογικών Β-λεμφοκυττάρων του βλαστικού κέντρου (π.χ. CD10, bcl6, CD38), β) τα προερχόμενα από ενεργοποιημένα Β-λεμφοκύτταρα (Activated B-Cell Like, ABC-DLBCL), τα οποία εκφράζουν γονίδια που φυσιολογικά επάγονται κατά την διάρκεια της *in vitro* ενεργοποίησης Β-λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος και γ) τα τύπου 3 DLBCL που δεν εκφράζουν σε υψηλά επίπεδα γονίδια των δύο προηγούμενων τύπων (2, 3, 62, 221-224). Μεταγενέστερα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανοσοϊστοχημείας (π.χ. CD10, bcl6, MUM-1/IRF-4, CD38) για τη μελέτη της Β-κυτταρικής διαφοροποίησης των DLBCL και διαπιστώθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ των ανοσοφαινοτυπικών και των μοριακών ευρημάτων (25, 225-228). Σε αυτή τη βάση, με προηγούμενες μελέτες της ομάδας μας, έχουμε δείξει ότι αυξημένη ανοσοϊστοχημική έκφραση των δεικτών CD10 και bcl6, σχετίζεται με αυξημένη απόπτωση και κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε DLBCL, καθώς και ότι DLBCL με ανοσοφαινότυπο αυτόν των Β-κυττάρων του βλαστικού κέντρου (GCB) σχετίζονται με αυξημένο αποπτωτικό δείκτη, υψηλή έκφραση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών bax, bak και bid και χαμηλή έκφραση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης bcl-xl (21, 58, 66). Επιπλέον, έχουμε δείξει ότι συνδυασμένες διαταραχές των p53-Rb και p53-p27 μονοπατιών που ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό και των p53, Rb και p27 μονοπατιών σχετίζονται με υψηλότερη έκφραση της κυκλίνης A (49). Δεδομένου ότι η κυκλίνη A έχει ενεργό ρόλο στην αντιγραφή του DNA, στον αναδιπλασιασμό του κεντροσώματος και στη μίτωση, τα ανωτέρω ευρήματα υποδηλώνουν ότι οι συνδυασμένες διαταραχές των p53, Rb και p27 μονοπατιών στα DLBCL μπορεί να

συμβάλλουν στην αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των νεοπλασματικών κυττάρων.

Ο πολλαπλασιασμός και ο θάνατος των κακοήθων κυττάρων ελέγχεται από μία πληθώρα μεταγραφικών παραγόντων που δρουν σε ποικίλα μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Ο μεταγραφικός παράγοντας ενεργοποιητικής πρωτεΐνης-1 (activator protein-1, AP-1) περιλαμβάνει μία ομάδα από πρωτεΐνες, ικανές να σχηματίζουν ομοδιμερή και ετεροδιμερή. Διαφορετικοί συνδυασμοί ομοδιμερών και ετεροδιμερών αναγνωρίζουν διαφορετικές ακολουθίες στους εκκινητές των AP-1-γονιδίων στόχων που ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση και κατ' επέκταση που συμβάλλουν στον ογκογένεση (112, 135). Από τις πρωτεΐνες που ανήκουν στον AP-1, η παρούσα μελέτη εστιάζει το ενδιαφέρον της στην οικογένεια πρωτεϊνών Jun.

Από δεδομένα εργασιών διαφαίνεται η συμβολή των AP-1 πρωτεϊνών, και ιδιαίτερα των πρωτεϊνών της οικογένειας Jun, στην παθογένεση των κλασικών λεμφωμάτων Hodgkin, τα οποία χαρακτηρίζονται από CD30-θετικά Hodgkin και Reed-Sternberg κύτταρα (78). Σε κυτταροκαλλιέργειες Hodgkin και Reed-Sternberg κυττάρων, η JunB βρέθηκε να συνδέεται με τον εκκινητή του CD30 γονιδίου. Ο τελευταίος έχει τρεις περιοχές: μία μικροδορυφορική αλληλουχία που περιέχει επαναλαμβανόμενα CCAT, έναν πυρηνικό εκκινητή με Sp-1 θέσεις σύνδεσης και κατάρρου στοιχείο εκκινητή (147). Στα φυσιολογικά λεμφοκύτταρα, η μικροδορυφορική αλληλουχία καταστέλλει τον CD30 εκκινητή, ενώ στα Hodgkin και Reed-Sternberg κύτταρα η JunB συνδέεται σε μία AP-1 θέση της μικροδορυφορικής ακολουθίας και εμποδίζει την καταστολή του CD30 εκκινητή (147). Αυτό, έχει ως επακόλουθο, να επάγεται η έκφραση του CD30 γονιδίου στα Hodgkin και Reed-Sternberg κύτταρα.

Βασιζόμενοι σε αυτά τα δεδομένα, ο Rassidakis και συν. (2005) και Drakos και συν. (2007) (120, 149) υπέθεσαν ότι οι JunB και c-Jun πρωτεΐνες μπορεί να υπερεκφράζονται και σε άλλες CD30-θετικές λεμφοϋπερπλαστικές αλλοιώσεις. Για αυτό, μελέτησαν την έκφραση της JunB στην λεμφματοειδή βλατίδωση, στο λέμφωμα Hodgkin και σε διάφορα CD30-θετικά μη-Hodgkin λεμφώματα. Ο Rassidakis και συν. (2005) βρήκαν έκφραση της JunB σε 41 από τις 42 (98%) περιπτώσεις συστηματικών αναπλαστικών λεμφωμάτων από μεγάλα κύτταρα και σε όλες τις περιπτώσεις κλασικών λεμφωμάτων Hodgkin, CD30-θετικών DLBCL (11 περιστατικά), πρωτοπαθών δερματικών αναπλαστικών λεμφωμάτων από μεγάλα κύτταρα και λεμφματοειδών βλατιδώσεων που μελέτησαν (149). Επιπρόσθετα, ο Rassidakis και συν. (2005), χρησιμοποιώντας διπλές ανοσοϊστοχημικές χρώσεις, ανέδειξαν συνέκφραση

της JunB και του CD30 σε Hodgkin και Reed-Sternberg κύτταρα κλασικών λεμφωμάτων Hodgkin και σε νεοπλασματικά κύτταρα ALK-θετικών συστηματικών αναπλαστικών λεμφωμάτων από μεγάλα κύτταρα (149). Αντίθετα, οι ίδιοι μελετητές δεν ανίχνευσαν JunB έκφραση σε όλες τις CD30-αρνητικές περιπτώσεις οζώδους λεμφοεπικρατητικού λεμφώματος Hodgkin και DLBCL που μελέτησαν (149).

Ο Drakos και συν. (2007) (120) ανέλυσαν την έκφραση της c-Jun και βρήκαν θετικότητα σε CD30-θετικά λεμφώματα: 41/41 κλασικά λεμφώματα Hodgkin, 20/23 συστηματικά αναπλαστικά λεμφώματα από μεγάλα κύτταρα ALK-θετικά και 18/26 ALK-αρνητικά, 5/9 πρωτοπαθή δερματικά αναπλαστικά λεμφώματα από μεγάλα κύτταρα, 11/24 λεμφωματοειδείς βλατιδώσεις και 4/11 DLBCL. Οι ίδιοι ερευνητές ανέλυσαν την έκφραση της rh-c-Jun και βρήκαν θετικότητα σε: 16/18 κλασικά λεμφώματα Hodgkin, 9/12 συστηματικά αναπλαστικά λεμφώματα από μεγάλα κύτταρα ALK-θετικά και 7/20 ALK-αρνητικά, 2/6 πρωτοπαθή δερματικά αναπλαστικά λεμφώματα από μεγάλα κύτταρα, 3/17 λεμφωματοειδείς βλατιδώσεις και 1/5 CD30-θετικά DLBCL (120). Όλες οι περιπτώσεις από CD30-αρνητικά λεμφώματα (οζώδες λεμφοεπικρατικό λέμφωμα Hodgkin, θυλακιώδες λέμφωμα, λέμφωμα από το κύτταρο του μανδύα, λέμφωμα οριακής ζώνης, λέμφωμα Burkitt, χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία/λέμφωμα μικρών λεμφοκυττάρων, πλασματοκυτταρικό μυέλωμα και DLBCL) που περιελήφθησαν στην μελέτη τους δεν εξέφραζαν c-Jun (120). Τα αποτελέσματα των Rassidakis και συν. (2005) και Drakos και συν. (2007) (120, 149) βρίσκονται σε συμφωνία με αυτά του Mathas και συν. (2002) (78) που ανακοίνωσαν υπερέκφραση της JunB σε λέμφωμα Hodgkin. Ακόμη, ο Mao και συν. (2003) δημοσίευσαν ότι σε υποομάδα δερματικών T-λεμφωμάτων (συμπεριλαμβανομένων των πρωτοπαθών δερματικών αναπλαστικών λεμφωμάτων από μεγάλα κύτταρα), παρατηρήθηκε έκφραση της JunB (150).

Λαμβάνοντας υπόψη τα ανωτέρω, ενδιαφέρονσα είναι η υπόθεση ότι στα CD30-θετικά λεμφώματα και στη λεμφωματοειδή βλατίδωση, η JunB επάγει την έκφραση του CD30 μέσω αλληλεπίδρασης με τον εκκινητή του CD30 γονιδίου, όπως συμβαίνει στο κλασικό λέμφωμα Hodgkin (147). Ο υποκείμενος μηχανισμός/οί της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης JunB σε CD30-θετικά λεμφώματα και στη λεμφωματοειδή βλατίδωση δεν έχει διευκρινιστεί. Ο Mao και συν. (2003) (150), χρησιμοποιώντας συγκριτικό γενωμικό υβριδισμό (CGH), ανίχνευσαν απόκτηση επιπλέον χρωμοσωμικού υλικού στο γενετικό τόπο 19p13, τη θέση του JunB γονιδίου. Επιπλέον, χρησιμοποιώντας την μέθοδο PCR πραγματικού χρόνου (real-time PCR) βρέθηκε υπερέκφραση της JunB (150). Επομένως, η

γονιδιακή ενίσχυση είναι μία πιθανότητα, παρόλο που ενίσχυση του γονιδίου JunB δεν έχει ακόμα αναφερθεί τόσο σε λεμφώματα Hodgkin όσο και σε άλλα CD30-θετικά μη Hodgkin λεμφώματα. Άλλος μηχανισμός θα μπορούσε να είναι η συσσώρευση πρωτεΐνης JunB λόγω μειωμένης αποδόμησής της σε αυτά τα λεμφώματα. Πρόσφατες μελέτες συνεισφέρουν στην κατανόηση των μηχανισμών ποσοτικών διακυμάνσεων των c-Jun και JunB (229, 230). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί η διαπίστωση του Gao και συν. (2004), ότι περίσσεια της JunB (και c-Jun) μπορεί να ρυθμιστεί από εξωκυττάρια ερεθίσματα σε T-λεμφοκύτταρα μέσω Jun-N terminal κινάσης (JNK)-εξαρτώμενης φωσφορυλίωσης του novel E3 λιγκάση (ligase) Itch (230).

Ο ρόλος των JunB-σχετιζόμενων AP-1 διμερών στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού δεν είναι πλήρως κατανοητός. Παρόλο που έχει προταθεί ότι η JunB μπορεί να δημιουργεί σύμπλοκα με την c-Jun, τα οποία θα μπορούσαν να καταστείλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (166), η επίδραση του JunB και των συμπλόκων του με άλλα μέλη του AP-1 στην κυτταρική ανάπτυξη παραμένει υπό διερεύνηση (165). Πρόσφατες δημοσιεύσεις υποστηρίζουν ότι η ενεργότητα της JunB στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία είναι σημαντικά μειωμένη σε σχέση με τα κύτταρα του περιφερικού αίματος υγιών ενηλίκων και ότι αυτό οφείλεται σε μεθυλίωση του γονιδίου JunB (155). Επιπρόσθετα, απενεργοποίηση της JunB σε ποντίκια έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη σε αυτά μυελοϋπερπλαστικών αλλοιώσεων με χαρακτηριστικά κοινά με τη χρόνια μυελογενή λευχαιμία των ανθρώπων (156). Ο Szremska και συν. (2003) έχουν περιγράψει ότι η διαγονιδιακή έκφραση της JunB μπλοκάρει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των B αλλά όχι και των T-λεμφοκυττάρων, υποδηλώνοντας διαφορετική ικανότητα επίδρασης της JunB στις διάφορες υποομάδες λεμφοκυττάρων (138).

Οι ανωτέρω μελέτες έχουν δείξει ότι: α) η υπερέκφραση της JunB είναι σχεδόν σταθερό εύρημα των CD30-θετικών λεμφωμάτων και της λεμφωματοειδούς βλατίδωσης και β) η έκφραση και ενεργοποίηση της c-Jun περιορίζεται στις CD30-θετικές λεμφοϋπερπλαστικές αλλοιώσεις. Περισσότερες μελέτες είναι απαραίτητες ώστε να διελευκανθεί ο υποκείμενος μοριακός μηχανισμός της απενεργοποίησης της JunB καθώς και ο πιθανός ογκογόνος ρόλος του σηματοδοτικού μονοπατιού JunB/CD30 σε αυτά τα λεμφώματα. Αναφορικά με τα ανωτέρω, πρόσφατες *in vitro* μελέτες σε κυτταρικές σειρές έδειξαν ότι ο μεταγραφικός παράγοντας Ets-1, ο οποίος είναι διαρκώς ενεργοποιημένος από ERK1/2 MAPK, παίζει σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό που οδηγεί στην υπερέκφραση της JunB και του CD30 (231).

Εκτός από τις προαναφερθείσες μελέτες σε CD30-θετικά λεμφώματα, η έκφραση της οικογένειας πρωτεϊνών Jun έχει επιπλέον αναλυθεί σε πρωτοπαθή δερματικά T-λεμφώματα. Πράγματι, ο Mao X και συν. (2008) (151) καθόρισαν το γενωμικό και το προφίλ έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων AP-1 σε πρωτοπαθή δερματικά T-λεμφώματα χρησιμοποιώντας ανοσοϊστοχημεία, μικροσυστοιχίες (Affymetrix expression microarray), αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου ανάστροφης τρανσκριπτάσης (real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR) και φθορίζοντα in situ υβριδισμό (FISH). Πιο αναλυτικά, ανοσοϊστοχημική έκφραση της JunB ανιχνεύθηκε στα νεοπλασματικά κύτταρα 17 από 33 περιπτώσεις συνδρόμου Sezary και έκφραση της JunD σε 16 από 23 περιπτώσεις σπογγοειδούς μυκητίασης (151). Δε βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της JunB και του CD30. Βρέθηκε όμως συνέκφραση της φωσφοριωμένης και της ολικής ERK ½ (extracellular signal-regulated kinase) MAPK(mitogen-activated protein kinase) πρωτεΐνης σε 7 από 12 JunB-θετικές περιπτώσεις συνδρόμου Sezary (151). Αυτό είναι αξιοσημείωτο εύρημα λαμβανομένου υπόψη ότι οι MAPK κινάσες: ERK, JNK και p38 φωσφορυλιώνουν συγκεκριμένα υποστρώματα της AP-1 οικογένειας με την JNK να ρυθμίζει τόσο τη φωσφορυλίωση της c-Jun όσο της JunB (89, 118, 135, 165, 232).

Το μονοπάτι ERK διαμεσολαβεί σήματα κυτταρικής ανάπτυξης και επιβίωσης και προάγει την κυτταρική διαφοροποίηση, ενώ τα μονοπάτια p38 και JNK διαμεσολαβούν κυρίως προ-αποπτωτικά μονοπάτια και σήματα αναστολής της ανάπτυξης με τα μονοπάτια των p38 MAPK κινασών να συμβάλλουν σημαντικά στην ανταπόκριση προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών (π.χ. ιντερφερόνες, TNFα, TGFb) (89, 118, 141, 165, 232). Αυξητικοί παράγοντες και παράγοντες ορού ρυθμίζουν τις AP-1 μέσω της ERK1/2, ενώ προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και γενοτοξικό stress (π.χ. UV) ρυθμίζουν τις AP-1 μέσω των JNK (c-JUN N-terminal kinase) και των p38 MAPK κινασών. Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι MAPK ρυθμίζονται από μικρές G-πρωτεΐνες όπως οι RHO για τα μονοπάτια p38 και JNK και ενεργοποιούνται από ογκογονίδια όπως τα RAS και RAF για το μονοπάτι ERK (89, 118, 135, 165, 232).

Στη μελέτη του Mao X και συν. (2008) σε μικροσυστοιχίες (microarrays) βρέθηκε περισσότερο από τρεις φορές αύξηση της έκφρασης της JunB σε 3 από 6 ασθενείς με σύνδρομο Sezary (151). Με την μέθοδο της PCR-πραγματικού χρόνου (RT-PCR) πραγματοποιήθηκε επιβεβαίωση της υπερέκφρασης της JunB σε 4 και της JunD σε 3 από 4 περιπτώσεις συνδρόμου Sezary (151). Με την μέθοδο του φθορίζοντος in situ υβριδισμού βρέθηκαν αυξημένα αντίγραφα του γονιδίου JunB σε 4 από 7 περιπτώσεις συνδρόμου Sezary.

Βασιζόμενοι σε αυτά τα ευρήματα, ο Mao και συν. (2008) (151) υποστήριξαν ότι η απορρύθμιση της έκφρασης του AP-1 στα πρωτοπαθή δερματικά T-λεμφώματα είναι αποτέλεσμα της ανώμαλης έκφρασης της JunB και πιθανόν και της JunD, η οποία οφείλεται σε γενωμική ενίσχυση (genomic amplification) και διαρκή ενεργοποίηση της πρωτεΐνης ERK1/2 σε αυτόν τον τύπο λεμφώματος.

Στη δημοσίευση του Mao και συν. (2008) (151), μόνο λίγες από τις περιπτώσεις σπογγοειδούς μυκητίασης και συνδρόμου Sezary που εξετάστηκαν εξέφραζαν CD30, δεν υπήρχε συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης JunB και CD30 και δεν βρέθηκε υπερέκφραση των ανάρρους MAPK γονιδίων. Τα ευρήματα αυτά συνηγορούν υπέρ του ότι η έκφραση του CD30 σε πρωτοπαθή δερματικά T-λεμφώματα, αντίθετα με ότι ισχύει για το λέμφωμα Hodgkin και το συστηματικό αναπλαστικό λέμφωμα από μεγάλα κύτταρα, πιθανότατα δεν ρυθμίζεται ευθέως από την υπερέκφραση του JunB (151). Παραμένει να διαπιστωθεί στο μέλλον εάν υφίσταται σταθερή έκφραση του CD30 και των JunB ανάρρους γονιδίων σε αυτή την ομάδα λεμφωμάτων χρησιμοποιώντας ιστικές μικροσυστοιχίες και πρωτεομική ανάλυση.

Παρόλο που ο c-Jun είναι ένας ικανός μεταγραφικός ενεργοποιητής και γενικά προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω επαγωγής του CCND1, στην εργασία του Mao και συν. (2008) (151) η πλειοψηφία των περιπτώσεων σπογγοειδούς μυκητίασης και συνδρόμου Sezary δεν εξέφραζαν CCND1 σε επίπεδο πρωτεΐνης ή RNA, υποδηλώνοντας ότι μπορεί να επέρχεται απώλεια της έκφρασης του CCND1 σαν επακόλουθο ανώμαλης AP-1 έκφρασης σε πρωτοπαθή δερματικά T-λεμφώματα. Ωστόσο, στην ίδια εργασία παρατηρήθηκε φυσιολογική έκφραση άλλων κατάρρους γονιδίων (P14, P15, P16, P21, P38 και P53) σε όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν. Η ακριβής δράση του AP-1 πιθανότατα εξαρτάται από τον τύπο των κυττάρων και των ιστών και την δομική σύνθεση των διμερών. Επιπλέον, ενώ η c-Jun συνδέεται στις περισσότερες AP-1 θέσεις, η JunB φαίνεται να είναι πιο εκλεκτική (89, 135, 165, 233, 234).

Αλληλεπιδράσεις του AP-1 με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες όπως τον πυρηνικό παράγοντα-κΒ2 (NFκΒ2) και το STAT3 έχουν επίσης τεκμηριωθεί (78, 89, 135, 161, 165, 233, 234). Ο Mao και συν. (2008) (151) εντόπισαν αυξημένη έκφραση του γονιδίου TNFRSF7 σε 3 περιπτώσεις συνδρόμου Sezary, των STAT1 και STAT5B σε 2 περιπτώσεις συνδρόμου Sezary και του NFκΒ σε μία περίπτωση συνδρόμου Sezary, ενώ μειωμένη έκφραση του STAT4 και φυσιολογική του STAT3 ανιχνεύτηκε σε όλες τις περιπτώσεις. Η ανώμαλη έκφραση των STAT4, TNFRSF7, STAT1 και STAT5B παραμένει αδιευκρίνιστη,

αλλά μια πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι η απορρυθμισμένη έκφραση των JunB/JunD σε πρωτοπαθή δερματικά T-λεμφώματα. Είναι γνωστό ότι η JunB ρυθμίζει ειδικά την έκφραση διάφορων κατάρρους γονιδίων, όπως των CD30, BCL3, MET και NFAT.

Στην παρούσα μελέτη αναλύσαμε την έκφραση των πρωτεϊνών Jun σε DLBCL με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας. Παρατηρήσαμε ότι η έκφραση της JunB συσχετίστηκε θετικά με την έκφραση των πρωτεϊνών Ki-67 ($p=0.032$), κυκλίνης A ($p=0.042$), κυκλίνης B1 ($p=0.016$), κυκλίνης D2 ($p=0.037$), κυκλίνης E ($p=0.001$) και CD30 ($p<0.001$). Σε συμφωνία με προηγούμενη μελέτη που υποστήριξε ότι η JunB ρυθμίζει θετικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (112), τα δικά μας ευρήματα συνηγορούν υπέρ του ότι η JunB είναι πιθανόν θετικός ρυθμιστής του πολλαπλασιασμού των νεοπλασματικών κυττάρων σε DLBCL.

Στην παρούσα μελέτη, η έκφραση της JunD συσχετίστηκε θετικά με την έκφραση των Ki-67 ($p=0.01$) και κυκλίνης E ($p=0.007$). Το εύρημα αυτό σε συνδυασμό με δεδομένα προηγούμενων μελετών που ανέδειξαν αρνητικό ρυθμιστικό ρόλο της JunD στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (112), υποδεικνύει την απορρύθμιση της έκφραση της JunD σε DLBCL. Από την άλλη μεριά, η έκφραση της JunD μπορεί να εμπλέκεται στη ρύθμιση της απόπτωσης δεδομένου ότι, η JunD μπορεί να διαμεσολαβεί σε σηματοδοτικά μονοπάτια επιβίωσης μέσω του μονοπατίου JNK (235). Εν τούτοις, η υπόθεση αυτή δεν υποστηρίζεται από πειραματικά δεδομένα σε διαγονιδιακά ποντίκια που έδειξαν ότι η JunD δεν μπορεί να προστατέψει θυμοκύτταρα, B ή T-λεμφοκύτταρα από πολυάριθμα αποπτωτικά ερεθίσματα (236).

Με σκοπό να αναλύσουμε περαιτέρω την σχέση μεταξύ της οικογένειας των πρωτεϊνών Jun και το πρότυπο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού χρησιμοποιήσαμε την μέθοδο k-μέσων τιμών συστάδων (k-means clustering). Οι περιπτώσεις των DLBCL διαχωρίστηκαν σε συστάδες (cluster) υψηλού (52 περιπτώσεις) και χαμηλού (77 περιπτώσεις) κυτταρικού πολλαπλασιασμού με την μέθοδο k-μέσων τιμών συστάδων (k-means clustering), με βάση τα επίπεδα συνδυασμένης έκφρασης των πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου Ki-67 και κυκλινών A, B1, D2, D3 και E. Επιπρόσθετα, οι πρωτεΐνες αυτές ιεραρχήθηκαν με τη δοκιμασία ANOVA (analysis of variance) σύμφωνα με τη συμβολή της καθεμιάς στο διαχωρισμό των περιπτώσεων των DLBCL σε συστάδες υψηλού και χαμηλού κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η σειρά της στατιστικώς σημαντικής ικανότητας διαχωρισμού των πρωτεϊνών αυτών από υψηλότερη σε χαμηλότερη συμβολή στον διαχωρισμό ήταν η ακόλουθη: Ki-67, κυκλίνη A, κυκλίνη D3, κυκλίνη E και κυκλίνη B1 (όλες $p<0.001$). Η κυκλίνη D2 ήταν η μόνη πρωτεΐνη ταξινόμησης που δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντική

ικανότητα διαχωρισμού των DLBCL σε συστάδες υψηλού και χαμηλού κυτταρικού πολλαπλασιασμού ($p=0.800$). Η ανάλυση των διαφορών των μέσων τιμών έκφρασης των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν μεταξύ των δύο συστάδων κυτταρικού πολλαπλασιασμού χρησιμοποιώντας το T-test, έδειξε στατιστικώς σημαντικά υψηλότερα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών: Ki-67, κυκλίνη A, κυκλίνη B1, κυκλίνη D3, κυκλίνη E και bcl6 (όλα $p<0.001$), JunB ($p=0.033$) και JunD ($p=0.027$) στη συστάδα υψηλού κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η συσχέτιση της έκφρασης των πρωτεϊνών JunB και JunD με τη συστάδα των DLBCL υψηλού κυτταρικού πολλαπλασιασμού υποδεικνύει ότι η αυξημένη έκφρασή τους μπορεί να εμπλέκεται στην παθογένεση των DLBCL συμμετέχοντας στην επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Στην παρούσα μελέτη, η έκφραση της JunB συσχετίστηκε θετικά με την έκφραση της πρωτεΐνης MUM-1/IRF-4 ($p<0.001$) και με τον non-GC ιστογενετικό ανοσοφαινότυπο ($p=0.006$) και αρνητικά με την έκφραση της πρωτεΐνης CD10 ($p<0.001$). Η στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ JunB και non-GC ανοσοφαινότυπου ίσως να οφείλεται, τουλάχιστον εν μέρει, στην ρύθμιση του JunB από τον NFκB, δεδομένου ότι στο κλασικό λέμφωμα Hodgkin το JunB βρίσκεται υπό τον έλεγχο του NFκB και είναι γνωστό ότι ο NFκB είναι ενεργοποιημένος στον ανοσοφαινοτυπικό υπότυπο των non-GC DLBCL.

6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Αξιολογώντας τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα:

- 1) Στη μελέτη αυτή ανιχνεύθηκαν για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών της οικογένειας Jun (ph-c-Jun, JunB και JunD) και της ph-STAT3 στα DLBCL. Ανιχνεύθηκε έκφραση των πρωτεϊνών ph-c-Jun, JunB, JunD και ph-STAT3 στο 67%, 97%, 100% και 67% των περιπτώσεων DLBCL, αντίστοιχα.
- 2) Η στατιστικώς σημαντική θετική συσχέτιση της έκφρασης των πρωτεϊνών JunB και JunD με πρωτεΐνες κυτταρικού πολλαπλασιασμού και με την συστάδα (cluster) των DLBCL υψηλού κυτταρικού πολλαπλασιασμού (όπως προέκυψε από k-means clustering) που βρέθηκε στην παρούσα μελέτη, υποδεικνύει ότι η αυξημένη έκφραση τους μπορεί να εμπλέκεται στην παθογένεση των DLBCL συμμετέχοντας στην επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.
- 3) Διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της πρωτεΐνης JunB και του non-GC ανοσοφαινότυπου των DLBCL. Η συσχέτιση αυτή ίσως να οφείλεται στη ρύθμιση της JunB από το μεταγραφικό παράγοντα NFκB, δεδομένου ότι στο κλασσικό Hodgkin λέμφωμα η JunB βρίσκεται υπό τον έλεγχο του NFκB και ο NFκB είναι ενεργοποιημένος στα non-GC DLBCL. Τα JunB-θετικά DLBCL πιθανώς να σχετίζονται με δυσμενή πρόγνωση, δεδομένου ότι η πρωτεΐνη αυτή συσχετίζεται με τον non-GC ανοσοφαινότυπο και με υψηλό κυτταρικό πολλαπλασιασμό.
- 4) Βρέθηκε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση της έκφρασης των πρωτεϊνών JunD και Bcl-6. Το εύρημα αυτό συμφωνεί με το εύρημα προηγούμενης μελέτης στην οποία διαπιστώθηκε ότι η JunD ενισχύει την έκφραση του Bcl-6 των B-κυττάρων του βλαστικού κέντρου του ποντικού.

- 5) Βρέθηκε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ JunB και μορίου ενεργοποίησης CD30 σε DLBCL. Αυτό το εύρημα επιβεβαιώνει προηγούμενα ευρήματα που ανευρίσκουν σημαντική συσχέτιση μεταξύ JunB και CD30 σε κλασικό Hodgkin λέμφωμα και CD30-θετικά αναπλαστικά λεμφώματα από μεγάλα κύτταρα.
- 6) Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των rh-c-Jun, JunB, JunD ή rh-STAT3 και της έκφρασης των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση της απόπτωσης bcl-2, bcl-x1, bax, bad, bak και bid.
- 7) Στη μελέτη αυτή ανιχνεύθηκε μεθυλίωση του εκκινητή του JunB σε 17/20 περιπτώσεις DLBCL με χαμηλή ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης. Η ανώμαλη μεθυλίωση του εκκινητή του γονιδίου JunB πιθανώς να είναι ο υποκείμενος μηχανισμός στις περιπτώσεις με χαμηλή ανοσοϊστοχημική έκφραση της JunB πρωτεΐνης.
- 8) Δεν βρέθηκαν συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης της rh-STAT3 και των πρωτεϊνών της οικογένειας Jun, του δείκτη CD30 και των πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου.

7 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η οικογένεια των πρωτεϊνών Jun που περιλαμβάνει τους μεταγραφικούς παράγοντες c-Jun, JunB και JunD, αποτελεί μέλος του συμπλέγματος του μεταγραφικού παράγοντα της ενεργοποιητικής πρωτεΐνης-1 (AP-1, activator protein-1) και εμπλέκεται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην απόπτωση. Αποτελέσματα μελετών έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες c-Jun και JunB εκφράζονται στο κλασικό Hodgkin λέμφωμα και σε CD30-θετικά μη-Hodgkin λεμφώματα. Η οικογένεια των πρωτεϊνών STAT είναι σημαντικοί μεταγραφικοί παράγοντες που εμπλέκονται στην κυτταρική διαφοροποίηση, στον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση. Η οικογένεια STAT ενεργοποιείται μέσω του JAK/STAT μονοπατιού μεταγωγής σήματος. Μελέτη της έκφρασης της οικογένειας των πρωτεϊνών Jun και rh-STAT3 σε DLBCL δεν έχει δημοσιευθεί στη διεθνή βιβλιογραφία, από όσο τουλάχιστον γνωρίζουμε.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών rh(phospho)-c-Jun, JunB, JunD και rh-STAT3 σε 130 περιπτώσεις διάχυτων Β-λεμφωμάτων από μεγάλα κύτταρα (DLBCL, Diffuse Large B-Cell Lymphoma) σε σχέση με: 1) την ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης ενεργοποίησης CD30, 2) το πρότυπο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (κυκλίνες A, B1, D2, D3 και E και Ki-67), 3) την ανοσοϊστοχημική έκφραση πρωτεϊνών Β-κυτταρικής διαφοροποίησης (CD10, Bcl-6 και MUM-1/IRF4) και 4) τους ιστογενετικούς/ανοσοφαινοτυπικούς υπότυπους [ομοιάζοντας με αυτόν των Β-κυττάρων του βλαστικού κέντρου (Germinal Center, GC) και του μη ομοιάζοντας (non-GC)], όπως αυτοί καθορίζονται από την έκφραση των πρωτεϊνών Β-κυτταρικής διαφοροποίησης. Σε ορισμένες περιπτώσεις με χαμηλά και υψηλά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης JunB πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ειδικής της μεθυλίωσης (MSP, methylation specific PCR), με σκοπό να διερευνηθεί εάν η μεθυλίωση του εκκινητή του γονιδίου JunB σχετίζεται με σιγή του γονιδίου.

Στην παρούσα μελέτη έκφραση των πρωτεϊνών rh-c-Jun, JunB, JunD και rh-STAT3 ανιχνεύθηκε στις 59/103 (67%), 100/103 (97%), 94/98 (97%) και 41/61 (67%) περιπτώσεις DLBCL, αντίστοιχα. Η έκφραση της JunB συσχετίστηκε θετικά με την έκφραση των πρωτεϊνών Ki-67 ($p=0.032$), κυκλίνης A ($p=0.042$), κυκλίνης B1 ($p=0.016$), κυκλίνης D2 ($p=0.037$), κυκλίνης E ($p=0.001$), CD30 ($p<0.001$) και MUM-1/IRF-4 ($p<0.001$), καθώς και με τον non-GC ιστογενετικό ανοσοφαινότυπο ($p=0.006$) και αρνητικά με την έκφραση της πρωτεΐνης CD10 ($p<0.001$). Η έκφραση της JunD συσχετίστηκε θετικά με την Ki-67

($p=0.01$), την κυκλίνη E ($p=0.007$) και την Bcl-6 ($p=0.03$) και η ph-c-Jun θετικά με την MUM-1/IRF-4 ($p=0.03$).

Μεθυλίωση του JunB εκκινήτη ανιχνεύτηκε σε 17 από τις 20 περιπτώσεις με χαμηλή ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης JunB που εξετάστηκαν.

Οι περιπτώσεις των DLBCL διαχωρίστηκαν σε συστάδες (cluster) υψηλού (52 περιπτώσεις) και χαμηλού (77 περιπτώσεις) κυτταρικού πολλαπλασιασμού με την μέθοδο k-μέσων τιμών συστάδων (k-means clustering), βάσει των επιπέδων συνδυασμένης έκφρασης των πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου Ki-67 και των κυκλινών A, B1, D2, D3 και E. Επιπρόσθετα, οι πρωτεΐνες αυτές ιεραρχήθηκαν με τη δοκιμασία ANOVA σύμφωνα με τη συμβολή της καθεμιάς στο διαχωρισμό των περιπτώσεων των DLBCL σε συστάδες υψηλού και χαμηλού κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η σειρά της στατιστικής σημαντικής ικανότητας διαχωρισμού των πρωτεϊνών αυτών ήταν: Ki-67, κυκλίνη A, κυκλίνη D3, κυκλίνη E και κυκλίνη B1. Η κυκλίνη D2 ήταν η μόνη πρωτεΐνη ταξινόμησης που δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντική ικανότητα διαχωρισμού. Η ανάλυση των διαφορών των μέσων τιμών έκφρασης των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν μεταξύ των δύο συστάδων κυτταρικού πολλαπλασιασμού έδειξε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών: Ki-67, κυκλίνη A, κυκλίνη B1, κυκλίνη D3, κυκλίνη E και bcl6 (όλα $p<0.001$), JunB ($p=0.033$), JunD ($p=0.027$) και MUM-1/IRF-4 ($p=0.006$) στην συστάδα υψηλού κυτταρικού πολλαπλασιασμού (T-test).

Συμπερασματικά, στην παρούσα μελέτη διαπιστώθηκε ότι οι πρωτεΐνες της οικογένειας Jun και η πρωτεΐνη ph-STAT3 εκφράζονται σε DLBCL. Η συσχέτιση της έκφρασης των πρωτεϊνών JunB και JunD με τη συστάδα των DLBCL υψηλού κυτταρικού πολλαπλασιασμού υποδεικνύει ότι η αυξημένη έκφραση τους μπορεί να εμπλέκεται στη παθογένεση των DLBCL, επάγοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η συσχέτιση μεταξύ JunB και non-GC ανοσοφαινότυπου ίσως να οφείλεται στην ρύθμιση της JunB από τον NFκB, δεδομένου ότι στο κλασικό λέμφωμα Hodgkin η JunB βρίσκεται υπό τον έλεγχο του NFκB και είναι γνωστό ότι ο NFκB είναι ενεργοποιημένος στον ανοσοφαινοτυπικό υπότυπο των non-GC DLBCL. Η συσχέτιση των πρωτεϊνών JunD and Bcl-6 συμφωνεί με το εύρημα ότι η JunD ενισχύει την έκφραση του Bcl-6 των B-κυττάρων του βλαστικού κέντρου του ποντικού. Η ανώμαλη μεθυλίωση του εκκινήτη του γονιδίου JunB πιθανώς να είναι ο υποκείμενος μηχανισμός στις περιπτώσεις με χαμηλή έκφραση της JunB πρωτεΐνης.

8 ABSTRACT

Study of signaling pathways involved in cell cycle and apoptosis regulation of Diffuse Large B-cell Lymphomas

Papoudou-Bai Alexandra

The Jun family includes c-Jun, JunB and JunD that are components of the activator protein-1 (AP-1) transcription factor complex involved in cell proliferation and apoptosis. Recent evidence suggests that c-Jun and JunB are expressed in classical Hodgkin lymphomas and CD30-positive non-Hodgkin lymphomas. The STAT family are important transcription factors that have been implicated in cell differentiation, cycle and death. STAT can be activated via the JAK-STAT pathway. Therefore, the immunohistochemical expression of Jun family proteins was studied in relation to: 1) the CD30 expression, 2) the proliferation profile (cyclin A, B1, D2, D3, E and Ki-67) and 3) B cell differentiation markers (CD10, Bcl-6, MUM-1/IRF4) and phenotype in 130 de novo DLBCL. In a subset of cases with low JunB expression, we performed MSP (methylation specific PCR) in order to investigate whether methylation of the JunB promoter correlates with silencing of the gene. Expression of phospho(ph)-c-Jun, JunB, JunD and ph-STAT3 was found in 59/103 (67%), 100/103 (97%), 94/98 (97%) and 41/61 (67%) cases of DLBCL, respectively. The expression of JunB was positively associated with Ki-67 ($p=0.032$), cyclin A ($p=0.042$), cyclin B1 ($p=0.016$), cyclin D2 ($p=0.037$), cyclin E ($p=0.001$), CD30 ($p<0.001$), MUM-1/IRF-4 ($p<0.001$) and non-GC phenotype ($p=0.006$) and negatively with CD10 ($p<0.001$). Moreover, the expression of JunD was positively associated with Ki-67 ($p=0.01$), cyclin E ($p=0.007$) and Bcl-6 ($p=0.03$) as well as the expression of ph-c-Jun with MUM-1/IRF-4 ($p=0.03$). Cases were also assigned to a high (52 cases) and a low (77 cases) proliferation cluster by *K*-means clustering based on the combined expression levels of the proteins Ki-67 and cyclin A, B1, D2, D3 and E. These classification variables were ordered by ANOVA according to their statistically significant contribution to the derived clustering from highest to lowest, as follows: Ki-67, cyclin A, cyclin D3, cyclin E and cyclin B1. Cyclin D2 was the only classification variable with statistically non-significant separation ability. Analysis of the differences in mean values between the two clusters by T-tests, showed significantly higher expression levels of the Ki-

67, cyclin A, cyclin B1, cyclin D3, cyclin E, bcl6 (all $p < 0.001$), JunB ($p = 0.033$), JunD ($p = 0.027$) and MUM-1/IRF-4 ($p = 0.006$) in the high expression cluster. Methylation of the JunB promoter was found in 17/20 of the cases with low JunB expression. The proteins of Jun family expressed in DLBCL. The association between JunB and JunD and high proliferation cluster in DLBCL, suggests that increased JunB and JunD expression may be involved in their pathogenesis by favoring tumor cell proliferation. The association between JunB and non-GC phenotype may reflect NF κ B control of JunB in view of previous findings that JunB is under NF κ B control in classical Hodgkin lymphomas and NF κ B is activated in non-GC DLBCL. The association between JunD and Bcl-6 expression is in line with data that JunD is a major enhancer molecule of Bcl-6 in mouse GC B-cells. Aberrant methylation of the JunB promoter may be the underlying mechanism in the cases with low JunB expression.

9 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Swerdlow S, Campo E, Harris N, et. al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th edition, International Agency for Research on Cancer, Lyon. 2008:233-7.
2. Alizadeh A, Eisen M, Davis R, et. al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403:503-11.
3. Rosenwald A, Wright G, Chan W, et. al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2002;346:1937-47.
4. Stein H. and Hummel. Histopathology in the light of molecular profiling. *Ann Oncol*. 2006;17:5-7.
5. Rimsza L, Roberts R, Miller T, et. al. Loss of MHC class II gene and protein expression in diffuse large B-cell lymphoma is related to decreased tumor immunosurveillance and poor patient survival regardless of other prognostic factors: a follow-up study from the Leukemia and Lymphoma Molecular Profiling Project BLOOD. 2004;103:4251-8.
6. Staudt L. and Dave S. The biology of human lymphoid malignancies revealed by gene expression profiling. *Adv Immunol*. 2005;87:163-208.
7. Adams S. and Cory J. The BCL-2 family proteins. Arbiters of cell survival. *Science*. 1998;281:1322-6.
8. Evan T. and Littlewood G. A matter of life and cell death. *Science*. 1998;281:1317-22.
9. Weinert T. DNA damage and checkpoint pathways: Molecular anatomy and interactions with repair. *Cell*. 1998;94:555-8.
10. Cox L. Multiple pathways control cell growth and transformation: overlapping and independent activities of p53 and p21. *J Pathol*. 1997;183:134-40.
11. Harrington E, Bruce J, Harlow E, et. al. pRb plays an essential role in cell cycle arrest induced by DNA damage. *Proc Natl Acad USA* 1998;95:11945-50.
12. Hsieh J, Chan F, O'Connor D, et. al. Rb regulates the stability and the apoptotic function of p53 via mdm2. *Molecular Cell* 1999;3:181-93.
13. Sanchez-Beato M, Camacho F, Martinez-Montero J, et. al. Anomalous high p27/KIP1 expression in a subset of aggressive B-cell lymphomas is associated with cyclin D3 overexpression and P27/KIP1-cyclin D3 colocalization in tumor cells. *BLOOD*. 1999;94:765-72.
14. Lloyd R, Erickson L, Jin L, et. al. P27/KIP1: a multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers. *Am J Pathol*. 1999;154:313-23.
15. Sander C, Yano T, Clark H, et. al. p53 mutation is associated with progression in follicular lymphomas. *BLOOD*. 1993;82:1994-2004.
16. Shiohara M, El-Deiry W, Wada M, et. al. Absence of waf1 mutations in a variety of human malignancies. *BLOOD*. 1994;84:3781-4.

17. Erlanson M, Portin C, Linderholm D, et al. Expression of cyclin E and the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in malignant lymphomas-prognostic implications. *BLOOD*. 1998;92:770-7.
18. Miller T, Crogan T, Dahlberg S, et. al. Prognostic significance of the Ki-67 associated proliferative antigen in aggressive non-Hodgkin's lymphomas: A prospective Southwest Oncology Group trial. *BLOOD*. 1994;83:1460-6.
19. Koduru P, Raju K, Vadmal V, et. al. Correlation between mutation in P53, p53 expression, cytogenetics, histologic type, and survival in patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *BLOOD*. 1997;90:4078-91.
20. Winter J, Andersen J, Reed J, et. al. Bcl-2 expression correlates with lower proliferative activity in the intermediate and high grade non-Hodgkin's lymphomas: an eastern cooperative oncology group and southwest oncology group cooperative laboratory study. *BLOOD*. 1998;91:1391-8.
21. Bai M, Agnantis N, Skyrilas A, et. al. Increased expression of the bcl6 and CD10 proteins is associated with increased apoptosis and proliferation in diffuse large B-cell lymphomas. *Mod Pathol*. 2003;16(5):471-80.
22. Bai M, Tsanou E, Agnantis N, et. al. Expression of cyclin D3 and E and identification of distinct clusters of proliferation and apoptosis in diffuse large B-cell lymphomas. *Histol Histopathol*. 2003;18:449-57.
23. Staudt L. Gene expression physiology and pathophysiology of the immune system. *Trends in Immunology* 2001;22(1):35-40.
24. Ikeda K, Monden T, Kanoh T, et. al. Extraction and analysis of diagnostically useful proteins from formalin-fixed paraffine-embedded sections. *Journal of Histochem Cytochem* 1998;46:397-403.
25. Hans C, Weisenburger D, Greiner T, et. al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *BLOOD*. 2003;103:275-82.
26. Fu K, Weisenburger D, Choi W, et. al. Addition of rituximab to standard chemotherapy improves the survival of both the germinal center B-cell-like and non-germinal center B-cell-like subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2008;26(28):4587-94.
27. Lenz G, Wright G, Dave S, et. al. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 2008;359(22):2313-23.
28. Choi W, Greiner T, and Piris M. A new immunostain improves the classification of diffuse large B-cell lymphoma into prognostically significant subgroups. *Mod Pathol*. 2008;21:250A.
29. Choi W, Weisenburger D, Greiner T, et. al. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clin Cancer Res*. 2009;15(17):5494-502.
30. Muris J, Meijer C, Vos W, et.al. Immunohistochemical profiling based on Bcl-2, CD10 and MUM1 expression improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B cell lymphoma. *J Pathol*. 2006;208:714-23.

31. Nyman H, Adde M, Karjalainen-Lindsberg M, et. al. Prognostic impact of immunohistochemically defined germinal center phenotype in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with immunochemotherapy. *BLOOD*. 2007;109:4930-5.
32. Natkunam Y, Farinha P, Hsi E, et. al. LMO2 protein expression predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with anthracycline-based chemotherapy with and without rituximab. *J Clin Oncol*. 2008;26:447-54.
33. Iqbal J, Neppalli V, Wright G, et. al. BCL2 expression is a prognostic marker for the activated B-cell-like type of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2006;24(6):961-8.
34. Leroy K, Haioun C, Lepage E, et. al. p53 gene mutations are associated with poor survival in low and low-intermediate risk diffuse large B-cell lymphomas. *Ann Oncol* 2002;13(7):1108-15.
35. M. Hartwell L, and Kastan. Cell cycle control and cancer. *Science*. 1994;266:1821-8.
36. Besson A, Dowdy S, and Roberts J. CDK inhibitors: Cell cycle regulators and beyond. *Developmental Cell*. 2008;14:159-69.
37. Sherr C. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res*. 2000;60:3689-95.
38. Malumbres M, and Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* 2001;1:222-31.
39. Prives P, and Hall C. The p53 pathway. *J Pathol*. 1999(187):112-26.
40. Lundberg R, and Weinberg A. Control of the cell-cycle and apoptosis. *Eur J Cancer* 1999;35:1886-94.
41. Sherr C. G1 phase progression: cyclin on cue. *Cell*. 1994;79:551-5.
42. Cox L. Multiple pathways control cell growth and transformation: overlapping and independent activities of p53 and p21. *J Pathol*. 1997(183):134-40.
43. Gillet C. and Barnes D. Cell cycle. *J Clin Pathol*. 1998;51:310-6.
44. Bartek J, Lukas J, and Bartkova J. Perspective: defects in cell cycle control and cancer. *J Pathol*. 1999;187:95-9.
45. Jeffrey P, Russo A, and Polyak K. Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclin-A-CDK2 complex. *Nature*. 1995;376:313-20.
46. Matsushime H, Quelle D, Shurtleff S, et al. D-type cyclin dependent kinase activity in mammalian cells *Mol Cell Biol*. 1994;14:2066-76.
47. McDonald W, and El-Deiry R. Cycle control as a basis for cancer drug development. *Int J Oncol* 2000;16:871-86.
48. Kato J, Matsuoka M, Polyak K. Cyclin AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27kip1) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell*. 1994;79:487-96.
49. Bai M, Tsanou E, Skyrilas A, et. al. Alterations of the p53, Rb and p27 tumour suppressor pathways in diffuse large B-cell lymphomas. *Anticancer Res*. 2007;27:2345-52.
50. Sanchez-Beato M, Sanchez-Aguilera A, and Piris M. Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas. *BLOOD*. 2003;101:1220-35.

51. Leoncini L, Lazzi S, Bellan C, et. al. Cell kinetics and cell cycle regulation in lymphomas. *J Clin Pathol*. 2002;55:648-55.
52. Villuendas R, Sanchez-Beato M, Martinez J, et. al. Loss of p16/INK4A protein expression in non-Hodgkin's lymphomas is a frequent finding associated with tumor progression. *Am J Pathol*. 1998;153:887-97.
53. Nakamura M, Sakaki T, Hashimoto H, et. al. Frequent alterations of the p14/ARF and p16/INK4a genes in primary central nervous system lymphomas. *Cancer Res*. 2001;61:6335-9.
54. Villuendas R, Pezzella F, Gatter K, et. al. p21^{WAF1/CIP1} and mdm2 expression in non-Hodgkin's lymphoma and their relationship to p53 status: a p53+, mdm2, p21-immunophenotype associated with missense p53 mutations. *J Pathol*. 1997;181:51-61.
55. Lim M, Adamson A, Lin Z, et. al. Expression of Skp2, a p27 Kip1 ubiquitin ligase, in malignant lymphoma: correlation with p27 Kip1 and proliferation index. *BLOOD*. 2002;100:2950-6.
56. Lin Z, Lim S, and Lim M. Growth regulation by p27 Kip1 is abrogated by multiple mechanisms in aggressive malignant lymphomas. *Br J Haematol*. 2003;121:739-48.
57. Bai M, Vlachonikolis J, Agnantis N, et. al. Low expression of p27 protein combined with altered p53 and Rb/p16 expression of cyclin A and cyclin B1 in diffuse large B-cell lymphomas. *Mod Pathol*. 2001;14(11):1105-13.
58. Bai M, Skyrilas A, Agnantis N, et. al. Cluster analysis of apoptosis-associated bcl-2 family proteins in diffuse large B-cell lymphomas. Relations with the apoptotic index, the proliferation profile and the B-cell differentiation immunophenotypes. *Anticancer Research*. 2004;24:3081-8.
59. Falini DY. and Mason B. Proteins encoded by genes involved in chromosomal alterations in lymphoma and leukemia: clinical value of their detection by immunohistochemistry. *BLOOD*. 2002;99:409-26.
60. Capello D, Vitolo U, Pasqualucci L, et. al. Distribution and pattern of BCL-6 mutations throughout the spectrum of B-cell neoplasia. *BLOOD*. 2000;95:651-9.
61. Go J, Yang W, Ree H, et. al. Mutational analysis of the 5'noncoding region of the BCL-6 gene in primary gastric lymphomas. *Mod Pathol*. 2001;14:410-4.
62. Davis R, Brown K, Siebenlist U, et al. Constitutive nuclear factor kappa B activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med*. 2001;194:1861-74.
63. Houldsworth J, Olshen A, Cattoretti G, et. al. Relationship between REL amplification, REL function, and clinical and biologic features in diffuse large B-cell lymphomas. *BLOOD*. 2004;103:1862-8.
64. Albagli O, Lantoin D, Quief S, et. al. Overexpressed BCL6 (LA23) oncoprotein triggers apoptosis, delays S phase progression and associates with replication foci. *Oncogene*. 1999;18:5063-75.
65. Yamochi T, Kaneita Y, Akiyama T, et. al. Adenovirus-mediated high expression of BCL-6 in CV-1 cells induces apoptotic cell death accompanied by down-regulation of BCL-2 and BCL-X(L). *Oncogene*. 1999;18(2):487-94.

66. Bai M, Agnantis N, Skyras A, et. al. Diffuse large B-cell lymphomas with germinal center B-cell-like differentiation immunophenotypic profile are associated with high apoptotic index, high expression of the pro-apoptotic proteins bax, bak and bid and low expression of the anti-apoptotic protein bcl-xl. *Mod Pathol.* 2004;17:847-56.
67. Bai M, Skyras A, Agnantis N, et. al. Relationships between B-cell differentiation, apoptosis and proliferation in Diffuse Large B-cell Lymphomas. *Anticancer Research.* 2005;25:347-62.
68. Zintzaras E, Bai M, Douligieris C, et. al. A tree-based decision rule for identifying prolife groups of cases without pre-defined classes: application in diffuse large B-cell lymphomas. *Computers in Biology and Medicine.* 2006;37:637-41.
69. Bai M, Tsanou E, Agnantis N, et. al. Proliferation profile of classical Hodgkin's lymphomas. Increased expression of the protein cyclin D2 in Hodgkin and Reed-sternberg cells. *Mod Pathol.* 2004;45:2127-33.
70. Kanavaros P, Stefanaki K, Eliopoulos G, et. al. Expression of p53, p21/waf1, bcl-2, bax, Rb and Ki-67 proteins in Hodgkin's lymphomas. *Histol Histopathol.* 2000;15:445-53.
71. Kanavaros P, Stefanaki K, Vlachonickolis J, et. al. Immunohistochemical expression of p53, mdm2, p21, Rb, p16 and Ki-67 proteins in multiple myeloma. *Anticancer Research.* 2001;20:4619-25.
72. Kanavaros P, Bai M, Stefanaki K, et. al. Immunohistochemical expression of p53, mdm2, p21/Waf-1, Rb, p16, Ki-67, cyclin D1, cyclin A, cyclin B1 proteins and apoptotic activity in T-cell lymphomas. *Histol Histopathol.* 2001;16:377-86.
73. Bai M, Papoudou-Bai A, Kitsoulis P, et. al. Cell Cycle and apoptosis deregulation in classical Hodgkin lymphomas. *In Vivo.* 2005;19:439-54.
74. Pentheroudakis G, Goussia A, Voulgaris E, et. al. High levels of topoisomerase II alpha protein expression in diffuse large B-cell lymphoma are associated with high proliferation, germinal center immunophenotype, and response to treatment. *Leuk Lymphoma.* 2010;51:1260-8.
75. Chiu K, Fine M, Ikle D, et al. Telomerase activity and proliferation index in aggressive mature B-cell lymphoma: comparison to germinal center phenotypic markers. *Hum Pathol.* 2003;34:1259-64.
76. Hinz M, Loser P, Mathas S, et. al. Constitutive NF-kappa B maintains high expression of a characteristic gene network, including CD40, CD86 and a set of antiapoptotic genes in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *BLOOD.* 2001;97:2798-807.
77. Hinz M, Lemke P, Anagnostopoulos I, et. al. Nuclear factor kappa B-dependent gene expression profiling of Hodgkin's disease tumor cells, pathogenetic significance and link to constitutive signal transducer and activator of transcription 5a activity. *J Exp Med.* 2002;196:605-17.
78. Mathas S, Hinz M, Anagnostopoulos I, et. al. Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF-κB *The EMBO Journal.* 2002;21(15):4104-13.

79. Mathas S, Lietz A, Anagnostopoulos I, et. al. C-FLIP mediates resistance of Hodgkin and Reed-Sternberg cells to death receptor-induced apoptosis. *J Exp Med.* 2004;199:1041-52.
80. Georgakis G, Li Y, Rassidakis G, et. al. Inhibition of the phosphatidylinositol-3/Akt promotes G1 cell cycle arrest and apoptosis in Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol.* 2006;132:503-11.
81. Cochet O, Frelin C, Peyron J, et.al. Constitutive activation of STAT proteins in the HDLM-2 and L540 Hodgkin-derived cell lines supports cell survival. *Cell Signal.* 2006;18:449-55.
82. Zheng B, Fiumara P, Li Y, et. al. MEK/ERK pathway is aberrantly active in Hodgkin disease: a signaling pathway shared by CD30, CD40 and RANK that regulates cell proliferation and survival. *BLOOD.* 2003;102:1019-27.
83. Skinnider T, and Mak B. The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *BLOOD.* 2002;99:4283-97.
84. Mitchell S, and John T. Signal transducer and activator of transcription (STAT) signalling and T-cell lymphomas. *Immunology.* 2005;114:301-12.
85. Bromberg J. Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest.* 2002;109:1139-42.
86. Calo V, Migliavacca M, Bazan V, et. al. STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis. *J Cell Physiol.* 2003.;197:157-68.
87. Wurster A, Tanaka T, Grusby M, et. al. The biology of Stat4 and Stat6. *Oncogene.* 2000;19:2577-84.
88. Lam L, Wright G, Davis E, et. al. Cooperative signaling through the signal transducer and activator of transcription 3 and nuclear factor-κB pathways in subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2008;111:3701-13.
89. Shaulian M, and Karin E. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene.* 2001;20:2390-400.
90. Ivanov V, Bhoumik A, Krasilnikov M, et. al. Cooperation between STAT3 and c-jun suppresses Fas transcription. *Mol Cell.* 2001;7:517-28.
91. Hanada A, and Yoshimura T. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002;13:413-21.
92. Ding B, Yu J, Yu R, et. al. Constitutively activated STAT3 promotes cell proliferation and survival in the activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphomas. *Blood.* 2008;111:1515-23.
93. Scuto A, Kujawski M, Kowolik C, et. al. STAT3 inhibition is a therapeutic strategy for ABC-like diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Res.* 2011;71:3182-8.
94. Martini M, Hohaus S, Petrucci G, et. al. Phosphorylated STAT5 represents a new possible prognostic marker in Hodgkin lymphoma. *Am J Clin Pathol.* 2008;129:472-7.
95. Zamo A, Chiarle R, Piva R, et. al. Anaplastic lymphoma kinase (ALK) activates Stat3 and protects hematopoietic cells from cell death. *Oncogene.* 2002;21:1038-47.

96. Alas S, and Bonavida B. Inhibition of constitutive STAT3 activity sensitizes resistant non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma to chemotherapeutic drug-mediated apoptosis. *Clin Cancer Res.* 2003;9:316-26.
97. Momose S, Tamaru J, Kishi H, et. al. Hyperactivated STAT3 in ALK-positive diffuse large B-cell lymphoma with clathrin-ALK fusion. *Hum Pathol.* 2009;40:75-82.
98. Ritz O, Guiter C, Dorsch K, et. al. STAT6 activity is regulated by SOCS-1 and modulates BCL-XL expression in primary mediastinal B-cell lymphoma. *Leukemia.* 2008;22:2106-10.
99. Yang S, Lee K, Kim I, et. al. Long-term survival in primary CNS lymphoma treated by high-dose methotrexate monochemotherapy: role of STAT6 activation as prognostic determinant. *J Neurooncol.* 2009;92:65-71.
100. Guiter C, Dusanter-Fourt I, Copie-Bergman C, et. al. Constitutive STAT6 activation in primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood.* 2004;104:543-9.
101. Schwab U, Stein H, Gerdes J, et. al. Production of a monoclonal antibody specific for Hodgkin and Sternberg-Reed cells of Hodgkin and a subset of normal lymphoid cells. *Nature.* 1982;299(5878):65-7.
102. Smith C, Gruss H, Davis T, et.al. CD30 antigen, a marker for Hodgkin's lymphoma, is a receptor whose ligand defines an emerging family of cytokines with homology to TNF. *Cell.* 1993;73(7):1349-60.
103. Stein H, Foss H, Durkop H, et. al. CD30+ anaplastic large cell lymphoma: a review of its histopathologic, genetic, and clinical features. *BLOOD.* 2000;96(12):3681-95.
104. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, et. al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 2001;22:153-83.
105. Chang L, and Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature.* 2001;410:37-40.
106. Tanoue T, and Nishida E. Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cell Signal.* 2003;15:455-62.
107. Plataniias L. Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *BLOOD.* 2003;101(12):4667-79.
108. Xia Y. c-Jun: a complex tale of a simple transcription factor. *Gene Expres & Regul.* 2006;3:219-37.
109. Yu C, Minemoto Y, Zhang J, et. al. JNK suppresses apoptosis via phosphorylation of the proapoptotic Bcl-2 family protein BAD. *Mol Cell.* 2004;13:329-40.
110. Leppa S, Eriksson M, Saffrich R, et. al. Complex functions of AP-1 transcription factors in differentiation and survival of PC12 cells. *Mol Cell Biol.* 2001;21(13):4369-78.
111. Liu J, and Lin A. Role of JNK activation in apoptosis: A double-edged sword. *Cell Res.* 2005;15(1):36-42.
112. Shaulian E. AP-1: The Jun proteins: Oncogenes or tumor suppressors in disguise? *Cellular Signalling.* 2010;22:894-9.

113. Angel P, and Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1991;1072:129-57.
114. Shaulian E, and Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol.* 2002;4(5):E131-6.
115. Wagner E. AP-1--Introductory remarks. *Oncogene.* 2001;20(19):2401-12.
116. Karin M, Liu Z, and Zandi E. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 1997;9:240-6.
117. Shen Q, Uray IP, Li Y, et. al. The AP-1 transcription factor regulates breast cancer cell growth via cyclins and E2F factors AP-1 blockade downregulates cyclins and E2F1. *Oncogene.* 2008;27:366-77.
118. Jochum W, Passegue E, and Wagner E. AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene.* 2001;20:2401-12.
119. Hartl M, Bader AG, and Bister K. Molecular targets of the oncogenic transcription factor jun. *Curr Cancer Drug Targets.* 2003;3(1):41-55.
120. Drakos E, Leventaki V, Schlette E, et. al. c-Jun expression and activation are restricted to CD30+ lymphoproliferative disorders. *Am J Surg Pathol.* 2007;31(3):447-53.
121. Karin M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem.* 1995;270:16483-6.
122. Karin M, and Shaulian E. AP-1: Linking hydrogen peroxide and oxidative stress to the control of cell proliferation and death. *IUBMB Life.* 2001;52:17-24.
123. Young M, Li J, Rincon M, et. al. Transgenic mice demonstrate AP-1 (activator protein-1) transactivation is required for tumor promotion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:9827-32.
124. Chinenov Y, and Kerppola TK. Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene.* 2001;20(2438-2452).
125. Smeyne R, Vendrell M, Hayward M, et. al. Continuous c-fos expression precedes programmed cell death in vivo. *Nature.* 1993;363:166-9.
126. Kolbus A, Herr I, Schreiber M, et. al. c-Jun-dependent CD95-L expression is a rare-limiting step in the induction of apoptosis by alkylating agents. *Mol Cell Biol.* 2000;20:575-82.
127. Hafezi F, Steinback J, Marti A, et. al. The absence of c-fos prevents light-induced apoptotic cell death of photoreceptors in retinal degeneration in vivo. *Nat Med.* 1997;3:346-9.
128. Kollmann K, Heller G, and Sexl V. c-Jun prevents methylation of p16^{INK4a} (and Cdk6): the villain turned bodyguard. *Oncotarget.* 2011;2:422-7.
129. Chang L, and Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature.* 2001;1(410 (6824)):37-40.
130. Dérijard B, Hibi M, Wu I, et. al. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell.* 1994;76(6):1025-37.

131. Gupta S, Barrett T, Whitmarsh A, et. al. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J.* 1996;15(11):2760-70.
132. Gius D, Botero A, Shah S, et. al. Intracellular oxidation/reduction status in the regulation of transcription factors NF-kB and AP-1. *Toxicol Lett.* 1999;106:93-106.
133. Hsu J, Cressman D, and Taub R. Promoter-specific trans-activation and inhibition mediated by JunB. *Cancer Research.* 1993;53:3789-94.
134. Deng T, and Karin M. JunB differs from c-Jun in its DNA-binding and dimerization domains, and represses c-Jun by formation of inactive heterodimers. *Genes Dev* 1993;7(3):479-90.
135. Eferl R, and Wagner E. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(11):859-68.
136. Hilberg F, Aguzzi A, Howells N, et. al. c-jun is essential for normal mouse development and hepatogenesis. *Nature.* 1993;365(6442):179-81.
137. Johnson R, van Lingen B, Papaioannou V, et. al. A null mutation at the c-jun locus causes embryonic lethality and retarded cell growth in culture. *Genes Dev.* 1993;7(7B):1309-17.
138. Szremska AP, Kenner L, Weisz E, et. al. JunB inhibits proliferation and transformation in B-lymphoid cells. *Blood.* 2003;102:4159-65.
139. Troen G, Nygaard V, Jenssen TK, et. al. Constitutive expression of the AP-1 transcription factors c-jun, JunD, jun B, and c-fos and the marginal zone B-cell transcription factors Notch2 in splenic marginal zone lymphoma. *J Mol Diagn.* 2004;6:297-307.
140. Ruiz-Ballesteros E, Mollejo M, Rodriguez A, et. al. Splenic marginal zone lymphoma: proposal of new diagnostic and prognostic markers identified after tissue and cDNA microarray analysis. *Blood.* 2005;106:1831-8.
141. Eferl R, Ricci R, Kenner L, et. al. Liver tumor development: c-Jun antagonizes the proapoptotic activity of p53. *Cell.* 2003;112:181-92.
142. Li B, Tournier C, Davis R, et. al. Regulation of IL-4 expression by the transcription factor JunB during T helper cell differentiation. *The EMBO Journal.* 1999;18(2):420-32.
143. Schorpp-Kistner M, Wang Z, Angel P, et. al. JunB is essential for mammalian placentation. *EMBO J* 1999;18(4):934-48.
144. Grigoriadis A, Schellander K, Wang Z, et. al. Osteoblasts are target cells for transformation in c-fos transgenic mice. *J Cell Biol* 1993;122(3):685-701.
145. Schorpp M, Jäger R, Schellander K, et. al. The human ubiquitin C promoter directs high ubiquitous expression of transgenes in mice. *Nucleic Acids Res.* 1996;24(9):1787-8.
146. Rincon M, Derijard B, Chow C, et. al. Reprogramming the signalling requirement for AP-1 (activator protein-1) activation during differentiation of precursor CD4+ T-cells into effector Th1 and Th2 cells. *Genes Funct.* 1997;1:51-68.

147. Watanabe M, Ogawa Y, Ito K, et. al. AP-1 mediated relief of repressive activity of the CD30 promoter microsatellite in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Am J Pathol.* 2003;163(2):633-41.
148. Watanabe M, Sasaki M, Itoh K, et. al. JunB induced by constitutive CD30-extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase signaling activates the CD30 promoter in anaplastic large cell lymphoma and reed-sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Cancer Res.* 2005;65:7628-34.
149. Rassidakis GZ, Thomaidis A, Atwell C, et. al. JunB expression is a common feature of CD30+ lymphomas and lymphomatoid papulosis. *Mod Pathol.* 2005;18:1365-70.
150. Mao X, Orchard G, Lillington DM, et. al. Amplification and overexpression of JUNB is associated with primary cutaneous T-cell lymphomas. *Blood.* 2003;101:1513-9.
151. Mao X, Orchard G, Mitchell TJ, et. al. A genomic and expression study of AP-1 in primary cutaneous T-cell lymphoma: evidence for dysregulated expression of JUNB and JUND in MF and SS. *J Cutan Pathol.* 2008;35:899-910.
152. Liebermann D, and Hoffman B. MyD genes in negative growth control. *Oncogene.* 1998;17:3319-29.
153. Lord K, Abdollahi A, Hoffman-Liebermann B, et. al. Proto-oncogenes of the fos/jun family of transcription factors are positive regulators of myeloid differentiation. *Mol Cell Biol.* 1993;13:841-51.
154. Mollinedo F, Vaquerizo M, and Naranjo J. Expression of c-jun, junB and junD proto-oncogenes in human peripleral-blood granulocytes. *Biochem.* 1991;273:477-9.
155. Yang MY, Liu TC, Chang JG, et. al. JunB gene expression is inactivated by methylation in chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2003;101:3205-11.
156. Passegue E, Wagner EF, and Weissman IL. JunB deficiency leads to a myeloproliferative disorder arising from hematopoietic stem cells. *Cell.* 2004;119:431-43.
157. Passegue E, Jochum W, Schorpp-Kistner M, et. al. Chronic myeloid leukemia with increased granulocyte progenitors in mice lacking JunB expression in the myeloid lineage. *Cell.* 2001;104:21-32.
158. Ryder K, Lanahan A, Perez-Albuerne E, et. al. JunD: a third member of the Jun gene family. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86:1500-3.
159. Wang H, Birkenbach M, and Hart J. Expression of Jun family members in human colorectal adenoarcinoma. *Carcinogenesis.* 2000;21:1313-7.
160. Hirai S, Ryseck R, Mechte F, et. al. Characterization of junD:a new member of the jun oncogene family. *EMBO J.* 1989;8:1433-9.
161. Passegue E, Jochum W, Behrens A, et. al. JunB can substitute for Jun in mouse development and cell proliferation. *Nat Genet.* 2002;30:158-66.
162. Ruppert S, Chehtane M, Zhang G, et. al. JunD/AP-1-Mediated gene expression promotes lymphocyte growth dependent on interleukin-7 signal transduction. *PLoS One.* 2012;7:e32262.
163. Mechta-Grigoriou F, Gerald D, and Yaniv M. The mammalian Jun proteins: redundancy and specificity. *Oncogene.* 2001;20:2378-89.

164. Bakiri L, Lallemand D, Bossy-Wetzel E, et. al. Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression. *The EMBO Journal*. 2000;19(9):2056-68.
165. Shaulian E, and Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol*. 2002;4(5):131-6.
166. Passegue E, and Wagner E. JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16^{INK4a} expression. *The EMBO Journal*. 2000;19(12):2969-79.
167. Schreiber M, Kolbus A, Piu F, et. al. Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. *GENES & DEVELOPMENT*. 1999;13:607-19.
168. Shaulian E, Schreiber M, Piu F, et. al. The mammalian UV response: c-Jun induction is required for exit from p53-imposed growth arrest. *Cell*. 2000;103:897-907.
169. Johnson R, Huong S, and Huang E, et. al. Activation of the mitogen-activated protein kinase p38 by human cytomegalovirus infection through two distinct pathways: a novel mechanism for activation of p38. *J Virol*. 2000;74(3):1158-67.
170. Weiss C, and Bohmann D. Deregulated repression of c-Jun provides a potential link to its role in tumorigenesis. *Cell Cycle*. 2004;3:111-3.
171. Johnson R, Spiegelman B, Hanahan D, et. al. Cellular transformation and malignancy induced by ras require c-jun. *Mol Cell Biol*. 1996;16:4504-11.
172. Szabowski A, Maas-Szabowski N, Andrecht S, et. al. c-Jun and JunB antagonistically control cytokine-regulated mesenchymal-epidermal interaction in skin. *Cell*. 2000;103(5):745-55.
173. Sherr C. Tumor surveillance via the ARF-p53 pathway. *Genes Dev*. 1998;12:2984-91.
174. Weitzman J, Fiette L, Matsuo K, et. al. JunD protects cells from p-53-dependent senescence and apoptosis. *Mol Cell*. 2000;6:1109-19.
175. Gururajan M, Chui R, Karuppanan A, et. al. c-Jun N-terminal kinase (JNK) is required for survival and proliferation of B-lymphoma cells. *BLOOD*. 2005;106(4):1382-91.
176. Wu H, Venkataraman C, Estus S, et. al. Positive signaling through CD72 induces mitogen-activated protein kinase activation and synergizes with B cell receptor signals to induce X-linked immunodeficiency B cell proliferation. *J Immunol*. 2001;167:1263-73.
177. Sakata N, Patel H, Terada N, et. al. Selective activation of c-Jun kinase mitogen-activated protein kinase by CD40 on human B cells. *J Biol Chem*. 1995;270:30823-8.
178. Xie P, Hostager B, and Bishop G. Requirement for TRAF3 in signaling by LMP1 but not CD40 in B lymphocytes. *J Exp Med*. 2004;199:661-71.
179. Arguni E, Arima M, Tsuruoka N, et. al. JunD/AP-1 and STAT3 are the major enhancer molecules for high Bcl6 expression in germinal center B cells. *Int Immunol*. 2006;18:1079-89.
180. Hilberg F, and Wagner EF. Embryonic stem (ES) cells lacking functional c-jun: consequences for growth and differentiation, AP-1 activity and tumorigenicity. *Oncogene*. 1992;7:2371-80.

181. Chen J, Stewart V, Spyrou G, et. al. Generation of normal T and B lymphocytes by c-jun deficient embryonic stem cells. *Immunity*. 1994;1:65-72.
182. Berger S, Kouzarides T, Shiekhattar R, et. al. An operational definition of epigenetics. *Genes*. 2009;23:781-3.
183. Cedar H. DNA methylation and gene activity. *Cell*. 1988;53(1):3-4.
184. Jenuwein T, and Allis C. Translating the histone code. *Science*. 2001;293:1074-80.
185. Hatzimichael E, Benetatos L, and Briasoulis E. Pathogenesis of MDS III: the role of epigenetic modifications. *Haema* 2011;2:169-76.
186. Hanahan D, and Weinberg R. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
187. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*. 2008;358:1148-59.
188. Baylin S, and Herman J. DNA hypermethylation in tumorigenesis:epigenetics joins genetics. *Trends Genet*. 2000;16:168-74.
189. Jones P, and Laird P. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet*. 1999;21:163-7.
190. Rodriguez-Paredes M, and Esteller M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat Med*. 2011;17:330-9.
191. Futscher B, Oshiro M, Wozniak RJ, et. al. Role for DNA methylation in the control of cell type specific maspin expression. *Nat Genet*. 2002;31:175-9.
192. Meshorer E, and Misteli T. Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7:540-6.
193. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*. 2002;16:6-21.
194. Li B, Carey M, and Workman J. The role of chromatin during transcription. *Cell*. 2007;128:707-19.
195. Wu S, and Zhang Y. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11:607-20.
196. Jones P, and Baylin S. The epigenomics of cancer. *Cell*. 2007;128(4):683-92.
197. Li E, Beard C, and Jaenisch R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature*. 1993;366:362-5.
198. Jones P. Altering gene expression with 5-azacytidine. *Cell*. 1985;40:485-6.
199. Fahrner J, Eguchi S, Herman J, et. al. Dependence of histone modifications and gene expression on DNA hypermethylation in cancer. *Cancer Res* 2002;62:7213-8.
200. Kondo Y, Shen L, and Issa J. Critical role of histone methylation in tumor suppressor gene silencing in colorectal cancer. *Mol Cell Biol*. 2003;23:206-15.
201. Nguyen C, Weisenberger D, Velicescu M, et. al. Histone H3-lysine 9 methylation is associated with aberrant gene silencing in cancer cells and is rapidly reversed by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res*. 2002;62:6456-61.
202. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 2007;8:286-98.
203. Barski A, Cuddapah S, Cui K, et. al. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*. 2007;129:823-37.

204. Lehrmann H, Pritchard L, and Harel-Bellan A. Histone acetyltransferases and deacetylases in the control of cell proliferation and differentiation. *Adv Cancer Res* 2002;86:41-65.
205. Rosenfeld J, Wang Z, Schones D, et al. Determination of enriched histone modifications in non-genic portions of the human genome. *BMC Genomics*. 2009;10:143.
206. Hoshino K, Quintas-Cardama A, Radich J, et al. Downregulation of JUNB mRNA expression in advanced phase chronic myelogenous leukemia. *Leuk Res*. 2009;33:1361-6.
207. Strathdee G, Sim A, and Brown R. DNA methylation does not regulate JUNB expression in CML. *Leuk Res*. 2010;34:685-6.
208. Cordell JL, Falini B, Erber WN, et al. Immunoenzymatic labelling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal antialkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 1984;32:219-22.
209. Lan H, Mu W, Nikolic-Paterson D, et al. A novel, simple, reliable, and sensitive method for multiple immunoenzyme staining: use of microwave oven heating to block antibody cross-reactivity and retrieve antigens. *J Histochem Cytochem*. 1995;43:97-102
210. Pileri S, Dirnhofer S, Went P, et al. Diffuse large B-cell lymphoma: one or more entities? Present controversies and possible tools for its subclassification. *Histopathology*. 2002;41:482-509.
211. De Leval L, and Harris NL. Variability in immunophenotype in diffuse large B-cell lymphoma and its clinical relevance. *Histopathology*. 2003;43:509-28.
212. Moller MB, Pedersen NT, and Christensen BE. Diffuse large B-cell lymphoma: clinical implications of extranodal vs nodal presentation-a population-based study of 1575 cases. *Br J Haematol*. 2004;124:151-9.
213. Shaffer AL, Rosenwald A, and Staudt LM. Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation. *Nat Rev Immunol*. 2002;2:920-32.
214. Rossi D, and Gaidano G. Molecular heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma: implications for disease management and prognosis. *Hematology*. 2002;7:239-52.
215. Tzardi M, Kouvidou C, Panayiotides J, et al. p53 protein expression in non-Hodgkin's lymphomas. Comparative study with the wild type of p53 induced proteins mdm2 and p21/waf-1. *J Clin Pathol*. 1996;49:M278-83.
216. Sanchez E, Chacon I, Plaza MM, et al. Clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma is dependent on the relationship between different cell-cycle regulator proteins. *J Clin Oncol*. 1998;16:1931-9.
217. Stefanaki K, Tzardi M, Kouvidou C, et al. Expression of p53, mdm2, p21, Rb, Ki67, bcl2 and bax proteins in lymphomas of the mucosa-associated lymphoid tissue. *Anticancer Res*. 1998;18:2403-8.
218. Sanchez-Beato M, Saez AI, Navas IC, et al. Overall survival in aggressive B-cell lymphomas is dependent on the accumulation of alterations in p53, p16 and p27. *Am J Pathol*. 2001;159:205-13.

219. Saez AI, Saez AJ, Artiga MJ, et.al. Building an outcome predictor model for diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Pathol.* 2004;164:613-22.
220. Paik JH, Jeon YK, Park SS, et.al. Expression and prognostic implications of cell cycle regulatory molecules, p16, p21, p27, p14 and p53 in germinal center and non-germinal centre B-like diffuse large B-cell lymphomas. *Histopathology.* 2005;47:281-91.
221. Shipp MA, Ross KN, Tamayo P, et. al. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med.* 2002;8:68-74.
222. Wright G, Tan B, Rosenwald A, et. al. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:9991-6.
223. Lossos IS, Alizadeh AA, Eisen MB, et. al. Ongoing immunoglobulin somatic mutation in germinal center B cell-like but not in activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:10209-13.
224. Feuerhake F, Kutok JL, Monti S, et al. NFkB activity, function, and target gene signatures in primary mediastinal large B-cell lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma subtypes. *Blood.* 2005;106:1392-9.
225. Colomo L, Lopez-Guillermo A, Perales M., et. al. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *BLOOD.* 2003;101:78-84.
226. Chang CC, McClintock S, Cleveland RP, et. al. Immunohistochemical expression patterns of germinal center and activation B-cell markers correlate with prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol.* 2004;28:464-70.
227. Berglund M, Thunberg U, Amini RM, et. al. Evaluation of immunophenotype in diffuse large B-cell lymphomas and its impact on prognosis. *Mod Pathol.* 2005;18:1113-20.
228. King BE, Chen C, Locker J, et. al. Immunophenotypic and genotypic markers of follicular center cell neoplasia in diffuse large B-cell lymphomas. *Mod Pathol.* 2000;13:1219-31.
229. Nateri AS, Riera-Sans L, Da Costa C, et. al. The ubiquitin ligase SCFFw7 antagonizes apoptotic JNK signaling. *Science.* 2004;303:1374-8.
230. Gao M, Labuda T, Xia Y, et. al. Jun turnover is controlled through JNK-dependent phosphorylation of the E3 ligase Itch. *Science.* 2004;306:271-5.
231. Watanabe M, Itoh K, Togano T, et. al. Ets-1 activates overexpression of JunB and CD30 in Hodgkin's lymphoma and anaplastic large cell lymphoma. *Am J Pathol.* 2012;180:831-8.
232. Angel P, Szabowski A, and Schorpp-Kistner M. Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology. *Oncogene.* 2001;20:2413-23.
233. Finch S, Joseloff E, and Bowden T. JunB negatively regulates AP-1 activity and cell proliferation of malignant mouse keratinocytes. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2002;128:3-10.
234. Weitzman JB. Juggling jun. *Nat Genet.* 2002;30:128-9.

235. Lamb JA, Ventura JJ, Hess P, et. al. JunD mediates survival signaling by the JNK signal transduction pathway. *Mol Cell*. 2003;11:1479-89.
236. Meixner A, Karreth F, Kenner L, et. al. JunD regulates lymphocyte proliferation and T helper cell cytokine expression. *EMBO J*. 2004;23:1325-35.