

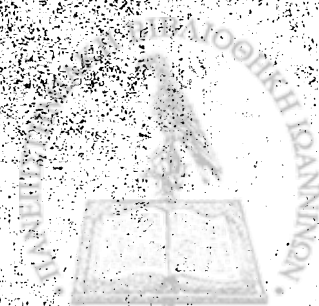
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



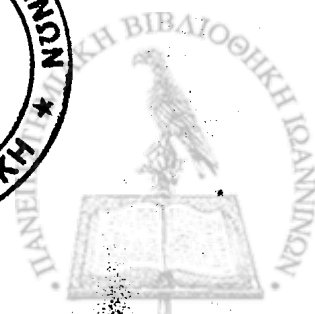
026000265301



12



Αρ. πρ.:.....1945.....2008.





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΝΙΚΗ Ι. ΑΓΝΑΝΤΗ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΣΧΕΣΕΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΤΗΣ ΙΣΤΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ
ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΔΙΑΧΥΤΩΝ Β-ΛΕΜΦΩΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΜΕΓΑΛΑ
ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕ ΤΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΩΝ ΤΟΥ
ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ, ΤΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΤΗΣ
ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΔΟΜΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΡΙΘΜΗΤΙΚΩΝ
ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΩΝ ΑΝΩΜΑΛΙΩΝ

ΑΓΓΕΛΟΣ ΣΚΥΡΛΑΣ
ΙΑΤΡΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2007



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



Ημερομηνία αίτησης του κ. Σκύρλα Άγγελου 27-9-2002

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 484^α/15-10-2002

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπουσα

Μπάη Μαρία Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας

Μέλη

Αγνάντη Νίκη, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας

Καναβάρος Παναγιώτης, Καθηγητής Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 29-10-2002

«Διερεύνηση των σχέσεων μεταξύ της ιστογενετικής προέλευσης των διάχυτων Β-λεμφωμάτων από μεγάλα κύτταρα με το πρότυπο έκφρασης διαταραχών του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης, το πρότυπο της αγγειογένεσης και τη παρουσία δομικών και αριθμητικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών »

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 601^α/27-3-2007

Αγνάντη Νίκη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων

Μαλάμου –Μήτση Βασιλική Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων

Καναβάρος Παναγιώτης Καθηγητής Ανατομίας που καλύπτει και την Ιστολογία-Εμβρυολογία, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων

Μπουραντάς Κωνσταντίνος Καθηγητής Παθολογίας -Αιματολογίας, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων

Μπάη Μαρία Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής του Παν/μίου Ιωαννίνων

Στεφάνου Δημήτριος Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας, της Ιατρικής Σχολής του Παν/μίου Ιωαννίνων.

Μπατιστάτου Άννα Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 12-7-2007

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Επαμεινώνδας Τσιάνος

Καθηγητής Παθολογίας





ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΕΘΝΙΚΗΣ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΕΠΕΑΕΚ

ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ
ΣΥΓΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ



Η ΠΑΙΔΕΙΑ ΣΤΗΝ ΚΟΡΥΦΗ
Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Εκπαίδευσης και Αρχικής
Επαγγελματικής Κατάρτισης

Η εργασία αυτή συγχρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση, στα πλαίσια του προγράμματος με τίτλο «ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ», του προγράμματος ΕΠΕΑΕΚ II του 3^{ου} Κοινοτικού Πλαισίου Στήριξης του ΥΠ.Ε.Π.Θ., με χρηματοδότηση κατά 25% από εθνικούς πόρους και κατά 75% από το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο (ΕΚΤ),

This research was co-funded by the European Union in the framework of the program "HRAKLEITOS" of the "Operational Program for Education and Initial Vocational Training" of the 3rd Community Support Framework of the Hellenic Ministry of Education, funded by 25% from national sources and by 75% from the European Social Fund (ESF).



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ θερμά όλους όσους με βοήθησαν να ξεκινήσω και να φέρω εις πέρας αυτή την εργασία και ιδιαίτερα:

Τα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής,

Την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας και επιστημονική υπεύθυνο της διατριβής μου κ. Μαρία Μπάη, την Καθηγήτρια και Διευθυντή του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομίας κ. Νίκη Αγνάντη και τον Καθηγητή Ανατομίας-Ιστολογίας και Εμβρυολογίας κ. Παναγιώτη Καναβάρο, για το καθημερινό τους ενδιαφέρον στη διάρκεια της ερευνητικής μου πορείας. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα εκλεκτά μέλη του εργαστηρίου μας, την Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας κ. Βασιλική Μαλάμου-Μήτση, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Παθολογικής Ανατομίας κ. Δημήτριο Στεφάνου, την Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας κ. Άννα Μπατιστάτου και την Λέκτορα Παθολογικής Ανατομίας κ. Άννα Γούσια για τη συμπαράσταση που μου έδειξαν κατά την διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής.

Τους εκλεκτούς φίλους και συνεργάτες,

Άντα Χριστοδούλου, Κώστα Χατζηστεργό, Ευτυχία Καπάτου, Κωνσταντίνα Γκρέπη, Χριστιάννα Ζαχαρίου, Κωνσταντίνα Ευσταθοπούλου, Σεβαστή Καμινά, Τσάνου Έλενα και Μιχάλη Αλεξίου, καθώς και όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής για την πολύτιμη στήριξη και βοήθεια τους.

Τέλος, ευχαριστώ τους γονείς μου Ιωάννη και Καλυψώ καθώς και τον αδελφό μου, Παναγιώτη, για την αμέριστη στήριξη τους καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.



ΑΦΙΕΡΩΝΕΤΑΙ

Με αγάπη και σεβασμό στην οικογένειά μου.



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα B-κύτταρα (Diffuse Large B-cell Lymphoma, DLBCL) είναι ο πιο συχνός τύπος μη-Hodgkin λεμφώματος στο δυτικό κόσμο και αντιστοιχεί στο 30-40% των μη- Hodgkin λεμφωμάτων. Εμφανίζει σημαντική ετερογονία όσον αφορά τα μορφολογικά, ανοσοφαινοτυπικά, κυτταρογενετικά, μοριακά και κλινικά χαρακτηριστικά. Μολονότι οι περισσότεροι ασθενείς ανταποκρίνονται αρχικά στη χημειοθεραπεία, το ήμισυ περίπου αυτών καταλήγουν από τη νόσο.

Πρόσφατες μελέτες cDNA και ολιγονουκλεοτιδικών μικροσυστοιχειών (oligonucleotid microarrays) ανέδειξαν τρεις μοριακά διακριτούς υπότυπους DLBCL : α) DLBCL με γονιδιακή έκφραση προσομοιάζουσα με αυτή των φυσιολογικών B-λεμφοκυττάρων του βλαστικού κέντρου (Germinal center B-cell like DLBCL, GCB-DLBCL), β) DLBCL με γονιδιακή έκφραση προσομοιάζουσα με αυτή in vitro ενεργοποιημένων B-λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος (activated B-cell like DLBCL, ABC-DLBCL), και γ) τύπου 3 (type 3 DLBCL) το οποίο δεν εκφράζει σε υψηλά επίπεδα γονίδια των δύο προηγούμενων υπότυπων. Ασθενείς με DLBCL του πρώτου μοριακού υπότυπου παρουσιάζουν ευνοϊκότερη πρόγνωση σε σχέση με αυτούς που ανήκουν στους δύο άλλους υπότυπους.

Μεταγενέστερες ανοσοιστοχημικές και κλινικές μελέτες έδειξαν ότι ο ανοσοφαινότυπος B-κυτταρικής διαφοροποίησης Bcl6/CD10/MUM1/CD138 μπορεί να προβλέψει την μοριακή ταξινόμηση των DLBCL σε σημαντικό ποσοστό περιπτώσεων. Επιπλέον, ευρήματα μοριακών και ανοσοιστοχημικών μελετών έδειξαν ότι η έκφραση γονιδίων B-κυτταρικής διαφοροποίησης επηρεάζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των DLBCL και ότι ο ιστολογικός αυτός τύπος λεμφώματος είναι ένα καλό μοντέλο μελέτης της λεμφωματογένεσης.

Έχοντας ως σκοπό την διερεύνηση των παθογενετικών μηχανισμών των ιστογενετικών υποτύπων των DLBCL, στη παρούσα εργασία αναλύθηκε ο ανοσοφαινότυπος της B-λεμφοκυτταρικής διαφοροποίησης Bcl6/CD10/MUM1/CD138 σε σχέση με την απόπτωση, τον κυτταρικό κύκλο, την αγγειογένεση, και τη πιθανή παρουσία δομικών ή/και αριθμητικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 ΔΙΑΧΥΤΟ Β-ΛΕΜΦΩΜΑ ΑΠΟ ΜΕΓΑΛΑ ΚΥΤΤΑΡΑ.....	1
1.1.1 Ορισμός.....	1
1.1.2 Επιδημιολογία.....	1
1.1.3 Εντόπιση και κλινική εικόνα.....	1
1.1.4 Αιτιολογία.....	2
1.1.5 Μορφολογικά χαρακτηριστικά.....	2
1.1.6 Ανοσοφαινότυπος.....	3
1.1.7 Φυσιολογικός ρόλος και έκφραση των πρωτεϊνών Β-κυτταρικής διαφοροποίησης BCL-6, CD10, MUM1, και CD138	4
1.1.8 Ιστογένεση του DLBCL	7
1.2 ΑΠΟΠΤΩΣΗ	9
1.2.1 Εξωγενές μονοπάτι της απόπτωσης.....	9
1.2.2 Ενδογενές ή μιτοχονδριακό μονοπάτι της απόπτωσης.....	11
1.2.3 Ρύθμιση της απόπτωσης	13
1.2.4 Οικογένεια πρωτεϊνών Bcl-2	13
1.3 ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ.....	19
1.4 Β-ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ, ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΣΤΑ DLBCL	25
1.5 ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ ΣΤΑ DLBCL.....	33
1.6 ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΣΤΑ DLBCL.....	37
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	41
3. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	43
3.1 Υλικό	43



3.2 Μέθοδοι	43
3.2.1 Μέθοδος LSAB	44
3.2.2 Μέθοδος TUNEL.....	46
3.2.3 Μέθοδος εκχύλισης πρωτεϊνών.....	47
3.2.4 Μέθοδος ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών.....	47
3.2.5 Μέθοδος SDS PAGE	48
3.2.6 Μέθοδος ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών.....	50
3.2.7 Μέθοδος ανοσοαποτύπωσης Western.....	50
3.2.8 Μέθοδος Πυκνομετρίας.....	51
3.2.9 Μέθοδος FISH	51
3.2.10 Στατιστική ανάλυση.....	53
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	55
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	75
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	87
7. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	89
8. ABSTRACT	93
9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	97



ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ



1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΔΙΑΧΥΤΟ Β-ΛΕΜΦΩΜΑ ΑΠΟ ΜΕΓΑΛΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

1.1.1 Ορισμός

Το διάχυτο Β-λέμφωμα από μεγάλα κύτταρα (Diffuse Large B-cell Lymphoma, DLBCL) ορίζεται σύμφωνα με την ταξινόμηση της WHO (World Health Organization), ως ο διάχυτος πολλαπλασιασμός μεγάλου μεγέθους νεοπλασματικών Β-λεμφοκυττάρων με μέγεθος πυρήνα ίσο ή και μεγαλύτερο από αυτό των φυσιολογικών μακροφάγων, ή μεγαλύτερο από το διπλάσιο ενός φυσιολογικού λεμφοκυττάρου. Οι πυρήνες των νεοπλασματικών κυττάρων παρουσιάζουν σημαντική ποικιλομορφία γενικά όμως χαρακτηρίζονται από φυσαλιδώδη χρωματίνη και εμφανή πυρήνα ενώ το κυτταρόπλασμα παρουσιάζει έντονη βασεοφιλία. Το DLBCL παρουσιάζει συνήθως υψηλό δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού και είναι ετερογενές όσο αναφορά τα μορφολογικά, μοριακά και γενετικά χαρακτηριστικά, τον ανοσοφαινότυπο, την κλινική εικόνα, και τη πρόγνωση.

1.1.2 Επιδημιολογία

Το DLBCL είναι ο πιο συχνός τύπος μη-Hodgkin λεμφώματος στο δυτικό κόσμο, και αντιστοιχεί στο 30-40% των μη-Hodgkin λεμφωμάτων. Στις αναπτυσσόμενες χώρες το ποσοστό αυτό φαίνεται να είναι υψηλότερο. Έχει διαπιστωθεί ότι η συχνότητα εμφάνισης νέων περιστατικών έχει αυξηθεί την τελευταία δεκαετία. Σύμφωνα με τα τελευταία δεδομένα της WHO, στην Ευρώπη σε απόλυτους αριθμούς το ποσοστό αυτό αντιστοιχεί σε 30.000 νέες περιπτώσεις ανά έτος. Η μέση ηλικία εμφάνισης της νόσου είναι η έβδομη δεκαετία ενώ η εμφάνιση της νόσου στη παιδική ηλικία δεν είναι σπάνια.

1.1.3 Εντόπιση και Κλινική Εικόνα

Το DLBCL μπορεί να εμφανίζει λεμφαδενική ή έξωλεμφαδενική (40% των περιπτώσεων) εντόπιση κατά την διάγνωση. Η πιο συχνή έξωλεμφαδενική εντόπιση είναι το γαστρεντερικό (στόμαχος ή ειλεοτυφλική περιοχή), ενώ οποιαδήποτε έξωλεμφαδενική θέση μπορεί να αποτελεί πρωτοπαθή εστία ανάπτυξης του λεμφώματος συμπεριλαμβανομένων του δέρματος, του κεντρικού νευρικού συστήματος, των οστών, των όρχεων, των μαλακών μορίων, των πνευμόνων, του ήπατος, του δακτυλίου του Waldeyer, και του σπληνός.

Οι περισσότεροι ασθενείς εμφανίζουν διόγκωση λεμφαδένα ή ταχέως αναπτυσσόμενη εξωλεμφαδενική μάζα, παρότι κατά τη διαδικασία της σταδιοποίησης διαπιστώνεται ότι οι περισσότεροι από αυτούς έχουν γενικευμένη νόσο.

Το DLBCL εμφανίζει επιθετική βιολογική συμπεριφορά αλλά είναι δυνητικά θεραπεύσιμη νόσος. Το 50% των ασθενών ανταποκρίνεται αρχικά σε χημειοθεραπευτικά σχήματα. Για τον καθορισμό της πρόγνωσης χρησιμοποιείτε το σύστημα IPI (International Prognostic Index), το οποίο στηρίζεται κυρίως σε κλινικές παραμέτρους. Έχει υπολογισθεί ότι το DLBCL ευθύνεται για 12.000 θανάτους ετησίως στην Ευρώπη

1.1.4 Αιτιολογία

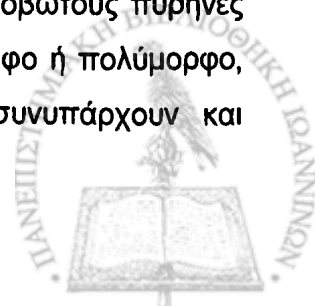
Ο αιτιολογικός παράγοντας του DLBCL παραμένει αδιευκρίνιστος. Η νόσος εμφανίζεται συνήθως de novo (πρωτοπαθές λέμφωμα), ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να αποτελεί τη μετάπτωση λιγότερο επιθετικών λεμφωμάτων (δευτεροπαθές λέμφωμα), όπως της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας/λεμφώματος μικρών λεμφοκυττάρων, του θυλακιώδους λεμφώματος, του Β-λεμφώματος οριακής ζώνης, και του οζώδους λεμφοεπικρατικού τύπου του Hodgkin λεμφώματος. Η ανοσοανεπάρκεια είναι σημαντικός παράγοντας κινδύνου ενώ ο ιός Epstein-Barr ανιχνεύεται στα νεοπλασματικά κύτταρα του όγκου κυρίως σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς.

1.1.5 Μορφολογικά χαρακτηριστικά και μορφολογικές ποικιλίες

Το DLBCL αποτελείται από μεγάλου μεγέθους μεταμορφωμένα Β-λεμφοκύτταρα (μέση διάμετρος $\geq 20\mu\text{m}$) με βασεόφιλο κυτταρόπλασμα και υποστρόγγυλους πυρήνες με εμφανή μονήρη ή πολλαπλά πυρήνεια. Τα νεοπλασματικά κύτταρα συνήθως αναπτύσσονται διάχυτα και εμφανίζουν υψηλό μιτωτικό δείκτη. Η κατάργηση της αρχιτεκτονικής δομής του λεμφαδένα μπορεί να είναι πλήρης, μερική, ενδοθυλακιώδης, ή λιγότερο συχνά ενδοκολπική, ενώ ο περιλεμφαδενικός ιστός είναι συχνά διηθημένος.

Σύμφωνα με την ταξινόμηση της WHO υπάρχουν τέσσερις μορφολογικές ποικιλίες διάχυτου Β-λεμφώματος από μεγάλα κύτταρα: το κεντροβλαστικό, το ανοσοβλαστικό, με άφθονα Τ-λεμφοκύτταρα/ιστιοκύτταρα, και το αναπλαστικό.

Η μορφολογική ποικιλία του κεντροβλαστικού DLBCL αποτελείται από κεντροβλάστες (μεγάλου μεγέθους Β-λεμφοκύτταρα με ωοειδής ή υποστρόγγυλους πυρήνες, λεπτοκοκκιώδη χρωματίνη και 2-4 πυρήνεια προσκολλημένα στη πυρηνική μεμβράνη). Σε ορισμένες περιπτώσεις οι κεντροβλάστες έχουν πολυλοβωτούς πυρήνες (πολυλοβωτές κεντροβλάστες). Το λέμφωμα μπορεί να είναι μονόμορφο ή πολύμορφο, δηλαδή να αποτελείται αποκλειστικά από κεντροβλάστες ή να συνυπάρχουν και ανοσοβλάστες.



Η μορφολογική ποικιλία του ανοσοβλαστικού λεμφώματος αποτελείται κυρίως (>90%) από ανοσοβλάστες (μεγάλου μεγέθους Β-λεμφοκύτταρα με ωοειδής ή υποστρόγγυλους πυρήνες και μονήρη κεντρικά τοποθετημένα πυρήνεια). Ανοσοβλάστες και κύτταρα με πλασματοκυτταροειδή διαφοροποίηση είναι δυνατόν να συνυπάρχουν.

Η μορφολογική ποικιλία του DLBCL με άφθονα Τ-λεμφοκύτταρα/ιστιοκύτταρα χαρακτηρίζεται από τη παρουσία πολυάριθμων μη νεοπλασματικών Τ-λεμφοκυττάρων και ιστιοκυττάρων, ενώ ο νεοπλασματικός πληθυσμός αντιστοιχεί σε ποσοστό μικρότερο του 10% του συνόλου των κυττάρων. Τα νεοπλασματικά Β-λεμφοκύτταρα είναι μεγάλου μεγέθους, έχουν μορφολογικά χαρακτηριστικά κεντροβλαστών και ανοσοβλαστών και σε ορισμένες περιπτώσεις προσομοιάζουν μορφολογικά με κύτταρα Reed-Sternberg. Η κατάργηση της αρχιτεκτονικής δομής είναι συνήθως διάχυτη, σε σπάνιες όμως περιπτώσεις αυτή μπορεί να είναι οζώδης.

Η μορφολογική ποικιλία του αναπλαστικού DLBCL χαρακτηρίζεται από τη παρουσία μεγάλου μεγέθους υποστρόγγυλων ή πολυγωνικών νεοπλασματικών Β-λεμφοκυττάρων με πλειόμορφους πυρήνες που συχνά προσομοιάζουν αυτούς των κυττάρων Reed-Sternberg του λεμφώματος Hodgkin.

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η μορφολογική ταξινόμηση του DLBCL παρουσιάζει χαμηλή αναπαραγωγιμότητα και δεν συσχετίζεται με ανοσοφαινοτυπικές ή γενετικές παραμέτρους

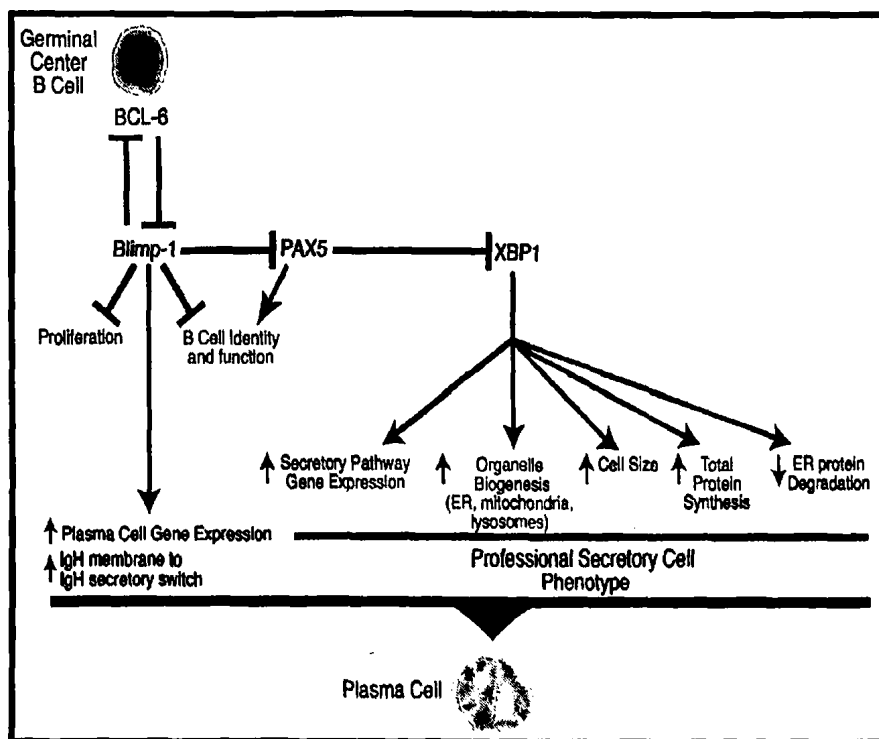
1.1.6 Ανοσοφαινότυπος

Τα ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά του DLBCL έχουν αποτέλεσει αντικείμενο πολλών μελετών. Πλήθος πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε διάφορα βιολογικά μονοπάτια έχουν μελετηθεί σε αυτό τον τύπο λεμφώματος όπως πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση, πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη μεταγωγή σημάτων, μεταγραφικοί παράγοντες, προσκολυτικά μόρια καθώς και δείκτες Β-κυτταρικής διαφοροποίησης.

Τα νεοπλασματικά κύτταρα του DLBCL συνήθως εκφράζουν τον δείκτη CD45 (κοινό λεμφοκυτταρικό αντιγόνο) και δείκτες Β-κυτταρικής διαφοροποίησης όπως CD19, CD20, CD22, Pax5 και CD79a. Έχει περιγραφεί απώλεια ενός ή περισσότερων Β-κυτταρικών δεικτών, όπως απώλεια του CD20 αντιγόνου σε DLBCL με ανοσοβλαστική ή πλασμαβλαστική διαφοροποίηση. Σε ιστολογικές τομές παραφίνης ως δείκτες Β-κυτταρικής διαφοροποίησης χρησιμοποιούνται κυρίως τα αντισώματα L26 (anti-CD20), JCB117 (anti-79a), και Pax5/BSAP (B-cell Specific Activator Protein).

Επιφανειακές ή/και κυτταροπλασματικές ανοσοσφαιρίνες (immunoglobins, Ig) ανιχνεύονται στο 50% των περιπτώσεων (IgM > IgG και IgA). Οι περιπτώσεις των DLBCL

με αναπλαστική μορφολογία συχνά εκφράζουν το δείκτη CD30, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρείται επιπρόσθετα έκφραση και άλλων δεικτών Β-κυτταρικής διαφοροποίησης όπως CD5, CD10, Bcl-6, και CD138. Οι πρωτεΐνες Bcl-2 και P53 εκφράζονται σε ποσοστό 30-50% και 30-40%, των DLBCL, αντίστοιχα. Ο δείκτης πολλαπλασιασμού Ki67/MIB1 εκφράζεται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 40% των νεοπλασματικών κυττάρων.



Εικόνα1. Διαφοροποίηση Β-λεμφοκυττάρων βλαστικού κέντρου (Hans et al, Nature 2001)

1.1.7 Φυσιολογικός ρόλος και έκφραση των πρωτεϊνών Β-κυτταρικής διαφοροποίησης BCL-6, CD10, MUM1, και CD138 σε φυσιολογικά και νεοπλασματικά Β-λεμφοκύτταρα

Οι πρωτεΐνες Bcl-6, CD10, MUM1, και CD138 εμπλέκονται στη φυσιολογική Β-κυτταρική διαφοροποίηση και στη παθογένεση διάφορων τύπων Β-λεμφωμάτων.



Η πρωτεΐνη Bcl-6 είναι ένας POZ/Zinc Finger μεταγραφικός καταστολέας που εμπλέκεται στην ενεργοποίηση, στην διαφοροποίηση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση και τη μετανάστευση των λεμφοκυττάρων. Η πρωτεΐνη Bcl-6 είναι απαραίτητη για την δημιουργία του βλαστικού κέντρου, την διαφοροποίηση των πλασματοκυττάρων, και την Th2 ανοσοαπάντηση (69,71). Μελέτες έδειξαν ότι σε ποντικούς με ανεπάρκεια της πρωτεΐνης Bcl-6 αποτυγχάνει η ανάπτυξη και η διαμόρφωση φυσιολογικών βλαστικών κέντρων ενώ παράλληλα παρατηρείται μειωμένη ενεργοποίηση της Τ-εξαρτώμενης παραγωγής αντισωμάτων (146). Επιπλέον Bcl-6 (-/-)

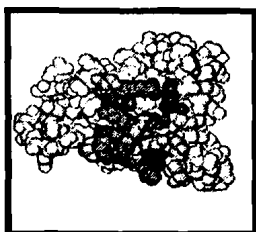
ποντικοί αναπτύσσουν, σε διάφορα όργανα, έντονη φλεγμονώδη αντίδραση χαρακτηριζόμενη από ηωσινόφιλα λευκοκύτταρα και υπερπαραγωγή IgE, στοιχεία τυπικά μιας υπερβολικής Th2 ανοσοαπάντησης (146). Τα ευρήματα αυτά είναι υπαινικτικά ενός αρνητικού ρόλου της Bcl-6 πρωτεΐνης στη ρύθμιση Th2 ανοσοαπάντησης. Η πρωτεΐνη Bcl-6 δρώντας ως μεταγραφικός παράγοντας διαφόρων γονιδίων στόχων μεταβάλλει τη μεταγωγή σήματος της IL-4, του B-κυτταρικού υποδοχέα, και του CD40L κατά τη φυσιολογική ανάπτυξη των B-λεμφοκυττάρων. Επιπλέον, η πρωτεΐνη Bcl-6 αναστέλλει την λεμφοκυτταρική ενεργοποίηση μέσω αναστολής της έκφρασης των μορίων CD69 και CD44, καθώς και την διαφοροποίηση των B-λεμφοκυττάρων του βλαστικού κέντρου προς πλασματοκύτταρα αναστέλλοντας την έκφραση του γονιδίου Blimp-1. Το τελευταίο είναι ένας μεταγραφικός καταστολέας με σημαντικό ρόλο στη πλασματοκυτταρική διαφοροποίηση. Η πρωτεΐνη Bcl-6 καταστέλλει μια ομάδα γονιδίων (cyclin D2 και p27) που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (108). Μελέτες σε Bcl-6 (-/-) ποντικούς έδειξαν ότι η πρωτεΐνη δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της φλεγμονής καταστέλλοντας την έκφραση συγκεκριμένων χημειοκινών (108).

Δομικές αλλαγές της γονιδιακής περιοχής του εκκινητή του Bcl-6, συμπεριλαμβανομένων χρωμοσωμικών διαμεταθέσεων και σωματικών υπερμεταλλάξεων παρατηρούνται συχνά σε μη-Hodgkin λεμφώματα, και ειδικά σε DLBCL (3,9,108). Στο 40% των περιπτώσεων των DLBCL, και στο 10%-15% των περιπτώσεων των θυλακιωδών B-λεμφωμάτων η 5' μη κωδικοποιούσα περιοχή του Bcl-6 εντοπίζεται μετατεθειμένη καθοδικά διαφόρων ισχυρών προαγωγών (συνήθως στους γονιδιακούς τόπους της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών) (71,72-78). Μεταλλάξεις της 5' μη κωδικοποιούσας περιοχής του γονιδίου Bcl-6 παρατηρούνται συχνά σε φυσιολογικά κύτταρα του βλαστικού κέντρου, σε DLBCL τα οποία προέρχονται ιστογενετικά από τα κύτταρα του βλαστικού κέντρου, σε θυλακιώδη λεμφώματα και σε λεμφώματα Burkitt (115-118). Έκφραση της Bcl-6 πρωτεΐνης παρατηρείται σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις των θυλακιωδών B-λεμφωμάτων, στο 50% των περιπτώσεων των DLBCL και σε σημαντικό ποσοστό Burkitt λεμφωμάτων. Οι μεταλλάξεις του γονιδίου Bcl-6 φαίνεται να μην σχετίζονται με τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης (78,82).

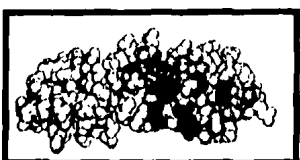


Η πρωτεΐνη CD10 είναι μια μεμβρανική μεταλοπρωτεϊνάση (φυσική ενδοπεπτιδάση EC 3.4.24.11) η οποία δρα μειώνοντας την κυτταρική αντίδραση/απάντηση σε πεπτιδικές ορμόνες (82). Η πρωτεΐνη εκφράζεται σε B και T-λεμφοβλάστες, και σε διάφορα στρωματικά και επιθηλιακά κύτταρα (82). Όσο αναφορά τα δευτερογενή λεμφικά όργανα η πρωτεΐνη CD10 εκφράζεται σχεδόν αποκλειστικά στα B-λεμφοκύτταρα του βλαστικού κέντρου των δευτερογενών λεμφοζιδίων. Έκφραση της

πρωτεΐνης CD10 παρατηρείται σε όλα τα λεμφοβλαστικά λεμφώματα, τα Burkitt λεμφώματα, και τα θυλακιώδη λεμφώματα, ενώ δεν εκφράζεται σε άλλα Β-λεμφώματα από μικρά κύτταρα. Ανοσοιστοχημικές μελέτες σε ιστολογικές τομές παραφίνης ανέδειξαν έκφραση της πρωτεΐνης CD10 στο 30-40% των DLBCL. Η ανοσοιστοχημική χρώση είναι κυρίως μεμβρανική. Διάφορες μελέτες έχουν συσχετίσει την έκφραση της πρωτεΐνης CD10 με προγνωστικούς δείκτες, όμως τα αποτελέσματα αυτών των μελετών είναι αντιφατικά



Η πρωτεΐνη MUM1/IRF4 (multiple myeloma-associated oncogene/interferon regulatory factor 4) είναι μέλος της πρωτεϊνικής οικογένειας των IRF (interferon regulatory factors) μεταγραφικών παραγόντων. Εμπλέκεται στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων μεταγωγής σήματος μετά από ενεργοποίηση με κυττοκίνες. Η πρωτεΐνη MUM1/IRF4 κωδικοποιείται από το γονίδιο το σχετιζόμενο με το πολλαπλούν μυέλωμα (multiple myeloma-associated oncogene). Το γονίδιο αυτό ενεργοποιείται σε μεταγραφικό επίπεδο ως αποτέλεσμα της χρωμοσωμικής διαμετάθεσης t(6;14) (p25;q32) και της τοποθέτησης του στην 3'περιοχή του υποκινητή του γονιδίου της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης (IgH) (9,125). Η πρωτεΐνη MUM1/IRF4 εμπλέκεται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην κυτταρική επιβίωση και στην ανθεκτικότητα των κυττάρων σε ιογενείς λοιμώξεις. (3,5,6,9,125) και εκφράζεται στο τελικό στάδιο διαφοροποίησης του Β-λεμφοκυττάρου του βλαστικού κέντρου καθώς και στα επόμενα στάδια διαφοροποίησης του προς πλασματοκύτταρο (3,5,6,9). Στο φυσιολογικό λεμφικό ιστό ανοσοιστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης ανιχνεύεται σε μικρό αριθμό Β-λεμφοκυττάρων του βλαστικού κέντρου (εξωτερικής περιοχής της διαυγούς ζώνης) καθώς επίσης σε πλασματοκύτταρα και σε ορισμένα ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα. Έκφραση της πρωτεΐνης MUM1/IRF4 παρατηρείται στο 50-75% των DLBCL, ενώ το θυλακιώδες λέμφωμα και το λέμφωμα του κυττάρου του μανδύα είναι MUM1/IRF4-αρνητικά (3,5,6,9,125-128).

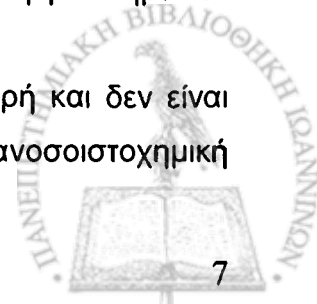


Η πρωτεΐνη CD138 είναι μια διαμεμβρανική πρωτεογλυκάνη, ανήκει στη οικογένεια των συνδεκανών, και χρησιμεύει ως συνδέτης του κυττάρου με διάφορες πρωτεΐνες του υποστρώματος (129). Η πρωτεΐνη αυτή εκφράζεται στα προγονικά (precursors) Β-λεμφοκύτταρα του μυελού των οστών, είναι απύουσα στα παρθένα (naïve) Β-κύτταρα και στα κύτταρα του βλαστικού κέντρου, ενώ επανεκφράζεται στα Β-κύτταρα που εξέρχονται από το βλαστικό κέντρο και οδεύουν προς πλασματοκυτταρική διαφοροποίηση. Όσον αφορά τα Β-λεμφώματα η πρωτεΐνη CD138 εκφράζεται στο λέμφωμα Hodgkin, στο πολλαπλούν μυέλωμα και σε ορισμένα HIV-σχετιζόμενα λεμφώματα ενώ τα DLBCL είναι σπάνια CD138-θετικά (5,6,129,130).

1.1.8 Ιστογένεση του DLBCL.

Η γονιδιακή έκφραση του DLBCL μελετήθηκε πρόσφατα με τις μεθόδους των cDNA και των ολιγονουκλεοτιδικών μικροσυστοιχιών (66,67). Ο Alizadeh και συν (66) ταυτοποίησαν δυο μοριακά διακριτούς ιστογενετικούς υπότυπους DLBCL: α) DLBCL με γονιδιακή έκφραση ομοιάζουσα με αυτήν των Β-λεμφοκυττάρων του βλαστικού κέντρου (Germinal Center B-cell like GCB-DLBCL), και β) DLBCL με γονιδιακή έκφραση ομοιάζουσα με αυτή in vitro ενεργοποιημένων περιφερικών Β-λεμφοκυττάρων (activated peripheral blood B-cell like DLBCL (ABL-DLBCL). Ο διαχωρισμός των DLBCL σε δυο ιστογενετικούς υπότυπους επιβεβαιώθηκε και από τις μελέτες του Rosenwald και συν (67), οι οποίοι περιέγραψαν και έναν τρίτο υπότυπο, το τύπου 3 DLBCL. Η γονιδιακή έκφραση του πρώτου ιστογενετικού υπότυπου χαρακτηρίζεται από την παρουσία ορισμένων ήδη γνωστών γονιδίων που εμπλέκονται στη διαφοροποίηση των Β-λεμφοκυττάρων του βλαστικού κέντρου όπως Bcl-6, CD10 και CD138 καθώς επίσης και μερικών άλλων γονιδίων όπως BCL-7A και LMO2 (66,67). Η γονιδιακή έκφραση του δεύτερου ιστογενετικού υπότυπου χαρακτηρίζεται από την επαγωγή του γονιδίου IRF4 (MUM1/LSIRF) το οποίο συχνά μετατίθεται σε λεμφώματα καθώς επίσης και από την επαγωγή δυο γονιδίων με σημαντικό ρόλο στην απόπτωση, των γονιδίων FLIP και bcl-2 (66,67). Στους μοριακούς υπότυπους των DLBCL εμπλέκονται διαφορετικοί μηχανισμοί κακοήθους εξαλλαγής γεγονός που ενισχύει την άποψη ότι αυτά αντιστοιχούν σε διακριτές παθογενετικές οντότητες. Πράγματι, η διαμετάθεση t(14;18), στη οποία εμπλέκεται το γονίδιο Bcl-2, η ενίσχυση του γονιδιακού τόπου του c-rel στο χρωμόσωμα 2p, και συρρέουσες (ongoing) σωματικές μεταλλάξεις των ανοσοσφαιρινών, παρατηρούνται στα GCB-DLBCL αλλά όχι στο ABL-DLBCL (80, 83). Αντίθετα, τα τελευταία χαρακτηρίζονται από ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NFκB και από υψηλά επίπεδα έκφρασης των NFκB γονιδίων στόχων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που κωδικοποιούν το ρυθμιστικό παράγοντα 4 της ιντερφερόνης (IRF4/MUM1), το μόριο προσκόλλησης CD44, τα αντί-αποπτωτικά γονίδια, c-FLIP, Bcl-2, bcl-xl, TRAF1, TRAF2, c-IAP1 και c-IAP2 καθώς και το γονίδιο της κυκλίνης D2 (78-80). Τα ευρήματα αυτά δείχνουν συσχέτιση μεταξύ της Β-λεμφοκυτταρικής διαφοροποίησης, της απόπτωσης και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στα DLBCL. Όσο αναφορά τη συσχέτιση της κλινικής πορείας των ασθενών με την ιστογενετική ταξινόμηση των DLBCL, προέκυψε ότι οι ασθενείς με DLBCL που εκφράζουν γονίδια Β-λεμφοκυττάρων του βλαστικού κέντρου έχουν ευνοϊκότερη κλινική πορεία από εκείνους με λεμφώματα που εκφράζουν γονίδια ενεργοποιημένων περιφερικών Β-λεμφοκυττάρων ή τύπου 3 λεμφώματα (79-81).

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



ανάλυση σε τομές παραφίνης προκειμένου να ταξινομήσουν ιστογενετικά τα DLBCL (3-6, 9,10,36-40,57,60-62,84-87). Άξια αναφοράς είναι η μελέτη του Hans και συν (57) οι οποίοι συσχέτισαν τα αποτελέσματα των cDNA μικροσυστοιχιών με ανοσοιστοχημικά ευρήματα προκειμένου να μελετήσουν την δυνατότητα ιστογενετικής ταυτοποίησης των DLBCL μέσω της έκφρασης δεικτών B-κυτταρικής διαφοροποίησης και συγκεκριμένα του ανοσοφαινότυπου Bcl-6/CD10/MUM1. Η μελέτη του Hans και συν (57) έδειξε ότι η ανοσοιστοχημική ταξινόμηση των DLBCL με βάση τον ανοσοφαινότυπο Bcl-6/CD10/MUM1/CD138 έχει προγνωστική αξία και προβλέπει την ταξινόμηση των μικροσυστοιχιών σε ποσοστό 71% όσον αφορά τον πρώτο ιστογενετικό υπότυπο και 88% όσον αφορά τον δεύτερο και τον τρίτο υπότυπο του DLBCL(57).



1.2 ΑΠΟΠΤΩΣΗ

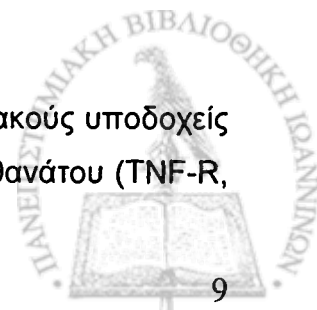
Η απόπτωση είναι μία μορφή κυτταρικού θανάτου κατά την οποία εγγενείς μηχανισμοί ή εξωγενή ερεθίσματα ενεργοποιούν μία σειρά από γενετικά προγραμματισμένα γεγονότα τα οποία οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο. Στους πολυκύτταρους οργανισμούς η απόπτωση παίζει σημαντικό ρόλο στην εμβρυογένεση, στην ιστική ομοιόσταση, στην ανοσοεπίβλεψη και στον περιορισμό των λοιμώξεων. Διαταραχές στη ρύθμιση του φαινομένου της απόπτωσης εμπλέκονται στη παθογένεση κακώθων νεοπλασμάτων, αυτοάνοσων νοσημάτων και εκφυλιστικών παθήσεων.

Τα τελευταία χρόνια η συστηματική μελέτη του φαινομένου της απόπτωσης από πολλές και σημαντικές ερευνητικές ομάδες οδήγησε στην αναγνώριση δύο βασικών εναλλακτικών αποπτωτικών μονοπατιών ενεργοποίησης του φαινομένου της απόπτωσης: α) του εξωγενούς (extrinsic) μονοπατιού το οποίο διαμεσολαβείται από τους υποδοχείς θανάτου της κυτταρικής επιφάνειας και β) του ενδογενούς (intrinsic) μονοπατιού το οποίο διαμεσολαβείται από τα μιτοχόνδρια. Και στα δύο μονοπάτια ενεργοποιούνται οι κυστείνο-ασπάρτι-πρωτεάσες (cystein-aspartyl specific proteases) γνωστές και ως κασπάσες οι οποίες διασπούν διάφορα κυτταρικά υποστρώματα οδηγώντας το κύτταρο στις χαρακτηριστικές μορφολογικές και βιοχημικές μεταβολές της απόπτωσης.

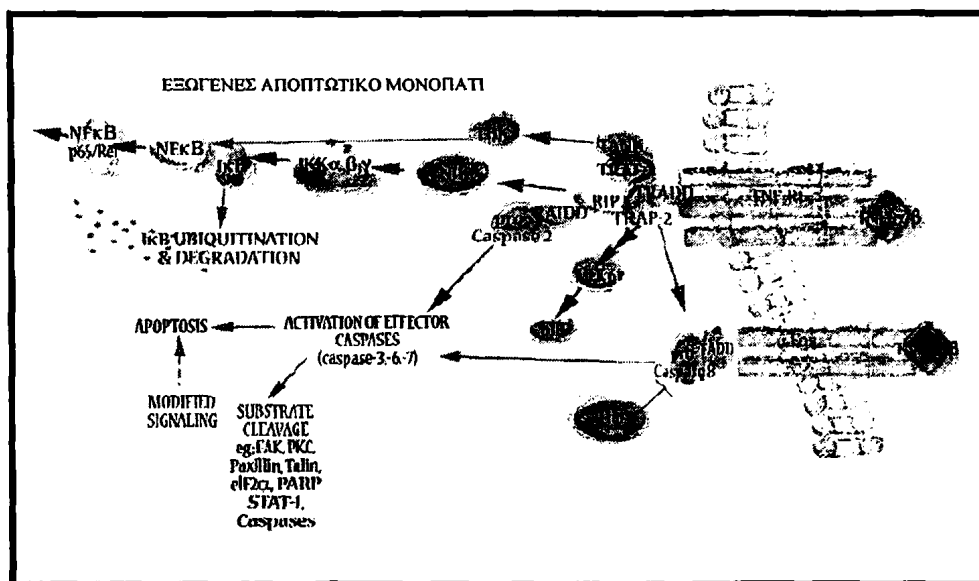
Οι κασπάσες λειτουργούν ως αποδέκτες προ-αποπτωτικών σημάτων και ως εκτελεστές της απόπτωσης. Ακολουθούν τον μηχανισμό ενζυμικής κατάλυσης των ασπαρτασών δηλαδή αναγνωρίζουν τετραπεπτιδικές δομές και πρωτεολύουν το πρωτεϊνικό τους υπόστρωμα στη καρβόξυ πλευρά του ασπαρτικού υπολείμματος. Ο ακριβής τρόπος δράσης τους έχει μερικώς κατανοηθεί και οι κάτωθι λειτουργίες έχουν ήδη καταγραφεί: α) απενεργοποίηση πρωτεϊνών που προστατεύουν τα κύτταρα π.χ. όπως ICAD/DFF45, β) αποδόμηση της αντί-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2, γ) αποδόμηση των πυρηνικών λαμινών και δ) απορύθμιση ή απενεργοποίηση πρωτεϊνών που ενέχονται στην επιδιόρθωση του DNA (DNA-PK), στην ωρίμανση του mRNA (U1-70k) και στην αντιγραφή του DNA (αντιγραφικός παράγοντας C). Η ρύθμιση της δράσης των κασπασών γίνεται με ένα πολύπλοκο πρωτεολυτικό σύστημα που περιλαμβάνει ρυθμιστικές πρωτεΐνες και ανάδρομη ρύθμιση (feedback). Προς το παρόν 14 κασπάσες είναι γνωστές και με βάση τα φυλογενετικά κριτήρια διαιρούνται σε 3 κατηγορίες: α) οικογένεια CASP-1: κασπάσες 1, 4, 5, 11, 12, 13, 14 β) οικογένεια CASP-3: κασπάσες 3, 6, 7, 8, 10 και γ) οι κασπάσες 2 και 9.

1.2.1 Εξωγενές μονοπάτι της απόπτωσης

Το εξωγενές αποπτωτικό μονοπάτι διαμεσολαβείται από επιφανειακούς υποδοχείς θανάτου οι οποίοι ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων κυτταρικού θανάτου (TNF-R,



Tumor Necrosis Factor-Receptor) όπως είναι οι TNF-R, Fas/CD95 και οι υποδοχείς θανάτου (Death Receptor, DR) DR3, DR4, DR5 και DR6. Οι υποδοχείς αυτοί αποτελούνται από μια εξωκυττάρια περιοχή πλούσια σε κυστεΐνες και μια ενδοκυττάρια

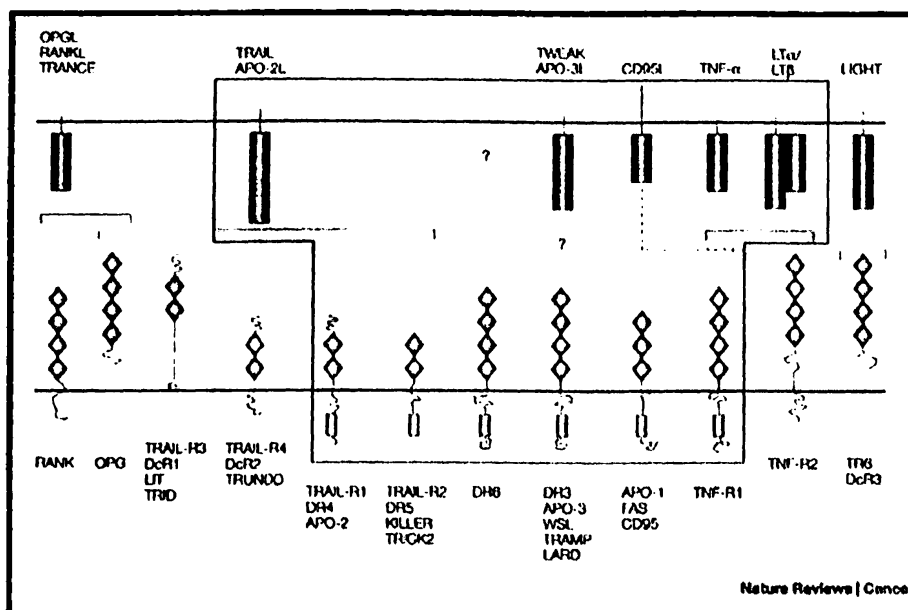


Εικόνα 2. Το εξωγενές αποπτωτικό μονοπάτι (Cell signaling Inc.)

περιοχή θανάτου (DD, Death Domain) που εμπλέκεται στη μεταγωγή του αποπτωτικού σήματος από την επιφάνεια του κυττάρου προς το κυτταρόπλασμα. Οι ειδικοί συνδέτες των TNF-R ανήκουν στη πρωτεϊνική οικογένεια TNF η οποία περιλαμβάνει τους TNFα, Fas-συνδέτης, λεμφοτοξίνη (LT) -α, apo-3-συνδέτης και TRAIL (TNF related apoptosis inducing ligand). Η σύνδεση του ειδικού συνδέτη με τον φυσικό του υποδοχέα, επάγει την ενεργοποίηση του υποδοχέα θανάτου μέσω της διαδικασίας του ομοτριμερισμού. Μετά την ενεργοποίηση οι υποδοχείς θανάτου στρατολογούν πρωτεϊνικά μόρια δομικής προσαρμογής (adaptor proteins), [π.χ. Fas associated death domain (FADD) για τον υποδοχέα Fas/CD95] χρησιμοποιώντας την δυνατότητα αλληλεπίδρασης των περιοχών θανάτου (DD) του ενδοκυτταρίου μέρους των υποδοχέων και των περιοχών θανάτου (DD) των πρωτεϊνών προσαρμογής. Οι πρωτεΐνες προσαρμογής περιέχουν στο μόριο τους μια περιοχή εκτέλεσης θανάτου (death effector domain, DED) που αλληλεπιδρά με τη DED περιοχή του αποπτωτικού ενζύμου προ-κασπάση 8. Το σχηματιζόμενο σύμπλεγμα που απαρτίζεται από το τριμερές υποδοχέα θανάτου (π.χ. Fas/CD95), πρωτεΐνη προσαρμογής (π.χ. FADD) και προ-κασπάση 8 ονομάζεται σύμπλεγμα μεταγωγής αποπτωτικού ερεθίσματος (death inducing signalling complex, DISC). Εν συνεχεία, η προ-κασπάση 8 αυτοπρωτεολύεται σε ενεργοποιημένη κασπάση 8 και ενεργοποιεί τις εκτελεστικές κασπάσες 3, 6 και 7.



Ορισμένα μέλη της πρωτεϊνικής οικογένεια των TNFR έχουν τη δυνατότητα να ενεργοποιούν τους μεταγραφικούς ρυθμιστές NFκB και Jun κινάση. Η μεταγωγή του σήματος μέσω των πρωτεϊνικών μορίων TRADD, RIP, NFκB, IκB κινάση (IKK), και IKKβ συμμετέχει στη φωσφοριλύωση και την αποδόμηση των NFκB αναστολέων της IκB



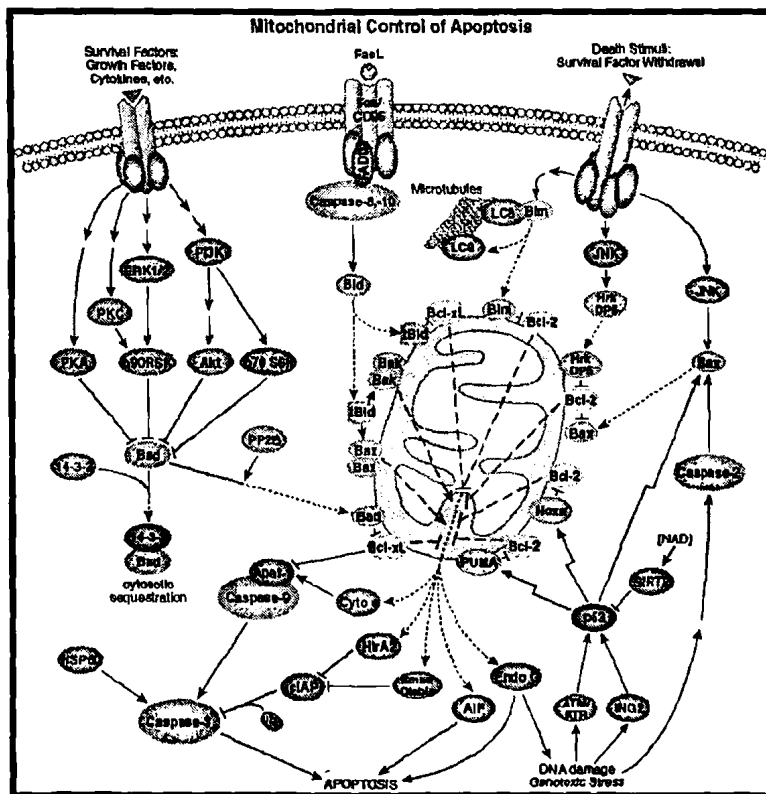
Εικόνα 3. Τα μέλη της πρωτεϊνικής υπέρ-οικογένειας TNF (Nature 2000)

πρωτεϊνικής οικογένειας. Ο βιολογικός μηχανισμός με τον οποίο η μεταγωγή σήματος μέσω των μορίων TRAF ενεργοποιεί την πρωτεΐνη JNK παραμένει άγνωστος. Πρόσφατα πειράματα σε ποντικούς με ανεπάρκεια στις πρωτεΐνες RIP και/ή TNF receptor-associated factor 2, (TRAF2) έδειξαν ότι η μεταγωγή σήματος επάγει την κυτταρική επιβίωση και αναστέλλει την απόπτωση, γεγονός που συμφωνεί με τον αντί-αποπτωτικό ρόλο των πρωτεϊνικών μονοπατιών NFκΒ και JNK. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η πρωτεΐνη FADD δεν εμπλέκεται μόνο στην απόπτωση που επάγεται από τους υποδοχείς θανάτου αλλά συμμετέχει επίσης και στην επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των Τ-λεμφοκυττάρων μέσω μιτογόνων ερεθισμάτων. Ο μηχανισμός με τον οποίο η πρωτεΐνη FADD επάγει τον πολλαπλασιασμό των Τ-λεμφοκυττάρων δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί.

1.2.2 Ενδογενές ή μιτοχονδριακό μονοπάτι της απόπτωσης

Το ενδογενές ή μιτοχονδριακό μονοπάτι επάγεται ως επί το πλείστον από στρεσογόνα ερεθίσματα, όπως βλάβη του γενετικού υλικού, χημειοθεραπευτικοί παράγοντες, UV και γ-ακτινοβολία, ή ακόμα μετά από αιφνίδια στέρση του κυττάρου από σήματα επιβίωσης όπως αυξητικοί παράγοντες, κυτταροκίνες, και ορμόνες. Το ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης ενεργοποιείται μετά από διέγερση των μιτοχονδριακών μεμβρανών από πρωτεϊνικά μόρια (πρωτεΐνες της Bcl-2 οικογένειας) ή μετά από τη

μεταβολή του ιοντικού φορτίου (ιόντα σιδήρου, ασβεστίου, ψευδαργύρου) και κατ' επέκταση του δυναμικού της επιφάνεια των μεμβρανών. Αποτέλεσμα της μεταβολής αυτής είναι η δημιουργία διαμεμβρανικών μιτοχονδριακών καναλιών που επιτρέπουν την μετακίνηση των πρωτεϊνών από τον διαμεμβρανικό χώρο προς το κυτταρόπλασμα όπως



Εικόνα 4. Το ενδογενές αποπτωτικό μονοπάτι (Cell signaling Inc.)

συμβαίνει με το κυτόχρωμα c, την ενδονουκλεάση G, τις πρωτεΐνες Smac και Diablo και τον παράγοντα AIF (Apoptosis Inducing Factor). Στο κυτταρόπλασμα το κυτόχρωμα c στρατολογεί τον παράγοντα Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor-1), την προ-κασπάση 9 και μόρια ATP και σχηματίζεται ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών που ονομάζεται αποπτώσωμα. Η προ-κασπάση 9 ενεργοποιείται μετά από αυτοπρωτεόλυση στο ενζυμικά δραστικό μόριο της κασπάσης 9 το οποίο εν συνεχεία ενεργοποιεί το πρωτεϊνικό καταράκτη των εκτελεστικών κασπασιών (κασπάσες 3, 6 και 7).

Έχει παρατηρηθεί ότι σε ορισμένα είδη κυτάρων (π.χ. κύτταρα τύπου I) η ενδοκυττάρια συγκέντρωση της ενεργοποιημένης κασπάσης 8 είναι επαρκής για να οδηγήσει το κύτταρο σε απόπτωση μέσω της εξωγενούς αποπτωτικής οδού, ενώ σε άλλα είδη κυτάρων (π.χ. κύτταρα τύπου II), όπως επίσης και σε κάποια αποπτωτικά ερεθίσματα (π.χ. οξειδωτικό στρες και ιστική υποξία) η συγκέντρωση των ενεργοποιημένων μορίων κασπάσης 8 δεν επαρκεί για να ενεργοποιήσει τον καταράκτη των εκτελεστικών κασπασιών. Στις περιπτώσεις αυτές η ενεργοποιημένη κασπάση 8 ενεργοποιεί την πρωτεΐνη Bid που ανήκει στην οικογένεια των BH3 πρωτεϊνών και ενεργοποιείται το ενδογενές αποπτωτικό μονοπάτι. Η tBid (truncated Bid) επάγει τον

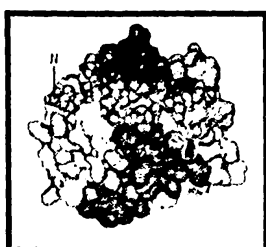
ομοδιμερισμό των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bak και Bax που με τη σειρά τους διαταράσσουν τη δομή της μιτοχονδριακή μεμβράνη δημιουργώντας διαύλους μετακίνησης πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη απόπτωση.

1.2.3 Ρύθμιση της απόπτωσης

Η απόπτωση ρυθμίζεται από διάφορες πρωτεΐνες σε διαφορετικά επίπεδα. Σημαντικός είναι ο ρόλος των πρωτεϊνών FLIP (FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme-like protease [FLICE/caspase 8]-inhibitory proteins), η οικογένεια των πρωτεϊνών Bcl-2 και οι πρωτεΐνες IAP (inhibitor of apoptosis proteins). Οι πρωτεΐνες FLIP επεμβαίνουν στο μονοπάτι των υποδοχέων θανάτου, συνδέονται στο DISC και ανασταλούν την ενεργοποίηση της κασπάσης 8. Η οικογένεια των πρωτεϊνών Bcl-2 αποτελείται από προ και αντί-αποπτωτικές πρωτεΐνες. Η λειτουργική ισορροπία μεταξύ προ και αντί-αποπτωτικών πρωτεϊνών καθορίζει τη τελική ευαισθησία του κυττάρου στην απόπτωση. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας IAP (π.χ. XIAP, C-IAP1, C-IAP2, NIAP, ML-IAP, ILP2, surviving) προσδένονται στις κασπάσες και ανασταλούν τη δράση τους, ή δρουν σαν E3-ουμπικουτίνη συνδέτες προκαλώντας αποδόμηση των κασπασών.

1.2.4 Οικογένεια πρωτεϊνών Bcl-2

Μελέτες των μηχανισμών του αποπτωτικού θανάτου οδήγησαν στην ανίχνευση πρωτεϊνών της ευρύτερης πρωτεϊνικής οικογένειας Bcl-2, ορισμένες από τις οποίες αναστέλλουν, ενώ άλλες επάγουν την απόπτωση. Η οικογένεια των πρωτεϊνών Bcl-2 περιλαμβάνει 20 τουλάχιστον μέλη με ομολογία σε μία τουλάχιστον BH περιοχή (Bcl-2 homology domain, BH domain). Η οικογένεια Bcl-2 διαιρείται σε τρεις υπο-ομάδες πρωτεϊνών: α) την Bcl-2 β) την Bax και γ) την BH3-only. Η BCL-2 υπό-ομάδα περιλαμβάνει τις αντί-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, A1 και Bcl-w, ενώ οι Bax και BH3-only τις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bax, Bak, Bok και Bim, Bik, Bid, Bad, Bmf, Hrk, Noxa, Puma, αντίστοιχα. Για την έναρξη της απόπτωσης απαιτούνται και οι δύο υπο-ομάδες των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες BH3-only πιθανών να δρουν ως αισθητήρες (sensors) της απόπτωσης και ως άμεσοι ανταγωνιστές των ανταγωνίζονται άμεσα τις αντί-αποπτωτικών πρωτεϊνών ενώ οι πρωτεΐνες της οικογένειας Bax πιθανών να δρουν χαμηλότερα (downstream) στο αποπτωτικό μονοπάτι.



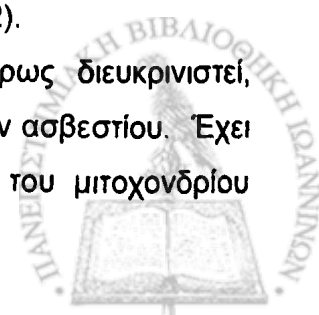
Η αντί-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 είναι ένα από τα περισσότερο μελετημένα πρωτεϊνικά μόρια. Η αλληλουχία του ανθρώπινου γονιδίου Bcl-2 (υπεύθυνου για την σύνθεση της ομώνυμης πρωτεΐνης) ανευρέθη αρχικά στο γενετικό υλικό του σκώληκα *C. Elegans* και ονομάστηκε γονίδιο CED-9. Ο

προσδιορισμός της πρωτεΐνης Bcl-2 σε ανθρώπινα κύτταρα έγινε αρχικά σε περιπτώσεις λεμφωμάτων. Συγκεκριμένα διαπιστώθηκε υπερέκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 στο 85% των θυλακιωδών (follicular) λεμφωμάτων και στο 20% άλλων Β-λεμφωμάτων τα οποία έφεραν την χαρακτηριστική χρωμοσωμική διαμετάθεση t(14;18). Οι μελέτες της επίδρασης της πρωτεΐνης Bcl-2, πέρα των αρχικών πειραμάτων του παρεμφερούς γονιδίου CED-9 στο *C. Elegans*, έγιναν με πειράματα υβριδισμού σε πειραματόζωα. Στις μελέτες αυτές ανευρέθηκε ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 στα Β-λεμφοκύτταρα οδηγεί στην ανάπτυξη λεμφοζιδιακής υπερπλασίας, η οποία ενίοτε εξελίσσεται σε επιθετικό λέμφωμα. Όταν η υπερέκφραση αφορούσε Τ-λεμφοκύτταρα περίπου το ένα τρίτο των πειραματόζωων ανέπτυξε περιφερικά Τ-λεμφώματα (74). Το γεγονός βέβαια ότι δεν εξελίσσονται όλες οι υπερπλασίες σε λεμφώματα και στις περιπτώσεις που τελικά αυτό συμβαίνει μεσολαβεί μία μακρά χρονική περίοδος, δείχνει ότι στην κακοήγη εξαλλαγή πλην της πρωτεΐνης Bcl-2 συμμετέχουν και άλλοι ογκογόνοι παράγοντες.

Άλλα ενδιαφέροντα πειραματικά δεδομένα για τον ρόλο της πρωτεΐνης Bcl-2 προέρχονται από τη διαμόλυνση κυτταροκαλλιιεργειών από ιούς, π.χ. ο αδενοϊός αναστέλλει την απόπτωση του κυττάρου ξενιστή μέσω της έκφρασης της πρωτεΐνης E1B αλλά και τη υπερέκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2. Οι πρωτεΐνες Bcl-2 και E1B επιτυγχάνουν τον στόχο τους, δηλαδή την αντί-αποπτωτική τους δράση, εξουδετερώνοντας το ειδικό αποπτωτικό γονίδιο του ιού E1A αλλά και την πρωτεΐνη p53 του κυττάρου ξενιστή (5).

Ανοσοϊστοχημικές μελέτες και μελέτες ανοσοφθορισμού έδειξαν ότι η πρωτεΐνη Bcl-2 εντοπίζεται στον ενδοκυττάριο χώρο. Συγκεκριμένα ανευρίσκεται κατά κύριο λόγο στην μεμβράνη των μιτοχονδρίων και σπανιότερα στις μεμβράνες του λείου ενδοπλασματικού δικτύου και στην πυρηνική μεμβράνη. Όπως προκύπτει από *in vitro* μελέτες μιτοχονδρίων, η πρωτεΐνη Bcl-2 είναι προσκολλημένη με το καρβοξυτελικό της άκρο στην εξωτερική επιφάνεια του μιτοχονδρίου. Με τον τρόπο αυτό το μεγαλύτερο μέρος της πρωτεΐνης Bcl-2 βρίσκεται ελεύθερο εντός του κυτταροπλάσματος έτσι ώστε να αλληλεπιδρά με τις πρωτεάσες και τα άλλα κυτταροπλασματικά ένζυμα. Η μετακίνηση της πρωτεΐνης Bcl-2 στην εσωτερική πλευρά της μιτοχονδριακής μεμβράνης, μέσω σύνδεσης με την ειδική μεμβρανική πρωτεΐνη Map 70p, προκαλεί σχεδόν πλήρη αναστολή της αντί-αποπτωτικής δράσης της πρωτεΐνης Bcl-2. Από τα παραπάνω γίνεται κατανοητό ότι η λειτουργία της πρωτεΐνης Bcl-2 δεν εξαρτάται μόνο από την ακεραιότητα της δομής του μορίου της, αλλά και από την θέση της στην μιτοχονδριακή μεμβράνη (2).

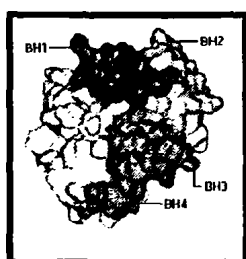
Ο μηχανισμός δράσης της πρωτεΐνης Bcl-2 δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί, πιθανών η πρωτεΐνη να δρα στην ενδοκυττάρια ομοιόσταση των ιόντων ασβεστίου. Έχει αποδειχθεί ότι η αύξηση της συγκεντρώσεως του ασβεστίου εντός του μιτοχονδρίου



προκαλεί απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, το οποίο εντοπίζεται εντός της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Επιπρόσθετα το ασβέστιο προάγει την απόπτωση και με άλλους μηχανισμούς όπως την ενεργοποίηση του συστήματος των ενδοκυττάριων κασπασών καθώς και της ενδογενούς DNAάσης. Η τελευταία αποτελεί τον καθοριστικό παράγοντα έναρξης της απόπτωσης, καθότι διασπά το πυρηνικό DNA. Η πρωτεΐνη Bcl-2 μπορεί να αναστείλει τις διαδικασίες έναρξης της απόπτωσης εμποδίζοντας την αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου. Το τελευταίο επιτυγχάνεται, σύμφωνα με τις υπάρχουσες ενδείξεις, μέσω της αναστολής της διέλευσης του ασβεστίου διαμέσου των ενδοπλασματικών μεμβρανών (2).

Η πρωτεΐνη Bcl-2, είναι πιθανό να αναστέλλει την απόπτωση που οφείλεται σε οξειδωτικό stress. Η εξωτερική επιφάνεια της μιτοχονδριακής μεμβράνης, οι μεμβράνες του λείου ενδοπλασματικού δικτύου καθώς επίσης και η πυρηνική μεμβράνη αποτελούν θέσεις που άμεσα ή έμμεσα σχετίζονται με την παραγωγή ενεργών παραγώγων του οξυγόνου (ROS, reactive oxygen species). Η εντόπιση της πρωτεΐνης Bcl-2 στα συγκεκριμένα αυτά σημεία οδήγησε τους ερευνητές στην αναζήτηση τυχόν σχέσεων μεταξύ της απελευθέρωσης των ενεργών παραγώγων οξυγόνου και της απόπτωσης. Η παρουσία παραγώγων του οξυγόνου, όπως το υπεροξείδιο του οξυγόνου, οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και το t-butyl hydroperoxide σε χαμηλές συγκεντρώσεις προκαλούν ήπιο οξειδωτικό stress που μπορεί να οδηγήσει το κύτταρο σε απόπτωση. Είναι πιθανό η πρωτεΐνη Bcl-2 να αναστείλει την επαγόμενη από οξειδωτικό στρες απόπτωση. Παρόμοια δράση μπορεί να έχουν και άλλοι παράγοντες, όπως η N-ακετυλοκυστεΐνη, η γλουταθειόνη και η δεσφεριοξαμίνη. Όταν διαταράσσεται η λειτουργία του κύριου ενδοκυττάριου αντιοξειδωτικού συστήματος, δηλαδή της γλουταθειόνης, η πρωτεΐνη Bcl-2 μπορεί να αναλάβει το ρόλο του "προστάτη" του κυττάρου σε ένα πιθανό ενδοκυττάριο οξειδωτικό stress. Ως πιθανός τρόπος της προστατευτικής αυτής δράσης προτείνεται η αναστολή της οξείδωσης των ενδοκυττάριων λιπιδίων που μπορούν να οδηγήσουν σε οξειδωτικές βλάβες. Άλλες μελέτες βέβαια δεν αποδέχονται την δυνατότητα της Bcl-2 να προστατεύει από το οξειδωτικό stress ή ακόμη αμφιβάλλουν για την σημασία και τον ρόλο των ενεργών παραγώγων οξυγόνου στις διαδικασίες έναρξης της απόπτωσης (3). Ενδιαφέρουσες είναι οι παρατηρούμενες φαινοτυπικές ανωμαλίες σε πειραματόζωα, στα οποία με γενετικές μεθόδους εμποδίζεται πλήρως η έκφραση της αντί-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2. Τα πειραματόζωα αυτά εμφανίζουν πολυκυστικούς νεφρούς και διάταση του πυελοκαλυκτικού τους συστήματος που οδηγεί σε σύντομο χρονικό διάστημα στην ανάπτυξη νεφρικής ανεπάρκειας. Ιστοπαθολογική μελέτη του νεφρικού παρεγχύματος των εμβρύων πειραματόζωων και των ζώντων πειραματόζωων που δεν παρουσίαζαν έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 έδειξε ότι στα τελευταία παρατηρείται σημαντική μείωση του

αριθμού των νεφρώνων και αυξημένη έκφραση αποπτωτικών πρωτεϊνών (6). Ο λεμφικός ιστός των πειραματόζων, συγκεκριμένα ο σπλήνας και ο θύμος, δεν παρουσιάζουν εμφανείς διαταραχές κατά την γέννηση των πειραματόζων (6). Τόσο τα θυμοκύτταρα όσο και τα περιφερικά B και T-λεμφοκύτταρα εμφανίζουν αρχικώς φυσιολογική δομή και λειτουργία. Παρόλα αυτά, 4 έως 8 εβδομάδες αργότερα τα όργανα του λεμφικού ιστού παρουσιάζουν μαζική απόπτωση και είναι ανίκανα να διατηρήσουν μια ομοιόσταση των B και T-λεμφοκυττάρων (6). Επιπρόσθετα τα πειραματόζωα εμφανίζουν, σε σύντομο χρονικό διάστημα, αποχρωματισμό του δέρματός τους. Ο φαινότυπος αυτός πιθανόν οφείλεται σε αυξημένη απόπτωση των μελανοκυττάρων και σε ανεπαρκή προστασία τους από τα αποπτωτικά σήματα τα προερχόμενα από οξειδωτικές ουσίες που παράγονταν κατά την ενδοκυττάρια σύνθεση της μελανίνης (6).

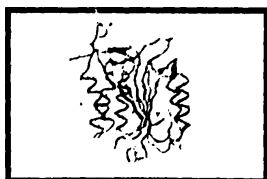


Η πρωτεΐνη Bcl-X παρουσιάζει στο 44% τις ίδιες αλληλουχίες αμινοξέων με την πρωτεΐνη Bcl-2. Υπάρχουν τρεις ισομορφές της πρωτεΐνης α) η ισομορφή Bcl-X_L (230 αμινοξέα) δείχνει μεγάλη ομολογία με τη πρωτεΐνη Bcl-2 και αναστέλλει την απόπτωση, β) η ισομορφή Bcl-X_S (170 αμινοξέα) επάγει την απόπτωση ακόμη και επί παρουσίας της Bcl-2, και γ) η ισομορφή Bcl-X_p η οποία στερείται της υδρόφοβης καρβόξυ-τελικής περιοχής που έχουν οι Bcl-X_L και Bcl-X_S και αναστέλλει την απόπτωση που επάγεται από αυξητικούς παράγοντες. Η πρωτεΐνη Bcl-X_L δύναται να σχηματίσει ετεροδιμερή με την πρωτεΐνη Bak παρουσιάζοντας μια μετά-μεταφραστική ικανότητα αναστολής της απόπτωσης παρόμοια με αυτή της πρωτεΐνης Bcl-2. Ιδιαίτερα ενδιαφέρον παρουσιάζει ο μηχανισμός ρύθμισης της έκφρασης της πρωτεΐνης από γνωστούς μεταγραφικούς παράγοντες όπως NFκB, Jnk και την πρωτεΐνη Bcl-6. . Μελέτες σε πειραματόζωα έδειξαν ότι η πλήρης απουσία της πρωτεΐνης Bcl-x_L προκαλεί πολύ σοβαρές αλλοιώσεις και αύξηση της θνησιμότητας των πειραματοζώων. Συγκεκριμένα παρατηρείται μαζική απόπτωση στον εγκέφαλο και στο νωτιαίο μυελό όπου κυρίως εκφράζεται η συγκεκριμένη πρωτεΐνη (5).

Οι προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες BH3 φαίνεται πως δρουν ως αισθητήρες (sensors) της απόπτωσης ενεργοποιούν τις Bax και Bak προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες, ανταγωνίζονται τις αντί-αποπτωτικές πρωτεΐνες και συμμετέχουν στη μεταβολή της διαπερατότητας της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, ενώ η ομάδα των Bax πρωτεϊνών είναι άμεσοι ανταγωνιστές των αντί-αποπτωτικών πρωτεϊνών και είναι υπεύθυνες για τις διαταραχές της διαπερατότητας της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και τη δημιουργία των διαμεμβρανικών μιτοχονδριακών καναλιών. Οι BH3-only πρωτεΐνες δεν οδηγούν το κύτταρο σε απόπτωση απουσία των πρωτεϊνών Bax και Bak.



Η προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bax θεωρείται ότι μπορεί, τουλάχιστον εν μέρει, να επηρεάσει τη δράση της πρωτεΐνης Bcl-2. Η πρωτεΐνη Bax έχει μοριακό βάρος 21 Kd, και παρουσιάζει δύο ομόλογες ομάδες αμινοξέων με την πρωτεΐνη Bcl-2, τις περιοχές BH1 και BH2. Μέσω των περιοχών αυτών η πρωτεΐνη Bax σχηματίζει είτε ομοδιμερή είτε ετεροδιμερή με την πρωτεΐνη Bcl-2. Όταν η πρωτεΐνη Bcl-2 υπερεκφράζεται σε ένα κύτταρο τα μόρια της σχηματίζουν διμερή μεταξύ τους αλλά και με τις υπάρχουσες ποσότητες πρωτεΐνης Bax. Με τον τρόπο αυτό αναστέλλεται η απόπτωση και παρατείνεται η επιβίωση του κυττάρου. Η απουσία έκφρασης της Bcl-2 σε ένα κύτταρο, συνεπεία ενδογενών ή εξωγενών παραγόντων, έχει ως αποτέλεσμα οι υπάρχουσες ποσότητες της πρωτεΐνης Bax να σχηματίζουν μόνον ομοδιμερή, προάγοντας έτσι την απόπτωση. Η πρωτεΐνη Bax εντοπίζεται κυρίως στην μιτοχονδριακή μεμβράνη με την οποία συνδέεται με το υδρόφοβο καρβοξυτελικό της άκρο. Σχηματίζει ετεροδιμερή και με άλλες πρωτεΐνες εκτός της πρωτεΐνης Bcl-2, συγκεκριμένα με τις Bcl-xL, MCL1 και A1, επομένως φαίνεται ότι η δράση της είναι ιδιαίτερα σύνθετη. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο μηχανισμός ρύθμισης της έκφρασης της πρωτεΐνης Bax από γνωστούς μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο p53 και ο Jnk καθώς επίσης και η παρατήρηση ότι πειραματόζωα με πλήρη έλλειψη της πρωτεΐνης Bax δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερες διαταραχές (6).



Η προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bak είναι μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών Bax. Ο κύριος ρόλος της είναι η δημιουργία διαμεμβρανικών μιτοχονδριακών διαύλων. Η ενεργοποίηση της και κατά συνέπεια η δράση της εξαρτάται πλήρως από την ενεργοποίηση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bid. Μετά την ενεργοποίηση της από την πρωτεΐνη Bid η πρωτεΐνη Bak σχηματίζει ομοδιμερή που προσδένονται στη κυτταροπλασματική πλευρά της μιτοχονδριακής μεμβράνης και σχηματίζουν τα μιτοχονδριακά πρωτεϊνικά κανάλια. Πειραματόζωα με πλήρη έλλειψη της πρωτεΐνης Bak δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαταραχές γεγονός που υποδηλώνει την σαφώς υποδεέστερη και πιθανότατα μόνο βοηθητική συμβολή της πρωτεΐνης στην απόπτωση.



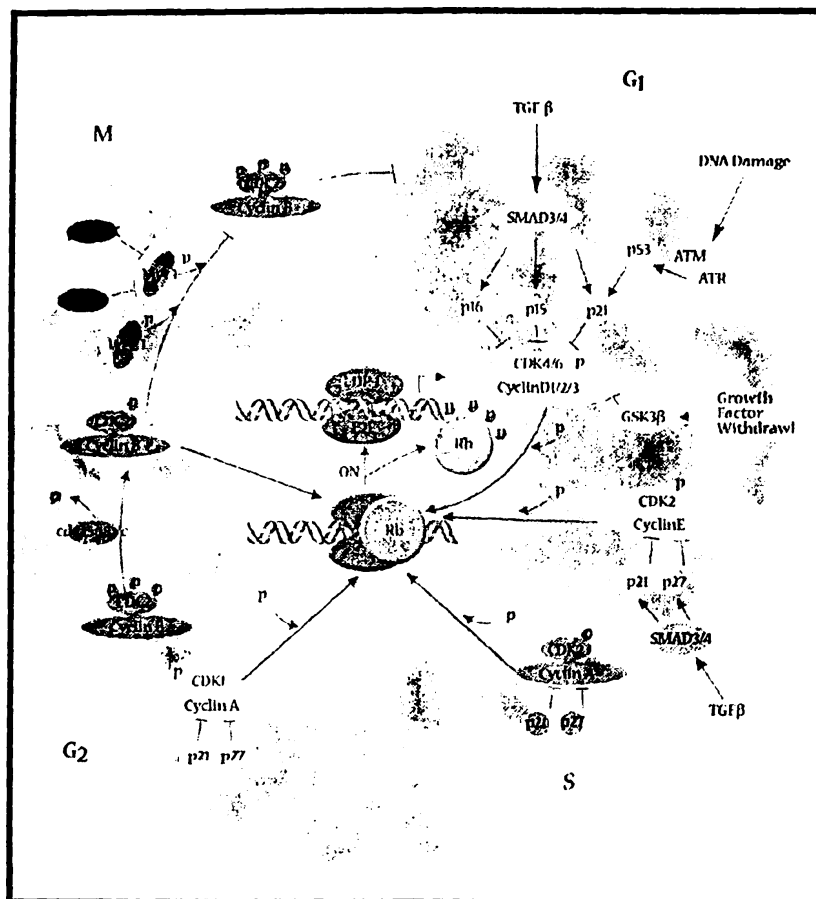
Η προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bid, μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών BH3-only έχει μια σύνθετη και ουσιαστική δράση στη ρύθμιση της απόπτωσης. Η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Bid είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση άλλων προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η συμβολή της πρωτεΐνης στη συνδυασμένη δράση των δύο βασικών αποπτωτικών μονοπατιών (εξωγενούς και ενδογενούς). Συγκεκριμένα πολλά και διαφορετικά αποπτωτικά ερεθίσματα είναι ικανά να ενεργοποιήσουν τη

πρωτεΐνη Bid. Η λύση των λυσοσωμάτων έχει σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση της πρωτεΐνης καθεψίνη-L. Η καθεψίνη-L δρώντας ως ενδοπεπτιδάση έχει την ικανότητα να πρωτεολύει το μόριο της πρωτεΐνης Bid και κατά συνέπεια να το ενεργοποιεί. Επίσης η ενεργοποίηση του αποπτωτικού καταρράκτη των κασπασών μέσω των TNFR υποδοχέων έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της πρωτεάσης κασπάση 8 η οποία με τη σειρά της πρωτεολύει και ενεργοποιεί τη πρωτεΐνη Bid. Ο κύριος ρόλος της πρωτεΐνης Bid είναι η ενεργοποίηση άλλων προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών όπως οι πρωτεΐνες Bak και Bax, και στο να σχηματίζει ετεροδιμερή με αντί-αποπτωτικές πρωτεΐνες όπως είναι η πρωτεΐνη Bcl-xL αναστέλλοντας έτσι την αντί-αποπτωτική τους δράση.

Τέλος οι προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες Noxa και Puma, μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών BH3-only, ασκούν ουσιαστική ανασταλτική δράση στη αντί-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η έκφραση των γονιδίων Noxa και Puma ρυθμίζεται σε μεγάλο βαθμό από τον μεταγραφικό παράγοντα p53 και ότι ο μηχανισμός αυτός ρύθμισης της απόπτωσης αποτελεί τον καθοριστικότερο παράγοντα αναστολής της κυτταρικής επιβίωσης σε περιπτώσεις γενοτοξικού στρες.



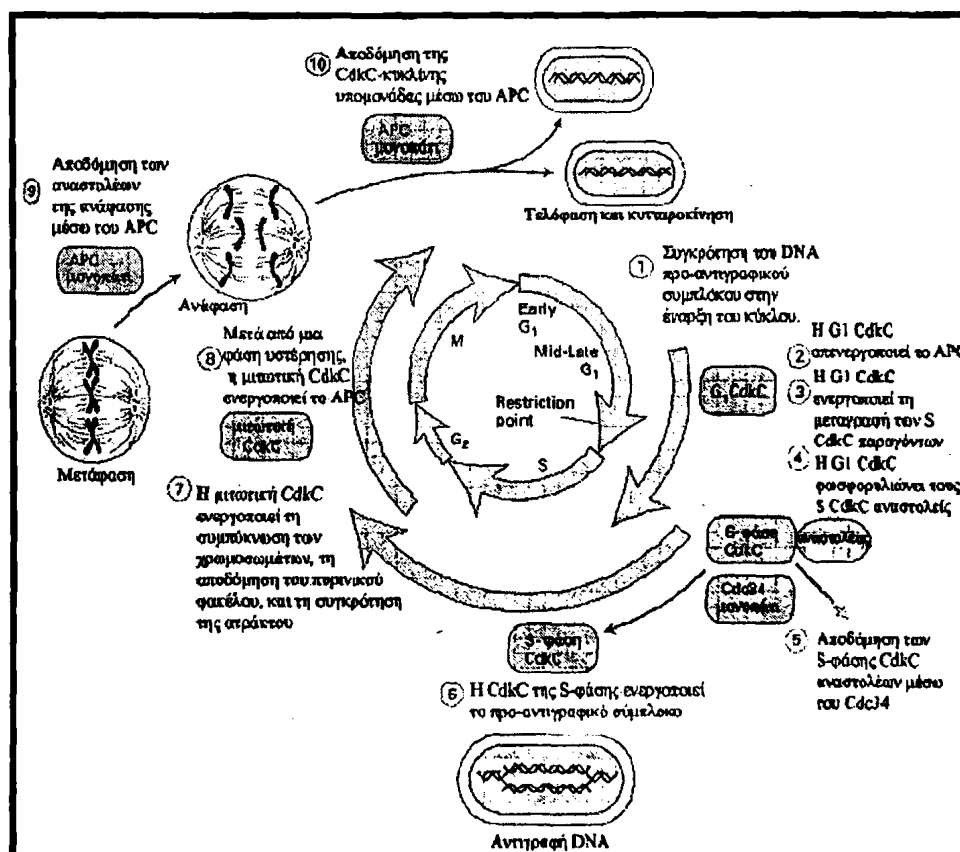
1.3 ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ



Εικόνα 5. Κυτταρικός κύκλος (Cell signaling Inc.)

Ο κυτταρικός κύκλος ρυθμίζεται από πολλά ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια σήματα. Σήμερα θεωρείται ότι η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου επιτυγχάνεται κυρίως από μια ομάδα ομόλογων σερίνο-θρεονίνο-κινασών οι οποίες καλούνται κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (Cyclin Dependent Kinase, CDK). Οι καταλυτικές υπομονάδες αυτών των κινασών είναι ενεργείς μόνον όταν σχηματίσουν συμπλέγματα με μέλη μιας ομάδας ασταθών ρυθμιστικών μορίων, τα επίπεδα των οποίων μεταβάλλονται κατά την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου τις καλούμενες κυκλίνες (cyclins). Έχουν απομονωθεί επτά διαφορετικές CDKs και τέσσερις ομάδες κυκλινών (D, E, A και B). Τα ενεργά συμπλέγματα κυκλίνης-CDK δρουν σε συγκεκριμένες φάσεις του κυτταρικού κύκλου, κατά τις οποίες φωσφορυλιώνουν κατάλληλα υποστρώματα. Υπάρχουν δύο κύριες οικογένειες κυκλινών. Η οικογένεια G1 περιλαμβάνει τις κυκλίνες C, D1-3 και E που μεσολαβούν τη δίοδο του κυττάρου μέσω της G1-φάσης και την είσοδο στη S-φάση. Η άλλη οικογένεια περιλαμβάνει τις κυκλίνες A, B1 και B2. Η κυκλίνη A εμπλέκεται στην αντιγραφή του DNA και στην συμπλήρωση και προετοιμασία για την μετάβαση στη μίτωση. Οι κυκλίνες B1 και B2 ρυθμίζουν τη μη αναστρέψιμη είσοδο του κυττάρου στη μίτωση και τη συμπλήρωση της (1,2,5-9).

Η έναρξη του κυτταρικού κύκλου του φυσιολογικού κυττάρου συνήθως πυροδοτείται από ένα εξωκυττάριο μιτογόνο ερέθισμα (π.χ. αυξητικό παράγοντα), το οποίο ενεργοποιεί μία σειρά από ενδοκυττάρειες βιοχημικές μεταβολές, που καλούνται «οδός μεταγωγής του σήματος» (signal transduction pathway). Το κύτταρο δέχεται εξωκυττάρια μιτογόνα σήματα στη πρώιμη G1 φάσης του κυτταρικού κύκλου. Αποδέκτες αυτών των σημάτων είναι τα συμπλέγματα κυκλίνη D/CDK4 ή κυκλίνη D/CDK 6 τα οποία



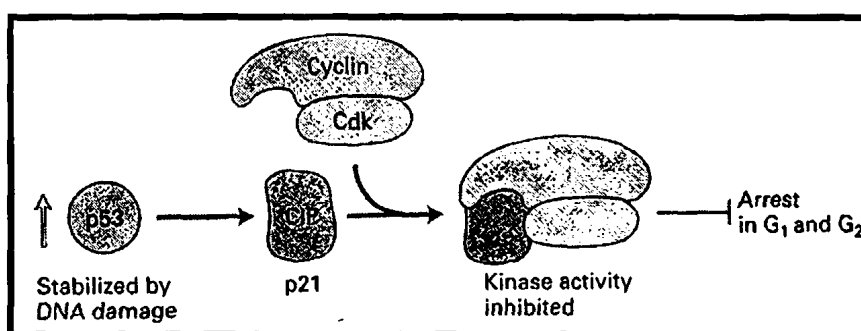
Εικόνα 6. Φάσεις του κυτταρικού κύκλου (Damell et al, 1998)

προς το τέλος της G1 φάσης με άγνωστο μηχανισμό ενεργοποιούν τη κυκλίνη E/CDK2. Τα συμπλέγματα κυκλίνη D/CDK4 ή κυκλίνη D/CDK 6 πιστεύεται ότι εμπλέκονται στη ρύθμιση του περιοριστικού σημείου που ρυθμίζει τη μετάβαση διαμέσου της προχωρημένης G1 φάσης του κυτταρικού κύκλου. Το σύμπλεγμα κυκλίνης E/CDK2 δρα στο όριο των φάσεων G1 και S. Τα δύο αυτά συμπλέγματα κυκλινών/CDKs έχουν σαν κύριο στόχο το σύμπλεγμα pRb/E2F-DP. Η φωσφορυλίωση του τελευταίου απελευθερώνει τους μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας E2F-DP, οι οποίοι με την σειρά τους ενεργοποιούν, μεταξύ των άλλων, μόρια που εμπλέκονται στην αντιγραφική όπως, πολυμεράση-α, δένδροφολλική αναγωγή (DHFR), ORC1 (Origin Replication Complex) και MCM. Η φωσφορυλίωση του συμπλέγματος pRb/E2F-DP σηματοδοτεί το σημείο χωρίς επιστροφή προς την S φάση του κυτταρικού κύκλου (1,2,5-9).

Η αντιγραφή του DNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα ξεκινά από πολλά και διαφορετικά σημεία (Origins of replication). Αυτό συμβαίνει γιατί εάν υπήρχε ένα μόνο σημείο

έναρξης της αντιγραφής, η διάρκεια της S φάσης θα ήταν υπερβολικά μεγάλη και οι πιθανότητες λάθους αυξημένες. Υπολογίζεται ότι στο ανθρώπινο γονιδίωμα υπάρχουν 106 ανεξάρτητα σημεία έναρξης της αντιγραφής. Στα σημεία αυτά σχηματίζεται προς το τέλος της G1 φάσης το προ-αντιγραφικό σύμπλεγμα (pre-replication complex, pre-RC), το οποίο είναι απαραίτητο για την δράση των CDKs της S φάσης. Σημαντική είναι η δράση του συμπλέγματος κυκλίνη A/CDK2, το οποίο όχι μόνο πυροδοτεί την έναρξη της αντιγραφής αλλά εμποδίζει τον εκ νέου σχηματισμό προ-αντιγραφικών συμπλεγμάτων. Ο τρόπος με τον οποίο τα προ-αντιγραφικά συμπλέγματα καταλύουν την αντιγραφή δεν είναι γνωστός. Μόλις το κύτταρο εισέλθει στην S-φάση, η κυκλίνη E φωσφορυλιώνεται από την CDK2 και αποικοδομείται μέσω της πρωτεολυτικής οδού της ουμπικουϊτίνης (ubiquitin-dependent proteolysis). Κατά την αντιγραφή, οι επιμέρους πρωτεΐνες cdc6 και MCM των προ-αντιγραφικών συμπλεγμάτων απομακρύνονται αφήνοντας την ORC, να σχηματίσει στις νεοσχηματισμένες αδελφές χρωματίδες το μετά-αντιγραφικό σύμπλεγμα (post-RCs) (1,2,5-9). Εφόσον ολοκληρωθεί η αντιγραφή, το κύτταρο αρχίζει να παράγει σταδιακά κατά την διάρκεια της G2 φάσης κυκλίνη B, η οποία συνδέεται με την CDK1. Το σύμπλεγμα αυτό αποτελεί τον παράγοντα που προάγει την μίτωση (mitosis-promoting factor, MPF) και η δράση του οποίου θεωρείται απαραίτητη για την έναρξη της μίτωσης. Στην συνέχεια η CDK1 φωσφορυλιώνεται στην θέση T161 από την κινάση που ενεργοποιεί τις CDKs (CDK-activating Kinase, CAK). Ακολουθεί ανασταλτική φωσφορυλίωση από την κινάση Wee1 στην T14, η οποία στο όριο G2-M ακολουθείται από μία τελική φωσφορυλίωση ενεργοποίησης στην Y15. Η πλήρως πλέον ενεργοποιημένη CDK1 φωσφορυλιώνει μία σειρά από δομικές πρωτεΐνες όπως την ιστόνη H1, πυρηνικές λαμίνες, βιμεντίνη και καλδεσμόνη (caldesmon), οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στη συσπείρωση των μεταφασικών χρωμοσωμάτων, την αποδιάταξη των πυρηνικών λαμινών, την αποδιάταξη των ενδιάμεσων ινιδίων, και την αναδιάταξη των μικροϊνιδίων, αντίστοιχα. Τα βιοχημικά αυτά γεγονότα είναι καθοριστικά για την μετάβαση στην M φάση. Η μίτωση αρχίζει με την πρόφαση, η οποία ακολουθείται από το σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου και του μεταφασικού δίσκου (μετάφαση). Στο στάδιο αυτό οι μιτωτικές CDKs ενεργοποιούν το πρωτεϊνικό σύμπλεγμα που προάγει την ανάφαση (Anaphase Promoting Complex, APC), το οποίο καταλύει την πρωτεόλυση μέσω της οδού της ουμπικουϊτίνης, των αναστολέων της ανάφασης PDS1 και CUT2. Το APC επίσης πρωτεολύει την κυκλίνη B, στάδιο απαραίτητο για την έξοδο του κυττάρου από την τελόφαση (1,2,5-9). Οι μηχανισμοί που αναφέρθηκαν πιο πάνω εξασφαλίζουν την αντιγραφή και την κατανομή του γενετικού υλικού αλλά δεν διασφαλίζουν την πιστότητα της αντιγραφής και της ισοκατανομής του. Επίσης οι μηχανισμοί αυτοί ευοδώνουν τον πολλαπλασιασμό, αλλά δεν δίνουν την δυνατότητα μετά-μιτωτικής

διαφοροποίησης στο κύτταρο. Έτσι, το κύτταρο έχει αναπτύξει αρνητικούς μηχανισμούς ρύθμισης και ελέγχου (checkpoints) του κυτταρικού κύκλου οι οποίοι του επιτρέπουν, αφενός μεν κάτω από ορισμένες συνθήκες να διαφοροποιηθεί, αφετέρου δε να αμυνθεί στο γενετοξικό stress του περιβάλλοντος, το οποίο μπορεί να προκαλέσει είτε βλάβη του DNA, είτε διαταραχή στο σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου. Η δράση των κινασών στα συμπλέγματα κυκλινών και CDKs ρυθμίζεται αρνητικά από τους αναστολείς των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (Cyclin Dependent Kinase Inhibitors, CDKs). Υπάρχουν δύο οικογένειες CDKIs. Η πρώτη οικογένεια καλείται INK4A, περιλαμβάνει τα γονίδια p16, p15, p18 και p14/ARF και αναστέλλει κυρίως τις CDKs 4 και 6, προλαμβάνοντας την σύνδεση των. Η δεύτερη οικογένεια καλείται Cip/Kip περιλαμβάνει τα γονίδια p21/Cip1, P27/Kip1, p57/Kip2 και αναστέλλει κυρίως τις CDKs 2, 4 και 6. Ειδικότερα η p21/Cip1 αναστέλλει τις CDKs 1,2,4,5 και 6, ενώ P27/Kip1 τις CDKs 2,4,5 και 6.

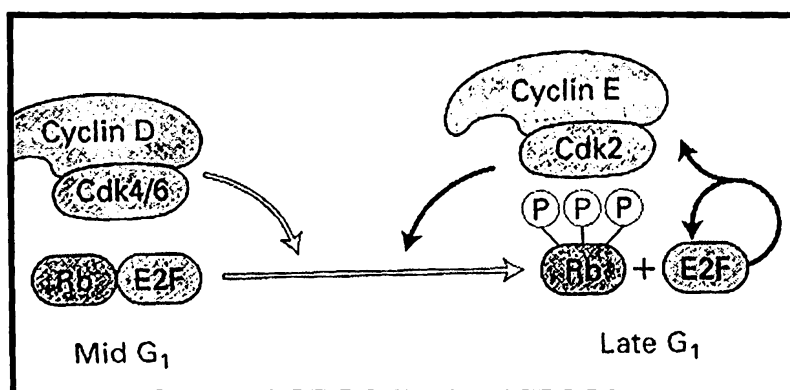


Εικόνα 7. Ο ρόλος του p53 στο κυτταρικό κύκλο (Darnell et al, 1998).)

Ένα κλασσικό παράδειγμα της δράσης των αρνητικών ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου αποτελεί η ενεργοποίηση του άξονα ATM (Ataxia-Telegestasia-Mutated) – p53, η οποία οφείλεται σε βλάβη του DNA και οδηγεί σε G1 σταμάτημα (G1 arrest) μέσω της πρωτεΐνης p21/WAF1. Εάν οι μηχανισμοί της επιδιόρθωσης του DNA αποκαταστήσουν την βλάβη, τότε η p53 ενεργοποιεί την MDM2 η οποία με την σειρά της αίρει την αναστολή του κυτταρικού κύκλου, μέσω ενός μηχανισμού αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης. Η ρύθμιση της αλληλοεπίδρασης p53/mdm2 πραγματοποιείται α) ως αποτέλεσμα φυσικής αντίδρασης πρωτεΐνης / πρωτεΐνης μεταξύ p53 και mdm2 και β) ως δυνατότητα της mdm2 πρωτεΐνης να μειώνει τη μεταγραφική δράση της p53 και να προκαλεί την αποδόμηση της p53. Αναλυτικότερα, πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι α) φωσφορυλίωση της p53 επαγόμενη από βλάβη του DNA μειώνει την αλληλεπίδραση p53/mdm2 και β) το προϊόν του εναλλακτικού πλαισίου ανάγνωσης (ARF) που εντοπίζεται στο γονιδιακό τόπο P16 μπορεί να συνδέεται με την mdm2 και μειώνει την mdm2-επαγόμενη αποδόμηση της πρωτεΐνης p53. Σε περίπτωση αποτυχίας της επιδιόρθωσης του DNA ενεργοποιείται ο μηχανισμός του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Ανάλογοι ρυθμιστικοί μηχανισμοί έχουν αναπτυχθεί και στην M φάση του κυτταρικού κύκλου. Η διαταραχή στο σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου ενεργοποιεί τις πρωτεΐνες

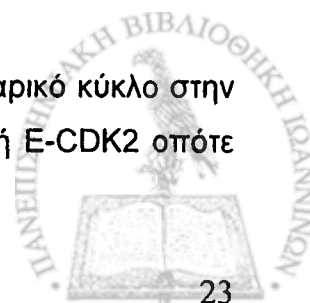
Bub, Mad και Mps1, οι οποίες αναστέλλουν μέσω της cdc20 την APC και την μετάφαση (Metaphase arrest) (1,2,5-9).

Το δίκτυο ρύθμισης p53 (p14-Hdm2-p53-p21) ρυθμίζει τη παύση του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις G1 και G2. Η p53-εξαρτώμενη G1/S στάση μεσολαβεί από την p53-εξαρτώμενη επαγωγή της πρωτεΐνης p21 ενώ η p53-εξαρτώμενη στάση στη G2/M φάση μεσολαβεί από την αναστολή του προαγωγού της κυκλικής B1 και της CDK1 (cyclin dependent kinase1). Η δραστηριότητα και η σταθεροποίηση της πρωτεΐνης p53 ρυθμίζεται μέσω αλληλεπιδράσεως της με πρωτεΐνες όπως η mdm2 η οποία επιτρέπει τη στόχευση της πρωτεΐνης p53 από το πρωτεολυτικό δίκτυο της ουμπικουιτίνης. Το μονοπάτι της πρωτεΐνης Rb (p16-κυκλίνη D/CDK4-Rb) ρυθμίζει το σημείο περιορισμού του κυτταρικού κύκλου αναστέλλοντας τη μεταγραφή γονιδίων απαραίτητων για τη μετάβαση του από την G1 στην S φάση. Βασικό ρόλο στο δίκτυο Rb έχει η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Rb (pRb). Η pRb είναι μέλος της πρωτεϊνικής οικογένειας των "rocket-protein" που συμπεριλαμβάνει και τις πρωτεΐνες p130/pRb2 και p107. Η υπό-φωσφορυλιωμένη pRb δεσμεύει και απενεργοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα E2F1 που είναι απαραίτητος για τη μετάβαση του κυτταρικού κύκλου από την G1 στην S φάση. Όταν η pRb είναι φωσφορυλιωμένη απελευθερώνεται ο μεταγραφικός παράγοντας E2F1. Η φωσφορυλίωση της pRb ενεργοποιείται από το σύμπλοκο κυκλίνη D-CDK4/6 και αναστέλλεται από τα μόρια p16, p27 και από άλλους αναστολείς των CDKs. Τα δύο δίκτυα ρύθμισης (p53 και p27) συνδέονται μέσω του γονιδιακού τόπου 9p21 όπου βρίσκονται τα γονίδια των δύο CDK, CDKN2A και CDKN2B. Το γονίδιο CDKN2A κωδικοποιεί τη πρωτεΐνη p16 που εμπλέκεται στο δίκτυο ρύθμισης Rb1 όπου η πρωτεΐνη p14/ARF δεσμεύει τη Hdm2 και επάγει την αποδόμηση της προλαμβάνοντας έτσι την Hdm2-επιτελούμενη διάσπαση της πρωτεΐνης p53. Κεντρικό ρόλο στο δίκτυο ρύθμισης



Εικόνα 8. Ο ρόλος του Rb στο κυτταρικό κύκλο (Darnell et al, 1998).)

p27 (p27-κυκλίνη E-CDK2) έχει η CDK1 p27, η οποία σταματάει τον κυτταρικό κύκλο στην G1 φάση. Η πρωτεΐνη p27 φωσφορυλιώνεται από το σύμπλοκο κυκλίνη E-CDK2 οπότε



και ενεργοποιείται η πρωτεοσωμική αποδόμηση της από την ουμπικουιλίνη. Η πρωτεΐνη SKP2 δρα ως λιγάση της ουμπικουιλίνης κατά την διαδικασία της αποδόμησης της p27.

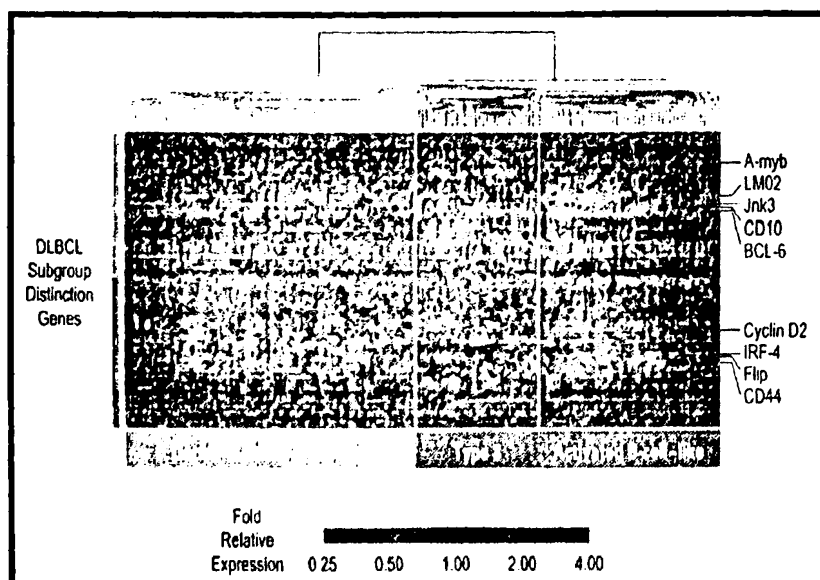
Ιδιαίτερα σημαντική είναι η αλληλεξάρτηση κυτταρικού κύκλου και απόπτωσης (2,11,12). Έχει βρεθεί ότι το γονίδιο p53 καταστέλλει την έκφραση του bcl-2 γονιδίου και ενεργοποιεί την έκφραση του bax γονιδίου. Υψηλά επίπεδα της bcl-2 πρωτεΐνης ευνοούν την κυτταρική επιβίωση, ενώ υψηλά επίπεδα της p53 πρωτεΐνης οδηγούν σε αύξηση της bax και ελάττωση της bcl-2, οδηγώντας το κύτταρο σε απόπτωση. Επιπλέον υπάρχουν πολλές ενδείξεις ότι το γονίδιο Rb μπορεί να καταστείλει την απόπτωση καθότι δρα ως καταστολέας σε αποπτωτικές διαδικασίες που επάγει το γονίδιο p53 (2-4). Επιπλέον, η αποδόμηση της pRb από τις κασπάσες φαίνεται να είναι σημαντική για την αποτελεσματική επαγωγή της απόπτωσης από τις πρωτεΐνες TNF και CD95 (2-4).



1.4 Β-ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ, ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΣΤΟ DLBCL.

Βασικός σκοπός των μελετών που αναλύουν το πρότυπο της γονιδιακής έκφρασης της Β-κυτταρικής διαφοροποίησης των λεμφωμάτων είναι η ταυτοποίηση του κυττάρου προέλευσης ενός συγκεκριμένου Β-λεμφώματος. Επομένως, το κύτταρο προέλευσης ενός Β-λεμφώματος παραπέμπει στη σχέση μεταξύ του προτύπου γονιδιακής έκφρασης του λεμφώματος, τη κλινική εμφάνιση της νόσου και το στάδιο της Β-κυτταρικής διαφοροποίησης. Η σχέση αυτή συνήθως καθορίζεται μετά από συνδυασμένη αξιολόγηση της ιστολογικής εικόνας, του ανοσοφαινότυπου, και ορισμένων γενετικών χαρακτηριστικών.

Πρόσφατες μελέτες ανάλυσης του συνδυασμένου προτύπου της γονιδιακής έκφρασης των DLBCL με τη μέθοδο των cDNA και των ολιγονουκλεοτιδιακών μικροσυστοιχιών πρόσθεσαν σημαντικές πληροφορίες όσο αναφορά: α) τη σχέση του προτύπου της γονιδιακής έκφρασης των DLBCL και του προτύπου της γονιδιακής έκφρασης της Β-λεμφοκυτταρικής διαφοροποίησης και β) τη σχέση του προτύπου της γονιδιακής έκφρασης της Β-κυτταρικής διαφοροποίησης και την έκφραση των γονιδίων της απόπτωσης και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

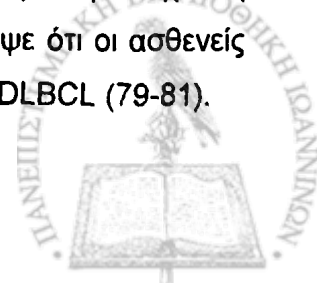


Εικόνα 9. cDNA μικροσυστοιχίες σε DLBCL (Rosenwald et al, 2002)

Η μέθοδος των cDNA και ολιγονουκλεοτιδιακών μικροσυστοιχιών παρέχει τη δυνατότητα ταυτόχρονης ποσοτικής ανάλυσης των επιπέδων του mRNA εκατοντάδων ή χιλιάδων γονιδίων. Συγκεκριμένα στις cDNA μικροσυστοιχίες το προϊόν της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) σημαίνεται πάνω σε φίλτρα ή σε αντικειμενοφόρους πλάκες. Στη περίπτωση των ολιγονουκλεοτιδικών μικροσυστοιχιών οι ολιγονουκλεοτιδικοί ιχνηθέτες τοποθετούνται ή συντίθενται απευθείας στην επιφάνεια πλακιδίων σιλικόνης. Τα αποτελέσματα δύνανται να αναλυθούν με δύο

μεθόδους την επιτηρούμενη (supervised learning method) ή την μη-επιτηρούμενη μέθοδο (unsupervised learning method). Η δεύτερη μέθοδος κατηγοριοποιεί τα δείγματα σε ομάδες με βάση την γονιδιακή τους έκφραση χωρίς να λαμβάνει υπόψιν εκ των προτέρων γνωστές συσχετίσεις, ενώ η πρώτη μέθοδος κατηγοριοποιεί τα δείγματα λαμβάνοντας υπ' όψιν γνωστές διαφορές (όπως π.χ. ίαση έναντι θανατηφόρου έκβασης) και παράγει τα μεταγραφικά πρότυπα καθορισμένων ομάδων.

Η μεθοδολογία των cDNA μικροσυστοιχιών χρησιμοποιήθηκε από τον Alizadeh και συν (66), και τον Rosenwald και συν (67). Ο Alizadeh και συν (66) έδειξαν ότι υπάρχει ποικιλία στο πρότυπο γονιδιακής έκφρασης των DLBCL η οποία προφανώς παραπέμπει στην ποικιλία της έκφρασης γονιδίων του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της αντίδρασης του ξενιστή και του σταδίου της Β-κυτταρικής διαφοροποίησης του λεμφώματος. Με βάση το πρότυπο έκφρασης των γονιδίων διαφοροποίησης των Β-λεμφοκυττάρων και χρησιμοποιώντας τη μη-επιτηρούμενη μέθοδο (ιεραρχική ομαδοποίηση) ο Alizadeh και συν (66) αναγνώρισαν δύο μοριακά διακριτές υποομάδες DLBCL, α) αυτά που έχουν πρότυπο γονιδιακής έκφραση προσομοιάζουν με αυτό των Β-λεμφοκυττάρων του βλαστικού κέντρου (Germinal Center B-cell like-Diffuse Large B-cell Lymphoma, GCB-LDLBCL) και β) αυτά που έχουν πρότυπο γονιδιακής έκφραση όμοιο με αυτό in vitro ενεργοποιημένων Β-λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος (Activated B-cell Like-Diffuse Large B-Cell Lymphoma, ABL-DLBCL). Διαπιστώθηκε ότι το GCB-LDLBCL χαρακτηρίζεται από την έκφραση γονιδίων των φυσιολογικών Β-κυττάρων του βλαστικού κέντρου (π.χ. Bcl-6, CD10, CD38) ενώ το ABL-DLBCL χαρακτηρίζεται από την έκφραση γονιδίων τα οποία επάγονται φυσιολογικά κατά την διάρκεια της in vitro ενεργοποίησης περιφερικών Β-λεμφοκυττάρων. Επιπρόσθετα, το πρότυπο γονιδιακής έκφρασης των GCB-LDLBCL περιλαμβάνει ένα πλήθος πρόσφατα αναγνωρισμένων γονιδίων όπως τα γονίδια Bcl-7A και LMO2. Το γονίδιο BCL-7A κλωνοποιήθηκε ως μέρος μίας σύνθετης διαμετάθεσης που εμφανίστηκε σε σταθερές κυτταρικές σειρές λεμφωμάτων Burkitt και διάχυτων Β-λεμφωμάτων του μεσοθωρακίου. Το γονίδιο LMO2 μετατίθεται και υπερεκφράζεται σε μία υποομάδα Τ-λεμφοβλαστικής λευχαιμίας και πιθανότατα συμμετέχει στην αναστολή της Β-κυτταρικής διαφοροποίησης. Επιπλέον, το πρότυπο γονιδιακής έκφρασης του ABL-DLBCL περιλαμβάνει το γονίδιο IRF4/MUM1 και τα αντί-αποπτωτικά γονίδια c-FLIP και Bcl-2. Το γονίδιο cFLIP είναι η αρνητική ισομορφή του γονιδίου της κασπάσης 8 και έχει την δυνατότητα να αναστέλλει την απόπτωση την επαγόμενη από το Fas και τους άλλους υποδοχείς θανάτου. Όσον αφορά τη συσχέτιση της κλινική πορείας και της μοριακής ταξινόμησης των DLBCL, προέκυψε ότι οι ασθενείς με GCB-DLBCL είχαν ευνοϊκότερη κλινική έκβαση από εκείνους με ABL-DLBCL (79-81).



Τα ευρήματα του Alizadeh και συν (66) επιβεβαιώθηκαν από τον Rosenwald και συν (66,67) οι οποίοι δημιούργησαν ένα μοριακό μοντέλο πρόγνωσης βασιζόμενο σε γονίδια που σχετίζονται με την επιβίωση. Ο Rosenwald και συν (67) περιέγραψε τρεις μοριακούς υποτύπους DLBCL: α) GCB-DLBCL, (germinal center B-cell like DLBCL), β) ABL-DLBCL (activated B-cell like DLBCL) και γ) ένα τρίτο υπότυπο τα τύπου 3 DLBCL. Οι ασθενείς με GCB-DLBCL είχαν το υψηλότερο ποσοστό πενταετούς επιβίωσης. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι οι περιπτώσεις GCB-DLBCL χαρακτηρίζονται από τη μετάθεση $t(14;18)$ (στην οποία εμπλέκεται το γονίδιο Bcl-2), την ενίσχυση του γονιδιακού τόπου του c-rel στο χρωμόσωμα 2p, και συρρέουσες σωματικές μεταλλάξεις των γονιδίων των ανοσοσφαιρινών. Το c-rel γονίδιο κωδικοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα NFκB που αποτελείται από διμερή υπομονάδων που ανήκουν στην πρωτεϊνική οικογένεια REL/NFκB (cREL, p65/RELA, RELB, p50/p105, και p52/p100.). Τα διμερή συνδέονται σε μία κοινή αλληλουχία γνωστή ως σημείο πρόσδεσης του NFκB. Η μεταγραφική δράση του NFκB ρυθμίζεται από την πρωτεϊνική οικογένεια των IκB αναστολέων οι οποίοι δεσμεύουν τα NFκB διμερή και τα διατηρούν στο κυτταρόπλασμα. Η έκθεση των λεμφοκυττάρων σε πλήθος εξωκυττάρων ερεθισμάτων (π.χ. προφλεγμονώδη κυτταροκίνες) ενεργοποιεί το σύμπλοκο των IκB κινάσων που φωσφορυλιώνει την προσκολλημένη IκB υπομονάδα, απελευθερώνοντας τον NFκB που με την σειρά του μετατοπίζεται στο πυρήνα. Ανάλογα με το εξωκυττάριο ερέθισμα και την ενδοκυττάρια διεργασία ο NFκB ενεργοποιεί προ-αποπτωτικά γονίδια όπως CD95, CD95L, και TRAIL, αντί-αποπτωτικά γονίδια όπως c-FLIP, Bcl-2, Bcl-xL, c-IAP1 και c-IAP2 και γονίδια του κυτταρικού κύκλου όπως κυκλίνη D1, κυκλίνη D2, και c-myc. Οι πρωτεΐνες REL/NFκB συμμετέχουν στη φυσιολογική B-κυτταρική διαφοροποίηση, το κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση. Η ενεργοποίηση της μεταγωγής σήματος του Rel/NFκB μονοπατιού έχει συσχετισθεί με αρκετές νεοπλασίες και ανοσολογικές απαντήσεις.

Πέρα από τον διαχωρισμό των DLBCL σε τρεις βασικές μοριακές υποκατηγορίες ο Rosenwald και συν (66) διαπίστωσαν ότι η έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων σχετίζεται με την επιβίωση. Τα περισσότερα από αυτά τα γονίδια εκφράζονται στα Β-λεμφοκυττάρων του βλαστικού κέντρου, σε πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, σε αντιδραστικά λεμφοκύτταρα και σε κύτταρα του στρώματος του φυσιολογικού λεμφαδένα, καθώς επίσης και σε κύτταρα που φέρουν στην επιφάνεια τους αντιγόνα του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας τάξης II.

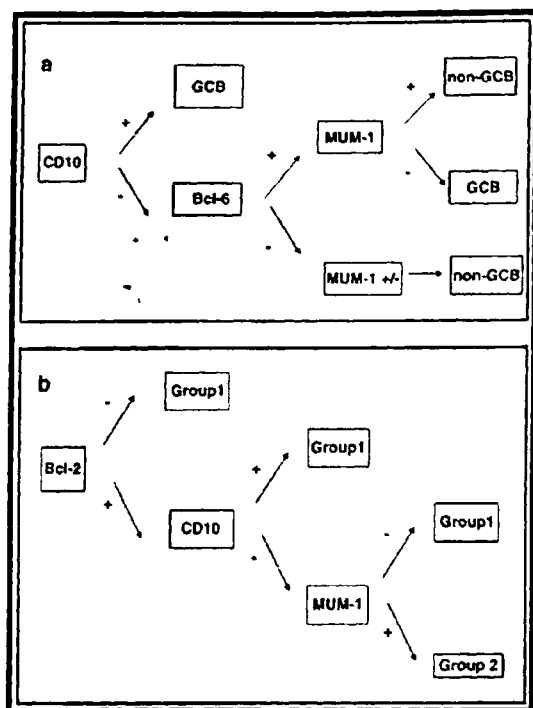
Ο Shipp και οι συν (69) χρησιμοποίησαν μια διαφορετική πειραματική προσέγγιση για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης των DLBCL. Συγκεκριμένα, ανέλυσαν τα αποτελέσματα των ολιγονουκλεοτιδικών μικροσυστοιχειών χρησιμοποιώντας την επιτηρούμενη μέθοδο πρόβλεψης και ανέδειξαν το πρότυπο γονιδιακής έκφρασης των

DLBCL με βάση τη κλινική πορεία της νόσου (ίση έναντι θανατηφόρου έκβασης και υποτροπιάζουσας νόσου). Ο αλγόριθμος που προέκυψε ανέδειξε δύο υποομάδες ασθενών με στατιστικώς σημαντική διαφορά όσον αφορά την 5ετή επιβίωση (70% έναντι 12%). Επιπλέον διαπιστώθηκε ότι τα ευρήματα του Shipp και συν (69) σχετίζονται με τον διεθνή προγνωστικό δείκτη IPI (international prognostic index) προβλέποντας παράλληλα τη πιθανότητα ίασης και κατάληξης από τη νόσο. Τα γονίδια τα οποία συσχετίστηκαν με τη κλινική πορεία των ασθενών ήταν γονίδια που εμπλέκονται: α) στη ρύθμιση της μεταγωγής σήματος του B-κυτταρικού υποδοχέα (BCR), β) στο μονοπάτι της φωσφορυλίωσης της σερίνης/θρεονίνης και γ) στην απόπτωση.

Οι Wright και συν (67) χρησιμοποίησαν για την ανάλυση των αποτελεσμάτων μια νέα στατιστική μέθοδο ταξινόμησης (statistical predictor) η οποία βασίζεται στην έκφραση των γονιδίων που βοηθούν στη διάκριση μεταξύ GCB-DLBCL και ABL-DLBCL. Με τη μέθοδο αυτή υπολογίστηκε η πιθανότητα ταξινόμησης ενός DLBCL σε μία από τις δύο υποομάδες ανεξάρτητα από την πειραματική προσέγγιση που ακολουθήθηκε (cDNA ή ολιγονουκλεοτιδικές μικροσυστοιχίες). Η συσχέτιση της νέας αυτής μεθόδου με τη 5ετή επιβίωση έδειξε ότι η υποομάδα GCB-DLBCL παρουσιάζει 5ετή επιβίωση 62% ενώ η υποομάδα των ABL-DLBCL παρουσιάζει 5ετή επιβίωση 26% (67). Επιπλέον ο Wright και συν (67) έδειξαν ότι τα ABL-DLBCL εκφράζουν μία ομάδα γονιδίων που εμπλέκονται στη πλασματοκυτταρική διαφοροποίηση και ιδιαίτερα γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του ενδοπλασματικού δικτύου και της συσκευής του Golgi που εμπλέκονται στην απέκκριση μορίων όπως η πρωτεΐνη XBP-1 που είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζει την τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών του ενδοπλασματικού δικτύου.

Σε μία άλλη μελέτη ο Davis και συν (155) έδειξαν ότι τα ABL-DLBCL χαρακτηρίζονται από τη συνεχή και αυτόνομη ενεργοποίηση του NFκB και από υψηλά επίπεδα έκφρασης των NFκB-γονιδιακών στόχων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που κωδικοποιούν το ρυθμιστικό παράγοντα 4 της ιντερφερόνης (IRF4/MUM1), το μόριο προσκόλλησης CD44, τα αντί-αποπτωτικά γονίδια, c-FLIP, Bcl-2, bcl-xl, TRAF1, TRAF2, c-IAP1 και c-IAP2 και το γονίδιο της κυκλίνης D2 που εμπλέκεται στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό (78-80, 155).

Σε μελέτη των Davis και συν (155) σε δύο σταθερές κυτταρικές σειρές ABL-DLBCL βρέθηκε ότι ο πρωτεϊνικός καταρράκτης του συμπλόκου REL/NFκB είναι ενεργοποιημένος. Η IκB κινάση (IκBκ) παρουσιάζει αυτόνομη και συνεχή ενεργοποίηση και η IκBa παρουσιάζει ταχεία αποδόμηση οπότε ο μεταγραφικός παράγοντας NFκB μετακινείται στο πυρήνα όπου και ρυθμίζει τη μεταγραφή των γονιδιακών στόχων συμπεριλαμβανομένων και των γονιδίων TRAF. Σε κυτταρικές σειρές GCB-DLBCL δεν παρατηρήθηκε ενεργοποίηση του συμπλόκου REL/NFκB. Επιπλέον, η ερευνητική ομάδα



Εικόνα 10. (a) Ανοσοιστοχημικός αλγόριθμος του Hans και συνεργατών για την ομαδοποίηση των DLBCL σε προγνωστικές υποομάδες (b) Εναλλακτικός ανοσοιστοχημικός αλγόριθμος για την ομαδοποίηση των DLBCL σε προγνωστικά ευμενής (group 1) και μή (group 2) ομάδες (Muris *et al.*).

του Davis έδειξε ότι η ρετροϊκή επαγωγή της πρωτεΐνης Iκβ που είναι ο υπεραναστολέας της πρωτεΐνης IκBa είναι τοξική για τα κύτταρα του ABL-DLBCL ενώ αντιθέτως τα κύτταρα του GCB-DLBCL έμειναν ανεπηρέαστα. Στην ίδια μελέτη η μορφολογική ανάλυση της δομής του DNA έδειξε ότι η αναστολή του παράγοντα NFκB προκαλεί διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη G1 φάση και κυτταρικό θάνατο.

Ο Houldsworth και συν (163) έδωσαν περισσότερες πληροφορίες για τον ρόλο που διαδραματίζει το δίκτυο ρύθμισης του παράγοντα NFκB στα DLBCL. Συγκεκριμένα ανέλυσαν τη σχέση μεταξύ REL ενίσχυση και REL λειτουργικότητας και του προτύπου γονιδιακής έκφρασης των GCB-DLBCL και των ABL-DLBCL. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι η ενίσχυση του γονιδιακού τόπου του REL (2p12-16) δεν σχετίζεται με την πυρηνική συσσώρευση την ενεργοποιημένης

μορφής της πρωτεΐνης. Η ενίσχυση του γονιδιακού τόπου του REL ανιχνεύθηκε και στις δύο ιστογενετικές υποομάδες των DLBCL (GCB-DLBCL και ABL-DLBCL) μολονότι η μετατόπιση της πρωτεΐνης στον πυρήνα ήταν σημαντικά συχνότερη στα ABL-DLBCL. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι η γονιδιακή ενίσχυση 2p12-16 δεν οδηγεί σε ανώμαλη ενεργοποίηση του γονιδίου REL γεγονός που δείχνει ότι το γονίδιο δεν επηρεάζεται λειτουργικά από την γενωμική ενίσχυση.

Δεδομένου ότι η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών είναι δαπανηρή και δεν είναι ευρέως διαθέσιμη, πολλές μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει επιτυχώς την ανοσοιστοχημική ανάλυση σε τομές παραφίνης προκειμένου να ταξινομήσουν ιστογενετικά τα DLBCL. Άξια αναφοράς είναι η μελέτη του Hans και συν (57,164) οι οποίοι συσχέτισαν τα αποτελέσματα των cDNA μικροσυστοιχιών και της ανοσοιστοχημικής ανάλυσης προκειμένου να μελετήσουν την δυνατότητα ιστογενετικής ταξινόμησης των DLBCL μέσω της έκφρασης δεικτών B-κυτταρικής διαφοροποίησης και συγκεκριμένα του ανοσοφαινότυπου Bcl-6/CD10/MUM1. Η μελέτη των Hans και συνεργατών έδειξε ότι η ανοσοιστοχημική ταξινόμηση των DLBCL με βάση τον ανοσοφαινότυπο Bcl-6/CD10/MUM1 σε GCB_DLBCL και nonGCB-DLBCL έχει προγνωστική αξία και

προβλέπει την ταξινόμηση των μικροσυστοιχιών σε ποσοστό 71% για το πρώτο ιστογενετικό υπότυπο και 88% για τον δεύτερο (57).

Πρόσφατες μελέτες *in vitro* έδειξαν ένα διπλό ρόλο της πρωτεΐνης Bcl-6 στην απόπτωση και στο κυτταρικό κύκλο, και επιπλέον μελέτες *in vitro* και *in vivo* έδειξαν συσχέτιση μεταξύ της πρωτεΐνης CD10, της απόπτωσης και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Όσο αναφορά τη σχέση της πρωτεΐνης Bcl-6 με την απόπτωση τα βιβλιογραφικά δεδομένα δείχνουν ότι η πρωτεΐνη μπορεί να επάγει ή να αναστέλλει την απόπτωση και ότι η δράση της εξαρτάται από το είδος του κυττάρου και την πειραματική προσέγγιση που ακολουθήθηκε. Ορισμένες μελέτες αναφέρουν ότι η πρωτεΐνη Bcl-6 μπορεί να προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση. Ο Kumagai και συν (76) χρησιμοποίησαν μία διαφοροποιούμενη μυογενή (myogenic) κυτταρική σειρά ποντικών (C2C12) και έδειξαν ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Bcl-6 μέσω αδενοϊών σχετίζεται με τη τελική διαφοροποίηση και την αύξηση της ζωτικότητας των διαφοροποιούμενων μυοκυττάρων προλαμβάνοντας την απόπτωση. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι η αναστολή της έκφρασης της πρωτεΐνης Bcl-6 μέσω της διαμόλυνσης των κυττάρων με antisense Bcl-6 mRNA οδηγεί τα κύτταρα σε απόπτωση, ενώ η επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης Bcl-6 μέσω της διαμόλυνσης των κυττάρων με sense Bcl-6 mRNA αναστέλλει την απόπτωση. Στη μελέτη αυτή ο Kumagai και συν (76) υποστηρίζουν ότι η πρωτεΐνη Bcl-6 πιθανώς να προστατεύει τα μυοκύτταρα από ειδικούς στρεσογόνους παράγοντες (π.χ. στέρηση ορού).

Ο Kojima και συν (80) μελέτησαν τη σπερματογένεση σε ποντικούς με ανεπάρκεια της Bcl-6 πρωτεΐνης (Bcl-6 $-/-$), Bcl-6 ετεροζυγότες ($+/-$), και Bcl-6 ($+/+$) ποντικούς, και έδειξαν ότι η πρωτεΐνη Bcl-6 μπορεί να παίξει σημαντικό ρόλο στη προστασία των σπερματοκυττάρων από την απόπτωση που επάγεται από στρεσογόνους παράγοντες όπως είναι το θερμικό σοκ (heat shock induced apoptosis).

Ο Baron και συν (81) χρησιμοποίησαν τη κυτταρική σειρά BJAB (EBV-αρνητικό λέμφωμα Burkitt) η οποία εκφράζει σε υψηλά επίπεδα την πρωτεΐνη Bcl-6 και βρήκαν ότι το γονίδιο PDCD2 (human programmed cell-death 2) το οποίο σχετίζεται με την απόπτωση ανώριμων θυμοκυττάρων, είναι μεταγραφικός στόχος της αρνητικής δράσης της πρωτεΐνης Bcl-6. Επιπλέον, μετά από ανοσοιστοχημικές μελέτες σε ανθρώπινες αμυγδαλές, έδειξαν ότι στα κύτταρα του βλαστικού κέντρου και του μανδύα η εντόπιση της έκφρασης της πρωτεΐνης PDCD2 σχετίζεται αντιστρόφως ανάλογα με την έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-6. Βασιζόμενοι στα ευρήματα αυτά ο Baron και συν (81) υποστήριξαν ότι η πρωτεΐνη Bcl-6 μπορεί να αναστέλλει την απόπτωση μέσω της κατασταλτικής μεταγραφικής δράσης που ασκεί στο γονίδιο PDCD2.



Επιπλέον ο Kogusu και συν (90) χρησιμοποίησαν τις κυτταρικές σειρές Daudi και Raji (κυτταρικές σειρές Β-λεμφωμάτων) οι οποίες υπερεκφράζουν τη φυσιολογική πρωτεΐνη Bcl-6 ή τη μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης, την Bcl-6-Ala333/343, και έδειξαν ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Bcl-6 δεν επηρεάζει σημαντικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επιπλέον προστατεύει τα κύτταρα από την αύξηση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου και την απόπτωση που επάγεται από χημειοθεραπευτικούς παράγοντες όπως το ετοποσίδιο.

Ωστόσο, σε ορισμένες άλλες μελέτες υποστηρίζεται ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Bcl-6 μπορεί να επάγει την απόπτωση. Ο Zhang και συν (91) χρησιμοποίησαν τη σταθερή κυτταρική σειρά ποντικών NIH3T3 και βρήκαν ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Bcl-6 επάγει την απόπτωση των ινοβλαστών. Επιπλέον οι ίδιοι ερευνητές έδειξαν ότι μια αλληλουχία 17 αμινοξέων που βρίσκεται στο κέντρο της πρωτεΐνης είναι υπεύθυνη για την επαγωγή της απόπτωσης.

Ο Albagli και συν (92) χρησιμοποίησαν μια κυτταρική σειρά ανθρώπινου οστεοσαρκώματος (U2OS) η οποία ρυθμίζεται από τετρακυκλίνες και είναι σταθερά επιμολυσμένη με το γονίδιο Bcl-6. Στη μελέτη αυτή διαπιστώθηκε ότι η μείωση της τετρακυκλίνης επάγει την έκφραση του γονιδίου ενώ η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Bcl-6 επάγει τη όσο-εξαρτώμενη αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων, επιβραδύνει την S-φάσης του κυτταρικού κύκλου και ενεργοποιεί την απόπτωση.

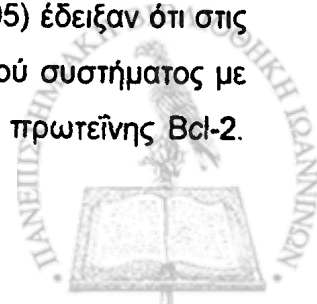
Σε πρόσφατη μελέτη ο Yamoshi και συν (93) έδειξαν ότι κύτταρα CV1 και HeLa επιμολυσμένα με ανασυνδυασμένο αδενοϊό τα οποία εξέφραζαν υψηλά επίπεδα της πρωτεΐνης Bcl-6 παρέμειναν στη υπό-G1 και G2/M φάση του κυτταρικού κύκλου ενώ στα αποπτωτικά κύτταρα προηγήθηκε μεγάλη μείωση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών Bcl-2 και Bcl-xL. Βασισμένοι στα παραπάνω ευρήματα οι Yamoshi και συν (93) υποστήριξαν ότι η πρωτεΐνη Bcl-6 πιθανών να ρυθμίζει την έκφραση των αντί-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και Bcl-xL.

Ο Tang και συν (94) περιέγραψαν ένα νέο προ-αποπτωτικό μηχανισμό που ενεργοποιείται από τη πυρηνική μετατόπιση του μεταγραφικού παράγοντα AFX και στον οποίο εμπλέκεται το Bcl-6 και το αντί-αποπτωτικό γονίδιο Bcl-xL. Στη μελέτη αυτή οι ερευνητές υποστηρίζουν ότι υπάρχει περιοχή άμεσης πρόσδεσης της πρωτεΐνης Bcl-6 στον υποκινητή του γονιδίου Bcl-xL.

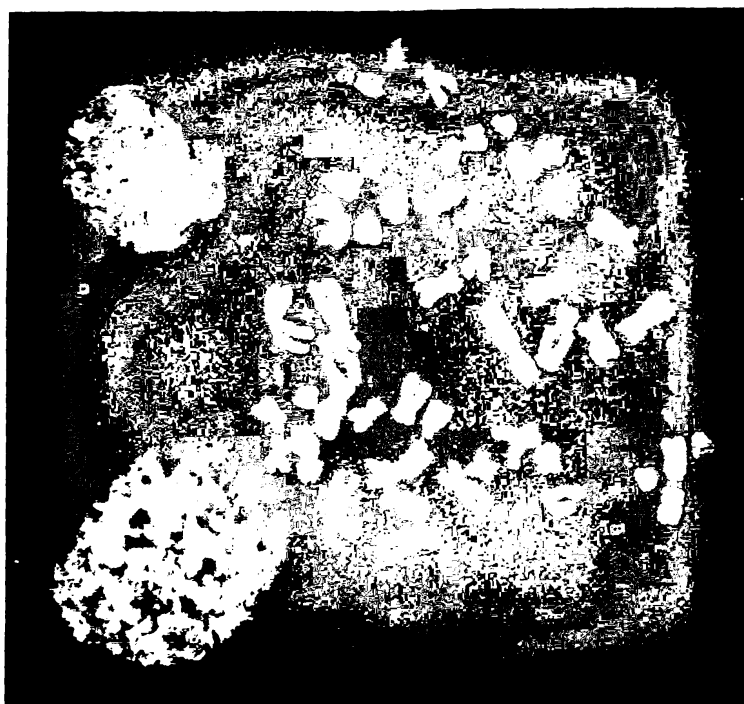
Όσον αφορά την έκφραση της πρωτεΐνης CD10, πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η έκφραση της πρωτεΐνης συσχετίζεται θετικά με την απόπτωση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε φυσιολογικά και νεοπλασματικά Β-λεμφοκύτταρα. Πράγματι: α) τα κύτταρα του βλαστικού κέντρου τα οποία παρουσιάζουν αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και έχουν την δυνατότητα να αποπέσουν επάγουν την έκφραση της

πρωτεΐνης CD10 ενώ στα ώριμα Β-λεμφοκύτταρα τα οποία δεν έχουν αυτή την αποπτωτική δυναμική η πρωτεΐνη δεν ανιχνεύεται (28), β) τα κύτταρα του λεμφώματος Burkitt τα οποία παρουσιάζουν υψηλό δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού και απόπτωσης εκφράζουν σταθερά τη πρωτεΐνη CD10, γ) τα κύτταρα της CD10-θετικής Β-λεμφοβλαστικής λευχαιμίας είναι κύτταρα που βρίσκονται σε κυτταρικό κύκλο και έχουν την δυνατότητα να αποπέσουν ενώ αντίθετα τα κύτταρα της CD10-αρνητικής Β-λεμφοβλαστικής λευχαιμίας παρουσιάζουν χαμηλή ικανότητα κυτταρικού πολλαπλασιασμού και είναι ανθεκτικά στην απόπτωση και δ) τα κύτταρα της Β-λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας αποτίπτουν *in vivo* και *in vitro* ανεξάρτητα από την έκφραση του μορίου CD10. Τα ανωτέρω ευρήματα σε φυσιολογικά και κακοήγη Β-λεμφοκύτταρα συμφωνούν με τα ευρήματα μελετών των Cutrona και συν (75) που περιέγραψαν ότι τα ανθρώπινα Τ-λεμφοκύτταρα (προ-θυμικού και θυμικού σταδίου διαφοροποίησης) εκφράζουν το μόριο CD10 όταν οδεύουν προς απόπτωση. Όσον αφορά τη σχέση της πρωτεΐνης CD10 με την απόπτωση έχει προταθεί ότι η συγκεκριμένη πρωτεΐνη μπορεί να κατατμήσει κυτταροκίνες που έχουν προστατευτικό ρόλο στην απόπτωση των Β και Τ-λεμφοκυττάρων. Η ιδιότητα αυτή συνδυάζεται με την ικανότητα της πρωτεΐνης CD10 να υδρολύει πλήθος ενεργών πεπτιδίων συμπεριλαμβανομένων αυξητικών και χημειοτακτικών παραγόντων. Επομένως η πρωτεΐνη CD10 πιθανών να εμπλέκεται στη διαδικασία επιλογής των Β-λεμφοκυττάρων στα βλαστικά κέντρα των λεμφοζιδίων και των Τ-λεμφοκυττάρων στο θύμο αδένά αυξάνοντας το όριο των κυτταροκινών που απαιτούνται για την αναστολή την απόπτωση των Β και Τ-λεμφοκυττάρων.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η σχέση που ανευρέθηκε μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του αντί-αποπτωτικού γονιδίου Bcl-2 και της έκφρασης γονιδίων Β-κυτταρικής διαφοροποίησης στα DLBCL. Πράγματι, σε πρόσφατες μελέτες cDNA μικροσυστοιχιών αυξημένη έκφραση του γονιδίου Bcl-2 συσχετίστηκε με το πρότυπο γονιδιακής έκφρασης των ABL-DLBCL. Πρόσφατες ανοσοιστοχημικές μελέτες που συνέκριναν τη έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 με τον ανοσοφαινότυπο BCL-6/CD10/MUM1 δεν επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα των cDNA μικροσυστοιχιών. Συγκεκριμένα ο Hans και συν (86) έδειξαν ότι έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 παρατηρείται στο 59% των GCB-DLBCL και στο 43% των nonGCB-DLBCL (ABL-DLBCL και τύπου 3 DLBCL). Επιπλέον ο Colombo και συν (88) βρήκαν ότι η πρωτεΐνη Bcl-2 εκφράζεται στο 67% των Bcl-6+/CD10+ GCB-DLBCL, στο 50% των Bcl-6(+)/CD10(-) GCB-DLBCL, και στο 62% των DLBCL σταδίου διαφοροποίησης μετά το βλαστικό κέντρο. Τέλος, ο Larocca και συν (95) έδειξαν ότι στις περισσότερες περιπτώσεις πρωτοπαθών DLBCL του κεντρικού νευρικού συστήματος με αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-6 δεν ανιχνεύεται έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2.



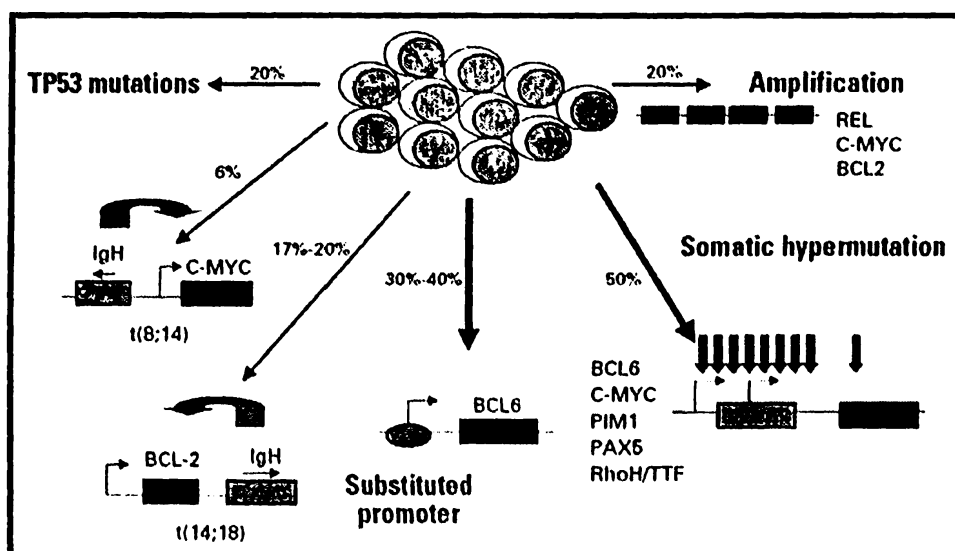
1.5 ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ ΣΤΟ DLBCL



Τα τελευταία χρόνια η εφαρμογή της τεχνικής του φθορίζοντος *in situ* υβριδισμού (FISH: Fluorescence *in situ* hybridization) γνωρίζει ραγδαία ανάπτυξη τόσο σε ερευνητικό όσο και σε διαγνωστικό επίπεδο (126-147). Η τεχνική του FISH αποτελεί κυτταρογενετική τεχνική, εναλλακτική του κλασικού καρυοτύπου, βασίζεται στον *in situ* υβριδισμό γονιδιακών ή μειζόνων χρωμοσωματικών αλληλουχιών του DNA και αποκαλύπτει τις περιοχές που καταλαμβάνουν στον πυρήνα και ειδικότερα τις θέσεις των χρωμοσωμάτων στα οποία εδράζονται. Ο φθορίζον *in situ* υβριδισμός είναι μία ευαίσθητη τεχνική με υψηλή ευκρίνεια λαμβανόμενου σήματος και επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλών γονιδιακών περιοχών στόχων. Η τεχνική του FISH επιτρέπει την ανίχνευση γενετικών αλλοιώσεων σε κύτταρα που βρίσκονται στη μετάφαση και σε μονήρες κυτταρικό επίπεδο καθιστώντας με αυτό το τρόπο εφικτή τη συσχέτιση της μορφολογίας και του ανοσοφαινότυπου με τα χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Για την εφαρμογή της τεχνικής χρησιμοποιούνται DNA ιχνηθέτες σημασμένοι με φθορίζουσες ουσίες. Οι τελομεριδιακοί ιχνηθέτες ανιχνεύουν τελομεριδιακές αλληλουχίες που συγκροτούνται από επαναλαμβανόμενες εξαμερείς αλληλουχίες και είναι ίδιες σε όλα τα χρωμοσώματα αλλά διαφέρουν σε κάθε είδος σπονδυλωτού οργανισμού. Οι κεντρομεριδιακοί α- και β-δορυφορικοί δείκτες ανιχνεύουν συγκεκριμένες κεντρομεριδιακές αλληλουχίες που είναι χαρακτηριστικές για κάθε χρωμόσωμα. Οι κλασικοί δορυφορικοί ιχνηθέτες αναγνωρίζουν συγκεκριμένες βραχείες περικεντρομεριδιακές αλληλουχίες των χρωμοσωμάτων 1, 9, 15, 16 και του μακρού σκέλους του χρωμοσώματος Y. Οι κεντρομεριδιακοί και κλασικοί

δορυφορικοί ιχνηθέτες δίδουν πληροφορίες για τον αριθμό των αντιγράφων κάθε χρωμοσώματος και επομένως για την πλοειδία του DNA. Οι ειδικοί γονιδιακοί ιχνηθέτες (locus specific probes) ανιχνεύουν μοναδικές αλληλουχίες νουκλεοτιδίων συγκεκριμένων γονιδίων. Οι χρωμοσωματικοί ιχνηθέτες είναι ομόλογοι με τμήμα ή ολόκληρο το DNA χρωμοσώματος. Εφαρμόζονται σε κύτταρα που βρίσκονται στη μετάφαση και βοηθούν στην εύκολη αναγνώριση ενός χρωμοσώματος. Ο συνδυασμός διαφόρων φθορίζοντων χρωστικών παρέχει τη δυνατότητα αναγνώρισης όλων των χρωμοσωμάτων σε ένα μόνο πλακίδιο. Οι χρωμοσωμικοί ιχνηθέτες σε συνδυασμό με κεντρομεριδιακούς ή ειδικούς γονιδιακούς ιχνηθέτες χρησιμοποιούνται για τη μελέτη μεταλλάξεων, μετατοπίσεων, μερικών ή ολικών χρωμοσωμικών απωλειών. Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο του φθορίζοντος in situ υβριδισμού έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες σε Β-λεμφώματα χαμηλής και υψηλής κακοήθειας, λεμφοαδενικής και εξωλεμφοαδενικής εντόπισης και έχει καταγραφεί η παρουσία χρωμοσωμικών ανωμαλιών, όπως πολυσωμία χρωμοσώματος 12 και 7, τρισωμία 3, απάλειψεις 6q, 11q, 13q, 22q, 2p, 12p, διπλασιασμός 14q32, και απάλειψη των γονιδιακών τόπων των γονιδίων Rb-1, p53, και CDKN2 και σε κάποιες από αυτές τις μελέτες έχουν γίνει συσχετίσεις με κλινικές παραμέτρους (όπως ο συνολικός χρόνος επιβίωσης, το διάστημα μέχρι την πρώτη υποτροπή και η σταδιοποίηση της νόσου) (126-147). Ιδιαίτερα σημαντική είναι η αξιοποίηση της τεχνικής του FISH για την ανίχνευση χρωμοσωμικών ανωμαλιών σε λεμφώματα (147), όπως απώλειες και ενισχύσεις ογκοκατασταλτικών γονιδίων και ογκογονιδίων, αντίστοιχα, που ενέχονται στους μηχανισμούς απορύθμισης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης (2,8). Για παράδειγμα η ενίσχυση του C-myc πρωτοογκογονιδίου στη χρωμοσωμική περιοχή 8q24 ανευρέθηκε σε ένα ποσοστό DLBCL (74). Επιπλέον, ετερόζυγη απάλειψη του ογκοκατασταλτικού γονιδίου Rb-1 που βρίσκεται στη χρωμοσωμική περιοχή 13q14 ανευρέθηκε στο 20% των περιπτώσεων Β-χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας και στο 20% των περιπτώσεων DLBCL (133,134). Είναι αξιοσημείωτο ότι ομόζυγη απάλειψη του Rb-1 είναι σπάνια και κυρίως σ'αυτές τις περιπτώσεις υπάρχει σημαντική απώλεια ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της πρωτεΐνης σε DLBCL (133). Επιπρόσθετα, ετερόζυγη απάλειψη του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 που βρίσκεται στη χρωμοσωμική περιοχή 17p13 ανευρέθηκε στο 20% των περιπτώσεων DLBCL και συνδυάστηκε με επιθετικά λεμφώματα και πτωχή πρόγνωση (133,134). Εν τούτης υπάρχουν αντιφατικά στοιχεία όσον αφορά την επίδραση της παρουσίας ετερόζυγων απωλειών του γονιδίου P53 στην πρόγνωση διότι σε μία άλλη μελέτη δεν φαίνεται να υπάρχει επίδραση. Ο συνήθης μηχανισμός απενεργοποίησης του γονιδίου p53 γενικά είναι ο συνδυασμός απάλειψης στο ένα αλληλίο και μετάλλαξη στο άλλο (18). Αυτά τα δεδομένα όμως ανευρίσκονται σε ένα μικρό ποσοστό DLBCL και κυρίως κατά την μετάπτωση χαμηλής κακοήθειας λεμφωμάτων

σε DLBCL. Επίσης στις περιπτώσεις αυτές ανευρίσκεται αυξημένη ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης p53 η οποία συνδυάζεται με πτωχή πρόγνωση (18). Από μια άλλη πλευρά από τους μηχανισμούς απενεργοποίησης του γονιδίου p16 όπως μετάλλαξη, απάλειψη και μεθυλίωση, ο τελευταίος φαίνεται να είναι ο πλέον σημαντικός στα DLBCL. Μεθυλίωση του P16 παρατηρείται συχνά σε περιπτώσεις μετάπτωσης από χαμηλής κακοήθειας όγκους σε DLBCL και συνοδεύεται από απώλεια της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της πρωτεΐνης (20,32). Είναι αξιοσημείωτο ότι οι κυτταρογενετικές ανωμαλίες είναι ως ένα βαθμό διαφορετικές στα εξωλεμφαδενικά λεμφώματα σε σύγκριση με τα λεμφαδενικά. Μία σημαντική μελέτη σε DLBCL από μεγάλα κύτταρα του γαστρεντερικού συστήματος ανέδειξε χρωμοσωμικές ανωμαλίες σε μεγάλο ποσοστό όγκων, όπως απόκτηση όλου ή τμήματος των χρωμοσωμάτων 11, 12, 1q, και 3q και απώλεια τμήματος των χρωμοσωμάτων 6q και 17p (141). Αυτές οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες συνδυάστηκαν



Εικόνα 11. Χρωμοσωμικές ανωμαλίες στα DLBCL (Clin. Investig. 2006)

με πτωχή πρόγνωση. Τα ευρήματα σε DLBCL του βλεννογονοεξαρτώμενου λεμφικού ιστού (MALT) ήταν διαφορετικά και αφορούσαν τα χρωμοσώματα 7, 12 και 18 και κυρίως το χρωμόσωμα 3 στο οποίο παρατηρήθηκε τρισωμία στο 60% των περιπτώσεων (144). Ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα είναι πρόσφατη μελέτη με συνδυασμό πολλαπλής χρώσης και συμβατικού FISH (148,149) στην οποία αναφέρεται ότι οι συχνότερες κυτταρογενετικές ανωμαλίες στα DLBCL είναι αυτές των γονιδίων bcl-2 και bcl-6.

Ένα από τα πιο σημαντικά επιχειρήματα που ενισχύει την άποψη ότι οι ιστογενετικοί υπότυποι των DLBCL αποτελούν διακριτές παθολογικές οντότητες είναι το γεγονός ότι χαρακτηρίζονται από διαφορετικούς ογκογενετικούς μηχανισμούς. Η διαμετάθεση t(14;18) απορυθμίζει το γονίδιο Bcl-2 τοποθετώντας το κοντά στα ενισχυτικά στοιχεία (enhancer elements) του γονιδιακού τόπου της βαριάς αλυσίδας της Ig.

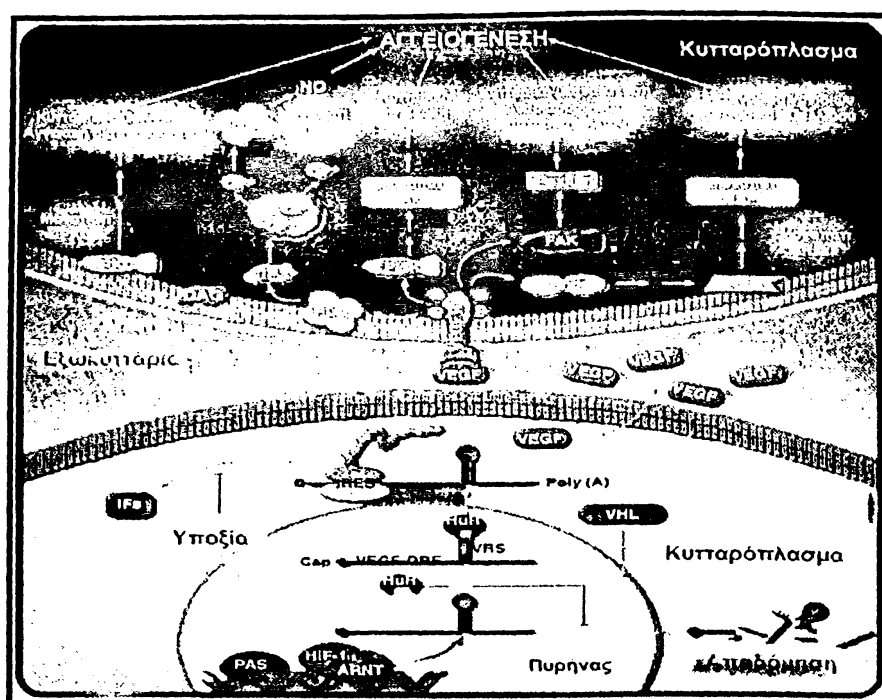
Μελέτες έδειξαν ότι η διαμετάθεση t(14;18)(q32;q21) ανευρίσκεται στο 20% των DLBCL και ότι παρατηρείται κυρίως στα GC-DLBCL (35%) και σχετίζεται με τα επίπεδα

του Bcl-2 mRNA και τη πρωτεϊνική έκφραση. Ωστόσο ανιχνεύονται υψηλά επίπεδα πρωτεΐνης Bcl-2 και στα ABC-DLBCL παρότι δεν ανευρίσκεται η διαμετάθεση t(14;18)(q32;q21). Το εύρημα αυτό δείχνει ότι προφανώς υπάρχουν εναλλακτικοί μηχανισμοί υπερέκφρασης της πρωτεΐνης Bcl-2. Μελέτες έδειξαν ότι ο μεταγραφικός παράγοντας NFκB εκφράζεται στα ABC-DLBCL και παίζει σημαντικό ρόλο στη παθογένεση αυτού του λεμφώματος. Το Bcl-2 είναι γονιδιακός στόχος του NFκB και η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 πιθανών να οφείλεται σε ενεργοποίηση του δικτύου ρύθμισης του NFκB. Ένας άλλος πιθανός μηχανισμός είναι η ενίσχυση του χρωμοσωμικού τόπου 18q21 στον οποίο εδράζει το γονίδιο Bcl-2. Μελέτες με τη μέθοδο CGH (comparative genomic hybridization) έδειξαν ότι στο 20% των περιπτώσεων των DLBCL ανιχνεύεται επαύξηση του χρωμοσωμικού τόπου 18q. Ενδιαφέρον είναι ότι με τη μέθοδο FISH επαύξηση του γονιδιακού τόπου παρατηρείται σχεδόν αποκλειστικά στον ιστογενετικό υπότυπο ABC-DLBCL (140-143).

Μια άλλη συχνή κυτταρογενετική ανωμαλία των DLBCL είναι η επαύξηση του γονιδιακού τόπου του cREL στο χρωμοσωμικό βραχίονα 2p. Η συγκεκριμένη χρωμοσωμική ανωμαλία ανιχνεύεται στο 16% των GCB DLBCL ενώ δεν ανιχνεύεται στα ABL DLBCL. Το γονίδιο cREL κωδικοποιεί ένα μέλος της αντί-αποπτωτικής οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων NFκB. Δεν έχουν ακόμα διευκρινιστεί τα πλεονεκτήματα που προσδίδει η επαύξηση του γονιδίου cREL στη κυτταρική επιλογή των GCB DLBCL εφόσον δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην έκφραση των NFκB γονιδιακών στόχων μεταξύ περιπτώσεων GCB DLBCL που φέρουν τη γονιδιακή επαύξηση και εκείνων με φυσιολογικό αριθμό αντιγράφων του γονιδίου cREL (142, 143). Το εύρημα αυτό εξηγείται αφού η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NFκB απαιτεί την ενεργοποίηση της IκB κινάσης ούτως ώστε να μετατοπιστεί στον πυρήνα του κυττάρου. Κατά την διάρκεια της ενεργοποίησης του βλαστικού κέντρου η μεταγωγή του ερεθίσματος μέσω του B-κυτταρικού υποδοχέα ή μέσω του υποδοχέα CD40 μπορεί να ενεργοποιήσει την IκB κινάση οπότε το B-λεμφοκύτταρο του βλαστικού κέντρου που φέρει την επαύξηση του γονιδίου c-REL δέχεται ένα ισχυρό αντί-αποπτωτικό σήμα που του προσδίδει το πλεονέκτημα της θετικής επιλογής στα αρχικά στάδια της νεοπλασματικής ανάπτυξης του GCBL-DLBCL.



1.6 ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΣΤΟ DLBCL



Η αγγειογένεση (angiogenesis, neovascularization) είναι η διεργασία κατά την οποία νέα αιμοφόρα αγγεία αναπτύσσονται από το υπάρχον αγγειακό δίκτυο. Είναι πλέον καλά τεκμηριωμένο ότι ένας όγκος δεν δύναται να αναπτυχθεί πέραν του μεγέθους των 2-3mm άνευ της δημιουργίας του δικού του αγγειακού δικτύου. Η νέο-αγγείωση αυτή ευρίσκεται υπό τον έλεγχο των νεοπλασματικών κυττάρων τα οποία εκκρίνουν αγγειογενετικούς παράγοντες προκειμένου να προσελκύσουν ενδοθηλιακά κύτταρα στην περιοχή. Τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα με την σειρά τους εκκρίνουν με αυτοκρινή ή παρακρινή τρόπο αυξητικούς παράγοντες για τον όγκο. Αυτή η διασταυρούμενη επικοινωνία μεταξύ ενδοθηλιακών και νεοπλασματικών κυττάρων αποτελεί ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά της αγγειογένεσης. Το δεύτερο χαρακτηριστικό είναι η ευαίσθητη ισορροπία ανάμεσα στους ενδογενείς αναστολείς και τους επαγωγείς της αγγειογένεσης. Τα φυσιολογικά κύτταρα εκκρίνουν συνήθως μικρές ποσότητες επαγωγέων και μεγάλες ποσότητες αναστολέων της αγγειογένεσης. Εν τούτοις, κατά την εξέλιξη προς την νεοπλασία η ισορροπία διαταράσσεται υπέρ του αγγειογενετικού φαινότυπου. Η στροφή αυτή των κυττάρων υπέρ του αγγειογενετικού φαινότυπου κατά την διαδικασία της ογκογένεσης αποτελεί ένα πολύ πρώιμο γεγονός και συνήθως διαδράμει σταδιακά. Η δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων επιτελείται μέσω μίας σειράς διαδοχικών βημάτων. Αρχικά συμβαίνει ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων των εγγύς ευρισκόμενων φυσιολογικών αγγείων και παραγωγή πρωτεολυτικών ενζύμων που διασπούν τις βασικές μεμβράνες και την εξωκυττάρια ουσία. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα διηθούν την εξωκυττάρια ουσία, μεταναστεύουν και πολλαπλασιάζονται.

Βαθμιαία, τα ενδοθηλιακά κύτταρα ωριμάζουν και διαφοροποιούνται, σχηματίζοντας αγγειακές δομές με υποτυπώδη αυλό και συνθέτοντας μία νέα βασική μεμβράνη. Μολονότι τα νεοσχηματιζόμενα αγγεία αποτελούνται από φυσιολογικά κύτταρα, εν τούτοις παρουσιάζουν σημαντικές παρεκκλίσεις από τα φυσιολογικά αγγεία. Τα αγγεία των όγκων είναι συχνά διάτρητα και ανώμαλα σε μέγεθος και σχήμα, κυρίως λόγω των χαλαρών δεσμών των ενδοθηλιακών κυττάρων μεταξύ τους. Φαίνεται ότι ενδοθηλιακά κύτταρα από διαφορετικά όργανα εκφράζουν και διαφορετικούς επιφανειακούς υποδοχείς με συνέπεια την πιθανότητα εξειδικευμένης στόχευσης μέσω ειδικών πεπτιδικών αλληλουχιών. Τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν μία μεγάλη ποικιλία αυξητικών παραγόντων, όπως ο basic fibroblast growth factor (bFGF), ο platelet derived growth factor (PDGF) και ο insulin-like growth factor (IGF-1), οι οποίοι αφενός διατηρούν τα ενδοθηλιακά κύτταρα ενεργοποιημένα και αφετέρου λειτουργούν σαν παρακρινείς διεγέρτες πολλαπλασιασμού των νεοπλασματικών κυττάρων. Είναι επίσης σε θέση να παράγουν μία ποικιλία παραγόντων οι οποίοι μπορούν να αναστείλουν την ανάπτυξη των όγκων, όπως η ιντερλευκίνη-6. Γενικά, μπορεί να θεωρηθεί ότι η αγγειογένεση εξελίσσεται σε τρεις διαφορετικές φάσεις : α) επαγωγή-έναρξη β) πολλαπλασιασμός-διήθηση γ) ωρίμανση-αναδόμηση. Κατά την πρώτη φάση, επαγωγείς της αγγειογένεσης, όπως αυξητικοί παράγοντες και κυτοκίνες εκκρίνονται τόσο από νεοπλασματικά όσο και από βοηθητικά κύτταρα τα οποία προσελκύονται στην περιοχή. Αυτοί οι παράγοντες διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των αγγειακών κυττάρων και την διεργασία της διήθησης, ευνοώντας με αυτόν τον τρόπο την ανάπτυξη των αγγείων εντός του όγκου. Παράλληλα, μεταβολές στην έκφραση των μορίων προσκόλλησης επιτρέπουν στα ενδοθηλιακά κύτταρα να μετακινούνται διά μέσου του εξωκυττάριου στρώματος ενώ ταυτόχρονα πολλαπλασιάζονται. Σε μία τελική φάση της αγγειογένεσης ο συνεχής πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων διακόπτεται ώστε να υπάρξει δυνατότητα κυτταρικής διαφοροποίησης και ωρίμανσης του νεοσχηματισθέντος αγγειακού δικτύου με εκπροσώπηση των περισσότερων δομικών συστατικών της βασικής μεμβράνης και την παρουσία διαφοροποιημένων περικυττάρων και λείων μυϊκών κυττάρων. Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωρισθεί και χαρακτηριστεί τουλάχιστον 18 πεπτίδια με αγγειογενετική δράση (αγγειογενετικοί παράγοντες) καθώς επίσης και ένας ανάλογος αριθμός αναστολέων της αγγειογένεσης (αντί-αγγειογενετικοί παράγοντες).

Ο VEGF μπορεί να θεωρηθεί σαν ο σπουδαιότερος αγγειογενετικός παράγοντας. Αρχικά, ο παράγοντας αυτός αναγνωρίστηκε σαν υπεύθυνος για την αυξημένη διαπερατότητα των αγγείων, ενώ ακολούθως διαπιστώθηκε ότι είναι ένας πολύ ισχυρός επαγωγέας της αγγειογένεσης. Τρεις επιπλέον υπότυποι του VEGF έχουν ταυτοποιηθεί, οι VEGF-B, VEGF-C, και VEGF-D. Ο VEGF επάγεται από την υποξία και την

υπογλυκαιμία και διαθέτει τρεις διαφορετικούς υποδοχείς με δραστηριότητα τυροσίνης-κινάσης (flk, flt-1, flt-4). Το σύστημα VEGF/VEGFR έχει πολύ υψηλή ειδικότητα. Μολονότι ο VEGF εκφράζεται από μία ποικιλία κυττάρων, οι υποδοχείς του εκφράζονται σχεδόν αποκλειστικά από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ο VEGF μπορεί να αποθηκευθεί δεσμευόμενος από διάφορες πρωτεογλυκάνες του εξωκυττάριου στρώματος και από εκεί να απελευθερωθεί εφόσον και όταν απαιτείται επαγωγή της αγγειογένεσης. Επιπλέον, διάφορα ογκογονίδια, όπως μεταλλαγμένο *ras* επάγουν την έκφραση του VEGF μέσω ηυξημένης μεταγραφής.

Τα τελευταία χρόνια η μελέτη της αγγειογένεσης γνωρίζει ραγδαία ανάπτυξη τόσο σε ερευνητικό επίπεδο όσο και ως προγνωστικός δείκτης σε κακοήγη νεοπλάσματα (116-125). Η μελέτη της αγγειογένεσης αφορά στο προσδιορισμό της πυκνότητας των μικρών αγγείων μέσω ανοσοιστοχημικής έκφρασης του μορίου CD34 και επεκτείνεται στην ανάλυση της ανοσοιστοχημικής έκφρασης τόσο των πρωτεϊνών που σχετίζονται με την αγγειογένεση όπως αγγειογενών παραγόντων (π.χ. VEGF, FGF, TNF- α , TGF- β , EGF, PdECGF), μορίων προσκόλλησης (ιντεγκρίνες, καντερίνες, υπεροικογένεια ανοσοσφαιρινών, σελεκτίνες) και πρωτεασών (μεταλλοπρωτεϊνάσες, καθεψίνη D, ενεργοποιητές πλασμινογόνου) όσο και πρωτεϊνών που ενέχονται σε δίκτυα ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης και σχετίζονται παράλληλα με τους μηχανισμούς αγγειογένεσης (π.χ. p53, Ki67, Bcl-2) (116-125). Παρά το μεγάλο αριθμό μελετών σε διάφορα κακοήγη νεοπλάσματα, η αγγειογένεση όπως επίσης και η ανοσοιστοχημική έκφραση πρωτεϊνών που σχετίζονται με την αγγειογένεση και η σχέση τους με πρωτεΐνες των δικτύων ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης έχουν μελετηθεί ελάχιστα στα DLBCL. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν υψηλά επίπεδα ανοσοιστοχημικής έκφρασης της πρωτεΐνης VEGF στα νεοπλασματικά κύτταρα του DLBCL και συσχέτιση αυτής με την μικροαγγειακή πυκνότητα του νεοπλασματικού ιστού (123). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στα επίπεδα του VEGF του ορού και στην ανοσοιστοχημική έκφραση μεταξύ περιπτώσεων GCB-DLBCL και ABC-DLBCL (126).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ



2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η συστηματική διερεύνηση του προτύπου έκφρασης πρωτεϊνών της απόπτωσης, του αποπτωτικού δείκτη, της αγγειογένεσης και της πιθανής παρουσίας χρωμοσωμικών ανωμαλιών σε σχέση με την ιστογενετική προέλευση, το πρότυπο έκφρασης πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου (αποτελέσματα προηγούμενων μελετών της ίδιας ομάδας) και τη κλινική σταδιοποίηση των DLBCL.

Συγκεκριμένα, σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η συστηματική διερεύνηση: 1) της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης πρωτεϊνών που καθορίζουν την ιστογενετική προέλευση των DLBCL (Bcl-6/CD10/MUM1/CD138), 2) της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης σημαντικών πρωτεϊνών της απόπτωσης, (Bcl-2, Bax, Bak, Bid, Bad, Bcl-X_L), 3) της έκφρασης πρωτεϊνών της απόπτωσης με ανοσοαποτύπωση κατά Western, 4) του δείκτη απόπτωσης με την μέθοδο TUNEL (TdT-mediated in-situ labelling), 5) της παρουσίας δομικών ή/και αριθμητικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών του γονιδίου Bcl-2 στα DLBCL με τη μέθοδο FISH, 6) της συσχέτισης των ανωτέρω ανοσοϊστοχημικών και κυτταρογενετικών δεδομένων με την ιστογενετική ταξινόμηση το πρότυπο του κυτταρικού κύκλου (αποτελέσματα προηγούμενων μελετών της ίδιας ομάδας) και τη κλινική σταδιοποίηση των DLBCL, 7) της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του αγγειογενετικού παράγοντα VEGF σε DLBCL.

Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στα ερωτήματα α) αν στους δύο βασικούς ιστογενετικούς υποτύπους των DLBCL (GCB-DLBCL και ABL-DLBCL) διαπιστώνεται διαφορετικό πρότυπο διαταραχών της απόπτωσης και του κυτταρικού κύκλου και η πιθανή σημασία αυτών των διαταραχών στην παθογένεση των DLBCL, β) αν η έκφραση των σημαντικών για την παθογένεση των DLBCL πρωτεϊνών Bcl-6 και CD10 συσχετίζεται με διαφορετικά πρότυπα έκφρασης πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 και του κυτταρικού κύκλου (αποτελέσματα προηγούμενων μελετών), έχοντας ως δεδομένο ότι τα αποτελέσματα πρόσφατων in vitro μελετών παραμένουν αντιφατικά και γ) κατά πόσον δομικές ή/και αριθμητικές ανωμαλίες του γονιδίου Bcl-2 συσχετίζονται με τους ιστογενετικούς ανοσοφαινότυπους των DLBCL. Μέσα από την ανάλυση των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης ευελπιστούμε να οδηγηθούμε στη περαιτέρω κατανόηση των μηχανισμών παθογένεσης των DLBCL.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ



3. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Υλικό

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε 79 περιπτώσεις de novo DLBCL (37 λεμφαδενικά και 42 εξωλεμφαδενικά) ταξινομημένων σύμφωνα με τη ταξινόμηση της WHO (World Health Organization). Οι περιπτώσεις επιλέχθηκαν από τα αρχεία του Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων (Π.Γ.Ν.Ι.) με βάση την ύπαρξη επαρκούς και κατάλληλου υλικού για τη μελέτη και την ύπαρξη παθολογοανατομικών δεδομένων.

3.2 Μέθοδοι

Ανοσοιστοχημική μελέτη πρωτεϊνών που καθορίζουν το ιστογενετικό πρότυπο των DLBCL, της απόπτωσης και της αγγειογένεσης

Πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική ανάλυση πρωτεϊνών (Bcl-6, CD10, MUM1, CD138) που καθορίζουν την ιστογένεση των DLBCL, πρωτεϊνών της απόπτωσης (Bcl-2, Bax, Bak, tBid, Bad, Bcl-X_L) και της πρωτεΐνης της αγγειογένεσης VEGF. Χρησιμοποιήθηκε η κλασική τεχνική της στρεπταβιδίνης-αβιδίνης-βιοτίνης (LSAB, Labeled StreptAvidin Biotin) (150,151,152). Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη παρατίθενται στο πίνακα 1.

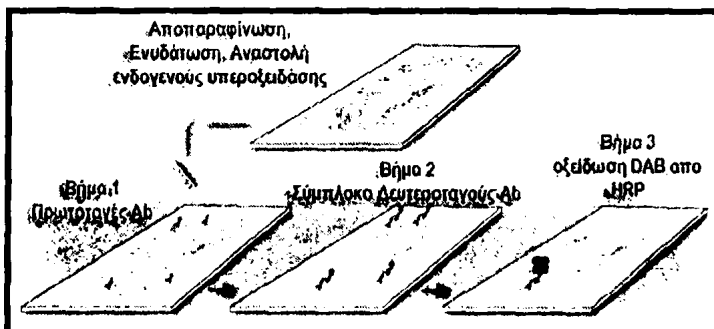
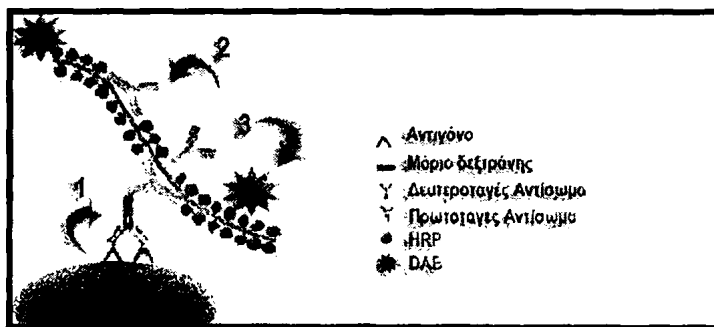
Πίνακας 1. Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη

Αντίσωμα	Μονοκλωνικό/ Πολυκλωνικό	Επίτοπος	Συγκέντρ.	Χρόνος Επώασης	Εταιρία
Bcl-6	Μονοκλωνικό	Αμίνο-τελικό	1:10	ολονύχτια	Dako
CD10	Μονοκλωνικό	Καρβόξυ-τελικό	1:10	ολονύχτια	Novocastra
MUM1	Μονοκλωνικό	Πλήρης	1:40	ολονύχτια	Dako
CD138	Πολυκλωνικό	Πλήρης	1:20	ολονύχτια	Dako
Bcl-2	Πολυκλωνικό	Πλήρης	1:10	ολονύχτια	Dako
Bcl-X _L	Μονοκλωνικό	Πλήρης	1:20	ολονύχτια	Zymed
Bax	Μονοκλωνικό	Αμίνο-τελικό	1:40	3 ώρες	Dako
Bak	Πολυκλωνικό	Καρβόξυ-τελικό	1:40	ολονύχτια	Santa Cruz
tBid	Μονοκλωνικό	Αμίνο-τελικό	1:40	ολονύχτια	Zymed
Bad	Πολυκλωνικό	Πλήρης	1:40	ολονύχτια	Santa Cruz
VEGF	Πολυκλωνικό	Αμίνο-τελικό	1:80	2 ώρες	Calbiochem

3.2.1 Περιγραφή της μεθόδου LSAB (στρεπταβιδίνης-αβιδίνης-βιοτίνης)

Αποπαραφίνωση-ενυδάτωση: Τα πλακίδια τοποθετήθηκαν σε κλίβανο στους 37°C για 18 ώρες και κατόπιν στους 56°C για 1 ώρα. Ακολούθως, εμβαπτίσθηκαν σε 3 διαδοχικά δοχεία ξυλόλης από 5' στο κάθε ένα, για να ολοκληρωθεί η αποπαραφίνωση και στη συνέχεια ενυδατώθηκαν σε κατιούσα σειρά οινόπνευμάτων: 3 X 15' σε 100% οινόπνευμα, 3 X 5' σε 96%, 5' σε 80% και 5' σε 70% οινόπνευμα.

Τεχνική αποκάλυψης του αντιγόνου: Τα πλακίδια ξεπλύθηκαν με απεσταγμένο νερό, εμβαπτίσθηκαν σε διάλυμα κιτρικού νατρίου (pH 6,2) και θερμάνθηκαν σε φούρνο μικροκυμάτων για 3 X 5' 750W. Η τεχνική αποκάλυψης του Bcl-6 αντιγόνου πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα ουδέτερου pH (Dako).



Προεπώαση: Τα πλακίδια αφέθηκαν για 15' σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια εκπλύθηκαν με απεσταγμένο νερό, τοποθετήθηκαν σε TBS (Tris Buffer Solution, pH 7,6) για 2 X 5' και επωάσθηκαν για 30' σε υγρό θάλαμο με φυσιολογικό ορό σε αραιώση 1:20 σε TBS. Στο στάδιο αυτό δεσμεύονται οι μη ειδικοί αντιγονικοί επίτοποι του ιστού.

Επώαση με το πρωτοταγές αντίσωμα: Στη συνέχεια οι ιστολογικές τομές εκπλύθηκαν με απεσταγμένο νερό, τοποθετήθηκαν

σε TBS (Tris Buffer Solution, pH 7,6) για 2 X 5' και επωάσθηκαν με τα πρωτοταγή αντισώματα έναντι των υπό μελέτη πρωτεϊνών. Σε κάθε ιστολογική τομή τοποθετήθηκαν περίπου 300 μl διαλύματος. Σε όλα τα διαλύματα του πρωτοταγούς (μονοκλωνικού) αντισώματος προστέθηκε 1:100 BSA (Bovine serum albumine) προκειμένου να συμπληρωθεί και να ενισχυθεί η δράση του φυσιολογικού ορού, δηλαδή η δέσμευση των μη ειδικών αντιγονικών θέσεων. Μετά την επώαση με το πρωτοταγές αντίσωμα οι τομές εμβαπτίσθηκαν σε TBS για 2 X 5'.

Επώαση με το δευτεροταγές αντίσωμα: Οι ιστολογικές τομές επωάσθηκαν με το δευτεροταγές αντίσωμα (DAKO), το οποίο είναι βιοτινιομένο και χρησιμοποιείται σε αραιώση 1:500 σε TBS, για 30' σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε έκπλυση των ιστολογικών τομών σε TBS 2X5'. Στην συνέχεια προστέθηκε το αντίσωμα ABC

Complex/HRP (στρεπταβιδίνη συνδεδεμένη με το σύμπλοκο αβιδίνη-βιοτίνη-υπεροξειδάση) το οποίο και επωάσθηκε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε έκπλυση των ιστολογικών τομών με TBS 2Χ5' και επώαση με το χρωμογόνο DAB (3,3' τετραχλωρική διαμινοβενζιδίνη) (0.1% W/V) (S3000 DAKO) για 1'. Στη συνέχεια έγινε επίχρωση των τομών με αιματοξυλίνη (Harris' hematoxylin). Τέλος οι ιστολογικές τομές ξεπλύθηκαν με απεσταγμένο νερό για 10', αφυδατώθηκαν και καλύφθηκαν με καλυπτρίδες. Ακολούθησε η παρατήρηση και ανάλυση της ανοσοιστοχημικής χρώσης στο μικροσκόπιο. Σε όλες τις ανοσοχρώσεις χρησιμοποιήθηκαν θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες. Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ιστολογικές τομές αντιδραστικού λεμφαδένα και φυσιολογικού θύμου αδένα. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ιστολογικές τομές περιπτώσεων DLBCL οι οποίες δεν επωάστηκαν με το πρωτοταγές αντίσωμα.

Για την αξιολόγηση των ανοσοιστοχημικών χρώσεων μετρήθηκαν τουλάχιστον πέντε επιλεγμένα πεδία μεγάλης μεγένθυσης (Χ400) νεοπλασματικού ιστού που εξέφραζαν τις υπό μελέτη πρωτεΐνες. Τα ποσοστά έκφρασης των πρωτεϊνών προέκυψαν μετά από υπολογισμό της εκατοστιαίας αναλογίας των ανοσοθετικών κυττάρων (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Αξιολόγηση ανοσοιστοχημικής έκφρασης πρωτεϊνών

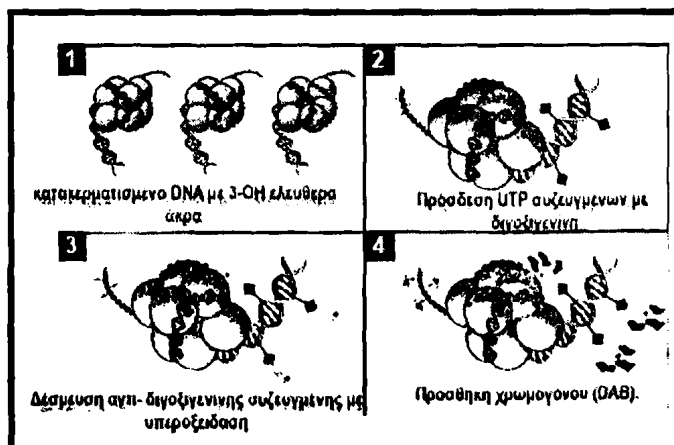
Πρωτεΐνη	Ομαδοποίηση ανάλογα με το εκατοστιαίο ποσοστό έκφρασης	Θετική έκφραση
Bcl-6	≤10%(Μηδενική/Χαμηλή), >10% ≤29% (Μέτρια), ≥30% (Υψηλή)	>10%
CD10	≤10%(Μηδενική/Χαμηλή), >10% ≤29% (Μέτρια), ≥30% (Υψηλή)	>10%
MUM1	≤25%(Μηδενική/Χαμηλή) , >10% (ΜέτριαΥψηλη)	>25%
CD138	≤25%(Μηδενική/Χαμηλή), >10% (ΜέτριαΥψηλη)	>25%
Bcl-2	≤10%(Μηδενική/Χαμηλή), >10% ≤29% (Μέτρια), ≥30% (Υψηλή)	>10%
Bcl-X _L	≤10%(Μηδενική/Χαμηλή), >10% (ΜέτριαΥψηλη)	>10%
Bax	≤10%(Μηδενική/Χαμηλή) , >10% (ΜέτριαΥψηλη)	>10%
Bak	≤10%(Μηδενική/Χαμηλή), >10% (ΜέτριαΥψηλη)	>10%
tBid	≤10%(Μηδενική/Χαμηλή), >10% (ΜέτριαΥψηλη)	>10%
Bad	≤10%(Μηδενική/Χαμηλή), >10% (ΜέτριαΥψηλη)	>10%
VEGF	≤15%(Μηδενική/Χαμηλή), >15% (ΜέτριαΥψηλη)	>15%

3.2.2 Προσδιορισμός του αποπτωτικού δείκτη των DLBCL με τη μέθοδο της *in situ* σήμανσης TUNEL.

Για το προσδιορισμό του αποπτωτικού δείκτη χρησιμοποιήθηκε το kit Apotag του οίκου Calbiochem (Oncor, Gaithersburg).

Περιγραφή της μεθόδου TUNEL

Η μέθοδος TUNEL στηρίζεται στην ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων σημασμένων με διγοξigenίνη (Dig-dUTP) στο 3'-OH άκρο φραγμάτων DNA με την 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 την μερική πέψη των πρωτεϊνών του 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% H₂O₂ σε PBS για 5', ενώ μετά την εφαρμογή ενός διαλύματος εξισορόπησης, 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 ρυθμιστικό διάλυμα (working-strength stop/wash buffer) στους 37°C. Ακολούθησε έκπλυση των τομών με PBS για 5 λεπτά. 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 (Harris' hematoxylin). Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ιστολογικές τομές στις οποίες είχε παραληφθεί το στάδιο της TdT αντίδρασης (152).

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.



3.2.3 Εκχύλιση πρωτεϊνών

Για την επεξεργασία κατεψυγμένων ιστών και ιστών παραφίνης χρησιμοποιήθηκε μια τροποποιημένη μέθοδος εκχύλισης πρωτεϊνών βασισμένη στην μέθοδο που περιγράφεται από τους Tomita και συν (153). Προχωρήσαμε στην απομόνωση 24 (12 GCB-DLBCL, 12 nonGCB-DLBCL) συνολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από τα 79 δείγματα παραφίνης αντιπροσωπευτικών περιπτώσεων de novo DLBCL. Η εκχύλιση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με βαθμιαίες επώσεις των ιστών σε διάλυμα RIPA (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% Sodium deoxycholate and 0.1 % SDS) και σε θερμοκρασίες από 70 έως 100 βαθμούς κελσίου. Ακολούθησε η ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης του πρωτεϊνικού διαλύματος με τη μέθοδο Bradford. Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας ενός δείγματος σε πρωτεΐνη σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, βασίζεται στη δημιουργία συμπλόκου πρωτεΐνης-χρωστικής σε όξινο περιβάλλον, τη μεταβολή του μεγίστου απορρόφησης μετά τη δημιουργία του συμπλόκου (από τα 465 nm στα 595 nm) και τη μέτρηση της απορρόφησης του συμπλόκου αυτού.

Στη συνέχεια ακολούθησε ο διαχωρισμός του πρωτεϊνικού διαλύματος σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS page kit της QIAGEN), η μεταφορά των δειγμάτων σε μεμβράνες νιτροκυταρίνης, η επώαση τους με τα μονοκλωνικά αντισώματα των υπό μελέτη πρωτεϊνών και η ανοσοαποτύπωση τους σε φιλμ με τη μέθοδο της χημειοφωταύγας.

Μελέτη της έκφρασης πρωτεϊνών της ιστογένεσης και της απόπτωσης με ανοσοαποτύπωση κατά Western.

3.2.4 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Η μεθοδολογία ηλεκτροφόρησης που ακολουθήθηκε βασίζεται στην αρχή ότι ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών ενός δείγματος πραγματοποιείται καθώς οι πρωτεΐνες, ως φορτισμένα μόρια, κινούνται διαμέσου των πόρων ενός πηκτώματος υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η ταχύτητα των πρωτεϊνών στο πηκτώμα καθορίζεται από τη διαφορά δυναμικού του ηλεκτρικού πεδίου (E) και το φορτίο της πρωτεΐνης (q) σύμφωνα με την εξίσωση:

$$v = E * q / f$$

όπου ο παράγοντας της εξίσωσης f εκφράζει την εξάρτηση από τη μάζα και το σχήμα της πρωτεΐνης καθώς και το ιξώδες του πηκτώματος μέσα στο οποίο κινείται η πρωτεΐνη.

Ο σχηματισμός των πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου βασίζεται στον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) και του N,N μεθυλενοδιακρυλαμιδίου ή bis-ακρυλαμιδίου ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}-\text{CH}_2$). Με τον τρόπο αυτό δημιουργείται ένα πολυμερές πλέγμα που διαθέτει πόρους το μέγεθος των οποίων

εξαρτάται από το βαθμό πολυμερισμού και τη συγκέντρωση των μονομερών στο διάλυμα. Η δημιουργία του πλέγματος γίνεται μέσω του μηχανισμού των ελευθέρων ριζών μετά από προσθήκη του υπερθειικού αμμωνίου $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ και του φωτοχημικού καταλύτη τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED).

Το σχήμα των πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου μπορεί να είναι είτε κυλινδρικό είτε επίπεδο, ανάλογα με τη συσκευή στην οποία θα πραγματοποιηθεί ο πολυμερισμός. Η ηλεκτροφόρηση μπορεί να είναι συνεχής ή ασυνεχής. Στη συνεχή ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα για την πηκτή και για τα δοχεία των ηλεκτροδίων. Στην ασυνεχή ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικά πηκτώματα, το πήκτωμα επιστοίβαξης που είναι υπεύθυνο για τη συμπίκνωση των πρωτεϊνών του δείγματος σε μια πολύ λεπτή στοιβάδα, και το πήκτωμα διαχωρισμού που είναι υπεύθυνο για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών σε λεπτές ζώνες. Τα ρυθμιστικά διαλύματα από τα οποία παρασκευάζονται τα δύο πηκτώματα είναι διαφορετικά ως προς το pH και τη σύσταση τους.

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου μπορεί να γίνει απουσία ή παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων όπως το απορρυπαντικό SDS (μετά νατρίου άλας του θειικού δωδεκυλίου). Απουσία τέτοιων παραγόντων (μη μετουσιωτικές συνθήκες) οι πρωτεΐνες διατηρούν τις ανώτερες διαμορφώσεις τους, ενώ υπό τη παρουσία τους (ηλεκτροφόρηση κάτω από μετουσιωτικές συνθήκες) αποδιατάσσονται και λαμβάνουν τυχαία διαμόρφωση.

3.2.5 SDS-page

Σύμφωνα με την τεχνική αυτή επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Στην ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται ως αποδιατακτικό μέσο το μετά-νατρίου άλας του θειικού δωδεκυλίου (SDS). Το SDS εκτός του ότι αποδιατάσει τις πρωτεΐνες, δεσμεύεται πάνω σ' αυτές μέσω υδρόφοβων δεσμών ανεξάρτητα της ιοντικής ισχύος, σε πλήρως καθορισμένες κατά βάρος αναλογίες (1.4 gr SDS/gr πρωτεΐνης). Τα σύμπλοκα που σχηματίζονται από την αλληλεπίδραση με το SDS είναι επιμήκη, με σαφή και καθορισμένη δομή και φέρουν καθαρό αρνητικό φορτίο. Επειδή το φορτίο ανά μονάδα μάζας είναι περίπου σταθερό και οι υδροδυναμικές ιδιότητες είναι συνάρτηση μόνο του μοριακού βάρους, η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων βασίζεται αποκλειστικά στο μοριακό βάρος. Το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια της παρούσας εργασίας για το διαχωρισμό των διαφόρων πρωτεϊνικών παρασκευασμάτων αποτελείτο από το πήκτωμα διαχωρισμού, ύψους 7.5 cm και πάχους 1.5 mm και το πήκτωμα επιστοίβαξης όπου οι πρωτεΐνες διανύουν απόσταση 1 cm πριν εισχωρήσουν στο πήκτωμα διαχωρισμού. Οι θέσεις

εισαγωγής του δείγματος δημιουργούνται με τη βοήθεια πλαστικής οδοντωτής μήτρας η οποία αφαιρείται μετά τον πολυμερισμό του πηκτώματος.

Η σύσταση των επιμέρους στοιχείων του συστήματος είναι οι εξής:

Διάλυμα δοχείων ηλεκτροφόρησης: 25 mM Tris
0.19 M γλυκίνη
0.1% SDS
pH 8.9

Πήκτωμα επιστοίβαξης: 5% ακρυλαμίδιο
0.25% bis-ακρυλαμίδιο
0.5% SDS
0.125 M Tris-Cl pH 6.8
για τον πολυμερισμό 0.08% APS
0.04% TEMED

Πήκτωμα διαχωρισμού: 12% ακρυλαμίδιο
0.62% bis-ακρυλαμίδιο
0.5% SDS
0.375 M Tris-Cl pH 8.9
για τον πολυμερισμό 0.08% APS
0.04% TEMED

Τα δείγματα πριν εισαχθούν στο πήκτωμα επιστοίβαξης αποδιατάσσονται σε διάλυμα:

0.0625 M Tris-Cl pH 6.8
2% SDS
1% v/v β-MSH
10% γλυκερόλη
0.02% κυανού της βρωμοφαινόλης

Το παραπάνω διάλυμα παρασκευάζεται συνήθως έξι φορές πυκνότερο ούτως ώστε να προστίθενται 5 μl του διαλύματος αυτού σε 25 μl του μίγματος επώασης. Τα δείγματα θερμαίνονται για 3 λεπτά στους 100° C, ώστε οι πρωτεΐνες να αποδιαταχθούν πλήρως και να διευκολυνθεί η δημιουργία συμπλόκων SDS-πρωτεΐνης. Η β-μερκαπτοαιθανόλη που χρησιμοποιείται, ανάγει τους τυχόν δισουλφιδικούς δεσμούς που

υπάρχουν, ώστε να διαχωριστούν οι πρωτεΐνες στις υπομονάδες τους. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται κάτω από σταθερή ένταση ρεύματος 25 mA.

3.2.6 Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών

Η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών από πηκτή πολυακρυλαμίδιου σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή PVDF, βασίζεται στην κίνηση των πρωτεϊνών, που βρίσκονται υπό τη μορφή συμπλόκου με το SDS και είναι αρνητικά φορτισμένες, από την πηκτή προς τη μεμβράνη κατά την εφαρμογή διαφοράς δυναμικού. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης η μεμβράνη και η πηκτή μεταφέρονται σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer) το οποίο αποτελείται από: 12.5 mM Tris-Βορικό pH 8.5, 0.02% SDS και 0.5 mM DTT (στην περίπτωση της PVDF μεμβράνης προηγείται ένα στάδιο εμβαπτίσεως της μεμβράνης σε 100% μεθανόλη πριν βυθιστεί στο διάλυμα μεταφοράς). Η τοποθέτηση τους στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς γίνεται ανάμεσα σε δύο χαρτιά Whatman 3MM με τη μεμβράνη προσανατολισμένη στο θετικό πόλο και την πηκτή στον αρνητικό. Η επαφή μεταξύ της πηκτής και της μεμβράνης πρέπει να είναι άμεση και χωρίς την παρεμβολή φυσαλίδων που παρεμποδίζουν τη διέλευση του ηλεκτρικού ρεύματος.

3.2.7 Ανοσοανίχνευση/ Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Η ανοσοανίχνευση είναι μια τεχνική που επιτρέπει τον εντοπισμό μιας καθηλωμένης σε μεμβράνη πρωτεΐνης με τη βοήθεια αντισώματος. Η τεχνική βασίζεται στην αρχή ότι όταν η καθηλωμένη πρωτεΐνη-αντιγόνο αλληλεπιδράσει με το αντίσωμα, η αλληλεπίδραση αυτή ανιχνεύεται με τη βοήθεια ενός δευτέρου αντισώματος το οποίο εκτός του ότι είναι ικανό να αναγνωρισθεί και να δεσμευθεί από τις ανοσοσφαιρίνες IgG του αρχικού, περιέχει στο μόριο του συζευγμένο ένζυμο-δείκτη το οποίο αντιδρά με το εξωγενώς προστιθέμενο υπόστρωμα και δίνει χαρακτηριστική χρωμοαντίδραση καταδεικνύοντας έτσι το μοριακό βάρος του αντιγόνου. Κατά τη διάρκεια της παρούσας μελέτης η τεχνική εφαρμόσθηκε για την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών Bcl-2, BclXL, Bax, Bak, Bad και Bid και της πρωτεΐνης Bcl-6.

Η διαδικασία που εφαρμόσθηκε είναι η εξής:

Αρχικά η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μετά το τέλος της ηλεκτρομεταφοράς εμβαπτίσθηκε υπό ανάδευση για 1 ώρα σε διάλυμα κορεσμού που αποτελείτο από 1% ζελατίνη σε PBS (8.0 gr/l NaCl, 0.2 gr/l KCl, 1.15 gr/l Na₂HPO₄, 0.2 gr/l KH₂PO₄), ώστε να κορεστεί η μεμβράνη και να αποφευχθεί η μη ειδική αλληλεπίδραση της μεμβράνης με το αντίσωμα. Κατόπιν η μεμβράνη επώασθηκε με το κύριο αντίσωμα. Ακολούθησαν τρεις πλύσεις της μεμβράνης για 10 λεπτά με PBS που περιείχε 0.04% Tween-20 και επώαση της μεμβράνης για 1 ώρα υπό ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με το δεύτερο

αντίσωμα (αραίωση 1 : 1000). Η μεμβράνη εκπλύθηκε 2 φορές με ddH₂O και φυλάχθηκε σε σκοτεινό χώρο μέσα σε ddH₂O που περιείχε και NaN₃. Ακολούθησε η διαδικασία της χημειοφωταύγειας και η αποτύπωση των πρωτεϊνικών μορίων σε φιλμ μετά από αυτοραδιογραφία.

3.2.8 Πυκνομετρία

Η ποσοτική ανάλυση και σύγκριση των επιπέδων των πρωτεϊνών καθώς και η ταυτοποίηση κατά μοριακό βάρος έγιναν με την βοήθεια του λογισμικού πρωτεϊνικής ανάλυσης και πυκνομετρίας PDQuest της εταιρίας Biorad (154). Συγκεκριμένα, τα φιλμ της ανοσοαποτύπωσης κατά Western ψηφιοποιήθηκαν με ηλεκτρονική σάρωση σε ανάλυση 1200dpi. Η ψηφιακή εικόνα των φιλμ εισήχθη στο λογισμικό PDQuest της εταιρίας Biorad και αναλύθηκε με βάση το πρότυπο απορρόφησης της ακτινοδιαύγειας με αναγωγή των δεδομένων σε κατανομή κατά Gauss. Ως μάρτυρας απορρόφησης για την αναγωγή του προτύπου απορρόφησης της ακτινοδιαύγειας σε κατανομή κατά Gauss χρησιμοποιήθηκε η ψηφιακή εικόνα ενός δείγματος που περιείχε γνωστή ποσότητα (100ng) της πρωτεΐνης ακτίνης. Ως μάρτυρες απορρόφησης για τη πιστοποίηση της φόρτωσης ισόποσων δειγμάτων και τη σύγκριση των επιπέδων ακτινοδιαύγειας ανάμεσα στα δείγματα του ίδιου φιλμ χρησιμοποιήθηκαν οι εικόνες που προέκυψαν μετά από απομάκρυνση των αντισωμάτων από τις μεμβράνες νιτροκυτταρίνης με τη μέθοδο "Antibody striping", την επανεπίσπαση των μεμβρανών με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της ακτίνης, την εκ νέου αποτύπωση αυτών σε φιλμ και τέλος τη ψηφιοποίηση των φιλμ στα 1200dpi.

3.2.9 Μελέτη δομικών και αριθμητικών ανωμαλιών του γονιδίου Bcl-2 με τη μέθοδο του φθορίζοντος in situ υβριδισμός (FISH).

Η τεχνική του φθορίζοντος in situ υβριδισμού (FISH) εφαρμόσθηκε σε ιστολογικές τομές παραφίνης.

Προετοιμασία του δείγματος: Κόπηκαν από μπλοκ παραφίνης ιστολογικές τομές πάχους 4μm. Οι ιστολογικές τομές τοποθετήθηκαν σε θερμό απεσταγμένο νερό και εν συνεχεία απλώθηκαν σε θετικά φορτισμένα πλακίδια και αφέθηκαν να ξεραθούν στον αέρα. Ακολούθως αυτές τοποθετήθηκαν σε κλίβανο στους 65°C για 4 έως 16 ώρες.

Αποπαραφίνωση των τομών: Οι ιστολογικές τομές τοποθετήθηκαν σε γυάλινο δοχείο που περιείχε 40 ml ξυλόλης. Αφέθηκαν για 10' σε θερμοκρασία δωματίου και εν συνεχεία μεταφέρθηκαν σε γυάλινα δοχεία που περιείχαν 100% αιθανόλη. Ακολούθως αυτές αφέθηκαν για 5' σε θερμοκρασία δωματίου επανατοποθετήθηκαν σε καινούργια αιθανόλη 100% για άλλα 5' και αφέθηκαν να στεγνώσουν στον αέρα.

Πέψη Πρωτεϊνών: Το διάλυμα πέψης των πρωτεϊνών (διάλυμα 2%w/v πρωτεϊνάσης K), τοποθετήθηκε σε γυάλινο δοχείο, και προθερμάνθηκε στους 45°C. Στη συνέχεια οι ιστολογικές τομές τοποθετήθηκαν σε γυάλινο δοχείο που περιείχε το προθερμασμένο διάλυμα πρωτεϊνάσης K. Οι τομές επωάσθηκαν για 30' (ανάλογα με το δείγμα) στους 45°C και ακολούθως ξεπλύθηκαν δύο φορές σε γυάλινο δοχείο τοποθετημένο σε κυκλικό αναδευτήρα που περιείχε SSC (αποδιατακτικό διάλυμα φορμαλδεΐδης). Οι τομές αφυδατώθηκαν σε 70%, 80% και 95% αιθανόλη σε θερμοκρασία δωματίου για 1' σε κάθε συγκέντρωση, και ύστερα αφέθηκαν να στεγνώσουν στον αέρα.

Υβριδισμός και ανίχνευση σήματος: Η αποδιάταξη του χρωμοσωμικού DNA των κυττάρων έγινε σε διάλυμα 2XSSC 70% φορμαμίδη (pH7) σε υδατόλουτρο προθερμασμένο στους 70°C για 2'. Ακολούθησε αφυδάτωση των ιστολογικών τομών σε διαλύματα 70% - 80% - 96% αιθανόλης στους 20°C για 2'. Το μίγμα των DNA ιχνηθετών που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από τον διπλό ιχνηθέτη έναντι της αλληλουχίας του γονιδίου IgH σημασμένου με φλουροσκεΐνη (FITC) και της αλληλουχίας του γονιδίου Bcl-2 σημασμένου με ροδαμίνη (TRITC) (LSI IgH Spectrum Green/LSI Bcl-2 Spectrum Orange Dual-Fusion Translocation Probe Abbott-Visys Downers Grove IL, USA) και τον ιχνηθέτη έναντι του κεντρομεριδίου του χρωμοσώματος 18 (CEP 18 Aqua Probe, Abbott-Visys). Το διάλυμα των ιχνηθετών αραιώθηκε σε μίγμα υβριδισμού που περιείχε 2xSSC 70% φορμαμίδη (Hybrisol VI, Oncor) έτσι ώστε η τελική συγκέντρωσή να είναι 1.0 ng/μl. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι ιχνηθέτες αποδιατάχθηκαν στους 70°C για 5' και παρέμειναν σε παγόλουτρο στους 4°C μέχρι το στάδιο του υβριδισμού. Για την επιτέλεση της αντίδρασης υβριδισμού τοποθετήθηκαν 20 μl διαλύματος ιχνηθέτη-μείγματος υβριδισμού σε κάθε ιστολογική τομή, και μετά από επικάλυψη με πλαστική καλύπτριδα οι τομές τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επωάσεως στους 37°C για 16 ώρες. Για την απομάκρυνση των μη συνδεδεμένων ιχνηθετών πραγματοποιήθηκε μεθυβριδική πλύση σε 0,5xSSC, pH 7, στους 72°C για 5' και οι ιστολογικές τομές τοποθετήθηκαν σε 1x PBS/1% Tween 20 (PBD) για 2x3'. Ακολούθησε πλύση των πλακιδίων σε PBD για 3x5' και χρώση των πυρήνων με (DAPI) και antifade σε αναλογία 1:1.

Αξιολόγηση σημάτων FISH: Η ανάλυση των σημάτων υβριδισμού έγινε σε μικροσκόπιο φθορισμού (Zeiss, Axioscope, Germany) με καταδυτικό φακό (X1000) και η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση λογισμικού CGH και συστήματος ψηφιακής απεικόνισης ISIS (Metasystem, Heidelberg, Germany). Σε κάθε περίπτωση αξιολογήθηκαν περίπου 50-100 πυρήνες. Αξιολογήθηκαν μόνο οι περιπτώσεις στις οποίες υπήρχαν σήματα υβριδισμού στο 90% των κυττάρων του δείγματος. Η καταμέτρηση των σημάτων πραγματοποιήθηκε μόνο σε άθικτα κύτταρα,

ενώ αλληλοεπικαλυπτόμενοι πυρήνες δεν αξιολογήθηκαν. Σε φυσιολογικούς πυρήνες μεσόφασης ανιχνεύθηκαν δύο ανεξάρτητα κόκκινα (Bcl2) και δύο ανεξάρτητα πράσινα (IgH) σήματα. Όταν ήταν παρούσα η διαμετάθεση t(14;18) τα κόκκινα και πράσινα σήματα σχημάτιζαν δύο κίτρινα χιμαιρικά σήματα στους μεσοφασικούς πυρήνες. Οι περιπτώσεις στις οποίες ανιχνεύθηκαν τρία ερυθρά σήματα (Bcl-2) και δύο γαλάζια σήματα (κεντρομερίδιο 18) καταγράφηκαν ως επαύξηση του γονιδίου Bcl-2, ενώ οι περιπτώσεις στις οποίες ανιχνεύθηκαν τέσσερα ή περισσότερα ερυθρά σήματα (Bcl-2) και δύο γαλάζια σήματα (κεντρομερίδιο 18) καταγράφηκαν ως ενίσχυση του γονιδίου Bcl-2.

3.2.10 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό στατιστικής SPSS. Η επιλογή της στατιστικής μεθόδου έγινε με βάση τα ποιοτικά μεγέθη που αναλύθηκαν αλλά και με γνώμονα την αντικειμενική απόδοση των ερευνητικών ερωτημάτων που δημιουργήθηκαν κατά τη διεξαγωγή της παρούσας μελέτης. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν στατιστικές μέθοδοι που παρατίθενται στο πίνακα 3.

Πίνακας 3. Στατιστικές μέθοδοι.

Στατιστική μέθοδος	Πειραματική προσέγγιση
t test	Σύγκριση δύο μη κατηγοριοποιημένων πληθυσμών ως προς μία κατηγοριοποιημένη μεταβλητή
Mann-Whitney test	Μη παραμετρική σύγκριση δύο μη κατηγοριοποιημένων πληθυσμών ως προς μία κατηγοριοποιημένη μεταβλητή
χ^2 test	Σύγκριση δύο κατηγοριοποιημένων πληθυσμών
ANOVA	Σύγκριση δύο μη κατηγοριοποιημένων πληθυσμών ως προς μία κατηγοριοποιημένη μεταβλητή με βάση τη μεταβολή της μέσης τιμής των πληθυσμών.
Spearman's correlation coefficient test	Σύγκριση δύο μη κατηγοριοποιημένων πληθυσμών

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

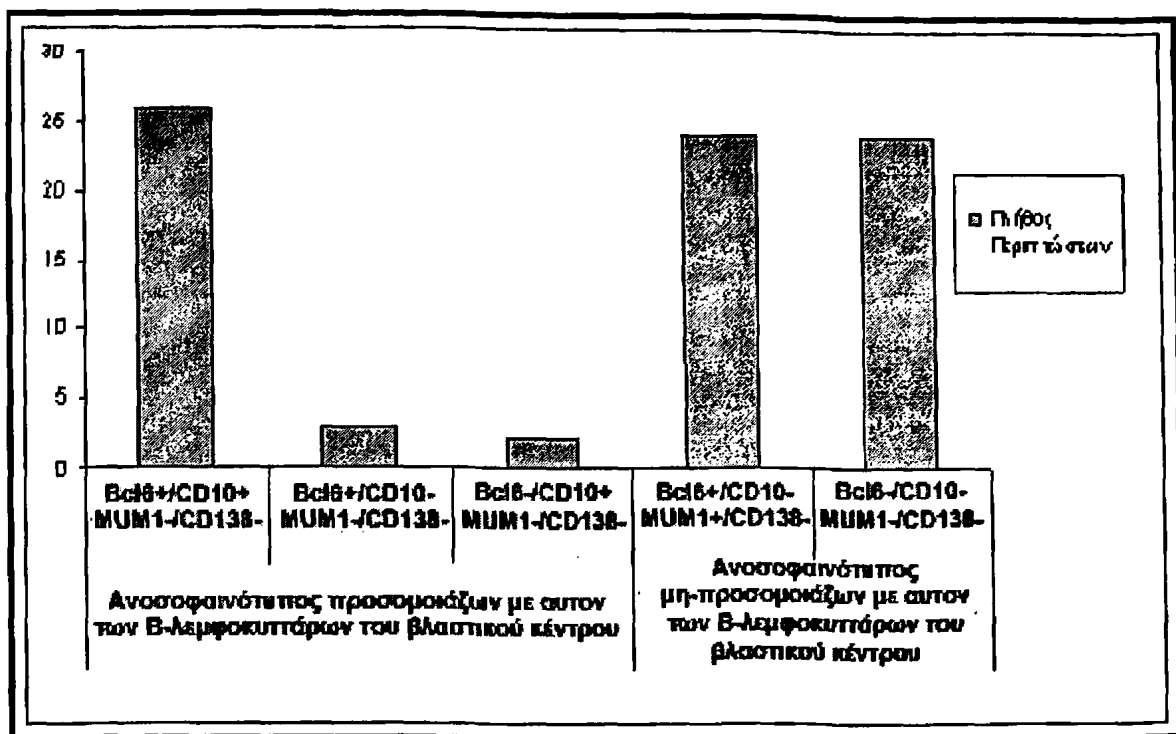
4.1 Ανοσοιστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών Β-κυτταρικής διαφοροποίησης Bcl-6, CD-10, MUM-1 και CD-138 στα DLBCL. Ανοσοφαινότυπος διαφοροποίησης

Έκφραση των πρωτεϊνών Bcl-6, CD10, MUM-1 και CD-138 ανιχνεύθηκε στα νεοπλασματικά κύτταρα σε 54/79 (68%), 28/79 (35%), 48/79 (60%), και 0/79 (0%) των περιπτώσεων, αντίστοιχα (Εικόνα 2).

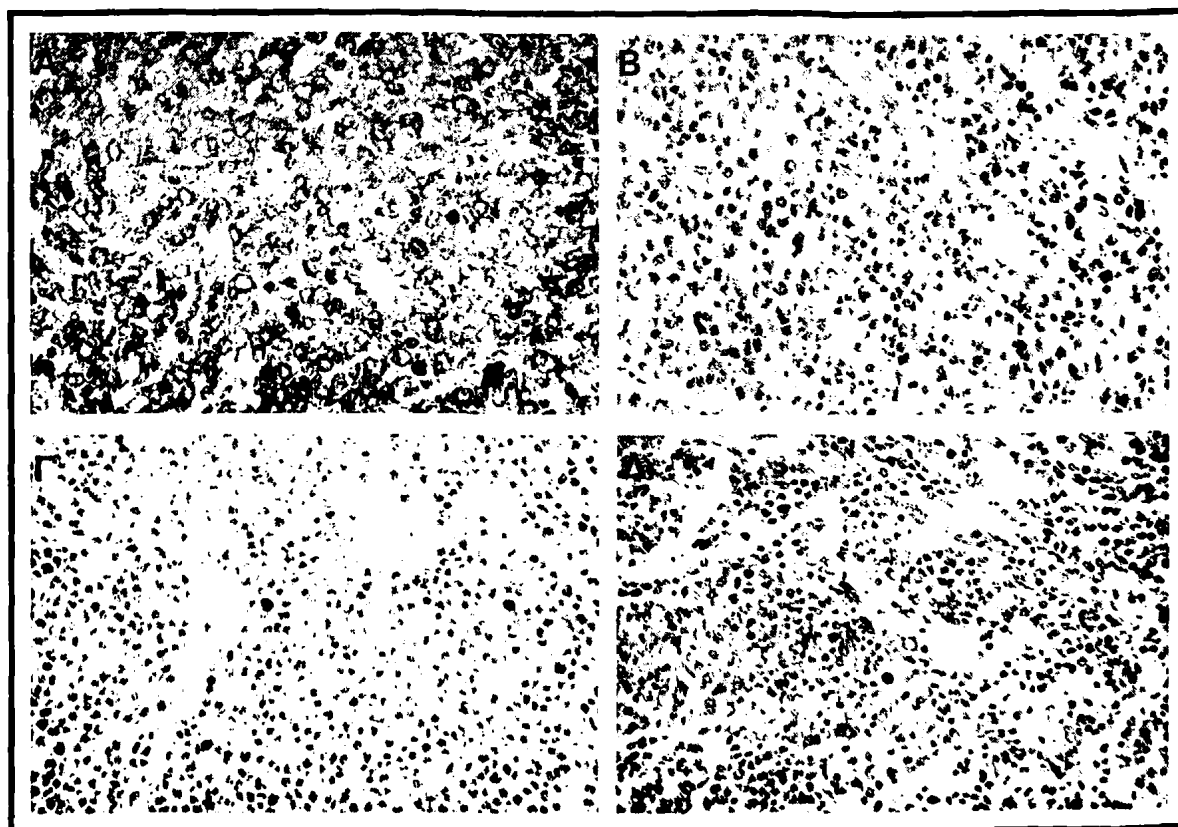
Δυο κύριοι ανοσοφαινότυποι αναδείχτηκαν σύμφωνα με την έκφραση των πρωτεϊνών Β-κυτταρικής διαφοροποίησης: α) ανοσοφαινότυπος προσομοιάζων με αυτόν των Β-λεμφοκυττάρων του βλαστικού κέντρου (GCB-DLBCL) 31 περιπτώσεις: [Bcl-6+/CD10+/MUM1-/CD138- (26 περιπτώσεις, 33%), Bcl-6+/CD10-/MUM1-/CD138- (3 περιπτώσεις, 4%), Bcl-6-/CD10+/MUM1-/CD138- (2 περιπτώσεις 3%)], β) ανοσοφαινότυπος μη προσομοιάζων με αυτόν των Β-λεμφοκυττάρων του βλαστικού κέντρου (nonGCB-DLBCL) 48 περιπτώσεις: [Bcl-6+/CD10-/MUM1+/CD138- (24 περιπτώσεις, 30%), και Bcl-6-/CD10-/MUM1+/CD138- (24 περιπτώσεις, 30%)] (Πίνακας 1, Εικόνα 1)

Πίνακας 1. Ανοσοφαινότυπος διαφοροποίησης των DLBCL.

Ανοσοφαινότυπος διαφοροποίησης	Αριθμός Περιπτώσεων	%
Ανοσοφαινότυπος προσομοιάζων με αυτόν των Β-λεμφοκυττάρων του βλαστικού κέντρου (GCB-DLBCL)		
Bcl-6+/CD10+/MUM1-/CD138-	26	33%
Bcl-6+/CD10-/MUM1-/CD138-	3	4%
Bcl-6-/CD10+/MUM1-/CD138-	2	3%
Σύνολο περιπτώσεων	31/79	40%
Ανοσοφαινότυπος μη-προσομοιάζων με αυτόν των Β-λεμφοκυττάρων του βλαστικού κέντρου (nonGCB-DLBCL)		
Bcl-6+/CD10-/MUM1+/CD138-	24	30%
Bcl-6-/CD10-/MUM1+/CD138-	24	30%
Σύνολο περιπτώσεων	48/79	60%



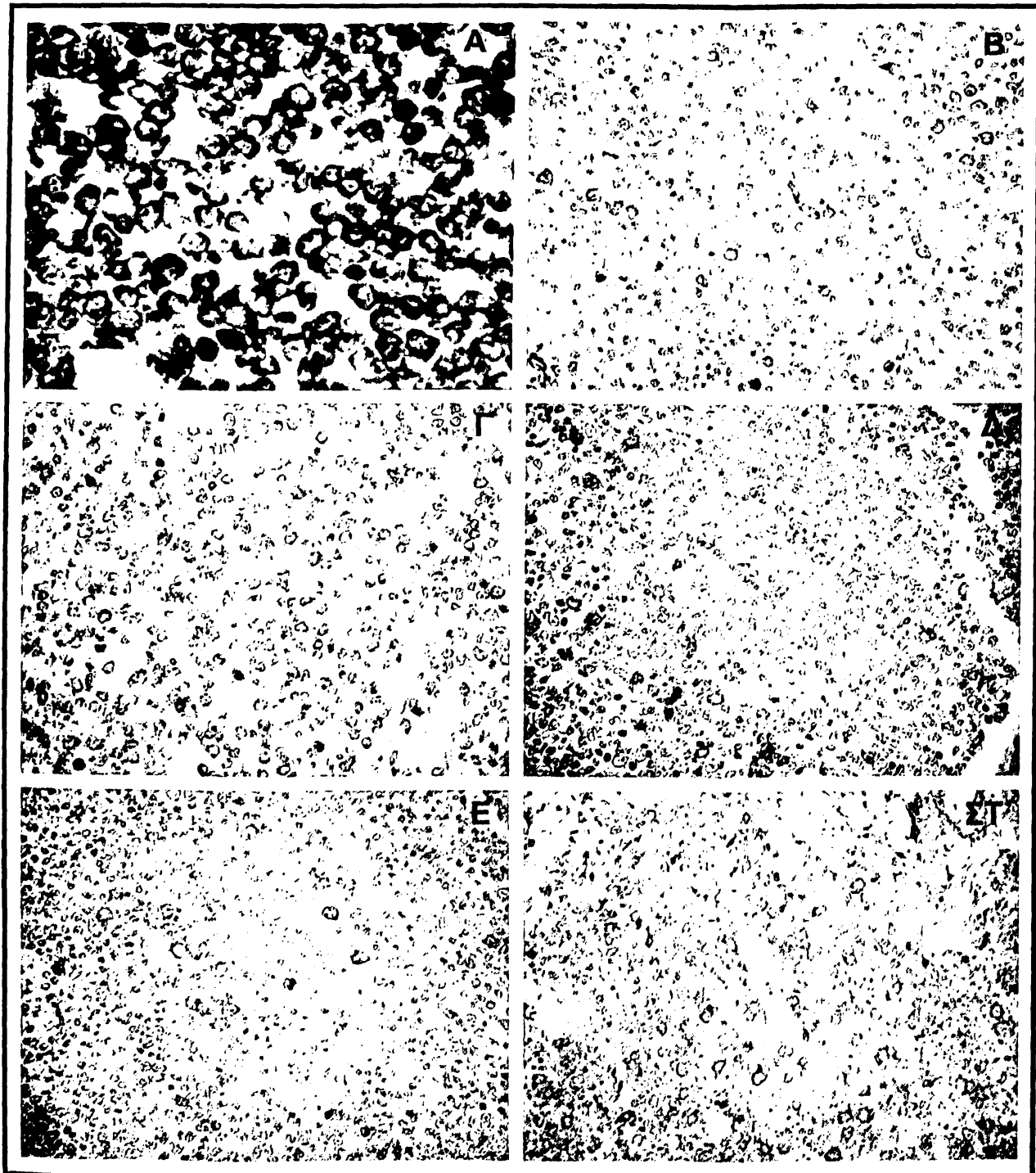
Εικόνα 1. Γραφική παράσταση της κατανομής των DLBCL ως προς των ανοσοφαινότυπο διαφοροποίησης.



Εικόνα 2. Ανοοιστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών Α) CD10 (μεμβρανική και κυταροπλασματική), Β) Bcl-6 (πυρηνική), Γ) MUM1 (πυρηνική ή/και κυταροπλασματική) στα νεοπλασματικά κύτταρα DLBCL. Δ) Έκφραση της πρωτεΐνης CD138 (μεμβρανική ή/και κυταροπλασματική) σε αντιδραστικά πλασματοκύτταρα, τα νεοπλασματικά κύτταρα είναι αρνητικά (X400).

4.2 Ανοσοιστοχημική έκφραση προ-αποπτωτικών και αντί-αποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 στα DLBCL

Έκφραση των πρωτεϊνών Bcl-2, BclX_L, Bax, Bak, Bad, Bid ανιχνεύθηκε στα νεοπλασματικά κύτταρα σε 47/74 (63%), 46/79 (58%), 73/79 (92%), 41/79 (51%), 60/79 (75%), και 44/79 (55%) περιπτώσεις DLBCL, αντίστοιχα (Πίνακας 2).



Εικόνα 3. Ανοσοιστοχημική κυτταροπλασματική έκφραση των πρωτεϊνών Α) Bcl-2, Β) BclX_L, Γ) Bax, Δ) Bak, Ε) Bad, ΣΤ) Bid, στα νεοπλασματικά κύτταρα DLBCL (Χ400).

Υψηλή έκφραση ($\geq 30\%$ των νεοπλασματικών κυττάρων) των πρωτεϊνών Bcl-2, Bcl_{X_L}, Bax, Bak, Bad, Bid ανιχνεύθηκε σε 43/74 (58%), 46/77 (60%), 36/79 (46%), 20/79 (26%), 25/79 (32%), και 30/79 (38%) περιπτώσεις DLBCL, αντίστοιχα (Πίνακας 2), (Εικόνα 3).

Πίνακας 2. Έκφραση των πρωτεϊνών Bcl-6, CD10 και Bcl-2 σε DLBCL.

	Bcl-6	CD10	Bcl-2
Υψηλή έκφραση	24 (30%)	7 (9%)	43 (58%)
Μέτρια έκφραση	30 (38%)	21 (26%)	4 (5%)
Θετικές περιπτώσεις	54 (68%)	28 (35%)	47 (63%)
Αρνητικές περιπτώσεις	25 (32%)	51 (65%)	27 (37%)
Συνολο περιπτώσεων	79	79	74

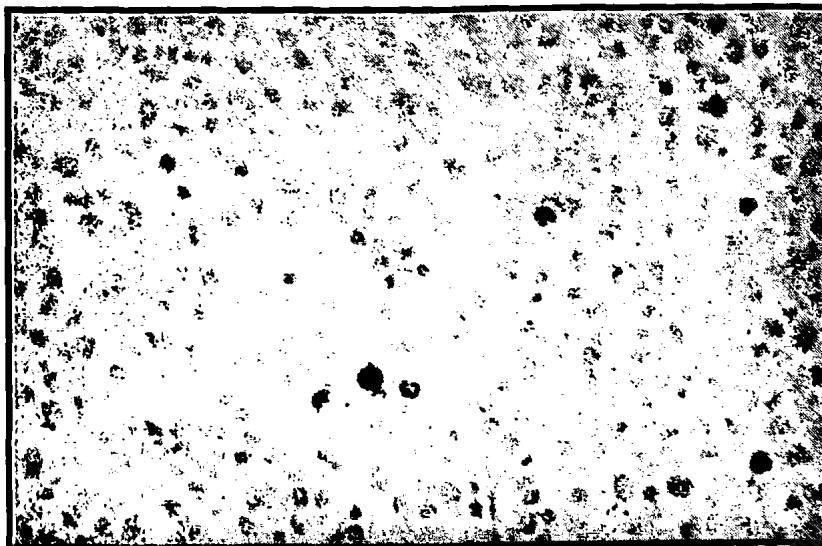
Υψηλή έκφραση: $\geq 30\%$ θετικών νεοπλασματικών κυττάρων

Μέτρια έκφραση: 10-29% θετικών νεοπλασματικών κυττάρων

Αρνητική έκφραση: $\leq 10\%$ θετικών νεοπλασματικών κυττάρων

4.3 Αποπτωτικός δείκτης (μέθοδος TUNEL)

Ο αποπτωτικός δείκτης αξιολογήθηκε σε 62 από τις 79 περιπτώσεις που μελετήθηκαν (Βασικά στατιστικά δεδομένα: εύρος 0.26-9.7%, μέση τιμή 2.79% $\pm$ 1.97%) (Εικόνα 4). Στις υπόλοιπες περιπτώσεις η χρώση ήταν μη ειδική. Αξιολογήθηκαν ως αποπτωτικά κύτταρα, TUNEL-θετικά κύτταρα και TUNEL-αρνητικά κύτταρα, με μορφολογικούς χαρακτήρες αποπτωτικών κυττάρων



Εικόνα 4. Αποπτωτικά κύτταρα και αποπτωτικά σωμάτια TUNEL-θετικά σε DLBCL (X400)

4.4 Ανοσοιστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών p27, p53, Rb, p16, Ki67, κυκλίνη A και κυκλίνη B1 στα DLBCL.

Τα αποτελέσματα της ανοσοιστοχημικής μελέτης των πρωτεϊνών p27, p53, Rb, p16, Ki67, κυκλίνη A και κυκλίνη B1 στα νεοπλασματικά κύτταρα των DLBCL που μελετήθηκαν στη παρούσα μελέτη έχουν περιγραφεί σε προηγούμενη μελέτη (84). Έν συντομία, θετική έκφραση των πρωτεϊνών p27 και p53 στα νεοπλασματικά κύτταρα παρατηρήθηκε σε 22/79 (28%) και 38/70 (48%) περιπτώσεις DLBCL, αντίστοιχα. Αμοιβαία αποκλειόμενη μειωμένη έκφραση των πρωτεϊνών Rb και p16 παρατηρήθηκε σε 5/79 (7%) και 14/79 (18%) περιπτώσεις. Η έκφραση της κυκλίνης A και κυκλίνης B1 ήταν υψηλή (τουλάχιστον το 30% των νεοπλασματικών κυττάρων) σε 44/79 (56%) και 22/79 (27%) περιπτώσεις, αντίστοιχα.

4.5 Συσχέτιση μεταξύ των πρωτεϊνών Bcl-6, CD10, Bcl-2, κυκλίνη A, κυκλίνη B1, p53, Rb, p16, και p27 και του αποπτωτικού δείκτη.

Η ανοσοιστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών Bcl-6, CD10, Bcl-2, Ki67, κυκλίνη A, κυκλίνη B1, p53, Rb, p16, και p27 και του αποπτωτικού δείκτη αναλύθηκαν ως συνεχείς μεταβλητές και βρέθηκαν στατιστικώς σημαντικές θετικές συσχετίσεις μεταξύ των Bcl-6/Ki67 ($r=0,328/p=0.003$), Bcl-6/κυκλίνη A ($r=0,265/p=0.018$), Bcl-6/αποπτωτικού δείκτη ($r=0,327/p=0.010$), CD10/Ki67 ($r=0,296/p=0.008$), και CD10/αποπτωτικού δείκτη ($r=0,397/p=0.001$).

4.6 Συσχέτιση των επιπέδων ανοσοιστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών Bcl-6 και CD10 με τα επίπεδα ανοσοιστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών p53, Rb, p16 και p27.

Η στατιστική ανάλυση των επιπέδων ανοσοιστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών Bcl-6, CD10, p53, Rb, p16 και p27 (θετικής έναντι αρνητικής έκφρασης) δεν ανέδειξε στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις. Συγκεκριμένα προέκυψαν οι εξής συσχετίσεις: Bcl-6/p53 ($p=0.409$), Bcl-6/Rb ($p=0.509$), Bcl-6/p16 ($p=0.245$), Bcl-6/p27 ($p=0.593$), CD10/p53 ($p=0.506$), CD10/Rb ($p=0.585$), CD10/p16 ($p=0.185$), CD10/p27 ($p=0.443$) (Πίνακας 3).

Πίνακας 3. Συσχέτιση των επιπέδων ανοσοιστοχημικής έκφρασης (αρνητική έκφραση έναντι θετική έκφραση) των πρωτεϊνών Bcl-6 και CD10 με τα επίπεδα ανοσοιστοχημικής έκφρασης (αρνητική έκφραση έναντι θετική έκφραση) των πρωτεϊνών p53, Rb, p16 και p27.

	Bcl-6+ (n=54)	Bcl-6- (n=25)	CD10+ (n=28)	CD10- (n=51)
p53+ (n=38)	25	13	13	25
p53- (n=41)	29	12	15	26
Rb+ (n=74)	51	23	26	48
Rb- (n=5)	3	2	2	3
p16+ (n=65)	46	19	25	40
p16- (n=14)	8	6	3	11
p27+ (n=22)	15	7	7	15
p27- (n=57)	39	18	21	36

Chi-Square tests: Bcl-6/p53 ($p=0.409$), Bcl-6/Rb ($p=0.509$), Bcl-6/p16 ($p=0.245$), Bcl-6/p27 ($p=0.593$), CD10/p53 ($p=0.506$), CD10/Rb ($p=0.585$), CD10/p16 ($p=0.185$), CD10/p27 ($p=0.443$)

4.7 Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών Bcl-6 και Bcl-2.

Η ανάλυση των επιπέδων ανοσοιστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών Bcl-6 και Bcl-2 έδειξε ότι οι δύο πρωτεΐνες συσχετίζονται αντιστρόφως ανάλογα. Συγκεκριμένα βρέθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ υψηλής έκφρασης της πρωτεΐνης Bcl-6 και αρνητικής έκφρασης της πρωτεΐνης Bcl-2 (Fisher's Chi-square test ($p=0,002$) (Πίνακας 4).

Πίνακας 4. Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών Bcl-6 και Bcl-2

Έκφραση της Bcl-6	Έκφραση της Bcl-2		Σύνολο
	Υψηλή/μέτρια	Αρνητική	
Υψηλή	9	15	24
Μέτρια/αρνητική	38	12	50
Σύνολο	47	27	74

Chi-Square test: $p=0.002$

4.8 Συσχέτιση του ανοσοφαινότυπου Bcl-6/CD10 με τον αποπτωτικό δείκτη, την έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 και πρωτεΐνες που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Επειδή τόσο η έκφραση της Bcl-6 όσο και η έκφραση της CD10 συσχετίστηκαν θετικά με τον αποπτωτικό δείκτη και τον πολλαπλασιασμό αναλύθηκε το πρότυπο της έκφρασης Bcl-6+/CD10+ έναντι των προτύπων έκφρασης Bcl-6+/CD10-, Bcl-6-/CD10+

και Bcl-6-/CD10-, σε σχέση με τον αποπτωτικό δείκτη, και την έκφραση των πρωτεϊνών Ki67, κυκλίνη A, κυκλίνη B1, p53, Rb, p16, p27 και Bcl-2. Βρέθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ του προτύπου έκφρασης Bcl-6+/CD10+ και του αποπτωτικού δείκτη ($p=0,014/t$ -test, και $p=0,046/\text{Mann-Whitney test}$) (Πίνακας 5). Η στατιστική ανάλυση του προτύπου έκφρασης Bcl-6/CD10 σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης (θετικής έναντι αρνητικής έκφρασης) των πρωτεϊνών p53, Rb, p16, p27 και Bcl-2 και τα επίπεδα έκφρασης (υψηλής-μέτριας έναντι χαμηλής έκφρασης) των πρωτεϊνών κυκλίνη A και κυκλίνη B1 δεν ανέδειξε στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις (Πίνακας 6).

Πίνακας 5. Συσχέτιση του προτύπου έκφρασης Bcl-6/CD10 με τον αποπτωτικό δείκτη (t-test και Mann-Whitney test).

Πρότυπο έκφρασης Bcl-6/CD10	N	Αποπτωτικός δείκτης Mean $\pm$ SD	Αποπτωτικός δείκτης Mean ranks
Bcl-6+/CD10+	23	3.59% $\pm$ 2.52%	37.46%
Bcl-6+/CD10-, Bcl-6-/CD10+ και Bcl-6-/CD10-	39	2.32% $\pm$ 1.39%	27.29%
Σύνολο περιπτώσεων	62	2.79% $\pm$ 1.97%	

T-test: $p=0.014$, Mann-Whitney test: $p=0.046$

Πίνακας 6. Συσχέτιση του προτύπου έκφρασης Bcl-6/CD10 με την έκφραση των πρωτεϊνών p53, Rb, p16, p27, Bcl-2, κυκλίνη A, και κυκλίνη B1

Έκφραση πρωτεϊνών (θετικής έναντι αρνητικής)	Bcl-6+/CD10+ (n=26)	Bcl-6+/CD10-, Bcl-6-/CD10+ και Bcl-6-/CD10- (n=53)
p53+ (n=38)	13	25
p53- (n=41)	13	28
Rb+ (n=74)	24	50
Rb- (n=5)	2	3
p16+ (n=65)	23	42
p16- (n=14)	3	11
p27+ (n=22)	6	16
p27- (n=57)	20	37
Bcl-2+ (n=47)	14	33
Bcl-2- (n=27)	11	16
Υψηλή έκφραση κυκλίνης A (n=44)	14	30
Μέτρια/χαμηλή έκφραση κυκλίνης A (n=35)	12	23
Υψηλή έκφραση κυκλίνης B1 (n=22)	11	11
Μέτρια/χαμηλή έκφραση κυκλίνης B1 (n=57)	15	42

Chi-Square tests: Πρότυπο έκφρασης Bcl-6/CD10 έναντι p53 ($p=0.501$), έναντι Rb ($p=0.535$), έναντι p16 ($p=0.248$), έναντι p27 ($p=0.351$), έναντι Bcl-2 ($p=0.240$), έναντι κυκλίνης A ($p=0.502$), έναντι κυκλίνης B1 ($p=0.062$)

4.9 Συσχέτιση μεταξύ της ανοσοιστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών Bcl-6, CD10 και MUM1 και των πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2.

Για τη στατιστική ανάλυση των συσχετίσεων της έκφρασης των πρωτεϊνών Bcl-6, CD10 και MUM1 με την έκφραση πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 χρησιμοποιήθηκε το Spearman correlation coefficient τεστ. Το πρόσημο της σταθεράς Spearman (r) δείχνει τον ποιοτικό χαρακτήρα των συσχετίσεων.

Η έκφραση των πρωτεϊνών Bcl-6 και CD10 συσχετίστηκε θετικά με τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών Bax ($r=0.659$, $p<0.001$ και $r=0.240$, $p=0.033$, αντίστοιχα), Bak ($r=0.391$, $p<0.001$ και $r=0.233$, $p=0.039$, αντίστοιχα) και Bid ($r=0.652$, $p<0.001$ και $r=0.238$, $p=0.035$, αντίστοιχα) και αρνητικά με τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Bcl-X_L ($r=-0.536$, $p<0.001$ και $r=-0.250$, $p=0.029$, αντίστοιχα). Επιπλέον, ότι η έκφραση της πρωτεΐνης MUM1 συσχετίστηκε αρνητικά με τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών bax ($r=-0.276$, $p=0.014$) και bid ($r=-0.266$, $p=0.018$) και θετικά με τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Bcl-X_L ($r=0.238$, $p=0.037$) (Πίνακας 7).

Πίνακας 7. Συσχέτιση της ανοσοιστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών Bcl-6, CD10 και MUM1 με πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 (Spearman's correlation coefficient test).

	Bax	Bak	Bid	Bad	Bcl-2	Bcl-X _L
Bcl-6	$r=0.659$ $p<0.001^*$	$r=0.391$ $p<0.001^*$	$r=0.652$ $p<0.001^*$	$r=0.118$ $p=0.299$	$r=-0.207$ $p=0.070$	$r=-0.536$ $p<0.001^*$
CD10	$r=0.240$ $p=0.033^*$	$r=0.233$ $p=0.039^*$	$r=0.238$ $p=0.035^*$	$r=0.053$ $p=0.640$	$r=-0.056$ $p=0.627$	$r=-0.250$ $p=0.029^*$
MUM1	$r=-0.276$ $p=0.014^*$	$r=-0.193$ $p=0.089$	$r=-0.266$ $p=0.018^*$	$r=-0.115$ $p=0.312$	$r=0.050$ $p=0.667$	$r=0.238$ $p=0.037^*$

Αστερίσκος: αναδεικνύει τις στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις ($p<0.05$)



4.10 Συσχετίσεις μεταξύ της ανοσοιστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών της Bcl-2 οικογένειας, του αποπτωτικού δείκτη, και του δείκτη πολλαπλασιασμού.

Για την στατιστική ανάλυση των συσχετίσεων της έκφρασης πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2, με τον αποπτωτικό δείκτη και τον δείκτη πολλαπλασιασμού χρησιμοποιήθηκε το Spearman correlation coefficient τεστ (Πίνακας 8). Η στατιστική ανάλυση έδειξε τις εξής σημαντικές συσχετίσεις: α) η ανοσοιστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης Bax συσχετίσθηκε θετικά με την ανοσοιστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών Bak, Bid, και Bad ($p=0.05$, $p=0.01$, και $p=0.047$, αντίστοιχα, β) η ανοσοιστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης Bak συσχετίσθηκε θετικά με την ανοσοιστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης Bid και τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki67 (PI) ($p=0.001$, και $p=0.025$, αντίστοιχα) και αρνητικά με την έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 ($p=0.044$), γ) η ανοσοιστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-X_L συσχετίσθηκε αρνητικά με την ανοσοιστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών Bax, Bid, και Bad ($p<0.01$, $p=0.034$ και $p=0.003$, αντίστοιχα) θετικά με την έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 ($p=0.017$) και δ) η έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 συσχετίσθηκε αρνητικά με τον αποπτωτικό δείκτη (AI) ($p=0.0022$) (Πίνακας 8).

Πίνακας 8. Συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης πρωτεϊνών της Bcl-2 οικογένειας, του αποπτωτικού δείκτη και του δείκτη πολλαπλασιασμού.

	Bax	Bak	Bid	Bad	Bcl-2	Bcl-X _L	AI	PI
Bax		$r=0.311$ $p=0.005^*$	$r=0.364$ $p=0.001^*$	$r=0.224$ $p=0.047^*$	$r=-0.207$ $p=0.070$	$r=-0.437$ $p<0.001^*$	$r=0.146$ $p=0.258$	$r=0.207$ $p=0.068$
Bak	$r=0.311$ $p=0.005^*$		$r=0.447$ $p<0.001^*$	$r=0.100$ $p=0.381$	$r=-0.230$ $p=0.044^*$	$r=-0.242$ $p=0.034^*$	$r=0.212$ $p=0.098$	$r=0.253$ $p=0.025^*$
Bid	$r=0.364$ $p=0.001^*$	$r=0.447$ $p<0.001^*$		$r=0.181$ $p=0.110$	$r=-0.189$ $p=0.100$	$r=-0.331$ $p=0.003^*$	$r=0.149$ $p=0.248$	$r=0.116$ $p=0.307$
Bad	$r=0.224$ $p=0.047^*$	$r=0.100$ $p=0.381$	$r=0.181$ $p=0.110$		$r=-0.005$ $p=0.962$	$r=-0.288$ $p=0.011^*$	$r=0.189$ $p=0.142$	$r=0.011$ $p=0.923$
Bcl-2	$r=-0.207$ $p=0.070$	$r=-0.230$ $p=0.044^*$	$r=-0.189$ $p=0.100$	$r=-0.005$ $p=0.962$		$r=0.237$ $p=0.039^*$	$r=-0.293$ $p=0.022^*$	$r=-0.101$ $p=0.382$
Bcl-X _L	$r=-0.437$ $p<0.001^*$	$r=-0.242$ $p=0.034^*$	$r=-0.331$ $p=0.003^*$	$r=-0.288$ $p=0.011^*$	$r=0.237$ $p=0.039^*$		$r=-0.115$ $p=0.376$	$r=-0.159$ $p=0.168$
AI	$r=0.146$ $p=0.258$	$r=0.212$ $p=0.098$	$r=0.149$ $p=0.248$	$r=0.189$ $p=0.142$	$r=-0.293$ $p=0.022^*$	$r=-0.115$ $p=0.376$		$r=0.501$ $p<0.001^*$
PI	$r=0.207$ $p=0.068$	$r=0.253$ $p=0.025^*$	$r=0.116$ $p=0.307$	$r=0.011$ $p=0.923$	$r=-0.101$ $p=0.382$	$r=-0.159$ $p=0.168$	$r=0.501$ $p<0.001^*$	

Συντομεύσεις: r: Σταθερά συσχέτισης Spearman. Το θετικό και αρνητικό πρόσημο της σταθεράς Spearman εκφράζει τη ποιότητα της σχέσης μεταξύ δύο συνεχών μεταβλητών ως ανάλογη και αντιστρόφως ανάλογη.

Αστερίσκος: αναδεικνύει τις στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις ($p<0.05$)

4.11 Συσχέτιση των δύο κύριων ανοσοφαινοτύπων διαφοροποίησης των DLBCL με τον αποπτωτικό δείκτη, το δείκτη πολλαπλασιασμού, την έκφραση πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 και του κυτταρικού κύκλου

Το Mann-Whitney test χρησιμοποιήθηκε για την στατιστική ανάλυση των δύο κύριων ανοσοφαινότυπων διαφοροποίησης με τον αποπτωτικό δείκτη, τον δείκτη πολλαπλασιασμού και την έκφραση πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 και του κυτταρικού κύκλου. Ο ανοσοφαινότυπος GCB-DLBCL (Bcl-6+/CD10+/MUM1-/CD138-, Bcl-6+/CD10-/MUM1-/CD138-, Bcl-6-/CD10+/MUM1-/CD138-) συγκρινόμενος με τον ανοσοφαινότυπο nonGCB-DLBCL συσχέτισθηκε με: α) υψηλότερη έκφραση των πρωτεϊνών Bax ($p=0,045$), Bad ($p=0,018$) και Bid ($p=0,003$), β) υψηλότερο αποπτωτικό δείκτη (AI) ($p=0,034$), και γ) χαμηλότερη έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-X_L ($p=0,026$) (Πίνακας 9). Δεν βρέθηκαν σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των κυρίων ανοσοφαινότυπων διαφοροποίησης και των πρωτεϊνών Bcl-2, Bad, Ki67 (PI), κυκλίνη A, κυκλίνη B1, κυκλίνη D3, κυκλίνη E, p53, Rb, p16 και p27.

Τα βασικά στατιστικά δεδομένα (μέση τιμή, standard deviation, standard error, διακύμανση) του επιπέδου έκφρασης των πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 και των τιμών του αποπτωτικού δείκτη σε σχέση με τους δύο κύριους ανοσοφαινότυπους διαφοροποίησης παρατίθενται στον πίνακα 10.

Οι συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης (θετικές έναντι αρνητικές περιπτώσεις) πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 με τους δύο κύριους ανοσοφαινοτύπους διαφοροποίησης παρατίθενται στον πίνακα 11.

Για την ανάλυση των δύο κύριων ανοσοφαινότυπων διαφοροποίησης σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης (υψηλής έναντι χαμηλής έκφρασης) των πρωτεϊνών της Bcl-2 οικογένειας, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και πρωτεϊνών του κυτταρικού πολλαπλασιασμού χρησιμοποιήθηκε το χ^2 τεστ. Ο ανοσοφαινότυπος GCB-DLBCL συσχέτισθηκε σημαντικά με υψηλή έκφραση των πρωτεϊνών Bak ($p=0.036$) και Bid ($p=0.001$) και χαμηλή έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-xL ($p=0.031$) (Πίνακας 112). Δεν βρέθηκαν στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των δύο κύριων ανοσοφαινοτύπων διαφοροποίησης και των επιπέδων έκφρασης (υψηλής έναντι χαμηλής έκφρασης) των πρωτεϊνών Bcl-2, Bax, Bad, Ki67, κυκλική A, κυκλική B1, κυκλική D3, κυκλική E, p53, Rb, p16 και p27.



Πίνακας 9. Συσχέτιση των ανοσοφαινότυπων διαφοροποίησης με τον αποπτωτικό δείκτη, το δείκτη πολλαπλασιασμού, και την ανοσοιστοχημική έκφρασης πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 και του κυτταρικού κύκλου (Mann-Whitney test).

	Ανοσοφαινότυπος διαφ.	Αριθμός περιπτώσεων	Mean Rank	p values
P53	1	31	35.16	P=0.129
	2	48	43.13	
Rb	1	31	42.17	P=0.396
	2	48	38.25	
P16	1	31	43.60	P=0.255
	2	48	37.28	
P27	1	31	41.02	P=0.711
	2	48	39.34	
PI (Ki67)	1	31	42.98	P=0.351
	2	48	38.07	
κυκλίνη A	1	31	37.19	P=0.381
	2	48	41.81	
κυκλίνη B1	1	31	43.48	P=0.277
	2	48	37.75	
κυκλίνη D3	1	31	38.10	P=0.548
	2	48	41.23	
κυκλίνη E	1	31	39.77	P=0.934
	2	48	40.15	
Bcl-2	1	30	37.03	P=0.709
	2	46	39.46	
bax	1	31	46.32	P=0.045*
	2	48	35.92	
Bak	1	31	47.48	P=0.018*
	2	48	35.17	
Bid	1	31	49.50	P=0.003*
	2	48	33.86	
Bad	1	31	44.02	P=0.203
	2	48	37.41	
Bcl-X _L	1	30	32.02	P=0.026*
	2	47	43.46	
AI	1	26	37.21	P=0.034*
	2	36	27.38	

Συνοψεύσεις:

Ανοσοφαινότυπος διαφοροποίησης 1: GCB-DLBCL (Bcl-6+/CD10+/MUM1-/CD138-: 26 περιπτώσεις, Bcl-6+/CD10-/MUM1-/CD138-: 3 περιπτώσεις, και Bcl-6-/CD10+/MUM1-/CD138-: 2 περιπτώσεις; σύνολο 31 περιπτώσεις)

Ανοσοφαινότυπος διαφοροποίησης 2: nonGCB-DLBCL (Bcl-6+/CD10-/MUM1+/CD138-: 24 περιπτώσεις, και Bcl-6-/CD10-/MUM1+/CD138-: 24 περιπτώσεις, σύνολο 48 περιπτώσεις).

Αστερίσκος: αναδεικνύει τις στατιστικές σημαντικές συσχετίσεις (p<0.05)

Πίνακας 10. Συσχετίσεις των ανοσοφαινότυπων διαφοροποίησης με την ανοσοιστοχημική έκφραση πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 και τον αποπτωτικό δείκτη (AI) (ANOVA test).

	Ανοσο. Διαφ.	N	Μέση Τιμή	Stand Dev	Stand Error	Min value	Max value	P-values
Bax	1	31	27.2581	20.8901	3.7519	5.00	80.00	p=0.013*
	2	48	17.9583	11.5260	1.6636	5.00	70.00	
Bak	1	31	17.4516	13.4680	2.4189	1.00	50.00	p=0.009*,
	2	48	10.5417	9.4147	1.3588	1.00	50.00	
Bad	1	31	14.7742	7.0318	1.2629	1.00	25.00	p=0.193
	2	48	12.5833	7.3740	1.0643	1.00	30.00	
Bid	1	31	24.7419	17.5612	3.1541	1.00	60.00	p=0.001*,
	2	48	12.8125	12.9740	1.8726	1.00	60.00	
Bcl-X_L	1	30	21.9667	27.3590	4.9950	0	80.00	p=0.020*
	2	47	38.1277	30.2587	4.4136	0	100.0	
Bcl-2	1	30	47.0000	43.7981	7.9964	0	100.0	p=0.938
	2	47	46.2128	42.2790	6.1670	0	100.0	
AI	1	26	3.4895	2.3971	0.4701	0.34	9.70	p=0.018*
	2	36	2.2983	1.4377	0.2396	0.26	6.13	

Συντομεύσεις: N: πλήθος περιπτώσεων

Ανοσοφαινότυπος διαφοροποίησης 1: GCB-DLBCL (Bcl-6+/CD10+/MUM1-/CD138-: 26 περιπτώσεις, Bcl-6+/CD10-/MUM1-/CD138-: 3 περιπτώσεις, και Bcl-6-/CD10+/MUM1-/CD138-: 2 περιπτώσεις; σύνολο 31 περιπτώσεις)

Ανοσοφαινότυπος διαφοροποίησης 2: nonGCB-DLBCL (Bcl-6+/CD10-/MUM1+/CD138-: 24 περιπτώσεις, και Bcl-6-/CD10-/MUM1+/CD138-: 24 περιπτώσεις; σύνολο 48 περιπτώσεις).

Αστερίσκος: αναδεικνύει τις στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις (p<0.05)



Πίνακας 11. Συσχετίσεις των ανοσοφαινοτύπων διαφοροποίησης με τα επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 (θετικές έναντι αρνητικές περιπτώσεις)

	Ανοσοφαινότυπος διαφοροποίησης 1	Ανοσοφαινότυπος διαφοροποίησης 2
Bax θετικό	29	44
Bax αρνητικό	2	4
Bak θετικό	20	21
Bak αρνητικό	11	27
Bid θετικό	23	21
Bid αρνητικό	8	27
Bad θετικό	25	35
Bad αρνητικό	6	13
Bcl-X _L θετικό	13	33
Bcl-X _L αρνητικό	17	14
Bcl-2 θετικό	18	29
Bcl-2 αρνητικό	12	18

Πίνακας 12. Συσχετίσεις των ανοσοφαινοτύπων διαφοροποίησης με τα επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 (υψηλής έναντι χαμηλής έκφραση) (X² test).

	Ανοσοφαινότυπος διαφοροποίησης 1	Ανοσοφαινότυπος διαφοροποίησης 2	p values
Bcl-2 υψηλό	18	29	p=0.881
Bcl-2 χαμηλό	12	18	
Bax υψηλό	17	19	p=0.184
Bax χαμηλό	14	29	
Bak υψηλό	12	8	p=0.036*
Bak χαμηλό	19	40	
Bid υψηλό	19	11	p=0.001*
Bid χαμηλό	12	37	
Bad υψηλό	12	13	p=0.278
Bad χαμηλό	19	35	
Bcl-X _L υψηλό	13	33	p=0.031*
Bcl-X _L χαμηλό	17	14	

Συνοτομώσεις:

Ανοσοφαινότυπος διαφοροποίησης 1: GCB-DLBCL (Bcl-6+/CD10+/MUM1-/CD138-: 26 περιπτώσεις, Bcl-6+/CD10-/MUM1-/CD138-: 3 περιπτώσεις, και Bcl-6-/CD10+/MUM1-/CD138-: 2 περιπτώσεις; σύνολο 31 περιπτώσεις)

Ανοσοφαινότυπος διαφοροποίησης 2: nonGCB-DLBCL (Bcl-6+/CD10-/MUM1+/CD138-: 24 περιπτώσεις, και Bcl-6-/CD10-/MUM1+/CD138-: 24 περιπτώσεις, σύνολο 48 περιπτώσεις).

Θετική έκφραση των Bcl-X_L, Bcl-2, Bax, Bak, Bad και Bid θεωρήθηκε όταν αυτή ξεπέρασε το 10% των ανοσοθετικών νεοπλασματικών κυττάρων.

Υψηλά: επίπεδα έκφρασης της Bcl-2 πρωτεϊνικής οικογένειας τουλάχιστον 25% ανοσοθετικά νεοπλασματικά κύτταρα

Χαμηλά: επίπεδα έκφρασης της Bcl-2 πρωτεϊνικής οικογένειας κάτω του 25% ανοσοθετικά νεοπλασματικά κύτταρα

4.12 Συσχετίσεις με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους

Δεν βρέθηκαν στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της εντόπισης (λεμφαδενικό λέμφωμα έναντι εξωλεμφαδενικού λεμφώματος) ή του κλινικού σταδίου (I-IV) και των δύο κύριων ανοσοφαινότυπων διαφοροποίησης Bcl-6/CD10.MUM1/CD138 (χ^2 τεστ).

4.13 Ανάλυση της έκφρασης πρωτεϊνών της B-κυτταρικής διαφοροποίησης και της απόπτωσης με ανοσοαποτύπωση κατά Western

Στη παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε ποσοτική ανάλυση της έκφρασης των πρωτεϊνών Bcl-6, Bcl-2, BclXL, Bax, Bak, Bad και Bid σε αντιπροσωπευτικά δείγματα των δύο βασικών ιστογενετικών υπότυπων των DLBCL (12 περιπτώσεις GCB και 12 περιπτώσεις nonGCB) με την μέθοδο ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

4.13.1 Εκχύλιση πρωτεϊνών

Για την επεξεργασία κατεψυγμένων ιστών και ιστών εγκλεισμένων σε παραφίνη χρησιμοποιήθηκε ήπια μέθοδος εκχύλισης πρωτεϊνών με βαθμιαίες επνώσεις των δειγμάτων παραφίνης μέσα σε διάλυμα RIPA και σε θερμοκρασίες από 70°C έως 100°C (τροποποιημένη τεχνική των Tomita και συν) (153) με σκοπό την ανεύρεση ιδανικών συνθηκών για την εκχύλιση πρωτεϊνών από ιστοτεμάχια εγκλεισμένα σε παραφίνη (Πίνακας 13).

Πίνακας 13. Μέσος όρος εκχύλισης συνολικής πρωτεΐνης ανά θερμοκρασία και χρόνο επώασης.

	50C	60C	70C	80C	90C	95C	100C
1 hr	1.5μg	1.2μg	17.9μg	59.0μg	58.5μg	61.9μg	60.2μg
2 hr	4.6μg	5.8μg	28.2μg	66.8μg	87.2μg	86.8μg	77.4μg
3 hr	4.9μg	4.8μg	28.1μg	63.3μg	70.1μg	74.4μg	69.9μg

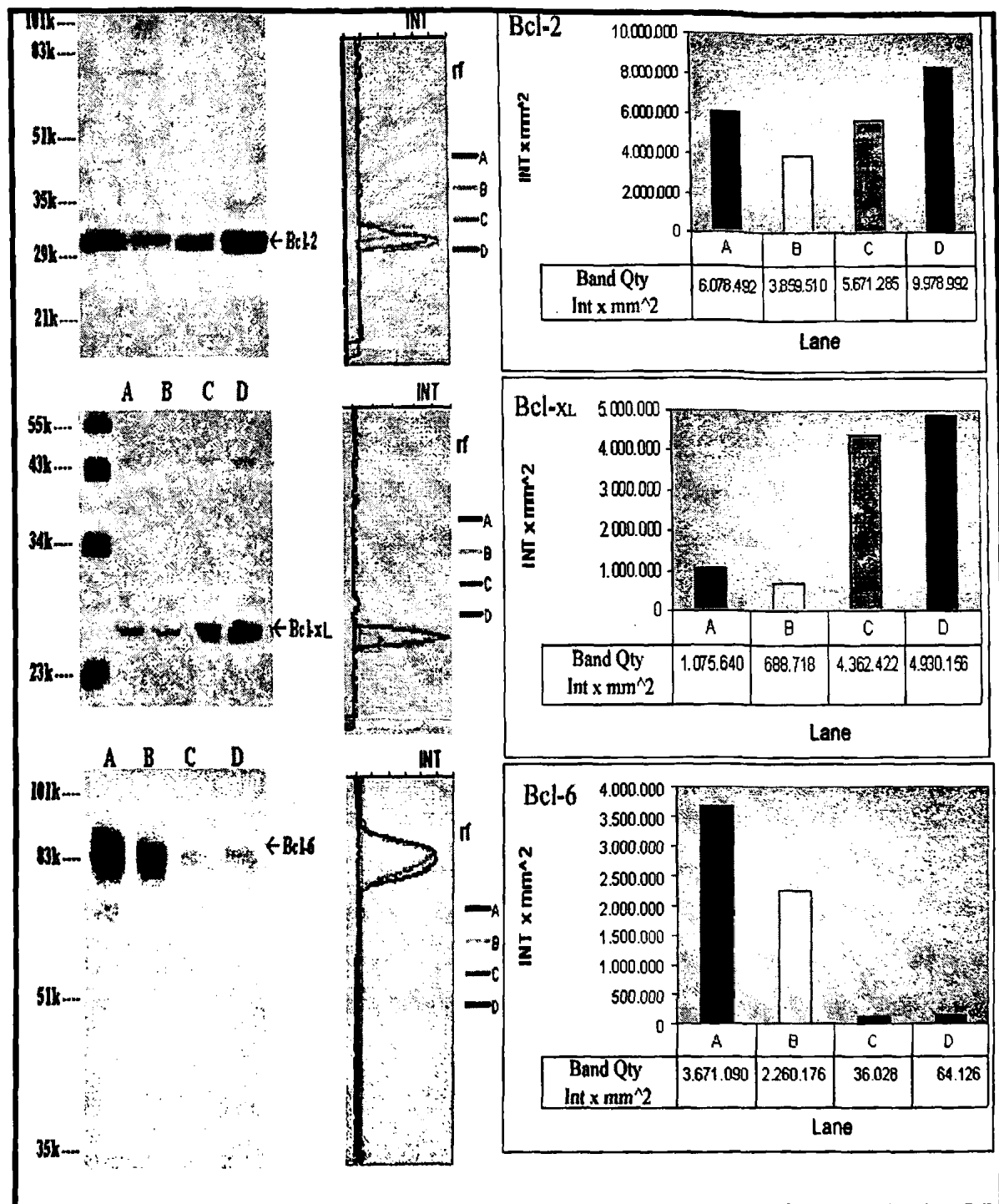
Υπολογίσθηκε ο μέσος όρος συνολικής πρωτεΐνης που εκχυλίστηκε από τα δείγματα παραφίνης των DLBCL σε σχέση με τη θερμοκρασία και το χρόνο επώασης σε διάλυμα RIPA. Η χρονική περίοδος των δύο ωρών σε θερμοκρασία 90°C ανέδειξε το μεγαλύτερο κλάσμα εκχύλισης 87.2μg συνολικής πρωτεΐνης /mg ιστού (Πίνακας 13).

4.13.2 Πυκνομετρία

Σε πρώτο στάδιο πιστοποιήθηκε η ακριβής ανοσοαποτύπωση της πρωτεΐνης Bcl-6 σε κατεψυγμένο ιστό περιπτώσεων GCB-DLBCL η οποία και ανέδειξε ανοσοαποτύπωμα μεγέθους 83kD . Η ανίχνευση της πρωτεΐνης Bcl-6 στο ίδιο μοριακό βάρος εντοπίστηκε και σε δείγματα παραφίνης GCB-DLBCL . Στις περιπτώσεις nonGCB-DLBCL δεν ανιχνεύθηκε έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-6. Ακολούθησε η ανίχνευση των πρωτεϊνών Bcl-2 και Bcl-X_L σε κατεψυγμένο ιστό και σε δείγματα παραφίνης. Από μεθοδολογική άποψη επιβεβαιώθηκε η δυνατότητα χρήσης αρχειακού παθολογικού υλικού εγκλεισμένου σε παραφίνη και η ανάκτηση ακέραιων πρωτεϊνικών μορίων με σκοπό την άμεση ποσοτικοποίηση τους. Επίσης η ποσοτική ανάλυση των πρωτεϊνών Bcl-6, Bcl-2, και Bcl-X_L επιβεβαίωσε μερικώς τα ανοσοιστοχημικά αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι οι περιπτώσεις των GCB-DLBCL χαρακτηρίζονται από αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-6, ενώ οι περιπτώσεις των nonGCB-DLBCL δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη. Η αντί-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 ανιχνεύθηκε σε περιπτώσεις και των δύο ιστογενετικών ανοσοφαινότυπων. Η ανάλυση πυκνομετρίας ανέδειξε ότι: α) η πρωτεΐνη Bcl-2 εμφάνισε υψηλότερη έκφραση (1,5 fold) στις περιπτώσεις των nonGCB-DLBCL (εικόνα 5), β) η πρωτεΐνη Bcl-X_L εμφάνισε υψηλότερη έκφραση (8 fold) στις περιπτώσεις των nonGCB-DLBCL (εικόνα 5).

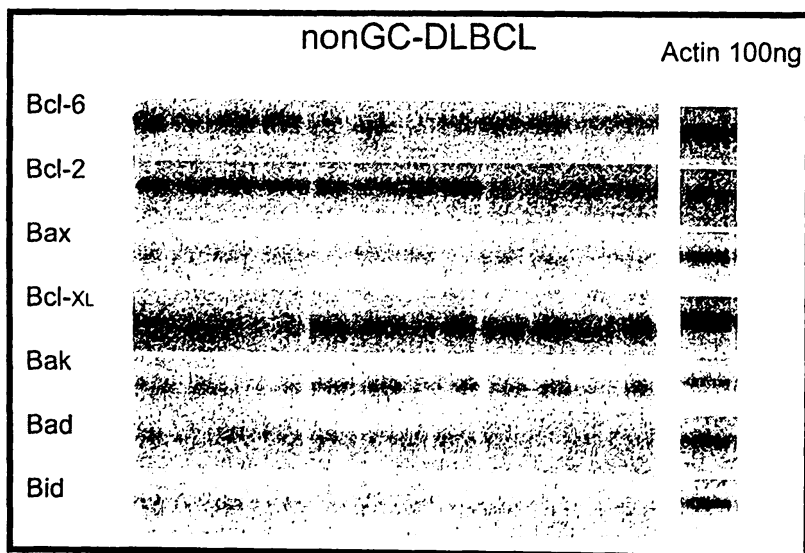
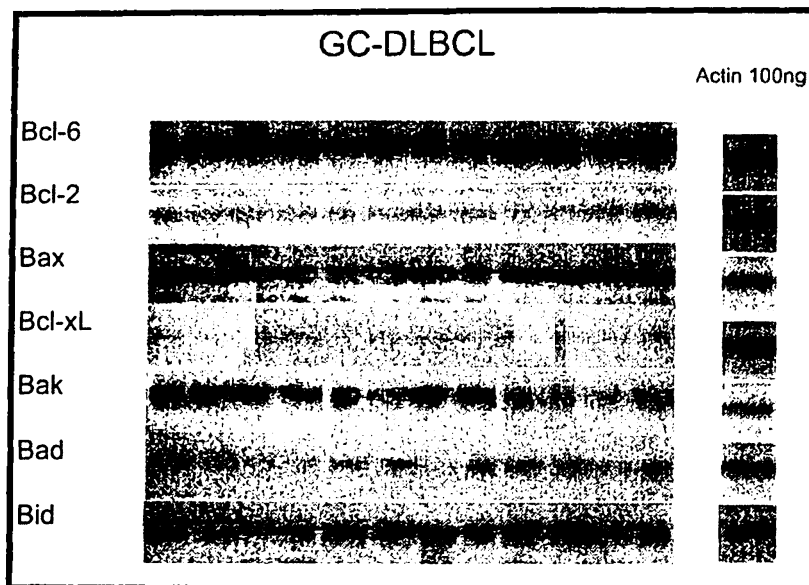
Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση και των υπολοίπων αποπτωτικών πρωτεϊνών Bax, Bak, Bad, και Bid η οποία ανέδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο κύριων ανοσοφαινότυπων των DLBCL. Συγκεκριμένα οι πρωτεΐνες Bax, Bak, Bad, και Bid εμφάνισαν υψηλότερη έκφραση (9,5 fold, 7 fold, 5 fold, και 6 fold, αντίστοιχα) στις περιπτώσεις με ανοσοφαινότυπο GCB-DLBCL. (εικόνα 6).

Εικόνα 5. Ανοσοαποτύπωση κατά Western.



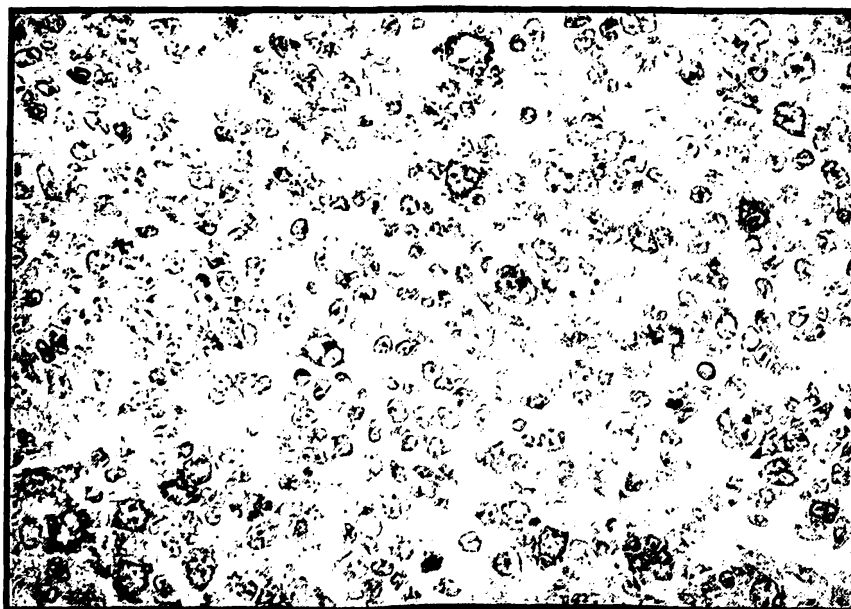
Σημείωση: Οι διαδρομές της ανοσοαποτύπωσης αντιστοιχούν σε: A) 20μg/μl συνολικής πρωτεΐνης από κατεψυγμένο ιστό GCB-DLBCL, B) 20μg/μl συνολικής πρωτεΐνης από δείγματα παραφίνης GCB-DLBCL, C) 20μg/μl συνολικής πρωτεΐνης από δείγματα παραφίνης nonGCB-DLBCL, D) 20μg/μl συνολικής πρωτεΐνης από κατεψυγμένο ιστό nonGCB-DLBCL.

Εικόνα 6. Ανοσοαποτύπωση κατά Western αποπτωτικών πρωτεϊνών σε περιπτώσεις GCB-DLBCL και nonGCB-DLBCL



4.15 Ανοσοιστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης VEGF στα DLBCL

Ανοσοιστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης VEGF ανιχνεύθηκε στα νεοπλασματικά κύτταρα σε 59/79 (80%) περιπτώσεις DLBCL (Βασικά στατιστικά δεδομένα: μέση τιμή 2,00%-μέσος όρος 17,69%-s.e. $\pm 3,55$ -std dev. 31,73-διακύμανση 1006,92-εύρος τιμών 0-100%)· (Εικόνα 8). Η ανάλυση των ανοσοιστοχημικών αποτελεσμάτων δεν ανέδειξε στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης της πρωτεΐνης VEGF και των πρωτεϊνών Β-κυτταρικής διαφοροποίησης, απόπτωσης, και πολλαπλασιασμού και του δείκτη απόπτωσης και πολλαπλασιασμού.



Εικόνα 8. Ανοσοιστοχημική κυτταροπλασματική έκφραση της πρωτεΐνης VEGF στα νεοπλασματικά κύτταρα DLBCL (X400).



ΣΥΖΗΤΗΣΗ



5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1 Η αυξημένη έκφραση των πρωτεϊνών Bcl-6 και CD-10 συσχετίζεται με αυξημένη απόπτωση και κυτταρικό πολλαπλασιασμό στα DLBCL

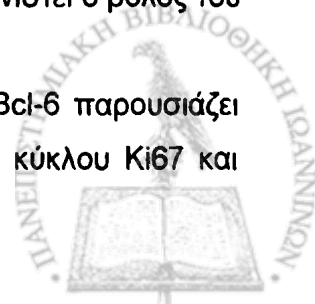
Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι η αυξημένη έκφραση των πρωτεϊνών Bcl-6 και CD10 στα νεοπλασματικά κύτταρα των DLBCL συσχετίζεται με αυξημένη απόπτωση και κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Όσον αφορά την πρωτεΐνη Bcl-6 τα μέχρι τώρα δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας δείχνουν ότι η πρωτεΐνη Bcl-6 μπορεί να επάγει ή να αναστείλει την απόπτωση και ότι η δράση της εξαρτάται από το είδος του κυττάρου και τη πειραματική προσέγγιση (76,78). Ορισμένες μελέτες υποστηρίζουν ότι η έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-6 μπορεί να προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση (76). Ο Kumagai και συν (76) χρησιμοποίησαν μία διαφοροποιούμενη μυογενή (myogenic) κυτταρική σειρά ποντικών (C2C12) και έδειξαν ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Bcl-6 μέσω αδενοϊών αυξάνει τη ζωτικότητα των διαφοροποιημένων μυοκυττάρων προλαμβάνοντας την απόπτωση. Διαπίστωσαν ότι η αναστολή της έκφρασης της πρωτεΐνης Bcl-6 μέσω της διαμόλυνσης των κυττάρων με antisense Bcl-6 mRNA οδηγεί τα κύτταρα σε απόπτωση, ενώ η επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης Bcl-6 μέσω της διαμόλυνσης των κυττάρων με sense Bcl-6 mRNA αναστέλλει την απόπτωση. Στη μελέτη αυτή ο Kumagai και συν (76) υποστηρίζουν ότι η πρωτεΐνη Bcl-6 πιθανών να προστατεύει τα μυοκύτταρα από ειδικούς στρεσογόνους παράγοντες (π.χ. στέρηση ορού). Ο Kojima και συν (80) μελέτησαν τη σπερματογένεση σε ποντικούς με ανεπάρκεια της πρωτεΐνης Bcl-6 και έδειξαν ότι η πρωτεΐνη προστατεύει τα σπερματοκύτταρα από την επαγόμενη από στρεσογόνους παράγοντες (π.χ. θερμικό σοκ) απόπτωση. Ο Baron και συν (81) χρησιμοποίησαν τη κυτταρική σειρά BJAB (EBV-αρνητικό Burkitt λέμφωμα) που εκφράζει υψηλά επίπεδα Bcl-6 πρωτεΐνης και βρήκαν ότι το γονίδιο PDCD2 (human programmed cell-death 2) είναι μεταγραφικός στόχος της αρνητικής δράσης της πρωτεΐνης Bcl-6. Επιπλέον, ο Baron και συν (81) έδειξαν ότι η εντόπιση της ανοσοιστοχημικής έκφρασης της πρωτεΐνης PDCD2 είναι αντίθετη από αυτή της Bcl-6 στο βλαστικό κέντρο και τον μανδύα των δευτερογενών λεμφοζιδίων των αμυγδαλών. Βασίζόμενοι στα ευρήματα αυτά ο Baron και συν (81) υποστήριξαν ότι η πρωτεΐνη Bcl-6 καταστέλλει την απόπτωση μέσω της κατασταλτικής της δράσης στο γονίδιο PDCD2.

Ωστόσο, σε ορισμένες άλλες μελέτες υποστηρίζεται ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Bcl-6 μπορεί να επάγει την απόπτωση. Πράγματι, ο Zhang και συν (91) χρησιμοποίησαν μία σταθερή κυτταρική σειρά ινοβλαστών ποντικού (NIH3T3) και βρήκαν ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Bcl-6 επάγει την απόπτωση των ινοβλαστών.

Επιπλέον, οι ίδιοι ερευνητές έδειξαν ότι μια αλληλουχία 17 αμινοξέων που βρίσκεται στο κέντρο της πρωτεΐνης Bcl-6 είναι υπεύθυνη για την επαγωγή της απόπτωσης. Ο Albagli και συν (92) χρησιμοποίησαν τη κυτταρική σειρά του ανθρώπινου οστεοσαρκώματος U2OS που είναι σταθερά επιμολυσμένη με το γονίδιο Bcl-6 και βρήκαν ότι η πρωτεΐνη Bcl-6 προκαλεί δόσοεξαρτώμενη αναστολή της ανάπτυξης που σχετίζεται με επιβράδυνση της S-φάσης και ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού. Σε πρόσφατη μελέτη ο Yamoshi και συν (93) χρησιμοποίησαν καλλιέργειες κυτάρων CV1 και HeLa επιμολυσμένων με ανασυνδυασμένο αδενοϊό που εξέφραζαν υψηλά επίπεδα της πρωτεΐνης Bcl-6 και έδειξαν ότι η επιβίωση των κυτάρων ελαττώνεται λόγω απόπτωσης. Επιπλέον, διαπίστωσαν ότι στα αποπτωτικά κύτταρα προηγείται μεγάλη μείωση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών Bcl-2 και Bcl-X_L. Βασιζόμενοι στα παραπάνω ευρήματα ο Yamoshi και συν (93) υποστήριξαν ότι η πρωτεΐνη Bcl-6 πιθανώς να ρυθμίζει την έκφραση των αντί-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και Bcl-X_L. Τέλος ο Tang και συν (94) περιέγραψαν ένα νέο προ-αποπτωτικό μηχανισμό που ενεργοποιείται από τη πυρηνική μετακίνηση του μεταγραφικού παράγοντα AFX και στον οποίο εμπλέκεται η πρωτεΐνη Bcl-6 και το αντί-αποπτωτικό γονίδιο Bcl-X_L. Στη μελέτη αυτή υποστηρίζεται ότι υπάρχει περιοχή άμεσης πρόσδεσης της πρωτεΐνης Bcl-6 στον υποκινητή του γονιδίου Bcl-X_L. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης επιβεβαιώνονται σε μεγάλο βαθμό από τα ευρήματα του Yamoshi και συν (93). Στη μελέτη μας βρέθηκε ότι η αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-6 συσχετίζεται στατιστικώς σημαντικά με μειωμένη ή και μη ανιχνεύσιμη έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 ($p=0,002$). Επιπλέον, ο Larocca και συν (95) έδειξαν ότι στις περισσότερες περιπτώσεις πρωτοπαθών DLBCL του κεντρικού νευρικού συστήματος με αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-6 δεν ανιχνεύεται έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα διατυπώνεται η υπόθεση ότι η συσχέτιση της αυξημένης έκφρασης της πρωτεΐνης Bcl-6 με την αυξημένη απόπτωση στα DLBCL πιθανώς να οφείλεται στη κατασταλτική δράση που ασκεί η πρωτεΐνη Bcl-6 στη πρωτεΐνη Bcl-2. Ωστόσο, είναι πιθανόν η πρωτεΐνη Bcl-6 να επάγει την απόπτωση ανεξάρτητα της πρωτεΐνης Bcl-2, αλλά μέσω της αναστολής της έκφρασης της αντί-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-X_L. Η υπόθεση αυτή εν μέρει ενισχύεται από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης όπως επίσης και από τα αποτελέσματα του Larocca και συν (95), στις οποίες ορισμένες περιπτώσεις DLBCL με υψηλό αποπτωτικό δείκτη εξέφραζαν ταυτόχρονα σε υψηλά επίπεδα τις πρωτεΐνες Bcl-6 και Bcl-2. Βέβαια θα πρέπει να επισημανθεί ότι απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να διευκρινιστεί ο ρόλος του γονιδίου Bcl-6 στην απόπτωση στα DLBCL.

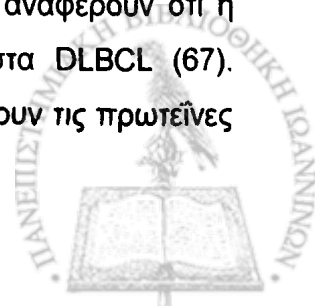
Στη παρούσα εργασία βρέθηκε ότι η έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-6 παρουσιάζει σημαντική συσχέτιση με την έκφραση των πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου Ki67 και



κυκλίνη A. Με βάση τη πρόσφατη βιβλιογραφία δεν προκύπτει άμεση σχέση μεταξύ της πρωτεΐνης Bcl-6 και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Ορισμένες *in vitro* μελέτες αναφέρουν ότι η έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-6 σχετίζεται με αναστολή της προώθησης του κυτταρικού κύκλου και τον ελαττωμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ο Albagli και συν (84) έδειξαν ότι στα κύτταρα οστεοσαρκώματος (U2OS) η πρωτεΐνη Bcl-6 αναστέλλει την ανάπτυξη των κυττάρων επιβραδύνοντας την S-φάση του κυτταρικού κύκλου. Επιπλέον, ο Hosokawa και συν (97) δημιούργησαν μια κυτταρική σειρά προ-B λεμφοκυττάρων (Ba/F3) επιμολυσμένη με το ανθρώπινο γονίδιο Bcl-6 και έδειξαν ότι η αύξηση της έκφρασης της πρωτεΐνης Bcl-6 μείωσε τα επίπεδα έκφρασης της κυκλίνης A και ανέστειλε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Σε αντίθεση με τις παραπάνω μελέτες, ο Shaffer και συν (69) έδειξαν ότι η πρωτεΐνη Bcl-6 επάγει την προώθηση του κυτταρικού κύκλου και διατηρεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό καταστέλλοντας την έκφραση του αναστολέα των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών p27 και παρεμποδίζοντας την έκφραση του γονιδίου Blimp-1 το οποίο καταστέλλει την έκφραση του γονιδίου c-myc. Επιπλέον, ο Allman και συν (99) έδειξαν ότι η έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-6 ήταν 36 φορές υψηλότερη στα ταχέως αναπτυσσόμενα B-λεμφοκύτταρα του βλαστικού κέντρου σε σχέση με τα μη ενεργοποιημένα (resting) B-λεμφοκύτταρα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης μια πρόσφατη μελέτη που σχετίζει την έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-6 με την γήρανση (senescence) και την ικανότητα πολλαπλασιασμού πρωτογενών καλλιιεργειών ανθρώπινων B-κυττάρων. Πράγματι, ο Shvarts και συν (100) έδειξαν ότι η πρωτεΐνη Bcl-6 αναστέλλει τη κυτταρική γήρανση που ακολουθεί μετά από την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης p53 και αυξάνει τη βιωσιμότητα του κυτταρικού πληθυσμού μέσω μίας διαδικασίας που προϋποθέτει την επαγωγή της έκφρασης της κυκλίνης D1. Επιπλέον, οι ίδιοι ερευνητές πρότειναν ότι η πρωτεΐνη Bcl-6 δρα ως ογκογονίδιο προκαλώντας κυτταρική αθανασία και καθιστώντας τα κύτταρα απαθή στα αντί-μιτωτικά σήματα που προέρχονται από το μονοπάτι p19 (ARF)-p53 ενώ παράλληλα αναστέλλει την έκφραση του p27. Συνεπώς, η αναστολή της έκφρασης της πρωτεΐνης p27 και η απενεργοποίηση των πρωτεϊνικών μονοπατιών p19 (ARF)-p53 και Rb-p16-κυκλίνη D (συχνά ενεργοποιημένων στα DLBCL) μπορεί να επάγει τον πολλαπλασιασμό των νεοπλασματικών κυττάρων. Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης σχετίζονται με την παραπάνω υπόθεση διότι βρέθηκε ότι τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης p27 σε συνδυασμό με μεταβολές των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών p53/Rb/p16 εμφανίζουν στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με την αύξηση του πολλαπλασιασμού στα DLBCL. Επίσης στη παρούσα μελέτη αναζητήθηκε η σχέση ανάμεσα στην έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-6 και την έκφραση των ρυθμιστικών μορίων του κυτταρικού κύκλου p53, Rb, p16 και p27. Δεν βρέθηκαν στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των

προαναφερθέντων μορίων και επομένως απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να διευκρινιστούν οι ακριβείς μηχανισμοί μέσω των οποίων η πρωτεΐνη Bcl-6 επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στα DLBCL.

Επιπλέον, στη παρούσα εργασία η έκφραση των πρωτεϊνών Bcl-6 και CD10 παρουσίασε στατιστικώς σημαντική θετική συσχέτιση με τον αποπτωτικό δείκτη και τη πρωτεΐνη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki67. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η έκφραση της πρωτεΐνης CD10 συσχετίζεται θετικά με την απόπτωση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό τόσο στα φυσιολογικά όσο και στα νεοπλασματικά Β-κύτταρα. Πράγματι α) τα κύτταρα του βλαστικού κέντρου που χαρακτηρίζονται από υψηλό δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού και απόπτωσης εκφράζουν την πρωτεΐνη CD10 ενώ η πρωτεΐνη δεν εκφράζεται σε άλλους υποπληθυσμούς ώριμων Β-λεμφοκυττάρων που χαρακτηρίζονται από χαμηλό δείκτη πολλαπλασιασμού, β) τα κύτταρα του λεμφώματος Burkitt που παρουσιάζουν υψηλό δείκτη πολλαπλασιασμού και απόπτωσης εκφράζουν σταθερά τη πρωτεΐνη CD10, γ) τα κύτταρα της CD10-θετικής Β-λεμφοβλαστικής λευχαιμίας που βρίσκονται σε κυτταρικό κύκλο έχουν υψηλά επίπεδα c-myc και δυνατότητα να αποπέσουν ενώ αντίθετα τα κύτταρα της CD10-αρνητικής Β-λεμφοβλαστικής λευχαιμίας παρουσιάζουν χαμηλή ικανότητα κυτταρικού πολλαπλασιασμού, χαμηλά επίπεδα c-myc και είναι ανθεκτικά στην απόπτωση. Τα παραπάνω ευρήματα σε φυσιολογικά και κακοήγη Β-λεμφοκύτταρα συμφωνούν με τα ευρήματα της μελέτης των Cutrona και συν (75) που έδειξαν ότι τα ανθρώπινα Τ-λεμφοκύτταρα προ-θυμικού και θυμικού σταδίου διαφοροποίησης εκφράζουν το μόριο CD10 όταν οδεύουν προς απόπτωση. Όσο αναφορά τη σχέση της πρωτεΐνης CD10 με την απόπτωση έχει προταθεί ότι η συγκεκριμένη πρωτεΐνη μπορεί να κατατμήσει κυτταροκίνες που έχουν προστατευτικό ρόλο στην απόπτωση των Β και Τ-λεμφοκυττάρων. Η ιδιότητα αυτή συνδυάζεται με την ικανότητα της πρωτεΐνης CD10 να υδρολύει πλήθος ενεργών πεπτιδίων συμπεριλαμβανομένων των αυξητικών και χημειοτακτικών παραγόντων. Επομένως είναι πιθανόν η πρωτεΐνη CD10 να εμπλέκεται στη διαδικασία επιλογής στα βλαστικά κέντρα των λεμφοζιδίων και στο θύμο αδένα αυξάνοντας το όριο των κυτταροκινών που απαιτούνται για την αναστολή την απόπτωση των Β και Τ-λεμφοκυττάρων, αντίστοιχα. Τα ευρήματα της παρούσης μελέτης ότι η έκφραση των πρωτεϊνών Bcl-6 και CD10 συσχετίζεται θετικά με τον αποπτωτικό δείκτη και ότι ο ανοσοφαινότυπος Bcl-6+/CD10+ συσχετίζεται με αυξημένο αποπτωτικό δείκτη μπορεί να σχετίζονται με τα αποτελέσματα πρόσφατων μελετών που αναφέρουν ότι η έκφραση των πρωτεϊνών αυτών σχετίζεται με ευνοϊκή πρόγνωση στα DLBCL (67). Επομένως, θα μπορούσε κανείς να υποθέσει ότι τα DLBCL που εκφράζουν τις πρωτεΐνες



Bcl-6 και CD10 μπορεί να είναι περισσότερο ευαίσθητα στην απόπτωση και επομένως στη θεραπεία.

Συμπερασματικά τα ευρήματα της μελέτης αυτής δείχνουν ότι α) η αυξημένη έκφραση των πρωτεϊνών Bcl-6 και CD10 συσχετίζεται με αυξημένη απόπτωση και κυτταρικό πολλαπλασιασμό στα DLBCL, και β) ότι υπερέκφραση της πρωτεΐνης Bcl-6 συσχετίζεται με απουσία ή μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2. Επιπλέον, η θετική συσχέτιση των πρωτεϊνών Bcl-6 και CD10 με την απόπτωση, όπως επίσης και του ανοσοφαινότυπου Bcl-6+/CD10+ με τα αυξημένα επίπεδα απόπτωσης, ενισχύουν τα ευρήματα πρόσφατων μελετών που έδειξαν ότι οι δυο αυτές πρωτεΐνες σχετίζονται με ευνοϊκή πρόγνωση.

Επομένως, θα μπορούσε κανείς να υποθέσει ότι τα DLBCL που εκφράζουν τη πρωτεΐνη CD10 ή/και τη πρωτεΐνη Bcl-6 είναι περισσότερο ευαίσθητα στην απόπτωση και επομένως περισσότερο ευαίσθητα στη θεραπεία.

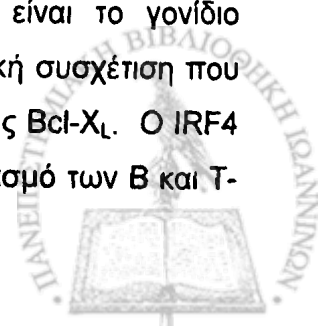
5.2 Τα διάχυτα Β-λεμφώματα από μεγάλα κύτταρα με ανοσοφαινότυπο κυτάρων βλαστικού κέντρου (GCB-DLBCL) συσχετίζονται με υψηλό αποπτωτικό δείκτη, υψηλή έκφραση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bax, Bak, και Bid, και χαμηλή έκφραση της αντί-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-X_L

Στη παρούσα μελέτη αναλύθηκε η σχέση του ανοσοφαινότυπου διαφοροποίησης Bcl-6/CD10/MUM1/CD138 με την απόπτωση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στα DLBCL. Επιπλέον, αναλύθηκε το πρότυπο έκφρασης των πρωτεϊνών της Bcl-2 οικογένειας (Bcl-2, Bcl-X_L, Bax, Bak, Bad, και Bid) σε σχέση με τον αποπτωτικό δείκτη και το δείκτη πολλαπλασιασμού.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι τα DLBCL με ανοσοφαινότυπο κυτάρων βλαστικού κέντρου (GCB-DLBCL) παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικά αυξημένο αποπτωτικό δείκτη, αυξημένη έκφραση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bax, Bak, και Bid, και χαμηλή έκφραση της αντί-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-X_L. Επιπλέον, η έκφραση των πρωτεϊνών Bcl-6 και CD10 που συσχετίζεται με τον ανοσοφαινότυπο των GCB-DLBCL έδειξε στατιστικώς σημαντικά θετική συσχέτιση με την έκφραση των πρωτεϊνών Bax, Bak, και Bid, και στατιστικώς σημαντικά αρνητική συσχέτιση με την έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-X_L. Επιπρόσθετα, όπως προαναφέρθηκε η έκφραση των πρωτεϊνών Bcl-6 και CD10 συσχετίσθηκε θετικά με τον αποπτωτικό δείκτη. Τα ανωτέρω ευρήματα συμφωνούν με τα ευρήματα προηγούμενων μελετών που πραγματοποιήθηκαν σε κυτταρικές σειρές στις οποίες διαπιστώθηκε ότι η έκφραση των πρωτεϊνών Bcl-6 και CD10 σχετίζεται με αυξημένη απόπτωση. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι *in vitro* μελέτες των Yamochi και συν (93), και Tang και συν (94) που

μελέτησαν την σχέση της πρωτεΐνης Bcl-6 και της απόπτωσης. Πράγματι, οι Yamochi και συν (93) έδειξαν ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Bcl-6 επάγει την απόπτωση των CV1 και HeLa κυττάρων και ότι της απόπτωσης προηγείται μείωση της έκφρασης των αντί-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και Bcl-X_L. Επιπλέον, οι Tang και συν (94) έδειξαν ότι ο διχαλωτός μεταγραφικός παράγοντας AFX ενεργοποιεί την απόπτωση επάγοντας την πρωτεΐνη Bcl-6 η οποία άμεσα δεσμεύει τον εκκινητή του γονιδίου Bcl-X_L. Τα παραπάνω ευρήματα δείχνουν ότι η σημαντική μείωση της έκφρασης της αντί-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-X_L που ανιχνεύθηκε στα GCB-DLBCL στη παρούσα μελέτη μπορεί εν μέρη να οφείλεται στη μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης Bcl-X_L από την υπερέκφραση της πρωτεΐνης Bcl-6. Όσο αναφορά τη σχέση της πρωτεΐνης CD10 με την απόπτωση έχει υποστηριχθεί ότι η συγκεκριμένη πρωτεΐνη μπορεί να κατατμήσει κυτταροκίνες που έχουν προστατευτικό ρόλο στην απόπτωση των B και T-λεμφοκυττάρων. Η ιδιότητα αυτή συνδυάζεται με την ικανότητα της πρωτεΐνης CD10 να υδρολύει πλήθος ενεργών πεπτιδίων συμπεριλαμβανομένων των αυξητικών και χημειοτακτικών παραγόντων. Επομένως, είναι πιθανών η πρωτεΐνη CD10 να εμπλέκεται στη διαδικασία επιλογής των λεμφοκυττάρων του βλαστικού κέντρου και του θύμου αδένος αυξάνοντας το αναγκαίο επίπεδο έκφρασης (threshold) των κυτταροκινών που απαιτούνται για την αναστολή τη απόπτωσης των B και T-λεμφοκυττάρων.

Στη παρούσα μελέτη βρέθηκε ότι ο ανοσοφαινότυπος διαφοροποίησης κυττάρων μη-βλαστικού κέντρου (nonGCB-DLBCL) συσχετίζεται σημαντικά με χαμηλό αποπτωτικό δείκτη, χαμηλή έκφραση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bax, Bak, και Bid, και την υψηλή έκφραση της αντί-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-X_L. Επιπλέον η έκφραση της πρωτεΐνης MUM1, που χαρακτηρίζει τα nonGCB-DLBCL εμφάνισε σημαντική αρνητική συσχέτιση με την έκφραση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bax και Bid και σημαντική θετική συσχέτιση με την έκφραση της αντί-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-X_L. Τα ανωτέρω ευρήματα φαίνεται να συμφωνούν με τα ευρήματα άλλων μελετών που αναφέρουν ότι τα nonGCB-DLBCL παρουσιάζουν ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NFκB (nuclear factor-kappa B). Ο τελευταίος ρυθμίζει θετικά τη μεταγραφή αρκετών αντί-αποπτωτικών γονιδίων-στόχων όπως των Bcl-2, Bcl-X_L, A1, TRAF1, TRAF2, c-IAP και c-IAP2. Τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι η υψηλή έκφραση της αντί-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-X_L που ανιχνεύθηκε στη παρούσα μελέτη στα ABC-DLBCL οφείλεται εν μέρη στην θετική ρύθμιση της έκφρασης της πρωτεΐνης Bcl-X_L από τον μεταγραφικό παράγοντα NFκB. Ένας άλλος στόχος του μεταγραφικού παράγοντα NFκB είναι το γονίδιο IRF4(MUM1/LSIRF), γεγονός που πιθανόν να εξηγεί τη σημαντική θετική συσχέτιση που προέκυψε μεταξύ της έκφρασης της πρωτεΐνης MUM1 και της πρωτεΐνης Bcl-X_L. Ο IRF4 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας απαραίτητος για τον πολλαπλασιασμό των B και T-



λεμφοκυττάρων και έχει υποστηριχθεί ότι μπορεί να είναι διαμεσολαβητής της δράσης του NFκB στα ABC-DLBCL.

Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι τα DLBCL εκφράζουν πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2, όπως οι πρωτεΐνες Bax, Bak, Bad, Bid, και Bcl-xL, και ότι αυτές εκφράζονται σε ποσοστά 92%, 52%, 76%, 56%, και 60% αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα άλλων μελετών στις οποίες περιγράφεται ότι τα νεοπλασματικά κύτταρα των DLBCL εκφράζουν τις πρωτεΐνες Bcl-2, Mcl-1, Bax, και Bak, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι στη παθογένεση των DLBCL εμπλέκεται ο αποπτωτικός μηχανισμός που ρυθμίζεται από την οικογένεια των πρωτεϊνών Bcl-2. Στη παρούσα εργασία και σε προηγούμενες μελέτες διαπιστώθηκε ότι στα DLBCL η έκφραση των πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 ποικίλει και είναι ετερογενής. Έχει επισημανθεί στη βιβλιογραφία ότι η διακύμανση της έκφρασης των πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 μπορεί να οφείλεται σε ανωμαλίες της γονιδιακής δομής ή/και της έκφρασης. Είναι γνωστό ότι σε ορισμένες περιπτώσεις DLBCL η έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 οφείλεται στην διαμετάθεση t(14;18) ή στην ενίσχυση του γονιδιακού τόπου του Bcl-2. Η διακύμανση της έκφρασης των πρωτεϊνών Bax, Bak, και Bcl-X_L που παρατηρήθηκε στη παρούσα μελέτη προφανώς δεν οφείλεται σε γενωμικές μεταλλάξεις των αντίστοιχων γονιδίων εφόσον αυτές περιγράφονται ιδιαίτερα σπάνια σε λεμφώματα. Η πρωτεΐνη Bad παίζει σημαντικό ρόλο στη παθογένεση των DLBCL. Συγκεκριμένα, έχει περιγραφεί ότι σε ποντικούς με ανεπάρκεια της πρωτεΐνης Bad αναπτύσσονται GCB-DLBCL (76). Με βάση τα ευρήματα της παρούσας μελέτης και τα δεδομένα της πρόσφατης βιβλιογραφίας είναι βέβαιο ότι απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την πλήρη κατανόηση των μηχανισμών ρύθμισης της έκφρασης των πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 στα DLBCL.

Επιπλέον, στη παρούσα μελέτη διαπιστώθηκε ότι ο αποπτωτικός δείκτης συσχετίζεται θετικά με την έκφραση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bax, Bak, Bad, και Bid και αρνητικά με την έκφραση των αντί-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και Bcl-X_L. Η διακύμανση της έκφρασης των αποπτωτικών πρωτεϊνών δικαιολογεί εν μέρη τη διακύμανση του αποπτωτικού δείκτη στα DLBCL. Επιπλέον, τα ευρήματα της εργασίας αυτής ανέδειξαν ότι ο δείκτης πολλαπλασιασμού (Ki67/MIB1) συσχετίζεται θετικά με τον αποπτωτικό δείκτη και με την έκφραση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bax, Bak, Bad, και Bid, και αρνητικά με τις αντί-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-X_L. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με τα ευρήματα προηγούμενων μελετών που αναφέρουν ότι στα Β-λεμφώματα ο δείκτης πολλαπλασιασμού συσχετίζεται θετικά με τον δείκτη απόπτωσης (53), καθώς επίσης και με ευρήματα πρόσφατων μελετών που έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες Bcl-X_L και Bcl-2 αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (79). Ενδιαφέρον είναι ότι οι πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-X_L επάγουν την G0 παύση του κυτταρικού κύκλου και

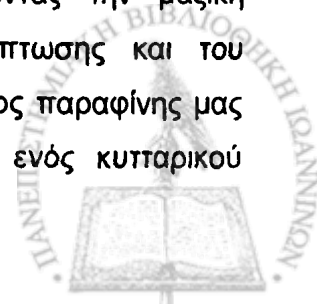
επομένως συμβάλουν στη καθυστέρηση της μετάβασης από την G0 στη G1 φάση (43). Επιπλέον, άλλες πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 όπως η Mcl-1 πιθανών να εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και στη διαφοροποίηση, διατηρώντας ή αναστέλλοντας τη κυτταρική βιωσιμότητα σε κρίσιμα σημεία του κυτταρικού κύκλου (44).

Η σχέση των ανοσοφαινοτύπων διαφοροποίησης των DLBCL με την απόπτωση πιθανώς επηρεάζει και τη κλινική συμπεριφορά των νεοπλασμάτων. Πράγματι, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι α) η πενταετής επιβίωση των ασθενών με GCB-DLBCL ήταν ευνοϊκότερη από αυτή των ασθενών με nonGCB-DLBCL (155) και β) η έκφραση των πρωτεϊνών Bcl-6 και CD10 σχετίζεται με καλύτερη συνολική επιβίωση ενώ η έκφραση της πρωτεΐνης MUM1 σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση στα DLBCL (155). Επιπλέον, η υψηλή ανοσοιστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης Bax, η οποία στη παρούσα μελέτη συσχετίζεται με τα GCB-DLBCL, βρέθηκε ότι σχετίζεται με καλύτερη πενταετή επιβίωση στα DLBCL (155). Με βάση τα ανωτέρω ευρήματα θα μπορούσε κανείς να υποθέσει ότι τα GCB-DLBCL είναι περισσότερο ευαίσθητα στην απόπτωση και επομένως στη θεραπεία.

Συμπερασματικά, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι τα GCB-DLBCL σχετίζονται με αυξημένη απόπτωση, υψηλή έκφραση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bax, Bak και Bid και χαμηλή έκφραση της αντί-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-X_L. Αντίθετα, τα ABC-DLBCL (nonGCB-DLBCL) σχετίζονται με ελαττωμένη απόπτωση, χαμηλή έκφραση των πρωτεϊνών Bax, Bak και Bid και υψηλή έκφραση της αντί-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-X_L. Δεδομένου ότι προηγούμενες κλινικές μελέτες έδειξαν ότι τα GCB-DLBCL εμφανίζουν ευνοϊκή κλινική πορεία θα μπορούσε κανείς να υποθέσει ότι τα GCB-DLBCL είναι περισσότερο ευαίσθητα στην απόπτωση και επομένως περισσότερο ευαίσθητα στη θεραπεία.

5.3 Η Ποσοτική ανάλυση της έκφρασης πρωτεϊνών B-κυτταρικής διαφοροποίησης και της απόπτωσης με ανοσοαποτύπωση κατά Western επιβεβαιώνει τα ανοσοιστοχημικά αποτελέσματα της μελέτης και αναδεικνύει αυξημένη έκφραση της Bcl-2 πρωτεΐνης στα nonGCB-DLBCL.

Η ρύθμιση των πρωτεϊνικών μορίων είναι μια πολυπαραγοντική διαδικασία που χαρακτηρίζεται από γενωμικές αλλαγές, πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, ιοντικές μεταβολές, και δομικές αναπροσαρμογές. Μικρές μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης μιας πρωτεΐνης μπορούν να ενεργοποιήσουν ένα μοριακό καταρράκτη προκαλώντας την μαζική αναπροσαρμογή κυτταρικών μηχανισμών όπως αυτών της απόπτωσης και του κυτταρικού κύκλου. Μολονότι η ανοσοιστοχημική μελέτη ενός δείγματος παραφίνης μας επιτρέπει να ανιχνεύσουμε τα ποσοστά έκφραση των πρωτεϊνών ενός κυτταρικού



πληθυσμού αξιοποιώντας παράλληλα τη συλλογή ενός μεγάλου αρχειακού υλικού (παθολογικού και φυσιολογικού) από τα παθολογοανατομικά τμήματα, δεν επιτρέπει την μελέτη της ακριβούς ποσοτικής μεταβολής των εν λόγω μορίων. Για το λόγο αυτό προχωρήσαμε στην απομόνωση 24 (12 GCB-DLBCL, 12 nonGCB-DLBCL) συνολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από τα 79 δείγματα παραφίνης DLBCL με σκοπό την περαιτέρω ανάλυση τους με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Σε πρώτη φάση σκοπός της μελέτης μας ήταν να αναπτύξουμε μια μεθοδολογία εκχύλισης πρωτεϊνών από ιστοτεμάχια παραφίνης που θα μας έδιναν δομικά ακέραια πρωτεϊνικά μόρια. Υπάρχουν αρκετές αναφορές στη βιβλιογραφία που υποστηρίζουν ότι συντηρητικά ιστών όπως η φορμαλδεΰδη προκαλούν ισχυρές μεταβολές στη τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών και καθιστούν την απομόνωση και την ανίχνευση τους αδύνατη (167, 168). Η μεθοδολογία εκχύλισης με βάση την μελέτη των Tomita και συν (153) έδειξε ότι σε ένα ποσοστό περιπτώσεων είναι εφικτή η μελέτη πρωτεϊνών από ιστούς παραφίνης.

Σε πρώτο στάδιο πιστοποιήθηκε η ακριβής ανοσοαποτύπωση της πρωτεΐνης B-κυτταρικής διαφοροποίησης BCL-6 σε κατεψυγμένο ιστό δείγματος GCB-DLBCL η οποία και ανέδειξε ανοσοαποτύπωμα μεγέθους 83KD. Η ανίχνευση της πρωτεΐνης BCL-6 στο ίδιο μοριακό βάρος εντοπίστηκε και σε δείγματα παραφίνης GCB-DLBCL. Όπως αναμενόταν στα nonGCB-DLBCL περιστατικά δεν ανιχνεύθηκε έκφραση της πρωτεΐνης BCL-6. Ακολούθησε η ανίχνευση των πρωτεϊνών BCL-2 και BclX_L σε κατεψυγμένο ιστό και σε δείγματα παραφίνης. Από μεθοδολογική σκοπιά επιβεβαιώθηκε η δυνατότητα χρήσης αρχειακού παθολογικού υλικού και ανάκτησης ακέραιων πρωτεϊνικών μορίων με σκοπό την άμεση ποσοτικοποίηση τους.

Στη συνέχεια ακολούθησε η ποσοτική ανάλυση των πρωτεϊνών Bcl-6, Bcl-2, και BclX_L η οποία και επιβεβαίωσε τα ανοσοιστοχημικά αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι οι GCB-DLBCL περιπτώσεις παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-6, ενώ οι nonGCB-DLBCL περιπτώσεις δεν εξέφραζαν την πρωτεΐνη Bcl-6. Η έκφραση των αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και Bcl-X_L ήταν υψηλότερη (1,5 fold και 8 fold, αντίστοιχα) στις περιπτώσεις των nonGCB-DLBCL σε σχέση με τις περιπτώσεις των GCB-DLBCL, ενώ η έκφραση των Bax, Bak, Bad και Bid ήταν υψηλότερη (9,5 fold, 7 fold, 5 fold και 6 fold, αντίστοιχα) στις περιπτώσεις των GCB-DLBCL σε σχέση με τις περιπτώσεις των nonGCB-DLBCL.

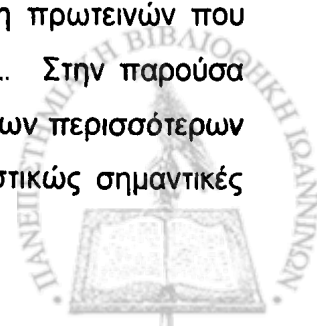
Συμπερασματικά θα μπορούσαμε να πούμε ότι η πρωτεϊνική εκχύλιση από ιστούς παραφίνης και η ποσοτική ανάλυση τους κατά Western επιβεβαίωσε τα ανοσοιστοχημικά αποτελέσματα της μελέτης, την δυνατότητα αξιοποίησης του αρχειακού μας υλικού.

5.4 Ανίχνευση αριθμητικών ανωμαλιών και της διαμετάθεσης του γονιδίου Bcl-2 στο DLBCL

Τα τελευταία χρόνια η εφαρμογή της τεχνικής του FISH γνωρίζει ραγδαία ανάπτυξη τόσο σε ερευνητικό όσο και σε διαγνωστικό επίπεδο (126-147). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι οι συχνότερες κυτταρογενετικές ανωμαλίες στο DLBCL είναι αυτές των γονιδίων Bcl-2 και Bcl-6 (148,149). Στη παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι πιθανές αριθμητικές ανωμαλίες και η διαμετάθεση του γονιδίου Bcl2 με τη μέθοδο του FISH. Διαμετάθεση t(14;18)(q32;q21) ανιχνεύθηκε σε 3/19 (13,9%) περιπτώσεις DLBCL που μελετήθηκαν. Όλες οι περιπτώσεις με διαμετάθεση ανήκαν στον ιστογενετικό υπότυπο του GCB-DLBC γεγονός το οποίο δείχνει ότι η διαμετάθεση t(14;18) παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση του GCB-DLBC όπως άλλωστε και του θηλακιδώδους/οζώδους λεμφώματος. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η διαμετάθεση t(14;18) ανευρίσκεται περίπου στο 20% των DLBCL και ότι παρατηρείται κυρίως (35%) στον υπότυπο του GCB-DLBCL (149). Η απουσία ανίχνευσης της διαμετάθεσης t(14;18) στον υπότυπο του nonGCB-DLBC στηρίζει την ήδη διαμορφωμένη άποψη ότι τα GCB-DLBC και τα non GCB-DLBC είναι διακριτές οντότητες όσον αφορά την παθογένεσή τους. Σε προηγούμενες μελέτες η διαμετάθεση t(14;18) έχει συσχετιστεί με την έκφραση του mRNA και της πρωτεΐνης του γονιδίου Bcl-2 στο GCB-DLBCL γεγονός το οποίο δείχνει ότι η διαμετάθεση t(14;18) είναι ο κύριος μηχανισμός υπερέκφρασης της πρωτεΐνης Bcl-2 στον ιστογενετικό υπότυπο των GCB-DLBCL (148). Ωστόσο, υπερέκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 παρατηρείται και στον υπότυπο του nonGCB-DLBC απουσία της διαμετάθεσης t(14;18). Το εύρημα αυτό δείχνει ότι προφανώς υπάρχουν εναλλακτικοί μηχανισμοί ενεργοποίησης του γονιδίου Bcl-2 όπως ενεργοποίηση του δικτύου ρύθμισης του NF-κΒ ή ενίσχυση του γονιδίου Bcl-2. Πράγματι, μελέτες συγκριτικού γενωμικού υβριδισμού (CGH) έδειξαν ότι στο 20% των περιπτώσεων των DLBCL παρατηρείται ενίσχυση του γονιδιακού τόπου 18q (53). Επιπλέον, στη παρούσα μελέτη και στην μελέτη των Igbalhai και συν (58) ανιχνεύθηκε ενίσχυση του γονιδίου 18q21 στα nonGCB-DLBC η οποία συσχετίστηκε με υπερέκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2. Τα ευρήματα της μελέτης αυτής αλλά και προηγούμενων μελετών δείχνουν ότι στους δύο κύριους ιστογενετικούς υπότυπους των DLBCL εμπλέκονται διαφορετικοί μηχανισμοί υπερέκφρασης της πρωτεΐνης Bcl-2.

5.5 Ανοσοιστοχημική έκφραση του VEGF στο DLBCL

Η αγγειογένεση όπως επίσης και η ανοσοιστοχημική έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην αγγειογένεση έχουν μελετηθεί ελάχιστα στο DLBCL. Στην παρούσα μελέτη αναδείχτηκε έκφραση του VEGF στα νεοπλασματικά κύτταρα των περισσότερων περιπτώσεων των DLBCL που μελετήθηκαν. Δεν ανευρέθηκαν στατιστικώς σημαντικές



διαφορές στην έκφραση της πρωτεΐνης VEGF μεταξύ των δύο κύριων ιστογενετικών υπότυπων του DLBCL. Ανάλογα είναι τα ευρήματα πρόσφατης μελέτης του Gratzinger και συν (151). Επιπλέον, ο Gratzinger και συν (151) μελέτησαν την μικροαγγειακή πυκνότητα (microvessel density, MVD) του νεοπλασματικού ιστού και την έκφραση των VEGFR1 και VEGFR2 στα νοεπλασματικά κύτταρα και βρήκαν ότι η έκφραση του VEGF συσχετίζεται με την MVD και την έκφραση των VEGFR1 και VEGFR2 στο DLBCL. Πράγματι, in vitro μελέτες έδειξαν ότι ο VEGF πιθανώς να έχει ένα διπλό ρόλο στην λεμφωματογένεση δρώντας τόσο ως αγγειογενετικός παράγοντας μέσω του VEGFR2 όσο και ως παράγοντας που επάγει την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων μέσω του VEGFR1. Στην παρούσα μελέτη η έκφραση του VEGFR δεν συσχετίστηκε με τον δείκτη πολλαπλασιασμού, τον δείκτη απόπτωσης και πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τα δύο αυτά κυτταρικά φαινόμενα. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την διερεύνηση της πιθανής αυτοκκρινούς δράσης του VEGF στο DLBCL.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ



6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης έδειξε:

- 1) Αυξημένη έκφραση των πρωτεϊνών Bcl-6 και CD-10 συσχετίζεται με αυξημένη απόπτωση και κυτταρικό πολλαπλασιασμό στο DLBCL.
- 2) Αυξημένη έκφραση των πρωτεϊνών Bcl-6 και CD10 συσχετίζεται θετικά με αυξημένη έκφραση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bax, Bak, και Bid και αρνητικά με την έκφραση της αντί-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-X_L στο DLBCL.
- 3) Αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-6 συσχετίζεται με αρνητική (μηδενική/ελαττωμένη) έκφραση της αντί-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 στο DLBCL.
- 4) Το πρότυπο έκφρασης Bcl6+/CD10+ συσχετίζεται θετικά με τον αποπτωτικό δείκτη στο DLBCL.
- 5) Η έκφραση της πρωτεΐνης MUM1 συσχετίζεται αρνητικά με την έκφραση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bax και Bid και θετικά με την έκφραση της αντί-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-X_L στο DLBCL.
- 6) Τα GCB-DLBCL παρουσιάζουν σημαντικά υψηλότερη έκφραση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bax, Bak, και Bid καθώς και υψηλότερο αποπτωτικό δείκτη σε σχέση με τα nonGCB-DLBCL.
- 7) Τα GCB-DLBCL παρουσιάζουν σημαντικά χαμηλότερη έκφραση της αντί-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-X_L σε σχέση με τα nonGCB-DLBCL.
- 8) Η ποσοτική ανάλυση της έκφρασης πρωτεϊνών Β-κυτταρικής διαφοροποίησης και της απόπτωσης με ανοσοαποτύπωση κατά Western επιβεβαίωσε τα ανοσοιστοχημικά αποτελέσματα της μελέτης.
- 9) Στους δύο κύριους ιστογενετικούς υπότυπους των DLBCL (GCB-DLBCL και nonGCB-DLBCL) εμπλέκονται διαφορετικοί μηχανισμοί υπερέκφρασης της πρωτεΐνης Bcl-2. Στον υπότυπο GCB-DLBCL η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 οφείλεται στην διαμετάθεση t(14;18) ενώ στον υπότυπο nonGCB-DLBCL στην ενίσχυση του γονιδίου Bcl-2.
- 10) Η πρωτεΐνη VEGF εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στο DLBCL και δεν συσχετίζεται με τους ιστογενετικούς υπότυπους του λεμφώματος ή την έκφραση πρωτεϊνών της απόπτωσης και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ / ABSTRACT



7. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν η περαιτέρω διερεύνηση των μηχανισμών παθογένεσης των DLBCL μέσω συνδυασμένης ανάλυσης του ιστογενετικού φαινότυπου, του κυτταρικού κύκλου, της απόπτωσης, της αγγειογένεσης, και των κυτταρογενετικών ανωμαλιών σε σχέση με την ιστογενετική προέλευση των DLBCL.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν 79 περιπτώσεις πρωτοπαθών DLBCL για την ανοσοιστοχημική έκφραση α) των πρωτεϊνών B-κυτταρικής διαφοροποίησης CD10, Bcl-6, MUM1, CD138, β) των αντί-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και Bcl-X_L, και των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bax, Bak, Bad και Bid και γ) της αγγειογενετικής πρωτεΐνης VEGF. Οι πρωτεΐνες B-κυτταρικής διαφοροποίησης καθώς και οι αποπτωτικές πρωτεΐνες μελετήθηκαν και με την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Επιπλέον μελετήθηκε ο αποπτωτικός δείκτης με τη μέθοδο TUNEL και οι πιθανές αριθμητικές ανωμαλίες και η διαμετάθεση του γονιδίου Bcl-2 (t(14;18)) με τη μέθοδο FISH. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής συσχετίστηκαν με τον δείκτη πολλαπλασιασμού (Ki67/MIB1) και πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο (p21, p16, p27, κυκλίνη A, κυκλίνη B1, κυκλική D3, Rb και p53) (αποτελέσματα προηγούμενων μελετών)

Στην παρούσα μελέτη η έκφραση των πρωτεϊνών Bcl-6 και CD10 συσχετίστηκε θετικά με τον δείκτη πολλαπλασιασμού ($r=0.328$, $p=0.003$ και $r=0.296$, $p=0.008$ αντίστοιχα), τον αποπτωτικό δείκτη ($r=0.327$, $p=0.010$ και $r=0.397$, $p=0.001$ αντίστοιχα), την έκφραση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bax ($r=0.659$, $p<0.001$ και $r=0.240$, $p=0.033$, αντίστοιχα), Bak ($r=0.391$, $p<0.001$ και $r=0.233$, $p=0.039$, αντίστοιχα) και Bid ($r=0.652$, $p<0.001$ και $r=0.238$, $p=0.035$, αντίστοιχα) και αρνητικά με την έκφραση των αντί-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-X_L ($r=-0.536$, $p<0.001$ και $r=-0.250$, $p=0.029$, αντίστοιχα) και Bcl-2 (χ^2 test, $p=0.002$). Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι οι περιπτώσεις των DLBCL με ανοσοφαινότυπο Bcl-6+/CD10+ είχαν σημαντικά αυξημένο αποπτωτικό δείκτη σε σχέση με τις περιπτώσεις που είχαν ανοσοφαινότυπο Bcl-6-/CD10+, Bcl-6+/CD10-, Bcl-6-/CD10- (t-test $p=0.014$ και Mann Whitney test $p=0.046$). Τα ευρήματα αυτά φαίνεται να ενισχύουν την πρόσφατα δημοσιευμένη άποψη ότι η έκφραση των πρωτεϊνών Bcl-6 και CD10 συσχετίζεται με ευνοϊκή κλινική πορεία των ασθενών με DLBCL και θα μπορούσε κανείς να υποθέσει ότι οι Bcl-6 και οι CD10-θετικές περιπτώσεις είναι περισσότερο ευαίσθητες στην απόπτωση και επομένως ανταποκρίνονται καλύτερα στην χημειοθεραπεία.

Στη παρούσα μελέτη δύο κύριοι ανοσοφαινότυποι διαφοροποίησης αναγνωρίστηκαν: α) ανοσοφαινότυπος παρόμοιος με αυτόν των B-λεμφοκυττάρων του βλαστικού κέντρου (GCB-DLBCL) (CD10+/-, Bcl-6+, MUM1-, CD138-)(31/79 περιπτώσεις)

και β) ανοσοφαινότυπος που δεν ομοιάζει με αυτόν των Β-λεμφοκυττάρων του βλαστικού κέντρου (nonGCB-DLBCL) (CD10-, Bcl-6+/-, MUM1+, CD138-)(48/79 περιπτώσεις). Διαπιστώθηκε ότι οι περιπτώσεις των GCB-DLBCL εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερο αποπτωτικό δείκτη και έκφραση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bax, Bak και Bid σε σχέση με τις περιπτώσεις nonGCB-DLBCL ($p=0.045$, $p=0.018$, $p=0.003$ και $p=0.0034$ αντίστοιχα). Αντίθετα ήταν τα αποτελέσματα όσον αφορά την έκφραση της αντί-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-X_L ($p=0.026$). Επιπλέον, η έκφραση της πρωτεΐνης MUM1, η οποία κυρίως χαρακτηρίζει τα nonGCB-DLBCL, έδειξε σημαντική αρνητική συσχέτιση με την έκφραση των αντί-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bak ($r=-0.276$, $p=0.037$) και Bid ($r=-0.266$, $p=0.018$) και θετική συσχέτιση με την αντί-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-xL ($r=0.238$, $p=0.037$). Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη έδειξε ότι τα GCB-DLBCL σχετίζονται με αυξημένη απόπτωση, υψηλή έκφραση προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών και χαμηλή έκφραση της αντί-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-X_L. Αντίθετα τα nonGC-DLBCL συσχετίζονται με ελαττωμένη απόπτωση, χαμηλή έκφραση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bax, Bak, και Bid και υψηλή έκφραση της αντί-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-X_L. Δεδομένου ότι προηγούμενες κλινικές μελέτες έδειξαν ότι τα GCB-DLBCL εμφανίζουν ευνοϊκή κλινική πορεία θα μπορούσε κανείς να υποθέσει ότι τα GCB-DLBCL είναι περισσότερο ευαίσθητα στην απόπτωση και επομένως περισσότερο ευαίσθητα στη θεραπεία.

Στη παρούσα μελέτη προχωρήσαμε στην απομόνωση 24 συνολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων (12 GCB-DLBCL, 12 nonGCB-DLBCL) από τα 79 δείγματα παραφίνης DLBCL με σκοπό την περαιτέρω ανάλυση τους με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Σε πρώτη φάση σκοπός της μελέτης μας ήταν να αναπτύξουμε μια μεθοδολογία εκχύλισης πρωτεϊνών από ιστοτεμάχια παραφίνης που θα μας έδιναν δομικά ακέραια πρωτεϊνικά μόρια. Από μεθοδολογική σκοπιά επιβεβαιώθηκε η δυνατότητα χρήσης αρχειακού παθολογικού υλικού και ανάκτησης ακέραιων πρωτεϊνικών μορίων με σκοπό την άμεση ποσοτικοποίηση τους. Στη συνέχεια ακολούθησε η ποσοτική ανάλυση των πρωτεϊνών Bcl-6, Bcl-2, Bax, Bak, Bid και Bcl-X_L η οποία και επιβεβαίωσε τα ανοσοιστοχημικά αποτελέσματα της παρούσας μελέτης.

Στη παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι πιθανές αριθμητικές ανωμαλίες και η διαμετάθεση του γονιδίου Bcl2 με τη μέθοδο του FISH. Διαμετάθεση t(14;18)(q32;q21) ανιχνεύθηκε σε 3/19 (13,9%) περιπτώσεις DLBCL που μελετήθηκαν. Όλες οι περιπτώσεις με διαμετάθεση ανήκαν στον ιστογενετικό υπότυπο του GCB-DLBC γεγονός το οποίο δείχνει ότι η διαμετάθεση t(14;18) παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση του GCB-DLBC. Επιπλέον, στη παρούσα μελέτη ανιχνεύθηκε ενίσχυση του γονιδίου 18q21 αποκλειστικά σε ABC-DLBCL. Τα ευρήματα της μελέτης αυτής αλλά και προηγούμενων

μελετών δείχνουν ότι στους δύο κύριους ιστογενετικούς υπότυπους των DLBCL εμπλέκονται διαφορετικοί μηχανισμοί υπερέκφρασης της πρωτεΐνης Bcl-2.

Στην παρούσα μελέτη αναδείχτηκε έκφραση του VEGF στα νεοπλασματικά κύτταρα των περισσότερων περιπτώσεων των DLBCL που μελετήθηκαν. Δεν ανευρέθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στην έκφραση της πρωτεΐνης μεταξύ των δύο κύριων ιστογενετικών υπότυπων του DLBCL. Επιπλέον, η έκφραση του VEGF δεν συσχετίστηκε με τον δείκτη πολλαπλασιασμού, τον δείκτη απόπτωσης και πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τα δύο αυτά κυτταρικά φαινόμενα. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την διερεύνηση της πιθανής αυτοκκρινούς δράσης του VEGF στο DLBCL.

8. ABSTRACT

There is increasing evidence that bcl6 and CD10 expression may be related to apoptosis and cell cycle progression. Therefore, 79 cases of de novo diffuse large B-cell lymphomas were studied for the expression of bcl6 and CD10 proteins in relation to a) the apoptotic index, b) the proliferation-associated proteins Ki67, cyclin A and cyclin B1 and c) the expression of the bcl2, p53, Rb, p16 and p27 proteins. Expression of bcl6, CD10 and bcl2 proteins was found in 54/79 (68%), 28/79 (35%) and 47/74 (63%) cases, respectively. The bcl6/CD10 patterns were as follows: bcl6+/CD10+ (26 cases, 32%), bcl6+/CD10- (28 cases, 33%), bcl6-/CD10- (23 cases, 31%) and bcl6-/CD10+ (2 cases, 4%). Significant positive correlations were found between bcl6/Ki67 ($r=0.328$, $p=0.003$), bcl6/cyclin A ($r=0.265$, $p=0.018$), bcl6/apoptotic index ($r=0.327$, $p=0.010$), CD10/Ki67 ($r=0.296$, $p=0.008$) and CD10/apoptotic index ($r=0.397$, $p=0.001$). In addition, high expression of bcl6 showed significant correlation with negative (null/low) bcl2 expression (Chi-Square test, $p=0.002$). The above findings indicate that increased expression of the bcl6 and CD10 proteins is associated with increased apoptosis and proliferation in diffuse large B-cell lymphomas. The association between increased bcl6 expression and enhanced apoptosis might be due, at least in part, to the null/low bcl2 expression since previous in vitro data showed that bcl6 overexpression induces apoptosis accompanied by bcl2 and bcl-xl down regulation. Moreover, significant correlation was found between increased apoptotic index and the bcl6+/CD10+ pattern (T-test: $p=0.014$, Mann-Whitney test: $p=0.046$). This finding and the positive correlation of the apoptotic index with bcl6 and CD10 expression may be related to previous results showing that the expression of these proteins has favorable effects on the clinical outcome of diffuse large B-cell lymphomas.

An aim of this study was to analyze the relations between differentiation immunophenotypes and the status of apoptosis and proliferation in diffuse large B-cell lymphomas. Therefore, the bcl6/CD10/MUM1/CD138 differentiation immunophenotypic profiles were studied in relation to a) the apoptotic index, b) the apoptosis-associated bcl2 family proteins bcl2, bcl-xl, bax, bak, bad and bid, c) the proliferation index (Ki67) and d) the cell cycle proteins cyclin A, cyclin B1, cyclin D3, cyclin E, p53, Rb, p16 and p27 in 79 cases of diffuse large B-cell lymphomas. Two major differentiation immunophenotypic profiles were distinguished: the germinal center B-cell-like profile; 31 cases (bcl6+/CD10±/MUM1-/CD138-: 29 cases and bcl6-/CD10+/MUM1-/CD138-: 2 cases) and the non-germinal center B-cell-like profile (bcl6±/CD10-/MUM1+/CD138-); 48 cases. The

expression of bax, bak and bid and the apoptotic index were significantly higher in the germinal center B-cell-like profile than in the non-germinal center B-cell-like profile ($p=0.045$, $p=0.018$, $p=0.003$ and $p=0.034$, respectively). In contrast, the expression of bcl-xl was significantly lower in the germinal center B-cell-like profile than in the non-germinal center B-cell-like profile ($p=0.026$). The expression of bcl6 and CD10 showed significant positive correlation with the expression of bax ($r=0.659$, $p<0.001$ and $r=0.240$, $p=0.033$, respectively), bak ($r=0.391$, $p<0.001$ and $r=0.233$, $p=0.039$, respectively) and bid ($r=0.652$, $p<0.001$ and $r=0.238$, $p=0.035$, respectively) and significant negative correlation with the expression of bcl-xl ($r=-0.536$, $p<0.001$ and $r=-0.250$, $p=0.029$, respectively). The expression of MUM1 showed significant negative correlation with the expression of bax ($r=-0.276$, $p=0.014$) and bid ($r=-0.266$, $p=0.018$) and significant positive correlation with the expression of bcl-xl ($r=0.238$, $p=0.037$). The above findings indicate that diffuse large B-cell lymphomas with germinal center B-cell-like immunophenotypic profile are associated with increased apoptosis status, high expression of the pro-apoptotic proteins bax, bak and bid and low expression of the anti-apoptotic protein bcl-xl. On the basis of the above results, it could be hypothesized that germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma may be more susceptible to apoptosis and, as a consequence, may be more sensitive to treatment.

In the present study we analyzed the levels of expression of Bcl-6, Bcl-2 and BclXL by means of immunoblotting and densitometry in 24 total protein extracts isolated from 24 paraffin embedded cases of de novo DLBCL (12 GCB-DLBCL, 12nonGCB-DLBCL). The primary aim of this experiment was to compare a semi quantitative method such as immunohistochemistry to a fully quantitative method such as western blotting and densitometry in order to identify even the slightest differences in expression levels, since it is well documented that the functional role of these proteins lies on their concentration along the mitochondrial membrane. Another aim of this study was to apply an isolation methodology for extraction of structurally intact molecules from paraffin embedded tissues. SDS page analysis revealed that the extraction procedure we describe in the present study achieves in doing so. Furthermore, western blotting and densitometry analysis revealed that the immunohistochemical results are in agreement with the quantitative analysis.

In the present study we also examined 19 *De novo* DLBCL specimens using interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) and immunohistochemistry on paraffin-embedded tissues. Interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis was performed to evaluate the Bcl-2 gene using IGH/BCL-2 and CEP18 centromere probes (Vysis). When extra Bcl-2 gene signals were observed in each tumour cell and

when these signals were in proportion to the extra CEP18 probe signals, we regarded the findings as indicating the presence of an additional chromosome 18; when extra Bcl-2 signals were observed but additional CEP18 signals were not, we regarded the findings as indicating the presence of gene amplification. A panel of 3 antigens (CD10, Bcl-6, and MUM-1) was applied to categorize each case as either a "germinal center B-cell (GCB) phenotype" or a "non-GCB phenotype." Of the 19 cases examined, FISH analysis revealed that t(14;18) was detected in 13,9% from which the 26% were classified as having a "GCB phenotype". None of the "non-GCB phenotype" cases revealed a t(14;18) translocation. Extra Bcl-2 gene signals were detected in 26,2% examined. Extra Bcl-2 gene signals were predominantly detected in DLBCL with the "non-GCB phenotype"; these cases, stained strongly positive for Bcl-2. In summary, our results confirmed the findings of previous reports indicating that t(14;18) is found in DLBCL specimens exhibiting a "GCB phenotype" and is associated with increased expression of Bcl-2 protein. Furthermore, an additional chromosome 18 and/or Bcl-2 gene amplification were associated with a "non-GCB phenotype." DLBCL specimens with Bcl-2 protein overexpression can be divided into at least two heterogeneous molecular groups, and this observation should be considered when analyzing the clinicopathologic features of DLBCL.

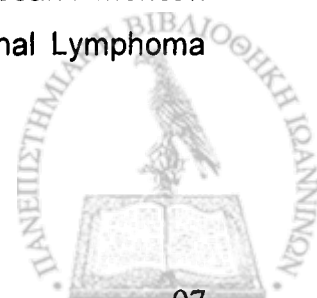
In recent years numerous studies have been made regarding the involvement of angiogenesis in cancer (116-125). In the present study we examined the immunohistochemical expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in 79 cases of de novo DLBCL. We found that the expression status of VEGF was high (59/79 cases 80% were immunopositive) and did not show any significant correlations with respect to DLBCL subtypes (GCB-DLBCL, nonGCB-DLBCL) and the expression of apoptosis and proliferation related proteins. Further studies need to be made in order to understand the involvement of VEGF in the formation and progression of DLBCL.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

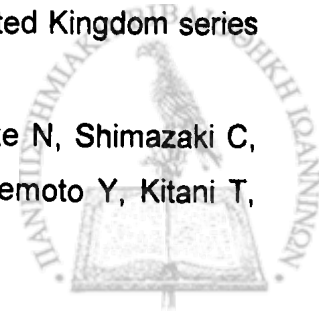


9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Prives C, and Hall P. (1999). The p53 pathway. *J Pathol* 187: 112-126.
2. Lundberg AS and Weinberg RA (1999). Control of the cell-cycle and apoptosis. *Eur J Cancer*; 35, 1886-1894
3. Adams JM and Cory S (1998). The BCL-2 family proteins. Arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322-1326
4. Evan G and Littlewood T (1998). A matter of life and cell death. *Science* 281, 1317-1322
5. Weinert T (1998). DNA damage and checkpoint pathways: Molecular anatomy and interactions with repair. *Cell*; 94, 555-558
6. Cox LS (1997). Multiple pathways control cell growth and transformation: overlapping and independent activities of p53 and p21. *J Pathol* 183: 134-140.
7. Gillet CE and Barnes DM. (1998). Cell cycle. *J Clin Pathol:(Mol Pathol)* 51: 310-316.
8. McDonald RE and El-Deiry WS (2000). Cell cycle control as a basis for cancer drug development. *Int J Oncol* 16, 871-886.
9. Harrington EA, Bruce JL, Harlow E and Dyson N (1998). pRb plays an essential role in cell cycle arrest induced by DNA damage. *Proc Natl Acad USA* 95, 11945-11950
10. Hsieh JK, Chan FSG, O'Connor DJ, Mitnacht S, Zhong S, and Lu X (1999). Rb regulates the stability and the apoptotic function of p53 via mdm2. *Molecular Cell* 3, 181-193.
11. Brady HJ, Gil-Gomez G, Kirberg J and Berns A (1998). Bax alpha perturbs T cell development and affects cell cycle entry of T cells. *EMBO J* 15, 6991-7001.
12. Gil-Gomez G, Berns A and Brady HJ (1998). A link between cell cycle and cell death: Bax and Bcl-2 modulate Cdk2 activation during thymocyte apoptosis. *EMBO J* 17, 7209-7218.
13. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Bankes PM, Chay JK, Cleary ML, Pelsol G, De wolf-Peeters G, Issacson PG, Knowles DM, Mason DY, Muller-Hermenlink HK, Pileri SA, Piris MA, Ralfkiaer E, and Warnke RA. (1994). Revised European-American classification of lymphoid neoplasms. A proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 84: 1361-1392.



14. Harris NL et al (1999). World Health organization classification of Neoplastic Diseases of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues: Report of the clinical advisory committee meeting. *J Clin Oncol* 17: 3835-3849
15. The non-Hodgkin's lymphoma classification project: A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma: *Blood* 89: 3909-3918, 1997
16. Gisselbrecht C, Gaulard P, Lepage E, et al: Prognostic significance of T-cell phenotype in aggressive non-Hodgkin's lymphomas. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA). *Blood* 92: 77-82, 1998
17. Imamura J, Miyoshi I, Koeffler HP: P53 in hematologic malignancies: *Blood* 84: 2412-2421, 1994
18. Kocalkowski S, Pezzella F, Morrison H, et al: Mutations in the p53 gene are not limited to classic 'hot spots' and are not predictive of p53 protein expression in high-grade non-Hodgkin's lymphoma. *British J Haematol* 89: 55-60, 1995
19. Baur AS, Shaw P, Burri N, Delacretaz F, Bosman FT, Chaubert P (1999). Frequent methylation silencing of p15 (INK4b) (MTS1) and p16 (INK4a) (MTS2) in B and T-cell lymphomas. *Blood* 94; 1773-1781
20. Chilosì M, Doglionni C, Magalini A, Inghirani G, Krampera M, Nadali G, Rahal D, Pedron S, Benedetti A, Scardoni M, Macri E, Lastani M, Menestrina F, Pizzolo G, and Scarpa A (1996). p21/WAF1 cyclin-kinase inhibitor expression in non-Hodgkin's lymphomas: a potential marker of p53 tumor-suppressor gene function. *Blood* 88: 4012-4020.
21. Du M, Singh N, Hussein A, Isaacson PG, and Pan LX. (1996). Positive correlation between apoptotic and proliferative indices in gastrointestinal lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *J Pathol* 178: 379-384.
22. Geradts J, Andriko JW, and Abbondanzo SL. (1998). Loss of tumor suppressor p16 gene expression in high grade but not in low grade non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Clin Pathol.* 109: 669-674.
23. Drexler P (1998). Review of alterations of the cyclin-dependent kinase inhibitor INK4 family genes p15, p16, p18 and p19 in human leukemia-lymphoma cells. *Leukemia* 12; 845-859
24. Grierson AJ, Hodgkins MA, Hancock BW, Goepel JR, Royds J, and Goyus MH. (1996). Investigation of the Rb-1 tumour suppressor gene in a United Kingdom series of non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk Lymphoma* 23: 353-363.
25. Hangaishi A, Ogawa S, Imamura N, Miyawaki S, Miura Y, Uike N, Shimazaki C, Emi N, Takeyama K, Hirosawa S, Kamada N, Kobayashi Y, Takemoto Y, Kitani T,



Toyama K, Ohtake S, Yazaki Y, Ueda R and Hirai H (1996). Inactivation of multiple tumor-suppressor genes involved in negative regulation of the cell cycle, MTS1/p16(INK4A)/CDKN2, MTS2/p15 (INK4B), p53 and Rb genes in primary lymphoid malignancies. *Blood* 87: 4949-4958.

26. Herman JG, Civin CI, Issa JPJ, Collector MI, Sharkis SJ, and Baylin SB. (1997). Distinct patterns of inactivation of p15INK4B and p16INK4A characterize the major types of hematological malignancies. *Cancer Res* 57: 837-841.

27. Kawamata N, Miller C, Levy V, Shintaku P, Koeffler HP, Said JW(1996). Mdm-2 oncogene expression in non-Hodgkin's lymphomas. *Diagn Mol Pathol* 5: 33-38

28. Leoncini L, et al (1999). Retinoblastoma-related p107 and pRb2/p130 proteins in malignant lymphomas : distinct mechanisms of cell growth control. *Clin Cancer Res* 5:4065-4072.

29. Leoncini L, Cossu A, Megha T, Bellan C, Lazzi S, Luzi P, Tosi P, Barbini P, Cevenini G, Pileri S, Giordano A, Kraft R, Laissue JA, and Cottier H. (1999). Expression of p34(cdc2) and cyclins A and B compared to other proliferative features of non-Hodgkin's lymphomas: a multivariate cluster analysis. *Int. J. Cancer* 83: 203-209

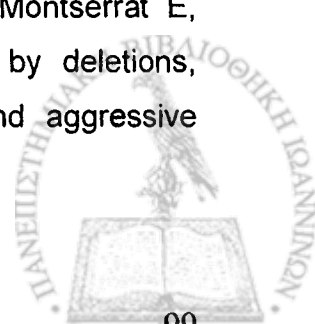
30. Maestro R, Gloghini A, Doglioni C, Piccinin S, Vukosavljevic T, Gaspurott D, Garbone A, and Boiocchi M. (1997). Human non-Hodgkin's lymphomas overexpress a wild-type form of p53 which is a functional transcriptional activator of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Blood* 89: 2523-2528.

31. Martinez JC, Piris MA, Sanchez-Beato M, Villuendas R, Orradre JL, Algara P, Sanchez-Verde L, and Martinez P. (1993). Retinoblastoma (Rb) gene product expression in lymphomas. Correlation with Ki67 growth fraction. *J. Pathol.* 169: 405-412.

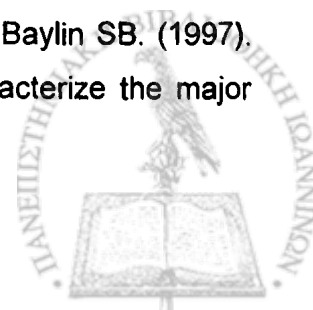
32. Moller MB, Ino Y, Gerdes AM, Skjodt K, Louis DN and Pedersen NT (1999). Aberrations of the p53 pathway components p53, mdm2 and CDKN2A appear independent in diffuse large B cell lymphoma. *Leukemia* 13: 453-459

33. Morosetti R, Kawamata N, Gombart AF, Miller CW, Hattat Y, Hiramata T, Said JW, Tomonaga M, Koeffler HP (1995). Alterations of the p27KIP1 gene in non-Hodgkin's lymphomas and adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* 86: 1924-1930

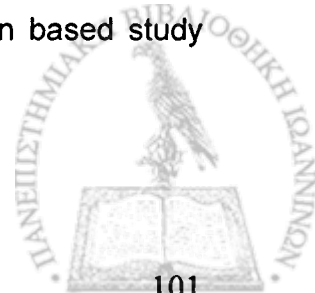
34. Pinyol M, Cobo F, Bea S, Jares P, Nayach I, Fernandez PL, Montserrat E, Cardesa A, and Campo E. (1998). P16 INKA4 gene inactivation by deletions, mutations, and hypermethylation is associated with transformed and aggressive variants of non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 91: 2977-2984.



35. Sanchez-Beato M, Saez AI, Martinez-Montero JC, Sol-Mateo M, Sanchez-Verde L, Villuendas R, Troncone G and Piris MA (1997). Cyclin-dependent kinase inhibitor p27/KIP1 in lymphoid tissue. P27/KIP1 expression is inversely proportional to the proliferative index. *Am J Pathol* 151: 151-160.
36. Sanchez-Beato M, Camacho FI, Martinez-Montero JC, Saez AI, Villuendas R, Sanchez-Verde L, Garcia JF and Piris MA (1999). Anomalous high p27/KIP1 expression in a subset of aggressive B-cell lymphomas is associated with cyclin D3 overexpression and P27/KIP1-cyclin D3 colocalization in tumor cells. *Blood* 94: 765-772
37. Lloyd RV, Erickson LA, Jin L, Kulig E, Qian X, Cheville JC, Scheithauer BW (1999). P27/KIP1: a multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers. *Am J Pathol* 154: 313-323.
38. Sander CA, Yano T, Clark HM, Harris S, Longo DL, Jaffe ES, and Raffeld M. (1993). p53 mutation is associated with progression in follicular lymphomas. *Blood* 82: 1994-2004.
39. Shiohara M, El-Deiry WS, Wada M, Nakamaki T, Takeuchi S, Yang R, Chen DL, Vogelstein B and Koeffler HP (1994). Absence of waf1 mutations in a variety of human malignancies. *Blood* 84: 3781-3784.
40. Erlanson M et al (1998). Expression of cyclin E and the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in malignant lymphomas-prognostic implications. *Blood* 92: 770-777.
41. Villuendas R, Pezzella F, Gatter K, Algara P, Sanchez-Beato M, Martinez P, Martinez JG, Munoz K, Garcia P, Sanchez L, Kocialkowsky S, Campo E, Orradre JL, and Piris MA. (1997). p21^{WAF1/CIP1} and mdm2 expression in non-Hodgkin's lymphoma and their relationship to p53 status: a p53+, mdm2-, p21- immunophenotype associated with missense p53 mutations. *J Pathol* 181: 51-61.
42. Villuendas R, Sanchez-Beato M, Martinez JC, Saez A, Martinez-Delgado B, Garcia J, Sol-Mateo M, Sanchez-Verde L, Beniter J, Martinez P, and Piris M. (1998). Loss of p16/INK4A protein expression in non-Hodgkin's lymphomas is a frequent finding associated with tumor progression. *Am. J. Pathol.* 153: 887-897.
43. Weide R, Tiemann M, and Pfluger KH. (1994). Altered expression of retinoblastoma gene product in human high-grade non-Hodgkin's lymphomas. *Leukemia* 8: 97-101.
44. Herman JG, Civin CI, Issa JPJ, Collector MI, Sharkis SJ, and Baylin SB. (1997). Distinct patterns of inactivation of p15INK4B and p16INK4A characterize the major types of hematological malignancies. *Cancer Res* 57: 837-841.



45. Kudoh S, Kumaravel TS, Kuramavel B, Eguchi M, Asaoku H, Dohy H, Fujiwara M, Sasaki N, Tanaka K, Kamada N. (1999). Protein expression of cell cycle regulator, p27Kip1, correlates with histopathological grade of non-Hodgkin's lymphoma. *Jpn J Cancer Res* 90:1262-9.
46. Takano Y, Saegusa M, Ikenaga M, Okayasu I. (1997). Apoptosis and proliferative activity of non-Hodgkin's: comparison with expression of bcl-2, p53 and c-myc proteins. *Pathol Int* 47:90-4.
47. Zhu YM, Haynes AP, Keith FJ, and Russell NH. (1995). Abnormalities of retinoblastoma gene expression in hematological malignancies. *Leuk Lymphoma* 18: 61-67
48. Krajewski S et al (1997). Immunolocalisation of the ICE/ced3 family protease, CPP32(caspase 3), in non-Hodgkin's lymphomas, Chronic lymphocytic leukemias, and reactive lymph nodes. *Blood* 10: 3817-3825.
49. Soini Y et al (1999). Apoptosis and expression of caspases 3, 6 and 8 in malignant non-Hodgkin's lymphomas. *APMIS* 107: 1043-1050
50. Mullauer L et al (1998). Fas ligand expression in nodal non-Hodgkin's lymphomas. *Mod Pathol* 11: 369-375
51. Wilson WH, Teruya-Feldstein J, Fest T, Harris C, Steinberg SM, Jaffe ES and Raffeld M (1997). Relationship of p53, bcl-2 and tumor proliferation to clinical drug resistance in non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 89: 601-609
52. Czader M, Mazur J, Pettersson M, Liliemark J, Stromberg M, Christennson B, Tribukait B, Auer G, Ost A, and Porwit A (1996). Prognostic significance of proliferative and apoptotic fractions in low grade follicle center cell-derived non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer* 77,1180-1188
53. Zhang A, Ohshima K, Sato K, Kanda M, Suzumiya J, Shimazaki K, Kawasaki C and Kikuchi M (1999). Prognostic clinicopathologic factors, including immunologic expression in diffuse large cell lymphomas. *Pathol Int* 49: 1043-1052
54. Ichikawa A, Kinoshita T, Watanabe T, Kato H, Nagai H, Tsushita K, Saito H, Hotta T (1997). Mutation of the p53 gene as a prognostic factor in aggressive B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 337: 529-534
55. Kramer MHH, Hermans J, Parker J, Krol ADG, Kluin-Nelemans JC, Haak HL, van Groningen K, van Krieken JHJM, de Jong D and Kluin PM. Clinical significance of Bcl-2 and p53 expression in diffuse large B-cell lymphomas: A population based study (1996). *J Clin Oncol* 14: 2131-2136



56. Moller MB, Gerdes AM, Skjodt K, Mortensen LS and Pedersen NT (1999). Disrupted p53 function as predictor of treatment failure and poor prognosis in B- and T-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res* 5: 1085-1091
57. Miller TP, Crogan TM, Dahlberg S, Spier CM, Brazier RM, Banks PM, Foucar K, Kjeldsberg CR, Levy N, Nathwani BN, Schnitzer B, Tubbs RR, Gaynor ER, Fisher RI (1994). Prognostic significance of the Ki-67 associated proliferative antigen in aggressive non-Hodgkin's lymphomas: A prospective Southwest Oncology Group trial. *Blood* 83: 1460-1466
58. Saez A, Sanchez E, Sanchez-Beato M, Cruz MA, Chacon I, Munoz E, Camacho FI, Martinez-Montero JC, Mollejo M, Garcia JF and Piris MA (1999). p27/KIP1 is abnormally expressed in diffuse large B-cell lymphoma and is associated with an adverse clinical outcome. *Br J Cancer* 80: 1427-1434.
59. Sanchez E, Chacon I, Plaza MM, Munoz E, Cruz B, Martinez B, Lopez L, Martinez-Montero JC, Orradre JL, Saez AI, Garcia JF and Piris MA (1998). Clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma is dependent on the relationship between different cell-cycle regulator proteins. *J Clin Oncol* 16:1931-1939.
60. Koduru PRK, Raju K, Vadmal V, et al: Correlation between mutation in P53, p53 expression, cytogenetics, histologic type, and survival in patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma: *Blood* 90: 4078-4091, 1997
61. Winter JN et al (1998) : 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* 91:1391-1398
62. Donoghue S et al (1999). Immunohistochemical localisation of caspase 3 correlates with clinical outcome in B-cell diffuse large cell lymphomas. *Cancer Res* 59: 5386-5391
63. Bairey O et al (1999). Bcl-2, bcl-x, bax and bak expression in short and long-lived patients with diffuse large B-cell lymphomas. *Clin Cancer Res* 5:2860-2866.
64. Wheaton S et al (1998). Bcl-2 and bax expression in indolent versus aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Hum Pathol* 29: 820-825
65. Zoi-Toli O (1999). Expression of fas and Fas ligand in cutaneous B-cell lymphomas. *J Pathol* 189: 533-538
66. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JJ, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JD, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM.

Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403:503-11.

67. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fischer RI, Gascoyne RD, Muller-Hermelink HK, Smeland EB, Giltane JM, Hurt EM, Zhao H, Averett L, Yang L, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Klausner RD, Powell J, Duffey PL, Longo DL, Greiner TC, Weisenburger DD, Sanger WG, Dave BJ, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Montserrat E, Lopez-Guillermo A, Grogan TM, Miller TP, LeBlanc M, Ott G, Kvaloy S, Delabie J, Holte H, Krajci P, Stokke T, Staudt LM. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002;346: 1937-47.

68. Pileri SA, Ascani S, Sabatini E, Fraternali-Orcioni G, Poggi S, Piccioli M, Piccaluga PP, Gamberi B, Zinzani PL, Leoncini L, Falini B. The pathologist's view point. Part II-aggressive lymphomas. *Haematologica* 2000;85:1308-21.

69. Dent A.L, Shatter A.L, Yu X, Allman D, Staudt L.M. Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6. *Science* 1997;276:589-92.

70. Ye BH, Cattoretti G, Shen Q, Zhang J, Hawe N, De Waard R, Leung C, Nouri-Shirazi M, Orazi A, Chaganti R, Rothman P, Stall A, Pandolfi P, Dalla-Favera R. The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2- type inflammation. *Nat Genet* 1997;16:161-70.

71. Dent A.L, Vasanwala F.H, Toney L. Regulation of gene expression by the proto-oncogene BCL-6. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002;41:1-9.

72. Lococo F, Ye BH, Lista F, Corradini P, Offit K, Knowles DM, Chaganti RSK, Dalla-Favera R. Rearrangements of the BCL-6 gene in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1994;83:1757-9.

73. Otsuki T, Yano T, Clark HM, Bastard C, Kerckaert JP, Jaffe ES, Raffeld M. Analysis of LAZ3 (BCL-6) status in B-cell non-Hodgkin lymphomas: Results of rearrangement and gene expression studies and a mutational analysis of coding region sequences. *Blood* 1995;85:2877-84.

74. Offit K, Louie DC, Parsa NZ, Roy P, Lo Coco F, Zelenetz A, Dalla-Favera R, Chaganti RS. Bcl-6 gene rearrangement and other cytogenetic abnormalities in diffuse large cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 1995;20:85-9.

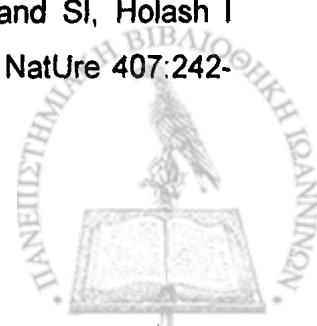
75. Ohno H, Fukuhara S. Significance of rearrangement of the Bcl-6 gene in B-cell lymphoid neoplasms. *Leuk Lymphoma* 1997;27:53-63.

76. Kramer MH, Hermans J, Wijburg E, Philippon K, Geelen E, van Kricken JH, de Jong D, Maartense E, Schuurin E, Kluin PM.. Clinical relevance of BCL-2, BCL-6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 1998;92:3152-62.
77. Kawasaki C, Ohshima K, Suzumiya J. Rearrangements of bcl-1, bcl-2, bcl-6 and c-myc in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2001;42:1099-1106.
78. Falini B, Mason D.Y. Proteins encoded by genes involved in chromosomal alterations in lymphoma and leukaemia: clinical value of their detection by immunocytochemistry. *Blood* 2002;99:409-26.
79. Capello D, Vitolo U, Pasqualucci L, Quattrone S, Migliaretti G, Fassone L, Ariatti C, Vivenza D, Gloghini A, Pastore C, Lanza C, Nomdedeu J, Botto B, Freilone R, Buonaiuto D, Zagonel V, Gallo E, Palestro G, Saglio G, Dalla-Favera R, Carbone A, Gaidano G. Distribution and pattern of BCL-6 mutations throughout the spectrum of B-cell neoplasia. *Blood* 2000;95:651-9.
80. Go JH, Yang WI, Ree HJ. Mutational analysis of the 5'noncoding region of the BCL-6 gene in primary gastric lymphomas. *Mod Pathol* 2001;14:410-4.
81. Artiga MJ, Saez AI, Romero C, Sanchez-Beato M, Mateo MS, Navas C, Mollejo M, Piris MA. A short mutational hot spot in the first exon of BCL-6 is associated with increased BCL-6 expression and with longer overall survival in large B-cell lymphomas. *Am J Pathol* 2002;160:1371-80.
82. Fang JM, Finn WG, Hussong JW, Goolsby CL, Cubbon AR, Variankojis D. CD 10 antigen expression correlates with the t(14;18)(q32;q21) major breakpoint region in diffuse large B-cell lymphoma. *Mod Pathol* 1999;12:295-300.
83. Allman D, Jain A, Dent A, Maile RR, Selvaggi T, Kehry MR, Staudt LM. Bcl-6 expression during B-cell activation. *Blood* 1996;87:5257-68.
84. Bai M et.al. *Mod Pathol* 2002
85. Staudt LM. Gene expression physiology and pathophysiology of the immune system. *Trends in Immunology* 2001 22(1):35-40
86. Ikeda K, Monden T, Kanoh T, Tsujie M, Isawa H, Haba A, Onishi T, Sekimoto M, Tomita N, Shiozaki H, Monden M. Extraction and analysis of diagnostically useful proteins from formalin-fixed paraffine-embedded sections. *Journal of Histochem. Cytochem.* 1998;46(3):397-403
87. Marti GE, Stetler-Stevenson M, Bleesing JJ, Fleisher TA. Introduction to flow cytometry. *Semin Hematol.* 2001 Apr;38(2):93-99
88. Bleesing JJ, Fleisher TA. Immunophenotyping. *Semin Hematol.* 2001 Apr;38(2)100-110



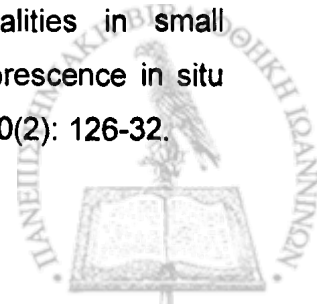
89. Stetler-Stevenson M, Braylan RC. Flow cytometric analysis of lymphomas and lymphoproliferative disorders. *Semin Hematol*. 2001 Apr;38(2):111-123
90. Bleesing JJ, Fleisher TA. Cell function-based flow cytometry. *Semin Hematol*. 2001 Apr;38(2):169-178
91. Darzynkiewicz Z, Bedner E, Smolewski P. Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis. *Semin Hematol*. 2001 Apr;38(2):179-193
92. Aguayo A, Estey E, Kantarjian H, Mansouri T, Gidel C, Keating M, Giles F, Estrov Z, Barlogie B, Albitar M (1999) Cellular vascular endothelial growth factor is a predictor of outcome in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 94:3717-3721
93. G Bairey O, Zimla Y, Shaklai M, Rabizadeh E (2001) Bcl-2 ex- pression correlates positively with serum basic fibroblast growth factor (bFGF) and negatively with cellular vascular en- dothelial growth factor (VEGF) in patients with chronic lym- phocytic leukemia. *Br J Haematol* 113 :400-406
94. Banks RE, Forbes MA, Kinsey SE, Stanley A, Ingham E, Walters C, Selby PJ (1998) Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: sig- nificance for VEGF measurements and cancer biology. *Br J Cancer* 77:956-964
95. Bellamy WT, Richter L, Frutiger Y, Grogan TM (1999) Ex- pression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hematopoietic malignancies. *Cancer Res* 59:728-733
96. Benjamin LE, Keshet E (1997) Conditional switching of vas- cular endothelial growth factor (VEGF) expression in tumors: induction of endothelial cell shedding and regression of hem- angioblastoma-like vessels by VEGF withdrawal. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:8761-8766
97. Bergers G, Javaherian K, Lo KM, Folkman J, Hanahan D (1999) Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carci- nogenesis in mice. *Science* 284:808-812
98. Bertolini F, Mancuso P, Gobbi A, Pruneri G (2000) The thin red line: angiogenesis in normal and malignant hematopoiesis. *Exp Hematol* 28:993-1000
99. Brooks PC (1996) Role of integrins in angiogenesis. *Eur J Cancer* 32A:2423-2429
100. Dankbar B, Padro T, Leo R, Feldmann B, Kropff M, Mesters RM, Serve H, Berdel WE, Kienast J (2000) Vascular endothe- lial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma. *Blood* 95:263G-2636
101. Di Raimondo F, Azzaro MP, Palumbo G, Bagnato S, Giustolisi G, Florida P, Sortino G, Giustolisi R (2000) Angiogenic fac- tors in multiple myeloma: higher levels in bone marrow than in peripheral blood. *Haematologica* 85:80G-805

102. Eberhard A, Kahlert S, Goede V, Hemmerlein B, Plate KH, Augustin HG (2000) Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer Res* 60:1388-1393
103. Folkman J (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285: 1182-1186
104. Folkman J (1995) Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 333:1757-1763
105. Th Foss RD, Araujo I, Demel G, Klotzbach H, Hummel M, Stein
106. J H (1997) Expression of vascular endothelial growth factor in lymphomas and Castleman disease. *J Pathol* 183:44--50
107. Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70
108. Kerbel RS, Vlloria-Petit A, Okada F, Rak J (1998) Establishing a link between oncogenes and tumor angiogenesis. *Mol Med* 4:286-295
109. Mangi MH, Newland A (2000) Angiogenesis and angiogenic mediators in haematological malignancies. *Br J Haematol* 111:43-51
110. Nakagawa M, Kaneda T, Arakawa T, Morita S, Sato T, Yomada T, Hanada K, Kumegawa M, Hakeda Y (2000) Vascular endothelial growth factor (VEGF) directly enhances osteoclastic bone resorption and survival of mature osteoclasts. *FEBS Lett* 473:161-164
111. Risau W (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386:671-674
112. Salven P, Anttonen K, Repo H, Joensuu H, Orpana A (2001) Endotoxin induce and interferon-alpha suppresses vascular endothelial growth factor (VEGF) production in human peripheral blood mononuclear cells. *FASEB* 115:1318-1320
113. Sezer O, Jakob C, Eucker J, Niemoller K, Gatz F, Wernecke K, Possinger K (2001) Serum levels of the angiogenic cytokines basic fibroblast growth factor (bFGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) and hepatocyte growth factor (HGF) in multiple myeloma. *Eur J Haematol* 66:83-88
114. Wartiovaara U, Salven P, Mikkola H, Lassila R, Kaukonen I, Loukov V, Orpana A, Ristimäki A, Heikinheimo M, Joensuu H, Alitalo K, Palotie A (1998) Peripheral blood platelets express VEGF-C and VEGF which are released during platelet activation. *Thromb Haemost* 80: 171-175
115. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge IS, Wiegand SJ, Holash J (2000) Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407:242-248



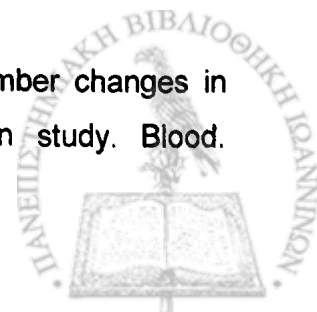
116. Kondo Y, et al. (2000) Implication of vascular endothelial growth factor and p53 status for angiogenesis in noninvasive colorectal carcinoma. *Cancer* ; 88(8): 1820-1827
117. O'Byrne KJ, et al. (2000) Vascular endothelial growth factor, platelet-derived endothelial cell growth and angiogenesis in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* ; 82(8): 1427-1434
118. Oshino S, et al. (2000) Clinical significance of angiogenesis, proliferation and apoptosis in renal cell carcinoma. *Anticancer Res*;20(1C):591-594
119. Matsushima H et al (1999). Correlation between proliferation, apoptosis and angiogenesis in prostate carcinoma. *Cancer*; 85, 1822-1828
120. Aotake et al (1999). Changes of angiogenesis and tumor cell apoptosis during colorectal carcinogenesis. *Clin Cancer Res*; 5,135-142
121. Belien et al (1999). Relationships between neovascularization and proliferation, in invasive breast cancer. *J Pathol*; 189,309-318
122. Ravi D et al (1998). Angiogenesis during tumor progression in th oral cavity is related to reduced apoptosis and high tumor cell proliferation. *Oral Oncol*; 34, 543-548
123. Volm M et al (1999). Inverse correlation between apoptotic (Fas ligand, caspase 3) and angiogenic factors (VEGF, microvessel density) in squamous cell lung carcinomas. *Anticancer Res* 19; 1669-1671
124. Arima J et al (2000). Expression of thymidine phosphorylase as an indicator of poor prognosis for patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer* ; 88(5): 1131-1134
125. Abdulkadir SA et al (2000). Tissue factor expression and angiogenesis in human prostate carcinoma. *Hum Pathol* 31, 443-447
126. Cowan JM (1994). Fishing for chromosomes. The art and its applications. *Diagn Mol Pathol* 3: 224-226.
127. Bentz M et al (1994). Fluorescence in situ hybridization in leukemias: 'The FISH are spawning'. *Leukemia*, 8, 1447-1452
128. Kluin PH, et al. FISH and related techinques in the diagnosis of lymphoma. *Cancer Surv.* 1997;30: 3-20. Review.
129. Siebert R, et al. Fluorescence in situ hybridization as a diagnostic tool in malignant lymphomas. *Histochem Cell Biol.* 1997 Oct-Nov; 108(4-5): 391-402. Review.
130. Glassman AB et al. Cytogenetics as an aid in the diagnosis of lymphomas *Ann Clin Lab Sci* 30; 72-74:2000

131. Wilkens L, et al. Analysis of hematologic diseases using conventional karyotyping, fluorescence in situ hybridization (FISH) and comparative genomic hybridization (CGH). *Hum Pathol*. 1998 Aug; 29(8): 833-9.
132. Juneau AI, et al. Detection of RB1 deletions by fluorescence in situ hybridization in malignant hematologic disorders. *Cancer Genet Cytogenet*. 1998 Jun;103(2): 117-23.
133. Clodi K, et al. Analysis of p53 gene deletions in patients with non-Hodgkin's lymphoma by dual-colour fluorescence in-situ hybridization. *Br J Haematol* 1997 Sep;98(4): 913-21.
134. Gatteland E, et al. c-MYC, RB-1, TP53, and centromere 8 and 17 copy number in B-cell non-Hodgkins' lymphomas assessed by dual-color fluorescence in situ hybridization. *Cytometry*. 1999 Apr 15;38(2): 53-60.
135. Cuneo A, et al. Acquired chromosome 11q deletion involving the ataxia teleangiectasia locus in B-cell non-Hodgkin's lymphoma: correlation with clinicobiologic features. *J Clin Oncol*. 2000 Jul; 18(13):2607-14.
136. Jackson A, et al. Deletion of 6q16-q21 in human lymphoid malignancies: a mapping and deletion analysis. *Cancer Res*. 2000 Jun 1;60(11):2775-9.
137. Bernell P, et al. Gain of chromosome 7, which marks the progression from indolent to aggressive follicle centre lymphomas, is restricted to the B-lymphoid cell lineage: a study by FISH in combination with morphology and immunocytochemistry. *Br J Haematol*. 1999 Jun; 105(4): 1140-4.
138. Arcaroli JJ, et al. Is a duplication of 14q32 a new recurrent chromosomal alteration in B-cell non-Hodgkin lymphoma? *Cancer Genet Cytogenet*. 1999 Aug;113(1):19-24.
139. Wada M, et al. Frequent chromosome arm 13q deletion in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia*. 1999 May; 13(5):792-8.
140. Preudhomme C, et al. Nonrandom 4p13 rearrangements of the RhoH/TTF gene, encoding a GTP-binding protein, in non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma. *Oncogene*. 2000 Apr 13;19(16):2023-32.
141. Barth TF, et al. Characteristic pattern of chromosomal gains and losses in primary large B-cell lymphomas of the gastrointestinal tract. *Blood*. 1998 Jun 1;91(11):4321-30.
142. Caraway NP, et al. Numeric chromosomal abnormalities in small lymphocytic and transformed large cell lymphomas detected by fluorescence in situ hybridization of fine-needle aspiration biopsies. *Cancer* 2000 Apr 25;90(2): 126-32.



143. Gilles F, et al. MUC1 dysregulation as the consequence of a t(1;14)(q21;q32) translocation in an extranodal lymphoma. *Blood*. 2000 May 1;95(9):2930-6.
144. Blanco R, et al. Trisomy 3 in gastric lymphomas of extranodal marginal zone B-cell (mucosa-associated lymphoid tissue) origin demonstrated by FISH in intact paraffin tissue sections. *Hum Pathol*. 1999 Jun;30(6): 706-11.
145. Dreyling et al. Codeletion of CDKN2 and MTAP genes in a subset of in non-Hodgkin's lymphoma may be associated with histologic transformation from low-grade to diffuse large cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 1998; 22; 72-78
146. Zhang y et al. Frequent deletions of 6q23-24 in B-cell non-Hodgkin's lymphoma detected by fluorescence in situ hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*. 1997; 18; 310-313
147. Dierlamm J et al. FISH identifies different types of duplications with 12q13-15 as the commonly involved segment in B-cell lymphoproliferative malignancies characterized by partial trisomy 12. *Genes Chromosomes Cancer*. 1997; 20; 155-166
148. Dave BJ, Nelson M, Pickering DL, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Sanger WG. Cytogenetic characterization of diffuse large cell lymphoma using multi-color fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet*. 2002 Jan 15;132(2):125-132
149. Peters K, Zetl A, Starostik P, Greiner A, Rosenwald A, Katzenberger T, Ott G, Muller-Hermelink HK. Genetic imbalances in primary gastric diffuse large B-cell lymphomas: comparison of comparative genomic hybridization, micrisatellite, and cytogenetic analysis. *Diagn Mol Pathol*. 2000 Mar;9(1):58-65
150. Cordell JL, Falini B, Erber WN, et al: Immunoenzymatic labelling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal antialkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 1984 32: 219-222
151. Lan HY, Mu W, Nikolic-Paterson DJ, et al: A novel, simple, reliable, and sensitive method for multiple immunoenzyme staining: use of microwave oven heating to block antibody cross-reactivity and retrieve antigens. *J Histochem Cytochem* 1995 43: 97-102
152. Bai M, Vlachonikolis J, Agnantis NJ, Tsanou E, Dimou S, Nicolaides C, Stefanaki S, Pavlidis N, Kanavaros P. Low expression of p27 protein combined with altered p53 and Rb/p16 expression status is associated with increased expression of cyclin A and cyclin B1 in diffuse large B-cell lymphomas. *Mod Pathol*. 2001 Nov;14(11):1105-13.

153. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Thorpe PE, Brekken RA, Sivridis E, Kakolyris S, Georgoulas V, Gatter KC, Harris AL. Vascular endothelial growth factor /KDR activated microvessel density versus CD31 standard microvessel density in non small cell lung cancer. *Cancer Res* 2000 Jun 1; 60(11):3088-95.
154. Barrans SL, O'Connor SJ, Evans PA, Davies FE, Owen RG, Haynes AP, Morgan GJ, Jack AS. Rearrangements of the BCL-6 locus at 3q27 is an independent poor prognostic factor in nodal diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2002 May;117(2):322-332
155. Davis RE, Brown KD, Siebenlist U, Staudt LM. Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp. Med*. 2001;194:1861-1874.
156. Huang JZ, Sanger WG, Greiner TC, Staudt LM, Weisenburger DD, Pickering DL, Lynch JZ, Armitage JO, Wamke RA, Alizadeh AA, Lossos IS, Levy R, Chan WC. The t(14;18) defines a unique subset of diffuse large B-cell lymphoma with a germinal center B-cell gene expression profile. *Blood* 2002;99:2285-2290
157. Jacobson JO, Wilkes BM, Kwiatkowski DJ, et al. bcl-2 rearrangements in de novo diffuse large cell lymphoma: association with distinctive clinical features. *Cancer*. 1993;72:231-236.
158. Weiss LM, Warnke RA, Sklar J, et al. Molecular analysis of the t(14;18) chromosomal translocation in malignant lymphomas. *N Engl J Med*. 1987;317:1185-1189.
159. Barrans SL, Carter I, Owen RG, et al. Germinal center phenotype and bcl-2 expression combined with the International Prognostic Index improves patient risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2002;99:1136-1143.
160. Colomo L, Lopez-Guillermo A, Perales M, et al. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2003;101:78-84.
161. Gascoyne RD, Adomat SA, Krajewski S, et al. Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1997;90:244-251.
162. Hermine O, Haioun C, Lepage E, et al. Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma: Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA). *Blood*. 1996;87:265-272.
163. Monni O, Joensuu H, Franssila K, et al. DNA copy number changes in diffuse large B-cell lymphoma—comparative genomic hybridization study. *Blood*. 1996;87:5269-5278



164. Monni O, Joensuu H, Franssila K, et al. BCL-2 overexpression associated with chromosomal amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 1997;90:1168–1174.
165. Huang JZ, Sanger WG, Greiner TC, et al. The t(14;18) defines a unique subset of diffuse large B-cell lymphoma with a germinal center B cell gene expression profile. *Blood*. 2002;99:2285–2290.
166. Iqbal J, Sanger WG, Horsman DE, et al. BCL-2 translocation defines a unique tumor subset within the germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Pathol*. 2004;165:159–166.
167. Clark RK, Damjanov J (1986) Immunoblotting of keratin polypeptides extracted from tissues preserved in standard histologic fixatives. *J Histochem Cytochem* 34:679–682
168. Conti CJ, Larcher F, Chesner J, Aldaz CM (1988) Polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting of proteins extracted from paraffin-embedded tissue sections. *J Histochem Cytochem* 36:547–550
169. Jiang P, Du W, Heese K, Wu M. The Bad guy cooperates with good cop p53: Bad is transcriptionally up-regulated by p53 and forms a Bad/p53 complex at the mitochondria to induce apoptosis. *Mol Cell Biol*. 2006 Dec;26(23):9071-82. Epub 2006 Sep 25.

