



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΕΚΕΤΑ
ΕΘΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ
ΕΡΕΥΝΑΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΗΣ
ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

ΕΘΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΒΙΟΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

Πτυχιακή Εργασία

Αλληλεπίδραση των B λεμφοκυττάρων με το μικροπεριβάλλον στο σπληνικό λέμφωμα οριακής ζώνης

Αντώνιος Μίγγος

Πατρώνυμο: Μίγγος Δημήτριος

Επιβλέπων: Κώστας Σταματόπουλος, Διευθυντής ΙΝΕΒ/ΕΚΕΤΑ

Συνεπιβλέπουσα: Κοντού Μαρία, Επίκουρος Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μέλος επιτροπής: Ζίφα Αιμιλία, Επίκουρος Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Θεσσαλονίκη 2021



UNIVERSITY OF THESSALY
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY & BIOTECHNOLOGY



ΕΚΕΤΑ
ΕΘΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ
ΕΡΕΥΝΑΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΗΣ
ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

CENTRE FOR RESEARCH AND TECHNOLOGY HELLAS
INSTITUTE OF APPLIED BIOSCIENCES

DIPLOMA THESIS

Interaction of B-lymphocytes with the microenvironment in Splenic Marginal Zone Lymphoma

Antonios Mingos

1st Supervisor: Kostas Stamatopoulos, Director of INAB/CERTH

2nd Supervisor: Maria Kontou, Assistant Professor, Department of Biochemistry & Biotechnology, University of Thessaly

Committee member: Zifa Aimilia, Assistant Professor, Department of Biochemistry & Biotechnology, University of Thessaly

Thessaloniki 2021

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	8
1.1.1 Γενικά στοιχεία	8
1.1.2 Έμφυτη ανοσία	9
1.1.3 Προσαρμοστική ανοσία	9
1.2 Β ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ	10
1.2.1 Γενικά στοιχεία	10
1.2.2 Οντογένεση των Β λεμφοκυττάρων	11
1.2.3 Διαφοροποίηση ανεξάρτητη από το αντιγόνο	13
1.2.4 Διαφοροποίηση εξαρτώμενη από το αντιγόνο	14
1.2.5 Σηματοδότηση μέσω του Β κυτταρικού υποδοχέα	15
1.3 ΠΡΩΤΟΓΕΝΗ ΚΑΙ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΗ ΛΕΜΦΙΚΑ ΟΡΓΑΝΑ	17
1.3.1 Γενικά.....	17
1.3.2 Πρωτογενή Λεμφικά Όργανα.....	17
1.3.3 Δευτερογενή Λεμφικά Όργανα	18
1.3.4 Δευτερογενή λεμφικά όργανα – Σπλήνας	18
1.3.5 Οριακή Ζώνη	19
1.4 ΤΥΠΟΙ Β ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ	20
1.4.1 Γενικά.....	20
1.4.2 Θυλακιοειδή Β κύτταρα (Follicular B cells).....	20
1.4.3 Β1 κύτταρα.....	21
1.4.4 Β λεμφοκύτταρα οριακής ζώνης του σπλήνα.....	21
1.5 ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ ΟΡΙΑΚΗΣ ΖΩΝΗΣ	22
1.5.1 Γενικά.....	22
1.5.2 Εξωλεμφαδενικό Λέμφωμα Οριακής Ζώνης (Extranodal Marginal Zone Lymphoma)	22
1.5.3 Λεμφαδενικό Λέμφωμα Οριακής Ζώνης (Nodal Marginal Zone Lymphoma)	23
1.5.4 Σπληνικό Λέμφωμα Οριακής Ζώνης.....	23
1.5.4.1 Γενικά	23
1.5.4.2 Κλινική εικόνα, Διάγνωση και Θεραπεία ΣΛΟΖ.....	24
1.6 ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΣΛΟΖ	24
1.6.1 Ανοσοφαινότυπος.....	24
1.6.2 Ανοσογενετικές μελέτες	25
1.6.3 Κυτταρογενετικές και Χρωμοσωμικές ανωμαλίες.....	25
1.6.4 Γονιδιακές Μεταλλάξεις.....	26
1.7 ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ	27
1.7.1 Γενικά.....	27
1.7.2 Μεθυλίωση DNA	28
1.7.3 Τροποποιήσεις ιστονών	28
1.8 Η EZH2 ΩΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ	29
1.8.1 Η EZH2 και το κατασταλατικό σύμπλοκο Polycomb 2	29
1.8.2 Ο ρόλος της EZH2 στον καρκίνο	30
2. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	33
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	34
3.1 ΟΜΑΔΑ ΑΣΘΕΝΩΝ	34
3.2 ΑΡΝΗΤΙΚΗ ΕΠΙΛΟΓΗ CD19⁺ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	34
3.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA	36
3.4 ΣΥΝΘΕΣΗ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA	37
3.4.1 Ποιοτικός έλεγχος του cDNA	38
3.4.2 Ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου EZH2 με real time PCR	40

3.4.3	Ανάλυση αποτελεσμάτων με τη μέθοδο ΔCt.....	42
3.5	ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ.....	42
3.6	ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	43
3.7	ΑΝΟΣΟΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ– WESTERN BLOT.....	44
3.8	ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ.....	49
3.8.1	Μέτρηση έκφρασης φωσφοπρωτεϊνών.....	50
3.8.2	Μέτρηση έκφρασης Ki-67/EZH2.....	50
3.8.3	Μέτρηση έκφρασης H3K27me3.....	51
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	53
4.1	Η EZH2 εκφράζεται ετερογενώς στα Β κύτταρα του ΣΛΟΖ.....	53
4.2	Τα κύτταρα του ΣΛΟΖ με ικανότητα πολλαπλασιασμού εκφράζουν EZH2.....	56
4.3	Τα κύτταρα του ΣΛΟΖ ανταποκρίνονται στα ερεθίσματα του μικροπεριβάλλοντος.....	57
4.4	Η διάκριση σε EZH2 ^{high} και EZH2 ^{low} περιπτώσεις αναδεικνύει παρόμοια πρότυπα απαντήσεων στις διεγέρσεις μέσω ΒΚΥ ή/και TLR9.....	58
4.5	Η διέγερση του TLR9 και η συν-διέγερση ΒΚΥ/TLR9 επάγουν την έκφραση της EZH2 στο ΣΛΟΖ.....	61
4.6	Ο ΒΚΥ ενεργοποιείται από τα συγγενή αντιγόνα ακτίνη και μυοσίνη στο ΣΛΟΖ.....	62
4.7	Η έκφραση της EZH2 ρυθμίζεται από τη διέγερση με τα αντιγόνα ακτίνη και μυοσίνη στο ΣΛΟΖ.....	64
5.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	65
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	68

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών (INEB) του Εθνικού Κέντρου Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης (ΕΚΕΤΑ). Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κώστα Σταματόπουλο, Διευθυντή του Ινστιτούτου, για την τιμή και την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω την εργασία μου στο Ινστιτούτο, όπως και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλο αυτό το διάστημα.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην κ. Μαρία Κοντού, Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας και συνεπιβλέπουσα της εργασίας, και στην κ. Αιμιλία Ζίφα, Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας και μέλος της τριμελούς επιτροπής, για την τιμή που μου έκαναν να είναι μέλη της τριμελούς επιτροπής της πτυχιακής εργασίας μου.

Στη συνέχεια, δεν μπορώ παρά να ευχαριστήσω την κ. Μαρίνα Γερούση, υποψήφια διδάκτωρ, για τον πολύτιμο χρόνο, τις συμβουλές, τις παρατηρήσεις και την υπομονή της. Η εμπιστοσύνη που μου έδειξε και η βοήθεια της, από την αρχή μέχρι το τέλος, ήταν καθοριστικής σημασίας για την ολοκλήρωση της εργασίας.

Κατά τη διάρκεια της εργασίας, συνεργάστηκα με πολλά στελέχη του εργαστηρίου: τους ευχαριστώ τόσο για τη γνώση και την εμπειρία που μου μετέδωσαν, όσο και για την προθυμία τους να βοηθήσουν πάντοτε.

Τέλος, ευχαριστώ τους φίλους μου για την αγάπη και την στήριξη τους όλο αυτό το διάστημα, μα το μεγαλύτερο ευχαριστώ ανήκει στην οικογένεια μου, η οποία με την αγάπη και την στήριξη της, μου παρείχε και με το παραπάνω όλα τα εφόδια για να καταφέρω να ολοκληρώσω τις σπουδές μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το Σπληνικό Λέμφωμα Οριακής Ζώνης (ΣΛΟΖ) είναι σπάνιο μη-Hodgkin B λέμφωμα και συνήθως εκδηλώνεται σε άτομα μεγάλης ηλικίας. Παρότι αρκετές έρευνες έχουν αναδείξει πλήθος χρωμοσωμικών ανωμαλιών και γονιδιακών μεταλλάξεων όπως επίσης και αλληλεπιδράσεις μεταξύ των νεοπλασματικών λεμφοκυττάρων και του μικροπεριβάλλοντός τους που πιθανόν σχετίζονται με την παθογένεση της νόσου, οι σχετικοί μοριακοί μηχανισμοί δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως. Επιπλέον, απορρύθμιση των επιγενετικών τροποποιήσεων έχει συσχετιστεί με διάφορους καρκίνους, συμπεριλαμβανομένου του ΣΛΟΖ. Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, η παρούσα εργασία έχει ως σκοπό την ανάδειξη του ρόλου της μεθυλοτρανσφεράσης EZH2 στην ανάπτυξη του ΣΛΟΖ. Η EZH2 ευθύνεται για την τριμεθυλίωση της λυσίνης 27 στην ιστόνη 3 και η απορρύθμισή της έχει συσχετιστεί με τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων. Με πειράματα Real-time PCR και κυτταρομετρία ροής, πραγματοποιήθηκε ανάλυση έκφρασης της EZH2 σε ασθενείς με ΣΛΟΖ, οι οποίοι στη συνέχεια, διαχωρίστηκαν σε υποσύνολα ανάλογα με τα επίπεδα έκφρασής της. Η έκφραση της EZH2 συσχετίστηκε και με την ικανότητα πολλαπλασιασμού των B λεμφοκυττάρων, μέσω του δείκτη Ki-67. Έπειτα, πραγματοποιήθηκαν διεγέρσεις του BKY ή/και του TLR9 και ανάλυση της επαγόμενης έκφρασης των pERK και pNF-κB, αλλά και της EZH2, με πειράματα Western blot και κυτταρομετρίας ροής, προκειμένου να αξιολογηθεί η απόκριση των ΣΛΟΖ B λεμφοκυττάρων σε εξωγενή ερεθίσματα και η δυνατότητα ρύθμισης της EZH2 από τη λειτουργία των σχετικών σηματοδοτικών οδών. Τέλος, με τη μέθοδο Western Blot μελετήθηκε η ικανότητα των φυσικών αυτοαντιγόνων ακτίνη και μυοσίνη να ενεργοποιούν τον BKY και να επηρεάζουν την έκφραση της EZH2. Συνολικά, από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων, προέκυψε πως η EZH2 εκφράζεται ετερογενώς στις διαφορετικές περιπτώσεις ΣΛΟΖ, ενώ αυξημένα επίπεδα έκφρασης συσχετίζονται με έντονη πολλαπλασιαστική ικανότητα των νεοπλασματικών B λεμφοκυττάρων. Η διέγερση του BKY ή/και του TLR9, έδειξε πως η φωσφορυλίωση της ERK ακολουθεί αυξητική τάση και ο pNF-κB παρουσιάζει διαφορετικά πρότυπα έκφρασης σε κάθε κατάσταση, ενώ παρατηρήθηκε και επαγωγή της έκφρασης της EZH2. Τέλος, η διέγερση με τα αυτοαντιγόνα προκάλεσε ενεργοποίηση του BKY αλλά και ρύθμιση των επιπέδων έκφρασης της EZH2.

ABSTRACT

Splenic Marginal Zone Lymphoma (SMZL) is a rare B non-Hodgkin lymphoma, affecting mainly the elderly. Despite evidence for the presence of recurrent genomic aberrations and interactions between the malignant lymphocytes and their microenvironment, the molecular pathogenesis of SMZL is not yet fully understood. Moreover, as in many other types of cancer, deregulation of epigenetic alterations appears to be relevant also for SMZL. Considering the above, the aim of this study is to obtain novel insight into the role of the EZH2 methyltransferase in SMZL. EZH2 is an epigenetic regulator, catalyzing the trimethylation of lysine 27 on histone 3, whose deregulation of EZH2 has been associated with the proliferation and migration of tumor cells. By using quantitative Real-time PCR and flow cytometry, we analyzed EZH2 expression in SMZL patients and divided them into two subgroups, according to EZH2 expression levels. EZH2 expression was also correlated with the proliferation capacity of B lymphocytes as assessed by measurement of the Ki-67 marker. Next, we activated the malignant cells through stimulating the B cell receptor (BcR) and/or the TLR9 and, then, examined the expression of pERK, pNF- κ B and EZH2, by using Western blot and flow cytometry, in order to evaluate the response of SMZL B lymphocytes to extrinsic signals and the possible modulation of EZH2. Moreover, by using Western Blot, we studied the ability of the natural autoantibodies actin and myosin to activate the BcR and affect EZH2 expression. We found that EZH2 expression varies among different SMZL cases, while enzyme upregulation correlates with B cell proliferation. BcR and/or TLR stimulation upregulated ERK phosphorylation, while pNF- κ B was affected, albeit in a differential fashion, and EZH2 expression was induced. Finally, autoantigen stimulation induced BcR activation and up-regulation of EZH2 expression levels.

1.Εισαγωγή

1.1 Ανοσοποιητικό Σύστημα

1.1.1 Γενικά στοιχεία

Το ανοσοποιητικό σύστημα αποτελεί την άμυνα του ανθρώπινου οργανισμού απέναντι σε μια ευρεία ποικιλία μικροοργανισμών, δυνητικά μολυσματικών, που επιφέρουν την πρόκληση νόσου. Η εξέλιξη και η προσαρμοστικότητά του, συντελούν στην προστασία του ατόμου μέσω της παραγωγής κυττάρων και μορίων ικανών να αναγνωρίσουν και να εξουδετερώσουν παθογόνα, διεργασία που αναφέρεται ως άνοση απόκριση.

Κάθε ξένος εισβολέας έρχεται αντιμέτωπος με την πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού, τους ανατομικούς (δέρμα, βλεννογόνοι, κροσσωτό επιθήλιο της αναπνευστικής οδού) και τους βιοχημικούς φραγμούς (γαλακτικό οξύ, γαστρικό υγρό, σίελος). Όσοι τελικά εισέλθουν στον ξενιστή, μπορούν να προκαλέσουν λοιμώξεις, που θα αντιμετωπιστούν από το ανοσοποιητικό σύστημα ¹.

Πρωταρχική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος είναι η αναγνώριση των παθογόνων μικροοργανισμών και η έγκαιρη δράση του με σκοπό την εξουδετέρωσή τους. Οι άνοσες απαντήσεις μπορούν να διακριθούν σε δυο κατηγορίες, την έμφυτη και την προσαρμοστική άνοση. Η έμφυτη άνοση περιλαμβάνει τους αρχικούς μηχανισμούς άμυνας που στοχεύουν στην παρεμπόδιση και εξάλειψη της μόλυνσης, ενώ η προσαρμοστική άνοση είναι ειδική γραμμή άμυνας, υπεύθυνη για την απόκριση έναντι του εισβολέα αλλά και για την απομνημόνευσή του. Η διέγερση τόσο της έμφυτης όσο και της προσαρμοστικής άνοσης πυροδοτείται από τη δράση των λευκών αιμοσφαιρίων ή λευκοκυττάρων.

Τα λευκοκύτταρα είναι μια ομάδα κυτταρικών πληθυσμών που προέρχονται από τα πολυδύναμα ή αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα που βρίσκονται στο μυελό των οστών. Η ορθή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος προϋποθέτει τις συντονισμένες ενέργειες των κυτταρικών πληθυσμών των λευκοκυττάρων που περιλαμβάνουν τα λεμφοκύτταρα (B

και T λεμφοκύτταρα, φυσικά κύτταρα φονείς), τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα, B λεμφοκύτταρα) και τα εκτελεστικά κύτταρα (μακροφάγα, κοκκιοκύτταρα, T λεμφοκύτταρα). Η διαφοροποίηση των πολυδύναμων αιμοποιητικών κυττάρων στους συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους απαιτεί την παρουσία αναπτυξιακών παραγόντων (π.χ. κυτταροκίνες) και την έκφραση των κατάλληλων γονιδίων, η οποία συντονίζεται από μια ομάδα μεταγραφικών παραγόντων ¹.

1.1.2 Έμφυτη ανοσία

Η έμφυτη ανοσία είναι μη ειδική άνοση απάντηση με απώτερο σκοπό την αντιμετώπιση των παθογόνων τόσο σε αρχικά στάδια, μέσω της αποτροπής τους να εισέλθουν στον οργανισμό (δέρμα, βλεννογόνοι), όσο και μετά την είσοδο τους, με την ενεργοποίηση κατάλληλων μηχανισμών.

Τα μακροφάγα και τα κοκκιοκύτταρα αποτελούν τύπους φαγοκυττάρων του ανθρώπινου οργανισμού και έχουν πρωτεύοντα ρόλο στην έμφυτη ανοσία. Οι λειτουργίες τους βασίζονται στην έκφραση μη ειδικών υποδοχέων, κατάλληλων για την αναγνώριση συντηρημένων δομικών μοτίβων στην επιφάνεια παθογόνων που αποσκοπεί στην διέγερση των δράσεων εξουδετέρωσης τους ^{2,3}. Οι συντηρημένες δομές αναφέρονται ως μοριακά πρότυπα σχετιζόμενα με παθογόνα (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMP), με κυριότερα το λιποσακχαρίτη του κυτταρικού τοιχώματος (LPS) των Gram αρνητικών βακτηρίων, τις πεπτιδογλυκάνες, τα τειχοϊκά οξέα σε Gram θετικά βακτήρια και το βακτηριακό DNA. Αντίστοιχα, οι μη ειδικοί υποδοχείς των φαγοκυττάρων καλούνται υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων (Pattern Recognition Receptors, PRR) και στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι Toll-like υποδοχείς, το CD14 στην επιφάνεια των μονοκυττάρων και ο υποδοχέας της μαννόζης ^{4,5}.

1.1.3 Προσαρμοστική ανοσία

Η προσαρμοστική ανοσία, με τη δράση κυττάρων μεγάλης ειδικότητας (B και T λεμφοκύτταρα) παρουσιάζει ιδιαίτερη ικανότητα στην αναγνώριση και εξάλειψη ξένων μικροοργανισμών. Οι προσαρμοστικές άνοσες αποκρίσεις ε διαθέτουν τα εξής χαρακτηριστικά:

- Αντιγονική ειδικότητα (διάκριση λεπτών διαφορών μεταξύ αντιγόνων)
- Ποικιλομορφία (ευρεία παραγωγή μορίων προς αναγνώριση μοναδικών διαφορετικών δομών σε ξένα αντιγόνα)
- Άνοση μνήμη (δυνατότητα για μεγάλης διάρκειας ανοσία σε επόμενη επαφή με το ίδιο αντιγόνο)
- Αναγνώριση εαυτού/μη εαυτού (αναγνώριση και απόκριση μόνο σε μη εαυτά μόρια)

Οι άνοσες αποκρίσεις της προσαρμοστικής ανοσίας υποδιαιρούνται σε χυμικές και κυτταρικές. Η χυμική ανοσία περιλαμβάνει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των Β κυττάρων σε πλασματοκύτταρα, αφού έχει προηγηθεί η αλληλεπίδραση με το αντιγόνο. Ακολουθεί η παραγωγή αντισωμάτων, κύρια συστατικά της χυμικής απόκρισης, τα οποία δεσμεύονται στο αντιγόνο και προάγουν την καταστροφή του. Αναφορικά με την κυτταρική ανοσία, υπεύθυνα είναι τα δραστικά Τ κύτταρα (Τ βοηθητικά κύτταρα, κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα) που παράγονται ως αποτέλεσμα απάντησης σε αντιγόνο. Πιο συγκεκριμένα, τα Τ βοηθητικά κύτταρα εκκρίνουν κυτταροκίνες προκαλώντας την ενεργοποίηση φαγοκυττάρων, τα οποία εξουδετερώνουν τους μικροοργανισμούς. Ο ρόλος των κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων είναι πιο περίπλοκος, καθώς συμμετέχουν στις χυμικές απαντήσεις εξάλειψης εαυτών κυττάρων που έχουν υποστεί τροποποίηση, κυττάρων μολυσμένων από ιό και καρκινικών κυττάρων ¹.

1.2B Λεμφοκύτταρα

1.2.1 Γενικά στοιχεία

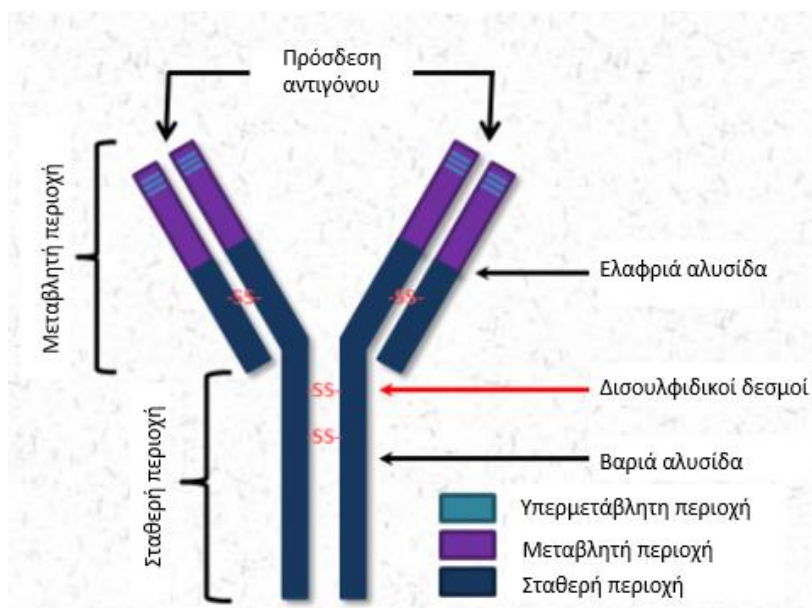
Τα Β λεμφοκύτταρα είναι βασική ομάδα κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Η παραγωγή και τα πρώιμα στάδια ανάπτυξης τους συμβαίνουν στο μυελό των οστών, ενώ στην περιφέρεια ακολουθούν οι αντιγονο-εξαρτώμενες διεργασίες της ενεργοποίησης και της διαφοροποίησής τους. Κάθε παρθένο Β λεμφοκύτταρο που εισέρχεται στην κυκλοφορία, χαρακτηρίζεται από έναν ειδικό αντιγονικό υποδοχέα. Ακολουθεί πρόσδεση του αντιγόνου

στον υποδοχέα, γεγονός που προκαλεί τον πολλαπλασιασμό των Β λεμφοκυττάρων και τη δημιουργία κυτταρικών κλώνων που εκκρίνουν αντισώματα ειδικά για το αντιγόνο ¹.

1.2.2 Οντογένεση των Β λεμφοκυττάρων

Η αναγνώριση ενός ανοσογόνου από τα αντισώματα στην επιφάνεια των Β κυττάρων προκαλεί τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση τους σε πλασματοκύτταρα ή Β κύτταρα μνήμης. Τα πλασματοκύτταρα είναι υπεύθυνα για την έκκριση των ανοσοσφαιρινών, διαλυτών μορίων εξειδικευμένων για το αντιγόνο.

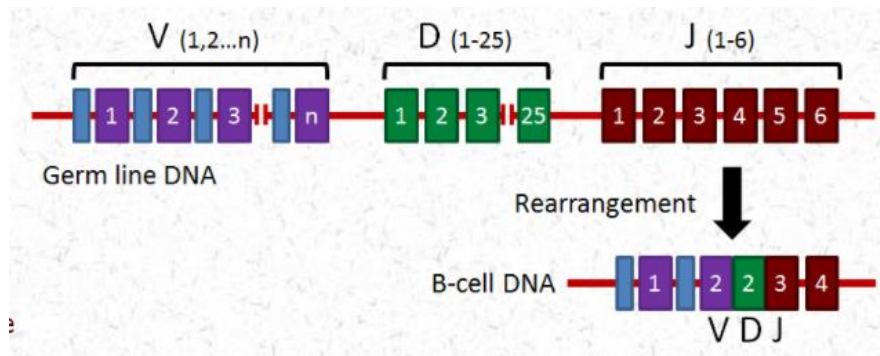
Οι ανοσοσφαιρίνες εμπλέκονται στην αναγνώριση και σύνδεση με το αντιγόνο, ενώ, στη συνέχεια, μέσω της διέγερσης διαφόρων μηχανισμών, συμβάλλουν στην αντιμετώπισή του. Οι ανοσοσφαιρίνες ή αντισώματα ανήκουν στην ομάδα γλυκοπρωτεϊνών του πλάσματος. Δομούνται από τέσσερις πεπτιδικές αλυσίδες, δυο πανομοιότυπες ελαφριές L και δυο πανομοιότυπες βαριές H. Οι δυο βαριές αλυσίδες συνδέονται μεταξύ τους μέσω δισουλφυδρυλικών δεσμών όπως και η κάθε βαριά συνδέεται με την ελαφριά αλυσίδα με έναν δισουλφυδρυλικό δεσμό (Εικόνα 1). Κάθε ελαφριά αλυσίδα μπορεί να είναι είτε κ είτε λ, με την κάθε ανοσοσφαιρίνη να έχει μόνο έναν τύπο ελαφριάς αλυσίδας. Τα είδη των βαριών αλυσίδων (μ, γ, δ, ε, α) είναι υπεύθυνα για τη διάκριση των ανοσοσφαιρινών σε ισότυπους (IgM, IgG, IgD, IgE, IgA) ⁶.



Εικόνα 1. Δομή ανοσοσφαιρίνης - Τροποποιημένη εικόνα από τον ιστότοπο myplace.frontier.com.

Το τελικό μόριο της ανοσοσφαιρίνης προκύπτει από ανασυνδυασμό των γονιδίων της ελαφριάς και της βαριάς αλυσίδας. Στους γενετικούς τόπους των ελαφριών αλυσίδων διακρίνονται τέσσερις ομάδες γονιδίων: L (Leader: Οδηγό), V (Variable: Μεταβλητό), J (Junctional: Συνδετικό) και C (Constant: Σταθερό). Στο γενετικό τόπο της βαριάς αλυσίδας συναντάται μια πρόσθετη ομάδα γονιδίων D (Diversity: Ποικιλότητα) που παρεμβάλλεται μεταξύ των ομάδων V και J. Με την κατάλληλη επιλογή ενός γονιδίου από κάθε υποομάδα προκύπτει η μεταβλητή περιοχή της βαριάς αλυσίδας. Η ανοσοσφαιρίνη συναρμολογείται με την ένωση της ελαφριάς με τη βαριά αλυσίδα ^{1,7}.

Η μεταβλητή περιοχή των ελαφριών αλυσίδων σχηματίζεται από την αναδιάταξη των γονιδίων V και J, ενώ η σταθερή περιοχή της αλυσίδας κωδικοποιείται από τα γονίδια C. Αντίστοιχα, η μεταβλητή περιοχή των βαριών αλυσίδων σχηματίζεται από την αναδιάταξη γονιδίων V, D και J (Εικόνα 2). Κατά τη διαδικασία της αναδιάταξης, πρώτα ένα γονίδιο D αναδιατάσσεται μ' ένα γονίδιο J και στη συνέχεια πραγματοποιείται η αναδιάταξη του συμπλόκου D-J μ' ένα γονίδιο V. Πρωτεύοντα ρόλο στην αναδιάταξη των γονιδίων παίζουν οι πρωτεΐνες RAG1 και RAG2, που δρουν ως ετεροδιμερές σύμπλοκο. Η μικρή αλληλουχία-οδηγός (L) πριν από κάθε γονίδιο V κατευθύνει τις συντιθέμενες βαριές και ελαφριές αλυσίδες στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η αλληλουχία αυτή αφαιρείται από την αλυσίδα κατά την τελική επεξεργασία.



Εικόνα 2. Παράδειγμα ανασυνδυασμού των γονιδίων V, D και J της βαριάς αλυσίδας – Τροποποιημένη εικόνα από τον ιστότοπο myplace.frontier.com.

Στο αμινοτελικό άκρο μιας ελαφριάς ή βαριάς αλυσίδας παρατηρείται μεγάλη ποικιλομορφία σε μια περιοχή της αμινοξικής αλληλουχίας που είναι γνωστή ως μεταβλητή περιοχή (Variable Region) και εμπλέκεται στην ειδική αναγνώριση του αντιγόνου. Στο καρβοξυτελικό άκρο εντοπίζονται αμινοξικά τμήματα με σταθερή αλληλουχία που καλούνται σταθερές περιοχές (Constant Region), οι οποίες εμπλέκονται σε εκτελεστικές λειτουργίες ^{1,8}.

Μόλις εκφραστεί αντιγονικός υποδοχέας στην επιφάνεια του Β λεμφοκυττάρου, παύουν οι περαιτέρω ανασυνδυασμοί. Η οντογενετική πορεία μέχρι την έξοδο στην κυκλοφορία παρθένων Β λεμφοκυττάρων που εκφράζουν λειτουργικούς υποδοχείς στην επιφάνεια τους καλείται φάση διαφοροποίησης ανεξάρτητη από το αντιγόνο.

1.2.3 Διαφοροποίηση ανεξάρτητη από το αντιγόνο

Η διαφοροποίηση και ωρίμανση των πολυδύναμων αιμοποιητικών κυττάρων σε Β λεμφοκύτταρα συντελείται σε πολλά στάδια στο μυελό των οστών. Σημαντικό ρόλο στον αρχικό πολλαπλασιασμό των πολυδύναμων αιμοποιητικών κυττάρων έχουν τα στρωματικά κύτταρα, τα οποία προωθούν τα κατάλληλα σήματα για τη σωστή ανάπτυξη των κυττάρων.

Αρχικά, από τα πολυδύναμα αιμοποιητικά κύτταρα προκύπτουν τα πολυδύναμα προγονικά κύτταρα, από τα οποία θα προέλθουν όλα τα κύτταρα του αίματος. Με τη διαφοροποίηση των πολυδύναμων προγονικών κυττάρων μπορούν να προκύψουν ο κοινός πρόγονος της μυελικής σειράς, ο πρώιμος λεμφοειδής πρόγονος και ο κοινός πρόγονος των λεμφοκυττάρων, υπεύθυνος για την διαφοροποίηση σε Β ή Τ λεμφοκύτταρα ή κύτταρα φυσικούς φονείς. Από τον πρόγονο των λεμφοκυττάρων προέρχονται τα πρώιμα προ Β

λεμφοκύτταρα, στάδιο κατά το οποίο συμβαίνει η πρώτη γονιδιακή αναδιάταξη με τη βοήθεια ρεκομπινασών, και ακολουθεί η μετατροπή σε όψιμο προ Β λεμφοκύτταρο. Τα προ Β κύτταρα που δεν επιτυγχάνουν λειτουργικό ανασυνδυασμό των γονιδίων V(D)J οδηγούνται σε απόπτωση. Αντίθετα, όσα προ Β κύτταρα παρουσιάσουν παραγωγική αναδιάταξη περνούν στο στάδιο του μεγάλου προ Β λεμφοκυττάρου, το οποίο εκφράζει στην επιφάνειά του το δείκτη CD19. Έπειτα, τα μεγάλα προ Β λεμφοκύτταρα εκφράζουν τον προ Β υποδοχέα και διαφοροποιούνται σε μικρά προ Β λεμφοκύτταρα, μέσω διαδικασίας θετικής επιλογής. Με το τέλος των παραγωγικών γονιδιακών αναδιατάξεων σε βαριά και ελαφριά αλυσίδα, αυτές συνδέονται και σχηματίζουν τον αντιγονοειδικό Β κυτταρικό υποδοχέα. Τα κύτταρα που εκφράζουν Β κυτταρικούς υποδοχείς αναφέρονται ως ανώριμα Β λεμφοκύτταρα ⁹. Δεν έχει διευκρινιστεί αν ο μηχανισμός με τον οποίο τα Β κύτταρα αντιλαμβάνονται την παρουσία ενός σωστά δομημένου Β κυτταρικού υποδοχέα απαιτεί την παρουσία κάποιου προσδέτη ή όχι ⁷.

Τα ανώριμα Β λεμφοκύτταρα πριν εξέλθουν από τον μυελό των οστών, υπόκεινται σε έλεγχο αυτό-ανοχής. Ο σχηματισμένος Β κυτταρικός υποδοχέας κάποιων κυττάρων ενδέχεται να αναγνωρίζει ως αντιγόνα, μόρια του ίδιου του οργανισμού (αυτοαντιγόνα), συνεπώς καθίσταται απαραίτητη για τα συγκεκριμένα κύτταρα είτε η διορθωτική τροποποίηση του υποδοχέα είτε η αδρανοποίηση και σε μερικές περιπτώσεις η απόπτωση των αυτοαντιδραστικών ανώριμων Β λεμφοκυττάρων ¹⁰.

1.2.4 Διαφοροποίηση εξαρτώμενη από το αντιγόνο

Τα ώριμα Β λεμφοκύτταρα είναι έτοιμα να εγκαταλείψουν το μυελό των οστών και να μεταναστεύσουν, μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, στα δευτερογενή λεμφικά όργανα. Σε αυτή τη φάση, τα Β λεμφοκύτταρα έχουν την δυνατότητα να συνδεθούν με αντιγόνα, οπότε πυροδοτείται η ενεργοποίηση και ο πολλαπλασιασμός τους σε ειδικές δομές, τα βλαστικά κέντρα, όπου αλληλεπιδρούν με τα Τ κύτταρα και τα δενδριτικά κύτταρα. Τα βλαστικά κέντρα αποτελούν το εξειδικευμένο μικροπεριβάλλον στο οποίο προάγεται ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση των Β λεμφοκυττάρων. Η επιλογή των Β λεμφοκυττάρων από αντιγόνο οδηγεί στην έξοδο από το βλαστικό κέντρο και στη διαφοροποίησή τους σε κύτταρα μνήμης ή πλασματοκύτταρα. Σε περίπτωση που τα Β κύτταρα δεν έρθουν σε επαφή με αντιγόνο αποπίπτουν ^{1,7}.

Στο βλαστικό κέντρο συμβαίνουν δύο πολύ σημαντικές διεργασίες για την ωρίμανση των Β κυττάρων: σωματική υπερμεταλλαξιγένεση και εναλλαγή ισοτύπου.

Η επιβίωση ενός Β λεμφοκυττάρου καθορίζεται από το σωστό ανασυνδυασμό των γονιδιακών τμημάτων της βαριάς και της ελαφριάς αλυσίδας και των προϊόντων τους. Μολονότι κάθε κύτταρο έχει στο γονιδίωμα του δυο αλληλόμορφα γονίδια για το γενετικό τόπο της βαριάς αλυσίδας και τέσσερα αλληλόμορφα για τους γενετικούς τόπους των ελαφριών αλυσίδων, κάθε Β λεμφοκύτταρο εκφράζει μόνο μια λειτουργική βαριά και μια ελαφριά αλυσίδα. Αυτό οφείλεται στο φαινόμενο του αποκλεισμού αλληλομόρφου, διαδικασία κατά την οποία όταν το κύτταρο αντιληφθεί το λειτουργικό ανασυνδυασμό ενός αλληλομόρφου και την παραγωγή προϊόντος ενός γενετικού τόπου προάγει την αναστολή του ανασυνδυασμού στο άλλο αλληλόμορφο.

Η διαδικασία του ανασυνδυασμού κατά την ωρίμανση ξεκινά από τα αλληλόμορφα της βαριάς αλυσίδας, όπου προαπαιτείται λειτουργική αναδιάταξη προκειμένου να ακολουθήσει ο ανασυνδυασμός των γενετικών τόπων των ελαφριών αλυσίδων. Σε περίπτωση μη λειτουργικού ανασυνδυασμού, γίνεται προσπάθεια αναδιάταξης του άλλου γενετικού τόπου. Η αποτυχία στην προσπάθεια συγκρότησης λειτουργικών ανασυνδυασμών σε ένα από τα αλληλόμορφα οδηγεί το Β κύτταρο σε απόπτωση¹¹.

1.2.5 Σηματοδότηση μέσω του Β κυτταρικού υποδοχέα

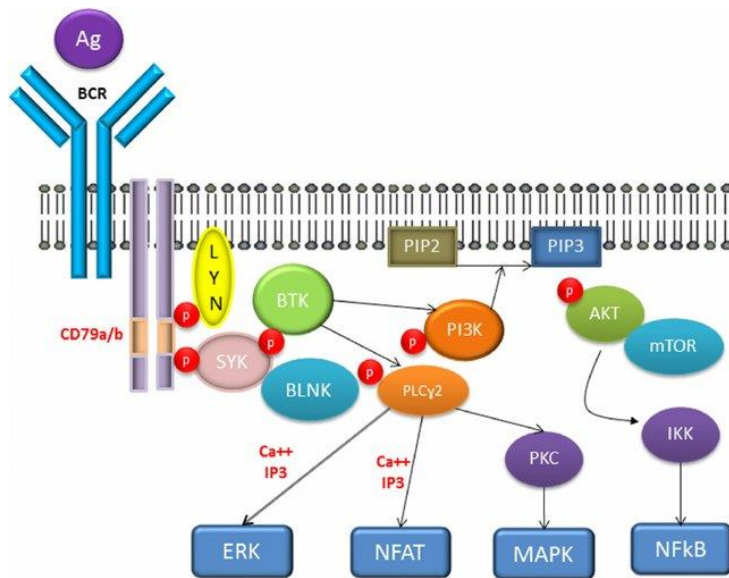
Καθοριστικό βήμα για την πλήρη λειτουργικότητα του Β κυτταρικού υποδοχέα (ΒΚΥ) στη σηματοδότηση αποτελεί η σύνδεση των βαριών αλυσίδων της ανοσοσφαιρίνης με τα μόρια επιφανείας Igα (CD79a) Igβ (CD79b), τα οποία διαθέτουν μια αλληλουχία ενεργοποίησης των ανοσοϋποδοχέων (immunereceptor tyrosine-based activation motif, ITAM). Η πρόσδεση του αντιγόνου στο λειτουργικό ΒΚΥ οδηγεί σε φωσφορυλίωση των ITAM από μέλη της ομάδας κινασών Src, με αποτέλεσμα να ενεργοποιηθεί η πρωτεϊνική κινάση Syk, είτε μέσω φωσφορυλίωσης από κινάσες της οικογένειας Src είτε με αυτο-φωσφορυλίωση.

Ακολουθεί καταρράκτης αντιδράσεων διακυττάριας σηματοδότησης (Εικόνα 3), κατά τον οποίο η Syk έχει μεταδώσει το αρχικό σήμα μέσω της φωσφορυλίωσης καθοδικών μορίων. Το μονοπάτι σηματοδότησης έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της 3-κινάσης της φωσφατίδυλοϊνοσιτόλης (phosphatidylinositol 3-kinase-PI3K) και της φωσφολιπάσης Cγ2 (phospholipase Cγ2 - PLCγ2)¹².

Η PI3K προάγει την διέγερση του μονοπατιού PI3K/Akt, υπεύθυνο για την έκφραση αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως οι Mcl-1 (myeloid cell leukemia-1) και XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein), και την καταστολή της δράσης προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως η BAD (Bcl2 antagonist of cell death) και οι κασπάσες ¹³.

Η PLC γ 2 προωθεί την απελευθέρωση Ca²⁺ στο εσωτερικό του κυττάρου και την παραγωγή μορίων διακυλογλυκερόλης (DAG), απαραίτητων για την σηματοδοτική ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC). Έπειτα συμβαίνει η ενεργοποίηση των MAP κινάσων (MAPKs - mitogen-activated protein kinases) και της ERK (extracellular signal-regulated kinase), οι οποίες επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων με ρύθμιση της δράσης των μεταγραφικών παραγόντων ^{12,14}.

Ένας καθοριστικός παράγοντας για την επιβίωση των B λεμφοκυττάρων είναι ο NF- κ B, ο οποίος διεγείρει την έκφραση αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών. Η ενεργοποίηση του NF- κ B εξασφαλίζει την παραγωγή και την επιβίωση των B λεμφοκυττάρων ¹⁵.



Εικόνα 3. Μονοπάτια που εμπλέκονται στην κυτταρική σηματοδότηση μέσω του BCR – Τροποποιημένη εικόνα από Chavez, J. C., Sahakian, E., & Pinilla-Ibarz, J. (2013). Ibrutinib: an evidence-based review of its potential in the treatment of advanced chronic lymphocytic leukemia. Core evidence, 8, 37–45.

1.3 Πρωτογενή και Δευτερογενή Λεμφικά Όργανα

1.3.1 Γενικά

Πλήθος οργάνων και ιστών, με σαφή μορφολογική και λειτουργική διάκριση, εξυπηρετούν διάφορες λειτουργίες για την ανάπτυξη άνοσων απαντήσεων. Αυτά τα όργανα διακρίνονται σε πρωτογενή και δευτερογενή λεμφικά όργανα, με βάση τις λειτουργίες που επιτελούν. Στα πρωτογενή λεμφικά όργανα συγκαταλέγονται ο θύμος αδένας και ο μυελός των οστών, στα οποία επιτελείται η ωρίμανση των λεμφοκυττάρων. Στην κατηγορία των δευτερογενών λεμφικών οργάνων ανήκουν οι λεμφαδένες, οι λεμφικοί ιστοί των βλεννογόνων και ο σπλήνας. Κύριος ρόλος τους είναι η επαφή των λεμφοκυττάρων με το αντιγόνο και η παραγωγή κυτταρικών κλώνων με σκοπό την εξουδετέρωση του ¹.

1.3.2 Πρωτογενή Λεμφικά Όργανα

Ο θύμος αδένας είναι ένα δίλοβο όργανο, με τον κάθε λοβό να διαιρείται σε μικρότερα λοβίδια. Τα λοβίδια περιβάλλονται εξωτερικά από το φλοιό, περιοχή που συναντώνται πυκνοί πληθυσμοί ανώριμων T κυττάρων, γνωστά ως θυμοκύτταρα, ωστόσο εσωτερικά ο μυελός διαθέτει μικρό αριθμό θυμοκυττάρων. Τόσο στο φλοιό όσο και στο μυελό των λοβιδίων περιέχονται οργανωμένα δίκτυα στρωματικών κυττάρων που αποτελούνται από επιθηλιακά κύτταρα, δενδριτικά κύτταρα και μακροφάγα που συντελούν στην ομαλή ανάπτυξη και ωρίμανση των θυμοκυττάρων.

Στο μυελό των οστών βρίσκεται το κέντρο αιμοποίησης του ανθρώπινου οργανισμού, εκεί όπου συμβαίνει η παραγωγή των αιμοποιητικών κυττάρων. Το εσωτερικό του οργανώνεται ως ένα δίκτυο που αποτελείται από ινίδια, αγγεία και κύτταρα, το οποίο αναφέρεται ως στρώμα και περιλαμβάνει τις θέσεις αιμοποίησης των κυττάρων, απ' όπου τα πολυδύναμα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα ξεκινούν τη διαφοροποίηση προς διάφορους τύπους κυττάρων. Τα B κύτταρα αντιπροσωπεύουν έναν από τους κυτταρικούς πληθυσμούς που προέρχονται από το μυελό των οστών, ο οποίος τους παρέχει τα κατάλληλα εφόδια για την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και την ωρίμανση τους ¹.

1.3.3 Δευτερογενή Λεμφικά Όργανα

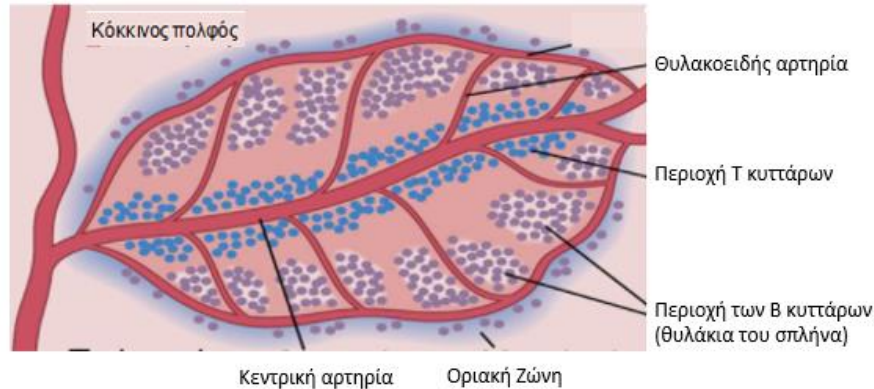
Στα δευτερογενή λεμφικά όργανα κατατάσσονται οι λεμφαδένες, οι λεμφικοί ιστοί των βλεννογόνων και ο σπλήνας, με το κάθε όργανο να επιμερίζεται διαφορετικούς και σημαντικούς ρόλους.

Οι λεμφαδένες είναι όργανα, μικρά σε μέγεθος, που συμμετέχουν ως θέσεις σύγκλισης σε ένα αγγειακό δίκτυο που συλλέγει το εξωκυττάριο υγρό (λέμφος) από τους ιστούς επαναφέροντας το στην κυκλοφορία. Στους λεμφαδένες συμπεριλαμβάνονται περιοχές συνάθροισης Β και Τ λεμφοκυττάρων, όπως τα λεμφοζίδια, ενώ έχουν την ικανότητα να παγιδεύουν στο εξωκυττάριο υγρό και αντιγόνα που έχουν εισβάλλει στον οργανισμό.

Στους λεμφικούς ιστούς των βλεννογόνων κατατάσσονται οι αμυγδαλές, η σκληροκοειδής απόφυση, οι αδενοειδής εκβλαστήσεις και οι πλάκες του Peyer (στο βλεννογόνο του λεπτού εντέρου). Εκεί συγκεντρώνονται αντιγόνα από το επιθήλιο των βλεννογόνων τα οποία έρχονται σε επαφή με πληθυσμούς κυρίως Β λεμφοκυττάρων, που βρίσκονται στην περιοχή ¹.

1.3.4 Δευτερογενή λεμφικά όργανα – Σπλήνας

Ο σπλήνας κατατάσσεται στα δευτερογενή λεμφικά όργανα και είναι οργανωμένος σε περιοχές που περιλαμβάνουν ενεργοποιημένα Β και Τ κύτταρα περιβαλλόμενα από ινώδη κάψα. Ανατομικά, εντοπίζεται στο αριστερό υποχόνδριο και έχει πρωτεύοντα ρόλο στην συλλογή αντιγόνων του αίματος και στην καταστροφή των γερασμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων. Η εσωτερική δομή του αποτελείται από δυο διαμερίσματα, τον ερυθρό και το λευκό πολφό, τα οποία διαχωρίζει η οριακή ζώνη (Εικόνα 4). Ο κυτταρικός πληθυσμός του ερυθρού πολφού συνίσταται κυρίως από μακροφάγα και ερυθροκύτταρα, τα οποία επιτελούν τη διαδικασία απομάκρυνσης γερασμένων και ελαττωματικών ερυθροκυττάρων. Ο λευκός πολφός περιβάλλει τα αρτηρίδια του οργάνου, περιφερικά των οποίων συναντώνται πληθυσμοί Τ λεμφοκυττάρων στην περιοχή της περιφερικής λεμφικής θήκης, ενώ ομάδες Β λεμφοκυττάρων συνυπάρχουν πλαγίως αυτής. Η βασική διαφορά στη λειτουργία μεταξύ σπλήνα και λεμφαδένων, παρότι μοιάζουν δομικά, έγκειται στο γεγονός ότι στον σπλήνα η συλλογή αντιγόνων γίνεται από το αίμα και όχι από τη λέμφο, όπως στους λεμφαδένες ¹.



Εικόνα 4. Απεικόνιση της μορφολογίας του σπλήνα - Τροποποιημένη εικόνα των Drs Katheryn Pape and Jeniffer Walter, University of Minnesota, School of Medicine, Minneapolis, Minnesota.

1.3.5 Οριακή Ζώνη

Στον άνθρωπο, η οριακή ζώνη συνιστά τμήμα του σπλήνα και τοποθετείται στο εξωτερικό όριο του λευκού πολφού, ως μια λειτουργικά και ανατομικά διακριτή περιοχή. Ο σχηματισμός της δε συμβαίνει νωρίτερα από 1-2 χρόνια μετά τη γέννηση, με τον πληθυσμό των Β λεμφοκυττάρων οριακής ζώνης να παρουσιάζεται αργότερα, μετά τα πρώτα δυο έτη. Αποτελείται από κολπίσκους, οι οποίοι περιβάλλονται από θυλάκια Β κυττάρων και περιοχές πλούσιες σε Τ λεμφοκύτταρα, όπως το περιαρτηριακό λεμφικό κάλυμμα. Δίπλα στο ενδοθήλιο της οριακής ζώνης εντοπίζονται μεταλλόφιλα μακροφάγα τα οποία συνδράμουν τόσο στην άνοση απόκριση όσο και στην αντιγονοπαρουσιαστική διαδικασία. Ανάμεσα σε αυτές τις οργανωμένες στοιβάδες μακροφάγων παρεμβάλλονται δενδριτικά κύτταρα, των οποίων η λειτουργία είναι η δέσμευση, μεταφορά και παρουσίαση των αντιγόνων του περιεχομένου της σπληνικής αρτηρίας στα Β και Τ κύτταρα ¹⁶. Επιπλέον, τα μεταλλόφιλα μακροφάγα συνεισφέρουν στη διατήρηση του μικροπεριβάλλοντος των Β κυττάρων της οριακής ζώνης, ενώ τα δενδριτικά κύτταρα αποτελούν πηγές παραγόντων επιβίωσης και μορίων κυτταρικής σηματοδότησης ¹⁷. Τα Β λεμφοκύτταρα της οριακής ζώνης εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια καθώς συναντώνται πληθυσμοί Β λεμφοκυττάρων που έχουν περάσει από το βλαστικό κέντρο, με μεταλλαγμένους Β κυτταρικούς υποδοχείς και φαινότυπο κυττάρων μνήμης, καθώς και Β λεμφοκύτταρα με μεταλλαγμένους Β κυτταρικούς υποδοχείς και φαινότυπο που παραπέμπει σε προέλευσή τους από την οριακή ζώνη ¹⁸.

Το φαινόμενο της ετερογένειας στους πληθυσμούς των Β λεμφοκυττάρων της οριακής ζώνης εξυπηρετεί τους σημαντικούς ρόλους που παίζει αυτή η περιοχή στην άμυνα του οργανισμού. Κυριότερο παράδειγμα αποτελεί το γεγονός πως η οριακή ζώνη αποτελεί το πρώτο κυτταρικό διαμέρισμα του σπλήνα που έρχεται σε επαφή με τα αντιγόνα της κυκλοφορίας του αίματος, με κύριο στόχο την εξουδετέρωση τους. Ο στόχος επιτυγχάνεται τόσο με την παρουσία Β λεμφοκυτταρικών πληθυσμών με χαμηλή αντιγονική συγγένεια για άμεση άνοση απάντηση όσο και αντιγονοειδικών Β λεμφοκυττάρων για δραστικότερη απόκριση¹⁸.

1.4 Τύποι Β λεμφοκυττάρων

1.4.1 Γενικά

Τα Β λεμφοκύτταρα διακρίνονται σε τρεις τύπους: θυλακιοειδή Β κύτταρα (Follicular B cells), Β-1 κύτταρα και Β λεμφοκύτταρα οριακής ζώνης (MZ cells). Η διάκριση γίνεται με βάση την περιοχή όπου εντοπίζονται, την ικανότητά τους να μεταναστεύουν και το αν η δράση τους χαρακτηρίζεται ως εξαρτημένη ή μη από τα Τ κύτταρα¹⁹.

1.4.2 Θυλακιοειδή Β κύτταρα (Follicular B cells)

Τα θυλακιοειδή Β κύτταρα συμμετέχουν στις θυμοεξαρτώμενες ανοσιακές αποκρίσεις. Η κυκλοφορία τους περιορίζεται στις θυλακιοειδείς περιοχές των λεμφαδένων, του σπλήνα και των λεμφικών ιστών των βλεννογόνων, όπου αναγνωρίζουν αντιγόνα και τα παρουσιάζουν στα Τ λεμφοκύτταρα²⁰.

1.4.3 B1 κύτταρα

Τα B1 κύτταρα αποτελούν περίπου το 1% των CD19⁺ B κυττάρων, ποσοστό το οποίο είναι αντιστρόφως ανάλογο με την ηλικία. Επιπλέον, έχει ταυτοποιηθεί η μειωμένη ικανότητα των B1 κυττάρων να εκκρίνουν αντισώματα με την πάροδο της ηλικίας, γεγονός το οποίο πιθανόν σχετίζεται με την ευπάθεια των ηλικιωμένων σε βακτηριακές λοιμώξεις²¹. Η ύπαρξή τους στον άνθρωπο είναι αμφιλεγόμενη.

1.4.4 B λεμφοκύτταρα οριακής ζώνης του σπλήνα

Τα B λεμφοκύτταρα οριακής ζώνης του σπλήνα θεωρούνται τα μεγαλύτερα σε μέγεθος από τα κύτταρα της οριακής ζώνης και έχουν φαινότυπο IgM^{high}IgD^{low}CD23⁻CD21⁺CD1c⁻. Η συγκεκριμένη ομάδα κυττάρων συναντάται σε μεγάλο ποσοστό στην οριακή ζώνη του σπλήνα, συμβάλλοντας σε σημαντικές λειτουργίες της που αφορούν κυρίως στην άμυνα του οργανισμού. Ειδικότερα, τα B λεμφοκύτταρα οριακής ζώνης συμμετέχουν στην προστασία έναντι παθογόνων μικροοργανισμών που μεταφέρονται στο σπλήνα μέσω της κυκλοφορίας του αίματος αλλά και σε άνοσες αποκρίσεις εναντίον αντιγόνων τύπου TI-2, όπως οι πολυσακχαρίτες της επιφάνειας των βακτηριακών καψιδίων^{22,23}.

Τα B λεμφοκύτταρα της οριακής ζώνης μετά την αναγνώριση του αντιγόνου, διαφοροποιούνται άμεσα προς πλασματοκύτταρα, τα οποία εκκρίνουν αντισώματα IgM σε υψηλές ποσότητες. Ανατομικά και λόγω της θέσης τους, τα κύτταρα αυτά φαίνεται πως είναι ικανά να αναγνωρίζουν ένα μεγάλο φάσμα αντιγόνων και να διεγείρουν έγκαιρα την προσπάθεια εξουδετέρωσής τους. Οι κύριες ιδιότητες των B λεμφοκυττάρων της οριακής ζώνης είναι η δυνατότητα αντιγονικής αναγνώρισης και σύνδεσης με μικρότερη συγγένεια πρόσδεσης και επιπλέον, η αντίδραση τους ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις αντιγόνων²⁰.

Η διαφοροποίηση των B κυττάρων και η ένταξη τους στον πληθυσμό της οριακής ζώνης έχει αποδειχθεί πως ελέγχεται από πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια, π.χ. σηματοδότηση μέσω Notch. Πιο συγκεκριμένα, ο υποδοχέας Notch2 φέρεται ως σημαντικός παράγοντας στη διακυττάρια επικοινωνία, τόσο ώστε χαμηλή έκφραση του να προκαλεί προβλήματα στη διαφοροποίηση των B κυττάρων οριακής ζώνης, ενώ σε έλλειψη του, η διαφοροποίηση αναστέλλεται πλήρως²⁴.

1.5 Λεμφώματα οριακής ζώνης

1.5.1 Γενικά

Τα λεμφώματα αντιπροσωπεύουν πάνω από το 3% των περιστατικών καρκίνου και αφορούν σε ένα σύνολο κακοηθειών που προέρχονται από λεμφοκύτταρα. Διακρίνονται σε λεμφώματα Hodgkin (Hodgkin Lymphomas) και μη Hodgkin λεμφώματα (non-Hodgkin Lymphomas). Αιτία για τα περισσότερα Β μη Hodgkin λεμφώματα αποτελούν ανωμαλίες κατά τη διαφοροποίηση των Β λεμφοκυττάρων, που τα μετατρέπουν σε καρκινικά. Η πιθανότητα εμφάνισης τους αυξάνεται με την ηλικία και παρουσιάζονται συχνότερα σε άνδρες σε σχέση με τις γυναίκες. Γενικότερα, θεωρείται πως υπάρχουν παθολογικές καταστάσεις που ευνοούν την εμφάνιση μη Hodgkin λεμφωμάτων σε άτομα με ανοσοανεπάρκεια ή ανοσοκαταστολή π.χ. από ιογενείς λοιμώξεις, όπως ο ιός HIV ²⁵.

Τα λεμφώματα οριακής ζώνης (ΛΟΖ) (Marginal Zone Lymphomas, MZL) είναι μια κατηγορία λεμφωμάτων τα οποία διακρίνονται σε 3 υποτύπους ²⁶:

- 1) Εξωλεμφαδενικό λέμφωμα οριακής ζώνης, ΕΛΟΖ (Extranodal Marginal Zone Lymphoma, EMZL)
- 2) Λεμφαδενικό λέμφωμα οριακής ζώνης, ΛΛΟΖ (Nodal Marginal Zone Lymphoma, NMZL)
- 3) Σπληνικό Λέμφωμα οριακής ζώνης, ΣΛΟΖ (Splenic Marginal Zone Lymphoma, SMZL)

1.5.2 Εξωλεμφαδενικό Λέμφωμα Οριακής Ζώνης (Extranodal Marginal Zone Lymphoma)

Το ΕΛΟΖ αναπτύσσεται σε όργανα απ' όπου συνήθως απουσιάζει λεμφοειδής ιστός (π.χ. στομάχι, πνεύμονας) αλλά έχουν συσσωρευθεί Β κύτταρα σε απάντηση χρόνιων μολύνσεων ή αυτοάνοσων αποκρίσεων. Η μακροχρόνια διέγερση των Β κυττάρων από μικροβιακά στελέχη έχει συνδεθεί με την εμφάνιση του νοσήματος. Ορισμένα σχετιζόμενα μικρόβια που έχουν ταυτοποιηθεί είναι τα *Helicobacter pylori* (Hρ), *Helicobacter heilmannii*, ιός ηπατίτιδας C, *Campylobacter jejuni*, *Borrelia burgdorferi* και *Chlamydia psittaci*. Πιο συγκεκριμένα, το 90% των περιπτώσεων γαστρικού ΕΛΟΖ συσχετίζεται με χρόνια μόλυνση από *Helicobacter pylori* (Hρ). Επίσης, γενετικές ανωμαλίες και γονιδιακές μεταλλάξεις έχουν καθοριστικό ρόλο

στην εξέλιξη ΕΛΟΖ καθώς επηρεάζουν την έκφραση πολλών σημαντικών γονιδίων που σχετίζονται με βασικές κυτταρικές διεργασίες όπως η σηματοδότηση του ΒΚΥ και η απόπτωση. Η μετάθεση t(11;18)(q21;q21) αποτελεί την πιο συχνή χρωμοσωμική ανωμαλία²⁷.

1.5.3 Λεμφαδενικό Λέμφωμα Οριακής Ζώνης (Nodal Marginal Zone Lymphoma)

Το ΛΟΖ προέρχεται από Β κύτταρα της οριακής ζώνης παρόλο που δεν έχουν διασαφηνιστεί πλήρως τα κριτήρια ως προς τη διάγνωση του. Πολλές έρευνες έχουν συσχετίσει κάποιες χρωμοσωμικές ανωμαλίες που εντοπίζονται στο χρωμόσωμα 3 και γονιδιακές μεταλλάξεις που επηρεάζουν την σηματοδότηση μέσω NOTCH2 με την ανάπτυξη ΛΟΖ. Πάραυτα δεν αποτελούν κριτήρια για διάγνωση, καθώς φαίνεται πως παρουσιάζονται και σε περιπτώσεις άλλων λεμφωμάτων²⁸.

1.5.4 Σπληνικό Λέμφωμα Οριακής Ζώνης

1.5.4.1 Γενικά

Το Σπληνικό Λέμφωμα Οριακής Ζώνης (ΣΛΟΖ) θεωρείται από τα σπάνια είδη λεμφωμάτων και αντιπροσωπεύει μόλις το 1-2% όλων των λεμφικών κακοηθειών. Αναφέρεται ως νόσος των ηλικιωμένων, καθώς στην πλειονότητά τους οι ασθενείς έχουν ηλικία πάνω από 50 έτη, με διάμεση ηλικία διάγνωσης τα 65 έτη. Το ΣΛΟΖ παρουσιάζει αργή εξέλιξη με διάμεση επιβίωση από 8 μέχρι 13 έτη, ανάλογα τα συμπτώματα του κάθε ασθενούς και το χρόνο διάγνωσης από την εκδήλωση του. Ωστόσο, περίπου στο 10% των ασθενών, η νόσος παρουσιάζει μεταμόρφωση σε διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β λεμφοκύτταρα, εξέλιξη που συνοδεύεται από κλινική επιδείνωση και σύντομη επιβίωση²⁹.

1.5.4.2 Κλινική εικόνα, Διάγνωση και Θεραπεία ΣΛΟΖ

Το ΣΛΟΖ χαρακτηρίζεται κλινικά από σπληνομεγαλία και λεμφοκυττάρωση. Σε κάποιες περιπτώσεις, συνυπάρχει αναιμία ή/και θρομβοπενία, ενώ ενδέχεται να συνοδεύεται και από παραπρωτεϊναιμία ή/και αυτοάνοσες διαταραχές, π.χ. αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία.

Παλαιότερα, η διάγνωση του ΣΛΟΖ βασιζόταν αποκλειστικά σε ευρήματα ιστοπαθολογικής εξέτασης του βιοπτικού υλικού από σπληνεκτομή, που αποτελούσε τον ενδεδειγμένο τρόπο θεραπείας. Πλέον, η διάγνωση γίνεται με συνεκτίμηση των δεδομένων που προκύπτουν από την εξέταση της μορφολογίας των λεμφοκυττάρων, τον ανοσοφαινότυπο, την ιστοπαθολογία του μυελού των οστών και την ανίχνευση κυτταρογενετικών ανωμαλιών. Υπάρχει και δυνατότητα διαφορικής διάγνωσης, καθώς έχουν ταυτοποιηθεί ανοσοφαινοτυπικοί και γενετικοί δείκτες, που μπορείν να συνεισφέρουν στην διάγνωση του ΣΛΟΖ με συνεκτίμηση και των υπόλοιπων κλινικών δεδομένων^{30,31}.

Οι θεραπευτικές προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση του ΣΛΟΖ διαφέρουν ανά ασθενή, ανάλογα το στάδιο της νόσου και τα κλινικά ευρήματα. Σε ασθενείς που δεν έχουν εκδηλώσει συμπτώματα ακολουθείται μια στρατηγική αναμονής και παρακολούθησης της νόσου. Αντίθετα, οι συμπτωματικοί ασθενείς ακολουθούν διαφορετικές θεραπευτικές οδούς, συνυπολογίζοντας δεδομένα όπως η ηλικία, το ιατρικό ιστορικό και η συνύπαρξη άλλων παθολογικών καταστάσεων εκτός του ΣΛΟΖ. Οι κυριότερες θεραπευτικές στρατηγικές που έχουν καταγραφεί είναι οι εξής: η σπληνεκτομή, η οποία ήταν πιο σύνηθης θεραπευτική προσέγγιση παλαιότερα, και η χημειοθεραπεία συνδυαζόμενη ή μη με rituximab, μονοκλωνικό αντίσωμα που στοχεύει τον υποδοχέα CD20 στην επιφάνεια των Β κυττάρων του κλώνου. Τέλος, σε ασθενείς που έχουν προσβληθεί από ιογενείς λοιμώξεις όπως ο ιός της ηπατίτιδας, η θεραπεία περιλαμβάνει και αντικά^{30,31}.

1.6 Βιολογία του ΣΛΟΖ

1.6.1 Ανοσοφαινότυπος

Τα κύτταρα που συμμετέχουν στο ΣΛΟΖ παρουσιάζουν ανοσοφαινότυπο ώριμου Β λεμφοκυττάρου που ως έναν βαθμό αντιστοιχεί σε φυσιολογικά κύτταρα της οριακής ζώνης του σπλήνα. Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα κύτταρα εκφράζουν IgM και IgD και είναι

θετικά σε πολλούς δείκτες Β λεμφοκυττάρων όπως ο CD19, CD20, CD22, CD79β και ο FMC7. Αντίθετα, φαίνεται πως δεν εκφράζουν τους δείκτες CD5, CD10, CD43 και CD23, ενώ μόλις το 5% των κυττάρων βρίσκεται θετικό για τον δείκτη του ρυθμού κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67. Τα παραπάνω ανοσοφαινοτυπικά στοιχεία συμβάλλουν στη διαφορική διάγνωση του ΣΛΟΖ από άλλους τύπους λεμφωμάτων^{29,32}.

1.6.2 Ανοσογενετικές μελέτες

Μελέτες στον τομέα της ανοσογενετικής έχουν προσπαθήσει να αναδείξουν τις αιτίες παθογένεσης διαφόρων νόσων, μεταξύ άλλων και του ΣΛΟΖ. Το συμπέρασμα αυτών των μελετών ήταν ότι η ανάπτυξη του ΣΛΟΖ συσχετίζεται με μια διαδικασία επιλογής από αντιγόνο. Ειδικότερα, φαίνεται να υπάρχει επιλογή κάποιων συγκεκριμένων γονιδίων τόσο της βαριάς όσο και της ελαφριάς αλυσίδας ανοσοσφαιρινών.

Συγκεκριμένα, οι ερευνητικές μελέτες έχουν εστιάσει στο γονίδιο IGHV1-2*04 της βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών, το οποίο δείχνει να επιλέγεται σε πολλές περιπτώσεις ΣΛΟΖ και να ανασυνδυάζεται με συγκεκριμένα γονίδια IGHD (IGHD3-3, IGH3-9 ή IGH3-10 στο 60% των περιπτώσεων) και ελαφριών αλυσίδων (IGKV3-20, IGKV1-8, IGLV2-14, σε ποσοστό 80% των περιπτώσεων). Συνεπώς, γίνεται κατανοητό πως για την ανάπτυξη του ΣΛΟΖ χρησιμοποιείται ένα συγκεκριμένο ρεπερτόριο γονιδίων για τη σύνθεση των βαριών και των ελαφριών αλυσίδων των ανοσοσφαιρινών, το οποίο φαίνεται να αντιστοιχεί στην αναγνώριση συγκεκριμένων αντιγονικών επιτόπων^{33,34}.

1.6.3 Κυτταρογενετικές και Χρωμοσωμικές ανωμαλίες

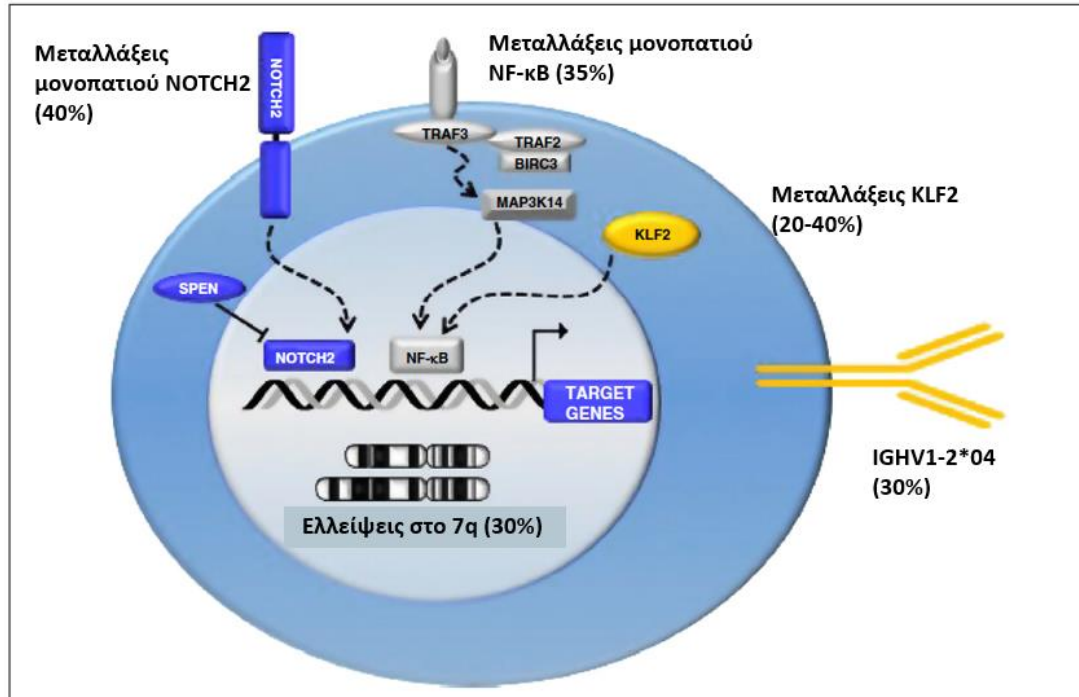
Κυτταρογενετικές ανωμαλίες ανιχνεύονται σε ποσοστό 80% των περιπτώσεων ΣΛΟΖ, χωρίς όμως να υπάρχει κάποια συγκεκριμένη, ειδική ανωμαλία. Σε πολλές περιπτώσεις έχουν αναφερθεί τρισωμία στο χρωμόσωμα 3, διαγραφές στις χρωμοσωμικές περιοχές 7q και 17p και μεταθέσεις στο γενετικό τόπο των ανοσοσφαιρινών, ενώ επίσης αναφέρονται προσθήκες στις χρωμοσωμικές περιοχές 5q, 12q, 20q και 9q. Η συχνότερη κυτταρογενετική ανωμαλία είναι η έλλειψη στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 7, που συνδέεται με απορρύθμιση

της έκφρασης της πρωτεΐνης cdk6, η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σωστή λειτουργία του κυτταρικού κύκλου. Συμπερασματικά, η ανάπτυξη του ΣΛΟΖ δεν μπορεί να αποδοθεί στην εμπλοκή μόνο μιας γονιδιακής περιοχής ή ενός γονιδίου και προϋποθέτει την ταυτόχρονη απώλεια δράσης πολλών γονιδίων ^{29,35}.

1.6.4 Γονιδιακές Μεταλλάξεις

Το ΣΛΟΖ συνδέεται με συγκεκριμένες σωματικές μεταλλάξεις σε γονίδια που έχουν ενεργό ρόλο σε διαδικασίες όπως ο πολλαπλασιασμός, η ανάπτυξη και η διαφοροποίηση των Β κυττάρων οριακής ζώνης, όπως έχει αποδειχθεί, από αναλύσεις με τεχνικές αλληλούχησης νέας γενιάς (New Generation Sequencing). Η απορρύθμιση των γονιδίων, στις περισσότερες περιπτώσεις που μελετήθηκαν, αφορά στα σηματοδοτικά μονοπάτια NOTCH και NF-κB, στην αναδιάταξη της χρωματίνης και στην οργάνωση του κυτταροσκελετού (Εικόνα 5). Μεταλλάξεις στον NOTCH2 υποδοχέα έχουν παρατηρηθεί στο 25% των περιπτώσεων ενώ έχουν εντοπιστεί και μεταλλάξεις σε γονίδια που συσχετίζονται με την σηματοδότηση μέσω Β κυτταρικού υποδοχέα (CARD11) και Toll-like υποδοχέων (MYD88) ^{32,36,37}.

Οι Toll-like υποδοχείς (TLR) συμβάλλουν καθοριστικά στις άνοσες αποκρίσεις του οργανισμού έναντι βακτηρίων, μυκήτων και ιών. Έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν τα Β λεμφοκύτταρα και να ρυθμίζουν διεργασίες όπως η ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων και η έκκριση κυτταροκινών που προσελκύουν τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα. Οι TLR εκφράζονται στα Β λεμφοκύτταρα και παίζουν ρόλο στην ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών των MAP κινασών και του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB. Διπλή ενεργοποίηση Β κυτταρικού υποδοχέα και TLR προκαλεί μετανάστευση των κυττάρων της οριακής ζώνης και παραγωγή αντισωμάτων. Στο ΣΛΟΖ, φαίνεται πως η ενεργοποίηση του TLR συνεισφέρει αισθητά στην ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων ^{38,39}.



Εικόνα 5, Μεταλλάξεις σε γονίδια και μονοπάτια που εμφανίζονται σε περιπτώσεις ΣΛΟΖ με μεγάλη συχνότητα – Τροποποιημένη εικόνα από Arcaini L, Rossi D, Paulli M. Splenic marginal zone lymphoma: from genetics to management. Blood. 2016;127(17):2072-2081.

1.7 Επιγενετικές Τροποποιήσεις

1.7.1 Γενικά

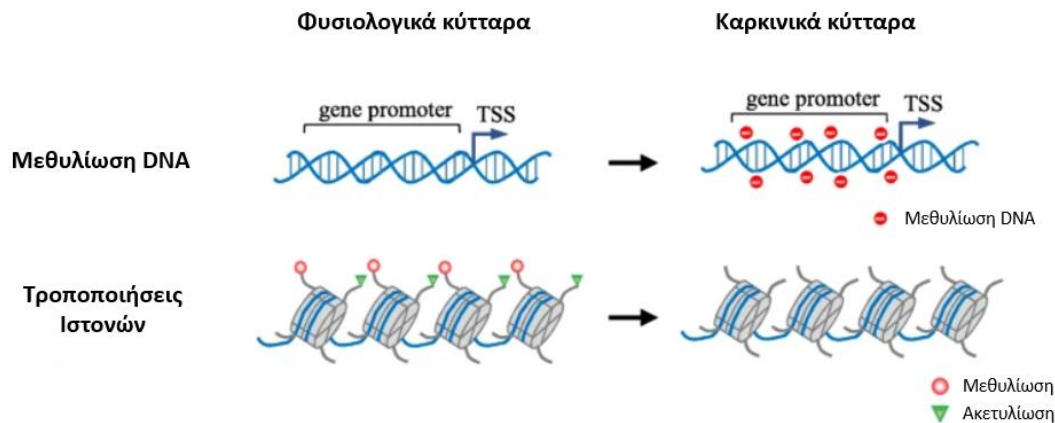
Ο κλάδος της Επιγενετικής εστιάζει κυρίως στις τροποποιήσεις στη δομή της χρωματίνης, οι οποίες επιφέρουν αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων χωρίς να επηρεάζεται η αλληλουχία βάσεων του DNA. Αυτές οι τροποποιήσεις είναι αντιστρεπτές και δεν κληρονομούνται σε επόμενες γενιές, ενώ επηρεάζονται κυρίως από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Οι επιγενετικές αλλαγές θεωρούνται απαραίτητες για πολλές φυσιολογικές κυτταρικές διεργασίες και τα λάθη στην επιγενετική ρύθμιση έχει αποδειχθεί πως σχετίζονται με την ανάπτυξη διαφόρων τύπων καρκίνου. Τα είδη επιγενετικών τροποποιήσεων που έχουν μελετηθεί εκτενέστερα είναι η μεθυλίωση του DNA και οι τροποποιήσεις των ιστονών ⁴⁰ (Εικόνα 6).

1.7.2 Μεθυλίωση DNA

Η μεθυλίωση του DNA είναι η καλύτερα μελετημένη επιγενετική τροποποίηση και αφορά σε τροποποιήσεις σε δινουκλεοτίδια CpG. Πιο συγκεκριμένα, γίνεται προσθήκη μιας μεθυλομάδας στον 5' άνθρακα της κυτοσίνης στο δινουκλεοτίδιο CpG από μια μεθυλοτρανσφεράση, υπεύθυνο για την κατάλυση της διεργασίας. Η συγκεκριμένη τροποποίηση έχει συσχετιστεί κυρίως με φαινόμενα γονιδιακής αποσιώπησης, καθώς με τη βοήθεια συγκεκριμένων πρωτεϊνών προκαλείται συμπύκνωση της χρωματίνης που επιφέρει καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας κάποιων γονιδίων. Απορρύθμιση της επιγενετικής διαδικασίας μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων, όπως ο καρκίνος, στις οποίες έχουν ταυτοποιηθεί διακριτά πρότυπα μεθυλίωσης του DNA ⁴⁰.

1.7.3 Τροποποιήσεις ιστονών

Το νουκλεοσωμάτιο είναι η βασική δομική μονάδα του DNA, κατά την οποία το γενετικό υλικό τυλίγεται γύρω από ένα οκταμερές ιστονών, οργανωμένο σε ομοδιμερή που απαρτίζονται από ιστόνες τύπου H2A, H2B, H3 και H4. Τα περισσότερα είδη τροποποιήσεων συμβαίνουν στις «ουρές» των ιστονών σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο και αφορούν κυρίως σε ακετυλίωση, μεθυλίωση και φωσφορυλίωση. Οι αλλαγές αυτές έχουν τη δυνατότητα να επηρεάσουν την πρόσβαση πρωτεϊνών και μεταγραφικών παραγόντων στη χρωματίνη, κάνοντας τη δομή της είτε πιο χαλαρή είτε πιο σφιχτή. Συνεπώς, οι τροποποιήσεις των ιστονών παίζουν σημαντικό ρόλο σε κρίσιμες διεργασίες π.χ. ρύθμιση της μεταγραφής, αντιγραφή και επιδιόρθωση του DNA ⁴¹.



Εικόνα 6, Είδη επιγενετικών τροποποιήσεων – Τροποποιημένη εικόνα από Roberti, A., Valdes, A.F., Torrecillas, R. et al. Epigenetics in cancer therapy and nanomedicine. Clin Epigenet 11, 81 (2019).

Στη συγκεκριμένη εργασία, γίνεται αναφορά στην τριμεθυλίωση που συμβαίνει στο αμινοξύ λυσίνη 27 (K27) της ιστόνης 3 (H3) από την EZH2 (enhancer of zeste homolog 2). Ειδικότερα, η H3K27me3 εμπλέκεται στο σχηματισμό κατασταλτικών περιοχών στην διαμόρφωση της χρωματίνης, με αποτέλεσμα να καταστέλλεται η μεταγραφή πολλών γονιδίων-στόχων. Η απορρύθμιση της έκφρασης του ενζύμου της μεθυλοτρανσφεράσης EZH2 και τα μειωμένα επίπεδα H3K27me3 που αυτή επιφέρει, έχουν συσχετιστεί με πολλούς τύπους καρκίνου ⁴².

1.8 Η EZH2 ως παράγοντας επιγενετικής ρύθμισης

1.8.1 Η EZH2 και το κατασταλτικό σύμπλοκο Polycomb 2

Η EZH2 είναι μια μεθυλοτρανσφεράση που λειτουργεί ως καταλυτική υπομονάδα του κατασταλτικού συμπλόκου Polycomb 2 (Polycomb Repressive Complex 2), το οποίο είναι υπεύθυνο για την καταστολή της έκφρασης πληθώρας γονιδίων και σημαντικών μεταγραφικών παραγόντων για τη φυσιολογική ανάπτυξη. Το σύμπλοκο PRC2, εκτός της EZH2, αποτελείται και από τις πρωτεΐνες EED (embryonic ectoderm development), SUZ12 (suppressor of zeste 12) και δυο βοηθητικά μόρια, το RbAp48 (histone-binding protein) και το AEBP2 (zinc finger protein). Η κατασταλτική του δράση επιτυγχάνεται τόσο αυτόνομα όσο και συνεργικά, με τη στρατολόγηση DNA μεθυλοτρανσφερασών και του PRC1 (παρόμοιο

κατασταλτικό σύμπλοκο) που συμβάλλει στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης με το μηχανισμό ουμπικιτιλίωσης της ιστόνης H2A στη λυσίνη 119 ⁴³.

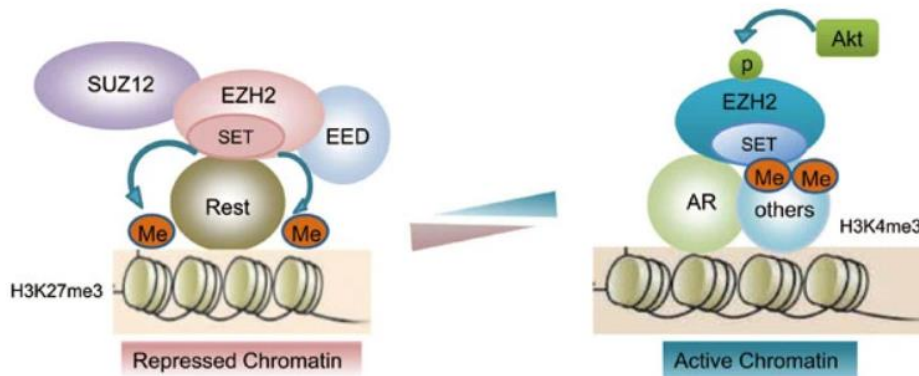
Αφού σχηματιστεί το πρωτεϊνικό σύμπλοκο της EZH2, με τη σύνθεση των μορίων EED και SUZ12, επιτυγχάνεται η καταλυτική δράση του, προχωρώντας σε δι και τρι-μεθυλίωση της ιστόνης 3 στην περιοχή της λυσίνης 27 ⁴⁴ (Εικόνα 7).

Το πρωτεϊνικό μόριο της EZH2 απαρτίζεται από 752 αμινοξέα, με μοριακό βάρος 98 kDa. Στη δομή του αναγνωρίζονται πέντε επικράτειες: επικράτεια πρόσδεσης της πρωτεΐνης EED, περιοχή SANT (σημαντική για την πρόσδεση του DNA), περιοχή ncRBD1 (non-coding RNA binding domain), περιοχή CXC (πλούσια σε κυστεΐνες) που συνεισφέρει στη δράση της μεθυλοτρανσφεράσης και επικράτεια SET στην οποία εντοπίζεται η καταλυτική ικανότητα της EZH2 ^{44,45}.

1.8.2 Ο ρόλος της EZH2 στον καρκίνο

Η ρύθμιση της έκφρασης της EZH2 ελέγχεται από πολύπλοκους μηχανισμούς, γεγονός που καταδεικνύει τον καθοριστικό ρόλο που παίζει το ένζυμο για πολλά είδη κυττάρων με ποικίλες λειτουργίες. Ερευνητικές μελέτες έχουν δείξει πως υπερέκφραση της EZH2 παρατηρείται σε διάφορους τύπους καρκίνου, επιθετικής μορφής με κακή πρόγνωση, ενώ οι λόγοι που οδηγούν σε υπερέκφραση περιλαμβάνουν γενετικές μεταλλάξεις, απορρύθμιση της μεταγραφής, συνθήκες υποξίας και μη ελεγχόμενη έκφραση microRNA. Επιπλέον, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως σε αρκετές περιπτώσεις καρκίνων, έχει παρατηρηθεί μειωμένη έκφραση της EZH2 ⁴⁶.

Κανονικά, η EZH2 ελέγχει την κυτταρική ανάπτυξη μέσω αλληλεπίδρασης με την οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων MYC, η οποία ενεργοποιώντας την φωσφατάση PTEN, ρυθμιστή του μονοπατιού PI3K, καταστέλλει την έκφραση της Akt και προάγει την έκφραση της EZH2. Έτσι, η EZH2, με την ιδιότητα της μεθυλοτρανσφεράσης, καταστέλλει την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων με σκοπό την ομαλή κυτταρική ανάπτυξη ^{47,48}. Επίσης, η EZH2 έχει ενεργό ρόλο στην οντογένεση των Β λεμφοκυττάρων, καθώς εντοπίζεται σε αυξημένα επίπεδα στα ενεργοποιημένα Β λεμφοκύτταρα των βλαστικών κέντρων, όπου πολλαπλασιάζονται και υπόκεινται σε ωρίμανση ⁴⁹.



Εικόνα 7, Τριμεθυλίωση της ιστόνης 3 από την μεθυλοτρανσφεράση EZH2 – Τροποποιημένη εικόνα από Tan, Jz., Yan, Y., Wang, Xx. et al. EZH2: biology, disease, and structure-based drug discovery. *Acta Pharmacol Sin* 35, 161–174 (2014).

Αλλαγές στην έκφραση της EZH2 έχουν παρατηρηθεί σε διάφορους τύπους Β λεμφωμάτων, όπως το λεμφοζιδιακό λέμφωμα και το διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β λεμφοκύτταρα. Στις νόσους αυτές, παρατηρείται η σωματική μετάλλαξη Y641H στο γονίδιο *EZH2* που προκαλεί μείωση της ενεργότητας του ενζύμου ⁵⁰. Η μειωμένη λειτουργία του ενζύμου οδηγεί σε χαμηλά επίπεδα τριμεθυλίωσης της H3K27 και αδυναμία καταστολής της έκφρασης γονιδίων υπεύθυνων για την κακοήγη μετατροπή των Β κυττάρων του βλαστικού κέντρου ⁵¹

Η EZH2 φαίνεται πως έχει ενεργό ρόλο και στον έλεγχο της φυσιολογικής λειτουργίας των T ρυθμιστικών κυττάρων. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της ενίσχυσης της λειτουργίας του μεταγραφικού παράγοντα Foxp3, ο οποίος, παρουσία της H3K27me3, ελέγχει την μεταγραφική δραστηριότητα σημαντικών γονιδίων των T ρυθμιστικών κυττάρων. Απώλεια της δράσης του Foxp3 συνδέεται με εμφάνιση αυτοάνοσων διαταραχών ⁵². Επιπλέον, υπερέκφραση της EZH2 έχει συσχετιστεί με περιπτώσεις T οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας, όπου παρά τα αυξημένα επίπεδα του ενζύμου παρατηρείται μειωμένη τριμεθυλίωση της H3K27. Αυτό συμβαίνει καθώς η κινάση Akt φωσφορυλιώνει ένα κατάλοιπο σερίνης στην περιοχή SET του ενζύμου, με αποτέλεσμα να εμποδίζει τη σύνδεση του με την ιστόνη 3 και την τριμεθυλίωσή της, που καταλήγει στην ανάπτυξη λευχαιμίας ⁵³.

Κάποιοι άλλοι τύποι καρκίνου στους οποίους έχει ταυτοποιηθεί απορύθμιση στην έκφραση της EZH2 είναι ο καρκίνος του μαστού και ο καρκίνος του προστάτη. Στον καρκίνο του μαστού, το μονοπάτι MEK-ERK1/2-Elk-1 φαίνεται να επάγει την έκφραση της πρωτεΐνης EZH2, η οποία με την σειρά της προκαλεί μείωση της έκφρασης της καντερίνης. Στην περίπτωση του καρκίνου του προστάτη, η υπερέκφραση της EZH2 προκύπτει μέσω της

συνέργειας πολλών μηχανισμών και έχει ως αποτέλεσμα την απενεργοποίηση πολλών γονιδίων, μεταξύ άλλων και της καντερίνης, η οποία επηρεάζει διεργασίες που εμπλέκονται στην κυτταρική προσκόλληση ⁵⁴⁻⁵⁶.

Αναφορικά με το ΣΛΟΖ, δεν υπάρχουν σαφείς ενδείξεις πως συσχετίζεται με τα επίπεδα έκφρασης και λειτουργίας της EZH2. Ωστόσο, λόγω των κυτταρογενετικών ανωμαλιών που παρατηρούνται σε περιπτώσεις ΣΛΟΖ στο χρωμόσωμα 7 όπου εντοπίζεται το γονίδιο της EZH2, πιθανές διαταραχές στην έκφραση αυτού του μορίου θα μπορούσε να συσχετίζονται με την ανάπτυξη της νόσου ⁵⁷.

2. Σκοπός Μελέτης

Το ΣΛΟΖ είναι λιγότερο καλά μελετημένο συγκριτικά με άλλους τύπους λεμφωμάτων, συνεπώς είναι πολύ ενδιαφέρουσα η διερεύνηση των αιτιών παθογένεσης και η ανάλυση των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται σε αυτή. Απαντήσεις σε αυτά τα ερωτήματα μπορεί να δώσει η επιγενετική, με τροποποιήσεις οι οποίες έχει αποδειχθεί πως αναδιαμορφώνουν την χρωματίνη και είναι κρίσιμες για την ορθή διεκπεραίωση των κυτταρικών λειτουργιών. Συνεπώς, απώλεια ελέγχου της επιγενετικής ρύθμισης μπορεί να επαγάγει διάφορους τύπους καρκίνου. Η μεθυλοτρανσφεράση των ιστονών EZH2 κατατάσσεται στα βασικά ένζυμα που επιτελούν επιγενετικές τροποποιήσεις, όπως η τριμεθυλίωση της ιστόνης 3 στην λυσίνη 27, και η απορρύθμιση της έκφρασης του ενζύμου έχει συσχετιστεί με ογκογένεση και ανάπτυξη λεμφωμάτων αλλά και με την πρόοδο και το μεταμόρφωσή τους.

Στην παρούσα εργασία, στόχος ήταν η ανάλυση της έκφρασης της EZH2 σε ασθενείς με ΣΛΟΖ και η διερεύνηση συσχέτισης με την πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων των ασθενών. Επίσης, αναλογιζόμενοι την ιδιαίτερη δράση των μονοπατιών του BKY και των TLR σε κάποιους τύπους μη-Hodgkin λεμφωμάτων, πραγματοποιήσαμε πειράματα διέγερσης αυτών των υποδοχέων σε κύτταρα ΣΛΟΖ, μελετήσαμε την επίδραση των διεγέρσεων σε καίρια μόρια που βρίσκονται καθοδικά των συγκεκριμένων σηματοδοτικών οδών και επιδιώξαμε να συσχετίσουμε τις παραπάνω αλλαγές με την έκφραση της EZH2. Τέλος, διερευνήσαμε την πιθανή ενεργοποίηση του BKY των ΣΛΟΖ κυττάρων από (αυτο)αντιγόνα όπως η ακτίνη και η μυοσίνη.

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Ομάδα ασθενών

Η ομάδα ασθενών περιελάμβανε 26 ασθενείς με σπληνικό λέμφωμα οριακής ζώνης όπως ορίζεται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ). Οι 16 ασθενείς παρακολουθούνται στην Αιματολογική Κλινική του ΓΝΘ «Γ. Παπανικολάου», ενώ η απομόνωση και φύλαξη ζωντανών κλωνικών λεμφοκυττάρων πραγματοποιήθηκε στο INEB|EKETA. Για τους υπόλοιπους 10 ασθενείς, είχαμε CD19⁺ B λεμφοκύτταρα διατηρημένα σε μέσο αποθήκευσης τα οποία προέρχονται από το Royal Bournemouthe Hospital του Ηνωμένου Βασιλείου και αποτελούν ευγενική χορηγία συνεργάτη του INEB|EKETA.

3.2 Αρνητική επιλογή CD19⁺ κυττάρων

Σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες χρησιμοποιήθηκαν δείγματα με ποσοστό κλωνικών λεμφοκυττάρων (CD19⁺ B λεμφοκύτταρα) >95%. Σε όσα δείγματα το ποσοστό ήταν <95% πραγματοποιήθηκε αρνητική επιλογή των CD19⁺ κυττάρων με χρήση του kit Easy SepTM Human B cell Enrichment Kit της εταιρίας Stemcell, ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η τεχνολογία συνδυάζει την αρνητική επιλογή των ανεπιθύμητων κυττάρων με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων και τη χρήση του αντιδραστηρίου φικόλλη (Ficoll--Hyraque) για διαχωρισμό βασισμένο σε διαβάθμιση πυκνότητας. Η πρόσδεση των ανεπιθύμητων κυττάρων στα μονοκλωνικά αντισώματα είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ροζετών με τα ερυθρά αιμοσφαίρια και την καθίζησή τους.

Διαδικασία:

1. Προσθήκη 50μl μείγματος μονοκλωνικών αντισωμάτων/ml αίματος και καλή ανακίνηση.
2. Επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Προσθήκη ίσου όγκου Phosphate Buffered Saline (PBS) με περιεκτικότητα 2% Fetal Bovine Serum (FBS) στο ολικό αίμα (PBS + 2% FBS).

4. Επιστοίβαση σε ίσο όγκο φικόλλης.
5. Φυγοκέντρηση στις 2300 rpm για 20 λεπτά χωρίς φρένο.
6. Συλλογή της στοιβάδας των CD19⁺ κυττάρων και μεταφορά τους σε νέο σωληνάριο.
7. Προσθήκη ανάλογης ποσότητας διαλύματος PBS +2% FBS μέχρι τελικό όγκο 12 ml.
8. Φυγοκέντρηση στις 2100 rpm για 8 λεπτά.
9. Απόρριψη του υπερκειμένου και προσθήκη 10 ml διαλύματος PBS 2% FBS. Επανάληψη της φυγοκέντρησης.
10. Επανεναίωση των κυττάρων σε 1 ml διαλύματος PBS 2% FBS.
11. Μέτρηση των κυττάρων σε μικροσκόπιο με τη χρήση της πλάκας Neubauer και της χρωστικής Trypan Blue.
12. Τοποθέτηση 12x10⁶ κυττάρων ανά σωληνάριο Eppendorf.
13. Προσθήκη 500 μl freezing medium {80% θρεπτικό μέσο RPMI + 10% FBS + 10% Dimethyl sulfoxide (DMSO)}.
14. Αποθήκευση στους -80°C.

Η μέτρηση του ποσοστού των CD19⁺ κυττάρων πραγματοποιήθηκε με κυτταρομετρία ροής σε αναλυτή Attune NxT Flow Cytometer και η ανάλυση των αποτελεσμάτων βασίστηκε στο λογισμικό Flowjo Software V10.

Διαδικασία:

1. Προσθήκη 10 μl μίγματος μονοκλωνικού αντισώματος CD3-FITC (ισοθειοκυανικό οξύ φλουορεσκεΐνης: fluorescein isothiocyanate, FITC) και CD19-PE (φυκοερυθρίνη: phycoerythrin, PE) σε 100 μl αίματος (10⁶ κύτταρα/ml).
2. Ανακίνηση και επώαση των δειγμάτων για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Προσθήκη 2 ml διαλύματος χλωριούχου αμμωνίου (NH₄Cl) για λύση των ερυθροκυττάρων.
4. Ανακίνηση και επώαση των δειγμάτων για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Φυγοκέντρηση (2000 rpm, 5 λεπτά) και απόρριψη του υπερκειμένου.
6. Προσθήκη 1 ml PBS.
7. Μέτρηση του ποσοστού των CD3⁺/CD19⁺ κυττάρων στον αναλυτή.

Η διαδικασία επαναλήφθηκε και μετά την αρνητική επιλογή των κυττάρων. Τα δείγματα που περιείχαν CD19⁺ κύτταρα σε ποσοστό πάνω από 95% χρησιμοποιήθηκαν για τις επόμενες πειραματικές διαδικασίες.

3.3 Απομόνωση RNA

Η απομόνωση ολικού RNA από τα CD19⁺ κύτταρα πραγματοποιήθηκε με πρωτόκολλο απομόνωσης με φαινόλη/χλωροφόρμιο (trizol), του οποίου τα βήματα περιγράφονται αναλυτικά ως εξής:

Πρώτη φάση

- 1) Ξεπάγωμα των κυττάρων σε υδατόλουτρο, στους 37 °C με ανακίνηση.
- 2) Φυγοκέντρηση στις 2000 rpm για 3 λεπτά και απόρριψη του υπερκείμενου.
- 3) Προσθήκη 1 ml trizol και ανακίνηση.
- 4) Τοποθέτηση των δειγμάτων στον πάγο.
- 5) Προσθήκη 250 μl χλωροφόρμιου σε κάθε δείγμα και ανακίνηση.
- 6) Φυγοκέντρηση (15min, 15.000 rcf) στους 4 °C.
- 7) Διαχωρισμός των φάσεων και μεταφορά του υπερκείμενου (περίπου 500 μl) σε νέο Eppendorf για κάθε δείγμα.
- 8) Προσθήκη ίσης ποσότητας (περίπου 500 μl) ισοπροπανόλης και ανακίνηση.
- 9) Τοποθέτηση των δειγμάτων στους -20 °C overnight.

Δεύτερη φάση

- 1) Φυγοκέντρηση (15min, 15.000 rcf) των δειγμάτων στους 4 °C.
- 2) Τοποθέτηση των δειγμάτων στον πάγο και αφαίρεση του υπερκείμενου.
- 3) Προσθήκη 850 μl αιθανόλης 70%.
- 4) Φυγοκέντρηση (5min, 15.000 rcf) στους 4 °C.
- 5) Αφαίρεση του υπερκείμενου.
- 6) Επανάληψη των βημάτων 3,4 και 5.
- 7) Τοποθέτηση των δειγμάτων, με ανοιχτό καπάκι, σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 1 ώρα.

- 8) Επαναίωση του RNA σε κατάλληλη ποσότητα νερού, ανάλογα με το ίζημα, και υπολογισμός της συγκέντρωσης RNA σε κάθε δείγμα με τη μέθοδο Qubit® RNA BR Assay Kit (Invitrogen), με βάση το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.
- 9) Αποθήκευση στους -80 °C.

3.4 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA

Η σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (cDNA) πραγματοποιήθηκε με τη χρήση τυχαίων εξαμερών εκκινητών, ενώ η αρχική ποσότητα του RNA που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1 µg.

Μεθοδολογία:

1. Υπολογισμός του απαραίτητου όγκου RNA για κάθε αντίδραση ώστε να έχουμε 1 µg RNA/αντίδραση.
2. Υπολογισμός του απαραίτητου όγκου RNase free H₂O για κάθε αντίδραση ώστε ο τελικός όγκος να είναι 11,4 µl.
3. Προετοιμασία σωληναρίων PCR χωρητικότητας 0,2 ml PCR tubes για κάθε αντίδραση και ενός επιπλέον που θα χρησιμοποιηθεί ως αρνητικός μάρτυρας.
4. Προσθήκη του απαραίτητου όγκου RNase free H₂O σε κάθε αντίδραση.
5. Προσθήκη του απαραίτητου όγκου RNA σε κάθε αντίδραση.
6. Προσθήκη 11,4 µl RNase free H₂O στον αρνητικό μάρτυρα.
7. Προετοιμασία master mix για το στάδιο της αποδιάταξης για το σύνολο των δειγμάτων:
 - a. 1 µl dNTPs αρχικής συγκέντρωσης 10 mM/αντίδραση
 - b. 0,1 µl τυχαίοι εκκινητές/αντίδραση
8. Προσθήκη 1,1 µl από το master mix στο PCR σωληνάριο που περιέχει το RNA και το RNA free H₂O.
9. Ανάδευση και τοποθέτηση των δειγμάτων στον θερμοκυκλοποιητή για το στάδιο της αποδιάταξης → 65 °C για 5 λεπτά.
10. Τοποθέτηση των δειγμάτων στον πάγο για 10 λεπτά ή στον θερμοκυκλοποιητή στους 4 °C για 10 λεπτά.

11. Προετοιμασία master mix για το στάδιο της σύνθεσης του cDNA για το σύνολο των δειγμάτων (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Αντιδραστήρια για την σύνθεση του cDNA

Αντιδραστήρια	Ποσότητα ανά αντίδραση (μl)
5x FS Buffer	4
DTT 0,1 M	2
Rnase OUT	1
Superscript II	0,5
Τελικός όγκος	7,5

12. Προσθήκη 7,5 μl από το cDNA master mix σε κάθε σωληνάριο PCR και ανάδευση. Τελικός όγκος σε κάθε σωληνάριο είναι τα 20 μl.
13. Τοποθέτηση δειγμάτων στον θερμοκυκλοποιητή και εφαρμογή του παρακάτω προγράμματος:
- 25 °C/10 λεπτά
 - 42 °C /50 λεπτά
 - 70 °C /15 λεπτά
 - 18 °C /∞.
14. Αραίωση των δειγμάτων με 30 μl RNase free H₂O ώστε ο τελικός όγκος του cDNA να είναι 50 μl.
15. Αποθήκευση των cDNAs στους 4 °C.

3.4.1 Ποιοτικός έλεγχος του cDNA

Για να αποκλειστεί το ενδεχόμενο ψευδών αρνητικών αποτελεσμάτων σε περίπτωση αδυναμίας ενίσχυσης του RNA, χρησιμοποιήσαμε ως μετάγραφα αναφοράς τα μετάγραφα του γονιδίου *RARA* (retinoic acid receptor α) το οποίο κωδικοποιεί έναν από τους υποδοχείς του ρετινοϊκού οξέος. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε 1 μl του προϊόντος cDNA το οποίο ενισχύθηκε με PCR με ειδικούς εκκινητές για το γονίδιο *RARA* (RAR6/RAR8):

RAR6: 5' GGTGCCTCCCTACGCCTTCT 3'

RAR8: 5' GGCGCTGACCCCATAGTGGT 3'

Μεθοδολογία:

- Προσθήκη των αντιδραστηρίων του Πίνακα 2 στο cDNA και ενίσχυση των δειγμάτων στις εξής συνθήκες:

- ✓ 94°C για 5 λεπτά
 - ✓ 94°C για 1 λεπτό
 - ✓ 53°C για 1 λεπτό
 - ✓ 72°C για 1 λεπτό
 - ✓ 72°C για 10 λεπτά
- } 40 κύκλοι

Πίνακας 2. Αντιδραστήρια για την αντίδραση RARa

Αντιδραστήρια	Ποσότητα ανά αντίδραση (μl)
cDNA	1
Buffer 10X	1
MgCl ₂ (50 mM)	0,4
dNTPs (10 mM)	0,2
Primer RAR6 (10 μM)	0,3
Primer RAR8 (10 μM)	0,3
Taq DNA polymerase (5u/μl)	0,1
H ₂ O	6,7
Τελικός όγκος	10

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε έλεγχος του cDNA για ανίχνευση επιμόλυνσης από γενωμικό DNA μέσω PCR. Στην αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν οι ειδικοί εκκινητές A2, A10 που προσδένουν σε ιντρόνιο του γονιδίου της β-ακτίνης (FR0). Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ολικό DNA από Β κύτταρα.

A2: 5' GCCCCGCCCCGCCCCGTGCCCCCGCGCCGCCCGCCCCGCCCCGCCCTGGCTCCTGCCCTCCC
3'

A10: 5' TTAGTAGCTTTGTACTGA 3'

Μεθοδολογία:

- Προσθήκη των αντιδραστηρίων του Πίνακα 3 στο δείγμα cDNA/ DNA
- Ενίσχυση των δειγμάτων στις εξής συνθήκες:

- ✓ 94°C για 5 λεπτά
 - ✓ 94°C για 1 λεπτό
 - ✓ 55°C για 1.30 λεπτά
 - ✓ 72°C για 2 λεπτά
 - ✓ 72°C για 4 λεπτά
- } 39 κύκλοι

Πίνακας 3. Αντιδραστήρια για την αντίδραση ελέγχου της FRO

Αντιδραστήρια	Ποσότητα ανά αντίδραση (μl)
cDNA/DNA	1,2
Buffer 10X	1
MgCl ₂ (50 mM)	0,5
dNTPs (10 mM)	0,3
A2 (10 μM)	0,6
A10 (10 μM)	0,6
Taq DNA polymerase (5u/μl)	0,1
H ₂ O	5,7
Τελικός όγκος	10

Ο έλεγχος των προϊόντων PCR πραγματοποιήθηκε σε gel αгарόζης 2%. Δείγματα με θετικό προϊόν PCR θεωρήθηκαν επιμολυσμένα με γενωμικό DNA και αποκλείστηκαν από τα επόμενα στάδια της πειραματικής διαδικασίας.

3.4.2 Ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου EZH2 με real time PCR

Η μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *EZH2* πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Real-Time PCR χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές (Qiagen) και τη χρωστική SYBR Green (Thermo Scientific) η οποία έχει την ικανότητα μη ειδικής πρόσδεσης στην ελάσσονα αύλακα του δίκλωνου DNA. Οι αντιδράσεις για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν σε δύο επαναλήψεις

ενώ για την εξαγωγή του τελικού αποτελέσματος υπολογίστηκε ο μέσος όρος των δύο αντιδράσεων. Το *ABL* χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς (housekeeping gene) για την κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης της *EZH2*. Για τον έλεγχο επιμολύνσεων κατά την προετοιμασία της αντίδρασης, χρησιμοποιήθηκε ένας αρνητικός μάρτυρας (NEG) σε δύο επαναλήψεις. Στις αντίστοιχες θέσεις δεν υπήρχε υπόστρωμα (cDNA), συνεπώς η ανίχνευση έκφρασης ερμηνευόταν ως επιμόλυνση. Για την ενδεικτική εικόνα της καμπύλης και τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε ένας θετικός μάρτυρας σε δύο επαναλήψεις (EZH2 POS) ο οποίος είχε τεχνητό υπόστρωμα (cDNA) που εκφράζει όλα τα ανθρώπινα γονίδια (RNA universal, Qiagen) (Εικόνα 8).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 EZH	1 EZH	9 EZH2	9 EZH2	17 EZH	17 EZH	1 ABL	1 ABL	9 ABL	9 ABL	17 ABL	17ABL
B	2 EZH	2 EZH	10 EZH2	10 EZH2	18 EZH	18 EZH	2 ABL	2 ABL	10 ABL	10 ABL	18 ABL	18 ABL
C	3 EZH	3 EZH	11 EZH2	11 EZH2	19 EZH	19 EZH	3 ABL	3 ABL	11 ABL	11 ABL	19 ABL	19 ABL
D	4 EZH	4 EZH	12 EZH2	12 EZH2	20 EZH	20 EZH	4 ABL	4 ABL	12 ABL	12 ABL	20 ABL	20 ABL
E	5 EZH	5 EZH	13 EZH2	13 EZH2	21 EZH	21 EZH	5 ABL	5 ABL	13 ABL	13 ABL	21 ABL	21 ABL
F	6 EZH	6 EZH	14 EZH2	14 EZH2	22 EZH	22 EZH	6 ABL	6 ABL	14 ABL	14 ABL	22 ABL	22 ABL
G	7 EZH	7 EZH	15 EZH2	15 EZH2	23 EZH	23 EZH	7 ABL	7 ABL	15 ABL	15 ABL	23 ABL	23 ABL
H	8 EZH	8 EZH	16 EZH2	16 EZH2	EZH POS	EZH POS	8 ABL	8 ABL	16 ABL	16 ABL	NEG	NEG

Εικόνα 8. Η διάταξη της πλάκας 96 θέσεων που χρησιμοποιήθηκε για την Real-Time PCR. EZH: primers για το γονίδιο EZH2, ABL: primers για το γονίδιο ABL, EZH POS: θετικό control, NEG: αρνητικό control, κάθε αριθμός αντιπροσωπεύει ένα ασθενή.

Μεθοδολογία:

- Προσθήκη των αντιδραστηρίων του Πίνακα 4 ή Πίνακα 5 σε 2,5 µl cDNA του κάθε δείγματος στο κατάλληλο πηγαδάκι της πλάκας, όπως φαίνεται στην Εικόνα
 - Ανακίνηση της πλάκας και spin
 - Ενίσχυση των δειγμάτων στις εξής συνθήκες:
 - ✓ 95°C για 10 λεπτά
 - ✓ 95°C για 15 δευτερόλεπτα
 - ✓ 55°C για 30 δευτερόλεπτα
 - ✓ 72°C για 30 δευτερόλεπτα
 - ✓ 72°C για 2 λεπτά
- } 32 κύκλοι

Πίνακας 4. Αντιδραστήρια για το γονίδιο της EZH2

Αντιδραστήρια	Ποσότητα ανά αντίδραση (µl)
SYBR green	12,5
Primer EZH2	1

template	2,5
dH ₂ O	9
Τελικός όγκος	25

Πίνακας 5. Αντιδραστήρια για το γονίδιο αναφοράς ABL

Αντιδραστήρια	Ποσότητα ανά αντίδραση (μl)
SYBR green	12,5
Primer ABL	1
template	2,5
dH ₂ O	9
Τελικός όγκος	25

3.4.3 Ανάλυση αποτελεσμάτων με τη μέθοδο ΔCt

Η μέθοδος ΔCt είναι μέθοδος σχετικής ποσοτικοποίησης. Ο αλγόριθμος χρησιμοποιεί ως αρχικό δεδομένο την τιμή Ct που είναι το σημείο στο οποίο το προϊόν της αντίδρασης περνά στην εκθετική φάση ενίσχυσης. Το αρχικό βήμα στην ανάλυση είναι η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων με τη χρήση γονιδίων αναφοράς (housekeeping genes), σύμφωνα με τον τύπο $\Delta Ct = Ct_{AVG\ EZH2} - Ct_{AVG\ ABL}$, όπου AVG EZH2 ο μέσος όρος των τιμών Ct του γονιδίου στόχου EZH2 και AVG ABL ο μέσος όρος των τιμών Ct του γονιδίου αναφοράς ABL. Τελικά, η σχετική έκφραση (relative expression) υπολογίστηκε από τον τύπο $2^{-\Delta Ct}$.

3.5 Κυτταροκαλλιέργειες

Τα απομονωμένα CD19⁺ B κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) συμπληρωμένο με L-γλουταμίνη, 10% θερμο-αδρανοποιημένο εμβρυϊκό βόειο ορό (Fetal Bovine Serum, FBS), 50 μg/ml πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη και 15 μg/ml γενταμικίνη. Όλες οι καλλιέργειες επωάστηκαν σε κλίβανο με περιεκτικότητα 5% CO₂ στους 37 °C.

Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε πλάκες 48 θέσεων και, σε κάθε περίπτωση, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε τελική συγκέντρωση 3×10^6 κύτταρα ανά ml θρεπτικού υλικού, παρουσία (διεγερμένα κύτταρα) ή απουσία (κύτταρα control) διαφόρων διεγερτών, για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. Συγκεκριμένα, για τα πειράματα της εργασίας, η διέγερση αφορούσε στους υποδοχείς BcR (B cell Receptor) και TLR9. Ο BcR διεγέρθηκε με πολυκλωνικό anti-IgM (10 µg/ml), ενώ ο TLR9 με 2,5 µg/ml ODN 2006 (ODN2006, stimulatory CpG-ODN typeB, human-specific, Invitrogen). Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε διέγερση των κυττάρων με τα αντιγόνα ακτίνη και μυοσίνη, τα οποία έχουν παραχθεί από ανθρώπινο ιστό στο εργαστήριο⁵⁸ και είναι ευγενική χορηγία συνεργάτη μας από το Ινστιτούτο Παστέρ στην Αθήνα.

Μεθοδολογία:

- 1) Ξεπάγωμα των κυττάρων, με την προσθήκη ζεστού θρεπτικού μέσου και μεταφορά της ποσότητας σε falcon με θρεπτικό μέσο.
- 2) Φυγοκέντρηση (7 min, 2000 rpm) και απομάκρυνση του υπερκειμένου.
- 3) Επαναιώρηση και διάλυση του ιζήματος σε θρεπτικό μέσο.
- 4) Μέτρηση των ζωντανών κυττάρων σε πλάκα Neubauer, με την βοήθεια της χρωστικής Trypan blue.
- 5) Υπολογισμοί όγκων και κατανομή των κυττάρων ώστε η συγκέντρωσή τους να είναι 3×10^6 /ml θρεπτικού μέσου σε κάθε θέση της πλάκας.
- 6) Μεταφορά των υπολογισμένων ποσοτήτων δείγματος σε πλάκα με 48 πηγαδάκια.
- 7) Προσθήκη του κατάλληλου προσδέτη (ή συνδυασμό) στα πηγαδάκια.
- 8) Επάωση σε κλίβανο (επωαστήρα) στους 37°C με περιεκτικότητα 5% CO₂ για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα.

Στη συνέχεια, τα κύτταρα συλλέγονται και είτε λύονται αν πρόκειται να προχωρήσουμε με ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών είτε ακολουθεί η σήμανσή τους με διάφορα φθοριοχρώματα, αν πρόκειται να προχωρήσουμε σε κυτταρομετρία ροής.

3.6 Συλλογή και λύση κυττάρων

Μετά από επάωση των κυττάρων για ορισμένο χρονικό διάστημα, ακολουθεί η συλλογή τους.

Μεθοδολογία:

- 1) Καλή ανάδευση των κυττάρων στα πηγαδάκια, συλλογή και μεταφορά τους σε ξεχωριστά erpendorfs των 1,5 ml ανά συνθήκη.
- 2) Φυγοκέντρηση (5 min, 2000 rpm, 4°C) και απομάκρυνση υπερκείμενου.
- 3) Προσθήκη 1 ml PBS.
- 4) Επανάληψη των βημάτων 2 και 3.
- 5) Φυγοκέντρηση (5 min, 2000 rpm, 4°C), απομάκρυνση υπερκείμενου και προαιρετική φυγοκέντρηση (2min, 2000 rpm, 4°C) για καλύτερο στέγνωμα του κυτταρικού pellet.

Ακολουθεί η λύση των κυττάρων με ειδικό διάλυμα λύσης (Lysis buffer), το οποίο αποτελείται κυρίως από RIPA buffer, αναστολείς πρωτεασών και φωσφατασών σε συγκέντρωση 1/10 και βενζονάση 1μl/ml lysis buffer (stock συγκέντρωση 1μg/ml).

Μεθοδολογία:

- 1) Προσθήκη διαλύματος λύσης σε αναλογία 20 μl/10⁶ κύτταρα σε κάθε erpendorf, στον πάγο (4 °C).
- 2) Πιπετάρισμα μέχρι να διαλυθεί το ίζημα, με ενδιάμεση αναμονή 5-10 λεπτών στον πάγο.
- 3) Φυγοκέντρηση (15 min, 11000 rpm, 4°C) και μεταφορά υπερκείμενου σε νέα erpendorfs.

Μετά το διαχωρισμό και την λήψη των πρωτεϊνών του κάθε δείγματος, ακολουθεί ποσοτικοποίηση με χρήση του Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

3.7 Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών– Western Blot

Για την ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος πρώτα παρασκευάζεται πηκτή ακρυλαμίδης, η οποία αποτελείται από δυο μέρη: πηκτή διαχωρισμού (resolving gel) και πηκτή επιστοίβασης (stacking gel), που παρασκευάζονται σύμφωνα με τον Πίνακα 6. Έπειτα, τα δείγματα αναμειγνύονται με αναλογία όγκου 2:1 με το διάλυμα φόρτωσης

(loading dye) που περιέχει τον παράγοντα διθειοθρεϊτόλη (DTT) και αποδιατάσσονται στους 99 °C για 10 λεπτά.

Πίνακας 6. Συστατικά παρασκευής των πηκτωμάτων διαχωρισμού και επιστοίβασης.

Συστατικά διαλύματος	Πήκτωμα διαχωρισμού 10% (Resolving gel) σε ml	Πήκτωμα επιστοίβασης 5% (Stacking gel) σε ml
Απεσταγμένο νερό	1.9	1.4
Ακρυλαμίδη 30%	1.7	0.33
Tris 1,5M (pH 8.8)	1.3	-
Tris 1,5M (pH 6.8)	-	0.25
SDS 10%	0.05	0.02
APS 10%	0.05	0.02
TEMED	0.002	0.002
Τελικός όγκος	5	2

Αφού τελειώσει η διαδικασία αποδιάταξης των πρωτεϊνών, είναι εφικτή η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων στην πηκτή ακρυλαμίδης.

Μεθοδολογία:

- Προετοιμασία του διαλύματος ηλεκτροφόρησης (Running buffer) σύμφωνα με τον Πίνακα 7.
- Συναρμολόγηση του συστήματος της Invitrogen XCell SureLock (Invitrogen, Paisley, UK), τοποθετώντας την πηκτή ακρυλαμίδης στην κατάλληλη θέση.
- Συμπλήρωση ολόκληρου του εσωτερικού θαλάμου με το διάλυμα ηλεκτροφόρησης.
- Φόρτωση των δειγμάτων αλλά και των δεικτών μοριακού βάρους BlueStar Prestained Protein Marker και Thermo Scientific MagicMark™ XP Western Protein Standard. Με την βοήθεια του δείκτη μοριακού βάρους BlueStar Prestained Protein Marker γίνεται η διάκριση του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών τόσο κατά την διάρκεια της ηλεκτροφόρησης όσο και μετά την μεταφορά στη μεμβράνη, ενώ ο δείκτης Thermo Scientific MagicMark™ XP Western Protein Standard είναι απαραίτητος για την οπτικοποίηση του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών κατά την εμφάνιση με χημειοφωταύγεια.

- Συμπλήρωση του εξωτερικού θαλάμου της συσκευής με διάλυμα ηλεκτροφόρησης μέχρι το σημείο που καλύπτονται τα ηλεκτρόδια.
- Ρύθμιση της συσκευής στα 120V για χρονικό διάστημα 75-80 λεπτών.

Πίνακας 7. Συστατικά παρασκευής διαλύματος ηλεκτροφόρησης (Running buffer).

Συστατικά διαλύματος	Ποσότητα
Γλυκίνη	14.4 gr
Tris	3 gr
SDS 10%	10 ml
Απεσταγμένο νερό	έως τα 1000 ml

Στη συνέχεια, μετά την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών στην πηκτή, σειρά έχει η ηλεκτρομεταφορά τους σε μεμβράνη PVDF (φθοροπολυμερές) στην οποία θα αφήσουν αποτύπωμα. Αυτό επιτυγχάνεται με την εφαρμογή ρεύματος υπό γωνία 90° ως προς την πηκτή ώστε να πραγματοποιηθεί η μετανάστευση των πρωτεϊνών στη μεμβράνη.

Μεθοδολογία:

- Προετοιμασία του διαλύματος μεταφοράς (Transfer buffer) σύμφωνα με τον Πίνακα 8 και αποθήκευση στους 4 °C.
- Εμποτισμός της μεμβράνης PVDF σε μεθανόλη για 2 λεπτά ώστε να ενεργοποιηθεί και μετέπειτα σε διάλυμα μεταφοράς.
- Προετοιμασία των ειδικών σφουγγαριών και 6 χαρτιών Whatman, ξέπλυμα με απεσταγμένο νερό και εμποτισμός τους, μαζί με το πήκτωμα ακρυλαμίδης, σε διάλυμα μεταφοράς.
- Διάταξη όλων των παραπάνω όπως ενδείκνυται και τοποθέτηση τους στην συσκευή Invitrogen XCell SureLock (Invitrogen, Paisley,UK).
- Γέμισμα ολόκληρου του εσωτερικού θαλάμου με διάλυμα μεταφοράς.
- Συμπλήρωση του εξωτερικού θαλάμου έως τα μισά, με κρύο απεσταγμένο νερό.
- Ρύθμιση της συσκευής στα 35 V για 2 ώρες.

Πίνακας 8. Συστατικά παρασκευής διαλύματος μεταφοράς (Transfer buffer).

Συστατικά διαλύματος	Ποσότητα
NuPAGE Transfer buffer	25 ml
Μεθανόλη	50 ml
SDS 10%	0.5 ml
Απεσταγμένο νερό	έως τα 500 ml

Μόλις ολοκληρωθεί η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών, γίνεται πλύση της μεμβράνης με PBS-Tween (PBS-T, 0.001%) για 5-10 λεπτά και χρώση με Ponceau S (Sigma-Aldrich, Germany). Η χρώση με Ponceau S θα επιβεβαιώσει τόσο την επιτυχή ηλεκτροφόρηση όσο και την ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή στη μεμβράνη PVDF.

Ακολουθεί η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος. Αρχικά, πρέπει να ελαχιστοποιηθούν οι πιθανότητες για μη ειδικές συνδέσεις μεταξύ αντισώματος και πρωτεϊνών στη μεμβράνη. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της επώασης της μεμβράνης με ένα διάλυμα γάλακτος 5% σε PBS-T (blocking solution) για 45-60 λεπτά.

Κατόπιν, η ανοσοανίχνευση γίνεται μέσω της ειδικής πρόσδεσης του πρωτογενούς μονοκλωνικού αντισώματος στην πρωτεΐνη ενδιαφέροντος πάνω στη μεμβράνη. Ένα δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με ένζυμο αναγνωρίζει και συνδέεται με το πρωτογενές και με την προσθήκη του κατάλληλου υποστρώματος έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φωτεινού σήματος μέσω χημειοφωταύγειας (Πίνακας 9).

Μεθοδολογία:

- Προετοιμασία διαλύματος γάλακτος 5% σε PBS-T (blocking solution) και επώαση μεμβράνης με ταυτόχρονη ανακίνηση για 45-60 λεπτά.
- 3 πλύσεις με PBS-T ανά 10 λεπτά.
- Επώαση της μεμβράνης με το διαλυτοποιημένο πρωτογενές μονοκλωνικό αντίσωμα για ολόκληρο βράδυ στους 4°C.
- 3 πλύσεις με PBS-T ανά 10 λεπτά.
- Επώαση της μεμβράνης με το διάλυμα του δευτερογενούς αντισώματος συζευγμένο με ένζυμο, για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου με ταυτόχρονη ανακίνηση.

- 3 πλύσεις με PBS-T ανά 10 λεπτά.
- Επώαση της μεμβράνης με 2 ml Luminata™ Classico Western HRP Substrate για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Στέγνωμα της μεμβράνης και τοποθέτηση της στη συσκευή GeneGnome (Syngene) για ανίχνευση του παραγόμενου σήματος.

Πίνακας 9. Πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην ανοσοανίχνευση κατά Western.

Αντίσωμα	Συγκέντρωση	Διαλύτης	Συγκέντρωση διαλύτη (%)
αντι-EZH2 (mouse)	1:200	γάλα	2.5
αντι-pERK (rabbit)	1:200	BSA	0.1
αντι-pPLCγ2 (rabbit)	1:250	BSA	0.1
anti-mouse/HRP	1:1250	γάλα	2.5
anti-rabbit/HRP	1:1250	γάλα	2.5
b-actin/HRP	1:50000	γάλα	2.5

Σε περιπτώσεις ανίχνευσης δυο πρωτεϊνών με ταυτόσημα ή παρόμοια μοριακά βάρη, ακολουθείται αποκόλληση (stripping) των ιχνηθετών από την μεμβράνη με ειδικό διάλυμα (stripping buffer) (Πίνακας 10) και νέα επώασή της (reprobing) με τα κατάλληλα αντισώματα.

Πίνακας 10. Συστατικά παρασκευής διαλύματος αποκόλλησης (Stripping buffer).

Συστατικά διαλύματος	Ποσότητα
Γλυκίνη	3.75 gr
SDS 10%	100 ml
HCl 1M	Μέχρι pH=2
Απεσταγμένο νερό	έως τα 1000 ml

Μεθοδολογία:

- 3 πλύσεις της μεμβράνης με PBS-T ανά 10 λεπτά.

- Επώαση της μεμβράνης με το διάλυμα αποκόλλησης (stripping buffer) για 10 λεπτά αυστηρά σε θερμοκρασία δωματίου, με ταυτόχρονη ανακίνηση.
- 3 πλύσεις με PBS-T ανά 10 λεπτά.
- Επώαση με διάλυμα γάλακτος 5% σε PBS-T (blocking solution) για 45-60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, με ταυτόχρονη ανακίνηση.
- 3 πλύσεις με PBS-T ανά 10 λεπτά.
- Επώαση της μεμβράνης με το διαλυτοποιημένο πρωτογενές μονοκλωνικό αντίσωμα για ολόκληρο βράδυ στους 4°C.

Έπειτα ακολουθείται η ίδια διαδικασία επώασης του δευτερογενούς αντισώματος, προσθήκης κατάλληλου υποστρώματος και ανίχνευσης του παραγόμενου σήματος, όπως αναφέρεται παραπάνω.

Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης των πρωτεϊνών επιτεύχθηκε με τη χρήση του λογισμικού Image J. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας του σήματος της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος καθώς και της β-ακτίνης. Η β-ακτίνη θεωρητικά εκφράζεται ισόποσα σε όλα τα κύτταρα, ανεξάρτητα των συνθηκών, και γι' αυτό χρησιμοποιείται για την κανονικοποίηση των τιμών της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος. Στη συνέχεια, υπολογίστηκε ο λόγος της οπτικής πυκνότητας της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος προς την οπτική πυκνότητα της β-ακτίνης.

3.8 Μέτρηση έκφρασης πρωτεϊνών με κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρική βιωσιμότητα, η πολλαπλασιαστική ικανότητα, η έκφραση των ενδοκυττάρων μορίων EZH2 και H3K27me3 καθώς και των φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών Erk και NF-kB προσδιορίστηκαν με κυτταρομετρία ροής σε αναλυτή Attune NxT Flow Cytometer. Για κάθε δείγμα μετρήθηκαν τουλάχιστον 10.000 συμβάντα (events), ενώ για τον ορισμό της θετικότητας χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλα ισοτυπικά control. Η ανάλυση βασίστηκε στην επιλογή (gating) μόνο ζωντανών κυττάρων και πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού Flowjo Software V10.

3.8.1 Μέτρηση έκφρασης φωσφοπρωτεϊνών

Μεθοδολογία:

- Επαναδιάλυση των κυττάρων που συλλέχθηκαν σε PBS 1X.
- Επώαση των κυττάρων σε 400 µl FVS (BD Horizon™ Fixable Viability Stain 660 Stock Solution σε συγκέντρωση 1:4000) για 10-15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ανακίνηση.
- 2 πλύσεις με διάλυμα PBS/FBS 1%.
- Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, 2000 rpm και απόρριψη υπερκειμένου.
- Προσθήκη BD Lyse/Fix buffer 1X (αραίωση 1:5 σε dH₂O - Lyse/Fix Buffer 5X, BD Phosflow™).
- Επώαση στους 37°C για 10 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, 2000 rpm και απόρριψη υπερκειμένου.
- Προσθήκη Perm/Wash buffer (αραίωση 1:10 σε dH₂O – 10X stock solution) και επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, 2000 rpm και απόρριψη υπερκειμένου.
- Προσθήκη των αντισωμάτων (Πίνακας 11) και επώαση για 20 λεπτά, στους 4°C, στο σκοτάδι.
- Πλύση με Perm/Wash buffer, φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, 2000 rpm και απόρριψη υπερκειμένου.
- Προσθήκη Perm/Wash buffer και μέτρηση έκφρασης στη συσκευή κυτταρομετρίας.

3.8.2 Μέτρηση έκφρασης Ki-67/EZH2

Προκειμένου να προσδιοριστεί η πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων, πραγματοποιήθηκε μέτρηση του δείκτη Ki-67.

Μεθοδολογία:

- Επαναδιάλυση των κυττάρων σε PBS 1X.
- Επώαση των κυττάρων σε 400 µl FVS (BD Horizon™ Fixable Viability Stain 660 Stock Solution σε συγκέντρωση 1:4000) για 10-15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ανακίνηση.

- 2 πλύσεις με διάλυμα PBS/FBS 1%.
- Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, 2000 rpm και απόρριψη υπερκειμένου.
- Προσθήκη διαλύματος Fixation/Permeabilization, επώαση για 20 λεπτά στους 4°C.
- Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, 2000 rpm και απόρριψη υπερκειμένου.
- Προσθήκη BD Perm/Wash buffer 1X και επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, 2000 rpm και απόρριψη υπερκειμένου.
- Προσθήκη αντισωμάτων (Πίνακας 11) και επώαση για 30 λεπτά, στους 4°C, στο σκοτάδι.
- Πλύση με BD Perm/Wash buffer 1X
- Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, 2000 rpm και απόρριψη υπερκειμένου.
- Προσθήκη BD Perm/Wash buffer 1X, ανακίνηση και μέτρηση έκφρασης στη συσκευή κυτταρομετρίας.

3.8.3 Μέτρηση έκφρασης H3K27me3

Μεθοδολογία:

- Επαναδιάλυση των κυττάρων σε PBS 1X.
- Επώαση των κυττάρων σε 400 µl FVS (BD Horizon™ Fixable Viability Stain 660 Stock Solution σε συγκέντρωση 1:4000) για 10-15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ανακίνηση.
- Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, 2000 rpm και απόρριψη υπερκειμένου.
- Πλύση με PBS 1X, φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, 2000 rpm και απόρριψη υπερκειμένου.
- Προσθήκη 150 µl φορμαλδεύδης 4% και επώαση για 10 λεπτά στους 37°C.
- Τοποθέτηση των δειγμάτων στον πάγο για 1 λεπτό.
- 2 πλύσεις με PBS 1X, φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, 2000 rpm και απόρριψη υπερκειμένου.
- Προσθήκη μεθανόλης 100% (σταγόνα-σταγόνα με ταυτόχρονη ανακίνηση των δειγμάτων) και επώαση για 30 λεπτά στον πάγο.
- Προσθήκη incubation buffer (0.25 gr BSA σε 50 ml PBS 1X), φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, 2000 rpm και απόρριψη υπερκειμένου.
- Επανάληψη του παραπάνω βήματος.

- Επαναιώρηση των κυττάρων σε incubation buffer και διαχωρισμός της ποσότητας των δειγμάτων για δημιουργία ισοτυπικών control για κάθε δείγμα.
- Προσθήκη αντισωμάτων (Πίνακας 11) και επώαση για 1 ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι.
- Προσθήκη incubation buffer, φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, 2000 rpm και απόρριψη υπερκειμένου.
- Επαναιώρηση των κυττάρων σε PBS 1X και μέτρηση έκφρασης στη συσκευή κυτταρομετρίας.

Πίνακας 11. Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την κυτταρομετρία ροής.

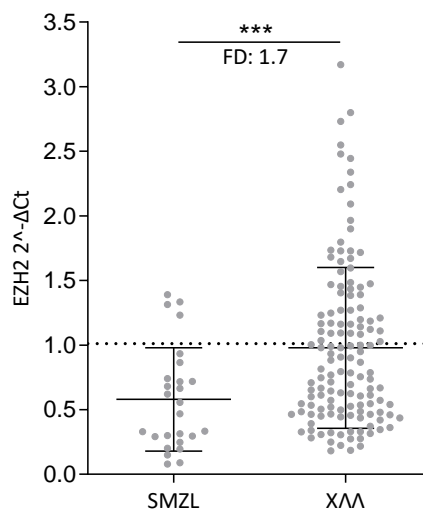
Αντίσωμα	Συγκέντρωση
Fixable Viability Stain (FVS)	400 μl/test (1:4000 in PBS 1X)
anti-pERK (mouse)	5 μl/test
Isotype IgG1-FITC (mouse)	0,5 μl/test
anti-NF-κB (mouse)	7 μl/test
Isotype IgG2b-PE (mouse)	2 μl/test
anti-EZH2 (mouse)	5 μl/test
Isotype IgG1-PE	0,5 μl/test
anti-Ki67 (mouse)	10 μl/test
Isotype IgG1-FITC (mouse)	10 μl/test
anti-H3K27me3	1 μl/test (1:100 in incubation buffer)

4. Αποτελέσματα

4.1 Η EZH2 εκφράζεται ετερογενώς στα Β κύτταρα του ΣΛΟΖ

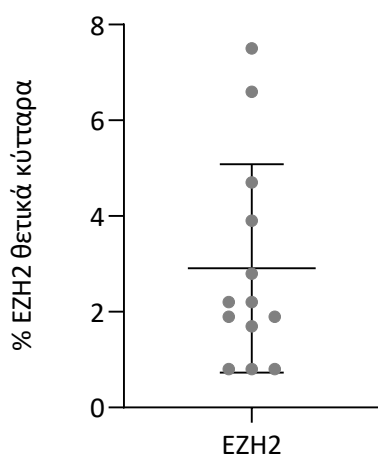
Πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση της έκφρασης της μεθυλοτρανσφεράσης EZH2 σε επίπεδο mRNA με την χρήση της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι η EZH2 εκφράζεται ετερογενώς σε επίπεδο mRNA ($2^{-\Delta Ct}$: 0.079-1.38) (Εικόνα 9), σε σύνολο 26 ασθενών με ΣΛΟΖ που μελετήθηκαν. Ακολούθησε σύγκριση των επιπέδων έκφρασης της μεθυλοτρανσφεράσης μεταξύ του ΣΛΟΖ και της Χρόνιας Λεμφοκυτταρικής Λευχαιμίας (ΧΛΛ) ($n=133$, δεδομένα δημοσίευσης από Parakonstantinou et al., 2016)⁵⁹ και παρατηρήθηκε πως στο ΣΛΟΖ εντοπίζονται στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης της EZH2 [διαφορά έκφρασης (Fold difference, FD:1.7; $p<0.001$)] (Εικόνα 9).

Η υψηλή ετερογένεια έκφρασης της EZH2 στα δείγματα του ΣΛΟΖ οδήγησε στην κατανομή των ασθενών σε δυο υποσύνολα, χαμηλής και υψηλής έκφρασης του μορίου, μέσω της ανάλυσης ROC Curve. Ως οριακή τιμή για την ταξινόμηση θεσπίστηκε η τιμή $2^{-\Delta Ct}$: 1.012 (ευαισθησία: 84.62% /ειδικότητα: 100%). Ασθενείς με υψηλότερη τιμή έκφρασης της οριακής, κατατάχθηκαν ως EZH2^{high} (4/26, 15%) ενώ όσοι είχαν χαμηλότερη τιμή ως EZH2^{low} (22/26, 85%) (Εικόνα 9).



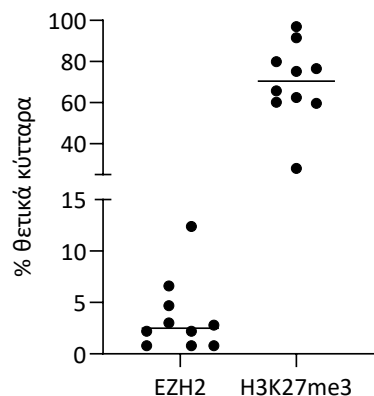
Εικόνα 9. Διάγραμμα που παρουσιάζει τα μεγέθη της μέσης τιμής και της τυπικής απόκλισης των επιπέδων έκφρασης της EZH2 σε επίπεδο mRNA σε 26 περιπτώσεις ΣΛΟΖ και 133 περιπτώσεις ΧΛΛ. Κάθε σημείο του διαγράμματος αντιπροσωπεύει έναν ασθενή, με τη διακεκομμένη γραμμή να παρουσιάζει το κατώφλι διαχωρισμού (1.012) στα υποσύνολα EZH2^{high} και EZH2^{low}, με βάση την ανάλυση ROC Curve. Η διαφορά στατιστικής σημαντικότητας ορίζεται ως *** $p < 0.001$, FD: Διαφορά Έκφρασης (fold difference).

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν πειράματα κυτταρομετρίας ροής με στόχο τη μέτρηση της έκφρασης της EZH2 σε πρωτεϊνικό επίπεδο, σε μια ομάδα ασθενών με ΣΛΟΖ (n=13). Τα φαινόμενα της ετερογένειας στην έκφραση της EZH2 παρατηρήθηκε και στο πρωτεϊνικό επίπεδο μεταξύ των διαφορετικών ασθενών (EZH2⁺ κύτταρα: 0.8-7.5%) (Εικόνα 10).

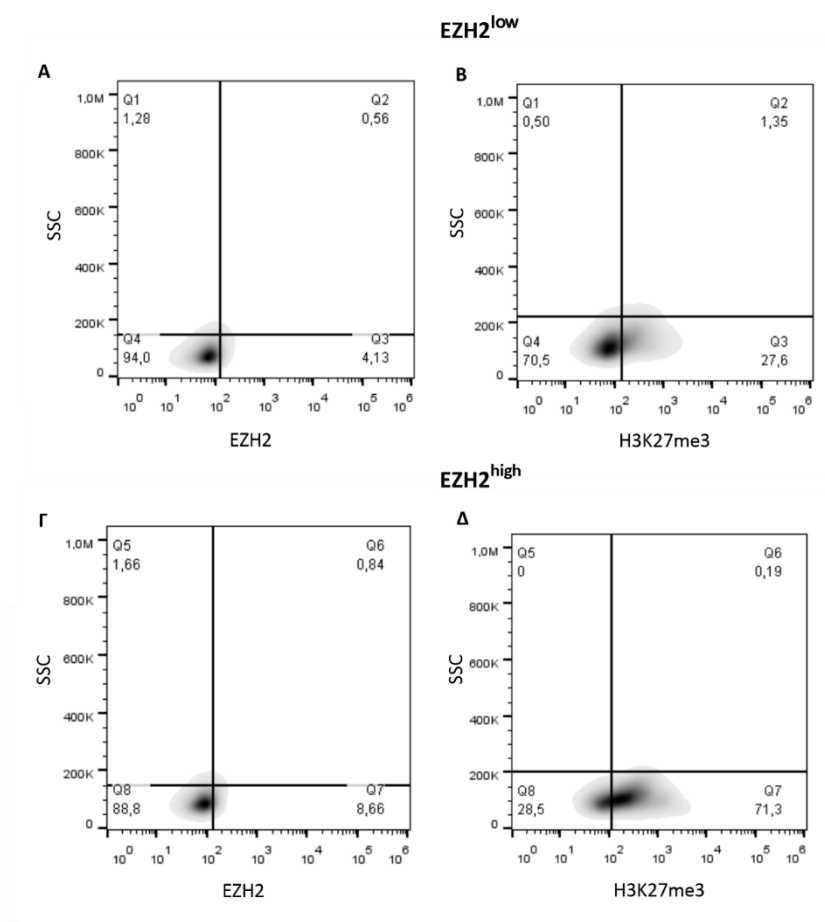


Εικόνα 10. Γράφημα της μέσης τιμής και της τυπικής απόκλισης του ποσοστού της έκφρασης της EZH2 σε πρωτεϊνικό επίπεδο, σε 13 περιπτώσεις ΣΛΟΖ. Στο διάγραμμα, κάθε σημείο αντιπροσωπεύει έναν ασθενή.

Επίσης, ταυτοποιήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης της τριμεθυλιωμένης λυσίνης 27 στην ιστόνη 3 (H3K27me3). Διαπιστώθηκε ότι η H3K27me3 εμφανίζει αυξημένα επίπεδα αλλά και διακυμάνσεις στην έκφρασή της στο σύνολο των ασθενών που μελετήθηκαν (n=10) (H3K27me3⁺ κύτταρα: 28-91.5%) (Εικόνες 11 και 12).



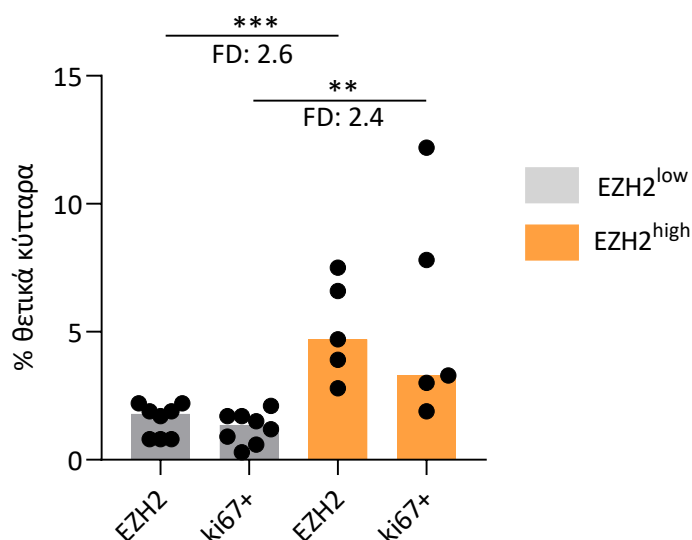
Εικόνα 11. Απεικόνιση της μέσης τιμής και της τυπικής απόκλισης του ποσοστού της έκφρασης της EZH2 και της H3K27me3, σε επίπεδο πρωτεΐνης, σε 10 ασθενείς με ΣΛΟΖ.



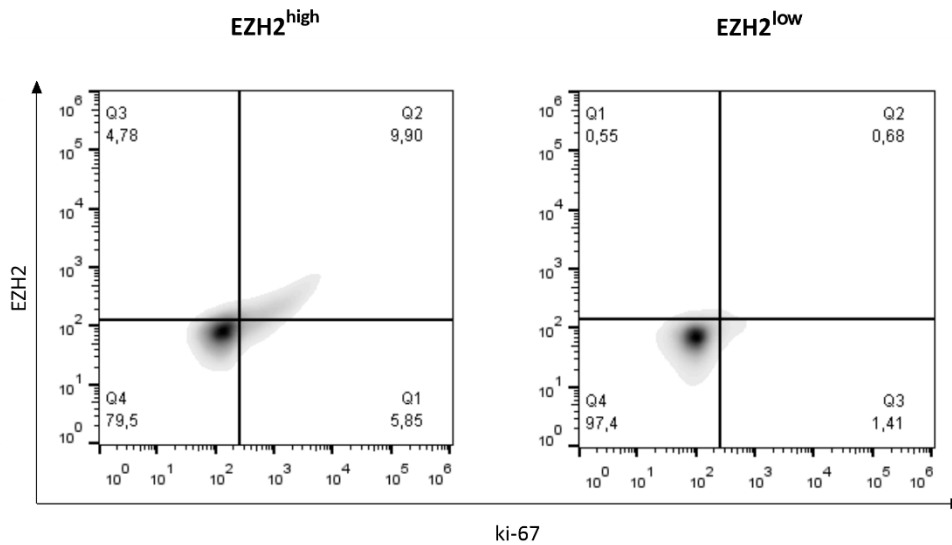
Εικόνα 12. Απεικόνιση με στικτογράμματα (dot plot) των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας ροής, κατά την οποία μετρήθηκαν τα ποσοστά έκφρασης των EZH2⁺ κυττάρων (Α, Γ) και H3K27me3⁺ κυττάρων (Β, Δ) σε δύο αντιπροσωπευτικές περιπτώσεις ασθενών με ΣΛΟΖ. (Α-Β) EZH2^{low} περίπτωση ασθενούς και (Γ-Δ) EZH2^{high} περίπτωση ασθενούς. SSC: πλάγιος σκεδασμός (side-scatter).

4.2 Τα κύτταρα του ΣΛΟΖ με ικανότητα πολλαπλασιασμού εκφράζουν EZH2

Στην ΧΛΛ το μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων με ικανότητα πολλαπλασιασμού έχει παρατηρηθεί πως εκφράζουν τη μεθυλοτρανσφεράση EZH2⁵⁹. Για να διαπιστωθεί αν κάτι παρόμοιο ισχύει και σε ασθενείς με ΣΛΟΖ, με χρήση κυτταρομετρίας ροής μετρήθηκαν τα ποσοστά έκφρασης του δείκτη πολλαπλασιασμού των κυττάρων Ki-67 (%Ki67⁺ κύτταρα) και το ποσοστό αυτών που είναι EZH2⁺, σε σύνολο 13 ασθενών. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης ανέδειξαν διαφορά στο ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων μεταξύ των διαφορετικών περιπτώσεων ΣΛΟΖ (0.3-12.2%). Μεγαλύτερη πολλαπλασιαστική ικανότητα (Ki67⁺ κύτταρα) βρέθηκε να διαθέτουν τα κύτταρα ΣΛΟΖ με υψηλή EZH2 (EZH2^{high}) έναντι των κυττάρων με χαμηλή έκφραση της EZH2 (EZH2^{low}) (FD: 2.4; p<0.01). (Εικόνες 13 και 14).



Εικόνα 13. Μέση τιμή του ποσοστού έκφρασης των EZH2⁺ και Ki67⁺ κυττάρων σε 13 ασθενείς με ΣΛΟΖ. Κάθε κουκίδα αντιπροσωπεύει έναν ασθενή. Οι ασθενείς χωρίζονται σε EZH2^{high} και EZH2^{low} όπως υποδεικνύεται από τα αντίστοιχα χρώματα. Η διαφορά στατιστικής σημαντικότητας ορίζεται ως ***p<0.001, FD: Διαφορά Έκφρασης (fold difference).

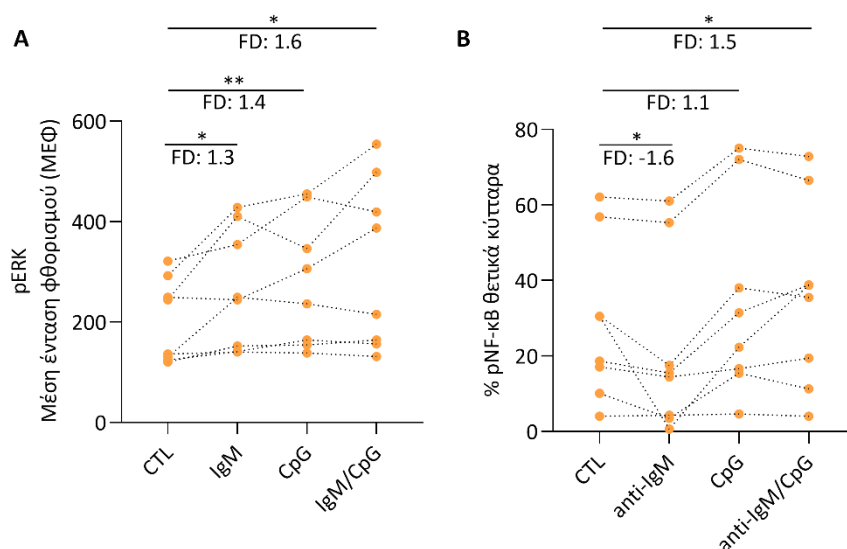


Εικόνα 14. Στο στικτόγραμμα (dot plot) παρουσιάζονται τα ποσοστά έκφρασης των $Ki67^+$ ή/και των $EZH2^+$ κυττάρων όπως μετρήθηκαν με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής στην περίπτωση δυο αντιπροσωπευτικών ασθενών με ΣΛΟΖ, ενός $EZH2^{high}$ και ενός $EZH2^{low}$. Ο άξονας x απεικονίζει την έκφραση της $Ki67$ και ο άξονας y την έκφραση της $EZH2$.

4.3 Τα κύτταρα του ΣΛΟΖ ανταποκρίνονται στα ερεθίσματα του μικροπεριβάλλοντος

Για να μελετηθεί η απόκριση των κυττάρων του ΣΛΟΖ σε εξωγενή ερεθίσματα του μικροπεριβάλλοντος μέσω των υποδοχών που εκφράζουν, πραγματοποιήθηκε διέγερση σε κύτταρα 8 ασθενών μέσω του BKY με anti-IgM ή/και του TLR9 με CpG για 60 λεπτά. Στη συνέχεια, μετρήθηκε η φωσφορυλίωση της κινάσης ERK (pERK) και του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB (pNF-κB) με κυτταρομετρία ροής.

Παρατηρήσαμε ότι τα κύτταρα του ΣΛΟΖ αποκρίνονται τόσο στη διέγερση μέσω του BKY όσο και μέσω του TLR9 με μεταβολές στην έκφραση των υπό μελέτη μορίων σε σχέση με τα αντίστοιχα αδιέγερτα κύτταρα. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αύξηση της φωσφορυλιωμένης ERK τόσο στις μονές διεγέρσεις όσο και στη διπλή διέγερση μέσω BKY και TLR9, όπου διαπιστώθηκε η μέγιστη επαγωγή έκφρασης (FD: 1.6; $p < 0.05$) (Εικόνα 15A). Αντίθετα, στην περίπτωση του NF-κB, κάθε διέγερση προκαλούσε διαφορετικό μοτίβο στη ρύθμιση της φωσφορυλίωσης. Ωστόσο, και εδώ η διπλή διέγερση οδήγησε σε σημαντική αύξηση του ποσοστού των $pNF-κB^+$ κυττάρων (FD: 1.5; $p < 0.05$) (Εικόνα 15B).

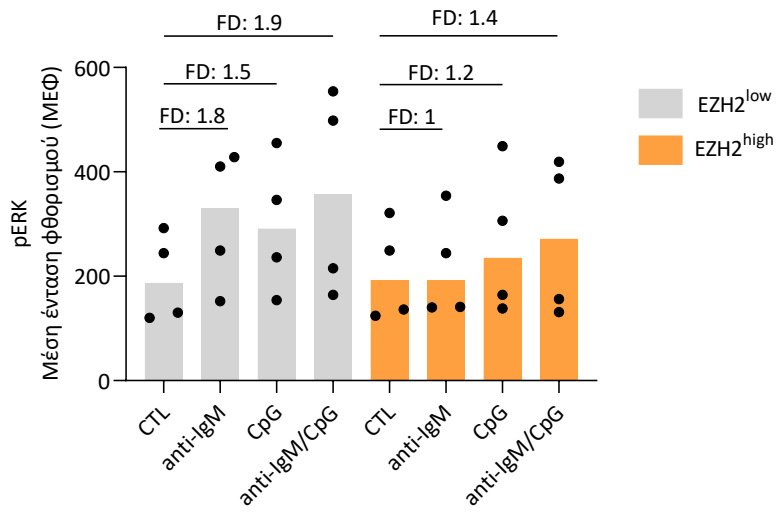


Εικόνα 15. Απεικόνιση της μέσης έντασης φθορισμού (ΜΕΦ) της φωσφορυλιωμένης κινάσης ERK (p ERK) (A) και του ποσοστού των pNF-κΒ⁺ κυττάρων (pNF-κΒ) (B) για τα κύτταρα 8 ασθενών με ΣΛΟΖ. Η έκφραση μετρήθηκε με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής μετά την ενεργοποίηση του ΒΚΥ ή/και του TLR9. Κάθε τελεία αντιπροσωπεύει το ποσοστό έκφρασης ενός ασθενούς, ενώ η γραμμή συνδέει τα ποσοστά έκφρασης κάθε ασθενούς σε όλες τις καταστάσεις. Οι διαφορές στατιστικής σημαντικότητας ορίζονται ως * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, FD: Διαφορά Έκφρασης (fold difference).

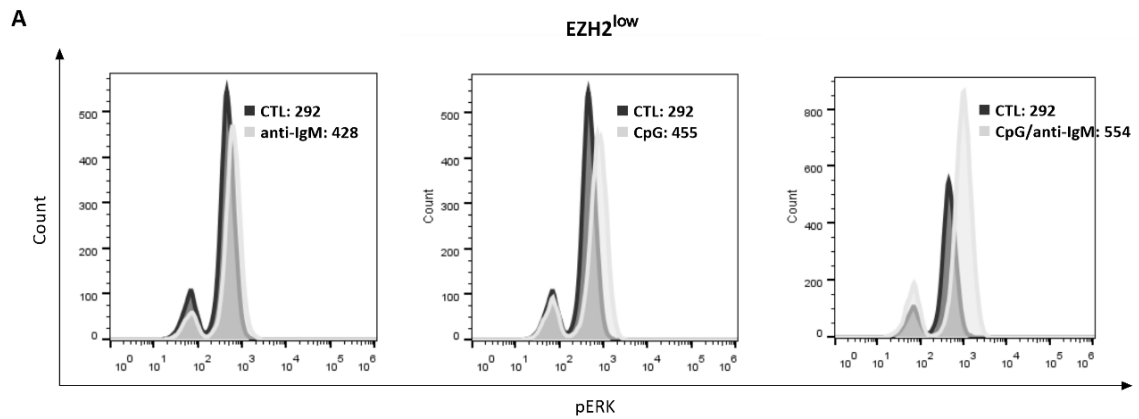
4.4 Η διάκριση σε EZH2^{high} και EZH2^{low} περιπτώσεις αναδεικνύει

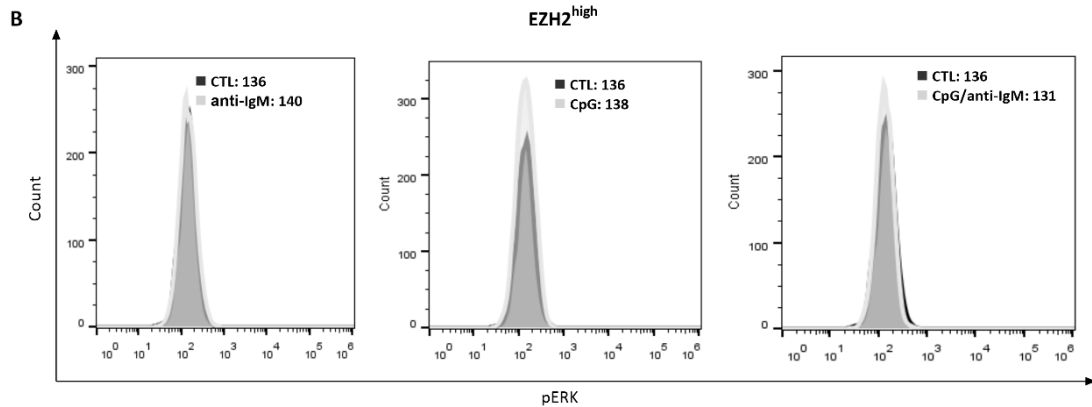
παρόμοια πρότυπα απαντήσεων στις διεγέρσεις μέσω ΒΚΥ ή/και TLR9

Στη συνέχεια εξετάσαμε εάν οι ασθενείς με διαφορετικά επίπεδα EZH2 (EZH2^{high} και EZH2^{low} με βάση την ανάλυση του mRNA) παρουσιάζουν διαφορετικά προφίλ ενεργοποίησης μετά από ενεργοποίηση μέσω του ΒΚΥ ή/και του TLR9. Από τους 8 ασθενείς που αναλύθηκαν οι μισοί παρουσίαζαν υψηλή έκφραση της EZH2 (EZH2^{high}) ενώ οι υπόλοιποι χαμηλή (EZH2^{low}). Η ανάλυση της pERK, η οποία είναι κίριο μόριο του μονοπατιού καθοδικά των υποδοχέων ΒΚΥ και TLR9, ανέδειξε παρόμοια προφίλ ενεργοποίησης ανάμεσα στις δύο ομάδες ασθενών. Ωστόσο, οι EZH2^{low} ασθενείς παρουσίασαν ισχυρότερες αποκρίσεις σε σχέση με τους EZH2^{high} και στις τρεις κατηγορίες διεγέρσεων, με τη μέγιστη αύξηση φωσφορυλίωσης της ERK να παρατηρείται στη διπλή διέγερση (ΒΚΥ FD: 1.8, TLR9 FD: 1.5, ΒΚΥ/TLR9 FD: 1.9) (Εικόνες 16 και 17). Στους EZH2^{high} ασθενείς, η διέγερση μέσω ΒΚΥ δεν είχε καμία επίδραση στα επίπεδα της pERK, ενώ παρατηρήθηκαν μικρές αυξήσεις σε σχέση με τα αδιέγερτα κύτταρα control τόσο κατά τη διέγερση με CpG (FD: 1.2) όσο και κατά τη διπλή διέγερση (FD: 1.4).



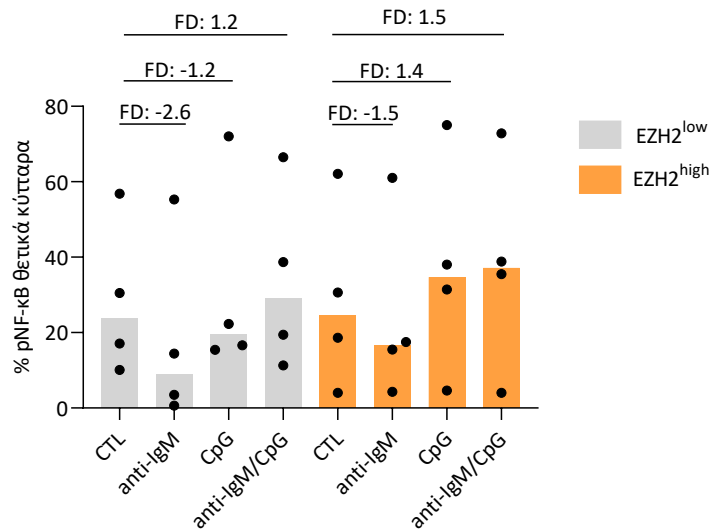
Εικόνα 16. Απεικόνιση της μέσης έντασης φθορισμού (ΜΕΦ) της φωσφορυλιωμένης κινάσης ERK έπειτα από διεγέρσεις του ΒΚΥ ή/και του TLR9 στο σύνολο των 8 ασθενών οι οποίοι έχουν χωριστεί με βάση την ταξινόμησή τους σε EZH2^{high} και EZH2^{low}. FD: Διαφορά Έκφρασης (fold difference).





Εικόνα 17. Αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα τα οποία απεικονίζουν τη μέση ένταση φθορισμού (ΜΕΦ) της pERK σε κύτταρα ασθενή με ΣΛΟΖ ο οποίος ταξινομείται ως EZH2^{low} (Α) και σε κύτταρα ασθενή με ΣΛΟΖ ο οποίος ταξινομείται ως EZH2^{high} (Β) έπειτα από διέγερση μέσω BKY, TLR9 και συνδιέγερση μέσω BKY/TLR9.

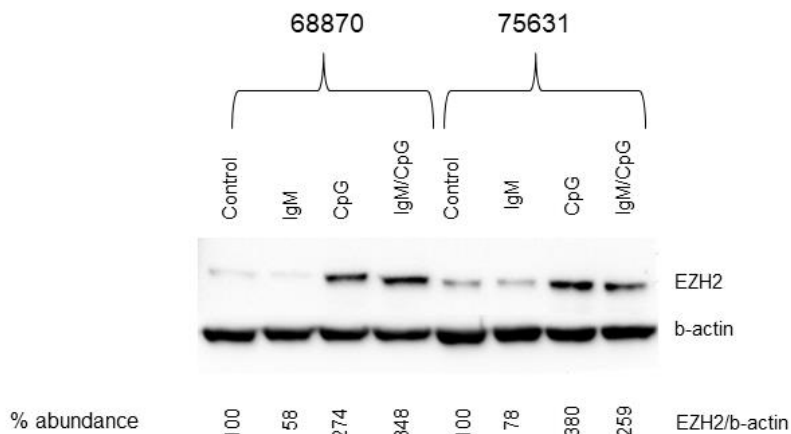
Επιπλέον, η μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού του NF-κΒ, το οποίο ενεργοποιείται επίσης μέσω του BKY και του TLR, ανέδειξε και σε αυτή την περίπτωση παρεμφερή πρότυπα απάντησης στους διεγέρτες μεταξύ των EZH2^{high} και EZH2^{low} ασθενών. Πιο συγκεκριμένα, η ανάλυση έδειξε ισχυρή μείωση του ποσοστού των pNF-κΒ⁺ κυττάρων έπειτα από διέγερση με anti-IgM τόσο στους EZH2^{low} (FD: -2.6) όσο και στους EZH2^{high} (FD: -1.5) ασθενείς. Στην περίπτωση της διέγερσης με CpG, οι EZH2^{low} ασθενείς συνέχισαν να παρουσιάζουν μειωμένα pNF-κΒ⁺ κύτταρα (FD: -1.2), ενώ οι EZH2^{high} ασθενείς αύξησαν το ποσοστό των pNF-κΒ⁺ σε σχέση με το αδιέγερτο control (FD: 1.4). Αντίθετα, η διπλή διέγερση είχε ως αποτέλεσμα την καθολική επαγωγή του ποσοστού των pNF-κΒ⁺ κυττάρων στις δυο κατηγορίες ασθενών (EZH2^{low} FD: 1.2, EZH2^{high} FD:1.5) (Εικόνα 18).



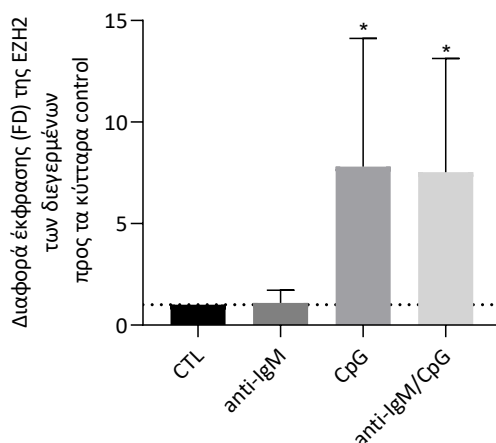
Εικόνα 18. Απεικόνιση του ποσοστού της έκφρασης του pNF-κΒ έπειτα από διεγέρσεις του ΒΚΥ ή/και του TLR9 στο σύνολο των 8 ασθενών οι οποίοι είχαν διακριθεί με βάση την ταξινόμησή τους σε EZH2^{high} και EZH2^{low}. FD: Διαφορά Έκφρασης (fold difference).

4.5 Η διέγερση του TLR9 και η συν-διέγερση ΒΚΥ/TLR9 επάγουν την έκφραση της EZH2 στο ΣΛΟΖ

Στη συνέχεια μελετήσαμε την πιθανή επίδραση της άνοσης σηματοδότησης στα επίπεδα έκφρασης της EZH2. Σε κύτταρα 4 ασθενών με ΣΛΟΖ πραγματοποιήσαμε διέγερση μέσω ΒΚΥ με anti-IgM ή/και του TLR9 με CpG για 24 ώρες και στη συνέχεια μετρήσαμε τα επίπεδα της EZH2 με ανοσοανίχνευση western (Εικόνα 19). Παρατηρήσαμε ότι η έκφραση της EZH2 αυξάνεται στατιστικά σημαντικά έπειτα από διέγερση του TLR9 (FD: 5.8; $p < 0.05$) καθώς και έπειτα από συν-διέγερση των ΒΚΥ/TLR9 (FD: 6; $p < 0.05$) σε σχέση με τα αδιεγέρτα κύτταρα control (Εικόνα 20).



Εικόνα 19. Αποτελέσματα ανοσοανίχνευσης western blot για την έκφραση της πρωτεΐνης EZH2 σε κύτταρα δυο αντιπροσωπευτικών ασθενών με ΣΛΟΖ. Η μέτρηση έγινε έπειτα από διέγερση μέσω του ΒΚΥ ή/και του TLR9 για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα της μέτρησης της EZH2 κανονικοποιήθηκαν ως προς το αδιέγερτο control που ορίστηκε ως 100%.



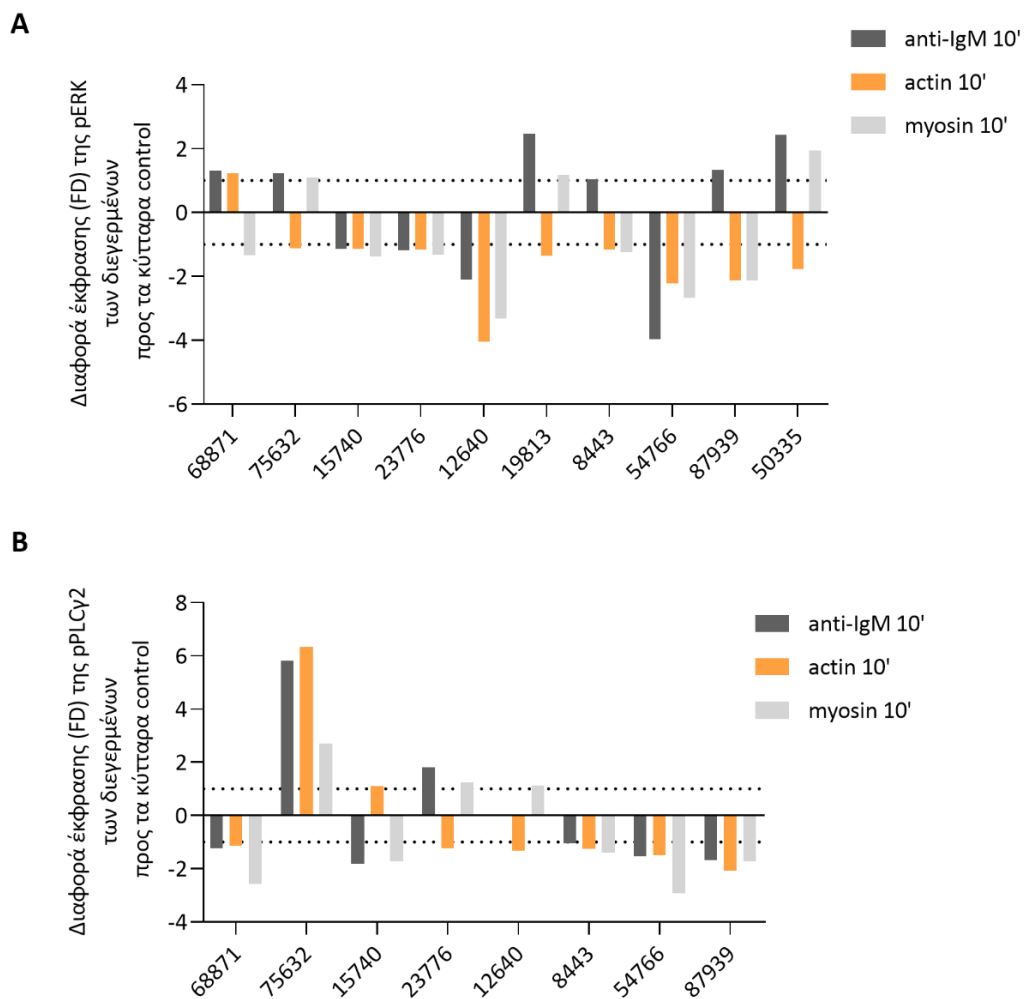
Εικόνα 20. Απεικόνιση της μέσης τιμής και της τυπικής απόκλισης της διαφοράς έκφρασης (FD: fold difference) της EZH2 έπειτα από διέγερση μέσω του ΒΚΥ ή/και του TLR9. Τα αποτελέσματα της μέτρησης της EZH2 κανονικοποιήθηκαν ως προς το αδιέγερτο control που ορίστηκε ως 1 (FD:1). * $p < 0.05$.

4.6 Ο ΒΚΥ ενεργοποιείται από τα συγγενή αντιγόνα ακτίνη και μυοσίνη στο ΣΛΟΖ

Στη συνέχεια θελήσαμε να μελετήσουμε εάν τα κύτταρα του ΣΛΟΖ απαντούν σε ερεθίσματα που αφορούν σε φυσικά αυτοαντιγόνα, όπως η ακτίνη και η μυοσίνη, σημαντικά δομικά

συστατικά του κυτταρικού σκελετού. Για το λόγο αυτό, διεγείραμε τα κύτταρα 10 ασθενών με anti-IgM, ακτίνη και μυοσίνη για 10 λεπτά και στη συνέχεια μετρήσαμε τη φωσφορυλίωση της PLC γ 2 και της κινάσης ERK με ανοσοανίχνευση western. Και τα δυο αυτά μόρια σηματοδοτούν καθοδικά του ΒΚΥ με την PLC γ 2 να βρίσκεται στην αρχή του μονοπατιού. Παρατηρήσαμε ότι η διέγερση των ΣΛΟΖ κυττάρων με ακτίνη και μυοσίνη οδήγησε σε αλλαγές στην έκφραση της pERK ή/και pPLC γ 2, κυρίως σε μείωση έκφρασης και των δυο μορίων. Πιο συγκεκριμένα, η διέγερση με ακτίνη και μυοσίνη είχε ως αποτέλεσμα την ελάττωση της pERK σε 5/10 και 6/10 περιπτώσεις, αντιστοίχως, ενώ σε μόλις μια περίπτωση η μυοσίνη προκάλεσε αύξηση της pERK (Εικόνα 21A).

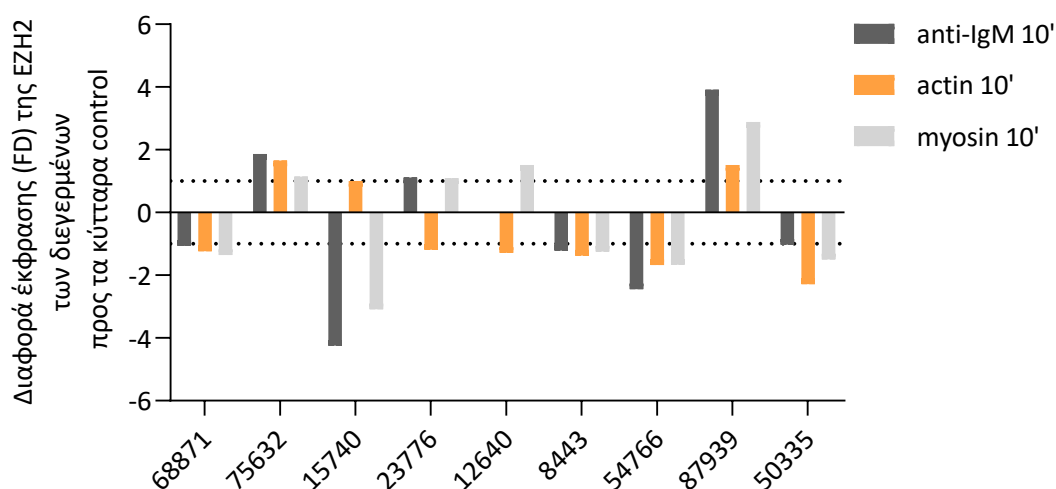
Αναφορικά με την έκφραση της pPLC γ 2, η διέγερση με ακτίνη και μυοσίνη είχε ως αποτέλεσμα την ελάττωσή της σε 4/8 και 5/8 περιπτώσεις, αντιστοίχως, ενώ σε έναν ασθενή παρατηρήθηκε αύξηση της pPLC γ 2 ως απάντηση και στις δυο διεγέρσεις (Εικόνα 21B).



Εικόνα 21. Απεικόνιση της διαφοράς έκφρασης (FD: fold difference) της pERK (A) και της pPLCγ2 (B) έπειτα από διέγερση με anti-IgM, ακτίνη και μυοσίνη. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων κανονικοποιήθηκαν ως προς το αδιέγερτο control που ορίστηκε ως 1 (FD:1).

4.7 Η έκφραση της EZH2 ρυθμίζεται από τη διέγερση με τα αντιγόνα ακτίνη και μυοσίνη στο ΣΛΟΖ

Επιπλέον, αποφασίσαμε να μελετήσουμε την πιθανή επίδραση των αυτοαντιγόνων ακτίνη και μυοσίνη στην έκφραση της EZH2. Για το σκοπό αυτό, διεγείραμε τα κύτταρα 9 ασθενών με anti-IgM, ακτίνη και μυοσίνη για 10 λεπτά και στη συνέχεια μετρήσαμε την έκφραση της EZH2 με ανοσοανίχνευση western. Η ανάλυση έδειξε ότι 8/9 περιπτώσεις αποκρίθηκαν είτε στη μια είτε και στις 2 διεγέρσεις, ωστόσο οι αλλαγές στην έκφραση της EZH2 αφορούσαν τόσο σε μείωση όσο και σε αύξηση, χωρίς να παρατηρείται κάποιο συγκεκριμένο πρότυπο αλλαγών (Εικόνα 22).



Εικόνα 22. Απεικόνιση της διαφοράς έκφρασης (FD: fold difference) της EZH2 έπειτα από διέγερση με anti-IgM, ακτίνη και μυοσίνη. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων κανονικοποιήθηκαν ως προς το αδιέγερτο control που ορίστηκε ως 1 (FD:1).

5. Συζήτηση

Η απορρύθμιση της έκφρασης της μεθυλοτρανσφεράσης EZH2 έχει συνδεθεί με ογκογένεση και ανάπτυξη διαφόρων τύπων καρκίνου. Αυξημένα επίπεδα έκφρασης του ενζύμου έχουν ταυτοποιηθεί σε κάποια μη Hodgkin λεμφώματα, όπως η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία και το διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β κύτταρα ^{59,60}

Το ΣΛΟΖ είναι ένα σπάνιο είδος μη Hodgkin λεμφώματος, του οποίου η παθογένεση δεν έχει αποσαφηνιστεί. Με τα μέχρι πρότινος δεδομένα, η έκφραση της EZH2 δεν έχει συνδεθεί με το ΣΛΟΖ, ζήτημα με το οποίο ασχολείται η παρούσα εργασία.

Αρχικά, ερευνήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης της EZH2, τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και πρωτεΐνης, σε κύτταρα ασθενών με ΣΛΟΖ. Η ανάλυση κατέδειξε μεγάλη διακύμανση της έκφρασης μεταξύ των διαφορετικών περιπτώσεων ΣΛΟΖ. Υποθετικά, τα διαφορετικά πρότυπα έκφρασης της EZH2 μπορεί να αποδοθούν στην υψηλή συχνότητα εμφάνισης ελλείψεων στην χρωμοσωμική περιοχή 7q σε ασθενείς με ΣΛΟΖ, περιοχή όπου εδράζεται το υπεύθυνο γονίδιο για την έκφραση της EZH2. Ωστόσο, αναλογιζόμενοι τον περίπλοκο μηχανισμό ρύθμισης του ενζύμου της μεθυλοτρανσφεράσης, τόσο από μεταγραφικούς παράγοντες όσο και από miRNA ⁶¹, οποιαδήποτε συσχέτιση δε μπορεί να θεωρείται βέβαιη.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων διαφορετικών περιπτώσεων ΣΛΟΖ με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής και διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ασθενών. Ενδιαφέρον προκαλεί η παρατήρηση πως τα κύτταρα των ασθενών που κατατάχθηκαν στο υποσύνολο υψηλής έκφρασης EZH2 (EZH2^{high}) είχαν έντονη, τουλάχιστον διπλάσια, πολλαπλασιαστική ικανότητα σε σύγκριση με αυτά των ασθενών του υποσυνόλου χαμηλής έκφρασης EZH2 (EZH2^{low}). Τα παραπάνω αποτελέσματα συνάδουν με δεδομένα ερευνών, που έχουν δείξει πως αυξημένα επίπεδα EZH2 συνοδεύονται από υψηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων σε Β και Τ νεοπλασίες ^{53,62}.

Επόμενο ζήτημα μελέτης αποτέλεσε η δυνατότητα απόκρισης των Β λεμφοκυττάρων ασθενών με ΣΛΟΖ σε ερεθίσματα του μικροπεριβάλλοντος, καθώς έχει βρεθεί πως το μικροπεριβάλλον επηρεάζει την εξέλιξη του όγκου και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων ποικιλοτρόπως ⁶³. Πραγματοποιήθηκαν διεγέρσεις του ΒΚΥ ή/και των TLR σε κύτταρα ασθενών με ΣΛΟΖ με σκοπό την ανίχνευση μοτίβων σηματοδότησης, όπως έχουν εντοπιστεί και σε παρόμοιες μελέτες διέγερσης του ΒΚΥ σε ασθενείς με ΧΛΛ ⁶⁴. Για τους υποδοχείς TLR είναι γνωστό πως συμβάλλουν σε αναπτυξιακές διεργασίες των Β λεμφοκυττάρων, ενώ σε περιπτώσεις συνεργικής σηματοδότησης με τον ΒΚΥ προάγουν τη

μετανάστευση των φυσιολογικών Β λεμφοκυττάρων οριακής ζώνης και την έκκριση αντισωμάτων^{7,39}. Συγκεκριμένα στο ΣΛΟΖ, η διέγερση του TLR9 έχει ρόλο στην ενεργοποίηση, στον πολλαπλασιασμό και την διεύρυνση του κλώνου των καρκινικών κυττάρων⁶⁵.

Στα μονοπάτια διακυτταρικής σηματοδότησης καθοδικά του BKY και των TLR, εμπλέκεται πλήθος μορίων που τελικώς επιτελούν την ενεργοποίηση των MAP κινάσων και του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ⁶³. Διεγείροντας τον BKY, ενεργοποιείται η κινάση BTK (Bruton's tyrosine kinase) η οποία μέσω και της PLCγ2, απελευθερώνει ασβέστιο ενδοκυττάρια και ενεργοποιεί τις MAP κινάσες, ενώ συνέπεια της διέγερσης είναι και η ενεργοποίηση του NF-κΒ που επέρχεται από την κινάση IKK. Επιπλέον, η κινάση ERK αποτελεί μόριο το οποίο μπορεί να ενεργοποιηθεί μέσω και των δυο τύπων υποδοχέων, BKY και TLR⁶³.

Στα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, μετά από τις διεγέρσεις του BKY και του TLR9 εντοπίζεται αυξητική τάση της φωσφορυλίωσης της ERK, ενώ για τη φωσφορυλίωση του NF-κΒ παρουσιάζεται διαφορετικό πρότυπο αλλαγών αναλογικά με το είδος της διέγερσης. Ειδικότερα, η διέγερση του BKY οδήγησε σε μειωμένα επίπεδα έκφρασης pNF-κΒ, ενώ, αντίθετα, η συνδιέγερση μέσω BKY/TLR9 προκάλεσε αύξηση των επιπέδων φωσφορυλίωσης του NF-κΒ.

Στη συνέχεια, έγινε ταξινόμηση των ασθενών σε δυο υποσύνολα με βάση τα επίπεδα έκφρασης της EZH2, EZH2^{high} και EZH2^{low}, και διαπιστώθηκαν παρόμοια μοτίβα απαντήσεων στις διεγέρσεις μέσω BKY ή/και TLR. Διαπιστώθηκε αξιοσημείωτη αύξηση της pERK μετά από διέγερση του TLR9, αποτέλεσμα σύμφωνο με προηγούμενη έρευνα που αφορά την σηματοδότηση μέσω TLR υποδοχέων στο ΣΛΟΖ⁶⁵. Επιπλέον, στην παρούσα εργασία αποδεικνύεται συνεργική δράση από τη συνδιέγερση μέσω BKY και TLR9 στην επαγωγή της φωσφορυλίωσης της ERK, και στα δυο υποσύνολα ασθενών⁶⁵. Συνολικά, οι EZH2^{low} ασθενείς παρουσίασαν ισχυρότερες αποκρίσεις σε σχέση με τους EZH2^{high} όσον αφορά στην επαγωγή της pERK, γεγονός που οδηγεί στην υπόθεση ότι η διαφορετική έκφραση της EZH2 στο ΣΛΟΖ συσχετίζεται με διαφορετική σηματοδότηση των κυττάρων.

Αναφορικά με τον pNF-κΒ, η επαγωγή έκφρασης που παρατηρήθηκε έπειτα από διέγερση του TLR9, στους ασθενείς που κατατάχθηκαν ως EZH2^{high}, συμφωνεί με δημοσιευμένα δεδομένα για το ΣΛΟΖ⁶⁵. Σχετικά με τον pNF-κΒ, σημαντικό εύρημα της παρούσας εργασίας αποτελεί η συνεργική δράση που παρατηρείται από τη συνδιέγερση μέσω BKY και TLR9 στην αύξηση της φωσφορυλίωσης του συγκεκριμένου μορίου και στα δυο υποσύνολα ασθενών.

Συνεπώς, γίνεται αντιληπτό πως η σηματοδότηση μέσω του BKY και των υποδοχέων TLR είναι πλήρως λειτουργική, οδηγώντας στην ενεργοποίηση των μονοπατιών καθοδικά και στην έκφραση συγκεκριμένων μορίων.

Επίσης, μελετήθηκε η έκφραση της EZH2 μετά από διέγερση του BKY ή/και των TLR υποδοχέων, με ήδη δημοσιευμένες μελέτες να έχουν συσχετίσει τη σηματοδότηση του μονοπατιού της ERK με αυξημένη έκφραση της EZH2 στο διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β λεμφοκύτταρα ⁶². Στην παρούσα εργασία διαπιστώθηκε αυξημένη έκφραση της EZH2 μετά από διέγερση του TLR9 ή συνδιέγερση BKY/TLR9, γεγονός που υποδηλώνει εμπλοκή του TLR9 στην ρύθμιση της έκφρασης της μεθυλοτρανσφεράσης.

Στο ΣΛΟΖ, οι Β κυτταρικοί υποδοχείς φέρουν ιδιότητες φυσικών αυτοαντισωμάτων, με κύριο χαρακτηριστικό την αναγνώριση αυτοαντιγόνων ⁵⁸. Βασιζόμενοι σε αδημοσίευτα δεδομένα της ερευνητικής ομάδας μας, τα οποία αποδεικνύουν ισχυρή αντιδραστικότητα των BKY του ΣΛΟΖ σε ποικίλα αυτοαντιγόνα, αποφασίσαμε να μελετήσουμε την επίδραση των αυτοαντιγόνων ακτίνη και μυοσίνη στη σηματοδότηση μέσω του BKY. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε πως ο BKY ενεργοποιείται τόσο από την ακτίνη όσο και τη μυοσίνη, όπως αποδεικνύεται από την αλλαγή της κατάστασης φωσφορυλίωσης των μορίων ERK και PLCγ2. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ελάττωση της έκφρασής τους στην πλειονότητα των ασθενών που μελετήθηκαν. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι και η έκφραση της EZH2 μεταβλήθηκε σε απόκριση στις διεγέρσεις με τα αυτοαντιγόνα, χωρίς ωστόσο να υπάρχει κοινό πρότυπο απάντησης μεταξύ των ασθενών.

Συνοπτικά, με την παρούσα εργασία ταυτοποιήσαμε την ετερογενή έκφραση της EZH2 στα Β λεμφοκύτταρα ασθενών με ΣΛΟΖ, σε επίπεδο μεταγράφων mRNA και σε επίπεδο πρωτεΐνης, ενώ διαπιστώσαμε και συσχέτισης μεταξύ της έκφρασης της EZH2 με την πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων του ΣΛΟΖ. Επίσης, αναδείξαμε την πλήρη λειτουργικότητα της σηματοδότησης μέσω των μονοπατιών του BKY και των TLR υποδοχέων, με την ενεργοποίηση του TLR9 μόνο ή και συνεργικά με τον BKY να φαίνεται πως επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης της EZH2. Τέλος, αποδείξαμε ότι τα αυτοαντιγόνα ακτίνη και μυοσίνη ενεργοποιούν τον BKY και επιπλέον, έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν την έκφραση της EZH2.

6. Βιβλιογραφία

1. Kindt, T., Goldsby, R., Osborne, B., & Kuby, J. (2007). *Kuby immunology*.
2. Janeway, C. A. & Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 197–216 (2002).
3. Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783–801 (2006).
4. Gordon, S. Pattern recognition receptors: Doubling up for the innate immune response. *Cell* **111**, 927–930 (2002).
5. Takeda, K. & Akira, S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* **17**, 1–14 (2005).
6. Lefranc, M.-P. & Gerard Lefranc. *The Immunoglobulin FactsBook*. (Academic Press, 2001).
7. Defrance, T., Casamayor-Pallejá, M. & Krammer, P. H. The life and death of a B cell. *Adv. Cancer Res.* **86**, 195–225 (2002).
8. Burmester, G.-R. & Pezzutto, A. *Color Atlas of Immunology*.
9. Lebien, T. W. & Tedder, T. F. B lymphocytes: How they develop and function. *Blood* **112**, 1570–1580 (2008).
10. Meffre, E. & Salmon, J. E. Autoantibody selection and production in early human life. *J. Clin. Invest.* **117**, 598–601 (2007).
11. Pillai, S., Cariappa, A. & Moran, S. T. Positive selection and lineage commitment during peripheral B-lymphocyte development. *Immunol. Rev.* **197**, 206–218 (2004).
12. Efremov, D. G., Gobessi, S. & Longo, P. G. Signaling pathways activated by antigen-receptor engagement in chronic lymphocytic leukemia B-cells. *Autoimmun. Rev.* **7**, 102–108 (2007).
13. Choudhary, G. S. *et al.* MCL-1 and BCL-xL-dependent resistance to the BCL-2 inhibitor ABT-199 can be overcome by preventing PI3K/AKT/mTOR activation in lymphoid malignancies. *Cell Death Dis.* **6**, e1593-12 (2015).

14. Spina, V. & Rossi, D. NF- κ B deregulation in splenic marginal zone lymphoma. *Semin. Cancer Biol.* **39**, 61–67 (2016).
15. Herishanu, Y. *et al.* The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF- κ B activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **117**, 563–574 (2011).
16. Martin, F. & Kearney, J. F. Marginal-zone B cells. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 323–335 (2002).
17. Lopes-Carvalho, T. & Kearney, J. F. Development and selection of marginal zone B cells. *Immunol. Rev.* **197**, 192–205 (2004).
18. Zandvoort, A. & Timens, W. The dual function of the splenic marginal zone: Essential for initiation of anti-TI-2 responses but also vital in the general first-line defense against blood-borne antigens. *Clin. Exp. Immunol.* **130**, 4–11 (2002).
19. Allman, D. & Pillai, S. Peripheral B Cell Subsets. *Curr. Opin. Immunology* **20**, 149–157 (2008).
20. Pillai, S., Cariappa, A. & Moran, S. T. Marginal zone B cells. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 161–196 (2005).
21. Kageyama, Y. & Katayama, N. Ontogeny of human B1 cells. *Int. J. Hematol.* **111**, 628–633 (2020).
22. Milner, E. C. B., Anolik, J., Cappione, A. & Sanz, I. Human innate B cells: A link between host defense and autoimmunity? *Springer Semin. Immunopathol.* **26**, 433–452 (2005).
23. Martin, F. & Kearney, J. F. Marginal-zone B cells. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 323–335 (2002).
24. Saito, T. *et al.* Notch2 Is Preferentially Expressed in Mature B Cells and Indispensable for Marginal Zone B Lineage Development. **18**, 675–685 (2003).
25. Marcus, R., Sweetenham, J. W. & Williams, M. E. *Lymphoma - Pathology, Diagnosis and Treatment*. (Cambridge University Press, 2013).
26. Joshi, M. *et al.* Marginal zone lymphoma: Old, new, targeted, and epigenetic therapies. *Ther. Adv. Hematol.* **3**, 275–290 (2012).
27. Zinzani, P. L. The many faces of marginal zone lymphoma. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* **2012**, 426–432 (2012).
28. Spina, V. & Rossi, D. Molecular pathogenesis of splenic and nodal marginal zone

- lymphoma. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **30**, 5–12 (2017).
29. Osciér, D., Owen, R. & Johnson, S. Splenic marginal zone lymphoma. *Blood Rev.* **19**, 39–51 (2005).
 30. Matutes, E. *et al.* Splenic marginal zone lymphoma proposals for a revision of diagnostic, staging and therapeutic criteria. **15**, 487–495 (2008).
 31. Matutes, E. Splenic marginal zone lymphoma: disease features and management. 735–745 (2013).
 32. Arcaini, L., Rossi, D. & Paulli, M. Splenic marginal zone lymphoma: From genetics to management. *Blood* **127**, 2072–2081 (2016).
 33. Bikos, V. *et al.* Over 30% of patients with splenic marginal zone lymphoma express the same immunoglobulin heavy variable gene: Ontogenetic implications. *Leukemia* **26**, 1638–1646 (2012).
 34. Bikos, V. *et al.* Selection of antigen receptors in splenic marginal-zone lymphoma: Further support from the analysis of the immunoglobulin light-chain gene repertoire. *Leukemia* **26**, 2567–2569 (2012).
 35. Salido, M. *et al.* Cytogenetic aberrations and their prognostic value in a series of 330 splenic marginal zone B-cell lymphomas: A multicenter study of the Splenic B-Cell Lymphoma Group. *Blood* **116**, 1479–1488 (2010).
 36. Rossi, D. *et al.* The coding genome of splenic marginal zone lymphoma: Activation of NOTCH2 and other pathways regulating marginal zone development. *J. Exp. Med.* **209**, 1537–1551 (2012).
 37. Kiel, M. J. *et al.* Whole-genome sequencing identifies recurrent somatic NOTCH2 mutations in splenic marginal zone lymphoma. **209**, 1553–1565 (2012).
 38. Akira, S. & Takeda, K. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 499–511 (2004).
 39. Rawlings, D. J., Schwartz, M. A., Jackson, S. W. & Meyer-Bahlburg, A. Integration of B cell responses through Toll-like receptors and antigen receptors. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 282–294 (2012).
 40. Portela, A. & Esteller, M. review Epigenetic modifications and human disease. *Nat. Publ. Gr.* **28**, 1057–1068 (2010).

41. Dawson, M. A. & Kouzarides, T. Review Cancer Epigenetics : From Mechanism to Therapy. *Cell* **150**, 12–27 (2012).
42. Ringrose, L., Ehret, H. & Paro, R. Distinct contributions of histone H3 lysine 9 and 27 methylation to locus-specific stability of Polycomb complexes. *Mol. Cell* **16**, 641–653 (2004).
43. Hock, H., Simon, C., Chagraoui, J. & Kros, J. A complex Polycomb issue : the two faces of EZH2 in cancer. 751–755 (2012) doi:10.1101/gad.191163.112.
44. Simon, J. A. & Lange, C. A. Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics. **647**, 21–29 (2008).
45. Tan, J., Yan, Y., Wang, X., Jiang, Y. & Xu, H. E. EZH2 : biology , disease , and structure-based drug discovery. *Nat. Publ. Gr.* **35**, 161–174 (2013).
46. Yamagishi, M. & Uchamaru, K. Targeting EZH2 in cancer therapy. (2017) doi:10.1097/CCO.0000000000000390.
47. Kaur, M. & Cole, M. D. MYC acts via the PTEN tumor suppressor to elicit autoregulation and genome-wide gene repression by activation of the Ezh2 methyltransferase. *Cancer Res.* **73**, 695–705 (2013).
48. Lund, K., Adams, P. D. & Copland, M. EZH2 in normal and malignant hematopoiesis. **28**, 44–49 (2013).
49. Béguelin, W. *et al.* EZH2 Is Required for Germinal Center Formation and Somatic EZH2 Mutations Promote Lymphoid Transformation. *Cancer Cell* **23**, 677–692 (2013).
50. Morin, R. D. *et al.* Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat. Genet.* **42**, 181–185 (2010).
51. Velichutina, I. *et al.* EZH2-mediated epigenetic silencing in germinal center B cells contributes to proliferation and lymphomagenesis. *Blood* **116**, 5247–5255 (2010).
52. DuPage, M. *et al.* The chromatin-modifying enzyme Ezh2 is critical for the maintenance of regulatory T cell identity after activation. *Immunity* **42**, 227–238 (2015).
53. Sasaki, D. *et al.* Overexpression of enhancer of zeste homolog 2 with trimethylation of lysine 27 on histone H3 in adult T-cell leukemia/lymphoma as a target for epigenetic therapy. *Haematologica* **96**, 712–719 (2011).

54. Kleer, C. G. *et al.* EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 11606–11611 (2003).
55. Ren, G. *et al.* Polycomb protein EZH2 regulates tumor invasion via the transcriptional repression of the metastasis suppressor RKIP in breast and prostate cancer. *Cancer Res.* **72**, 3091–3104 (2012).
56. Liu, Q. *et al.* Polycomb group proteins EZH2 and EED directly regulate androgen receptor in advanced prostate cancer. *Int. J. Cancer* **145**, 415–426 (2019).
57. Parry, M. *et al.* Whole exome sequencing identifies novel recurrently mutated genes in patients with splenic marginal zone lymphoma. *PLoS One* **8**, 1–5 (2013).
58. Zamanou, A., Samiotaki, M., Panayotou, G., Margaritis, L. & Lymberi, P. Fine specificity and subclasses of IgG anti-actin autoantibodies differ in health and disease. **20**, 333–344 (2003).
59. Papakonstantinou, N. *et al.* The histone methyltransferase EZH2 as a novel prosurvival factor in clinically aggressive chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget* **7**, 35946–35959 (2016).
60. Huet, S. *et al.* EZH2 alterations in follicular lymphoma: Biological and clinical correlations. *Blood Cancer J.* **7**, e555-8 (2017).
61. Yamaguchi, H. & Hung, M. C. Regulation and role of EZH2 in cancer. *Cancer Res. Treat.* **46**, 209–222 (2014).
62. Tian, X., Pelton, A., Shahsafaei, A. & Dorfman, D. M. Differential expression of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) protein in small cell and aggressive B-cell non-Hodgkin lymphomas and differential regulation of EZH2 expression by p-ERK1/2 and MYC in aggressive B-cell lymphomas. *Mod. Pathol.* **29**, 1050–1057 (2016).
63. Burger, J. A., Ghia, P., Rosenwald, A. & Caligaris-Cappio, F. The microenvironment in mature B-cell malignancies: A target for new treatment strategies. *Blood* **114**, 3367–3375 (2009).
64. Chatzouli, M. *et al.* Heterogeneous Functional Effects of Concomitant B Cell Receptor and TLR Stimulation in Chronic Lymphocytic Leukemia with Mutated versus Unmutated Ig Genes. *J. Immunol.* **192**, 4518–4524 (2014).

65. Fonte, E. *et al.* Toll-like receptor stimulation in splenic marginal zone lymphoma can modulate cell signaling, activation and proliferation. *Haematologica* **100**, 1460–1468 (2015).