







**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ**

**«Μελέτη της έκφρασης πρωτεϊνών οι οποίες σχετίζονται  
με την απόπτωση στο Hodgkin λέμφωμα»**

**ΧΩΡΙΑΝΟΠΟΥΛΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ  
ΙΑΤΡΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2013**





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



**Ημερομηνία αίτησης του κ. Χωριανόπουλου Νικολάου: 3-6-2003**

**Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 517<sup>α</sup>/18-11-2003**

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων

Μπάη Μαρία Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας

Μέλη

Αγνάντη Νίκη, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας

Καναβάρος Παναγιώτης Καθηγητής Ανατομίας που θα καλύπτει και την Ιστολογία-Εμβρυολογία

**Ημερομηνία ορισμού θέματος: 9-12-2003**

*«Μελέτη της έκφρασης πρωτεϊνών οι οποίες σχετίζονται με την απόπτωση στο Hodgkin λέμφωμα»*

**ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 714<sup>α</sup>/7-6-2011**

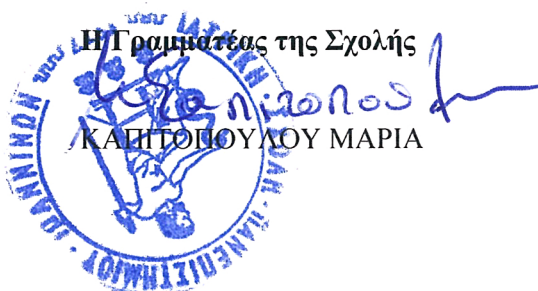
1. Αγνάντη Νίκη, τ. Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Καναβάρος Παναγιώτης Καθηγητής Ανατομίας που θα καλύπτει και την Ιστολογία-Εμβρυολογία, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Μπάη Μαρία Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Στεφάνου Δημήτριος Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
5. Μπριασούλης Ευάγγελος Αναπληρωτής Καθηγητής Ογκολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Γούσια Άννα Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Καψάλη Ελένη Λέκτορα Αιματολογίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 29-6-2012

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ**

**Τζαφλίδου Μαργαρίτα**

Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσικής





ΑΦΙΕΡΩΝΕΤΑΙ

στην σύζυγο μου Θεοπηγή, την κόρη μας Κυριακή-Ειρήνη,  
τους γονείς μου Γιώργο και Γεωργία,  
και ιδιαίτερα στον αδελφό μου Αντώνη  
χάρη στον οποίο ξαναβρίσκω την Αλήθεια κάθε φορά που αδυνατώ να κρατηθώ σε  
Αυτήν



## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους όσους συνέβαλαν στην ολοκλήρωση της παρούσης διδακτορικής διατριβής και ιδιαίτερα:

Τα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής,

Την **Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής κ. Μπάη Μαρία** στην οποία οφείλω τόσο την πολύτιμη ευκαιρία να εργαστώ στο πεδίο της έρευνας όσο και την επιτυχή ολοκλήρωση της εργασίας αυτής. Είναι ο άνθρωπος που με ενθάρρυνε από την πρώτη ημέρα που δούλεψα κοντά της, με στήριξε, με καθοδήγησε και με ενέπνευσε σε όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας. Ο τρόπος δουλειάς και η συμπεριφορά της σε συνδυασμό με το επιστημονικό της κύρος είχαν καθοριστική συμβολή στην επιστημονική μου κατάρτιση και αυτό της το παράδειγμα αποτελεί το σημαντικότερο προσωπικό κέρδος που αποκόμισα από την εργασία αυτή.

Τον **Καθηγητή Ανατομίας και Ιστολογίας-Εμβρυολογίας κ. Καναβάρο Παναγιώτη** για τις πολύτιμες συμβουλές του, και την ιδανική καθοδήγηση στο δύσβατο πεδίο της στατιστικής το οποίο κατέστησε ιδιαίτερα κατανοητό και, κυρίως, ενδιαφέρον για εμένα.

Την **Ομότιμη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής κ. Αγνάντη Νίκη**, η οποία με τίμησε με την εμπιστοσύνη της και της οποίας η εμπειρία και οι πολύτιμες συμβουλές αποτελούν έναν σημαντικό οδηγό στην πορεία μου.

Τα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής,

Τον Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής **κ. Στεφάνου Δημήτριο**, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ογκολογίας **κ. Μπριασούλη Ευάγγελο**, την Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής **κ. Γούσια Άννα** και την Λέκτορα Αιματολογίας **κ. Καψάλη Ελένη**, για την τιμή της συμμετοχής τους και το ειλικρινές ενδιαφέρον τους,

Τους συνεργάτες, και επίσης υποψήφιους διδάκτορες κατά την ίδια περίοδο στο εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής,

Παπούδου-Μπάη Αλεξάνδρα, Μανούσου Πηνελόπη, Χατζηστέργο Κωνσταντίνο, Σκύρλα Άγγελο, Γκρέπη Κωνσταντίνα και Τσάνου Έλενα, για την στήριξη και συνεργασία τους.

Τέλος, τους συναδέλφους Τρικαλινό Θωμά, Τσιφή Ιωάννη και Λίγκρο Νικόλαο για την πολύτιμη βοήθειά τους.





## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το κλασικό Λέμφωμα Hodgkin (classic Hodgkin Lymphoma, cHL) είναι μονοκλωνική νεοπλασία του λεμφικού ιστού, στην πλειονότητα των περιπτώσεων B-κυτταρικής προέλευσης, αποτελούμενη από μονοπύρηννα κύτταρα Hodgkin και πολυπύρηννα κύτταρα Reed-Sternberg (HRS), τα οποία χαρακτηριστικά ανευρίσκονται εντός ενός φλεγμονώδους υποστρώματος [1, 2].

Τα νεοπλασματικά κύτταρα HRS του cHL παρουσιάζουν πολλαπλές διαταραχές στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης. Παραδείγματος χάριν τα κύτταρα HRS παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση πρωτεϊνών του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, όπως οι πρωτεΐνες p53, Rb, Hdm2, p21, κυκλίνες E, D2, A, και B1, κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες (CDK) 1, 2 και 6, καθώς και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών όπως οι πρωτεΐνες c-FLIP (cellular FLICE inhibitory protein), bcl-X1, c-IAP2 (cellular inhibitor of apoptosis protein 2) και XIAP (X-linked IAP) [3-21].

Τα αποτελέσματα μελετών που εστιάζουν στη μοριακή παθογένεση του cHL παρέχουν βάσιμες ενδείξεις ότι μεταγραφικοί παράγοντες είναι ιδιοσυστασιακά ενεργοποιημένοι στα κύτταρα HRS, όπως ο NF-kB (nuclear factor kappa B), η οικογένεια των πρωτεϊνών STAT (signal transducers and activators of apoptosis) και η AP-1 (activator protein 1). Οι συγκεκριμένοι μεταγραφικοί παράγοντες ενδεχομένως να εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης των κυττάρων HRS, πιθανόν μέσω ενεργοποίησης γονδιακών τους στόχων. Παραδείγματος χάριν ο ενεργοποιημένος NF-kB στα HRS επάγει την έκφραση των αντί-αποπτωτικών γονιδίων bcl-X1, c-IAP2, TRAF1 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 1) και cFLIP, και η ενεργοποιημένη AP-1 συνεργάζεται με τον NF-kB και επάγει την έκφραση της κυκλίνης D2 και του πρώτο-ογκογονιδίου c-met [3, 6-10].

Ο αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος είναι δυνατόν να πυροδοτηθεί από δυο εναλλακτικά συγκλίνοντα μονοπάτια: 1) το εξωγενές, το οποίο διαμεσολαβείται από υποδοχείς κυτταρικού θανάτου της επιφανείας των κυττάρων, και 2) το ενδογενές το οποίο διαμεσολαβείται από τα μιτοχόνδρια. Και στα δύο μονοπάτια ενεργοποιούνται ειδικές πρωτεάσες κυστεΐνης-ασπαρτικού (κασπάσες) οι οποίες διασπούν κυτταρικά υποστρώματα. Ειδικά η ενεργοποίηση της κασπάσης-3 είναι ιδιαίτερα σημαντική για

την εκτέλεση του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου [22, 23, 320]. Τα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών bcl-2 διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης. Αυτή η οικογένεια αποτελείται τόσο από προ-αποπτωτικές όσο και από αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες, οι οποίες ταξινομούνται βάσει της ομόλογης αλληλουχίας 4 τμημάτων της α-έλικας του μορίου τους, από BH1 έως BH4. Οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες bcl2, bcl-X1, και mcl-1 εμπεριέχουν στο μόριό τους και τα 4 τμήματα BH τα οποία διαμορφώνουν μία δομή σαν «φωλιά» ικανή να συνδεθεί με τμήματα BH3 άλλων πρωτεϊνών της ίδιας οικογένειας. Οι προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες bax, bak και bok εμπεριέχουν στο μόριό τους τμήματα BH1, BH2 και BH3 τα οποία διαμορφώνουν επίσης δομή φωλιάς. Αντίθετα, οι προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες BH3-only όπως οι bad, bid, bim, bik, noxa και puma εμπεριέχουν στο μόριό του μόνο τμήματα BH3. Οι προ-αποπτωτικές bax και bak συμβάλουν σημαντικά στον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο, καθώς κύτταρα τα οποία στερούνται έκφρασης αμφοτέρων των πρωτεϊνών bax και bak εμφανίζουν αντίσταση σε ποικίλα ενδογενή αποπτωτικά ερεθίσματα. Οι πρωτεΐνες BH3-only δρουν ως αισθητήρες ενδογενών και εξωγενών αποπτωτικών σημάτων. Η ενεργοποίηση των BH3-only πρωτεϊνών έχει ως αποτέλεσμα την άμεση ή έμμεση ενεργοποίηση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών bax και bak, οι οποίες είναι απαραίτητες για την εκτέλεση της απόπτωσης. Τα ολιγομερή των πρωτεϊνών bax και bak θεωρείται ότι προκαλούν ή συμμετέχουν στην αύξηση της διαπερατότητας τη εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, επιτρέποντας έτσι την έξοδο αποπτογόνων πρωτεϊνών. Οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες bcl2 και bcl-X1 συνδέονται και δεσμεύουν τις πρωτεΐνες BH3-only, επομένως αποτρέπουν την ενεργοποίηση των bax και bak, ή δεσμεύονται άμεσα στις πρωτεΐνες bax και bak επιτρέποντας στο κύτταρο να επιβιώσει. Η δεκτικότητα ενός κυττάρου σε αποπτωτικά ερεθίσματα επηρεάζεται από τον σχετικό αριθμό των μορίων της οικογένειας πρωτεϊνών bcl2. Παραδείγματος χάριν, η αναλογία των πρωτεϊνών bcl2/bax είναι ένας ρεοστάτης που καθορίζει την δεκτικότητα του κυττάρου σε διάφορα ενδογενή αποπτωτικά ερεθίσματα [22, 320].

Σε προηγούμενες μελέτες περιγράφεται ότι τα HRS εκφράζουν διάφορες πρωτεΐνες της οικογένειας bcl2 [11-20]. Ωστόσο, από όσο γνωρίζουμε, το ανοσοϊστοχημικό πρότυπο έκφρασης των πρωτεϊνών bad, bid και bim καθώς και οι ενδεχόμενες συσχετίσεις τους με την έκφραση άλλων πρωτεϊνών της οικογένειας bcl2, την ενεργοποιημένη κασπάση-3 και τον δείκτη απόπτωσης TUNEL (terminal

deoxynucleotidyl transferase-mediated in situ labeling) δεν έχουν μελετηθεί στο cHL. Επομένως, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να αναλυθεί το πρότυπο της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών bcl2, bcl-X1, mcl-1, των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών bax, bak, bad, bid και bim, της ενεργοποιημένης κασπάση-3, καθώς και του δείκτη απόπτωσης TUNEL στα κύτταρα HRS, ώστε να διερευνηθούν περαιτέρω διαταραχές των μηχανισμών της απόπτωσης που εμπλέκονται στην παθογένεση του cHL.



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σελίδα

**ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

1. Λέμφωμα Hodgkin.....	9
1.1. Ταξινόμηση.....	10
1.2. Σταδιοποίηση.....	10
2. Κλασσικό Λέμφωμα Hodgkin.....	11
2.1. Λοίμωξη από τον ιό Epstein-Barr (EBV).....	11
2.2. Κλινικά χαρακτηριστικά.....	12
2.3. Μορφολογικά χαρακτηριστικά.....	13
2.4. Ανοσοφαινότυπος.....	14
2.5. Ιστογενετική προέλευση των κυττάρων HRS.....	16
2.6. Κλωνικές αναδιατάξεις υποδοχέων-γενετικές ανωμαλίες.....	18
2.7. Θεραπεία.....	19
3. Ιστολογικοί υπότυποι κλασσικού λεμφώματος Hodgkin.....	20
3.1. Κλασσικό λέμφωμα Hodgkin, υπότυπος οζώδους σκλήρυνσης.....	20
3.2. Κλασσικό λέμφωμα Hodgkin, υπότυπος μικτής κυτταροβρίθειας.....	20
3.3. Κλασσικό λέμφωμα Hodgkin, λεμφοπενικός τύπος.....	21
3.4. Κλασσικό λέμφωμα Hodgkin, υπότυπος πλούσιος σε λεμφοκύτταρα.....	21
4. Κυτταρικός θάνατος.....	23
4.1. Μη αποπτωτικοί μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου.....	23
4.2. Απόπτωση.....	25
5. Διαταραχές της απόπτωσης στο κλασσικό λέμφωμα Hodgkin.....	43
6. Σκοπός της μελέτης.....	48

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Υλικό και μέθοδοι.....	49
2. Περιγραφή μεθόδων.....	50
2.1. Ανοσοϊστοχημεία.....	50
2.2. Μέθοδος in situ σήμανσης TUNEL.....	52
2.3. Αξιολόγηση και στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.....	53
3. Αποτελέσματα.....	56
3.1. Ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών της οικογένειας bcl-2, της ενεργοποιημένης κασπάση 3 και του δείκτη TUNEL.....	56
3.2. Προσδιορισμός των θετικών για τις πρωτεΐνες της οικογένειας bcl-2, την ενεργοποιημένη κασπάση 3 και τον δείκτη TUNEL περιπτώσεις cHL.....	62
3.3. Συσχετίσεις μεταξύ των πρωτεϊνών της οικογένειας bcl-2, της ενεργοποιημένης κασπάσης 3 και του δείκτη TUNEL.....	64
3.3.α. Συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης των πρωτεϊνών bcl-2, της έκφρασης της ενεργοποιημένης κασπάσης 3 και του δείκτη απόπτωσης TUNEL (συνεχείς μεταβλητές).....	64
3.3.β. Συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών bcl-2, bcl-X1 και mcl-1, και των επιπέδων έκφρασης των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών bax, bak, bad, bid και bim.....	65
3.3.γ. Συσχετίσεις μεταξύ της θετικής και αρνητικής έκφρασης των πρωτεϊνών της οικογένειας bcl-2, της έκφρασης της ενεργοποιημένης κασπάσης 3 και του δείκτη απόπτωση.....	68
3.4. Συσχετίσεις μεταξύ των υποτύπων του cHL, των πρωτεϊνών της οικογένειας bcl-2, της ενεργοποιημένης κασπάσης 3 και του δείκτη απόπτωσης TUNEL.....	74
3.5. Συσχετίσεις μεταξύ των προτύπων συνδυασμένης έκφρασης των πρωτεϊνών της οικογένειας bcl-2, της ενεργοποιημένης κασπάσης 3 και του δείκτη απόπτωσης TUNEL.....	74
3.6. Συσχετίσεις μεταξύ των προτύπων συνδυασμένης έκφρασης των πρωτεϊνών της οικογένειας bcl-2 και των υποτύπων του cHL.....	78
4. Συζήτηση.....	79

5. Συμπεράσματα .....	85
6. Περίληψη.....	87
7. Abstract .....	88
8. Βιβλιογραφία.....	89

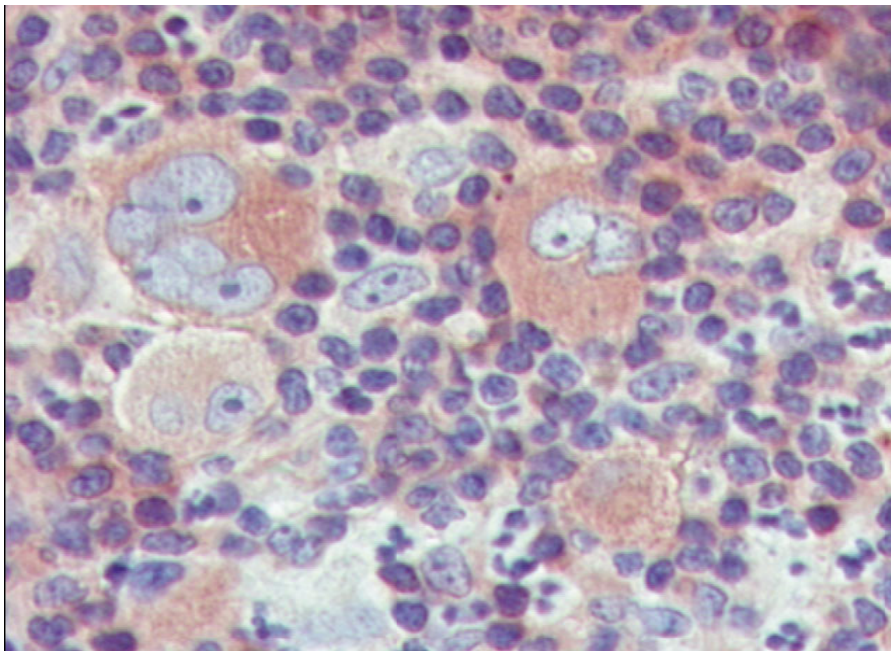




## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1. Λέμφωμα Hodgkin

Οι περιπτώσεις των λεμφωμάτων Hodgkin (Hodgkin Lymphoma, HL) παρουσιάζουν ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά: 1) σε αρχικά στάδια της νόσου εντοπίζονται σε λεμφαδένες κυρίως τραχηλικούς, 2) η πλειοψηφία των περιστατικών εκδηλώνεται σε νεαρούς ενήλικες, και 3) ο νεοπλασματικός ιστός αποτελείται από ένα περιορισμένο αριθμό μονοπύρηνων και πολυπύρηνων νεοπλασματικών κυττάρων, τα ονομαζόμενα κύτταρα Hodgkin και Reed Sternberg (HRS), τα οποία είναι μεγάλου μεγέθους κύτταρα που χαρακτηριστικά ανευρίσκονται διάσπαρτα εντός ενός πολύμορφου κυτταρικού πληθυσμού αποτελούμενου από φλεγμονώδη κύτταρα και επικουρικά/δενδριτικά κύτταρα. Επιπλέον, τα νεοπλασματικά κύτταρα χαρακτηριστικά περιβάλλονται από ροζετοειδείς σχηματισμούς T-λεμφοκυττάρων (Εικ. 1).



**Εικόνα 1.** Κλασικό Hodgkin λέμφωμα. Κύτταρα Hodgkin και Reed Sternberg εντός φλεγμονώδους υποστρώματος [24]

Το HL αποτελεί περίπου το 30% του συνόλου των λεμφωμάτων. Η συχνότητά του δεν έχει εμφανώς αυξηθεί τις τελευταίες δεκαετίες, σε αντίθεση από τα μη-Hodgkin λεμφώματα (non-Hodgkin lymphomas, NHL) τα οποία παρουσιάζουν σταθερή αύξηση [25].

### **1.1. Ταξινόμηση**

Βιολογικές και κλινικές μελέτες της τελευταίας 30ετίας έδειξαν ότι το HL περιλαμβάνει δύο κλινικοπαθολογοανατομικές οντότητες: 1) το οζώδες λεμφοεπικρατητικό λέμφωμα Hodgkin (nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma, NLPHL) και 2) το κλασσικό λέμφωμα Hodgkin (classic Hodgkin Lymphoma, cHL). Αυτές οι δύο οντότητες διαφέρουν τόσο στα κλινικά τους χαρακτηριστικά και την κλινική τους πορεία όσο και στη σύνθεση του κυτταρικού υποστρώματός, καθώς και στη μορφολογία, τον ανοσοφαινότυπο και τη διατήρηση ή την απώλεια του προγράμματος γονιδιακής έκφρασης B-λεμφοκυττάρων [25].

### **1.2. Σταδιοποίηση**

Η αντιμετώπιση του cHL βασίζεται στην κλινική και περιστασιακά και στην ιστοπαθολογική σταδιοποίηση της νόσου (σταδιοποίηση Ann Arbor) [25].

## 2. Κλασσικό Λέμφωμα Hodgkin

Το cHL είναι ένα μονοκλωνικό νεόπλασμα λεμφοκυττάρων, στις περισσότερες των περιπτώσεων Β-κυτταρικής προέλευσης, το οποίο συνίσταται από μονοπύρρηνα κύτταρα Hodgkin και πολυπύρρηνα κύτταρα Reed-Sternberg (HRS). Χαρακτηριστικά, τα τελευταία βρίσκονται σε ένα πολύμορφο φλεγμονώδες υπόστρωμα αποτελούμενο από μικρά λεμφοκύτταρα, ηωσινόφιλα, και ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα, ιστιοκύτταρα, πλασματοκύτταρα, ινοβλάστες και κολλαγόνες ίνες. Βάσει των χαρακτηριστικών του αντιδραστικού του υποστρώματος, του προτύπου ανάπτυξης του νεοπλασματικού ιστού και εν μέρει της μορφολογίας των HRS (πχ βοθριωτά HRS), το cHL διακρίνεται σε τέσσερις υποτύπους: 1) τον πλούσιο σε λεμφοκύτταρα (lymphocyte-rich CHL, LRCHL), 2) την οζώδη σκλήρυνση (nodular sclerosis CHL, NSCHL), 3) την μικτή κυτταροβρίθεια (mixed cellularity CHL, MCCHL) και 4) τον λεμφοπενικό (lymphocyte-depleted CHL, LDCHL). Τα ανοσοφαινοτυπικά και γενετικά χαρακτηριστικά των HRS είναι όμοια στους τέσσερις αυτούς υποτύπους, ενώ τα κλινικά χαρακτηριστικά τους και η αιτιοπαθογενετική συσχέτισή τους με τον EBV παρουσιάζει διαφορές [25].

Το cHL αποτελεί το 95% των HL. Στις αναπτυγμένες χώρες εμφανίζει μία δικόρυφη καμπύλη κατανομής της νόσου σε σχέση με την ηλικία, με την πρώτη κορυφή να αντιστοιχεί στην ηλικία των 15 έως 35 ετών και τη δεύτερη σε προχωρημένη ηλικία [25].

### 2.1. Λοίμωξη από τον ιό Epstein-Barr (EBV)

Από παλαιά, επιδημιολογικές παρατηρήσεις όπως η συγκέντρωση περιστατικών σε ομοιογενείς ομάδες πληθυσμού καθώς και η εποχιακή συγκέντρωση περιστατικών, συνηγορούσαν υπέρ ενός λοιμογόνου αιτιολογικού παράγοντα [26]. Πιο πρόσφατες μελέτες εστιάστηκαν στον EBV και διαπιστώθηκε ότι ασθενείς με cHL είχαν δύο έως τέσσερις φορές συχνότερα ιστορικό λοίμωξης από τον EBV σε σχέση με τον υπόλοιπο πληθυσμό, καθώς και ασυνήθιστα υψηλό τίτλο αντισωμάτων έναντι του ιού, τουλάχιστον 3 έτη πριν την εμφάνιση της νόσου [24, 26, 27]. Διαπιστώθηκε ότι το γένωμα του EBV ανιχνεύεται *in situ* (τεχνικές *in situ* υβριδισμού) στα κύτταρα HRS στο 40-50% των περιπτώσεων cHL, με το ποσοστό να ποικίλλει ανάλογα με τον ιστολογικό υπότυπο και επιδημιολογικούς παράγοντες. Το υψηλότερο ποσοστό

ανιχνεύεται στο τύπο της μικτής κυτταροβρίθειας (60-75%) και το χαμηλότερο στον τύπο της οζώδους σκλήρυνσης (10-40%). Στις τροπικές περιοχές το ποσοστό αυτό ανέρχεται στο 100% των περιπτώσεων και ανάλογο ποσοστό παρατηρείται σε άτομα που έχουν προσβληθεί από τον HIV. Ο τύπος του ιού επίσης ποικίλει μεταξύ των γεωγραφικών περιοχών. Στον ανεπτυγμένο κόσμο επικρατεί ο τύπος 1, ενώ στον αναπτυσσόμενο κόσμο ο τύπος 2. Μόλυνση και από τους δύο τύπους του ιού είναι περισσότερο συνηθισμένη σε χώρες του αναπτυσσόμενου κόσμου [25]. Σήμερα θεωρείται ότι η λοίμωξη των κυττάρων από τον EBV δεν είναι ένα επιφανίσιμο αλλά ο ιός εμπλέκεται στην αιτιοπαθογένεση του cHL. Η αναζήτηση άλλων ιών στα κύτταρα HRS δεν απέφερε αποτελέσματα [24].

## **2.2. Κλινικά χαρακτηριστικά**

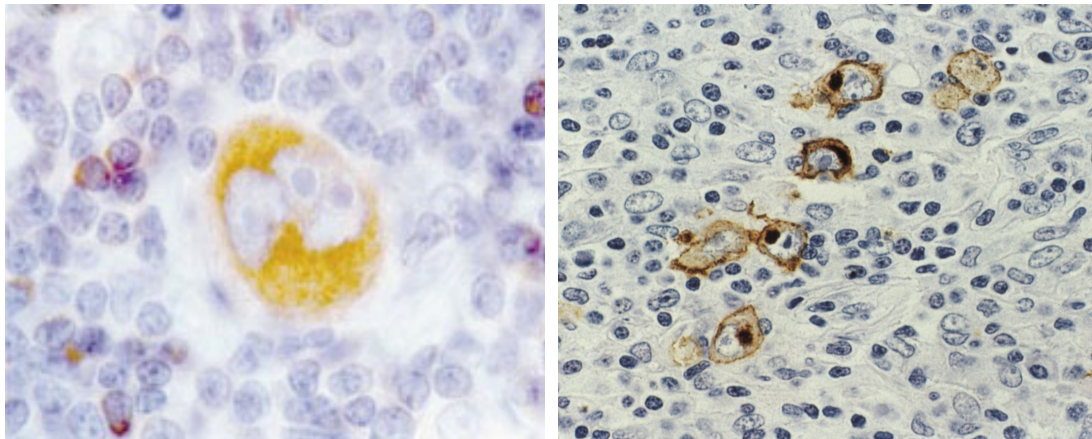
Το cHL προσβάλλει στην πλειοψηφία των περιπτώσεων λεμφαδένες της τραχηλικής χώρας (75% των περιπτώσεων). Ακολουθούν το μεσοθωράκιο, η μασχαλιαία κοιλότητα και η παρα-αορτική περιοχή. Σπάνια προσβάλλονται μεσεντέριοι ή επιτροχίλιοι λεμφαδένες. Επίσης, σπάνια είναι και η πρωτοπαθής εξωλεμφαδενική προσβολή. Περισσότεροι από το 60% των ασθενών εμφανίζουν εντοπισμένη νόσο (στάδιο I ή II). Περίπου το 60% των ασθενών, κυρίως ασθενείς με NSCHL, εμφανίζουν συμμετοχή του μεσοθωρακίου. Η συμμετοχή του σπληνός δεν είναι σπάνια (20%) και συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εξωλεμφαδενικής διασποράς. Η προσβολή του μυελού των οστών είναι πολύ λιγότερο συχνή (5%) και εφόσον ο μυελός των οστών στερείται λεμφικού συστήματος, η διήθησή του οφείλεται σε αγγειακή διασπορά (στάδιο IV) [25].

Η νόσος εμφανίζεται κλινικά συνήθως ως περιφερική λεμφαδενοπάθεια που εντοπίζεται σε μία ή περισσότερες ομάδες λεμφαδένων παρακείμενων περιοχών. Η προσβολή του μεσοθωρακίου είναι συχνότερη στον υποτύπο της οζώδους σκλήρυνσης, ενώ προσβολή λεμφαδένων της κοιλιακής χώρας ή του σπληνός παρατηρείται συχνότερα στον υποτύπο της μικτής κυτταροβρίθειας. Β-συμπτωματολογία (πυρετική κίνηση, νυκτερινές εφιδρώσεις, σημαντική απώλεια σωματικού βάρους) παρουσιάζει το 40% των ασθενών. Στην οζώδη σκλήρυνση παρατηρείται χαρακτηριστικά οζώδης διαμόρφωση, λόγω ανάπτυξης ταινιών πυκνού ινώδους ιστού και πάχυνση της λεμφαδενικής κάψας. Σε προσβολή του σπληνός παρατηρούνται διάσπαρτοι όζοι οι οποίοι αρχικά εντοπίζονται στον λευκό πολφό [25].

### 2.3. Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Ο προσβεβλημένος λεμφαδένας αποτελείται από άφθονο φλεγμονώδες υπόστρωμα και ποικίλο αριθμό νεοπλασματικών κυττάρων HRS. Τα τελευταία αποτελούν συνήθως το 0,1-10% περίπου του κυτταρικού πληθυσμού του νεοπλασματικού ιστού και αυτή ακριβώς η σπανιότητά τους απετέλεσε για μεγάλο χρονικό διάστημα σημαντικό εμπόδιο στην προσπάθεια προσδιορισμού του φυσιολογικού αντίστοιχου κυττάρου του λεμφώματος [24, 25].

Τα κλασικά κύτταρα Reed-Sternberg είναι μεγάλου μεγέθους κύτταρα, πολυπύρρηνα ή πολυλοβωτά, με άφθονο ελαφρώς βασεόφιλο κυτταρόπλασμα, σαφή κυτταροπλασματικά όρια, παχιά πυρηνική μεμβράνη και χαρακτηριστικά εμφανή ηωσινόφιλα πυρήνια, τα οποία περιβάλλονται από διαυγή άλω (“μάτια κουκουβάγιας”). Στην τυπική τους μορφή είναι διπύρρηνα με κατοπτρικά τοποθετημένους πυρήνες. Τα κύτταρα Hodgkin έχουν όμοια μορφολογικά χαρακτηριστικά με αυτά των κυττάρων Reed-Sternberg αλλά είναι μονοπύρρηνα (**Εικ. 2**). Επιπλέον, εύκολα αναγνωρίζονται νεοπλασματικά κύτταρα με συρρικνωμένο κυτταρόπλασμα και πυκνωτικούς πυρήνες, τα οποία είναι γνωστά ως “μουμιοποιημένα” κύτταρα. Τα κύτταρα HRS είναι χαρακτηριστικά της νόσου, όχι όμως παθογνωμονικά [25].



**Εικόνα 2.** Κύτταρα Hodgkin και Reed Sternberg. Ανοσοϊστοχημική έκφραση των δεικτών (α) CD30 και (β) CD15 [28]

## 2.4. Ανοσοφαινότυπος

Τα κύτταρα HRS εκφράζουν τον υποδοχέα κυτταροκινών CD30 (σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις), και το CD15 (75-85%) ενώ δεν εκφράζουν τους δείκτες CD45 και CD75 καθώς και δείκτες μακροφάγων όπως ο επίτοπος PG-M1 του μορίου CD68 και αλύσους J. Η ανοσοχρώση για το CD30 και για το CD15 είναι τυπικά μεμβρανική και κηλιδώδης κυτταροπλασματική (στην περιοχή του συστήματος Golgi). Το αντιγόνο CD15 μπορεί να εκφράζεται σε μικρό αριθμό νεοπλασματικών κυττάρων και η χρώση να περιορίζεται μόνο στην περιοχή της συσκευής Golgi. Στο 30–40% των περιπτώσεων, ανιχνεύεται το αντιγόνο CD20 αλλά συνήθως η ένταση της ανοσοχρώσης ποικίλει και περιορίζεται στη μειοψηφία των νεοπλασματικών κυττάρων. Το αντιγόνο το σχετιζόμενο με B-λεμφοκύτταρα CD79a εκφράζεται λιγότερο συχνά. Η προέλευση των HRS από B-λεμφοκύτταρα πιστοποιείται επιπρόσθετα στο 95% περίπου των περιπτώσεων cHL, μέσω της ανίχνευσης της πρωτεΐνης PAX5/BSAP (B-cell specific activator protein). Η έκφραση της πρωτεΐνης PAX5 είναι χαρακτηριστικά ασθενέστερη από αυτή των αντιδραστικών B-λεμφοκυττάρων. Επιπλέον, τα κύτταρα HRS εκφράζουν σταθερά τον ειδικό των πλασματοκυττάρων μεταγραφικό παράγοντα IRF4/MUM1. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μελέτης, ο *BLIMP1*, ένα μόριο με κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της διαδικασίας διαφοροποίησης των πλασματοκυττάρων, βρέθηκε να εκφράζεται σε μικρό ποσοστό κυττάρων HRS, στο 25% των περιπτώσεων cHL. Το σχετιζόμενο με πλασματοκύτταρα προσκολλητικό μόριο *CD138* εκφράζεται σπάνια και σε μικρό ποσοστό κυττάρων HRS [25].

Ενδιαφέροντα ευρήματα προέκυψαν σε μια μελέτη της ομάδας μας, στην οποία αναλύθηκε η έκφραση ενός συγκεκριμένου ανοσοφαινοτυπικού προτύπου δεικτών B κυτταρικής διαφοροποίησης στα κύτταρα HRS. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η έκφραση της πρωτεΐνης *BCL-6* (καταστολέας μεταγραφής, τυπικά εκφράζεται σε B κύτταρα στο στάδιο διαφοροποίησης βλαστικού κέντρου και συνδέεται με την έκφραση της *BLIMP1*), της επιφανειακής μεταλλοπρωτεΐνάσης *CD10* (τυπικά εκφράζεται σε B κύτταρα σταδίου βλαστικού κέντρου), της πρωτεΐνης *MUM1* (τυπικά εκφράζεται σε B κύτταρα βλαστικού κέντρου, όψιμου σταδίου διαφοροποίησης και/ή σταδίου διαφοροποίησης μετά το βλαστικό κέντρο) και της *CD138* (τυπικά εκφράζεται σε κύτταρα σταδίου διαφοροποίησης μετά το βλαστικό κέντρο). Βάσει της έκφρασης των ανωτέρω πρωτεϊνών αναδείχθηκαν κύτταρα HRS

τριών προτύπων έκφρασης/διαφοροποίησης: 1) κύτταρα με φαινότυπο *BCL-6* (-)/*CD10* (-)/*MUM1* (+)/*CD138* (-), που αντιστοιχεί σε Β-κύτταρα όψιμου σταδίου βλαστικού κέντρου και πρώιμου σταδίου μετά το βλαστικό κέντρο (59% των περιπτώσεων), 2) κύτταρα με φαινότυπο *BCL-6* (-)/*CD10* (-)/*MUM1* (+)/*CD138* (+) που αντιστοιχεί σε κύτταρα σταδίου διαφοροποίησης μετά το βλαστικό κέντρο (24% των περιπτώσεων) και 3) δύο απροσδιόριστοι φαινότυποι *BCL-6* (+)/*CD10* (-)/*MUM1* (+)/*CD138* (-) και *BCL-6* (+)/*CD10* (-)/*MUM1* (+)/*CD138* (+) (συνολικά 18% των περιπτώσεων). Οι δύο τελευταίοι φαινότυποι χαρακτηρίζονται από την ταυτόχρονη έκφραση πρωτεϊνών που φυσιολογικά εκφραζόταν ανεξάρτητα και σε διαφορετικά στάδια διαφοροποίησης των Β κυττάρων. Συμπερασματικά, τα ευρήματα της μελέτης αυτής δείχνουν ότι η διαδικασία διαφοροποίησης δεν έχει ολοκληρωθεί σε ένα υποσύνολο κυττάρων HRS και/ή συνεχίζεται κατά τη στιγμή της παρατήρησης [29].

Τα κύτταρα HRS δεν εκφράζουν αρκετούς από τους χαρακτηριστικούς δείκτες των Β-λεμφοκυττάρων, παρότι προέρχονται από αυτά (απώλεια Β-λεμφοκυτταρικού φαινοτύπου) [3, 30]. Ειδικότερα, δεν εκφράζουν μόρια επιφανείας, όπως τα μόρια CD22 και CD52, μόρια που εμπλέκονται σε οδούς μετάδοσης σήματος, όπως τα μόρια Syk και Blk καθώς και μεταγραφικούς παράγοντες, όπως Spi-B, A-myb, Oct-2, Bob-1, Pu.1 [31, 32]. Η απώλεια της έκφρασης Β-κυτταρικών δεικτών από το κύτταρο HRS παρά την προέλευση του από Β-κύτταρο αποτελεί ένα φαινόμενο μοναδικό μεταξύ των λεμφωμάτων που προέρχονται από Β-κύτταρα [30]. Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στο φαινόμενο αυτό δεν είναι πλήρως γνωστοί, όμως πολλοί συγγραφείς θεωρούν ότι εν μέρει ευθύνεται η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Notch-1 στα κύτταρα HRS. Ο παράγοντας αυτός δεν εκφράζεται φυσιολογικά σε διαφοροποιημένα Β-λεμφοκύτταρα και επιπλέον, σε πρόδρομα/αρχέγονα των λεμφοκυττάρων κύτταρα, η έκφρασή του καταστέλλει την διαφοροποίησή τους προς Β-λεμφοκύτταρο και τα οδηγεί προς Τ-κύτταρα [31, 34].

Τα μολυσμένα από τον EBV κύτταρα HRS εκφράζουν τις πρωτεΐνες LMP1 και EBNA-1, ενώ δεν ανιχνεύεται έκφραση της πρωτεΐνης EBNA-2. Αυτό το πρότυπο πρωτεϊνικής έκφρασης αντιστοιχεί σε λανθάνουσα λοίμωξη από τον EBV τύπου II. Η κωδικοποιούμενη από τον ιό πρωτεΐνη LMP1 εμπλέκεται στην παθογένεση των EBV-θετικών περιπτώσεων εφόσον έχει ογκογόνο και αντι-αποπτωτική δράση [25, 34, 35].

Σε ορισμένες περιπτώσεις cHL, μικρός αριθμός κυττάρων HRS εκφράζει ένα ή περισσότερα αντιγόνα T-λεμφοκυττάρων. Τα κύτταρα HRS των περισσότερων από αυτές τις περιπτώσεις φέρουν αναδιατάξεις των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών, γεγονός που δείχνει ότι η έκφραση αντιγόνων T-λεμφοκυττάρων είναι παρεκκλίνουσα (aberrant) [2, 25].

Έκφραση του EMA (epithelial membrane antigen) παρατηρείται σπάνια στα κύτταρα HRS και συνήθως είναι ασθενής. Τα κύτταρα HRS στο 90% περίπου των περιπτώσεων δεν εκφράζουν τους μεταγραφικούς παράγοντες Pu.1 και Oct-2, καθώς και το συν-διεγερτικό μόριο του τελευταίου, Bob.1. Η πλειονότητα των HRS βρίσκεται σε κυτταρικό κύκλο και εκφράζει το πυρηνικό αντιγόνο Ki67 (proliferation-associated nuclear antigen) [25].

Τέλος τα κύτταρα HRS του cHL χαρακτηρίζονται από υπερέκφραση κυτταροκινών, χυμοκινών και/ή των υποδοχέων τους. Το γεγονός αυτό πιθανώς σχετίζεται με την ίνωση και την υπεροχή Th2 λεμφοκυττάρων, και γενικά την κυτταρική σύνθεση του υποστρώματος της νόσου [25].

## **2.5. Ιστογενετική προέλευση των κυττάρων HRS**

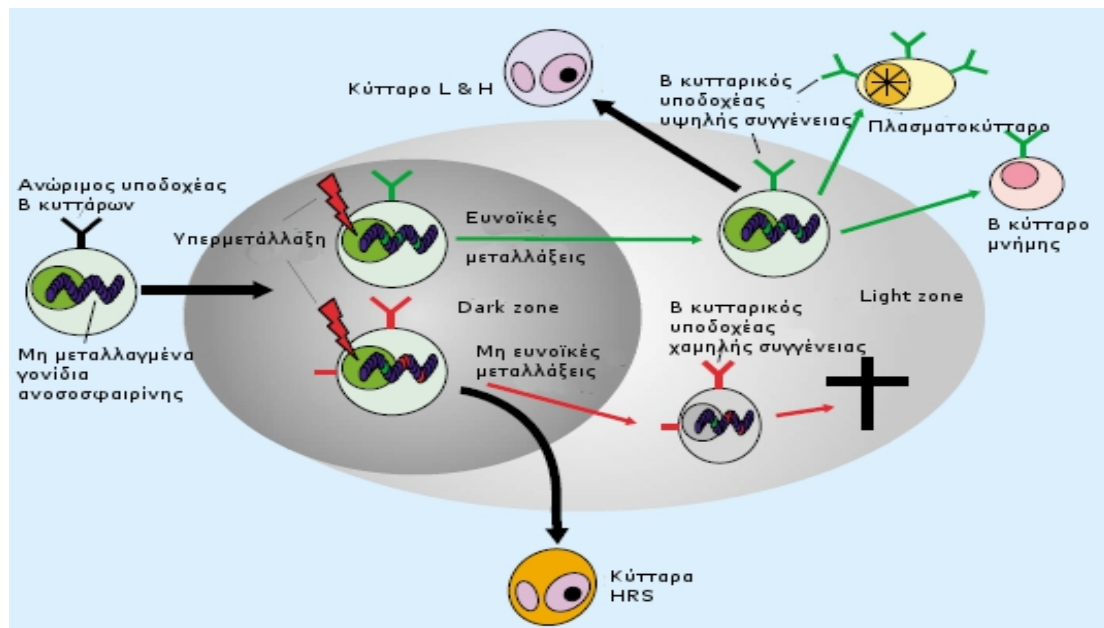
Υπό φυσιολογικές συνθήκες όταν το ειδικό αντιγόνο που πυροδότησε την πρωτογενή ανοσολογική απάντηση εισέλθει για δεύτερη φορά στον οργανισμό σχηματίζονται συμπλέγματα μεταξύ του αντιγόνου, ειδικών αντισωμάτων και του συμπληρώματος. Τα συμπλέγματα αυτά εγκλωβίζονται από τις αποφυάδες των δενδριτικών δικτυωτών κυττάρων του πρωτογενούς λεμφοζιδίου. Το γεγονός αυτό πυροδοτεί την είσοδο στο πρωτογενές λεμφοζίδιο μικρού αριθμού ευαισθητοποιημένων B-λεμφοκυττάρων και την έναρξη της αντίδρασης του βλαστικού κέντρου (germinal center reaction). Η τελευταία αρχίζει όταν τα ευαισθητοποιημένα B-λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν το ειδικό αντιγόνο, το οποίο με την μορφή συμπλεγμάτων τους παρουσιάζεται από τα δενδριτικά δικτυωτά κύτταρα του πρωτογενούς λεμφοζιδίου με αποτέλεσμα να πολλαπλασιάζονται και να μεταμορφώνονται σε μεγάλα κύτταρα, τις κεντροβλάστες (centroblasts). Παράλληλα οι κεντροβλάστες αποκτούν σωματικές υπερμεταλλάξεις (somatic hyper-mutations) των γονιδίων των μεταβλητών περιοχών των αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών (IGV). Από αυτές τις μεταλλάξεις είναι δυνατόν να προκύψουν μη-λειτουργικά γονίδια ή γονίδια που παράγουν B-κυτταρικό υποδοχέα χαμηλότερης ή πολύ υψηλότερης



συγγένειας προς το αντιγόνο από αυτήν του παρθένου Β-λεμφοκυττάρου. Επομένως, τα Β-λεμφοκύτταρα που βρίσκονται στην διαδικασία διαφοροποίησής τους στο βλαστικό κέντρο φέρουν μεταλλάξεις των γονιδίων των μεταβλητών περιοχών των ανοσοσφαιρινών με ενδοκλωνική ποικιλία/συνεχιζόμενες μεταλλάξεις, ενώ αυτά που έχουν διέλθει δια μέσω του βλαστικού κέντρου αλλά βρίσκονται σε στάδιο διαφοροποίησης μετά το βλαστικό κέντρο (post-germinal center) φέρουν μεταλλάξεις των γονιδίων των μεταβλητών περιοχών των ανοσοσφαιρινών χωρίς ενδοκλωνική ποικιλία.

Γονιδιακές αναδιατάξεις του Β-κυτταρικού υποδοχέα ανιχνεύονται σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις cHL, εύρημα το οποίο καταδεικνύει ότι τα κύτταρα HRS του cHL προέρχονται από Β-λεμφοκύτταρα [25, 36, 31, 37-41]. Επιπλέον, με λίγες εξαιρέσεις, τα αναδιατεταγμένα γονίδια του Β-κυτταρικού υποδοχέα των κυττάρων HRS φέρουν σωματικές υπερμεταλλάξεις στις μεταβλητές περιοχές των αλύσεων των ανοσοσφαιρινών. Το εύρημα αυτό δείχνει ότι τα κύτταρα HRS προέρχονται από ώριμα Β-λεμφοκύτταρα που έχουν διέλθει από το βλαστικό κέντρο των λεμφοζιδίων [25, 31, 36, 42].

Υποστηρίζεται ότι στο 25% περίπου των περιπτώσεων, οι μεταλλάξεις είναι μη-λειτουργικές και προκύπτουν μη-λειτουργικά γονίδια [31, 36, 40, 43] και ότι σχεδόν όλες οι περιπτώσεις που δεν φέρουν λειτουργικό υποδοχέα είναι μολυσμένες από τον ιό EBV [36]. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα Β-λεμφοκύτταρα που φέρουν μη-λειτουργικά γονίδια, αποπίπτουν εντός του βλαστικού κέντρου μέσω της ενεργοποίησης του εξωγενούς μονοπατιού της απόπτωσης και συγκεκριμένα του υποδοχέα CD95 (Fas/APO1) [3, 44]. Θεωρείται ότι τα κύτταρα HRS ανθίστανται σε αυτή τη διαδικασία και επομένως προέρχονται, στην πλειοψηφία τουλάχιστον των περιπτώσεων, από προ-αποπτωτικά Β-λεμφοκύτταρα του βλαστικού κέντρου [2, 31, 36, 40] (**Εικ. 3**).



**Εικόνα 3.** Αντίδραση βλαστικού κέντρου. Τα κύτταρα HRS προέρχονται από Β κύτταρα του βλαστικού κέντρου που φέρουν μη ευνοϊκές μεταλλάξεις των αναδιατεταγμένων γονιδίων του Β κυτταρικού υποδοχέα (ανοσοσφαιρινών), τα οποία θα έπρεπε να αποπέσουν εντός του βλαστικού κέντρου [42]

Όπως προαναφέρθηκε, σε σπάνιες περιπτώσεις cHL τα κύτταρα HRS εκφράζουν δείκτες Τ-λεμφοκυττάρων. Μοριακές μελέτες έδειξαν ότι ορισμένες από αυτές τις περιπτώσεις (1-2%) πράγματι προέρχονται από Τ-λεμφοκύτταρα, όμως οι περισσότερες περιπτώσεις προέρχονται από τα Β-λεμφοκύτταρα που παρουσιάζουν παρεκκλίνουσα έκφραση Τ-λεμφοκυτταρικών δεικτών [2, 25, 31, 45, 46].

## 2.6. Κλωνικές αναδιατάξεις υποδοχέων – γενετικές ανωμαλίες

Στα HRS ανιχνεύονται κλωνικές αναδιατάξεις των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών σε ποσοστό υψηλότερο του 98% των περιπτώσεων, ενώ κλωνικές αναδιατάξεις των γονιδίων του Τ-κυτταρικού υποδοχέα ανιχνεύονται σε ιδιαίτερα μικρό αριθμό περιπτώσεων (1-2%). Τα γονίδια των ανοσοσφαιρινών φέρουν υψηλό φορτίο σωματικών υπερμεταλλάξεων των μεταβλητών περιοχών των αλύσεων των ανοσοσφαιρινών, οι οποίες δεν είναι συνεχιζόμενες (ongoing) [25].

Παρότι τα κύτταρα HRS προέρχονται από Β-λεμφοκύτταρα του βλαστικού κέντρου, έχουν χάσει μεγάλο μέρος του προγράμματος γονιδιακής έκφρασης που εκφράζουν τα φυσιολογικά αντίστοιχα Β-λεμφοκύτταρα. Επιπρόσθετα, αυτά εκφράζουν γονίδια μη αναμενόμενα σε Β-λεμφοκύτταρα και επιπλέον παρουσιάζουν

διαταραχές στη ρύθμιση διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων που έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την αναστολή της απόπτωσης [25].

Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB είναι ιδιοσυστασιακά ενεργοποιημένος στα κύτταρα HRS, και παρατηρείται διαταραγμένη λειτουργία των γονιδίων-στόχων του NF-κB τα οποία ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των κυττάρων, όπως είναι το σύμπλεγμα των AP-1 και η οδός μετάδοσης σήματος JAK/STAT (Janus kinase/signal transducers and activators of transcription). Μεταλλάξεις του παράγοντα ελέγχου της JAK SOC-1 σχετίζονται με συσσώρευση πρωτεΐνης STAT5 στον πυρήνα των κυττάρων HRS, λόγω αναστολής της δράσης του μονοπατιού των JAK/STAT5 [25].

Παρότι συχνά αναδεικνύεται ανοσοϊστοχημική υπερέκφραση της πρωτεΐνης p53 στα κύτταρα HRS, μεταλλάξεις στο γονίδιο TP53 ανιχνεύονται ιδιαίτερα σπάνια σε ιστούς προσβεβλημένους από cHL, ενώ αντίθετα ανιχνεύονται σε κυτταρικές σειρές cHL. Συμβατικές κυτταρογενετικές μελέτες καθώς και μελέτες με την τεχνική του φθορίζοντος in situ υβριδισμού (Fluorescence in situ hybridization, FISH) έχουν ανέδειξει ανευπλοειδία και τετραπλοειδία στα κύτταρα HRS. Ωστόσο, αυτές οι τεχνικές δεν έχουν ανιχνεύσει συγκεκριμένες επαναλαμβανόμενες χρωμοσωμικές αλλοιώσεις στο cHL. Με την τεχνική του συγκριτικού γενομικού υβριδισμού (comparative genomic hybridization) εντοπίστηκαν επαναλαμβανόμενες απώλειες στις περιοχές 2p, 9p και 12q, καθώς επίσης και ενισχύσεις στις περιοχές 4p16, 4q23-q24 και 9p23-p24. Μεταθέσεις t(14;18) και t(2;5) δεν ανιχνεύονται στα κύτταρα HRS [25].

## 2.7. Θεραπεία

Το cHL έχει καταστεί θεραπεύσιμο σε ποσοστό μεγαλύτερο του 85% των περιπτώσεων. Η επιλογή της κατάλληλης θεραπείας (ακτινοθεραπείας ή/και χημειοθεραπείας) καθορίζεται από το στάδιο της νόσου, ενώ η πρόγνωση από κλινικές και εργαστηριακές παραμέτρους καθώς και την ανταπόκριση στη θεραπεία [25].

### **3. Ιστολογικοί υπότυποι κλασσικού λεμφώματος Hodgkin**

#### **3.1. Κλασσικό λέμφωμα Hodgkin, υπότυπος οζώδους σκλήρυνσης (Nodular sclerosis classical Hodgkin lymphoma)**

Η οζώδης σκλήρυνση είναι ο συχνότερος υπότυπος του cHL. Συναντάται συχνότερα στις αναπτυγμένες χώρες (70%), σε άτομα ηλικίας 15-34 ετών, το ίδιο συχνά σε άντρες και γυναίκες. Προσβάλλονται συνηθέστερα λεμφαδένες του μεσοθωρακίου (80%) και η νόσος εμφανίζεται κλινικά με διεύρυνση του μεσοθωρακίου. Κατά τη διάγνωση οι περισσότεροι των ασθενών έχουν νόσο σταδίου II και το 40% αυτών εμφανίζει Β-συμπτώματα.

Ο προσβεβλημένος λεμφαδένας παρουσιάζει οζώδη διαμόρφωση, η οποία οφείλεται στην ανάπτυξη ινωδών διαφραγμάτων που διαχωρίζουν το φλεγμονώδες υπόστρωμα σε όζους. Το τελευταίο αποτελείται από λεμφοκύτταρα, πολυμορφοπύρηννα και ηωσινόφιλα λευκοκύτταρα, ιστιοκύτταρα και πλασματοκύτταρα, μεταξύ των οποίων ανευρίσκονται κύτταρα HRS καθώς και χαρακτηριστικά της οζώδους σκλήρυνσης νεοπλασματικά κύτταρα, τα ονομαζόμενα “βοθριωτά” κύτταρα (lacunar cells). Πρόκειται για κύτταρα με λοβωτό πυρήνα, λεπτή πυρηνική μεμβράνη, πολλαπλά μικρά πυρήνια και άφθονο κυτταρόπλασμα. Μετά από μονιμοποίηση του ιστού σε διάλυμα φορμόλης το κυτταρόπλασμα των νεοπλασματικών κυττάρων συρρικνώνεται και δίνεται η εντύπωση ότι βρίσκονται μέσα σε κοιλότητες. Όταν τα νεοπλασματικά κύτταρα σχηματίζουν ευμεγέθεις αθροίσεις χρησιμοποιείται ο όρος “συγκυτιακή ποικιλία”. Συχνά εντός των όζων ανευρίσκονται περιοχές νέκρωσης.

Η οζώδης σκλήρυνση έχει καλύτερη πρόγνωση από τους υπόλοιπους υποτύπους του cHL [25].

#### **3.2. Κλασσικό λέμφωμα Hodgkin, υπότυπος μικτής κυτταροβρίθειας (Mixed cellularity classical Hodgkin lymphoma)**

Ο τύπος της μικτής κυτταροβρίθειας αποτελεί το 20%-30% των cHL. Απαντάται συχνότερα στις αναπτυσσόμενες χώρες και σε ασθενείς με λοίμωξη από τον HIV. Η μέση ηλικία των ασθενών είναι τα 38 έτη και το 70% αυτών είναι άνδρες. Προσβάλλονται κατά προτίμηση περιφερικοί λεμφαδένες και οι ασθενείς εμφανίζουν Β-συμπτωματολογία συχνότερα από τους υπόλοιπους υποτύπους του cHL.

Η κατάργηση της αρχιτεκτονικής δομής του προσβεβλημένου λεμφαδένα είναι διάχυτη. Το υπόστρωμα αποτελείται από λεμφοκύτταρα, ηωσινόφιλα λευκοκύτταρα, πλασματοκύτταρα και ιστιοκύτταρα μεταξύ των οποίων εύκολα αναγνωρίζονται τυπικά κύτταρα HRS. Αθροίσεις επιθηλιοειδών κυττάρων ή κοκκιώματα ανευρίσκονται κυρίως σε EBV-θετικές περιπτώσεις.

Ο τύπος της μικτής κυτταροβρίθειας παρουσιάζει χειρότερη πρόγνωση από τον τύπο της οζώδους σκλήρυνσης και καλύτερη από το λεμφοπενικό τύπο [25].

### **3.3. Κλασσικό λέμφωμα Hodgkin, λεμφοπενικός τύπος (Lymphocyte-depleted classical Hodgkin lymphoma)**

Ο λεμφοπενικός τύπος είναι ο σπανιότερος υπότυπος του cHL (1%). Απαντάται συχνότερα σε αναπτυσσόμενες χώρες, σε άνδρες ηλικίας 30-35 ετών. Συχνά συσχετίζεται με λοίμωξη από τον HIV.

Προσβάλλονται συχνότερα λεμφαδένες της περιτοναϊκής κοιλότητας, ενδοκοιλιακά όργανα και ο μυελός των οστών. Κατά τη διάγνωση οι ασθενείς έχουν νόσο προχωρημένου σταδίου (III-IV) και B- συμπτωματολογία.

Στο λεμφοπενικό τύπο το πρότυπο ανάπτυξης είναι πάντοτε διάχυτο και η κυτταρική σύνθεση του νεοπλασματικού ιστού ποικίλει. Σε ορισμένες περιπτώσεις αυτός είναι πλούσιος σε νεοπλασματικά κύτταρα και πτωχός σε φλεγμονώδη κύτταρα, ενώ σε άλλες πλούσιος σε ινώδες υπόστρωμα και πτωχός σε νεοπλασματικά κύτταρα. Ο λεμφοπενικός υπότυπος του cHL συχνά δημιουργεί πρόβλημα διαφορικής διάγνωσης με λεμφώματα μη-Hodgkin και σαρκώματα.

Ο λεμφοπενικός τύπος παρουσιάζει τη χειρότερη πρόγνωση από όλους τους υποτύπους του cHL, αλλά ανταποκρίνεται εξίσου καλά στη θεραπεία [25].

### **3.4. Κλασσικό λέμφωμα Hodgkin, υπότυπος πλούσιος σε λεμφοκύτταρα (Lymphocyte-rich classical Hodgkin lymphoma)**

Ο τύπος αυτός αποτελεί περίπου το 5% όλων των περιπτώσεων cHL. Απαντάται συχνότερα σε άνδρες (70%) ηλικίας 35-50 ετών, όπως και ο οζώδης λεμφοεπικρατητικός τύπος.

Προσβάλλονται συνηθέστερα περιφερικοί λεμφαδένες. Κατά τη διάγνωση η νόσος είναι συνήθως σταδίου I-II και οι ασθενείς δεν εμφανίζουν B- συμπτωματολογία.

Το πρότυπο ανάπτυξης του προσβεβλημένου λεμφαδένα είναι οζώδες και

σπάνια διάχυτο. Οι όζοι αποτελούνται κυρίως από μικρά λεμφοκύτταρα και κύτταρα Hodgkin τα οποία ομοιάζουν με “βοθριωτά” κύτταρα και μεταμορφωμένα λεμφοκύτταρα. Τυπικά, δεν ανευρίσκονται ηωσινόφιλα ή/και ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα. Ο πλούσιος σε λεμφοκύτταρα υπότυπος εύκολα συγγέεται με τον οζώδη λεμφοεπικρατητικό τύπο και η μεταξύ τους διάκριση επιτυγχάνεται μόνο μετά από ανοσοφαινοτυπική μελέτη.

Η πρόγνωση είναι καλύτερη από αυτή των άλλων υποτύπων του cHL και όμοια με αυτή του οζώδους λεμφοεπικρατητικού τύπου [25].

#### 4. Κυτταρικός θάνατος

Διαταραχές του κυτταρικού θανάτου εμπλέκονται στην παθογένεση των κακοήθων νεοπλασιών. Αν και η αντίσταση στον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο είναι στενά συνδεδεμένη με την ογκογένεση, τα νεοπλασματικά κύτταρα μπορούν ακόμη να οδηγηθούν σε κυτταρικό θάνατο και μέσω μη-αποπτωτικών μηχανισμών, όπως της νέκρωσης, της γήρανσης, της αυτοφαγίας και της μιτωτικής καταστροφής [47, 48]. Οι μοριακοί μηχανισμοί που ελέγχουν τα μη-αποπτωτικά είδη κυτταρικού θανάτου, αντίθετα από τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο, δεν έχουν αποσαφηνιστεί [47, 49-51].

##### 4.1. Μη αποπτωτικοί μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου

Η **γήρανση (senescence)** είναι μία κατάσταση στην οποία περιέρχεται το κύτταρο μετά από την ολοκλήρωση ενός προγραμματισμένου αριθμού διαιρέσεων, όπως αυτός καθορίζεται από τη σταδιακή βράχυνση των τελομερών των χρωμοσωμάτων. Το κύτταρο εισέρχεται σε μία κατάσταση μόνιμης αναστολής της ανάπτυξης η οποία συνοδεύεται από μεταβολές του μεταβολισμού του. Επιπλέον, παρουσιάζει ορισμένα μορφολογικά χαρακτηριστικά όπως, αποπλάτυνση του κυτταροπλάσματος, αύξηση της κοκκίωσης του κυτταροπλάσματος καθώς και αλλαγές στη δομή της χρωματίνης και στην έκφραση διαφόρων γονιδίων [47, 52]. Η γήρανση επάγεται και από διάφορα είδη κυτταρικού stress όπως αυτό που προκαλείται από βλάβη του DNA, ενεργοποίηση γονιδίων και ενεργοποίηση παραγόντων που προκαλούν βράχυνση του τελομεριδίου [47, 53]. Παράλληλα ενεργοποιούνται και διάφορες πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο, όπως οι p53, p21(WAF), p16 (INK4A) και Rb [47, 54-57]. Η εμπλοκή αυτών των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών δείχνει ότι η γήρανση έχει αντιογκογόνο δράση, γεγονός που επιβεβαιώνεται και σε πειραματικά μοντέλα [47, 58-62].

Η **νέκρωση** είναι ένα μη γενετικά ελεγχόμενο, παθητικό κυτταρικό φαινόμενο, το οποίο χαρακτηρίζεται από τραυματική κυτταρική καταστροφή που συνοδεύεται από ενδοκυττάριο οίδημα και καταλήγει σε απελευθέρωση ενδοκυττάρων οργανιδίων. Συνήθως οφείλεται σε λοιμώξεις, φλεγμονές ή ισχαιμία [47].

Κατά την **αυτοφαγία** μακρόβιες πρωτεΐνες και κυτταρικά οργανίδια κατευθύνονται προς τα λυσοσώματα όπου και διασπώνται [47, 63, 64]. Μελέτες έδειξαν ότι το φαινόμενο αυτό ενεργοποιείται μετά από στέρηση των κυττάρων από λειτουργικά ερεθίσματα καθώς και ερεθίσματα διαφοροποίησης και ανάπτυξης [47]. Κύτταρα τα οποία πραγματοποιούν εκσεσημασμένη αυτοφαγία αποθνήσκουν με μη-αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο. Στον έλεγχο της αυτοφαγίας εμπλέκεται η PI3K και η κινάση TOR (Target of rapamycin). Πρόσφατα ευρήματα δείχνουν ότι διαταραχές στη ρύθμιση της αυτοφαγίας δυνητικά καταλήγουν σε παθολογικές καταστάσεις και σε νεοπλασματική εκτροπή των κυττάρων [47, 65].

Η **μιτωτική καταστροφή** είναι ένα είδος κυτταρικού θανάτου που οφείλεται σε ανώμαλη μίτωση. Μορφολογικά, διαφέρει από τα άλλα είδη κυτταρικού θανάτου και χαρακτηρίζεται από σχηματισμό πολυπύρηνων κυττάρων [47]. Το σημείο ελέγχου G2 του κυτταρικού κύκλου είναι υπεύθυνο για τη διακοπή της μίτωσης επί βλάβης του DNA. Αν ωστόσο το σημείο ελέγχου είναι ελαττωματικό, το κύτταρο μπορεί να προχωρήσει πρώιμα σε ανώμαλη μίτωση, πριν ολοκληρωθεί ο διπλασιασμός του DNA. Η βλάβη ανιχνεύεται από τα μόρια ATM και ATR που ενεργοποιούν τις κινάσες CHK2 και CHK1, αντίστοιχα. Αυτές, φωσφορυλιώνουν τη φωσφατάση CDC25C, η οποία στη συνέχεια αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη στόχο της p53, την 14-3-3σ. Η τελευταία εξέρχεται από τον πυρήνα και επάγει την απενεργοποίηση της CDK1, οπότε επιτυγχάνεται διακοπή του κυτταρικού κύκλου [47, 66]. Η πρωτεΐνη p53 υποστηρίζει τη διακοπή αυτή μέσω της επαγωγής της πρωτεΐνης p21/WAF1 που συνδέεται και αναστέλλει την CDK1 και την PCNA [47, 67-69]. Η μετάδοση σήματος από τις CHK1 και CHK2 είναι μία περίπλοκη διαδικασία στην οποία εμπλέκονται διάφορα μόρια τα οποία επιπρόσθετα σχετίζονται με μηχανισμούς ογκογένεσης. Τέτοια μόρια είναι η ιστόνη H2AX, η 53 BP1 (p53 Binding Protein 1), οι πρωτεΐνες BRCA1 και η NBS1 (Nijmegen Breakage Syndrome 1), που είναι στόχοι των ATM και ATR. Επιπλέον, εμπλέκονται και τα μόρια MDC1 (Mediator of DNA Damage Checkpoint Protein 1) και SMC1 (Structural Maintenance of Chromosome 1) [47]. Διαταραχές των μορίων H2AX, 53BP1 και MDC1 συνεπάγονται διαταραχές του σημείου ελέγχου G2, με αποτέλεσμα γενετική αστάθεια, επιρρέπεια στην ογκογένεση και ευαισθησία στην ιονίζουσα ακτινοβολία. [47, 70-76]. Τέλος, μιτωτική καταστροφή επάγεται και επί βλάβης των μικροσωληνίσκων από διάφορους βλαπτικούς παράγοντες [47].



## 4.2. Απόπτωση

Τα HRS χαρακτηρίζονται εκτός από διαταραχές στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και οδών μεταγωγής ενδοκυττάριου σήματος, και από διαταραχές στη ρύθμιση της απόπτωσης. Η απόπτωση αποτελεί μία μορφή γενετικά προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και στη διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών των πολυκυττάριων οργανισμών [47, 77, 78]. Διαταραχές στη ρύθμιση της απόπτωσης εμπλέκονται στην παθογένεση διαφόρων κακοήθων νεοπλασμάτων [79-83].

Η αναστολή της απόπτωσης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση του κλασικού λεμφώματος Hodgkin (cHL) εφόσον το κύτταρο προέλευσης της νόσου είναι ένα προ-αποπτωτικό B-λεμφοκύτταρο του βλαστικού κέντρου, δηλαδή ένα B-λεμφοκύτταρο το οποίο επιβίωσε ενώ έπρεπε να αποπέσει κατά την διαδικασία της αντίδρασης του βλαστικού κέντρου. Τα κύτταρα HRS υπερεκφράζουν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην απόπτωση, όπως οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες c-FLIP, bcl-X1, c-IAP2 και XIAP [4, 10-14, 16-21, 36].

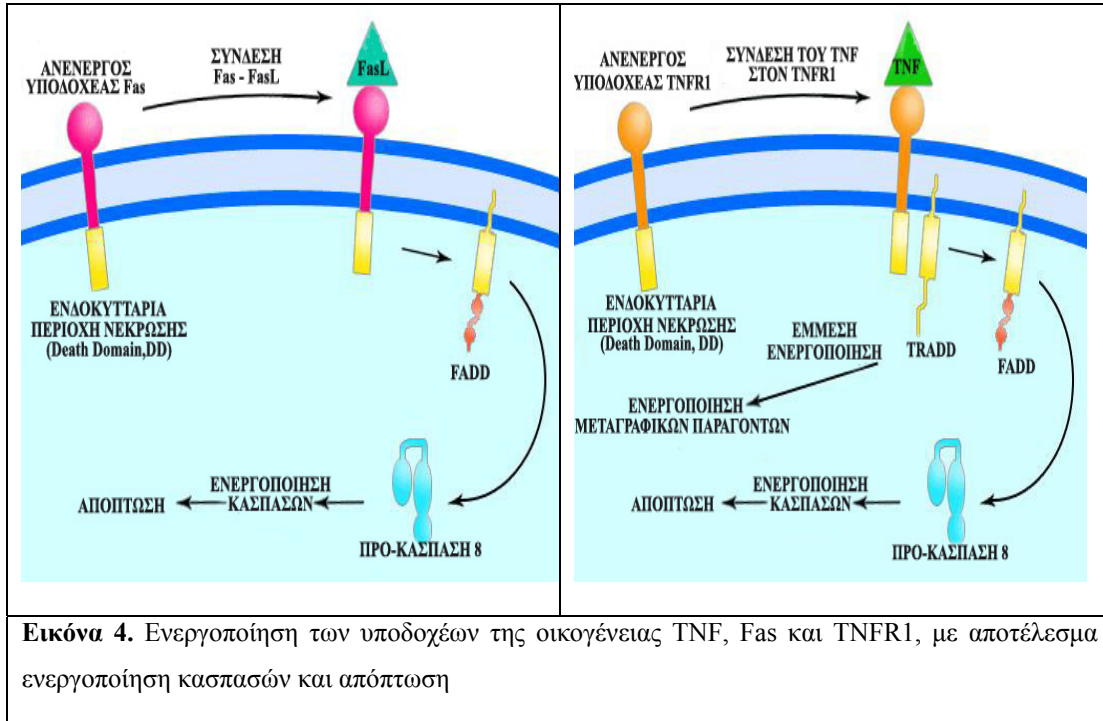
Στα θηλαστικά έχουν προσδιοριστεί **δύο κύρια μονοπάτια** μετάδοσης αποπτωτικών σημάτων: 1) το εξωγενές μονοπάτι ή των επιφανειακών υποδοχέων νέκρωσης, και 2) το ενδογενές ή μιτοχονδριακό μονοπάτι [3, 31, 34-36, 79, 84-87, 320]. Και τα δυο μονοπάτια καταλήγουν στη ενεργοποίηση των κασπασών [36, 47, 87, 88].

Οι **κασπάσες** αποτελούν μία οικογένεια πρωτεασών κυστεΐνης που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εκτέλεση της απόπτωσης. Αυτά τα ένζυμα διασπών συγκεκριμένα κυτταρικά υποστρώματα με αποτέλεσμα τα κύτταρα να παρουσιάζουν χαρακτηριστικές βιοχημικές και μορφολογικές μεταβολές [47, 86, 88-90]. Οι κασπάσες έκτος της απόπτωσης συμμετέχουν και σε άλλα κυτταρικά φαινόμενα [86, 91-95]. Στα θηλαστικά έχουν αναγνωριστεί 14 μέλη της οικογένειας των κασπασών, οι οποίες ανευρίσκονται στα κύτταρα ως ανενεργά προένζυμα (ζυμογόνα), και τα οποία ενεργοποιούνται από αποπτωτικά ερεθίσματα. Οι κασπάσες διακρίνονται σε τρεις ομάδες ανάλογα με την αλληλουχία του τετραπεπτιδίου που αναγνωρίζουν [86, 96, 97]. Η ενεργοποίηση των κασπασών περιλαμβάνει έναν καταρράκτη αντιδράσεων ο οποίος αρχίζει με αυτοκαταλυόμενη ενεργοποίηση των

**εναρκτήριων κασπασών** (initiator caspases) οι οποίες αναμεταδίδουν το σήμα ενεργοποιώντας τις **εκτελεστικές κασπάσες** (effector caspases) [86, 98]. Οι εναρκτήριες κασπάσες είναι οι -2, -8, -9, -10, οι εκτελεστικές κασπάσες οι -3, -6 και -7, και οι επονομαζόμενες φλεγμονώδεις κασπάσες είναι οι -1, -4, -5, -11 και -13. Η **κασπάση-3** ενεργοποιείται στα πλαίσια των περισσότερων αποπτωτικών προγραμμάτων και θεωρείται ότι είναι η κύρια εκτελεστική κασπάση. Οι ενεργοποιημένες εκτελεστικές κασπάσες διασπούν κυτταρικά υποστρώματα. Η διάσπαση των πυρηνικών λαμινών (lamins) εμπλέκεται στη συμπύκνωση της χρωματίνης και στην συρρίκνωση του κυττάρου και η διάσπαση του αναστολέα της DNάσης CAD (Caspase Activated DNase), ICAD (Inhibitor of CAD), προκαλεί την απελευθέρωση της CAD η οποία μετακινείται στον πυρήνα και τεμαχίζει το DNA. Τέλος, διάσπαση πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού όπως της ακτίνης και της Rho κινάσης 1 (ROCK1) οδηγεί στην κατάτμηση του κυττάρου και στον σχηματισμό των αποπτωτικών σωμάτων [86, 99-101].

Το **εξωγενές μονοπάτι** ενεργοποιείται μετά από σύνδεση εξωκυττάρων μορίων επαγωγής κυτταρικού θανάτου (συνδέτες) με τους αντίστοιχους επιφανειακούς υποδοχείς κυτταρικού θανάτου. Οι συνδέτες ανήκουν στην οικογένεια των TNF στην οποία περιλαμβάνονται οι TNF $\alpha$ , FasL/CD95L, TWEAK και TRAIL (TNF Related Apoptosis Inducing Ligand) [87, 102-104]. Οι αντίστοιχοι επιφανειακοί υποδοχείς τους είναι οι TNFR1, Fas/Apo-1/CD95, DR3 (Apo-3) και DR4/DR5 (TRAIL-R1/TRAIL-R2). Επιπλέον έχουν προσδιοριστεί και οι υποδοχείς EDA-R, DR-6 και NGF-R [87, 105]. Οι υποδοχείς φέρουν την ενδοκυττάρια δομή DD (Death Domain) [84, 85, 105, 320]. Σύνδεση των συνδετών με τον αντίστοιχο υποδοχέα θανάτου έχει ως αποτέλεσμα τον τριμερισμό του υποδοχέα, και την επιστράτευση και σύνδεση στο κυτταροπλασματικό τους τμήμα, και ειδικά στη δομή DD των προσαρμοστικών πρωτεϊνών (adaptor proteins) FADD (Fas Associated Death Domain) ή TRADD. Οι τελευταίες προσελκύουν την εναρκτήρια προ-κασπάση 8, με την οποία συνδέονται οπότε σχηματίζεται το σύμπλοκο DISC (Death Inducing Signalling Complex). Νεότερα ευρήματα δείχνουν ότι στο σχηματισμό του DISC συμμετέχει και η κασπάση-10 [10, 106-109, 320]. Οι πρωτεΐνες FADD και TRADD φέρουν εκτός από τις δομές DD (Death Domain) και δομές DED (Death Effector Domain). Έτσι, μέσω των πρώτων συνδέονται στην αντίστοιχη περιοχή DD των υποδοχέων, ενώ μέσω της δεύτερης συνδέονται με την περιοχή DED της προ-κασπάσης 8. Λόγω της ιδιαίτερης δομής του DISC επιτυγχάνεται αυτοπρωτεόλυση και ενεργοποίηση της προ-

κασπάσης-8, οπότε η ενεργοποιημένη κασπάση-8 ενεργοποιεί στη συνέχεια τις εκτελεστικές κασπάσες -3, -6 και -7, ενισχύοντας έτσι το αποπτωτικό σήμα (**Εικ. 4, 5 και 6**) [87].



Το εξωγενές μονοπάτι της απόπτωσης αναστέλλεται από ορισμένες πρωτεΐνες όπως οι πρωτεΐνες IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins) και η πρωτεΐνη cFLIP (cellular FADD-Like interleukin-1  $\beta$ -converting enzyme-like protease-inhibitory protein) (Borner C, 2003). Οι IAPs αναστέλλουν την δράση των κασπασών (**Εικ. 5**). Στην οικογένεια των πρωτεϊνών αυτών ανήκουν οι πρωτεΐνες XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP, ML-IAP, ILP2, livin (KIAP), apollon και σαρβιβίνη [110, 111, 320]. Πάντως, δεν φαίνεται να εμπλέκονται όλες οι IAP στην αναστολή της απόπτωσης [320]. Οι IAP φέρουν δομές BIR, ενώ ορισμένα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών αυτών φέρουν επιπλέον και δομή προσέλκυσης κασπασών CARD (caspase recruitment domain) καθώς και μία καρβοξυτελική δομή RING finger που ευνοεί την ουμπικουΐτινωση και την διάσπασή τους [110]. Στην τελευταία αυτή δομή συγκεκριμένων IAPs, όπως των XIAP και cIAP2, υπάρχει δράση E3 λιγάσης που ενδεχομένως επάγει την διάσπαση ορισμένων κασπασών στα πρωτεοσώματα, όπως των κασπασών -3 και -7 [110, 112, 113]. Οι καλύτερα μελετημένες αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας των IAPs είναι οι XIAP, c-IAP1, c-IAP2 και σαρβιβίνη. Οι IAPs δρουν και στο ενδογενές μονοπάτι, σε στάδιο μεταγενέστερο από αυτό των

πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 [110, 111, 114]. Επιπλέον, στο μονοπάτι αυτό απελευθερώνονται πρωτεΐνες που αναστέλλουν την δράση των IAPs όπως, οι Smac/DIABLO και Omi/HtrA2 [110, 114]. Οι IAPs ενδεχομένως να συμβάλλουν στην επιβίωση των κυττάρων και με άλλους μηχανισμούς, όπως την ενεργοποίηση των μονοπατιών TGF- $\beta$  και JNK (c-Jun amino terminal kinase) [110, 115, 116].

Η **XIAP** έχει την ικανότητα να συνδέεται και να αναστέλλει την δράση των κασπασών -3, -7 και -9, ενώ δεν συνδέεται στην κασπάση-8 [117, 118]. Μελέτες έδειξαν ότι η υπερέκφραση της XIAP αναστέλλει την απόπτωση την επαγόμενη από τον TNF, τον Fas-L, την στέρηση παραγόντων ανάπτυξης και την επίδραση διαφόρων χημειοθεραπευτικών φαρμάκων (**Εικ. 5**) [117, 119, 120].

Η **σαρβιβίνη** εμπλέκεται τόσο στην απόπτωση όσο και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η μεταγραφή του γονιδίου της δημιουργεί τρεις εναλλακτικές μορφές μεταγραφημάτων [110]. Ο αντι-αποπτωτικός ρόλος της πρωτεΐνης θεωρείται πλέον εδραιωμένος, αν και ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου δρα δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί [110, 121-129]. Υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι η σαρβιβίνη αλληλεπιδρά με κασπάσες και ότι οι αλληλεπιδράσεις είναι ανάλογες με αυτές άλλων πρωτεϊνών της οικογένειας των IAPs, αν και δεν αναστέλλει σημαντικά την δράση των κασπασών [110, 126, 130-132]. Νεότερα ευρήματα έδειξαν μία επιλεκτική δράση της σαρβιβίνης μόνο στο μιτοχονδριακό μονοπάτι της απόπτωσης αλληλεπιδρώντας με την κασπάση-9 και την Smac/DIABLO [110, 133-135].

Η έκφραση της σαρβιβίνης εξαρτάται από τον κυτταρικό κύκλο, ενώ δεν υπάρχουν ανάλογα ευρήματα για άλλες πρωτεΐνες της οικογένειας των IAPs. Η φωσφορυλίωσή της κατά την διάρκεια της μίτωσης από το σύμπλοκο CDC2-κυκλίνη B1 έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της σταθερότητας του μορίου της [110, 136]. Χαρακτηριστικά, η σαρβιβίνη εκφράζεται σε εμβρυϊκούς ιστούς, αλλά είναι μη ανιχνεύσιμη στους περισσότερους διαφοροποιημένους φυσιολογικούς ιστούς [110, 123, 137, 138]. Τα κύτταρα των φυσιολογικών ιστών στα οποία εκφράζεται η σαρβιβίνη, όπως θυμοκύτταρα, CD34+ βλαστικά αιμοποιητικά κύτταρα και επιθηλιακά κύτταρα της βασικής στοιβάδας του παχέως εντέρου χαρακτηρίζονται από υψηλό δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού [110, 123, 139-142]. Επιπλέον, η σαρβιβίνη υπερεκφράζεται σε διάφορα κακοήθη νεοπλασμάτα, συμπεριλαμβανομένου και του λεμφώματος Hodgkin [110, 143]. Δεδομένου ότι η έκφραση της σαρβιβίνης συνδέεται με τον κυτταρικό κύκλο, η υπερέκφραση της

πρωτεΐνης σε νεοπλασματικούς ιστούς έχει αποδοθεί στον αυξημένο δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού των νεοπλασματικών κυττάρων. Αυτή όμως η άποψη δεν φαίνεται να ισχύει καθώς η σαρβιβίνη υπερεκφράζεται στα νεοπλασματικά κύτταρα ανεξάρτητα του μιτωτικού τους δείκτη ή του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού [110, 144]. Επομένως, ίσως η υπερέκφρασή της σαρβιβίνης να οφείλεται σε διαταραχές του γονιδίου της ή να ελέγχεται και από άλλους μηχανισμούς ανεξάρτητους του κυτταρικού κύκλου. Πάντως η έκφραση της σαρβιβίνης ρυθμίζεται σε μεταγραφικό επίπεδο από την p53 (wild type p53). Η έκφραση της σαρβιβίνης αναστέλλει την απόπτωση την εξαρτώμενη από την p53 [110, 145, 146, 147].

Το εξωγενές μονοπάτι της απόπτωσης αναστέλλεται και από την **πρωτεΐνη cFLIP** (cellular FADD-Like Interleukin-1  $\beta$ -Converting Enzyme-like protease-Inhibitory Protein, cellular FLICE inhibitory protein) που αναστέλλει την κασπάση 8 (ονομάζεται και FLICE) (**Εικ. 5**). Η πρωτεΐνη αυτή είναι ένα καταλυτικά ανενεργό ομόλογο προ-κασπάσης 8/10. Στο μόριο της φέρει την δομή DED μέσω της οποίας συνδέεται στην FADD, στη θέση σύνδεσης της κασπάσης-8 με επακόλουθο την αναστολή της ενεργοποίησης της τελευταίας [87, 148, 149]. Ειδικότερα, η έκφραση της πρωτεΐνης cFLIP έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί έναν από τους κυριότερους παράγοντες αναστολής της απόπτωσης της επαγόμενης μετά από ενεργοποίηση επιφανειακών υποδοχών νέκρωσης. Επιπλέον, διάφορες μελέτες καταδεικνύουν ότι αρνητική ρύθμιση της cFLIP έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή της απόπτωσης πολλών τύπων νεοπλασματικών κυττάρων [10, 105, 150-159]. Αντίθετα, η κατευθυνόμενη έκφραση cFLIP επαναφέρει την ικανότητα των κυττάρων να ανθίστανται στην απόπτωση την επαγόμενη από επιφανειακούς υποδοχείς [105]. Αυξημένα επίπεδα έκφρασης της cFLIP έχουν ανευρεθεί σε διάφορους τύπους νεοπλασματικών κυττάρων, που είναι ανθεκτικά στην απόπτωση την επαγόμενη από υποδοχείς νέκρωσης συμπεριλαμβανομένου και του λεμφώματος Hodgkin [10, 105, 153, 160, 161].

Έχουν προσδιοριστεί τρεις ισομορφές κυτταροπλασματικής c-FLIP (c-FLIP1, c-FLIPs και c-FLIPr) στον άνθρωπο και έξι ικά ομόλογα (v-FLIP). Η ισομορφή c-FLIP1 διαθέτει δομή όμοια προς την προ-κασπάση 8: δηλαδή, δύο δομές DED στο αμινοτελικό της άκρο και μία δομή που προσομοιάζει τη δομή των κασπασών στο καρβοξυτελικό άκρο. Ωστόσο, η τελευταία αυτή δομή δεν διαθέτει το καταλυτικό

κυστεϊνικό κατάλοιπο που υπάρχει στις κασπάσες, και επομένως είναι καταλυτικά ανενεργό. Και οι τρεις ισομορφές c-FLIP, καθώς και τα ικκά ανάλογα v-FLIP συνδέονται στο σύμπλοκο DISC μέσω των δομών DED και έτσι αποκλείουν την προ-κασπάση 8 από την σύνδεση της στο σχηματισμό του DISC. Εξαίρεση αποτελεί η ικκή v-FLIP MC159 [105, 162].

Παρότι, στις περισσότερες μελέτες διαπιστώνεται ότι η c-FLIP1 αναστέλλει την δράση της κασπάσης 8, υπάρχουν ορισμένες μελέτες που υποστηρίζουν ότι η c-FLIP1 ενεργοποιεί την κασπάση 8 [105, 163-166]. Στις μελέτες αυτές διαπιστώθηκε ότι cFLIP1 μπορεί να δράσει είτε ως αντι-αποπτωτική είτε ως προ-αποπτωτική πρωτεΐνη ανάλογα με τα επίπεδα έκφρασής της, ενώ οι υπόλοιπες πρωτεΐνες FLIP έχουν αποκλειστικά αντι-αποπτωτική δράση. Η c-FLIP1 όταν εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα, όπως στα περισσότερα φυσιολογικά κύτταρα, ενισχύει την ενεργοποίηση της κασπάσης 8. Όταν αυτή εκφράζεται σε μέτρια επίπεδα, όπως στα μονοκύτταρα/μακροφάγα και σε ορισμένα νεοπλασματικά κύτταρα, δρά ως αναστολέας της κασπάσης 8, ενώ όταν εκφράζεται σε πολύ υψηλά επίπεδα έχει άμεσα κυτταροτοξική δράση [105, 167]. Σύμφωνα με ορισμένους ερευνητές, η προ-αποπτωτική δράση καθορίζεται από τη σχετική αναλογία της κασπάσης 8 προς την c-FLIP1 [148], ενώ πολύ πρόσφατη μελέτη υποστηρίζει ότι η c-FLIP1 έχει προ-αποπτωτική δράση μόνο όταν εκφράζεται σε μέτρια επίπεδα και παράλληλα υπάρχει ισχυρή ενεργοποίηση του υποδοχέα CD95 ή υψηλή συγκέντρωση μίας από τις βραχύτερες ισομορφές c-FLIPs c-FLIPr [168]. Συνολικά, παρά το διττό ρόλο της c-FLIP1 τονίζεται ότι φυσιολογικά επίπεδα έκφρασής της αναστέλλουν την απόπτωση των νεοπλασματικών κυττάρων [105]. Επιπρόσθετα, η c-FLIP1 ενεργοποιεί το μονοπάτι του NF-kB, ειδικά στα λεμφοκύτταρα, καθώς και το μονοπάτι Erk [105, 169-173].

Το εξωγενές μονοπάτι συνδέεται λειτουργικά με το ενδογενές μονοπάτι μέσω της ενεργοποιημένης κασπάσης 8, η οποία έχει την δυνατότητα να ενεργοποιεί την πρωτεΐνη Bid. Η ενεργοποιημένη tBid (truncated Bid) στη συνέχεια μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια όπου ενεργοποιεί το ενδογενές μονοπάτι με αποτέλεσμα ενίσχυση του αποπτωτικού σήματος [86, 174, 175]. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται σε κύτταρα, στα οποία η ποσότητα της ενεργοποιημένης κασπάσης-8 δεν επαρκεί για την περαιτέρω ενεργοποίηση του εξωγενούς αποπτωτικού μονοπατιού (κύτταρα τύπου II) **(Εικ. 5 και 6)** [320].

Το ενδογενές μονοπάτι ή μιτοχονδριακό μονοπάτι της απόπτωσης ενεργοποιείται ανεξάρτητα επιφανειακών υποδοχέων. Στα ερεθίσματα που την ενεργοποιούν περιλαμβάνονται οι ακτινοβολίες  $\gamma$  και UV, η απομάκρυνση παραγόντων ανάπτυξης και κυτταροκινών από το άμεσο μικροπεριβάλλον των κυττάρων, η απόσπαση του κυττάρου από το εξωκυττάριο υπόστρωμα (apoikis), και η επίδραση χημειοθεραπευτικών παραγόντων, ιών και βακτηρίων. Κρίσιμο σημείο αυτού του μονοπατιού είναι η αύξηση της διαπερατότητας της εξωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων, η οποία οφείλεται στον σχηματισμό και/ή στην ενεργοποίηση πόρων μέσω των οποίων επιτρέπεται η διέλευση διάφορων πρωτεϊνών που ρυθμίζουν την απόπτωση [87, 176, 177].

Τα μιτοχόνδρια περιβάλλονται από διπλή μεμβράνη, την εξωτερική (Outer Mitochondrial Membrane, OMM) και την εσωτερική (Inner Mitochondrial Membrane, IMM). Έτσι, το μιτοχόνδριο χωρίζεται σε δύο ενδομιτοχονδριακά διαμερίσματα, το μεσομεμβρανικό διάστημα (IMS, Intermembrane space) μεταξύ των δύο μεμβρανών και το πλέον εσωτερικό, το στρώμα (matrix). Κύριο συστατικό της IMM είναι η καρδιολιπίνη η οποία καθιστά τη μεμβράνη αδιαπέραστη, εκτός ελάχιστων επιλεγμένων ιόντων και μεταβολιτών που είναι απαραίτητα για τη διατήρηση του ηλεκτροχημικού δυναμικού που χρειάζονται τα μιτοχόνδρια για να επιτελούν την λειτουργία τους. Στα σημεία επαφής της IMM με την OMM σχηματίζονται διαμεμβρανικά κανάλια γνωστά ως πόροι μεταβολής της διαπερατότητας (Permeability Transition Pore, PTP). Αυτοί οι πόροι δομούνται από ένα ανιονικό κανάλι εξαρτώμενο από την διαφορά δυναμικού (Voltage dependent anion channel, VDAC) της OMM και από τον μεταφορέα νουκλεοτιδίων αδενίνης (Adenine nucleotide translocator, ANT) της IMM [87, 100, 178].

Τα μιτοχόνδρια απαντούν σε αποπτωτικά ερεθίσματα απελευθερώνοντας στο κυτταρόπλασμα διάφορες πρωτεΐνες που βρίσκονται στο IMS. Οι πρωτεΐνες αυτές είτε βρίσκονται αποθηκευμένες σε ανενεργό μορφή είτε συμμετέχουν σε άλλες φυσιολογικές διεργασίες του κυττάρου [87, 179-182]. Τυπικό παράδειγμα αποπτωτικής πρωτεΐνης με διττό ρόλο αποτελεί το κυτόχρωμα c (cyt c), το οποίο υπό φυσιολογικές συνθήκες βρίσκεται στον IMS των μιτοχονδρίων και συμμετέχει στο μηχανισμό της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και στην παραγωγή ενέργειας με τη μορφή ATP. Άλλοι αποπτωτικοί παράγοντες που απελευθερώνονται, επιπρόσθετα του κυτοχρώματος c, είναι ο AIF (Apoptosis Inducing Factor), η ενδονουκλεάση G, η

Smac/DIABLO, η Omi/HtrA2, η ACBP (Acyl-Co-A-binding protein) και η PTB (Poly-pyrimidine tract-binding protein) [100].

Το **κυτόχρωμα c** συντίθεται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου σε πρόδρομη μορφή και μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια μέσω της OMM, όπου ολοκληρώνεται η δομή του. Μετά την επίδραση αποπτωτικού ερεθίσματος το κυτόχρωμα c απελευθερώνεται από το IMS και συμμετέχει στον σχηματισμό και στην ενεργοποίηση του αποπτωσώματος (**Εικ. 5**) [87, 100, 183-185]. Το αποπτώσωμα είναι ένα σύμπλεγμα το οποίο αποτελείται από το κυτόχρωμα c, τον παράγοντα Araf-1 και την προκασπάση-9 [100] ή από τον παράγοντα Araf-1 και την προκασπάση-9 [87]. Το κυτόχρωμα c συνδέεται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες του Araf-1 παρουσία ATP ή dATP, με αποτέλεσμα τη μετατροπή της κλειστής μονομερούς μορφής του Araf-1 σε ανοιχτή επταμερή μορφή, όπου προσελκύεται και συνδέεται η προκασπάση-9 [87, 100, 186-191]. Η σύνδεση γίνεται στη δομή CARD του Araf-1 οπότε ενεργοποιείται η προ-κασπάση-9 και αυξάνεται σημαντικά (x1000) η ικανότητά της για ενεργοποίηση των εκτελεστικών κασπασών [87, 100, 186, 192]. Σε αυτό το σημείο είναι δυνατόν να ανασταλεί η δράση της ενεργοποιημένης κασπάσης-9 από την ενδεχόμενη παρουσία και δράση των ανασταλτικών πρωτεϊνών **IAPs** [87, 100, 114, 193, 194]. Όμως, η ταυτόχρονη απελευθέρωση από το IMS των πρωτεϊνών Smac/DIABLO και Htr2A/Omi πυροδοτεί την απομόνωση και/ή την διάσπαση των IAPs, εξασφαλίζοντας έτσι την δράση της κασπάσης-9 [87, 181, 195-200].

Η **Smac/DIABLO** απελευθερώνεται από το IMS των μιτοχονδρίων μετά από αποπτωτικά ερεθίσματα και ανταγωνίζεται την δράση των IAPs, εμποδίζοντας την ανασταλτική δράση των τελευταίων επί των κασπασών (**Εικ. 5**) [87, 100, 180, 195-197]. Η σύνδεση των IAP με την πρωτεΐνη Smac/DIABLO γίνεται μέσω συγκεκριμένης περιοχής του μορίου της που αναγνωρίζει την περιοχή BIR3 των IAP. Παρόμοια περιοχή υπάρχει και στο μόριο της κασπάσης-9, οπότε η Smac/DIABLO και η κασπάση-9 ανταγωνίζονται για τη σύνδεση στην περιοχή BIR3 της IAP [100, 196, 201]. Παρομοίως, η Smac/DIABLO συνδέεται και στη δομή BIR2 της XIAP και ανταγωνίζεται έτσι την ανασταλτική δράση της XIAP επί των κασπασών-3 και -7 (**Εικ. 6**) [100, 202].

Η πρωτεάση σερίνης **Omi/HtrA2**, επίσης βρίσκεται στο IMS των μιτοχονδρίων και όπως η Smac/DIABLO ασκεί προ-αποπτωτική δράση μέσω της ικανότητάς της να συνδέεται με τις IAPs [87, 100, 180, 181, 198, 200]. Αντίθετα από τη Smac/DIABLO,



δεν αλληλεπιδρά με τη σαρβιβίνη. Συμμετέχει τόσο στην εξαρτώμενη όσο και στην ανεξάρτητη από κασπάσες απόπτωση [100, 181, 197, 200].

Η Omi/Htr2A εκφράζεται σε όλους τους ιστούς, ενώ η Smac/DIABLO εκφράζεται κυρίως σε καρδιακά, ηπατικά και νεφρικά κύτταρα και πολύ λιγότερο σε μυϊκά, πνευμονικά, εγκεφαλικά και θυμικά κύτταρα [100, 195, 197]. Έχει διπλή δράση, αναστέλλει τις IAPs και επάγει μία άτυπη μορφή κυτταρικού θανάτου μέσω της δράσης της ως πρωτεάση [100]. Επιπρόσθετα, ως πρωτεάση διασπά και απενεργοποιεί την XIAP [203-205].

Η μιτοχονδριακή πρωτεΐνη **AIF** υπό φυσιολογικές συνθήκες περιορίζεται στα μιτοχόνδρια. Σε απάντηση σε ορισμένα αποπτωτικά ερεθίσματα εισέρχεται στο IMS, εξέρχεται από το μιτοχόνδριο και μεταφέρεται στον πυρήνα του κυττάρου [100, 206]. Η AIF επάγει διαδικασίες συμπίκνωσης της χρωματίνης, κατάλυσης της εδραιωμένης διαμεμβρανικής διαφοράς δυναμικού των μιτοχονδρίων, έκθεσης φωσφατιδילוσερίνης στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και διάσπασης του DNA σε υψηλού μοριακού βάρους θραύσματα [87, 100, 207, 208]. Το αποπτωτικό μονοπάτι της AIF δεν εξαρτάται από τις κασπάσες [100, 207]. Η δράση της ανταγωνίζεται από την Hsp70 (Heat Shock Protein 70) [100, 209].

Η **ενδονουκλεάση G** απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια, κατά τη διάρκεια της απόπτωσης, και μεταφέρεται στον πυρήνα του κυττάρου όπου κατακερματίζει το DNA απουσία δραστηριότητας κασπασών ή της δεοξυριβονουκλεάσης CAD (Caspase activated deoxyribonuclease) [87, 100, 182, 210]. Η διάσπαση του DNA από την ενδονουκλεάση G, όπως και από την AIF, είναι μία διαδικασία ανεξάρτητη κασπασών, ενώ η διάσπαση του DNA από την CAD εξαρτάται από τις κασπάσες [100, 210, 211]. Επομένως, θεωρείται ότι η ενδονουκλεάση G και ο AIF συμβάλουν σημαντικά στην εκτέλεση του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου στις περιπτώσεις τις οποίες η ενεργοποίηση των κασπασών είναι περιορισμένη [100].

Η **νουκλεάση CAD/DFF40** υπό φυσιολογικές συνθήκες βρίσκεται απομονωμένη στο κυτταρόπλασμα συνδεδεμένη στην ανασταλτική της πρωτεΐνη ICAD/DFF45. Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης, η ICAD διασπάται από την κασπάση-3 και η ελεύθερη CAD μεταφέρεται στον πυρήνα όπου διασπά το DNA [100, 101].

Η πρωτεΐνη ACBP (**Acyl-Co-A-binding protein**) απελευθερώνεται από τον IMS των μιτοχονδρίων μετά από πειραματική επεξεργασία με tBid [100, 180]. Πρόκειται για ένα ομοδιμερές που προάγει την ενεργοποίηση της m-calpain ελαττώνοντας τα επίπεδα του ασβεστίου στα απαιτούμενα για την ενεργοποίησή της [100, 212]. Η calpain ανήκει σε μία οικογένεια ενδοκυττάρων πρωτεασών κυστεϊνης των οποίων η δραστηριότητα εξαρτάται από το ασβέστιο. Οι calpain ενεργοποιούνται τόσο σε εξαρτώμενο από κασπάσες όσο και σε ανεξάρτητο από κασπάσες κυτταρικό θάνατο [100, 213]. Η πρωτεολυτική ενεργοποίηση της Bid από την calpain υποδεικνύει μία εναλλακτική οδό που μπορεί να επηρεάσει την ακεραιότητα των μιτοχονδρίων επί απουσίας δραστηριότητας κασπασών [100, 214].

Η οικογένεια των πρωτεϊνών **Bcl-2** περιλαμβάνει πρωτεΐνες που επάγουν ή αναστέλλουν την απόπτωση, οι οποίες παρουσιάζουν ομοιότητες στη δομή του μορίου τους [87]. Έχουν ταυτοποιηθεί 30 μέλη της οικογένειας που ταξινομούνται σε τρεις υποομάδες α) τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες της ομάδας των Bcl-2-like, β) τις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες της ομάδας των Bax-like και γ) τις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες της ομάδας των BH-3-only [87, 175, 215, 216].

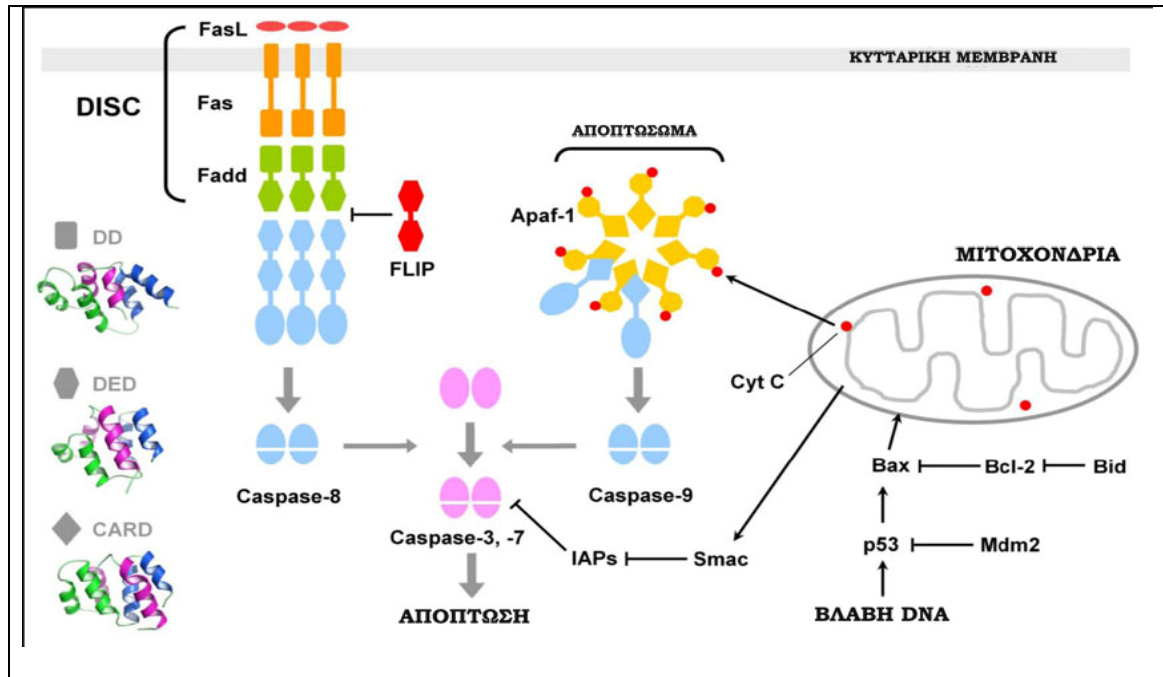
Στην ομάδα των **πρωτεϊνών των Bcl-2-like** περιλαμβάνονται οι πρωτεΐνες Bcl-2, Bcl-Xl, Mcl-1, Bcl-w, A1/Bfl-1, NR-13, Boo/Diva/Bcl2-L-10 και Bcl-B. Χαρακτηριστικό της δομής των πρωτεϊνών της ομάδας αυτής είναι η ύπαρξη τριών ή τεσσάρων περιοχών BH στο μόριό τους (Bcl-2 Homology domains), των BH-1 έως BH-4. Οι πρωτεΐνες αυτές δρουν αλληλεπιδρώντας με άλλες πρωτεΐνες και είναι απολύτως απαραίτητες για την επιβίωση των κυττάρων [87, 217-222]. Θεωρείται, ότι για την επιβίωση ενός κυττάρου είναι απαραίτητη η δράση μίας τουλάχιστον αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης της ομάδας των Bcl-2-like [79].

Μελέτες της δομής του μορίου των πρωτεϊνών **Bcl-2** και **Bcl-Xl**, έδειξαν ότι οι περιοχές BH-1, BH-2 και BH-3 του μορίου τους σχηματίζουν ένα υδρόφοβο σχηματισμό τον οποίο σταθεροποιεί η αμινοτελική περιοχή BH-4 [87, 223-226]. Αυτός ο υδρόφοβος σχηματισμός θεωρείται ότι αποτελεί το λειτουργικό τμήμα των πρωτεϊνών αυτών και χαρακτηρίζεται από την ικανότητα να συνδέεται με την περιοχή BH-3 άλλων πρωτεϊνών. Έχουν προσδιοριστεί και άλλες πρωτεΐνες που περιέχουν BH-3 περιοχή στο μόριό τους, με όμοιες ιδιότητες με αυτές των περιοχών BH-3 των πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2. Οπότε, θεωρήθηκε ότι κάθε πρωτεΐνη με περιοχή BH-3 στο μόριό της, μπορεί να αλληλεπιδρά με τον υδρόφοβο σχηματισμό των

πρωτεϊνών της ομάδας των Bcl-2. Ωστόσο, αυτό δεν συμβαίνει καθώς οι περιοχές BH-3 δεν είναι συνεχώς διαθέσιμες προς σύνδεση. Συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες των ομάδων των Bax-like και BH-3-only εκθέτουν τις περιοχές BH-3 μόνο μετά από μετα-μεταφραστική τροποποίηση και/ή αλλαγές της τριτοταγούς δομής τους, ενώ οι πρωτεΐνες της ομάδας των Bcl-2-like διατηρούν την περιοχή BH-3 που διαθέτουν ως αναπόσπαστο μέρος του υδρόφοβου σχηματισμού και επομένως δεν προσφέρονται για σύνδεση με άλλες πρωτεΐνες της ομάδας Bcl-2-like. Έτσι, οι τελευταίες δεν μπορούν να όμο- ή ετεροδιμεριστούν με άλλα μέλη της ίδιας υπό-ομάδας πρωτεϊνών. Επιπλέον, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ μίας πρωτεΐνης που φέρει υδρόφοβο σχηματισμό με μία που φέρει περιοχή BH-3 περιορίζονται από την διαμερισματοποίηση τους εντός του κυττάρου [87].

Ωστόσο, υπάρχουν ευρήματα που δείχνουν ότι ο τρόπος δράσης των πρωτεϊνών της ομάδας των Bcl-2-like είναι πιο σύνθετος. Έχει προσδιοριστεί πληθώρα πρωτεϊνών, όπως οι R-Ras, Raf-1, p53BP-2 που δεν διαθέτουν στο μόριό τους δομή BH-3, αλλά αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες της ομάδας των Bcl2-like συνδεδεμένες είτε στον υδρόφοβο σχηματισμό, είτε στην περιοχή BH-4 των τελευταίων. Ακόμη, έχει βρεθεί ότι οι πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-Xl συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου καθυστερώντας την είσοδο του κυττάρου στη φάση S [87, 227-232]. Πιθανόν, οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες της ομάδας των Bcl-2-like και δεν διαθέτουν περιοχή BH-3 να συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού [87, 229].

Εν κατακλείδι, το προτεινόμενο μοντέλο δράσης των πρωτεϊνών της ομάδας είναι ότι δρουν ως μεμβρανικοί παράγοντες αναγνώρισης και απομάκρυνσης παραγόντων με προ-αποπτωτική δράση που περιέχουν στο μόριό τους μία περιοχή BH-3 (**Εικ.5**). Οι πρωτεΐνες της ομάδας των Bcl-2-like βρίσκονται σε διάφορες ενδοκυττάριας μεμβράνες όπως, μιτοχονδριακές, πυρηνικές, και του ενδοπλασματικού δικτύου και αναπτύσσουν τη δράση τους σε μονομερή μορφή, χωρίς αλλαγές στην τριτοταγή δομή τους ή στην ενδοκυττάρια εντόπισή τους [87].



Εικόνα 5. Απόπτωση (εξωγενές και ενδογενές μονοπάτι) και αναστολή αυτής [105]

Οι πρωτεΐνες **Mcl-1** και **A1/Bfl-1** της ομάδας των Bcl-2-like είναι λιγότερο μελετημένες, και πιθανόν να έχουν ασθενέστερη αντι-αποπτωτική δράση. Αυτές, εμφανίζουν περισσότερο αποκλίνουσα δομή συγκριτικά με τα άλλα μέλη της ομάδας και ενδεχομένως να εμπλέκονται σε επιπρόσθετες λειτουργίες [79]. Μελέτες έδειξαν ότι πειραματόζωα που φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο της Mcl-1 εμφανίζουν αυξημένη συχνότητα ανάπτυξης Β-λεμφομάτων [87]. Φυσιολογικά, η έκφραση της πρωτεΐνης Mcl-1 ενεργοποιείται πρώιμα στην οδό μετάδοσης σήματος κυρίως από τις κυτταροκίνες GM-CSF και την IL-13, που επάγουν την επιβίωση των κυττάρων. Επιπρόσθετα, η έκφραση της Mcl-1 επάγεται από τον μεταγραφικό παράγοντα CREB σε απάντηση σε σήματα επιβίωσης από την οδό PI-3-K/Akt [87, 233].

Η ομάδα των προ-αποπτωτικών **πρωτεϊνών Bax-like** περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες Bax, Bak, Bok/Mtd και Bcl-Xs. Στο μόριό τους εμπεριέχονται τρεις περιοχές BH, οι BH-1 έως BH-3 [215, 234]. Περισσότερο μελετημένη είναι η πρωτεΐνη **Bax**, της οποίας οι περιοχές BH-1 έως BH-3 σχηματίζουν μία υδρόφοβη δομή, που μπορεί να συνδεθεί με την περιοχή BH-3 άλλων πρωτεϊνών. Ωστόσο, η περιοχή BH-3 του Bax είναι λιγότερο στενά πακεταρισμένη σε υδρόφοβο σχηματισμό και επομένως έχει τη δυνατότητα να περιστραφεί γύρω από τον άξονά της και να εκτεθεί μακριά από τον υδρόφοβο σχηματισμό του μορίου της οπότε καθίσταται διαθέσιμη προς σύνδεση στον υδρόφοβο σχηματισμό των πρωτεϊνών της ομάδας των

Bcl-2-like [87]. Συνδέσεις τέτοιου τύπου έχουν ανιχνευθεί μεταξύ της BH-3 δομής της πρωτεΐνης Bak και του υδρόφοβου σχηματισμού της πρωτεΐνης Bcl-Xl [87, 235]. Η ευελιξία που χαρακτηρίζει τις περιοχές BH-3 των πρωτεϊνών της ομάδας των Bax-like έχει ιδιαίτερη σημασία εφόσον τους επιτρέπει να ασκούν την προ-αποπτωτική τους δράση [87, 236].

Μία επιπλέον διαφορά της Bax έναντι των πρωτεϊνών της ομάδας των Bcl-2-like, όπως της Bcl-2 και της Bcl-Xl, είναι ότι οι τελευταίες αμέσως μετά την σύνθεσή τους ανευρίσκονται σε ενδοκυττάριας μεμβράνες, ενώ οι προ-αποπτωτικές βρίσκονται κυρίως ελεύθερες σε ολιγομερή μορφή στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου. Αυτό οφείλεται στην καρβοξυτελική δομή των πρωτεϊνών στην οποία εμπεριέχεται μία υδρόφοβη δομή στόχευσής τους και σταθεροποίησής τους σε μεμβράνες [79, 87, 237-240]. Η υδρόφοβη δομή, στις πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-Xl εκτίθεται αμέσως μόλις ολοκληρωθεί η σύνθεση τους και επομένως υπάρχει άμεση ανάγκη σύνδεσής τους σε ενδοκυττάριας μεμβράνες ώστε να αποφεύγεται η συσσωμάτωση πολλών πρωτεϊνικών μορίων που θα είχε ως επακόλουθο την κατακρήμνισή τους. Αντίθετα, η πρωτεΐνη Bax αναδιπλώνει την υδρόφοβη καρβοξυτελική δομή της εντός του υδρόφοβου σχηματισμού που δομούν οι BH-1, BH-2 και BH-3, οπότε αποτρέπεται η άμεση σύνδεση της σε μεμβράνες ή σε άλλες πρωτεΐνες [79, 87, 239, 240]. Η ελεγχόμενη απελευθέρωση του υδρόφοβου καρβοξυτελικού άκρου και η έκθεσή του στο ενδοκυττάριο μικροπεριβάλλον, δίνει την δυνατότητα στην πρωτεΐνη Bax να ανευρίσκεται σε ενδοκυττάριας μεμβράνες μόνο όταν το απαιτούν οι συνθήκες [87, 240]. Ο κύριος μηχανισμός δράσης της πρωτεΐνης Bax θεωρείται ότι είναι η άμεση συμμετοχή της στην αύξηση της διαπερατότητας της OMM [22, 23, 87, 234, 241]. Ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου το επιτυγχάνει δεν έχει διευκρινιστεί. Μετά από αποπτωτικό ερέθισμα, η πρωτεΐνη Bax αλλάζει τη τριτοταγή δομή της και μεταφέρεται στην OMM όπου ολιγομερίζεται [79, 234, 238, 242-244]. Η πρωτεΐνη Bax ελέγχεται μεταγραφικά από την p53 [245-247, 320].

Αντίθετα, από την πρωτεΐνη Bax, οι πρωτεΐνες **Bak και Bok** ανευρίσκονται αποκλειστικά σε μεμβράνες σε φυσιολογικά κύτταρα και δεν απαιτείται μετακίνηση τους κατά τη διάρκεια της απόπτωσης [87, 248]. Ειδικότερα η **Bak**, αποτελεί αναπόσπαστο τμήμα της OMM των φυσιολογικών κυττάρων, όπου ανευρίσκεται σε ολιγομερή μορφή. Μετά από αποπτωτικό ερέθισμα, οι προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες αλλάζουν περαιτέρω την τριτοταγή τους δομή και συμβάλλουν ουσιαστικά στην

αύξηση της διαπερατότητας της OMM [79, 87, 175, 238, 243, 248, 249]. Στο σημείο αυτό, οι πρωτεΐνες της ομάδας των Bcl-2-like μπορούν ακόμη να αναστείλουν την δράση των πρωτεϊνών της ομάδας των Bax-like [87].

Η δράση των πρωτεϊνών Bax και Bak για την εκτέλεση προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου οφειλόμενου σε ενδοκυττάριο stress είναι απολύτως απαραίτητη. Πειραματόζωα που εξέφραζαν μόνο μία από τις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bax και Bak, εμφάνισαν ελάχιστες ή καθόλου φαινοτυπικές ανωμαλίες. Αντίθετα, πειραματόζωα που δεν εξέφραζαν καμία από τις δύο πρωτεΐνες (Bax<sup>-/-</sup> Bak<sup>-/-</sup>), παρουσίασαν διαταραχές στην ανάπτυξη και ελάχιστα από αυτά επιβίωναν μέχρι της ενηλικίωσής τους, οπότε και ανέπτυσαν λεμφαδενοπάθεια [106, 250]. Λεμφοκύτταρα και ινοβλάστες από πειραματόζωα Bax<sup>-/-</sup> Bak<sup>-/-</sup>, παρουσίαζαν αντίσταση σε ένα ευρύ φάσμα κυτταροτοξικών ερεθισμάτων καθώς και στην απόσυρση κυτταροκινών [79, 239, 251].

Όσον αφορά τον μηχανισμό δράσης των πρωτεϊνών της ομάδας των Bax-like δεν έχει διευκρινιστεί εάν δημιουργούνται νέα κανάλια ή εάν αλληλεπιδρούν με προϋπάρχοντα κανάλια της OMM [79, 87]. Ένα τέτοιο κανάλι θα μπορούσε να είναι το κανάλι μεταβολής της διαπερατότητας PTP (Permeability Transition Pore) το οποίο διασχίζει και τις δύο μιτοχονδριακές μεμβράνες και μέσω του οποίου θα μπορούσαν να μεταφέρονται διάφορα μικρομόρια [87, 161, 252, 253]. Πιθανολογείται ότι η Bax αλληλεπιδρά με το κανάλι αυτό και αυξάνει τη διάμετρο του ανοίγματός του ώστε να μπορούν να απελευθερωθούν μόρια μεγαλύτερου μοριακού βάρους όπως είναι το cyt c, ο παράγοντας AIF ή η Smac/DIABLO [87, 241, 252, 253]. Ωστόσο, υπάρχουν αρκετά ευρήματα που δεν στηρίζουν την άποψη αυτή. Πάντως, οι πρωτεΐνες της ομάδας των Bcl-2-like είναι αυτές που καθορίζουν τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών της ομάδας των Bax-like που θα είναι διαθέσιμες για αυτή τη λειτουργία [87, 254].

Η πρωτεΐνη **Bok** ανήκει και αυτή στην ομάδα των Bax-like, είναι λιγότερο μελετημένη από τις δύο προαναφερθείσες και είναι η προ-αποπτωτική πρωτεΐνη της ομάδας που εκφράζεται κυρίως σε ιστούς του αναπαραγωγικού συστήματος [79].

Η ομάδα των **προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών των BH-3-only** περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες Bad, Bid, Bim/Bod, Noxa, PUMA/Bbc3, Bmf, Blk, Bik/Nbk, Hrk/DP5 και BNIP3 [87]. Οι πρωτεΐνες αυτές περιέχουν στο μόριό τους μόνο τη βραχεία περιοχή

BH-3 και λειτουργούν ως αρχικοί ανιχνευτές του αποπτωτικού σήματος το οποίο και μεταβιβάζουν περαιτέρω [87, 216, 255, 256]. Σε φυσιολογικά κύτταρα βρίσκονται σε αδρανή μορφή και ενεργοποιούνται μετά από την επίδραση αποπτωτικών ερεθισμάτων, με μηχανισμούς που διαφέρουν ανάλογα με την κάθε πρωτεΐνη [87, 216, 255]. Κάθε μία από αυτές τις πρωτεΐνες ανιχνεύει διαφορετικά αποπτωτικά ερεθίσματα [87].

Οι πρωτεΐνες **PUMA/Bbc3** και **Noxa** ελέγχονται σε μεταγραφικό επίπεδο, και η σύνθεσή τους επάγεται από τον μεταγραφικό παράγοντα p53. Κατά συνέπεια, θεωρείται ότι ανιχνεύουν αποπτωτικά σήματα εξαρτώμενα από τον p53, όπως βλάβη του DNA, χημειοθεραπευτικοί παράγοντες και ακτινοβολία-γ ή UV [87, 245, 246, 257-261]. Εκτός αυτών, ο παράγοντας p53, ελέγχει μεταγραφικά την έκφραση και άλλων πρωτεϊνών που ρυθμίζουν την απόπτωση και επιπλέον εμπλέκεται στην απόπτωση και σε επίπεδο μη μεταγραφικό, συνδεδεμένος σε ρυθμιστικές πρωτεΐνες όπως οι p53BP1/p53BP2 [87, 260-262] και η MDM2-RB [87, 263, 264]. Επομένως, κύτταρα με γονότυπο p53<sup>-/-</sup> είναι ανθεκτικά στην απόπτωση την επαγόμενη από βλάβη του DNA, ενώ αυτά παραμένουν ευαίσθητα σε αποπτωτικά σήματα που οφείλονται στην απομάκρυνση κυτταροκινών από το μικροπεριβάλλον του κυττάρου ή στην επίδραση παραγόντων TNF/Fas-like [87, 265, 266].

Ένας άλλος μηχανισμός ελέγχου ορισμένων εκ των μελών της ομάδας των BH-3-only, είναι η μετά-μεταγραφική φωσφορυλίωση. Τα κύτταρα κάτω από ορισμένες συνθήκες απομονώνουν την πρωτεΐνη **Bad** στο κυτταρόπλασμα τους μέσω πολλαπλής φωσφορυλίωσής της και επακόλουθης σύνδεσής της σε πρωτεΐνες πρόσδεσης 14-3-3 [87, 267]. Οι κινάσες που συμμετέχουν στην φωσφορυλίωση της Bad είναι η AKT/PKB (μεταγωγέας σήματος επιβίωσης από παράγοντες ανάπτυξης στα πλαίσια της οδού PI3-Κινάση), η Raf (συνδέει τους υποδοχείς παραγόντων ανάπτυξης με την οδό MAPK) [87, 268-270], και η PKA. Οι φωσφορυλίωσεις αυτές ελαττώνουν τη συγγένεια της πρωτεΐνης Bad προς τις πρωτεΐνες της ομάδας των Bcl-2-like οπότε, μετά από συγκεκριμένα αποπτωτικά σήματα η Bad αποφωσφοριλιώνεται από την φωσφατάση καλσινευρίνη, με αποτέλεσμα την απελευθέρωσή της από την πρωτεΐνη 14-3-3 ώστε να μπορεί να αλληλεπιδράσει με τις πρωτεΐνες της ομάδας των Bcl-2-like και να προωθήσει το αποπτωτικό σήμα [87, 233, 267, 271, 272].

Με φωσφορυλίωση ελέγχεται και η δράση της πρωτεΐνης **Bik**, πιθανώς μέσω της casein kinase II-related enzyme [87, 273]. Η φωσφορυλίωση της Bik προάγει το

αποπτωτικό σήμα με μηχανισμό ανεξάρτητο με την συγγενεία της προς τις πρωτεΐνες της ομάδας των Bcl-2-like [87].

Η πρωτεΐνη **Bid** ενεργοποιείται μετά από πρωτεόλυση. Σε κύτταρα τύπου II η μεταγωγή αποπτωτικού σήματος μέσω του εξωγενούς μονοπατιού, οδηγεί σε ενεργοποίηση της κασπάσης 8, η οποία διασπά την κυτταροπλασματική ανενεργό Bid σε ενεργό tBid. Η τελευταία μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια (**Εικ. 5**) [87, 274, 275]. Η tBid παρουσιάζει αυξημένη συγγενεία, τόσο προς τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες της ομάδας Bcl-2-like, όσο και προς τις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες της ομάδας Bax-like [87, 249, 276]. Έτσι, η tBid φαίνεται να προάγει την απόπτωση ενεργοποιώντας την Bax και την Bak, και απενεργοποιώντας τις πρωτεΐνες της ομάδας Bcl-2-like [79, 277]. Παρουσία των πρωτεϊνών Bax ή Bak, η tBid πυροδοτεί άμεση απελευθέρωση του κυτοχρώματος c [79, 278]. Η tBid ίσως αυξάνει τη διαπερατότητα της μεμβράνης των μιτοχονδρίων απελευθερώνοντας τις πρωτεΐνες της ομάδας Bax-like από αυτές της ομάδας Bcl-2-like και επιπλέον ίσως επάγει τον ολιγομερισμό και την εισαγωγή των ολιγομερών της Bax ή της Bak στην OMM. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η διάσπαση της Bid από την κασπάση 8 καθυστερεί μετά από επεξεργασία με κινάση καζεΐνης I ή II, οι οποίες την φωσφορυλιώνουν. Οπότε, θεωρείται ότι της επεξεργασίας από την κασπάση 8 προηγείται η ενεργοποίηση μίας φωσφατάσης που αποφωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη Bid. Πιθανή φωσφατάση είναι η φωσφατάση σερίνης PP2A [87, 279, 280].

Οι **BH-3-only** πρωτεΐνες διατηρούνται σε ανενεργό κατάσταση μέσω απομόνωσής τους σε μακρομοριακές δομές, όπως ο κυτταροσκελετός. Αυτό παρατηρείται στις πρωτεΐνες Bim και Bmf [79, 281, 282]. Η **Bim** είναι απαραίτητη για την ανίχνευση αποπτωτικών σημάτων κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, και γονότυποι Bim<sup>-/-</sup> ή Bim<sup>+/-</sup> έχουν συσχετιστεί με νεογνικό θάνατο [87, 283]. Η Bim παράγεται σε τρεις μορφές, ως Bim(S) που είναι ενεργός και ως Bim(L) και Bim(EL) που σε φυσιολογικά κύτταρα παράγονται σε ανενεργό μορφή [87, 284]. Οι δύο τελευταίες απομονώνονται στη δομή DLC1 του συμπλόκου μηχανισμού δυνείνης των μικροσωληνίσκων (Dynein Light Chain LC8). Μετά από αποπτωτικά ερεθίσματα οι Bim(L) και Bim(EL) απελευθερώνονται από τους μικροσωληνίσκους και συνδέονται σε πρωτεΐνες της ομάδας των Bcl-2-like [87, 281].

Η **Bmf** είναι μία πρωτεΐνη της ομάδας των BH-3-only της οποίας η ενεργοποίηση επίσης αποτρέπεται μέσω απομόνωσης της σε ενδοκυττάρειες δομές

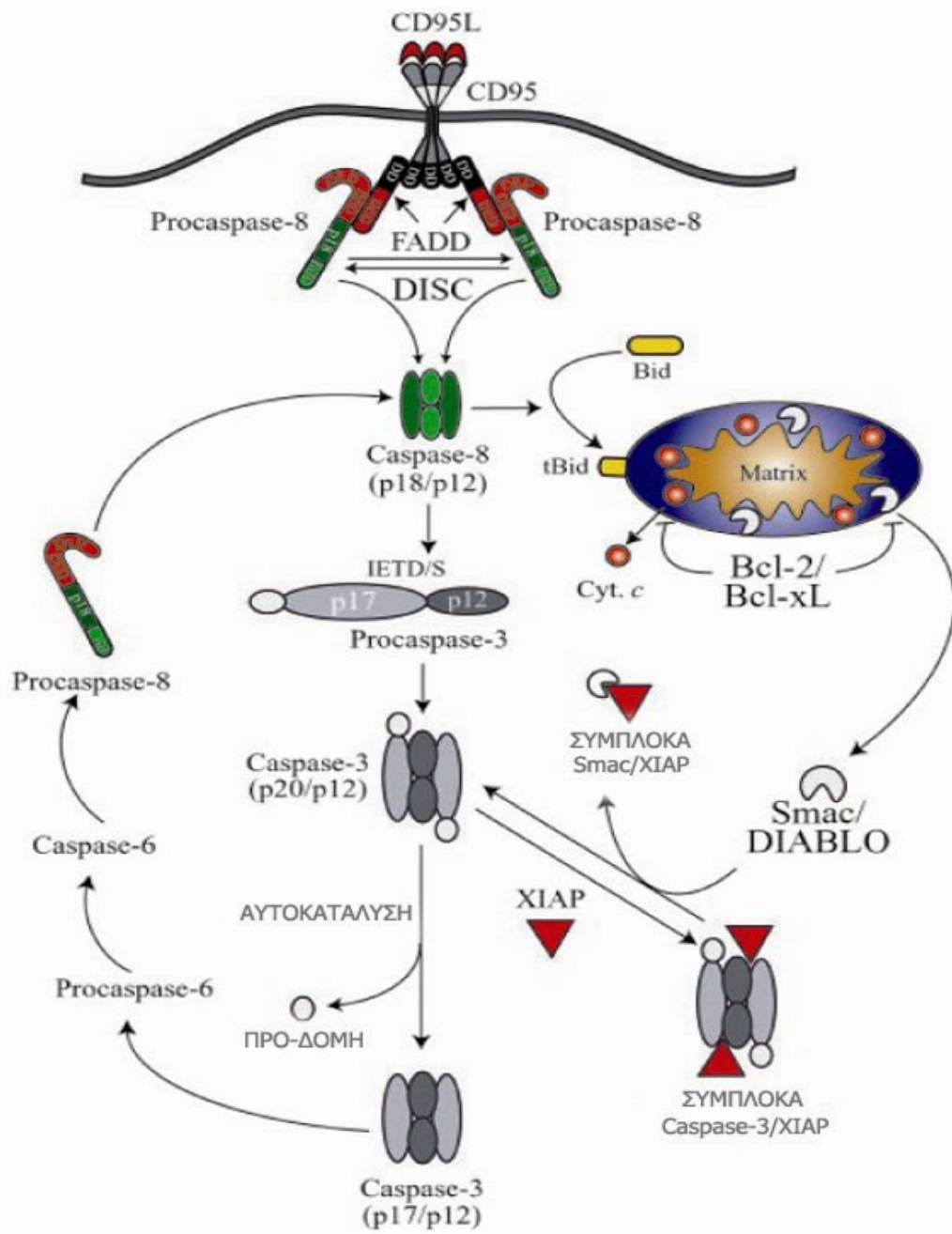


από όπου μπορεί να ανιχνεύει αποπτωτικά σήματα. Η πρωτεΐνη αυτή, συνδέεται στη δομή DLC2 (Dynein Light Chain) του συμπλόκου μηχανισμού της μυοσίνης V που εδράζεται στον κυτταροσκελετό της ακτίνης. Η απελευθέρωσή της και η επακόλουθη αλληλεπίδρασή της με τις πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-X1, πυροδοτείται από την απόσπαση του κυττάρου από το εξωκυττάριο στρώμα (anoikis) [87, 282].

Η πρωτεΐνη Bim και ίσως και η Bmf, δεν ρυθμίζονται μόνο μέσω αλλαγών της ενδοκυττάριας εντόπισής τους, αλλά και μέσω μεταγραφικής επαγωγής τους [87]. Για την Bim υπάρχουν ευρήματα που υποστηρίζουν ότι τουλάχιστον σε συγκεκριμένους πληθυσμούς νευρωνικών κυττάρων επάγεται από την κινάση Jun (JNK) [106, 285].

Η πρωτεΐνη **Hrk/DP5** ενεργοποιείται μεταγραφικά από το μονοπάτι JNK [87, 106, 285]. Όσον αφορά τις υπόλοιπες πρωτεΐνες της ομάδας των BH-3-only δεν υπάρχουν ευρήματα για τους μηχανισμούς ελέγχου και ενεργοποίησής τους [87].

Δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί εάν οι ενεργοποιημένες πρωτεΐνες της ομάδας των BH-3-only δρουν μέσω των πρωτεϊνών της ομάδας των Bcl-2-like ή μέσω των πρωτεϊνών της ομάδας των Bax-like. Θεωρητικά, όταν ενεργοποιηθεί κάποια πρωτεΐνη της ομάδας των BH-3-only μπορεί να δράσει μέσω πρωτεϊνών και των δύο ομάδων που προαναφέρθηκαν, εφόσον οι πρωτεΐνες και των δύο αυτών ομάδων διαθέτουν υδρόφοβο σχηματισμό στον οποίο μπορεί να συνδεθεί περιοχή BH-3. Ωστόσο, τα διαθέσιμα δεδομένα δεν επαρκούν για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων [87]. Υπάρχουν ευρήματα που δείχνουν ότι η Bim δρα μέσω της Bcl-2 χωρίς να απαιτείται η συνύπαρξη της Bax ή Bak και ευρήματα που δείχνουν ότι η Bim παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια με τις πρωτεΐνες της ομάδας των Bcl-2-like από ότι με αυτές των Bax-like, με αποτέλεσμα ακόμη και μικρά ποσά της Bim να απελευθερώνουν πρωτεΐνες της ομάδας των Bax-like από τις πρωτεΐνες της ομάδας των Bcl-2-like και να παίρνουν τη θέση τους [87, 283, 286-288]. Επιπλέον, υπάρχουν ευρήματα που δείχνουν ότι οι πρωτεΐνες της ομάδας των BH-3-only αλληλεπιδρούν άμεσα με πρωτεΐνες της ομάδας των Bax-like συμβάλλοντας στη μετατόπιση των τελευταίων, σε αλλαγές στην τριτοταγή δομή τους, ολιγομερισμό τους και εισαγωγή τους στην OMM [87, 283, 289, 290]. Σημαντικά είναι και τα ευρήματα που δείχνουν ότι οι πρωτεΐνες Bax και Bak είναι απολύτως απαραίτητες στην απόπτωση, ενώ διάφορες πρωτεΐνες της ομάδας των BH-3-only όπως η Bim, η Bad και η Bid αδυνατούν να επάγουν την απόπτωση όταν εκφράζονται σε κύτταρα που δεν εκφράζουν τις Bax και Bak (Bax-/-/Bak-/-) [79, 87, 249, 290, 291].



**Εικόνα 6.** Εξωγενής οδός απόπτωσης. Συμβολή της πρωτεΐνης Bid στην πρόοδο της οδού σε κύτταρα τύπου II, και επίδραση της XIAP και της αναστολής αυτής από την Smac/DIABLO [292]

## 5. Διαταραχές της απόπτωσης στο κλασσικό λέμφωμα Hodgkin

Τα νεοπλασματικά κύτταρα του κλασσικού λεμφώματος Hodgkin χαρακτηρίζονται από αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και ελαττωμένη απόπτωση [4]. Ενδεικτικά είναι τα ευρήματα της υπερέκφρασης διάφορων πρωτεϊνών που ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση όπως, κυκλίνης E, CDK2, CDK6, STAT3, Hdm2, Bcl-2, Bcl-X1, NF-kB και σαρβιβίνης στο cHL [4, 34]. Επιπρόσθετα, μελέτες έδειξαν ότι οι EBV-θετικές περιπτώσεις του cHL παρουσιάζουν διαφορετικό πρότυπο έκφρασης πρωτεϊνών που ρυθμίζουν τα δύο αυτά κυτταρικά φαινόμενα από αυτό των EBV-αρνητικών περιπτώσεων, γεγονός που επιβεβαιώνει τη συμβολή του ιού στην παθογένεση του cHL [4].

Σχετικά με την ρύθμιση της απόπτωσης, έχει ήδη αναφερθεί ότι αυτή επάγεται από την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bax και τον σχηματισμό ομοδιμερών Bax/Bax. Οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-X1 αποτρέπουν τη συσσώρευση ελεύθερων μορίων Bax και τον σχηματισμό ομοδιμερών τους, μέσω του σχηματισμού ετεροδιμερών Bcl-X1/Bax ή Bcl-2/Bax [20, 293]. Επομένως, η αναλογία μορίων Bcl-2 προς Bax και Bcl-X1 προς Bax μπορεί να καθορίσει κατά πόσον ένα κύτταρο θα επιβιώσει ή θα αποπέσει μετά την λήψη ενός αποπτωτικού ερεθίσματος [16, 20, 293, 294].

Μελέτες έδειξαν ότι τα κύτταρα HRS του cHL εκφράζουν τις πρωτεΐνη **Bcl-2**, Bcl-X1 και Bax [4, 14, 16, 20, 176, 295-299]. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των πρωτεϊνών πιθανώς διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επιβίωση των HRS [20]. Αναφορικά με την πρωτεΐνη Bcl-2, ο υποκείμενος μηχανισμός την υπερέκφρασης της στα κύτταρα HRS του cHL δεν είναι γνωστός. Υπάρχουν αντικρουόμενα ευρήματα σχετικά με ενδεχόμενη εμπλοκή της μετάθεσης t(14;18) στο cHL, πάντως οι περισσότερες μελέτες υποστηρίζουν ότι δεν ανιχνεύεται η μετάθεση αυτή στα κύτταρα HRS [17, 20, 300-303]. Υπερέκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 περιγράφεται συχνότερα στον υπότυπο της οξώδους σκλήρυνσης του cHL [17]. Υπάρχουν μελέτες στις οποίες η έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 συσχετίστηκε με την παρουσία του EBV στα νεοπλασματικά κύτταρα, καθώς είχε βρεθεί ότι η πρωτεΐνη LMP-1 επάγει την έκφραση της Bcl-2 *in vitro*. Όμως τα αποτελέσματα *in vivo* μελετών δεν επιβεβαίωσαν τα *in vitro* ευρήματα. Αντίθετα, ανιχνεύθηκε αντίστροφη συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 και στην παρουσία του ιού στα

νεοπλασματικά κύτταρα και υποστηρίχθηκε ότι άλλες αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες εμπλέκονται στην επιβίωση των μολυσμένων κυττάρων HRS και επιπλέον ότι η έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 πιθανώς να επάγεται από άλλους μηχανισμούς, όπως από την ογκοπρωτεΐνη c-myc [20, 300, 304, 305].

Η έκφραση της πρωτεΐνης **Bcl-XI** έχει συσχετιστεί αρνητικά με την απόπτωση των κυττάρων HRS [12, 20], και έχει υποστηριχτεί ότι ενδεχομένως η πρωτεΐνη αυτή να έχει σημαντικό ρόλο στην αναστολή της απόπτωσης των κυττάρων HRS και σημαντικότερο ρόλο στη συσσώρευση νεοπλασματικών κυττάρων από ότι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός. Επιπρόσθετα, μετά από διπλή ανοσοϊστοχημική χρώση για τις πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-XI βρέθηκε ότι τα κύτταρα HRS σε ποσοστό 50% εκφράζουν ταυτόχρονα τις πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-XI, το ποσοστό των κυττάρων που εκφράζει την Bcl-XI είναι μεγαλύτερο από αυτό που εκφράζει την Bcl-2 και η Bcl-XI εκφράζεται εντονότερα συγκριτικά με την Bcl-2. Βάσει των ευρημάτων αυτών υποστηρίχθηκε ότι επί ταυτόχρονης έκφρασης των πρωτεϊνών Bcl-2 και Bcl-XI, αυτές δρουν συνεργικά ή ενισχυτικά η μία προς την άλλη, ενώ επί έκφρασης μόνο της Bcl-XI, αυτή υποκαθιστά τη δράση της Bcl-2. Η υψηλότερη έκφραση της Bcl-XI στα κύτταρα HRS έναντι της πρωτεΐνης Bcl-2 υποδηλώνει ότι έχει σημαντικότερο ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης στο cHL. Σχετικά με την συσχέτιση της έκφρασης της πρωτεΐνης Bcl-XI με την παρουσία του ιού EBV στα νεοπλασματικά κύτταρα, δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές στην έκφρασή της μεταξύ EBV-αρνητικών και EBV-θετικών περιπτώσεων cHL [20].

Η πρωτεΐνη **Bax** εκφράζεται σε υψηλό ποσοστό κυττάρων HRS αλλά δεν έχει περιγραφεί συσχέτιση της έκφρασής της με τον δείκτη απόπτωσης [16, 20, 298]. Σημαντικό ποσοστό περιπτώσεων cHL, στις οποίες τα κύτταρα HRS εκφράζουν την πρωτεΐνη Bax, επιπλέον εκφράζουν και τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-XI ταυτόχρονα ή ξεχωριστά. Αυτό το εύρημα υποδεικνύει ότι πιθανόν αυτές οι πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με αποτέλεσμα να εξουδετερώνεται ή να τροποποιείται η προ-αποπτωτική δράση της Bax, επιτρέποντας στα κύτταρα HRS να επιβιώσουν [20]. Μελέτη σε κυτταρικές σειρές, έδειξε ότι στα κύτταρα HRS η πρωτεΐνη Bax παραμένει ανενεργής μετά από επεξεργασία με αποπτωτικό παράγοντα (σταυροσπορίνη) και επομένως δεν απελευθερώνεται κυττόχρωμα c και δεν ανιχνεύεται ενεργοποιημένη κασπάση-3. Το εύρημα αυτό ανευρέθηκε με την χρήση αντισώματος που ανιχνεύει την πρωτεΐνη Bax στη μορφή που λαμβάνει μετά τις

αλλαγές της τριτοταγούς δομή της λόγω ενεργοποίησής της αλλά όχι την αρχική μορφή της πρωτεΐνης που είναι ανενεργής. Έτσι, παρέχεται μία εικόνα της κατάστασης στην οποία βρίσκεται η Bax, καθώς η ανίχνευση αυξημένων ποσών έκφρασης της με κοινά αντισώματα δεν οδηγεί σε ασφαλή συμπεράσματα όσον αφορά την δράση της [306]. Σε ορισμένες μελέτες υποστηρίζεται ότι οι περιπτώσεις cHL οι οποίες εκφράζουν την πρωτεΐνη Bax, παρουσιάζουν υψηλότερο ποσοστό έκφρασης της πρωτεΐνης Bcl-X1 από ότι της Bcl-2. Άλλες μελέτες αναφέρουν ταυτόχρονη ανίχνευση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-X1 και Mcl-1, με την έκφραση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax [20].

Η εξέλιξη ενός αποπτωτικού προγράμματος σε φυσιολογικά κύτταρα που έχουν λάβει αποπτωτικό ερέθισμα εξαρτάται μεταξύ άλλων και από την λειτουργική κατάσταση των εκτελεστικών κασπασών, και ειδικότερα της **κασπάσης-3**. Ενεργοποιημένη κασπάση 3 ανιχνεύεται στον πυρήνα των κυττάρων HRS σε σημαντικό ποσοστό περιπτώσεων. Το ποσοστό των θετικών κυττάρων τα οποία εμφανίζουν μορφολογικά χαρακτηριστικά απόπτωσης κυμαίνεται από 0% έως 13%, με μέση τιμή περίπου 4%. Επιπλέον, ανιχνεύονται ελάχιστα κύτταρα HRS χωρίς μορφολογικά χαρακτηριστικά απόπτωσης τα οποία εκφράζουν την ενεργοποιημένη κασπάση-3 στο κυτταρόπλασμα και/ή στον πυρήνα τους [307]. Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί ότι στην πλειοψηφία των περιπτώσεων που ανιχνεύεται ενεργοποιημένη κασπάση-3 ανιχνεύεται και έκφραση της PARP-1/p89, γεγονός που δείχνει ότι η PARP-1 διασπάται από την κασπάση-3, και επομένως η τελευταία είναι λειτουργική. Περιγράφεται ότι στις περιπτώσεις που δεν ανιχνεύονται θετικά για την ενεργοποιημένη κασπάση-3 κύτταρα HRS, δεν ανιχνεύονται ούτε προ-κασπάση-3 θετικά κύτταρα, ενώ ισχύει και το αντίστροφο και υποστηρίζεται ότι σε αυτές τις περιπτώσεις, η απουσία ενεργοποιημένης κασπάσης-3 πιθανώς να οφείλεται σε διαταραχές στη μεταγραφική ρύθμιση της προ-κασπάσης-3 ή σε διαταραχές του ενός ή και των δύο γονιδίων της. Εναλλακτικά, οι διαταραχές στην ενεργοποίηση της κασπάσης-3 οφείλονται σε διαταραχές στην ενεργοποίηση του εξωγενούς ή του ενδογενούς μονοπατιού της απόπτωσης [307, 308]. Η παρουσία αυξημένου αριθμού (>5%) θετικών για την ενεργοποιημένη κασπάση-3 κυττάρων HRS έχει συσχετιστεί με ευνοϊκή εξέλιξη της νόσου [307].

Τα κύτταρα HRS του cHL παρουσιάζουν χαρακτηριστικά υψηλό επίπεδο έκφραση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης **XIAP** η οποία αναστέλλει την δράση

κασπασών. Περιγράφονται διαταραχές της ενεργοποίησης της κασπάσης-9 μετά από επεξεργασία κυττάρων HRS με κυττόχρωμα c, κασπάση-8 ή σερινοπρωτεάση B (granzyme B), ενώ η λειτουργική εξουδετέρωση της XIAP από την Smac επαναφέρει την ικανότητα απάντησης των νεοπλασματικών κυττάρων σε αποπτωτικά ερεθίσματα [117]. Η έκφραση της XIAP επάγεται από τον μεταγραφικό παράγοντα *NF-κB* [117, 308], ο οποίος είναι ιδιοσυστασιακά ενεργοποιημένος στα κύτταρα HRS του cHL [117, 309]. Επομένως η ιδιοσυστασιακή ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα *NF-κB* στα κύτταρα HRS επάγει την έκφραση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης XIAP με επακόλουθο αντίσταση των κυττάρων HRS σε αποπτωτικά ερεθίσματα [117].

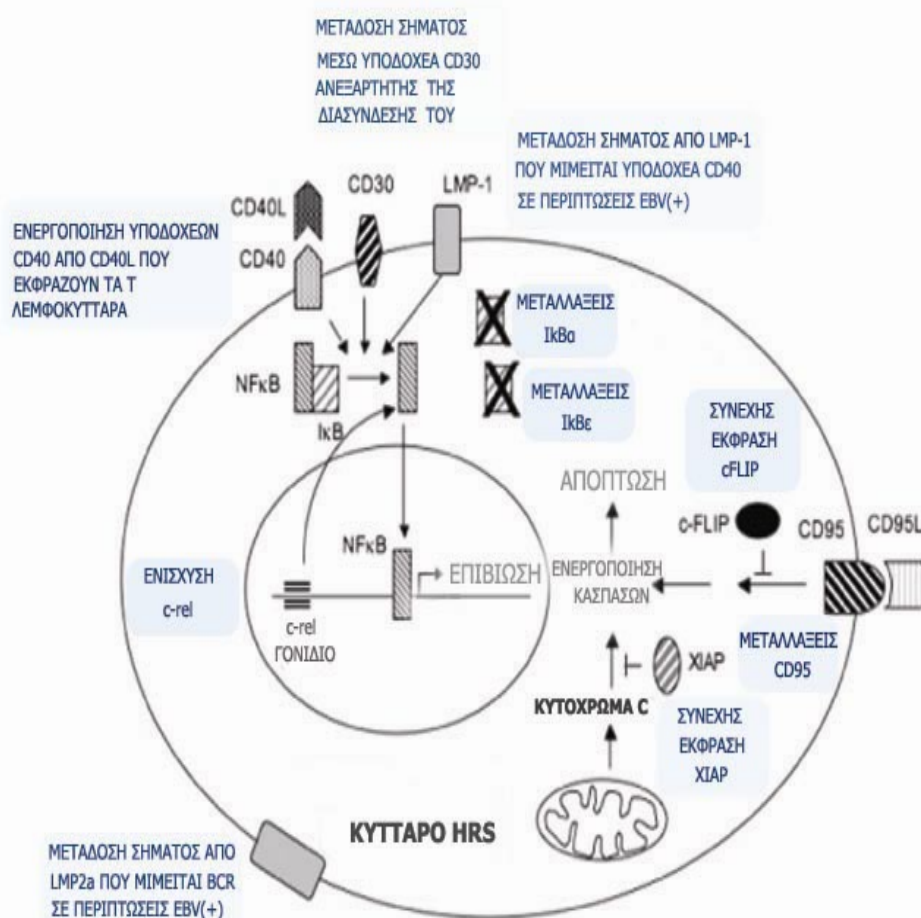
Επιπλέον, περιγράφεται υπερέκφραση της **σαρβιβίνης** στα HRS. Ίσως, η υπερέκφραση της πρωτεΐνης αυτής να αποτελεί ένα πρόσθετο μηχανισμό διαφυγής των κυττάρων HRS από την απόπτωση στο σημείο ελέγχου G2/M [4].

Συνολικά, η ενεργοποίηση των πρωτεϊνών Bcl-2 και Bcl-Xl και του μεταγραφικού παράγοντα *NF-κB*, όπως αναδεικνύεται από την ανίχνευση της υπερέκφρασής τους στα κύτταρα HRS, ίσως να αποτελούν τους σημαντικότερους αντι-αποπτωτικούς παράγοντες που εμπλέκονται στην παθογένεση του cHL. Η εμπλοκή του *NF-κB* στην παθογένεση του cHL συνίσταται στην ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο και στην απόπτωση, όπως των p21, p16, p27, Rb, CDK1, CDK2, SKP2, STAT1, STAT3, κυκλίνες E και D3 και σαρβιβίνης. Η έκφραση της Bcl-Xl, παρότι και αυτή αποτελεί μεταγραφικό στόχο του *NF-κB*, δεν βρέθηκε να σχετίζεται με την έκφρασή του [4].

Όσον αφορά τις θετικές στον ιό EBV περιπτώσεις cHL, αυτές χαρακτηρίζονται από υπερέκφραση των πρωτεϊνών STAT1 και STAT3 και από χαμηλή έκφραση των πρωτεϊνών p27, Hdm-2, p53, CDK6, Bcl-Xl και κυκλίνη E. Θεωρείται ότι οι πρωτεΐνες STAT1 και STAT3 έχουν καθοριστικό ρόλο στις EBV-θετικές περιπτώσεις, εφόσον η έκφρασή τους από τα κύτταρα HRS συσχετίζεται με υψηλά επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών CDK1, CDK2, CDK6, Rb, *NF-κB* και Bax, καθώς και με υψηλό δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού [4]). Δεν βρέθηκε άμεση συσχέτιση ανάμεσα στην παρουσία του EBV και στην έκφραση των πρωτεϊνών Bcl-Xl και Bax, ενώ περιγράφεται αντίστροφη συσχέτιση ανάμεσα στην παρουσία του ιού και την έκφραση της Bcl-2 [20].

Συνοψίζοντας, στο cHL έχουν περιγραφεί διαταραχές στην έκφραση διαφόρων πρωτεϊνών που ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση, όπως

p53, Rb, Hdm2, p21, κυκλίνη E, κυκλίνη D2, κυκλίνη D3, κυκλίνη A, κυκλίνη B1, CDK 1, CDK 2, CDK 6, c-FLIP, bcl-X1, c-IAP2, XIAP, AP1, STATs και NF-kB [3-21, 31, 307]. Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-kB προάγει την έκφραση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών bcl-X1, c-IAP2, TRAF1 και c-FLIP, και συνεργάζεται με τον ενεργοποιημένο μεταγραφικό παράγοντα AP1 ενεργοποιώντας την έκφραση της κυκλίνης D2 και του πρωτο-ογκογονιδίου c-met [3, 6-10].



**Εικόνα 7.** Γεγονότα που λαμβάνουν χώρα κατά την νεοπλασματική εκτροπή των B λεμφοκυττάρων του βλαστικού κέντρου σε κύτταρα HRS [36]

## 6. Σκοπός της μελέτης

Τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών έδειξαν ότι τα κύτταρα HRS του κλασσικού λεμφώματος Hodgkin (cHL) εκφράζουν διάφορες πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 και παρουσιάζουν αναστολή της απόπτωσης [11-20, 307]. Εντούτοις, το ανοσοϊστοχημικό πρότυπο έκφρασης των πρωτεϊνών bad, bid και bim, καθώς και η συσχέτιση της έκφρασής τους με την έκφραση άλλων πρωτεϊνών της οικογένειας bcl-2, την ενεργοποιημένη κασπάση-3 και τον δείκτη απόπτωσης TUNEL δεν είχε αναλυθεί σε περιπτώσεις cHL.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η ανοσοϊστοχημική έκφραση πρωτεϊνών, που εμπλέκονται στη ρύθμιση του ενδογενούς μονοπατιού της απόπτωσης. Μελετήθηκαν πρωτεΐνες της οικογένειας των πρωτεϊνών bcl-2 και συγκεκριμένα οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες bcl-2, bcl-X1 και mcl-1 και οι προ-αποπτωτικές bax, bak, bad, bid και bim.

Ακόμη, μελετήθηκε ο δείκτης απόπτωσης των κυττάρων HRS με την μέθοδο TUNEL, και η ανοσοϊστοχημική έκφραση της ενεργοποιημένης κασπάσης 3, πρωτεάσης που εξειδικευμένα αναγνωρίζει αλληλουχίες κυστεΐνης-ασπαρτικού και της οποίας η ενεργοποίηση οδηγεί σε απόπτωση.

Επιπλέον, αναλύθηκαν οι ενδεχόμενες συσχετίσεις της έκφρασης των πρωτεϊνών της οικογένειας bcl-2 μεταξύ τους, με τον δείκτη απόπτωσης και τους υπότυπους του cHL.

Τέλος, στην παρούσα μελέτη αναλύθηκε η ύπαρξη πιθανών συσχετίσεων μεταξύ των προτύπων συνδυασμένης έκφρασης των προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών και η συσχέτισή τους με τον δείκτη απόπτωσης TUNEL, την ενεργοποιημένη κασπάση 3, και τους υπότυπους του cHL.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών bcl-2, bcl-X1, mcl-1, bax, bak, bad, bid, bim και της ενεργοποιημένης κασπάσης 3, καθώς και του δείκτη TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated in situ labeling) στα κύτταρα HRS του cHL.



## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1. Υλικό και μέθοδοι

Το υλικό απετέλεσαν 114 περιπτώσεις cHL, οι οποίες συγκεντρώθηκαν από τα αρχεία των Εργαστηρίων Παθολογικής Ανατομίας του Γενικού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, και των Νοσοκομείων «Αγία Σοφία» και «Ευαγγελισμός» Αθηνών. Η επιλογή των περιστατικών έγινε με την προϋπόθεση ότι υπήρχε επαρκές υλικό εγκλεισμένο σε κύβους παραφίνης, ώστε να πραγματοποιηθεί πολυπαραμετρική ανοσοϊστοχημική ανάλυση. Οι 80/114 περιπτώσεις cHL ταξινομήθηκαν στον υπότυπο της οξώδους σκλήρυνσης, και οι 34/114 στον υπότυπο της μικτής κυτταροβρίθειας.

Από τους κύβους παραφίνης κάθε περίπτωσης ελήφθησαν ιστολογικές τομές πάχους 3-5  $\mu\text{m}$ , και πραγματοποιήθηκαν ανοσοϊστοχημικές χρώσεις με τη μέθοδο της στρεπταβιδίνης-αβιδίνης- βιοτίνης (LSAB Kit, Dako SA, Glostrup, Denmark). Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη, η πηγή και η αραιώσή τους, παρατίθενται στον **Πίνακα 1**.

**Πίνακας 1.** Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη.

Αντίσωμα	Προέλευση	Κλώνος	Αραιώση
<b>bcl-2</b>	Dako SA	124	1:20
<b>bcl-Xl</b>	Zymed	2H11	1:25
<b>bad</b>	Santa Cruz Biotechnology	sc-8044	1:50
<b>active caspase3</b>	Pharmigen	C92-605	1:500
<b>bax</b>	Dako SA	polyclonal, code A3533	1:50
<b>bak</b>	Dako SA	polyclonal, code A3538	1:50
<b>bid</b>	Santa Cruz Biotechnology	polyclonal, code sc-11423	1:50
<b>mcl-1</b>	Dako SA	polyclonal	1:100
<b>bim</b>	Neomarkers	polyclonal	1:100

## 2. Περιγραφή μεθόδων

### 2.1 Ανοσοϊστοχημεία

Χρησιμοποιήθηκε η κλασσική τεχνική της στρεπταβιδίνης-αβιδίνης-βιοτίνης (LSAB, Labeled StreptAbidin Biotin) η οποία πραγματοποιήθηκε με την χρήση του kit Lab Vision Corporation, UltraVision Large Volume Detection System Anti-Polyvalent, HRP (Ready-To-Use). Σε όλες τις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις συμπεριελήφθησαν θετικοί (φυσιολογικοί λεμφαδένες) και αρνητικοί μάρτυρες (παράλειψη της προσθήκης του πρωτογενούς αντισώματος).

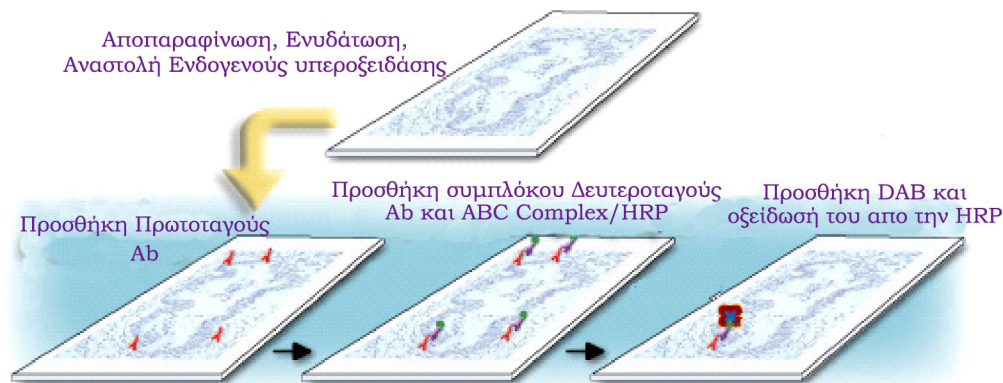
#### Περιγραφή της ανοσοϊστοχημικής μεθόδου (εικ. 8):

■ **Αποπαραφίνωση-ενυδάτωση:** Τα πλακίδια τοποθετήθηκαν σε κλίβανο θερμοκρασίας 60° C για 18 ώρες. Ακολούθησε προθέρμανση διαλύματος ξυλόλης για 30' σε κλίβανο σε θερμοκρασία 60° C. Στη συνέχεια, τα πλακίδια εμβαπτίστηκαν στο διάλυμα ξυλόλης και τοποθετήθηκαν σε κλίβανο σε θερμοκρασία 60° C για 20'. Κατόπιν μεταφέρθηκαν σε διάλυμα ξυλόλης θερμοκρασίας δωματίου για 10'. Ακολούθησε η διαδικασία ενυδάτωσης των ιστολογικών τομών με εμβάπτισή τους για 30' x2 διαδοχικά σε κατιόντα οιοπνεύματα (100%, 96%) και τέλος σε αποσταγμένο νερό.

■ **Αποκάλυψη αντιγόνου:** Πραγματοποιήθηκε έκπλυση των πλακιδίων με νερό βρύσης x3. Ακολούθησε προθέρμανση διαλύματος κιτρικού οξέως 10% (630 ml απεσταγμένο νερό και 70 ml κιτρικό οξύ, Buffer for Antigen Retrieval) σε φούρνο μικροκυμάτων για 3'. Στη συνέχεια, τα πλακίδια εμβαπτίστηκαν στο παραπάνω διάλυμα και εφαρμόστηκαν 2 κύκλοι εντός φούρνου μικροκυμάτων σε ισχύ 300Watt επί 15' για κάθε κύκλο. Κατόπιν το διάλυμα με τα πλακίδια αφέθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 10', και ακολούθησε έκπλυση των πλακιδίων σε απεσταγμένο νερό x3.

■ **Εξουδετέρωση ενδογενούς υπεροξειδάσης:** Στη συνέχεια προετοιμάστηκε διάλυμα εξουδετέρωσης της ενδογενούς υπεροξειδάσης μετά από ανάμιξη 500μl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) με 50 ml μεθανόλη. Τα πλακίδια εμβαπτίστηκαν στο διάλυμα για 30' και τοποθετήθηκαν σε αναδευτήρα (εναλλακτικά, ενστάλαξη 2-3 σταγόνων από το Hydrogen Peroxide Block που παρέχεται έτοιμο στο Kit, και επώαση για 15').

- **Προεπώση:** Ακολούθησε έκπλυση των πλακιδίων με απεσταγμένο νερό x3 και με διάλυμα TBS για 5' (TBS: Tris Buffer Solution, 20g NaCl, 1.5g Tris σε 2.5 lt dH<sub>2</sub>O και pH 7.6). Στη συνέχεια γίνεται ενστάλαξη 2-3 σταγόνων Ultra V Block από το Kit και τα πλακίδια επώστηκαν για 5' σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να αποφευχθεί η μη ειδική χρώση (δέσμευση μη ειδικών αντιγονικών επιτόπων του ιστού).
- **Επώση με το πρωτοταγές αντίσωμα:** Μετά από έκπλυση των πλακιδίων σε TBS για 5', ακολούθησε ενστάλαξη του πρωτοταγούς αντισώματος σε αραιώση που έχει προσδιοριστεί μετά από δοκιμαστικές χρώσεις. Το χρονικό διάστημα επώσης καθορίστηκε από το πρωτόκολλο κάθε αντισώματος και τις δοκιμές που προηγήθηκαν και κυμάνθηκε από ώρες μέχρι ολονύκτια επώση.
- **Επώση με το δευτεροταγές αντίσωμα:** Πραγματοποιήθηκε έκπλυση των πλακιδίων με διάλυμα TBS για 10' και στη συνέχεια επώση με το δευτεροταγές αντίσωμα το οποίο ήταν βιοτινισμένο (Biotinylated Goat Anti-Polyvalent, Envision Kit, έτοιμο προς χρήση) για 30'. Ακολούθησε έκπλυση των πλακιδίων σε TBS για 10'. Στη συνέχεια προστέθηκε το ABC Complex/HRP (στρεπταβιδίνη συνδεδεμένη με το σύμπλοκο αβιδίνη-βιοτίνη-υπεροξειδάση) το οποίο επώστηκε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε έκπλυση σε TBS για 5' x2.
- **Προσθήκη χρωμογόνων:** Για την προετοιμασία του χρωμογόνου αναμίχθηκαν 20μl DAB (χρωμογόνο, 3,3' τετραχλωρική διαμινοβενζιδίνη) σε 1ml από το αντίστοιχο Buffer. Τοποθετήθηκε διάλυμα χρωμογόνου (DAB 0.1% W/V) στις ιστολογικές τομές για 3', διαδικασία κατά την οποία το χρωμογόνο συνδέεται στο σύμπλοκο πρωτοταγούς αντισώματος-δευτεροταγούς αντισώματος-στρεπταβιδίνης και οξειδώνεται από την υπεροξειδάση (HRP) με αποτέλεσμα την χαρακτηριστική έντονη καφετή χρώση.



Εικόνα 8. Ανοσοϊστοχημική χρώση

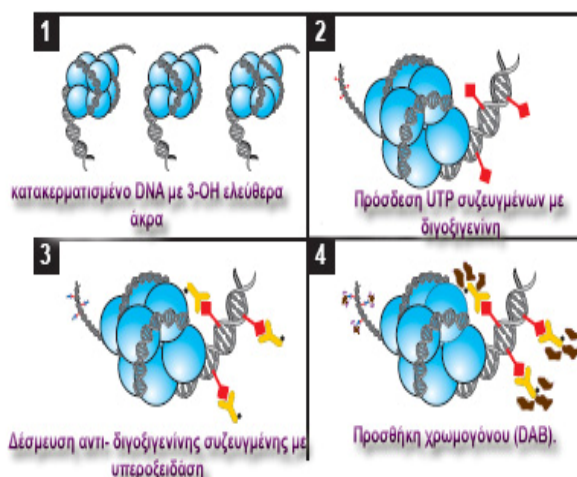
■ Ακολούθησε έκπλυση των πλακιδίων σε απεσταγμένο νερό για 10', και επίχρωσή τους με αιματοξυλίνη 10% (προσθήκη 10ml αιματοξυλίνης 100% σε 90ml αποσταγμένου νερού) για 2'. Τέλος, οι ιστολογικές τομές ξεπλύθηκαν με νερό βρύσης για 1'.

■ **Αφυδάτωση των ιστών:** Τέλος, τα πλακίδια εμβαπτίστηκαν σε ανιόντα οιοπνεύματα (96%, 96%, 100%, 100%) και ξυλόλη, και η διαδικασία ολοκληρώθηκε με την επικάλυψη των ιστολογικών τομών με καλυπτρίδες.

## 2.2. Μέθοδος in situ σήμανσης TUNEL

Η μέθοδος της in situ σήμανσης TUNEL πραγματοποιήθηκε με χρήση του Kit: Aoptage Plus Peroxidase In Situ Aoptosis Detection Kit S7101, Intergen.

Η μέθοδος TUNEL (εικ. 9) στηρίζεται στην ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων σημασμένων με διγοξigenίνη (Dig-dUTP) στο 3'-OH άκρο φραγμάτων DNA με τη δράση του ενζύμου TdT (terminal digoxyl transferase). Συγκεκριμένα, μετά από αποπαραφίνωση και ενυδάτωση, οι ιστολογικές τομές ξεπλύθηκαν με PBS (phosphate buffer solution). Ακολούθησε πέψη του ιστού με πρωτεϊνάση K (20μg/ml, Oncor) σε PBS για 20' σε θερμοκρασία δωματίου με σκοπό τη μερική πέψη των πρωτεϊνών του



**Εικόνα 9.** Σχηματική αναπαράσταση της αρχής της μεθόδου in situ σήμανσης TUNEL

ιστού ώστε τα θραύσματα του DNA του πυρήνα να καταστούν προσιτά στο ένζυμο TdT. Η αναστολή της δραστηριότητας της ενδογενούς υπεροξειδάσης έγινε με επώαση των ιστολογικών τομών σε διάλυμα 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε PBS για 5', ενώ μετά την εφαρμογή ενός διαλύματος εξισορρόπησης, οι τομές επώασθηκαν με διάλυμα που περιείχε το ένζυμο TdT και dUTP-διγοξigenίνη για 1 ώρα στους 37°C (working-strength TdT enzymes).

Η αντίδραση τερματίστηκε μετά από επώαση με προθερμασμένο διάλυμα (working-strength stop/wash buffer) στους 37°C. Ακολούθησε έκπλυση των τομών με PBS για 5'. Για τον εντοπισμό των ενσωματωμένων νουκλεοτιδίων προστέθηκε αντίσωμα έναντι της διγοξigenίνης, το

οποίο ήταν συζευγμένο με υπεροξειδάση. Σαν χρωμογόνο χρησιμοποιήθηκε η 3.3' - τετραχλωρική - διαμινοβενζίδη και ακολούθησε επίχρωση με αιματοξυλίνη. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ιστολογικές τομές στις οποίες είχε παραληφθεί το στάδιο της TdT αντίδρασης. Ο αποπτωτικός δείκτης (AI) ορίστηκε ως το εκατοστιαίο ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων (TUNEL-θετικά κύτταρα και TUNEL-αρνητικά κύτταρα με μορφολογικούς χαρακτήρες απόπτωσης). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε μεγεθυντικός φακός x40 και μετρήθηκαν τα αποπτωτικά κύτταρα σε τουλάχιστον 10 τυχαία επιλεγμένα οπτικά πεδία.

### 2.3. Αξιολόγηση και στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Για την αξιολόγηση των ανοσοθετικών για την κάθε πρωτεΐνη κυττάρων HRS χρησιμοποιήθηκε φακός x40, και οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε τουλάχιστον 10 οπτικά πεδία τα οποία επιλέχθηκαν με την προϋπόθεση ότι περιείχαν ανοσοθετικά κύτταρα HRS. Ο αριθμός των ανοσοθετικών κυττάρων HRS διαιρέθηκε με το συνολικό αριθμό των κυττάρων HRS που μετρήθηκαν, και η έκφραση προσδιορίστηκε ως το επί τις εκατό ποσοστό των θετικών κυττάρων HRS.

Για την περαιτέρω ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν δύο σημεία αποκοπής των θετικών από τις αρνητικές περιπτώσεις, τα οποία ορίστηκαν κατά συνθήκη. Έτσι, προσδιορίστηκαν οι περιπτώσεις με υψηλά επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών, όταν αυτές εξέφραζαν την πρωτεΐνη (1) σε ποσοστό μεγαλύτερο από το 10% των κυττάρων HRS [20] και (2) σε ποσοστό μεγαλύτερο από το 50% των κυττάρων HRS [16].

Σχετικά με την έκφραση της ενεργοποιημένης κασπάσης 3, μία περίπτωση θεωρήθηκε θετική εάν έστω και ένα κύτταρο HRS εξέφραζε την πρωτεΐνη [307]. Η έκφραση προσδιορίστηκε ως το επί της εκατό ποσοστό των θετικών κυττάρων HRS.

Ανάλογη ήταν και η αξιολόγηση του δείκτη απόπτωσης TUNEL. Μία περίπτωση θεωρήθηκε TUNEL-θετική εάν έστω και ένα κύτταρο HRS ήταν TUNEL-θετικό. Ο δείκτης TUNEL προσδιορίστηκε ως το επί τις εκατό ποσοστό των θετικών κυττάρων. Δεν αξιολογήθηκαν περιοχές παρακείμενες νεκρώσεων.

Αρχικά προσδιορίστηκαν οι βασικές στατιστικές παράμετροι των επιπέδων έκφρασης κάθε μίας από τις πρωτεΐνες που μελετήθηκαν, καθώς και οι τιμές του δείκτη TUNEL. 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 ανήκουν) καθώς και η μέγιστη και η ελάχιστη τιμή (maximum - minimum values).

Ακόμη, προσδιορίστηκαν οι θετικές περιπτώσεις για κάθε πρωτεΐνη, χρησιμοποιώντας τα δύο σημεία αποκοπής που προαναφέρθηκαν ώστε να διαχωριστούν οι θετικές από τις αρνητικές περιπτώσεις, στα πλαίσια δύο ανεξάρτητων ελέγχων.

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε ενδεχόμενη συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των αποπτωτικών πρωτεϊνών ανά ζεύγη. Ο έλεγχος αυτός έγινε μελετώντας τις πρωτεΐνες ανά ζεύγη ως συνεχείς μεταβλητές και με την χρήση του στατιστικού συντελεστή συσχέτισης  $r$  κατά Spearman (Spearman's correlation coefficient, αριθμητικό μέτρο ή δείκτης του βαθμού της συσχέτισης μεταξύ δύο συνόλων τιμών). Σε αυτόν τον έλεγχο, όπως και στους επόμενους, προσδιορίστηκε και η στατιστική σημαντικότητα  $p$  των ευρημάτων.

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση της κατάστασης έκφρασης των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών (θετικές έναντι αρνητικών περιπτώσεων, βάσει των 2 ορίων αποκοπής), σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών. Παρομοίως, πραγματοποιήθηκε και ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών της οικογένειας bcl-2 (θετικές έναντι αρνητικών περιπτώσεων) σε σχέση με τους δείκτες απόπτωσης (έκφραση της ενεργοποιημένης κασπάσης-3, και δείκτης TUNEL). Οι αναλύσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του στατιστικού ελέγχου  $U$  των Mann-Whitney (μη παραμετρικός έλεγχος).

Αναζητήθηκε πιθανή συσχέτιση μεταξύ του ιστολογικού υποτύπου του cHL (οζώδης σκλήρυνση έναντι μικτής κυτταροβρίθειας) και της έκφρασης των υπό μελέτη πρωτεϊνών και των δεικτών απόπτωσης. Η ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε με χρήση του ελέγχου  $\chi^2$ .

Επιπλέον, διερευνήθηκαν συγκεκριμένα πρότυπα έκφρασης των υπό μελέτη πρωτεϊνών bcl-2 από κάθε περίπτωση σε συνδυασμό μεταξύ τους. Στόχος της ανάλυσης αυτής ήταν να προσδιοριστούν ομάδες περιπτώσεων με υψηλό ή χαμηλό επίπεδο έκφραση των προ-αποπτωτικών και των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών. Στη συνέχεια εξετάστηκε ενδεχόμενη συσχέτιση μεταξύ των συνδυασμένων προτύπων

έκφρασης των προ-αποπτωτικών και των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας bcl-2. Η ανάλυση έγινε με χρήση του ελέγχου  $\chi^2$ .

Επιπρόσθετα, εξετάστηκε το ενδεχόμενο τα συνδυασμένα πρότυπα έκφρασης όπως ορίστηκαν παραπάνω, να συσχετίζονται με τις τιμές των δεικτών απόπτωσης. Η ανάλυση αυτή έγινε με χρήση του ελέγχου U Mann-Whitney.

Τέλος, αναζητήθηκε ενδεχόμενη συσχέτιση ανάμεσα στα συνδυασμένα πρότυπα έκφρασης των πρωτεϊνών bcl-2 και τους υποτύπους του cHL με χρήση του ελέγχου  $\chi^2$ .



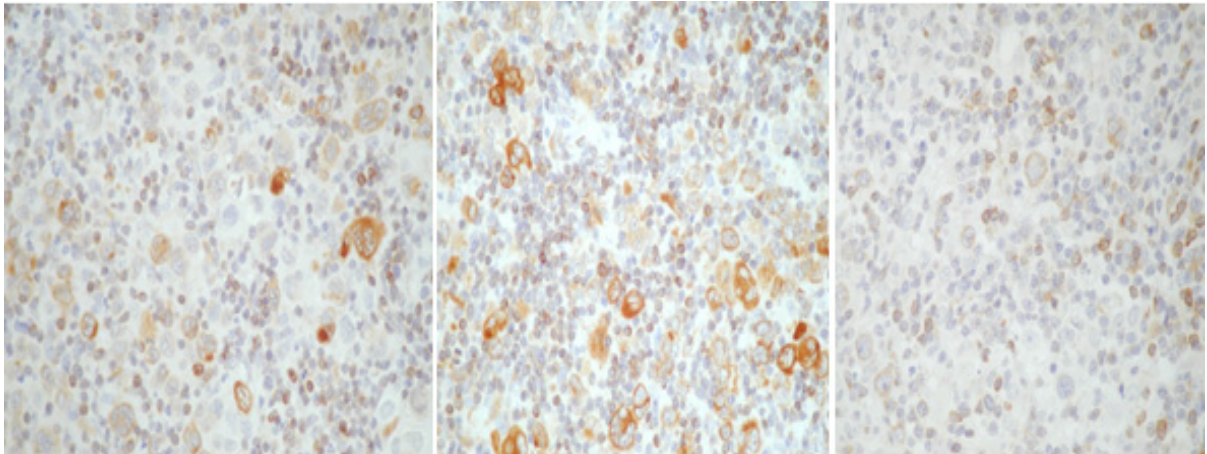
### 3. Αποτελέσματα

#### 3.1. Ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών της οικογένειας **bcl-2**, της ενεργοποιημένης κασπάση 3 και του δείκτη TUNEL

Η ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών **bcl-2**, **bcl-X1**, **mcl-1**, **bax**, **bak**, **bad** και **bid** στα HRS ήταν διάχυτη κυτταροπλασματική. Η έκφραση της πρωτεΐνης **bim** ήταν εστιακή παρα-πυρηνική, ενώ η έκφραση της ενεργοποιημένης κασπάσης 3 ήταν πυρηνική.

Οι βασικές στατιστικές παράμετροι των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών **bcl-2**, **bcl-X1**, **mcl-1**, **bax**, **bak**, **bad**, **bid**, **bim**, και της ενεργοποιημένης κασπάσης 3, καθώς και του δείκτη απόπτωσης TUNEL παρουσιάζονται συνοπτικά στον **Πίνακα 2**.

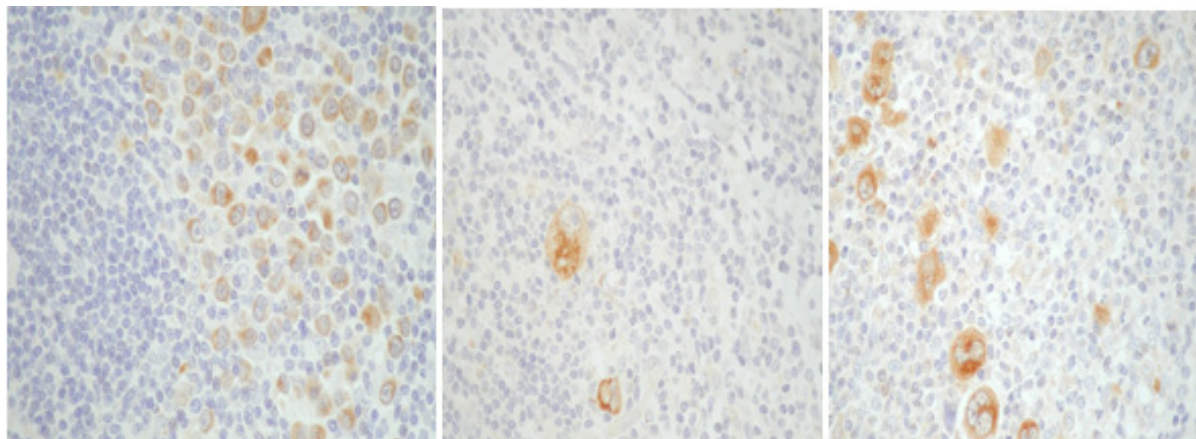
Η έκφραση της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης **bcl-2** εκτιμήθηκε σε 101 από τις 114 περιπτώσεις που μελετήθηκαν (**Εικ. 10**). Η πρωτεΐνη αυτή εκφράστηκε κατά μέσο όρο στο 27.22% των κυττάρων HRS των υπό μελέτη περιπτώσεων. Η τυπική απόκλιση της έκφρασης ήταν 33.69%. Η ελάχιστη τιμή έκφρασης της πρωτεΐνης ήταν 0%, ενώ η μέγιστη τιμή ήταν 95%.



**Εικόνα 10.** Ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης **bcl-2** σε κύτταρα HRS (x40)

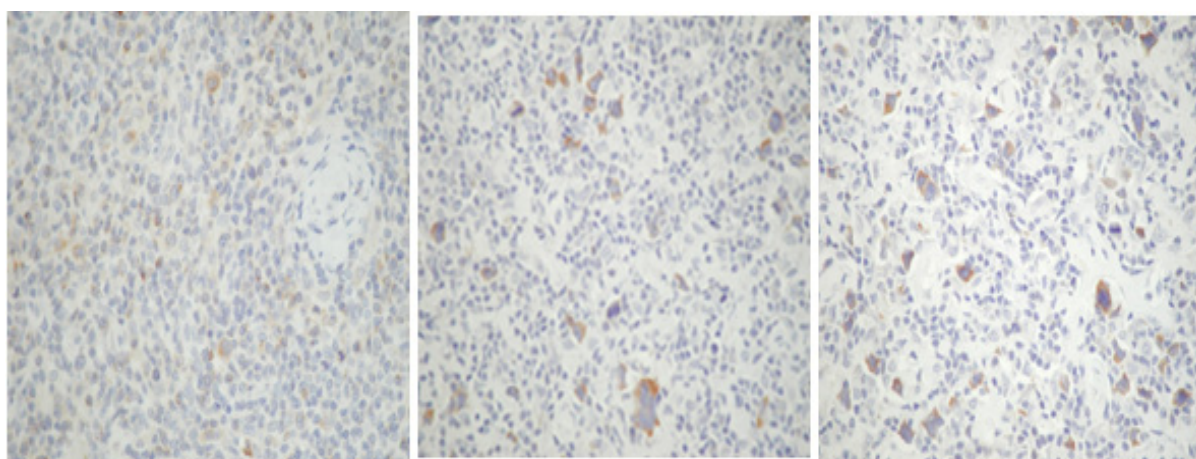
Η έκφραση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης **bcl-X1** εκτιμήθηκε σε 101 από τις 114 περιπτώσεις που μελετήθηκαν (**Εικ. 11**). Η πρωτεΐνη αυτή εκφράστηκε κατά μέσο όρο στο 80.49% των κυττάρων HRS. Η τυπική απόκλιση της έκφρασης υπολογίστηκε σε 18.21%. Η ελάχιστη τιμή έκφρασης της πρωτεΐνης ήταν 0%, ενώ η μέγιστη 95%.





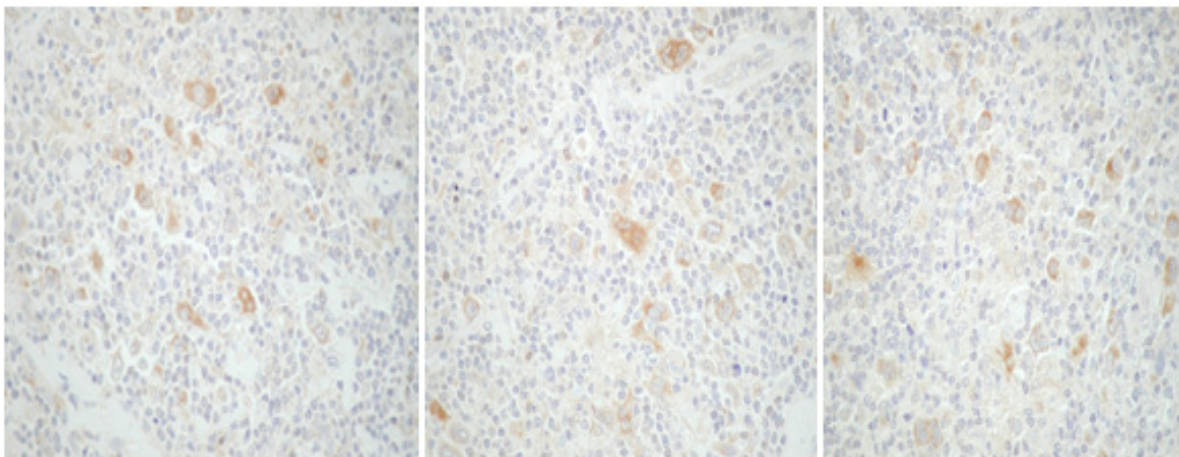
**Εικόνα 11.** Ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης **bcl-XI** σε κύτταρα HRS (x40)

Η έκφραση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης **mcl-1** εκτιμήθηκε σε 97 από τις 114 περιπτώσεις που μελετήθηκαν (**Εικ. 12**). Η πρωτεΐνη εκφράστηκε στο 26.28% των κυττάρων HRS, ενώ η τυπική απόκλιση υπολογίστηκε σε 29.90%. Η ελάχιστη τιμή έκφρασης της πρωτεΐνης ήταν 0% και η μέγιστη ήταν 90%.



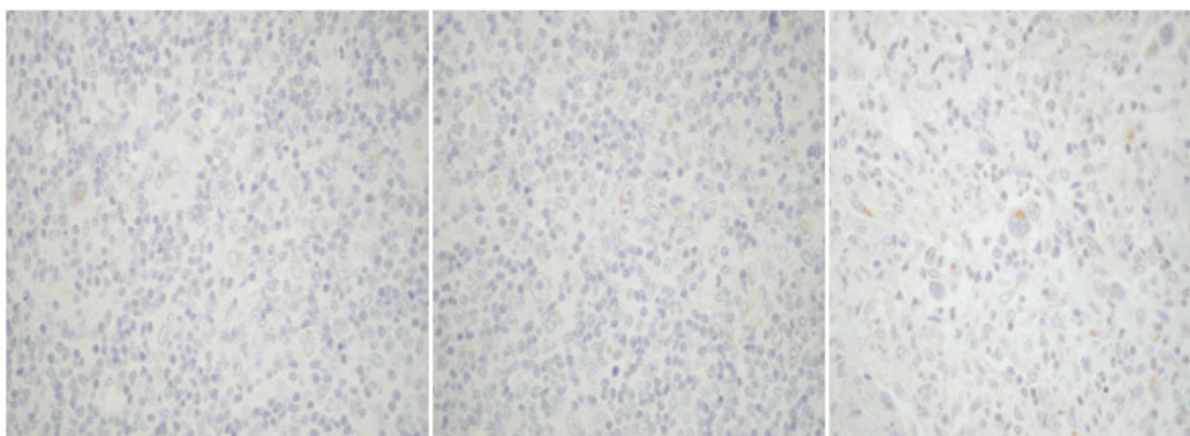
**Εικόνα 12.** Ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης **mcl-1** σε κύτταρα HRS (x40)

Η έκφραση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης **bax** εκτιμήθηκε σε 95 από τις 114 περιπτώσεων που μελετήθηκαν (**Εικ. 13**). Η πρωτεΐνη εκφράστηκε κατά μέσο όρο από το 65.52% των HRS κυττάρων, και η τυπική απόκλιση υπολογίστηκε σε 25.93%. Η ελάχιστη τιμή έκφρασης ήταν 0%, ενώ η μέγιστη ήταν 95%.



**Εικόνα 13.** Ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης **bax** σε κύτταρα HRS (x40)

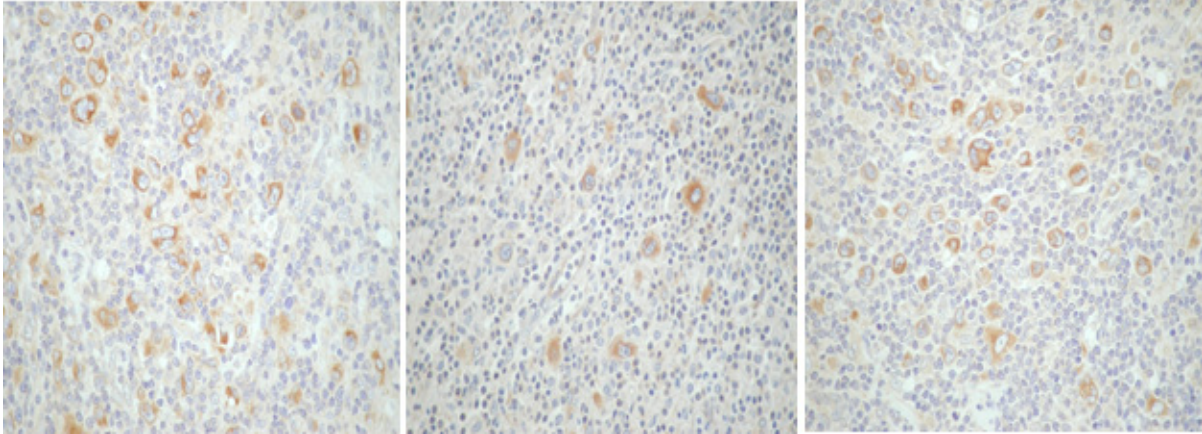
Η έκφραση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης **bak** αξιολογήθηκε σε 102 από τις 114 περιπτώσεις που μελετήθηκαν (**Εικ. 14**). Η πρωτεΐνη βρέθηκε να εκφράζεται κατά μέσο όρο στο 32.05% των κυττάρων HRS των περιπτώσεων που μελετήθηκαν, με τυπική απόκλιση από τον μέσο όρο 36.39%. Το ελάχιστο ποσοστό έκφρασης της πρωτεΐνης bak ήταν 0%, ενώ το μέγιστο 95%.



**Εικόνα 14.** Ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης **bak** σε κύτταρα HRS (x40)

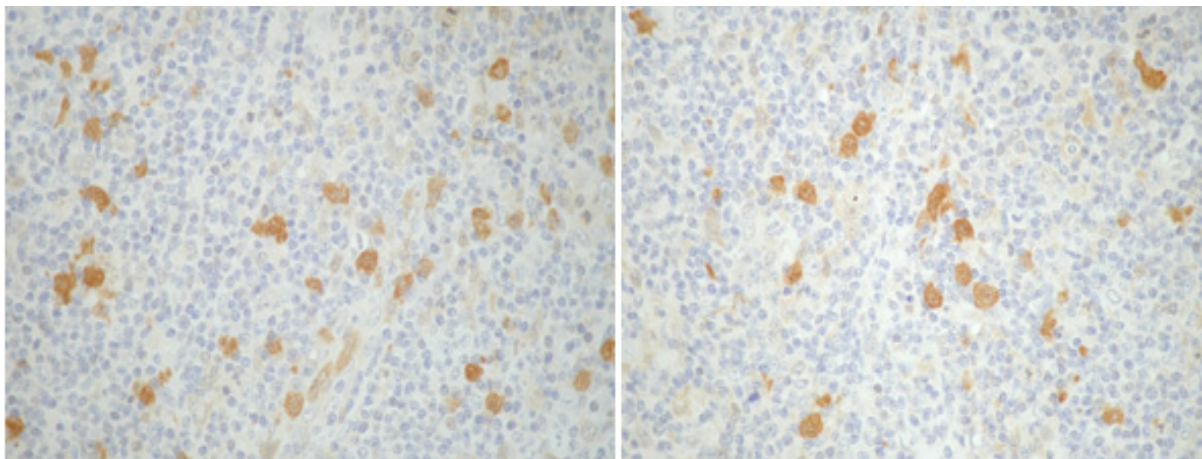
Η έκφραση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης **bad** αξιολογήθηκε σε 94 από τις 114 περιπτώσεις της μελέτης (**Εικ. 15**). Η πρωτεΐνη εκφράστηκε κατά μέσο όρο από το 72.76% των κυττάρων HRS και η τυπική απόκλιση υπολογίστηκε σε 17.76%. Το ελάχιστο ποσοστό έκφρασης της bad από τα κύτταρα HRS ήταν 10%, και το μέγιστο 95%.





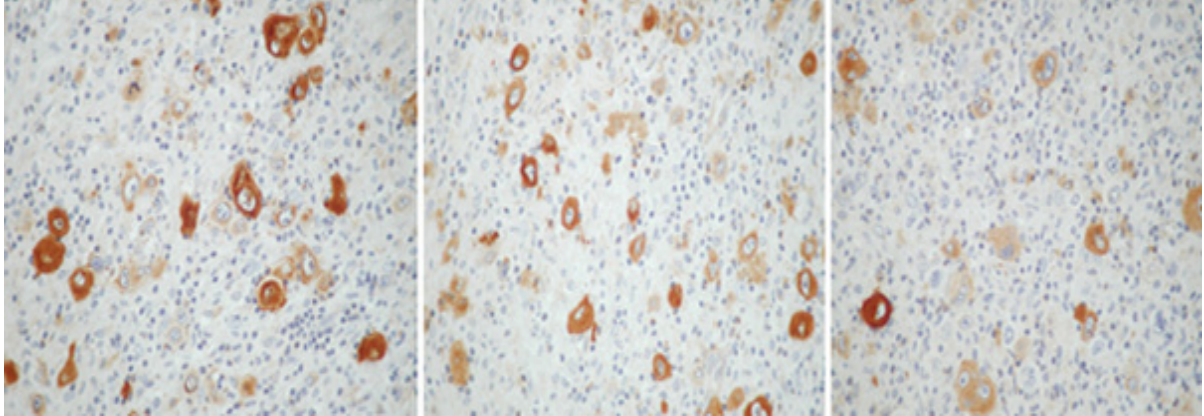
**Εικόνα 15.** Ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης **bid** σε κύτταρα HRS (x40)

Η έκφραση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης **bid** εκτιμήθηκε σε 109 από τις 114 περιπτώσεις της παρούσας μελέτης (**Εικ. 16**). Η πρωτεΐνη αυτή εκφράστηκε κατά μέσο όρο στο 15.22% των κυττάρων, με τυπική απόκλιση 28.47%. Η ελάχιστη τιμή έκφρασης της πρωτεΐνης bid ήταν 0% και η μέγιστη τιμή 95%.



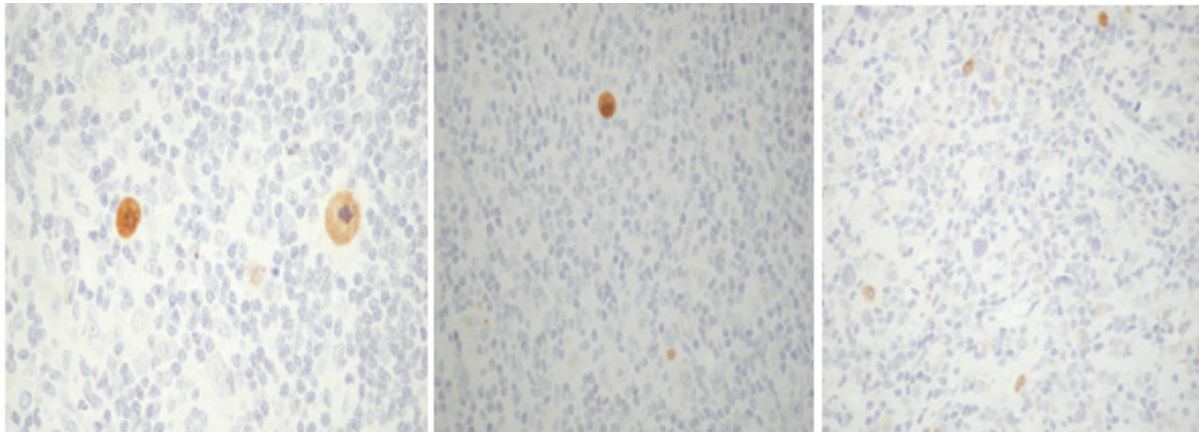
**Εικόνα 16.** Ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης **bid** σε κύτταρα HRS (x40)

Η έκφραση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης **bim** εκτιμήθηκε σε 91 από τις 114 περιπτώσεις της μελέτης (**Εικ. 17**). Η πρωτεΐνη bim εκφράστηκε κατά μέσο όρο στο 39.89% των κυττάρων HRS και η τυπική απόκλισή της υπολογίστηκε σε 29.58%. Η ελάχιστη τιμή έκφρασης της πρωτεΐνης ήταν 0% και η μέγιστη 95%.



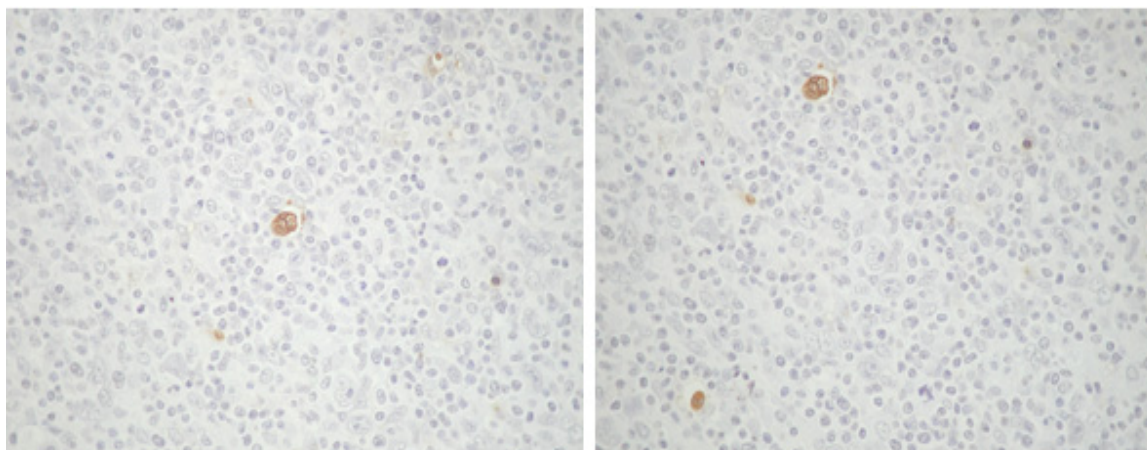
**Εικόνα 17.** Ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης **bim** σε κύτταρα HRS (x40)

Η έκφραση της ενεργοποιημένης πρωτεάσης **κασπάση 3** εκτιμήθηκε σε 70 από τις 114 περιπτώσεις της μελέτης, και βρέθηκε να εκφράζεται κατά μέσο όρο στο 1.92% των κυττάρων HRS, με τυπική απόκλιση 2.26%. Το μικρότερο ποσοστό έκφρασης ήταν 0%, και το μέγιστο ποσοστό έκφρασης ήταν 12%. Η έκφραση της πρωτεΐνης ήταν πυρηνική ή/και κυτταροπλασματική (**Εικ.18**).



**Εικόνα 18.** Ανοσοϊστοχημική έκφραση της ενεργοποιημένης **κασπάσης 3** σε κύτταρα HRS (x40)

Το ποσοστό των TUNEL θετικών κυττάρων HRS εκτιμήθηκε σε 71 από τις 114 περιπτώσεις που μελετήθηκαν. Ο μέσος όρος των TUNEL θετικών κυττάρων HRS ήταν 2.85% και η τυπική απόκλιση 3.83%. Το μικρότερο ποσοστό TUNEL θετικών νεοπλασματικών κυττάρων ήταν 0%, και το μέγιστο 19%. Η θετικότητα ήταν πυρηνική ή/και κυτταροπλασματική (**Εικ.19**).



**Εικόνα 19.** TUNEL θετικά κύτταρα HRS (x40)

**Πίνακας 2.** Βασικές στατιστικές παράμετροι της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών της οικογένειας bcl-2, της ενεργοποιημένης κασπάσης 3 και των TUNEL-θετικών κυττάρων HRS

	<b>Αριθμός περιπτώσεων</b>	<b>Μέσος όρος (%)</b>	<b>Τυπική απόκλιση</b>	<b>Ελάχιστη-μέγιστη τιμή (%)</b>
<b>bcl-2</b>	101	27.22	33.69	0-95
<b>bcl-Xl</b>	101	80.49	18.21	0-95
<b>mcl-1</b>	97	26.28	29.90	0-90
<b>bax</b>	95	65.52	25.93	0-95
<b>bak</b>	102	32.05	36.39	0-95
<b>bad</b>	94	72.76	17.78	10-95
<b>bid</b>	109	15.22	28.47	0-95
<b>bim</b>	91	39.89	29.58	0-95
<b>Ενεργοποιημένη κασπάση 3</b>	70	1.92	2.26	0-12
<b>TUNEL</b>	71	2.85	3.83	0-19

### 3.2. Προσδιορισμός των θετικών για τις πρωτεΐνες της οικογένειας bcl-2, την ενεργοποιημένη κασπάση 3 και τον δείκτη TUNEL περιπτώσεις cHL.

Ο προσδιορισμός των ανοσοϊστοχημικά θετικών περιπτώσεων του cHL ως προς την έκφραση των πρωτεϊνών της οικογένειας bcl-2 έγινε θέτοντας δύο κατώτερα όρια έκφρασης των πρωτεϊνών από τα κύτταρα HRS (Πίνακες 3 και 4). Το πρώτο κατώτερο όριο θετικότητας ήταν το 10% και το δεύτερο το 50%.

Χρησιμοποιώντας ως κατώτερο όριο θετικότητας το 10% των κυττάρων HRS διαπιστώθηκε ότι θετικές περιπτώσεις cHL για την πρωτεΐνη bcl-2 ήταν οι 50/101 (50%), για την bcl-Xl οι 99/101 (99%), για την mcl-1 οι 55/92 (60%), για την Bax οι 91/95 (96%), για την Bak οι 56/102 (55%), για την Bad οι 94/94 (100%), για την Bid οι 31/109 (28%) και για την Bim οι 73/91 (80%) (Πίνακας 3).

<b>Πίνακας 3.</b> Θετικές (10% των κυττάρων HRS) για την έκφραση των πρωτεϊνών της οικογένειας bcl-2 περιπτώσεις cHL			
	<b>Αριθμός περιπτώσεων</b>	<b>Αριθμός θετικών περιπτώσεων</b>	<b>Ποσοστό θετικών περιπτώσεων (%)</b>
<b>bcl-2</b>	101	50	50
<b>bcl-Xl</b>	101	99	99
<b>mcl-1</b>	97	55	60
<b>Bax</b>	95	91	96
<b>Bak</b>	102	56	55
<b>Bad</b>	94	94	100
<b>Bid</b>	109	31	28
<b>Bim</b>	91	73	80



Χρησιμοποιώντας ως κατώτερο όριο θετικότητας το 50% των κυττάρων HRS διαπιστώθηκε ότι θετικές περιπτώσεις cHL για την πρωτεΐνη bcl-2 ήταν οι 27/101 (27%), για την bcl-XI οι 95/101 (94%), για την mcl-1 οι 27/92 (29%), για την Bax οι 73/95 (77%), για την Bak οι 37/102 (36%), για την Bad οι 85/94 (90%), για την Bid οι 19/109 (17%) και για την Bim οι 43/91 (47%) (Πίνακας 4).

<b>Πίνακας 4.</b> Θετικές (50% των κυττάρων HRS) για την έκφραση των πρωτεϊνών της οικογένειας bcl-2 περιπτώσεις cHL			
	<b>Αριθμός περιπτώσεων</b>	<b>Αριθμός θετικών περιπτώσεων</b>	<b>Ποσοστό θετικών περιπτώσεων (%)</b>
<b>bcl-2</b>	101	27	27
<b>bcl-XI</b>	101	95	94
<b>mcl-1</b>	97	27	29
<b>Bax</b>	95	73	77
<b>Bak</b>	102	37	36
<b>Bad</b>	94	85	90
<b>Bid</b>	109	19	17
<b>Bim</b>	91	43	47

Σχετικά με την ανοσοϊστοχημική έκφραση της ενεργοποιημένης κασπάσης 3 και τον προσδιορισμό του δείκτη TUNEL, δεν χρησιμοποιήθηκε κατώτερο όριο θετικότητας. Θετικά κύτταρα HRS για την ενεργοποιημένη κασπάση 3 ανιχνεύθηκαν σε 47/70 περιπτώσεις (67%, εύρος 0%-12%), ενώ TUNEL θετικά κύτταρα HRS ανιχνεύθηκαν σε 60/71 περιπτώσεις που μελετήθηκαν (85%, εύρος 0%-19%) (Πίνακας 5).

<b>Πίνακας 5.</b> Έκφραση της ενεργοποιημένης κασπάσης 3 και δείκτης απόπτωσης TUNEL στα κύτταρα HRS			
	<b>Αριθμός περιπτώσεων</b>	<b>Αριθμός θετικών περιπτώσεων</b>	<b>Ποσοστό θετικών περιπτώσεων (%)</b>
<b>Ενεργοποιημένη κασπάση 3</b>	70	47	67
<b>Δείκτης TUNEL</b>	71	60	85

### **3.3 Συσχετίσεις μεταξύ των πρωτεϊνών της οικογένειας bcl-2, της ενεργοποιημένης κασπάσης 3 και του δείκτη TUNEL.**

#### **3.3.α. Συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης των πρωτεϊνών bcl-2, της έκφρασης της ενεργοποιημένης κασπάσης 3 και του δείκτη απόπτωσης TUNEL (συνεχείς μεταβλητές).**

Οι πιθανές συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης των πρωτεϊνών bcl-2, της έκφρασης της ενεργοποιημένης κασπάσης 3 και του δείκτη απόπτωσης TUNEL προσδιορίστηκαν υπολογίζοντας τους συντελεστές συσχέτισης  $r$  κατά Spearman (συνεχείς μεταβλητές). Ο συντελεστής αυτός αποτελεί ένα αριθμητικό μέτρο του βαθμού συσχέτισης μεταξύ δύο παραμέτρων. Επομένως δείχνει πόσο η έκφραση της μίας επηρεάζει την έκφραση της άλλης. Ταυτόχρονα, και για κάθε συντελεστή συσχέτισης υπολογίστηκε και η στατιστική σημαντικότητά  $p$ . Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις ( $p < 0.05$ ), βρέθηκαν μεταξύ της έκφρασης των πρωτεϊνών bax και bcl-2, bad και bcl-2, bad και bcl-XL, bim και mcl-1, ενεργοποιημένης κασπάσης 3 και bax, ενεργοποιημένης κασπάσης 3 και αποπτωτικού δείκτη TUNEL καθώς και bax και bad (Πίνακας 6).



**Πίνακας 6.** Συσχετίσεις μεταξύ των πρωτεϊνών της οικογένειας bcl-2, της ενεργοποιημένης κασπάσης 3 και του δείκτη απόπτωσης TUNEL (συνεχείς μεταβλητές)

<b>Ζεύγη παραμέτρων με στατιστικά σημαντική συσχέτιση</b>	<b>Συντελεστής συσχέτισης r</b>	<b>Τιμή p</b>
<b>bax/bcl-2</b>	0.324	0.002
<b>bad/bcl-2</b>	0.248	0.020
<b>bad/bcl-XI</b>	0.309	0.003
<b>bim/mcl-1</b>	0.231	0.036
<b>ενεργοποιημένη κασπάση3 /bax</b>	0.355	0.003
<b>ενεργοποιημένη κασπάση3 /TUNEL</b>	0.381	0.011
<b>bax/bad</b>	0.376	0.001

### **3.3.β. Συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών bcl-2, bcl-XI και mcl-1, και των επιπέδων έκφρασης των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών bax, bak, bad, bid και bim**

Ελέγχθηκε το ενδεχόμενο η έκφραση μίας συγκεκριμένης εκ των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών (bcl-2, bcl-XI και mcl-1) να επηρεάζει την έκφραση μίας συγκεκριμένης εκ των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών (bax, bak, bad, bid και bim). Χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος U των Mann-Whitney ώστε να προσδιοριστεί εάν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση της κάθε μίας προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης στις θετικές και στις αρνητικές για την εκάστοτε αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη περιπτώσεις. Προσδιορίστηκαν οι τιμές μέσης αξιολόγησης (mean rank) της έκφρασης κάθε προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης τόσο στις αρνητικές όσο και στις θετικές για τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες περιπτώσεις, και έγινε σύγκριση αυτών των τιμών. Ο έλεγχος U των Mann-Whitney ως μη παραμετρικός έλεγχος δεν εξετάζει τις διαφορές των μέσων όρων καθώς χρησιμοποιεί ιεραρχημένες τιμές.

Αρχικά, μελετήθηκε η έκφραση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών σε σχέση με την έκφραση της πρωτεΐνης bcl-2 χρησιμοποιώντας ως κατώτερο όριο θετικότητας το 10%. Παρόμοια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τις πρωτεΐνες bcl-X1 και mcl-1. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον **Πίνακα 7**.

<b>Πίνακας 7.</b> Συσχετίσεις μεταξύ των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών bcl-2, bcl-X1 και mcl-1 και των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών bax, bak, bad, bid και bim				
	<b>Κατάσταση έκφρασης της bcl-2</b>	<b>Αριθμός περιπτώσεων</b>	<b>Mean Rank</b>	<b>Τιμή p</b>
<b>Bax</b>	1	45	36.46	0.002 <sup>a</sup>
	2	43	52.92	
<b>Bak</b>	1	48	45.25	0.509
	2	45	48.87	
<b>Bad</b>	1	46	39.38	0.046 <sup>a</sup>
	2	42	50.11	
<b>Bid</b>	1	50	51.37	0.311
	2	47	46.48	
<b>Bim</b>	1	41	34.93	0.005 <sup>a</sup>
	2	43	49.72	
	<b>Κατάσταση έκφρασης της bcl-X1</b>	<b>Αριθμός περιπτώσεων</b>	<b>Mean Rank</b>	<b>Τιμή p</b>
<b>Bax</b>	1	2	28.00	0.369
	2	89	46.40	
<b>Bak</b>	1	3	55.17	0.690
	2	93	48.28	

<b>Bad</b>	1	2	52.50	0.721
	2	88	45.34	
<b>Bid</b>	1	3	65.50	0.381
	2	97	50.04	
<b>Bim</b>	1	1	6.00	0.138
	2	86	44.44	
	<b>Κατάσταση έκφρασης της mcl-1</b>	<b>Αριθμός περιπτώσεων</b>	<b>Mean Rank</b>	<b>Τιμή p</b>
<b>Bax</b>	1	34	43.07	0.897
	2	52	43.78	
<b>Bak</b>	1	41	47.33	0.658
	2	50	44.91	
<b>Bad</b>	1	37	42.43	0.881
	2	46	41.65	
<b>Bid</b>	1	41	45.80	0.338
	2	55	50.51	
<b>Bim</b>	1	34	36.82	0.102
	2	49	45.59	
<b>Επεξηγήσεις.</b> Κατηγορία 1: περιπτώσεις με έκφραση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης σε ποσοστό $\leq 10\%$ των κυττάρων HRS. Κατηγορία 2: περιπτώσεις με έκφραση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης σε ποσοστό $>10\%$ των HRS				

Ο έλεγχος U των Mann-Whitney έδειξε ότι στις bcl-2-αρνητικές περιπτώσεις, η ταυτόχρονη έκφραση της προ-αποπτωτικής bax ανιχνεύθηκε σε μικρότερο αριθμό κυττάρων HRS από ότι στις bcl-2-θετικές περιπτώσεις (mean rank 36.46% και

52.92% αντίστοιχα) και αυτή η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική ( $p=0.002$ ). Δεύτερο στατιστικά σημαντικό εύρημα της ανάλυσης ήταν ότι η προ-αποπτωτική πρωτεΐνη bad εκφράζεται από μεγαλύτερο ποσοστό κυττάρων HRS στις bcl-2-θετικές από ότι στις bcl-2-αρνητικές περιπτώσεις (mean rank 50.11% έναντι 39.38% αντίστοιχα). Η στατιστική σημαντικότητα του ευρήματος αυτού ήταν  $p=0.046$ . Επιπλέον, η προ-αποπτωτική πρωτεΐνη bim εκφράζεται από μεγαλύτερο ποσοστό HRS στις bcl-2-θετικές από ότι στις bcl-2 αρνητικές περιπτώσεις cHL (49.72% έναντι 34.93% αντίστοιχα). Η στατιστική σημαντικότητα του ευρήματος ήταν  $p=0.005$ . Από την ανάλυση αυτή δεν προέκυψαν άλλα στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα (Πίνακας 7).

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε όμοια στατιστική ανάλυση θέτοντας ως κατώτερο όριο θετικότητας της έκφρασης των πρωτεϊνών bcl-2 το 50% των κυττάρων HRS. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του ελέγχου U των Mann-Whitney, διαπιστώθηκε ότι η έκφραση της πρωτεΐνης bax ήταν σημαντικά υψηλότερη στις bcl-2 θετικές από ότι στις bcl-2 αρνητικές περιπτώσεις ( $p=0.041$ ). Από την ανάλυση αυτή δεν προέκυψαν άλλα στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα (τα αποτελέσματα δεν παρατίθενται σε πίνακες).

### **3.3.γ. Συσχετίσεις μεταξύ της θετικής και αρνητικής έκφρασης των πρωτεϊνών της οικογένειας bcl-2, της έκφρασης της ενεργοποιημένης κασπάσης 3 και του δείκτη απόπτωσης**

Διερευνήθηκε κατά πόσον η θετική ή αρνητική έκφραση των πρωτεϊνών bcl-2, bcl-X1, mcl-1, bax, bak, bad, bid ή bim επηρεάζει την έκφραση της ενεργοποιημένης κασπάσης 3 και τον δείκτη απόπτωσης TUNEL στα κύτταρα HRS. Η ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή του ελέγχου U των Mann-Whitney, σύμφωνα και με τα αναφερθέντα στην προηγούμενη ενότητα. Στην πρώτη ανάλυση, ετέθη ως κατώτερο όριο θετικότητας το 10% και στη δεύτερη το 50% των κυττάρων HRS.

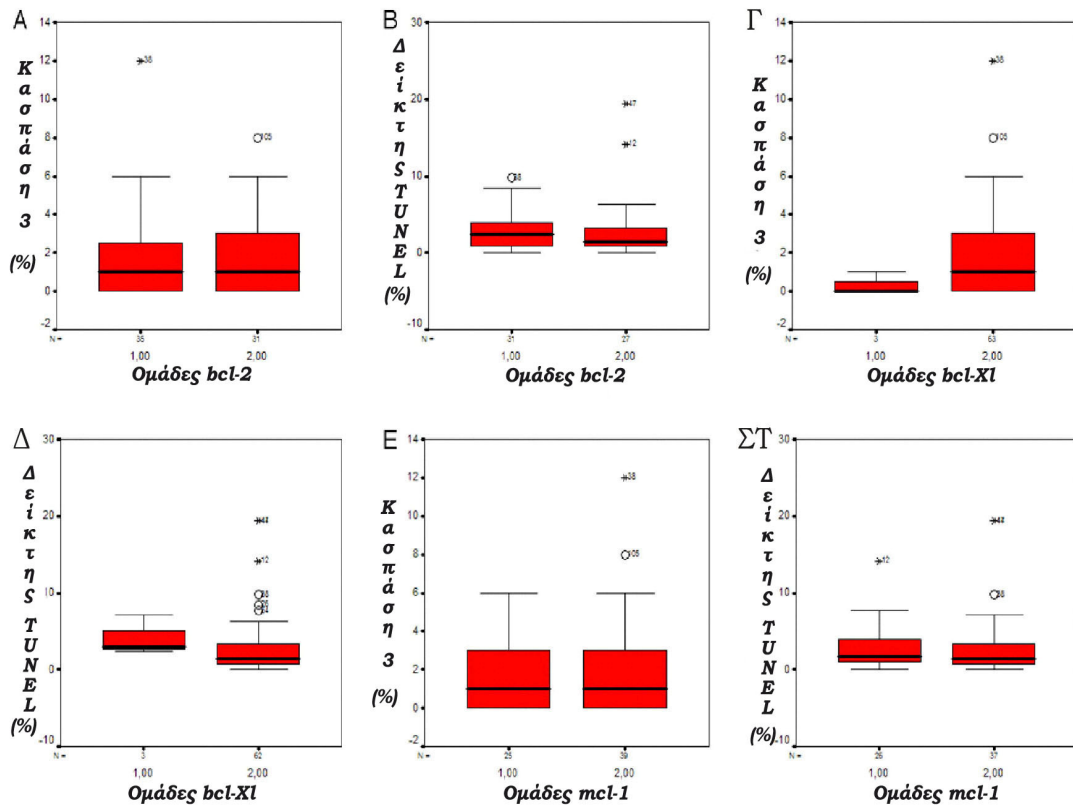
Τα αποτελέσματα της ανάλυσης χρησιμοποιώντας ως κατώτερο όριο θετικότητας το 10% συνοπτικά παρατίθενται στους Πίνακες 8 και 9. Ο Πίνακας 8 περιλαμβάνει τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες και τα αποτελέσματά του απεικονίζονται στο Γράφημα 1, ενώ ο Πίνακας 9 περιλαμβάνει τις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες και τα αποτελέσματά του απεικονίζονται στο Γράφημα 2. Από την πρώτη

ανάλυση δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις (Πίνακας 8 και Γράφημα 1).

**Πίνακας 8.** Συσχετίσεις μεταξύ θετικής και αρνητικής έκφρασης των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών bcl-2, bcl-Xl και mcl-1, της ενεργοποιημένης κασπάσης 3 και του δείκτη TUNEL

	<b>Πρότυπο έκφρασης της bcl-2</b>	<b>Αριθμός περιπτώσεων</b>	<b>Mean Rank</b>	<b>Τιμή p</b>
<b>Ενεργοποιημένη κασπάση 3</b>	1	35	32.10	0.518
	2	31	35.08	
<b>TUNEL</b>	1	31	30.79	0.532
	2	27	28.02	
	<b>Πρότυπο έκφρασης της bcl-Xl</b>	<b>Αριθμός περιπτώσεων</b>	<b>Mean Rank</b>	<b>Τιμή p</b>
<b>Ενεργοποιημένη κασπάση 3</b>	1	3	17.33	0.147
	2	63	34.27	
<b>TUNEL</b>	1	3	46.33	0.229
	2	62	32.35	

	Πρότυπο έκφρασης της <i>mcl-1</i>	Αριθμός περιπτώσεων	Mean Rank	Τιμή p
Ενεργοποιημένη κασπάση 3	1	25	32.96	0.871
	2	39	32.21	
TUNEL	1	26	34.27	0.410
	2	37	30.41	



**Γράφημα 1.** Στον κάθετο άξονα εμφανίζονται οι τιμές της ενεργοποιημένης κασπάσης 3 ή του δείκτη TUNEL (ποσοστό θετικών κυττάρων HRS). Στον οριζόντιο άξονα εμφανίζονται τα υποσύνολα των περιπτώσεων που προσδιορίστηκαν σύμφωνα με την κατάσταση έκφρασης των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών *bcl-2*, *bcl-XI* και *mcl1* (ομάδα 1: έκφραση πρωτεϊνών σε ποσοστό μικρότερο του 10% των HRS. ομάδα 2: έκφραση σε τουλάχιστον το 10% των HRS). (Α) ενεργοποιημένη κασπάση 3 και *bcl-2*, (Β) TUNEL και *bcl-2*, (Γ) ενεργοποιημένη κασπάση 3 και *bcl-XI*, (Δ) TUNEL και *bcl-XI* (Ε), ενεργοποιημένη κασπάση 3 και *mcl1*, (ΣΤ) TUNEL και *mcl1*

Από την δεύτερη ανάλυση (Πίνακας 9 και Γράφημα 2) προέκυψε ότι η ενεργοποιημένη κασπάση 3 εκφράζεται σε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα σε βαχ-θετικές περιπτώσεις από ότι σε βαχ-αρνητικές περιπτώσεις ( $p=0.042$ ). Από τους υπόλοιπους συνδυασμούς δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικά συμπεράσματα.

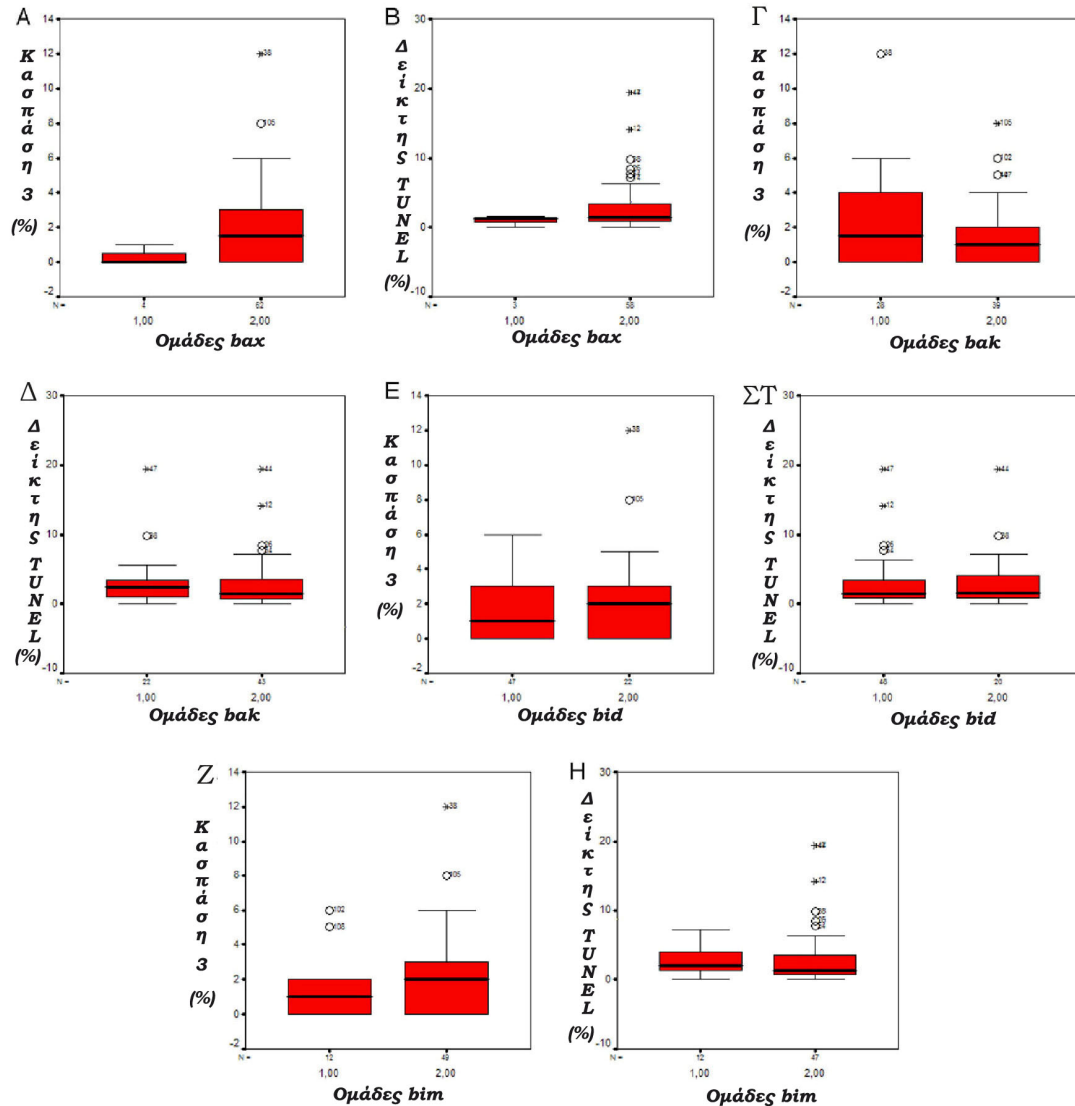
**Πίνακας 9.** Συσχετίσεις των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών *bax*, *bak*, *bid* και *bim*, με την ενεργοποιημένης κασπάση 3 και τον δείκτη TUNEL

	Πρότυπο έκφρασης της <i>bax</i>	Αριθμός περιπτώσεων	Mean Rank	Τιμή <i>p</i>
Ενεργοποιημένη κασπάση 3	1	4	14.88	0.042 <sup>a</sup>
	2	62	34.70	
TUNEL	1	3	22.67	0.443
	2	58	31.43	
	Πρότυπο έκφρασης της <i>bak</i>	Αριθμός περιπτώσεων	Mean Rank	Τιμή <i>p</i>
Ενεργοποιημένη κασπάση 3	1	28	36.91	0.287
	2	39	31.91	
TUNEL	1	22	34.68	0.607
	2	43	32.14	

	<b>Πρότυπο έκφρασης της bid</b>	<b>Αριθμός περιπτώσεων</b>	<b>Mean Rank</b>	<b>Τιμή p</b>
<b>Ενεργοποιημένη κασπάση 3</b>	1	47	34.22	0.629
	2	22	36.66	
<b>TUNEL</b>	1	48	34.00	0.746
	2	20	35.70	
	<b>Πρότυπο έκφρασης της bim</b>	<b>Αριθμός περιπτώσεων</b>	<b>Mean Rank</b>	<b>Τιμή p</b>
<b>Ενεργοποιημένη κασπάση 3</b>	1	12	26.75	0.342
	2	49	32.04	
<b>TUNEL</b>	1	12	34.04	0.360
	2	47	28.97	
<b>Επεξηγήσεις.</b> Κατηγορίες 1: περιπτώσεις με έκφραση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών σε ποσοστό $\leq 10\%$ των κυττάρων HRS και 2: περιπτώσεις με έκφραση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών σε ποσοστό $>10\%$ των κυττάρων HRS. Δεν συμπεριλαμβάνονται τιμές για την έκφραση της πρωτεΐνης bad, καθώς όλες οι περιπτώσεις υπάγονται στην κατηγορία 2				

Στη συνέχεια, παρατίθεται η αντίστοιχη απεικόνιση των ευρημάτων αυτών, στο **Γράφημα 2**.





**Γράφημα 2.** Στον κάθετο άξονα εμφανίζονται οι τιμές της ενεργοποιημένης κασπάσης 3 ή ο δείκτης TUNEL (ποσοστό θετικών κυττάρων HRS). Στον οριζόντιο άξονα παρουσιάζονται οι ομάδες των περιπτώσεων όπως αυτές καθορίστηκαν ανάλογα με την κατάσταση έκφρασης των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών bax, bak, bad, bid και bim (Ομάδα 1: έκφραση πρωτεϊνών σε ποσοστό μικρότερο του 10% των HRS, Ομάδα 2: έκφραση σε τουλάχιστον το 10% των HRS). (A) ενεργοποιημένη κασπάση 3 και bax, (B) TUNEL και bax, (Γ) ενεργοποιημένη κασπάση 3 και bak, (Δ) TUNEL και bak, (E) ενεργοποιημένη κασπάση 3 και bid, (ΣΤ) TUNEL και bid, (Z) Ενεργοποιημένη κασπάση 3 και bim, (H) TUNEL και bim

Ο έλεγχος U των Mann-Whitney εφαρμόστηκε στη συνέχεια, και για την διερεύνηση του ίδιου ερωτήματος διαφοροποιώντας το κατώτερο όριο θετικότητας της έκφρασης των πρωτεϊνών της οικογένειας bcl-2 σε ποσοστό μεγαλύτερο από το 50% των κυττάρων HRS. Από αυτή την ανάλυση δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις (τα αποτελέσματα δεν παρατίθενται σε πίνακες).

### **3.4. Συσχετίσεις μεταξύ των υποτύπων του cHL, των πρωτεϊνών της οικογένειας bcl-2, της ενεργοποιημένης κασπάσης 3 και του δείκτη απόπτωσης TUNEL**

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή του ελέγχου  $\chi^2$ . Ως δεδομένα χρησιμοποιήθηκαν ο αριθμός των περιπτώσεων που είναι θετικές (>10% των κυττάρων HRS), και αυτές που είναι αρνητικές για τις πρωτεΐνες bcl-2, bcl-X1, mcl-1, bax, bak, bad, bid και bim, την έκφραση της ενεργοποιημένης κασπάσης 3 και τον δείκτη απόπτωσης TUNEL των περιπτώσεων της οξώδους σκλήρυνσης και της μικτής κυτταροβρίθειας. Το ίδιο ερώτημα διερευνήθηκε εκ νέου θεωρώντας ως όριο θετικότητας των πρωτεϊνών της οικογένειας bcl-2 που μελετήθηκαν το 50%. Από τις αναλύσεις αυτές δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα (τα αποτελέσματα δεν παρατίθενται σε πίνακες).

### **3.5. Συσχετίσεις μεταξύ των προτύπων συνδυασμένης έκφρασης των πρωτεϊνών της οικογένειας bcl-2, της ενεργοποιημένης κασπάσης 3 και του δείκτη απόπτωσης TUNEL**

Σε αυτή την ανάλυση αρχικά οι περιπτώσεις κατατάχθηκαν σε αυτές με χαμηλή και αυτές με υψηλή έκφραση των πρωτεϊνών της οικογένειας bcl-2. Ως κατώτερο όριο υψηλής έκφρασης για κάθε πρωτεΐνη θεωρήθηκε το 50%. Το πρότυπο της υψηλής συνδυασμένης έκφρασης των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών ορίστηκε από την ταυτόχρονη αυξημένη έκφραση τουλάχιστον 2 εκ των 3 αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών. Κατά τον ίδιο τρόπο, το πρότυπο υψηλής έκφρασης των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών ορίστηκε από την ταυτόχρονη υψηλή έκφραση τουλάχιστον 3 εκ των 5 προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών.

Διαπιστώθηκε ότι 39/94 (41%) περιπτώσεις cHL παρουσίαζαν πρότυπο συνδυασμένης υψηλής έκφρασης αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών, ενώ οι υπόλοιπες περιπτώσεις παρουσίαζαν πρότυπο συνδυασμένης χαμηλής έκφρασης. Αναφορικά δε με τις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες οι 50/88 (57%) παρουσίαζαν πρότυπο υψηλής έκφρασης, ενώ οι υπόλοιπες παρουσίαζαν πρότυπο χαμηλής έκφρασης.

Η ανάλυση του ελέγχου  $\chi^2$  έδειξε ταυτόχρονα αυξημένη έκφραση των αντι-αποπτωτικών και των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών από τα κύτταρα HRS σε 24/78 (31%) περιπτώσεις ενώ, ταυτόχρονα μειωμένη έκφραση των αντι-αποπτωτικών και των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών από τα κύτταρα HRS παρατηρήθηκε σε 22/78 (28%) περιπτώσεις. Η στατιστική σημαντικότητα του ελέγχου ήταν  $p=0.104$  (Πίνακας 10).

**Πίνακας 10.** Συσχετίσεις μεταξύ των προτύπων συνδυασμένης έκφρασης των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών και προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών

Πρότυπο συνδυασμένης έκφρασης των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών.	Πρότυπο συνδυασμένης έκφρασης των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών.		Συνολικός αριθμός περιπτώσεων.
	Μειωμένη έκφραση	Αυξημένη έκφραση	
Μειωμένη έκφραση	22	22	44
Αυξημένη έκφραση	10	24	34
Συνολικός αριθμός περιπτώσεων	32	46	78

Έλεγχος  $\chi^2$ ,  $p=0.104$ .

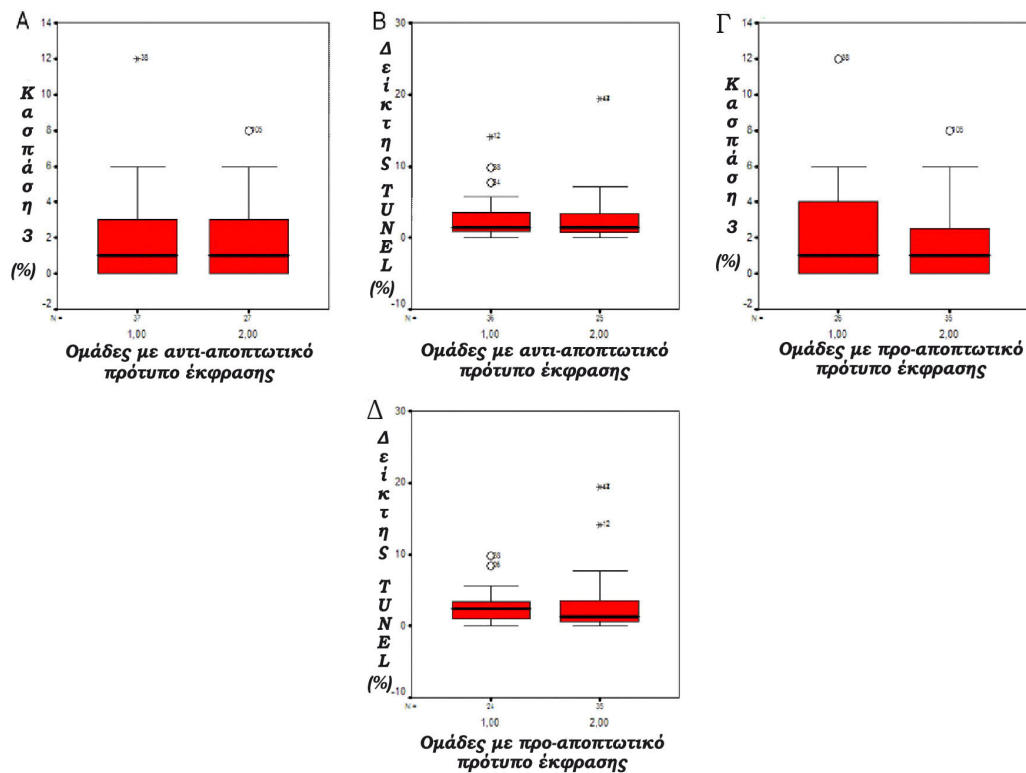
**Επεξηγήσεις.** Το πρότυπο υψηλής συνδυασμένης έκφρασης των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών bcl-2, bcl-X1 και mcl-1 ορίζεται ως η ταυτόχρονη αυξημένη έκφραση τουλάχιστον 2 εκ των 3 αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών. Οι υπόλοιπες περιπτώσεις κατατάχθηκαν στο πρότυπο χαμηλής έκφρασης. Το πρότυπο αυξημένης συνδυασμένης έκφρασης των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών bax, bak, bad, bid και bim ορίζεται ως η ταυτόχρονη αυξημένη έκφραση τουλάχιστον 3 εκ των 5 προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών. Οι υπόλοιπες περιπτώσεις κατατάχθηκαν στο πρότυπο χαμηλής έκφρασης.

Το επόμενο ερώτημα που τέθηκε ήταν εάν υπάρχει συσχέτιση των προτύπων συνδυασμένης έκφρασης των πρωτεϊνών της οικογένειας bcl-2 με τα επίπεδα έκφρασης της ενεργοποιημένης κασπάσης 3 και τον δείκτη απόπτωσης TUNEL. Η

διερεύνηση πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή του ελέγχου U κατά Mann-Whitney, και τα ευρήματα παρουσιάζονται στον **Πίνακα 11** και στο **Γράφημα 3**.

**Πίνακας 11.** Συσχετίσεις μεταξύ των προτύπων συνδυασμένης έκφρασης των αντι-αποπτωτικών και προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών με την ενεργοποιημένη κασπάση 3 και τον δείκτη TUNEL

	Αντι-αποπτωτικό πρότυπο	Αριθμός περιπτώσεων	Mean Rank	Τιμή p
<b>Ενεργοποιημένη κασπάση 3</b>	1	37	31.89	0.753
	2	27	33.33	
<b>TUNEL</b>	1	36	31.36	0.848
	2	25	30.48	
	Προ-αποπτωτικό πρότυπο	Αριθμός περιπτώσεων	Mean Rank	Τιμή p
<b>Ενεργοποιημένη κασπάση 3</b>	1	26	32.42	0.579
	2	35	29.94	
<b>TUNEL</b>	1	24	33.58	0.184
	2	35	27.54	
<p><b>Επεξηγήσεις.</b> 1: πρότυπο μειωμένης συνδυασμένης έκφρασης των αντι-αποπτωτικών ή των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών, 2: πρότυπο αυξημένης έκφρασης των αντι-αποπτωτικών ή προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών</p>				



**Γράφημα 3.** Στον κάθετο άξονα παρουσιάζονται οι τιμές της ενεργοποιημένης κασπάσης 3 ή του δείκτη TUNEL. Στον οριζόντιο άξονα παρουσιάζονται οι ομάδες περιπτώσεων όπως προσδιορίστηκαν βάσει του συνδυασμένου προτύπου έκφρασης των αντι-αποπτωτικών ή των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών (Ομάδα 1 και Ομάδα 2). (Α) Ενεργοποιημένη κασπάση 3 και ομάδες με υψηλό ή χαμηλό επίπεδο έκφρασης για το αντι-αποπτωτικό πρότυπο, (Β) TUNEL και συνδυασμένο αντι-αποπτωτικό πρότυπο, (Γ) ενεργοποιημένη κασπάση 3 και υψηλό ή χαμηλό επίπεδο έκφρασης για το προ-αποπτωτικό πρότυπο, (Δ) TUNEL και συνδυασμένο προ-αποπτωτικό πρότυπο

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης, έκφραση της ενεργοποιημένης κασπάσης-3 ανιχνεύθηκε σε 37 περιπτώσεις με πρότυπο χαμηλής συνδυασμένης έκφρασης (mean rank: 31.89%) και σε 27 περιπτώσεις με πρότυπο υψηλής συνδυασμένης έκφρασης των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών (mean rank: 33.33%) ( $p = 0.753$ ). Αναφορικά με το πρότυπο έκφρασης των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών, 26 περιπτώσεις παρουσίαζαν χαμηλή συνδυασμένη έκφραση (mean rank: 32.42%) και 35 περιπτώσεις αυξημένη συνδυασμένη έκφραση (mean rank: 29.94%) ( $p = 0.579$ ).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, για την τιμή του δείκτη απόπτωσης TUNEL, 36 περιπτώσεις παρουσίαζαν χαμηλό πρότυπο συνδυασμένης έκφρασης των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών (mean rank: 31.36%) και 25 περιπτώσεις υψηλό πρότυπο συνδυασμένης έκφρασης των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών (mean rank: 30.48%)

( $p=0.848$ ). Αναφορικά με τις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες, 24 περιπτώσεις παρουσίαζαν χαμηλό πρότυπο συνδυασμένης έκφρασης (mean rank: 33.58%) ενώ, 35 περιπτώσεις είχαν πρότυπο συνδυασμένης υψηλής έκφρασης (mean rank: 27.54%) ( $p=0.184$ ).

### **3.6. Συσχετίσεις μεταξύ των προτύπων συνδυασμένης έκφρασης των πρωτεϊνών της οικογένειας bcl-2 και των υποτύπων του cHL**

Τέλος, μελετήθηκε το ενδεχόμενο ύπαρξης συσχέτισης μεταξύ των υποτύπων του cHL (οξώδης σκλήρυνση έναντι μικτής κυτταροβρίθειας) και το πρότυπο συνδυασμένης έκφρασης των αντι-αποπτωτικών ή των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας bcl-2, όπως τα πρότυπα αυτά έχουν οριστεί και περιγράφονται παραπάνω. Η διερεύνηση πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή του ελέγχου  $\chi^2$ , και δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχέτισεις (τα αποτελέσματα δεν παρατίθενται σε πίνακα).

#### 4. Συζήτηση

Μέχρι την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης δεν είχε αναλυθεί το πρότυπο της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών bad, bid και bim στα κύτταρα Hodgkin και Reed-Sternberg (HRS) σε περιπτώσεις κλασσικού λεμφώματος Hodgkin (cHL). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, έδειξαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών που μελετήθηκαν στα κύτταρα HRS του cHL (θετικότητα σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50% των κυττάρων). Συγκεκριμένα, αυξημένα επίπεδα των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών bad, bid και bim παρατηρήθηκαν σε ποσοστό 90%, 17% και 47% των περιπτώσεων που αναλύθηκαν, αντίστοιχα.

Τα παραπάνω ευρήματα υποδεικνύουν ότι στη ρύθμιση της απόπτωσης των κυττάρων HRS των περισσότερων περιπτώσεων cHL πιθανόν να εμπλέκονται αποπτωτικοί μηχανισμοί που ελέγχονται από την πρωτεΐνη bad. Η πρωτεΐνη bad φωσφοριλιώνεται από αυξητικούς παράγοντες και η αποφωσφοριλιωμένη (ενεργοποιημένη) μορφή της συνδέεται με τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες bcl-2 ή bcl-X1 [22, 23]. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες με αντισώματα έναντι της φωσφοριλιωμένης μορφής της bad για την κατανόηση του ρόλου της πρωτεΐνης bad στη ρύθμιση της απόπτωσης των κυττάρων HRS, καθώς και των συνθηκών ενεργοποίησής της.

Αναφορικά με την έκφραση των υπολοίπων πρωτεϊνών της οικογένειας bcl-2 που απασχόλησαν την παρούσα μελέτη, τα αποτελέσματα που προέκυψαν συμφωνούν με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών [4, 11-20]. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης (έκφραση σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50% των κυττάρων) των πρωτεϊνών bcl-2, bcl-X1, mcl-1, bax και bak στα κύτταρα HRS στο 27%, 94%, 29%, 77% και 36% των περιπτώσεων cHL, αντίστοιχα.

Στις περισσότερες περιπτώσεις cHL ανιχνεύθηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών bcl-X1 και bax στα κύτταρα HRS. Αυτό το εύρημα πιθανόν να δείχνει ότι οι πρωτεΐνες αυτές διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης των κυττάρων HRS στο cHL. Η συμμετοχή των πρωτεϊνών bcl-X1 και bax στις διαδικασίες επιβίωσης των κυττάρων HRS υποστηρίζεται και από τα ακόλουθα δεδομένα. Σύμφωνα με τα ευρήματα προηγούμενης μελέτης, η έκτοπη έκφραση της

πρωτεΐνης bcl-X1 αποκαθιστά την ικανότητα επιβίωσης κυττάρων HRS στα οποία απουσιάζει ο μεταγραφικός παράγοντας NFκB [7]. Επίσης, μη αποδοτική ενεργοποίηση της πρωτεΐνης bax σε σειρές κυττάρων HRS τα καθιστά ανθεκτικά στην απόπτωση που επάγεται από την δράση της σταυροσπορίνης [306]. Επομένως, από τα ανωτέρω εξάγεται το συμπέρασμα ότι είναι ιδιαίτερος σημαντικός ο ρόλος των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών bad και bax, καθώς και της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης bcl-X1 στη ρύθμιση των μηχανισμών της απόπτωσης στα κύτταρα HRS του cHL. Αναφορικά με τη bad, αυτό προκύπτει από τα ευρήματα της παρούσας μελέτης, ενώ αναφορικά με τις bax και bcl-X1 από τα ευρήματα τόσο της παρούσας μελέτης όσο και προηγούμενων μελετών.

Στην παρούσα μελέτη βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών bax και bcl-2, bad και bcl-2, bad και bcl-X1, και bim και mcl-1 που εκφράζονται στα κύτταρα HRS. Το εύρημα αυτό δείχνει πιθανή επίδραση της έκφρασης της μίας πρωτεΐνης κάθε ζεύγους στα επίπεδα έκφρασης της άλλης πρωτεΐνης κάθε ζεύγους και επομένως, τελικά, οι λειτουργίες τους εντός των κυττάρων HRS να υπόκεινται σε έλεγχο και επιρροή ανά δύο σύμφωνα με τα παραπάνω ζεύγη. Συγκεκριμένα, η έκφραση και λειτουργία της πρωτεΐνης bax πιθανώς επιδρά στην έκφραση και λειτουργία της πρωτεΐνης bcl-2, και επιπλέον της bad στην bcl-2 και στην bcl-X1, όπως και της bim στην mcl-1, ή/και αντιστρόφως.

Επιπρόσθετα, στην παρούσα μελέτη διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών bax, bad και bim στα κύτταρα HRS είναι σημαντικά υψηλότερα στις bcl-2-θετικές περιπτώσεις παρά στις bcl-2-αρνητικές περιπτώσεις. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα ευρήματα προηγούμενων μελετών που περιγράφουν ότι σε ποσοστό 74.4% των bax-θετικών περιπτώσεων cHL συνεκφράζονται οι πρωτεΐνες bcl-2 και bcl-X1 είτε μεμονωμένα είτε συνδυασμένα [20]. Από τα ανωτέρω θα μπορούσε να υποστηριχθεί ότι οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες bcl-2, bcl-X1 και mcl-1 ίσως να έχουν την ικανότητα να εξουδετερώνουν την έκφραση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών bax, bad και bim, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στην επιβίωση των κυττάρων HRS.

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε σημαντική ποικιλία και ετερογένεια στην έκφραση των πρωτεϊνών της οικογένειας bcl-2 στα κύτταρα HRS. Αυτό το εύρημα



πιθανώς να υποδηλώνει μία διαφορετικά ρυθμιζόμενη έκφραση των συγκεκριμένων πρωτεϊνών από κύτταρο σε κύτταρο, η οποία θα μπορούσε να αποδοθεί σε διαταραχές στη δομή των γονιδίων ή/και σε διαταραχές στην έκφρασή τους. Ωστόσο, προηγούμενη μελέτη (single cell analysis) έδειξε ότι στα κύτταρα HRS δεν ανιχνεύεται η χρωμοσωματική μετάθεση t(14;18)(q32;q21) [301]. Επιπλέον, σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα δεν έχουν ανευρεθεί ανωμαλίες στη δομή των γονιδίων *bax*, *bak*, *bad*, *bim*, *bid*, *mcl-1*, και *bcl-Xl* στα κύτταρα HRS. Εναλλακτικά, η ποικιλία στην έκφραση των πρωτεϊνών *bcl-2* θα μπορούσε να οφείλεται στην κατάσταση ενεργοποίησης διαφόρων οδών μετάδοσης σήματος στα κύτταρα HRS [310, 311, 312]. Πράγματι, η οδός του μεταγραφικού παράγοντα NF- $\kappa$ B βρίσκεται σε κατάσταση συνεχούς ενεργοποίησης στα κύτταρα HRS, κατάσταση που έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης *bcl-Xl* [7, 8, 10, 31]. Επιπρόσθετα, σε κατάσταση συνεχούς ενεργοποίησης βρίσκεται και η οδός Janus kinase/STAT η οποία συμβάλει στην επιβίωση κυτταρικών σειρών cHL μέσω μηχανισμών φωσφορυλίωσης/ενεργοποίησης των πρωτεϊνών STAT. Η αναστολή της ενεργοποίησης των πρωτεϊνών STAT προκαλεί επαγωγή της απόπτωσης σε κύτταρα cHL, η οποία συσχετίστηκε με ελαττωμένη έκφραση της πρωτεΐνης *bcl-Xl* [312]. Ακόμη, με παρόμοιους μηχανισμούς εμπλέκεται και η οδός Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase (MAPK/ERK). Η κατάσταση συνεχούς ενεργοποίησης της οδού αυτής συμβάλλει στην επιβίωση κυτταρικών σειρών cHL. Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται σε αυτή την οδό περιλαμβάνουν διαδικασίες φωσφορυλίωσης και ενεργοποίησης, της κινάσης ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase). Αναστολή της οδού MAPK σε πρώιμα στάδια απόπτωσης των κυττάρων του cHL έχει συσχετιστεί με ελαττωμένα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών *bcl-2* και *mcl-1* [314]. Τέλος, η παραμονή της οδού Phosphatidylinositide 3 Kinase (PI3K) σε κατάσταση συνεχούς ενεργοποίησης συμβάλει στην επιβίωση κυτταρικών σειρών λεμφώματος Hodgkin μέσω μηχανισμού που περιλαμβάνει τη φωσφορυλίωση, και ενεργοποίηση της κινάσης Akt [311]. Η οδός αυτή μεταδίδει αντι-αποπτωτικά σήματα, συμπεριλαμβανομένης και της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης *bad* [313].

Σημαντικό ρόλο στην εκτέλεση του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου διαδραματίζει η ενεργοποίηση της κασπάσης-3 [320, 23]. Στην παρούσα μελέτη, η έκφραση της ενεργοποιημένης κασπάσης-3 ανιχνεύθηκε στα κύτταρα HRS στις 47

από τις 70 περιπτώσεις cHL που μελετήθηκαν και το εύρος της έκφρασης ήταν από 0% έως 12%. Το εύρημα αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα προηγούμενης μελέτης του Dukers και των συνεργατών του, οι οποίοι ανίχνευαν την ενεργοποιημένη μορφή της κασπάσης-3 σε περισσότερα από το 5% των κυττάρων HRS σε 22 από τις 63 περιπτώσεις cHL που μελέτησαν. Το εύρος αυτής της έκφρασης κυμάνθηκε από 0% έως 13%. Ιδιαίτερης σημασίας είναι η ανεύρεση από τους ίδιους ερευνητές ότι η ενεργοποιημένη κασπάση-3 είναι λειτουργική στα κύτταρα HRS. Ανίχνευαν διασπασμένα τμήματα (θραύσμα) της PARP-1/p89, ενός από τα υποστρώματα που διασπά η κασπάση, σε ανάλογα ποσοστά με αυτά της ενεργοποιημένης κασπάσης-3 [15]. Το εύρημα αυτό μπορεί να αξιολογηθεί σε συνδυασμό με τη στατιστικά σημαντική συσχέτιση, που βρέθηκε στην παρούσα μελέτη, ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης της ενεργοποιημένης κασπάσης-3 και στο δείκτη TUNEL στα κύτταρα HRS. Από την άλλη πλευρά, στην παρούσα μελέτη όπως και σε προηγούμενες μελέτες σε σημαντικό ποσοστό περιπτώσεων δεν ανιχνεύθηκαν ή ανιχνεύθηκαν χαμηλά επίπεδα ενεργοποιημένης κασπάσης-3 [5]. Το εύρημα αυτό ενδεχομένως να οφείλεται στην έκφραση αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών στα κύτταρα HRS. Παραδείγματα τέτοιων πρωτεϊνών είναι μέλη της οικογένειας bcl-2, όπως και μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών IAP [21].

Στην παρούσα μελέτη και σε προηγούμενες μελέτες [307], δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική αντίστροφη συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση της ενεργοποιημένης κασπάσης-3 και στην έκφραση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας bcl-2 που μελετήθηκαν. Εύρημα, που εάν προέκυπτε, θα καταδείκνυε κάποιου είδους αρνητική αλληλεπίδραση μεταξύ τους, και ειδικότερα θα σήμαινε την αναστολή της δράσης της κασπάσης-3, ή ακόμη την καταστολή της έκφρασής της από τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες. Αντίθετα, η ερευνητική ομάδα του Durkop [21] βρήκε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση της ενεργοποιημένης κασπάσης-3 και στην έκφραση της πρωτεΐνης cIAP2 (μέλους της οικογένειας των πρωτεϊνών IAP) στα HRS. Εύρημα το οποίο δείχνει πιθανή ανασταλτική δράση της c-IAP2 στη διαδικασία της απόπτωσης μέσω αλληλεπιδράσεων της με την ιδιοσυστασιακά ενεργοποιημένη κασπάση-3.

Αξιοσημείωτη είναι η παρατήρηση ότι σε ορισμένες περιπτώσεις cHL της παρούσας μελέτης δεν ανιχνεύθηκε ανοσοϊστοχημική έκφραση της ενεργοποιημένης κασπάσης-3 στα κύτταρα HRS, ενώ ανιχνεύθηκαν TUNEL-θετικά κύτταρα HRS.

Αυτό το αρχικά παράδοξο εύρημα θα μπορούσε να οφείλεται σε κυτταρικό θάνατο ανεξάρτητο της δράσης των κασπασών Ένας τέτοιος μηχανισμός θανάτου αποδίδεται στη δράση δύο ενδομιτοχονδριακών πρωτεϊνών, της ενδονουκλεάσης G και του παράγοντα AIF (Apoptosis Inducing Factor, παράγοντας επαγωγικός της απόπτωσης) [23, 210, 315].

Υπάρχουν ευρήματα προηγούμενων μελετών τα οποία δείχνουν ότι πρωτεΐνες της οικογένειας bcl-2 όπως οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες bcl-X1, bcl-2 και mcl-1 καταστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε συστήματα *in vitro* [316-319]. Συγκεκριμένα, οι bcl-X1 και bcl-2 διακόπτουν το κυτταρικό κύκλο στη φάση G0 σε ινοβλάστες, και επιπλέον καθυστερούν τη μετάβαση από τη φάση G0 στη φάση G1 στα ίδια κύτταρα [318]. Επιπρόσθετα, η έκφραση της πρωτεΐνης bcl-2 συσχετίζεται με χαμηλότερο δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε περιπτώσεις μη Hodgkin λεμφωμάτων [319]. Στην παρούσα μελέτη, στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις βρέθηκαν ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών bcl-2 και κυκλίνης E, καθώς και ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών mcl-1 και κυκλίνης A. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που έδειξαν στατιστικά σημαντικές θετικές συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών bcl-X1 και MIB1 (Ki67), bcl-xL και κυκλίνης E, bcl-X1 και cdk1, bcl-X1 και cdk6, mcl-1 και κυκλίνη E, mcl-1 και cdk6, και τέλος μεταξύ bcl-2 και cdk6 [4]. Αυτές οι μη αναμενόμενες συσχετίσεις ανάμεσα στην αυξημένη έκφραση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών και πρωτεϊνών εμπλεκόμενων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στα κύτταρα HRS δείχνει ότι η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης είναι έκδηλα διαταραγμένη στα κύτταρα HRS [4, 5, 20, 21].

Συμπερασματικά, στην παρούσα μελέτη διαπιστώθηκε ποικιλία και ετερογένεια στην έκφραση των πρωτεϊνών bcl-2, bcl-X1, mcl-1, bax, bak, bad, bid και bim της οικογένειας bcl-2 στα κύτταρα HRS του cHL. Το εύρημα αυτό δείχνει ότι διαφορετικοί μηχανισμοί εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης αυτών των πρωτεϊνών στα κύτταρα HRS του cHL. Επίσης, τα υψηλά επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών bcl-X1, bax και bad στα κύτταρα HRS των περισσότερων περιπτώσεων cHL υποδηλώνει τον δυνητικά κυρίαρχο ρόλο αυτών των πρωτεϊνών στη ρύθμιση της απόπτωσης στα νεοπλασματικά κύτταρα της νόσου. Βάσει των στατιστικά σημαντικών θετικών συσχετίσεων ανάμεσα σε ζεύγη πρωτεϊνών που ανήκουν στην οικογένεια bcl-2, και συγκεκριμένα ανάμεσα στις bax και bcl-2, bad και bcl-2, bad

και bcl-Xl, και bim και mcl-1, θα ήταν δόκιμο να θεωρηθεί ότι οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες bcl-2, bcl-Xl και mcl-1 ίσως ανταγωνίζονται και εξουδετερώνουν την έκφραση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών bax, bad και bim, και έτσι δημιουργούνται συνθήκες που ευνοούν την επιβίωση των κυττάρων HRS.

## 5. Συμπεράσματα

01. Στην παρούσα μελέτη προσδιορίστηκαν για πρώτη φορά στην διεθνή βιβλιογραφία τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών bad, bid και bim στα κύτταρα HRS του cHL. Ανιχνεύθηκαν υψηλά επίπεδα έκφρασης (θετικά >50% των κυττάρων) των πρωτεϊνών bad, bid και bim στο 90%, 47% και 17% των περιπτώσεων cHL, αντίστοιχα. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι είναι πιθανό στη ρύθμιση της απόπτωσης των κυττάρων HRS των περισσότερων περιπτώσεων cHL να εμπλέκονται αποπτωτικοί μηχανισμοί που ελέγχονται από την πρωτεΐνη bad.
02. Στην παρούσα μελέτη επιβεβαιώθηκαν τα ευρήματα προηγούμενων μελετών όσον αφορά την έκφραση των πρωτεϊνών bcl-2, bcl-X1, mcl-1, bax και bak στα κύτταρα HRS του cHL. Ανευρέθηκαν υψηλά επίπεδα έκφρασης (θετικά >50% των κυττάρων) στο 27%, 94%, 29%, 77% και 36% των περιπτώσεων, αντίστοιχα. Στις περισσότερες περιπτώσεις cHL ανιχνεύθηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών bcl-X1 και bax στα κύτταρα HRS. Αυτό το εύρημα πιθανόν να δείχνει ότι οι πρωτεΐνες αυτές διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης των κυττάρων HRS στο cHL.
03. Στην παρούσα μελέτη αναδείχθηκε η ύπαρξη στατιστικά σημαντικής συσχέτισης ανάμεσα στην έκφραση των πρωτεϊνών bax και bcl-2, bad και bcl-2, bad και bcl-X1, και των πρωτεϊνών bim και mcl-1. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών bax, bad και bim στα κύτταρα HRS είναι σημαντικά υψηλότερα στις bcl-2-θετικές περιπτώσεις συγκρινόμενα με αυτά των bcl-2-αρνητικών περιπτώσεων. Από τα ανωτέρω θα μπορούσε να υποστηριχθεί ότι οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες bcl-2, bcl-X1 και mcl-1 ίσως να έχουν την ικανότητα να εξουδετερώνουν την έκφραση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών bax, bad και bim, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στην επιβίωση των κυττάρων HRS.

04. Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε σημαντική ποικιλία και ετερογένεια στην έκφραση των πρωτεϊνών bcl-2, bcl-Xl, mcl-1, bax, bak, bad, bid και bim της οικογένειας bcl-2 στα κύτταρα HRS του cHL. Το εύρημα αυτό δείχνει ότι πιθανόν διαφορετικοί μηχανισμοί εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης αυτών των πρωτεϊνών στα κυττάρων HRS του cHL.
  
05. Στην παρούσα μελέτη ανευρέθηκαν μη αναμενόμενες συσχετίσεις ανάμεσα στην αυξημένη έκφραση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών και πρωτεϊνών εμπλεκόμενων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (αποτελέσματα προηγούμενων μελετών) στα κύτταρα HRS, εύρημα που δείχνει ότι η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης είναι έκδηλα διαταραγμένη στα κύτταρα HRS.

## 6. Περίληψη

Προηγούμενες μελέτες περιγράφουν έκφραση διαφόρων πρωτεϊνών της οικογένειας bcl-2 στα κύτταρα HRS, δεν έχει όμως μελετηθεί η έκφραση των πρωτεϊνών bad, bid και bim στα κύτταρα HRS του cHL. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών bcl-2, bcl-X1, mcl-1, bax, bak, bad, bid, bim και της ενεργοποιημένης κασπάσης-3, καθώς και του δείκτη TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated in situ labeling) στα κύτταρα HRS του cHL. Ανιχνεύθηκαν υψηλά επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών bcl-2 (27/101, 27%), bcl-X1 (95/101, 94%), mcl-1 (27/97, 29%), bax (73/95, 77%), bak (37/102, 36%), bad (85/94, 90%), bid (19/109, 17%) και bim (43/91, 47%) στα κύτταρα HRS. Τα υψηλά επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών bcl-X1, bax και bad από τα κύτταρα HRS στις περισσότερες περιπτώσεις cHL δείχνουν ότι οι πρωτεΐνες αυτές πιθανόν να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης στο cHL. Ενεργοποιημένη κασπάση-3 και TUNEL-θετικά κύτταρα HRS ανιχνεύθηκαν σε 47/70 (67%, εύρος 0-12%) και 60/71 (85%, εύρος 0-19%), αντίστοιχα. Επίσης, βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις ανάμεσα στην έκφραση των πρωτεϊνών bax και bcl-2 ( $p = 0.002$ ), bad και bcl-2 ( $p = 0.020$ ), bad και bcl-X1 ( $p = 0.003$ ) καθώς και bim και mcl1 ( $p = 0.036$ ). Βάσει αυτών των ευρημάτων, πιθανολογείται ότι οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες bcl2, bcl-x1 και mcl1 ίσως επηρεάζουν την έκφραση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών bax, bad και bim, και επομένως συμβάλλουν στην επιβίωση των κυττάρων HRS στο cHL.

## 7. Abstract

The expression of various bcl2 family proteins has been reported in Hodgkin and Reed-Sternberg (HRS) cells, but that of proteins bad, bid and bim has not been analyzed in classical Hodgkin's lymphomas (cHLs). This study aimed to investigate the expression of the proteins bcl2, bcl-xl, mcl1, bax, bak, bad, bid and bim; active caspase 3; and the TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated in situ labeling) index to gain further insight on the apoptosis profile of cHLs. A high expression of the proteins bcl2, bcl-xl, mcl1, bax, bak, bad, bid and bim in HRS cells was found in 27 of 101 (27%), 95 of 101 (94%), 27 of 97 (29%), 73 of 95 (77%), 37 of 102 (36%), 85 of 94 (90%), 19 of 109 (17%), and 43 of 91 (47%) cases respectively. The high expression of bcl-xl, bax and bad in HRS cells in most cHLs indicates that these proteins may play predominant roles in the regulation of apoptosis in cHLs. Active caspase 3-positive and TUNEL-positive HRS cells were detected in 47 of 70 (67%; range 0%-12%) and 60 of 71 (85%; range 0%-19%) cases, respectively. Significant positive correlations were found between bax/bcl2 ( $P = 0.002$ ), bad/bcl2 ( $P = 0.020$ ), bad/bcl-xl ( $P = 0.003$ ), and bim/mcl1 ( $P = 0.036$ ). Based on these findings, it could be hypothesized that the antiapoptotic proteins bcl2, bcl-xl and mcl1 may counteract the expression of the proapoptotic proteins bax, bad, and bim, thereby contributing to the survival of HRS cells.



## 8. Βιβλιογραφία

1. Harris NL. Hodgkin's disease: classification and differential diagnosis. *Mod Pathol* 1999; 12: 159-176.
2. Pileri SA, Ascani S, Leoncini L, et al. Hodgkin's lymphoma: The pathologist's view-point. *J Clin Pathol* 2002; 55: 162-176.
3. Re D, Thomas RK, Behringer K, et al. From Hodgkin disease to Hodgkin Lymphoma: biologic insights and therapeutic potential. *Blood* 2005; 105 (No 12): 4553-4560.
4. Garcia JF, Camacho FI, Morente M, et al. Hodgkin and Reed-Sternberg cells harbor alterations in the major tumor suppressor pathways and cell-cycle checkpoints: analyses using tissue microarrays. *Blood* 2003; 101: 681-689.
5. Kim LH, Pech SC, Poppema S. Expression of retinoblastoma protein and p16 proteins in classic Hodgkin lymphoma: relationship with expression of p53 and presence of Epstein-Barr virus in the regulation of cell growth and death. *Hum Pathol* 2006; 37: 92-100.
6. Bargou RC, Emmerich F, Krappmann D, et al. Constitutive nuclear factor-NF- $\kappa$ B-Rel A activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest* 1997;100: 2961-2969.
7. Hinz M, Loser P, Mathas S, et al. Constitutive NF-kappaB 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: 2798-2807.
8. 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: 2798-2807.
9. 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-kappa B. *EMBO J* 2002; 21: 4104-4113.
10. Mathas S, Lietz A, Anagnostopoulos I, et al. c-FLIP mediates resistance of Hodgkin/Reed-Sternberg cells to death-receptor-induced apoptosis. *J Exp Med* 2004; 199: 1041-1052.
11. Brink AA, Oudejans JJ, van den Brule AJ, et al. Low p53 and high bcl-2 expression in Reed-Sternberg cells predicts poor clinical outcome for Hodgkin's disease: involvement in apoptosis resistance. *Mod Pathol* 1998; 11: 376-383.
12. Chu WS, Aguilera NS, Wei MQ, et al. Antiapoptotic marker Bcl-X(L), expression on Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease using a novel monoclonal marker, YTH-2H12. *Human Patolol* 1999; 30: 1065-1070.
13. Brousset P, Krajewski S, Schlaifer D, et al. Detection of the cell death-inducing protein BAK in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *Leuk Lymphoma* 1999; 34: 581-584.

14. Kanavaros P, Stefanaki K, Vlachonikolis J, et al. Expression of p53, p21/waf-1, bcl-2, bax, Rb and Ki-67 proteins in Hodgkin's lymphomas. *Histol Histopathol* 2000; 15: 445-453.
15. Dukers DF, Oudejans JJ, Vos W, et al. Apoptosis in B cell lymphomas and reactive lymphoid tissues always involves activation of caspase 3 as determined by a new in situ detection method. *J Pathol* 2002; 196: 307-315.
16. Rassidakis GZ, Medeiros LJ, McDonnell TJ, et al. Bax expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease: correlations with clinical outcome. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 488-493.
17. Rassidakis GZ, Medeiros LJ, Vassilakopoulos TP, et al. Bcl-2 expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's disease predicts a poorer prognosis in patients treated with ABVD or equivalent regimens. *Blood* 2002; 100: 3935-3941.
18. Vassalo J, Metze K, Traina F, et al. The prognostic relevance of apoptosis-related proteins in classical Hodgkin's lymphomas. *Leuk Lymphoma* 2003; 44: 483-488.
19. Montalban C, Garcia JF, Abaira V, et al. Influence of biologic markers on the outcome of Hodgkin's lymphoma: a study by the Spanish Hodgkin's Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1664-1673.
20. Kim LH, Nadarajah VS, Peh SC, et al. Expression of the bcl-2 family members and presence Epstein-Barr virus in the regulation of cell growth and death in classical Hodgkin's lymphoma. *Histopathology* 2004; 44: 257-267.
21. Durkop H, Hirsch B, Hahn C, et al. cIAP2 is highly expressed in Hodgkin and Reed-Sternberg cells and inhibits apoptosis by interfering with constitutively active caspase-3. *J Mol Med* 2005; 2: 277-288.
22. Opferman JT, Korsmeyer SJ. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat Immunol* 2003; 4: 410-415.
23. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004; 116: 205-219.
24. Thomas RK, Re D, Wolf J, et al. Part I: Hodgkin's lymphoma – molecular biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Lancet Oncol* 2004; 5: 11-18.
25. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. International Agency for Research on Cancer. Lyon, 2008; 4<sup>th</sup> Edition: 322-334.
26. Αγνάντη ΝΙ, Μήτση-Μαλάλμου ΒΔ, Στεφάνου ΔΓ, και συν. Ειδική Παθολογική Ανατομική. Εκδόσεις Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, 1999; Μέρος 1: 249-289.
27. Mueller N. Hodgkin's disease. In: Schnottenfeld D, Fraumeni J (Eds). *Cancer epidemiology and prevention*, Vol 2. New York: Oxford University Press 1992: 877.
28. van Sprosen DJ, Peh SC, Vrints LW, et al. Clinical drug-resistant nodular sclerosing Hodgkin's lymphoma is associated with decreased bcl-2 expression in the Reed-Sternberg cells. *Histopathology* 2000; 37: 420-426.

29. Bai M, Panoulas V, Papoudou-Bai A, Horianopoulos N, et al. B-cell differentiation immunophenotypes in classical Hodgkin lymphomas. *Leukemia & Lymphoma* 2006; 47(3): 495-501.
30. Schwering I, Bräuninger A, Klein U, et al. Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin's lymphoma. *Blood* 2003; 101: 1505-1512.
31. Re D, Küppers R, Diehl V. Molecular pathogenesis of Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2005; 23: 6379-6386. (b)
32. Re D, Müschen M, Ahmadi T, et al. Oct-2 and Bob-1 deficiency in Hodgkin and Reed Sternberg cells. *Cancer Res* 2001; 61: 2080-2084.
33. Jundt F, Anagnostopoulos I, Förster R, et al. Activated Notch1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma. *Blood* 2002; 99: 3398-3403.
34. Bai M, Papoudou-Bai A, Horianopoulos N, et al. Cell cycle and apoptosis deregulation in classical Hodgkin lymphomas. *In Vivo* 2005 Mar- Apr; 19 (2):439-453.
35. Poppema S. Immunobiology and pathophysiology of Hodgkin lymphomas. *Hematology Am Soc Hematol Educ* 2005; 231-238.
36. Bräuninger A, Schmitz R, Bechtel D, et al. Molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer* 2006; 118: 1853-1861.
37. Marafioti T, Hummel M, Foss HD, et al. Hodgkin and Reed-Sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription. *Blood* 2000; 95:1443-1450.
38. Braeuninger A, Küppers R, Strickler JG, et al. Hodgkin and Reed-Sternberg cells in lymphocyte predominant Hodgkin's disease represent clonal populations of germinal center-derived tumor B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 9337-9342.
39. Marafioti T, Hummel M, Anagnostopoulos I, et al. Origin of nodular lymphocyte- predominant Hodgkin's disease from a clonal expansion of highly mutated germinal- center B cells. *N Engl J Med* 1997; 337: 453- 458.
40. Kanzler H, Küppers R, Hansmann ML, et al. Hodgkin's and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J Exp Med* 1996; 184: 1495- 1505.
41. Küppers R, Rajewsky K, Zhao M, et al. Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 10962-10966.
42. Küppers R, Zhao M, Hansmann ML, et al. Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *EMBO J* 1993; 12: 4955-4967.

43. Küppers R. Molecular biology of Hodgkin's lymphoma. *Adv Cancer Res* 2002; 84: 277-312.
44. Rajewski K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 1996; 381: 751-758.
45. Müschen M, Rajewsky K, Brauning A, et al. Rare occurrence of classical Hodgkin's disease as a T cell lymphoma. *J Exp Med* 2000; 191: 387-94.
46. Seitz V, Hummel M, Maraffioti T, et al. Detection of clonal T-cell receptor gamma-chain gene rearrangements in Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's disease. *Blood* 2000; 95: 3020-3024.
47. Okada H, Mak TW. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nature Reviews, Cancer* 2004; 4: 592-603.
48. Brown JM, Wouters BG. Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents. *Cancer Res* 1999; 59: 1391-1399.
49. Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, et al. Cyclin-dependent kinase-1: linking apoptosis to cell cycle and mitotic catastrophe. *Cell Death Differ* 2002; 9: 1287-1293.
50. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995; 146: 3-15.
51. Lockshin RA, Zakeri Z. Caspase-independent cell deaths. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14: 727-733.
52. Narita M, Nunez S, Heard E, et al. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 2003; 113: 703-716.
53. Campisi J. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol* 2001; 11: S27-S31.
54. Alcorta DA, Xiong Y, Phelps D, et al. Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 13742-13747.
55. Kamijo T, Zindy F, Roussel MF, et al. Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* 1997; 91: 649-659.
56. Sage J, Miller AL, Perez-Mancera PA, et al. Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry. *Nature* 2003; 424: 223-228.
57. Slein GH, Drullinger LF, Soulard A, et al. Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol Cell Biol*. 1999; 19: 2109-2117.
58. Kamijo T, Bodner S, van de Kamp E, et al. Tumor spectrum in ARF-deficient mice. *Cancer Res* 1999; 59: 2217-2222.
59. Serrano M, Lee H, Chin L, et al. Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* 1996; 85: 27-37.
60. Donehower LA, Harvey M, Slaque BL, et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 1992; 356: 215-221.

61. Sharpless NE, Bardees Y N, Lee KH, et al. Loss of p16/INK4a with retention of p19/ARF predisposes mice to tumorigenesis. *Nature* 2001; 413: 86-91.
62. Krimpenfort P, Quon KC, Mooi WJ, et al. Loss of p16/INK4a confers susceptibility to metastatic melanoma in mice. *Nature* 2001; 413: 83-86.
63. Klionsky DJ, Ohsumi Y. Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999; 15: 1-32.
64. Kim J. & Klionsky DJ. Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. *Annu Rev. Biochem.* 2000; 69: 303-342.
65. Liang XH, Jackson S, Seaman M, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 1999; 402: 672-676.
66. Abraham RT. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev.* 2001; 15: 2177-2196.
67. Hermeking H. et al. 14-3-3 $\sigma$  is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell* 1997; 1: 3-11.
68. Chan TA, Hermeking H, Lengauer C, et al. 14-3-3 $\sigma$  is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* 1999; 401: 616-620.
69. Kawabe T, Suganuma M, Ando T, et al. Cdc25C interacts with PCNA at G2/M transition. *Oncogene* 2002; 21: 1717-1726.
70. Celeste A, Petersen S, Romanienko PJ, et al. Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* 2002; 296: 922-927.
71. Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Celeste A, et al. DNA damage-induced G2/M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1. *Nature Cell Biol* 2002; 4: 993-997.
72. DiTullio RA, Mochan TA, Venere M, et al. 53BP1 functions in an ATM-dependent checkpoint pathway that is constitutively activated in human cancer. *Nature Cell Biol* 2002; 4: 998-1002.
73. Wang B, Matsuoka S, Carpenter PB, et al. 53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint. *Science* 2002; 298: 1435-1438.
74. Ward IM, Minn K, van Deursen J, et al. p53 Binding Protein 53BP1 is required for DNA damage responses and tumor suppression in mice. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 2556-2563.
75. Stewart GS, Wang B, Bignell CR, et al. MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature* 2003; 421: 961-966.
76. Lou Z, Minter-Dykhouse K, Wu X, et al. MDC1 is coupled to activated CHK2 in mammalian DNA response pathways. *Nature* 2003; 421: 957-961.
77. Ellis RE, Yuan JY, Horvitz HR. Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* 1991; 7: 663-698.
78. Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell* 1997; 88: 347-354.
79. Cory S. & Adams JM. The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews. Cancer* 2002; 2: 647-656.

80. Cory S, Vaux DL, Strasser A, et al. Insights from Bcl2 and Myc: malignancy involves abrogation of apoptosis as well as sustained proliferation. *Cancer Res* 1999; 59: S1685-S1692.
81. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57- 70.
82. Green DR, Evan GI. A matter of life and death. *Cancer Cell* 2002; 1: 19-30.
83. Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 2002; 108: 153-164.
84. Krammer PH. CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv Immunol* 1999; 71: 163-210.
85. Schmitz I, Kirchhof S, Krammer PH. Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32: 1123-1136.
86. Köhler C, Orrenius S, Zhivotovsky B. Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. *Journal of Immunological Methods* 2002; 265: 97-110.
87. Borner C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol* 2003; 39: 615-647.
88. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996; 87: 171.
89. Samali A, Zhivotovsky B, Jones D, et al. Apoptosis: cell death defined by caspase activation. *Cell Death Differ* 1999; 6: 495-496.
90. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-1316.
91. Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, et al. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 $\beta$  processing in monocytes. *Nature* 1992; 356: 768-774.
92. Ishizaki Y, Jacobson MD, Raff MC. A role for caspases in lens fiber differentiation. *J Cell Biol* 1998; 140: 153-158.
93. Kennedy NJ, Kataoka T, Tschopp J, et al. Caspase activation is required for T-cell proliferation. *J Exp Med* 1999; 190: 1891-1895.
94. Weil M, Raff MC, Braga VMM. Caspase activation in the terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *Curr Biol* 1999; 9: 361-364.
95. Fadeel B, Orrenius S, Zhivotovski B. The most unkindest cut of all: on the multiple roles of mammalian caspases. *Leukemia* 2000; 14: 1514-1525.
96. Talanian RV, Quinlan C, Trautz S, et al. Substrate specificities of caspase family proteases. *J Biol Chem* 1997; 272: 9677-9688.
97. Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, et al. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. *J Biol Chem* 1997; 272: 17907-17911.
98. Salvesen GS, Dixit VM. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 10964-10967.
99. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 1999; 68: 383-424.

100. van Gurp M, Festjens N, van Loo G, et al. Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem Biophys Res Comm* 2003; 304: 487-497.
101. Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 1998; 391: 96-99.
102. Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 2000; 407: 789-795.
103. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001; 104: 487-504.
104. Screaton G, Xu XN. T-cell life and death signalling via TNF-receptor family members. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 316-322.
105. Yang JK. FLIP is an anti-cancer therapeutic target. *Yonsei Med J* 2008; 49(1): 19-27.
106. Coultas L, Strasser A. The role of the Bcl-2 protein family in cancer. *Seminars in cancer biology* 2003; 13: 115-123.
107. Sprick MR, Weigand MA, Rieser E, et al. FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity* 2000; 12: 599-609.
108. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signalling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 1995; 14: 5579-5588.
109. Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A, et al. Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem* 2001; 276: 46639-46646.
110. Altieri DC. Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nature Reviews Cancer* 2003; 3: 46-54.
111. Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 401-410.
112. Huang HK, Joazeiro CA, Bonfoco E, et al. The inhibitor of apoptosis c-IAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes in vitro monoubiquitination of caspases 3 and 7. *J Biol Chem* 2000; 275: 26659-26670. (1-4).
113. Suzuki Y, Nakabayashi Y, Takahashi R. Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 8662-8667.
114. Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 2002; 9: 459-470.
115. Birkey Reffey S, Wurthner JU, Parks WT, et al. X-linked inhibitor of apoptosis protein functions as a cofactor in transforming growth factor- $\beta$  signalling. *J Biol Chem* 2001; 276: 26542-26549.
116. Sanna MG, et al. IAP suppression of apoptosis involves distinct mechanisms: the TAK1/JNK1 signaling cascade and caspase inhibition. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 1754-1766.

117. Kashkar H, Haefs C, Shin H, et al. XIAP-mediated caspase inhibition in Hodgkin's lymphoma-derived B cells. *J Exp Med* 2003; 198(2): 341-347.
118. Stennicke HR, Ryan CA, Salvesen GS. Reprieve from execution: the molecular basis of caspase inhibition. *Trends Biochem Sci* 2002; 27:94-101.
119. Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13: 239-252.
120. Yamamoto S, Seta K, Morisco C, et al. Chelerythrine rapidly induces apoptosis through generation of reactive oxygen species in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33: 1829-1848.
121. Papapetropoulos A, Fulton D, Mahboubi K, et al. Angiopoietin-1 inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/survivin pathway. *J Biol Chem* 2000; 275: 9102-9105.
122. Aoki Y, Feldman GM, Tosato G. Inhibition of STAT3 signaling induces apoptosis and decreases survivin expression in primary effusion lymphoma. *Blood* 2003; 101: 1535-1542.
123. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nature Med* 1997; 3: 917-921.
124. Li F, Ambrosini G, Chu EY, et al. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 1998; 396: 580-584.
125. Mahotka C, Wenzel M, Springer E, et al. Survivin- $\Delta$ Ex3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different anti-apoptotic properties. *Cancer Res* 1999; 59: 6097-6102.
126. Tamm I, Wang Y, Sausville E, et al. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res* 1998; 58: 5315-5320.
127. Suzuki A, Ito T, Kawano H, et al. Survivin initiates procaspase 3/p21 complex formation as a result of interaction with Cdk4 to resist Fas-mediated cell death. *Oncogene* 2000; 19: 1346-1353.
128. Chen J, Wu W, Tahir SK, et al. Down-regulation of survivin by antisense oligonucleotides increases apoptosis, inhibits cytokinesis and anchorage of-independent growth. *Neoplasia* 2000; 2: 235-241.
129. Olie RA, Simoes-Wust AP, Bauman B, et al. A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy. *Cancer Res* 2000; 60: 2805-2809.
130. Conway EM, Pollefeyt S, Cornelissen J, et al. Three differentially expressed survivin cDNA variants encode proteins with distinct antiapoptotic functions. *Blood* 2000; 95: 1435-1442.
131. Shin S, Sung BJ, Cho YS, et al. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7. *Biochemistry* 2001; 40: 1117-1123.
132. Verdecia MA, Huang H, Dutil E, et al. Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement. *Nature Struct Biol* 2000; 7: 602-608.



133. Grossman D, Kim PJ, Blanc-Brude OP, et al. Transgenic expression of survivin in keratinocytes counteracts UVB-induced apoptosis and cooperates with loss of p53. *J Clin Invest* 2001; 108: 991-999.
134. O'Connor DS, Grossman D, Plescia J, et al. Regulation of apoptosis at cell division by p34/cdc2 phosphorylation of survivin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 13103-13107.
135. Mesri M, Wall NR, Li J, et al. Cancer gene therapy using a survivin mutant adenovirus. *J Clin Invest* 2001; 108: 981-990.
136. O'Connor DS, Wall NR, Porter AC, et al. A p34(cdc2) survival checkpoint in cancer. *Cancer Cell* 2002; 2: 43-54.
137. Kobayashi K, Hatano M, Otaki M, et al. Expression of a murine homologue of the inhibitor of apoptosis protein is related to cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 1457-1462.
138. Adida C, Crotty PL, McGrath J, et al. Developmentally regulated expression of the novel anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. *Am J Pathol* 1998; 152: 43-49.
139. Fukuda S, Pelus LM. Regulation of the inhibitor-of-apoptosis family member survivin in normal cord blood and bone marrow CD34(+) cells by hematopoietic growth factors: implication of survivin expression in normal hematopoiesis. *Blood* 2001; 98: 2091-2100.
140. Carter BZ, Milella M, Altieri DC, et al. Cytokine-regulated expression of survivin in myeloid leukemia. *Blood* 2001; 97: 2784-2790.
141. Gianani R, Jarboe E, Orlicky D, et al. Expression of survivin in normal, hyperplastic and neoplastic colonic mucosa. *Hum Pathol* 2001; 32: 119-125.
142. Zhang T, Otevrel T, Gao Z, et al. Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 8664-8667.
143. Garcia JF, Villuendas R, Sanchez-Beato M, et al. Nucleolar p14(ARF) overexpression in Reed-Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma: absence of p14(ARF)/Hdm2 complex is associated with expression of alternatively spliced Hdm2 transcripts. *Am J Pathol* 2002; 160: 569-578.
144. Grossman D, McNiff JM, Li F, et al. Expression and targeting of the apoptosis inhibitor, survivin, in human melanoma. *J Invest Dermatol* 1999; 113: 1076-1083.
145. Mirza A, McQuirk M, Hockenberry TN, et al. Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene* 2002; 21: 2613-2622.
146. Hoffman WH, Blade S, Zilfou JT, et al. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J Biol Chem* 2001; 277: 3247-3257.
147. Zhou M, Gu L, Li F, et al. DNA damage induces a novel p53-survivin signalling pathway regulating cell cycle and apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 303: 124-131.

148. Bagnoli M, Canevari S, Mezzanzanica D. Cellular FLICE-inhibitory protein (cFLIP) signalling: a key regulator of receptor-mediated apoptosis in physiologic context and in cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; 42(2): 210-213.
149. Safa AR, Day TW, Wu CH. Cellular FLICE-like inhibitory protein (C-FLIP): a novel target for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2008; 8(1): 37-46.
150. Hernandez A, Wang QD, Schwartz SA, Evers BM. Sensitization of human colon cancer cells to TRAIL-mediated apoptosis. *J Gastrointest Surg* 2001; 5: 56-65.
151. Nam SY, Jung GA, Hur GC, et al. Upregulation of FLIP(S) by Akt, a possible inhibition mechanism of TRAIL-induced apoptosis in human gastric cancers. *Cancer Sci* 2003; 94: 1066-1073.
152. Mori T, Doi R, Toyoda E, et al. Regulation of the resistance to TRAIL-induced apoptosis as a new strategy for pancreatic cancer. *Surgery* 2005; 138: 71-78.
153. Dutton A, O'Neil JD, Mielner AE, et al. Expression of the cellular FLICE (c-FLIP) protects Hodgkin's lymphoma cells from autonomous Fas-mediated death. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 6611-6616.
154. Griffith TS, Chin WA, Jackson GC, et al. Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells. *J Immunol* 1998; 161: 2833-2840.
155. Abedini MR, Qiu Q, Yan X, et al. Possible role of FLICE-like inhibitory protein (FLIP) in chemoresistant ovarian cancer cells in vitro. *Oncogene* 2004; 23: 6997-7004.
156. Mezzanzanica D, Balladore E, Turatti F, et al. CD95-mediated apoptosis is impaired at receptor level by cellular FLICE-inhibitory protein (long form) in wild-type p53 human ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 5202-5214.
157. Siegmund D, Hadwiger P, Pfinzemaier K, et al. Selective inhibition of FLICE-like inhibitory protein expression with small interfering RNA oligonucleotides is sufficient to sensitize tumor cells for TRAIL-induced apoptosis. *Mol Med* 2002; 8: 725-732.
158. Ricci MS, Jin Z, Dews M, et al. Direct repression of FLIP expression by c-myc is a major determinant of TRAIL sensitivity. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 8541-8546.
159. Kim K, Fisher MJ, Xu SQ, et al. Molecular determinants of response to TRAIL in killing of normal and cancer cells. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 335-346.
160. Zhao X, Qiu W, Kung J, et al. Bortezomib induces caspase-dependent apoptosis in Hodgkin lymphoma cell lines and is associated with reduced c-FLIP expression: a gene expression profiling study with implications for potential combination therapies. *Leuk Res* 2008; 32(2): 275-285.
161. Thomas RK, Kallenborn A, Wickenhauser C, et al. Constitutive expression of c-FLIP in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Am J Pathol* 2002; 160: 1521-1528.
162. Yang JK, Wang L, Zheng L, et al. Crystal structure of MC159 reveals molecular mechanism of DISC assembly and FLIP inhibition. *Mol Cell* 2005; 20: 939-949.
163. Yeh WC, Itie A, Elia AJ, et al. Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development. *Immunity* 2000; 12: 633-642.

164. Goltsev YV, Kovalenko AV, Arnold E, et al. CASH, a novel caspase homologue with death effector domains. *J Biol Chem* 1997; 272: 19641-19649.
165. Inohara N, Koseki T, Hu Y, et al. CLARP, a death effector domain-containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 10717-10722.
166. Shu HB, Halpin DR, Goeddel DV. Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis. *Immunity* 1997; 6: 751-763.
167. Chang DW, Xing Z, Pan Y, et al. c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD-95 mediated apoptosis. *EMBO J* 2002; 21: 3704-3714.
168. Fricker N, Beaudouin J, Richter P, et al. Model based dissection of CD95 signalling dynamics reveals both a pro- and antiapoptotic role of c-FLIP. *J Cell Biol* 2010; 190(3): 377-389.
169. Kataoka T, Budd RC, Holler N, et al. The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kappaB and Erk signalling pathways. *Curr Biol* 2000; 10: 640-648.
170. Hu WH, Johnson H, Shu HB. Activation of NF-kappaB by FADD, Casper, and caspase-8. *J Biol Chem* 2000; 275: 10838-10844.
171. Golks A, Brenner D, Krammer PH, et al. The c-FLIP-NH2 terminus (p22-FLIP) induces NF-kappaB activation. *J Exp Med* 2006; 203: 1295-1305.
172. Chaudhary PM, Eby MT, Jasmin A, et al. Activation of the NF-kappaB pathway by caspase 8 and its homologs. *Oncogene* 2000; 19: 4451-4460.
173. Park SJ, Kim YY, Ju JW, et al. Alternative splicing variants of c-FLIP transduce the differential signal through the Raf or TRAF2 in TNF-induced cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 289: 1205-1210.
174. Gross A, Yin XM, Wang K, et al. Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem* 1999; 274: 1156-1163.(a)
175. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13: 1899-1911.
176. von Ahsen O, Renken C, Perkins G, et al. Preservation of mitochondrial structure and function after Bid- or Bax-mediated cytochrome c release. *J Cell Biol* 2000; 150: 1027-1036.
177. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 2001; 15: 2922-2933.
178. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 1999; 341: 233-249.
179. Patterson SD, Spahr CS, Daugas E, et al. Mass spectrometric identification of proteins released from mitochondria undergoing permeability transition. *Cell Death Differ* 2000; 7: 137-144.
180. van Loo G, Demol H, van Gurp M, et al. A matrix-assisted laser desorption ionization post-source decay (MALDI-PSD) analysis of proteins released from

- isolated liver mitochondria treated with recombinant truncated Bid. *Cell Death Differ* 2002; 9: 301-308.
181. van Loo G, van Gurp M, Depuydt B, et al. The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ* 2002; 9: 20-26.
  182. van Loo G, Schotte P, van Gurp M, et al. Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ* 2001; 8: 1136-1142.
  183. Li P, Nijhavan D, Budihardjo I, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; 91: 479-489.
  184. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, et al. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997; 275: 1132-1136.
  185. Yang J, Liu X, Bhalla K, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997; 275: 1129-1132.
  186. Acehan D, Jiang X, Morgan DC, et al. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* 2002; 9: 423-432.
  187. Saleh A, Srinivasula SM, Acharya C, et al. Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a pre-requisite for procaspase-9 activation. *J Biol Chem* 1999; 274: 17941-17945.
  188. Zou H, Li Y, Liu X, et al. An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates pro-caspase-9. *J Biol Chem* 1999; 274: 11549-11556.
  189. Adrain C, Slee EA, Harte MT, et al. Regulation of apoptotic protease activating factor-1 oligomerization and apoptosis by the WD-40 repeat region. *J Biol Chem* 1999; 274: 20855-20860.
  190. Hu Y, Ding L, Spencer DM, et al. WD-40 repeat region regulates Apaf-1 self association and procaspase-9 activation. *J Biol Chem* 1998; 273: 33489-33494.
  191. Hu Y, Benedict MA, Ding L, et al. Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *EMBO J* 1999; 18: 3586-3595.
  192. Rodriguez J, Lazebnik Y. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev* 1999; 13: 3179-3184.
  193. Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, et al. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J* 1998; 17: 2215-2223.
  194. Ekert PG, Silke J, Vaux DL. Caspase inhibitors. *Cell Death Differ* 1999; 6: 1081-1086.

195. Du C, Fang M, Li Y, et al. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000; 102: 33-42.
196. Srinivasula SM, Hegde R, Saleh A, et al. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* 2001; 410: 112-116.
197. Verhagen AM, Ekert PG, Pakousch M, et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000; 102: 43-53.
198. Hedge R, Srinivasula SM, Zhang Z, et al. Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem* 2002; 277: 432-438.
199. Martins LM, Iaccarino I, Tenev T, et al. The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. *J Biol Chem* 2002; 277: 439-444.
200. Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, et al. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* 2001; 8: 613-621.
201. Wu G, Chai J, Suber TL, et al. Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature* 2000; 408: 1008-1012.
202. Chai J, Shiozaki E, Srinivasula SM, et al. Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell* 2001; 104: 769-780.
203. Wilkinson JC, Cepero E, Boise LH, et al. Upstream regulatory role for XIAP in receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* 2004; 24 (16): 7003-7014.
204. Srinivasula SM, Gupta S, Datta P, et al. Inhibitor of apoptosis proteins are substrates for the mitochondrial serine protease Omi/HtrA2. *J Biol Chem* 2003; 278: 31469-31472.
205. Yang QH, Church-Hajduk R, Ren J, et al. Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis. *Genes Dev* 2003; 17: 1487-1496.
206. Yu SW, Wang H, Poitras MF, et al. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 2002; 297: 259-263.
207. Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, et al. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* 2000; 192: 571-580.
208. Lorenzo HK, Susin SA, Penninger J, et al. Apoptosis-inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ* 1999; 6: 516-524.
209. Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, et al. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis inducing factor. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 839-843.
210. Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 2001; 412: 95-99.
211. Susin SA, Lorenzo HK, Zanzami N, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999; 397: 441-446.

212. Melloni E, Averna M, Salamino F, et al. Acyl-CoA-binding protein is a potent m-calpain activator. *J Biol Chem* 2000; 275: 82-86.
213. Wang KK. Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci* 2000; 23: 20-26.
214. Chen M, He H, Zhan S, et al. Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion. *J Biol Chem* 2001; 276: 30724-30728.
215. Adams JM, Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci* 2001; 26: 61-66.
216. Puthalakath H, Strasser A. Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH-3-only proteins. *Cell Death Differ* 2002; 9: 505-512.
217. Borner C, Olivier R, Martinou I, et al. Dissection of functional domains in Bcl-2 $\alpha$  by site-directed mutagenesis. *Biochem Cell Biol* 1994; 72: 463-469.
218. Chittenden T, Flemington C, Houghton AB, et al. A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *EMBO J* 1995; 14: 5589-5596.
219. Farrow SN, Brown R. New members of the Bcl-2 family and their protein partners. *Curr Opin Genet Dev.* 1996; 6: 45-49.
220. Hanada M, Aime-Sempre C, Sato T, et al. Structure-function analysis of Bcl-2 protein: identification of conserved domains important for homodimerization with Bcl-2 and heterodimerization with Bax. *J Biol Chem* 1995; 270: 11962-11969.
221. Kelekar A, Thompson CB. Bcl-2 family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol* 1998; 8: 324-330.
222. Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 1994; 369: 321-323.
223. Aritomi M, Kunishima N, Inohara N, et al. Crystal structure of rat Bcl-Xl: implications for the function of the Bcl-2 protein family. *J Biol Chem* 1997; 272: 27886-27892.
224. Huang Q, Petros AM, Virgin HW, et al. Solution structure of a bcl-2 homolog from Kaposi sarcoma virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 3428-3433.
225. Muchmore SW, Sattler M, Liang H, et al. X-ray and NMR structure of human Bcl-Xl, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 1996; 381: 335-341.
226. Petros AM, Medek A, Nattesheim DG, et al. Solution structure of the anti-apoptotic protein Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 3012-3017.
227. Reed JC. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 1998; 17: 3225-3236.
228. Borner C. Diminished cell proliferation associated with the death-protective activity of Bcl-2. *J Biol Chem* 1996; 271: 12695-12698.
229. Huang DC, O'Reilly LA, Strasser A, et al. The anti-apoptosis function of Bcl-2 can be genetically separated from its inhibitory effect on cell cycle entry. *EMBO J* 1997; 16: 4628-4638.

230. Linette GP, Li Y, Roth K, et al. Cross talk between cell death and cell progression: BCL-2 regulates NFAT-mediated activation. *Pro Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9545-9552.
231. Mazel S, Burtrum D, Petrie HT. Regulation of cell division cycle progression by bcl-2 expression: a potential mechanism for inhibition of programmed cell death. *J Exp Med* 1996; 183: 2219-2226.
232. O'Reilly LA, Huang DC, Strasser A. The cell death inhibitor Bcl-2 and its homologues influence control of cell cycle entry. *EMBO J* 1996; 15: 6979-6990.
233. Wang JM, Chao JR, Chen W, et al. The anti-apoptotic gene mcl-1 is up-regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway through a transcription factor complex containing CREB. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 6195-6206.
234. Antonsson B. Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family "killer-proteins" and their victim, the mitochondrion. *Cell Tissue Res* 2001; 306: 347-361.
235. Sattler M, Liang H, Nettekheim D, et al. Structure of Bcl-Xl-Bak peptide complex: recognition between regulators and apoptosis. *Science* 1997; 275: 983-986.
236. Hunter JJ, Parslow TG. A peptide sequence from Bax that converts Bcl-2 into an activator of apoptosis. *J Biol Chem* 1996; 271: 8521-8524.
237. Wattenberg B, Lithgow T. Targeting of C-terminal (tail)-anchored proteins: understanding how cytoplasmic activities are anchored to intracellular membranes. *Traffic* 2001; 2: 66-71.
238. Nechushtan A, Smith CL, Lamensdorf I, et al. Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *J Cell Biol* 2001; 153: 1265-1271.
239. Suzuki M, Youle RJ, Tjandra N. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* 2000; 103: 645-654.
240. Nechushtan A, Smith CA, Hsu YT, et al. Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *The EMBO Journal* 1999; Vol.18 No.9: 2330-2341
241. Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as a central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 2000; 10: 369-377.
242. Hsu Y-T, Youle RJ. Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. *J Biol Chem* 1998; 273: 10777-10783.
243. Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B, et al. Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 11615-11623.
244. Mikhailov V, Mikhailova M, Pulkrabek DJ, et al. Bcl-2 prevents Bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* 2001; 276: 18361-18374.
245. Nakano K, Vousden KH. PUMA, a novel pro-apoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 2001; 7: 683-694.

246. Oda E, Ohki R, Murasawa H, et al. Noxa, a BH3-only member of the bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 2000; 288: 1053-1058.
247. Oda K, Arakawa H, Tanaka T, et al. p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell* 2000; 102: 849-862.
248. Griffiths GJ, Dubrez L, Morgan CP, et al. Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol* 1999; 144: 903-914.
249. Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, et al. tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev* 2000; 14: 2060-2071.
250. Lindsten T, Ross AJ, King A, et al. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members Bak and Bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell* 2000; 6: 1389-1399.
251. Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res* 1999; 59: S1701-S1706.
252. Zamzami N, Maise C, Métivier D, et al. Measurement of membrane permeability and permeability transition of mitochondria. *Methods Cell Biol* 2001; 65: 147-158.
253. Zamzami N, Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; Jan; 2(1):67-71.
254. Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* 1992; 80: 879-886.
255. Huang DC, Strasser A. BH-3-only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* 2000; 103: 839-842.
256. Lutz RJ. Role of the BH3 (Bcl-2 homology 3) domain in the regulation of apoptosis and Bcl-2-related proteins. *Biochem Soc Trans* 2000; 28: 51-56.
257. Han J, Flemington C, Houghton AB, et al. Expression of *bbc3*, a pro-apoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 11318-11969.
258. Wu X, Deng Y. Bax and BH3-domain-only proteins in p53-mediated apoptosis. *Front Biosci* 2002; 7: d151-d156.
259. Lakin ND, Jackson SP. Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene* 1999; 18: 7644-7655.
260. Sionov RV, Haupt Y. The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene* 1999; 18: 6145-6157.
261. Vousden KH. p53: death star. *Cell* 2000; 103: 691-694.
262. Samuels-Lev Y, O'Connor DJ, Bergamaschi D, et al. ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. *Mol Cell* 2001; 8: 781-794.
263. Hsieh JK, Chan FS, O'Connor DJ, et al. RB regulates the stability and the apoptotic function of p53 via MDM2. *Mol Cell* 1999; 3: 181-193.



264. Marchenko ND, Zaika A, Moll UM. Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem* 2000; 275: 16202-16212.
265. Chao C, Saito S, Kang J, et al. p53 transcriptional activity is essential for p53-dependent apoptosis following DNA damage. *EMBO J* 2000; 19: 4967-4975.
266. Jimenez GS, Nister M, Stommel JM, et al. A transactivation-deficient mouse model provides insights into Trp53 regulation and function. *Nat Genet* 2000; 26: 37-43.
267. Zha J, Harada H, Yang E, et al. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 1996; 87: 619-628.
268. Datta SR, Dudek H, Tao X, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997; 91: 231-241.
269. del Peso L, Gonzalez VM, Inohara N, et al. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 1997; 278: 687-689.
270. Wang HG, Rapp UR, Reed JC. Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. *Cell* 1996; 87: 629-638.
271. Datta SR, Katsov A, Hu L, et al. 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol Cell* 2000; 6: 41-51.
272. Harada H, Becknell B, Wilm M, et al. Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A. *Mol Cell* 1999; 3: 413-422.
273. Verma S, Zhao LJ, Chinnadurai G. Phosphorylation of the pro-apoptotic protein BIK: mapping of phosphorylation sites and effect on apoptosis. *J Biol Chem* 2001; 276: 4671-4676.
274. Li H, Zhu H, Hu CJ, et al. Cleavage of BID by caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway to apoptosis. *Cell* 1998; 94: 491-501.
275. Luo X, Budihardjo I, Zou H, et al. Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 1998; 94: 481-490.
276. Desagher S, Osen-Sand A, Nichols A, et al. Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol*. 1999; 144(5): 891-901.
277. Wang K, Yin X-M, Chao DT, et al. BID: a novel BH-3 domain-only death agonist. *Genes Dev*. 1996; 10: 2859-2869.
278. Madesh M, Antonsson B, Srinivasula S, et al. Rapid kinetics of tBid-induced cytochrome c and Smac/DIABLO release and mitochondrial depolarization. *J Biol Chem* 2002; 277: 5651-5669.
279. Desagher S, Osen-Sand A, Montessuit S, et al. Phosphorylation of Bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8. *Mol Cell* 2001; 8 (3): 601-611.

280. Santoro MF, Annand RR, Robertson MM, et al. Regulation of protein phosphatase A2 activity by caspase-3 during apoptosis. *J Biol Chem* 1998; 273: 13119-13128.
281. Puthalakath H, Huang DCS, O'Reilly LA, et al. The pro-apoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell* 1999; 3: 287-296.
282. Puthalakath H, Villunger A, O'Reilly LA, et al. Bmf: A pro-apoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science* 2001; 293: 1829-1832.
283. Bouillet P, Metcalf D, Huang DC, et al. Pro-apoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* 1999; 286: 1735-1738.
284. O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, et al. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J* 1998; 17: 384-395.
285. Harris CA, Johnson Jr EM. BH3-only Bcl-2 family members are coordinately regulated by the JNK pathway and require Bax to induce apoptosis in neurons. *J Biol Chem* 2001; 276: 37754-37760.
286. Bouillet P, Cory S, Zhang LC, et al. Degenerative disorders caused by Bcl-2 deficiency prevented by loss of its BH3-only antagonist Bim. *Dev Cell* 2001; 1: 645-653.
287. Conous S, Kaufmann T, Fellay I, et al. Bcl-2 is a monomeric protein: prevention of homodimerization by structural constraints. *EMBO J* 2000; 19: 1534-1544.
288. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 2000; 69: 217-24.
289. Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-XL-regulated apoptosis in T-cell development. *Int Immunol* 1997; 9: 1375-1384.
290. Cheng EH, Wei MC, Weiler S, et al. BCL-2 BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 2001; 8: 705-711.
291. Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, et al. BH3-only proteins that bind to pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev* 2001; 15: 1481-1486.
292. Sun XM, Bratton SB, Butterworth M. et al. Bcl-2 and Bcl-XL inhibit CD-95-mediated apoptosis by preventing mitochondrial release of Smac/DIABLO and subsequent inactivation of X-linked inhibitor of apoptosis protein. *The journal of biological chemistry* 2002; 277: 11345-11351.
293. Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerises in vivo with a conserved homologue, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; 74: 609-619.
294. Korsmeyer SJ. Bcl-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res* 1999; 59 (7): 1693s-1700s.
295. Stetler-Stevenson M, Crush-Stanton S, Cossman J. Involvement of of the Bcl-2 gene in Hodgkin's disease. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 855-858.

296. Schlaifer D, Krajewski S, Rigal-Huhuet F, et al. Bcl-X gene expression in Hodgkin's disease. *Leuk Lymphoma* 1996; 23: 143-146.
297. Schlaifer D, March M, Krajewski S, et al. High expression of the bcl-x gene in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *Blood* 1995; 85: 2671-2674.
298. Brousset P, Benharroch D, Krajewski S, et al. Frequent expression of the cell death-inducing gene Bax in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *Blood* 1996; 87: 2470-2475.
299. Xerri L, Parc P, Brousset P, et al. Predominant expression of the long isoform of Bcl-X (Bcl-xL) in human lymphomas. *Br J Haematol* 1996; 92: 900-906.
300. Lauritzen AF, Moller PH, Nedergaard T, et al. Apoptosis related genes and proteins in Hodgkin's disease. *APMIS* 1999; 107: 636-644.
301. Gravel S, Delsol G, Al Saati T. Single-cell analysis of the t(14;18)(q32;q21) chromosomal translocation in Hodgkin's disease demonstrates the absence of this translocation in neoplastic Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Blood* 1998; 91: 2866-2874.
302. Bhagat SK, Madeiros LJ, Weiss LM, et al. bcl-2 expression in Hodgkin's disease. Correlation with the t(14;18) translocation and the Epstein-Barr virus. *Am J Clin Pathol* 1993; 99:604-608.
303. Sarris AH, Jhanwar SC, Cabanillas F. Cytogenetics of Hodgkin's disease. In: Mauch PM, Armitage JO, Diehl V, Hoppe RT, Weiss LM, eds. *Hodgkin's Disease*. New York: Lippincott-Raven; 1999: 195-212.
304. Jiwa M, Kanavaros P, Van Der Valk P, et al. Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease express frequently c-myc and bcl-2 oncogene products independently of the presence of EBV. *J Clin Pathol* 1993; 46: 211-217.
305. Chetty R, Biddolph S, Kaklamanis L, et al. Relationship of EBV and bcl-2 in Hodgkin's disease. *Histopathology* 1995; 27: 391-394.
306. Kashkar H, Kronke M, Jurgensmeier JM. Defective Bax activation in Hodgkin B-cell lines confers resistance to staurosporine-induced apoptosis. *Cell Death and Differentiation* 2002; 9: 750-757.
307. Dukers DF, Meijer CJ, ten Berge RL, et al. High numbers of active caspase 3-positive Reed-Sternberg cells in pretreatment biopsy specimens of patients with Hodgkin's disease predict favorable clinical outcome. *Blood* 2002; 100: 36-42.
308. Stehlik C, de Martin R, Kumabashiri I, et al. Nuclear factor (NF)-kB-regulated X-chromosome-linked *iap* gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced apoptosis. *J Exp Med* 1998; 188: 211-216.
309. Fiumara P, Snell V, Li Y, et al. Functional expression of receptor activator of nuclear factor kB in Hodgkin's disease cell lines. *Blood* 2001; 98(9): 2784-2790.
310. Skinnider BF, Mak TW. The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2002; 99: 4283-4297.
311. Georgakis GV, Li Y, Rassidakis GZ, et al. Inhibition of the phosphatidylinositol-3/Akt promotes G1 cell cycle arrest and apoptosis in Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol* 2006; 132: 503-511.

312. Cochet O, Frelin C, Peyron JF, et al. Constitutive activation of STAT proteins in the HDLM-2 and L540 Hodgkin lymphoma-derived cell lines supports cell survival. *Cell Signal* 2006; 18: 449-455.
313. Chang F, Lee JT, Navolanic PM, et al. Involvement of PI3K/AKT pathway in cell cycle progression, apoptosis and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia* 2003; 17: 590-603.
314. Zheng B, Fiumara P, Li YV, et al. MEK/ERK pathway is aberrantly active in Hodgkin disease: a signalling pathway shared by CD30, CD40 and RANK that regulates cell proliferation and survival. *Blood* 2003; 102: 1019-1027.
315. Lipton SA, Bossy-Wetzel E. Dueling activities of AIF in cell death versus cell survival: DNA binding and redox activity. *Cell* 2002; 111: 147-150.
316. Craig RW. MCL1 provides a window on the role of BCL-2 family in cell proliferation, differentiation and tumorigenesis. *Leukemia* 2002; 16: 444-454.
317. Gil-Gomez G, Berns A, Brady HJ. A link between cell cycle and cell death: Bax and Bcl-2 modulate Cdk2 activation during thymocyte apoptosis. *EMBO J* 1998; 17: 7209-7218.
318. Janumyan YM, Sansam CG, Chattopadhyay A, et al. Bcl-Xl/bcl-2 coordinately regulates apoptosis, cell cycle arrest and cell cycle entry. *EMBO J* 2003; 22: 5459-5470.
319. Winter JN, Andersen J, Reed JC, 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: 1391-1398.
320. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumor resistance to apoptosis. *Nature Rev Cancer* 2002; 2: 277-288.

