



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΥΓΕΙΑΣ

Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη της μεταγραφικής έκφρασης των γονιδίων *BMP-2*, *BMP-6* και *Smad6* σε ασθενείς με πολλαπλό μύελωμα

Στόικος Παναγιώτης, Ιατρός

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Γιαννακούλας Νικόλαος, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας – Αιματολογίας, Επιβλέπων
- Μπόγδανος Δημήτριος, Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοανόσων Νοσημάτων, Διευθυντής
- Σπελέτας Ματθαίος, Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στην Αιματολογία

Λάρισα, Φεβρουάριος 2023



UNIVERSITY OF THESSALY

SCHOOL OF HEALTH  
SCIENCES

FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN  
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS

**Transcriptomic expression of *BMP-2*, *BMP-6* and *Smad6* genes in  
multiple myeloma patients**

By  
**Stoikos Panagiotis, MD**

Examination Committee:

- Giannakoulas Nikolaos, Associate Professor of Internal Medicine & Hematology, Supervisor
- Bogdanos Dimitrios, Professor of Internal Medicine and Autoimmune Diseases, Director
- Speletas Matthaïos, Professor of Medical Immunology

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Hematology

Larissa, February 2023

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</b> .....	8
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ – ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ</b> .....	9
<b>ABSTRACT – KEYWORDS</b> .....	10
<b>I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	11
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	11
<b>1.1 Επιδημιολογία</b> .....	14
<b>1.2 Παράγοντες κινδύνου</b> .....	15
<b>1.2.1 Περιβαλλοντικοί και επιγενετικοί παράγοντες</b> .....	15
<b>1.2.2 Γενετικοί παράγοντες</b> .....	15
<b>1.3 Παθογενετικοί μηχανισμοί</b> .....	15
<b>1.3.1 Έναρξη νόσου – Πρωτογενή γενετικά γεγονότα</b> .....	16
<b>1.3.2 Δευτερογενή γενετικά γεγονότα – Κλωνικά μοντέλα ανάπτυξης</b> .....	24
<b>1.3.3 Επιγενετικές ανωμαλίες</b> .....	27
<b>1.3.4 Μικροπεριβάλλον</b> .....	27
<b>1.3.4.1 Μεσεγχυματικά κύτταρα μυελού των οστών</b> .....	28
<b>1.3.4.2 Λιπώδης ιστός</b> .....	29
<b>1.3.4.3 Μόρια προσκόλλησης</b> .....	30
<b>1.3.4.4 Κυτταροκίνες και αυξητικοί παράγοντες</b> .....	30
<b>1.3.5 Ανοσοτροποποίηση</b> .....	32
<b>1.3.5.1 Κυτταρική αδράνεια</b> .....	32
<b>1.3.5.2 Αγγειακή αδράνεια</b> .....	32
<b>1.3.5.3 Ανοσολογικά επαγόμενη αδράνεια</b> .....	33
<b>2. ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ</b> .....	37
<b>2.1 Κλινική αξιολόγηση</b> .....	39
<b>2.2 Εργαστηριακός έλεγχος</b> .....	39
<b>2.3 Απεικονιστικός έλεγχος</b> .....	41
<b>2.4 Επιπρόσθετες εξετάσεις</b> .....	43

2.5 Νέες μέθοδοι ανίχνευσης.....	43
2.6 Διαστρωμάτωση κινδύνου και προγνωστικοί παράγοντες.....	44
2.7 Θεραπεία.....	46
2.7.1 Αρχική θεραπεία.....	49
2.7.2 Φαρμακευτική θεραπεία.....	49
2.7.3 ASCT.....	50
2.7.4 Διάρκεια και στόχος θεραπείας.....	51
2.7.5 Θεραπεία υποτροπής.....	51
2.7.5.1 Πρώτη υποτροπή.....	51
2.7.5.2 Δεύτερη υποτροπή.....	52
2.7.6 Τριπλά ανθεκτικό MM.....	53
2.8 Υποστηρικτική θεραπεία.....	54
2.8.1 Οστική νόσος.....	54
2.8.2 Λοιμώξεις.....	54
2.8.3 Καρδιαγγειακή και θρομβοεμβολική νόσος.....	55
2.8.4 Περιφερική νευροπάθεια.....	55
2.8.5 Νεφρική δυσλειτουργία.....	55
3. ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ BMPs.....	56
3.1 Υπερουκογένεια TGF-β.....	56
3.2 Μεταλλάξεις.....	57
3.3 Βιοσύνθεση, βιοδιαθεσιμότητα και βιοδραστικότητα.....	57
3.4 Ο ρόλος των κυστιδίων της θεμέλιας ουσίας.....	60
3.5 Ανταγωνιστές.....	60
3.5.1 Οι ανταγωνιστές Noggin, Chordin, DAN και Cerberus.....	61
3.6 Οι υποδοχείς των BMPs.....	62
3.6.1 Δομή των υποδοχέων.....	63
3.7 Σύνδεση με τους υποδοχείς και μεταγωγή σήματος.....	64
3.8 Συμπληρωματικοί υποδοχείς.....	66
3.8.1 Η βηταγλυκάνη.....	66

3.8.2 Η ενδογλίνη.....	67
3.8.3 Ο Cripto.....	68
3.8.4 Άλλοι συμπληρωματικοί υποδοχείς.....	68
3.9 <i>Id</i> γονίδια.....	69
<b>4. ΟΙ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ Smad.....</b>	<b>70</b>
4.1 Δομή.....	70
4.1.1 Ο ρόλος της περιοχής MH1.....	71
4.1.2 Η συνδετική περιοχή – linker.....	71
4.1.3 Ο ρόλος της περιοχής MH2.....	72
4.2 Σηματοδότηση.....	73
4.3 Smad-επαγόμενοι μεταγραφικοί παράγοντες.....	74
4.3.1 Runx2.....	74
4.3.2 GATA4/5/6.....	75
4.3.3 Menin.....	75
4.3.4 YY1.....	75
4.3.5 OAZ, Hoxc-8, SIP1.....	76
4.3.6 p300 και CBP.....	76
4.4 Μεταγραφική δραστηριότητα των R-Smads και ρύθμιση.....	77
4.5 Η ανακύκλωση των υποδοχέων.....	78
4.5.1 Ενδοκύτωση υποδοχέων μέσω κυστιδίων καλυμμένων με κλαθρίνη.....	78
4.5.2 Ενδοκύτωση υποδοχέων που βρίσκονται σε λιπιδικές σχεδίες πλούσιες σε καβεολίνη.....	79
4.6 Αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες και περαιτέρω ρύθμιση.....	80
4.6.1 Η πρωτεΐνη SARA.....	80
4.6.2 Η πρωτεΐνη Dab2.....	81
4.6.3 Οι πρωτεΐνες Ski και SnoN.....	82
4.6.4 Η κινάση CDK6 και οι πρωτεΐνες CIZ, SANE, U-CHIP και Tob.....	82
4.6.5 I-Smads.....	83
4.7 Μη-Smad σηματοδοτικά μονοπάτια των BMPs.....	84

4.7.1 Ενεργοποίηση ERK1/2.....	85
4.7.2 Ενεργοποίηση της JNK και του p38.....	86
4.7.3 Μονοπάτι της κινάσης ROCK.....	87
4.7.4 Μονοπάτι της κινάσης PI3K.....	87
<b>5. ΟΣΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΣΤΟ ΜΜ.....</b>	<b>88</b>
<b>5.1 Οστική αναδόμηση, απορρόφηση και σχηματισμός.....</b>	<b>88</b>
5.1.1 Οστεοβλάστες, οστεοκύτταρα και οστεοκλάστες.....	88
5.1.2 Ο ρόλος των BMUs και των MM κυττάρων στον (από)συντονισμό του οστικού μεταβολισμού.....	90
<b>5.2 Μοριακά μονοπάτια της αυξημένης οστεοκλαστικής δραστηριότητας.....</b>	<b>90</b>
5.2.1 RANK/RANKL/OPG.....	90
5.2.2 Μονοπάτι των Notch.....	91
5.2.3 Osteopontin.....	92
5.2.4 CCL-3 (MIP-1a)/ CCK-20.....	92
5.2.5 Activin A.....	92
5.2.6 Ιντερλευκίνες.....	93
5.2.7 TNF.....	93
5.2.8 BTK και SDF-1a.....	93
5.2.9 Annexin II.....	94
5.2.10 TGF-β και Smads.....	94
5.2.11 BMPs.....	95
<b>5.3 Μοριακά μονοπάτια ελαττωμένης οστεοβλαστικής δραστηριότητας.....</b>	<b>96</b>
5.3.1 Μονοπάτι Wnt/β-catenin.....	96
5.3.2 SFRP.....	97
5.3.3 DKK-1.....	97
5.3.4 Sclerostin.....	98
5.3.5 Periostin.....	98
5.3.6 Runx2, GFI-1 και IL-7.....	98
5.3.7 EphrinB2/EphB4.....	99

5.3.8 Υπερουκογένεια TNF.....	99
5.3.9 BMPs και TGF-β.....	100
5.4 MicroRNAs.....	101
5.4.1 miR221-5p.....	102
5.4.2 miR135b-5p.....	102
5.4.3 miR203a-3p.....	102
5.4.4 miR34a-5p.....	102
5.5 Θεραπεία οστική νόσου.....	103
<b>II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>104</b>
<b>6. ΥΛΙΚΑ.....</b>	<b>104</b>
<b>7. ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>108</b>
7.1 Απομόνωση στοιβάδας μονοπύρηνων κυττάρων.....	108
7.2 Παρασκευή γέλης ηλεκτροφόρησης.....	109
7.3 Απομόνωση RNA.....	109
7.4 Ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος απομονωθέντος RNA.....	111
7.5 Σύνθεση cDNA.....	112
7.6 Εκτέλεση ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου αντίστροφης μεταγραφής (real-time RT-qPCR).....	115
7.6.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου.....	115
7.6.2 Βασικές αρχές της PCR σε πραγματικό χρόνο.....	118
7.6.3 PCR σε πραγματικό χρόνο με χρωστικές που παρεμβάλλονται στο DNA.....	118
7.6.4 PCR σε πραγματικό χρόνο με τη χρήση τροποποιημένων νουκλεϊκών οξέων.....	120
7.6.5 Θερμοκυκλοποιητές πραγματικού χρόνου.....	121
7.6.6 Λήψη δεδομένων.....	122
7.6.7 Ποσοτικός προσδιορισμός με τη μέθοδο του συγκριτικού Ct.....	123
7.6.8 Πειραματική εκτέλεση real-time RT-qPCR.....	123
<b>8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>127</b>
<b>9. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>134</b>
<b>ΠΗΓΕΣ – ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>142</b>

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία αυτή ξεκίνησε ύστερα από προτροπή του αγαπητού Καθηγητή Δρ. Νικολάου Γιαννακούλα, Αναπληρωτή Καθηγητή Αιματολογίας – Παθολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, ο οποίος εδέχθη να επιβλέψει αλλά και να συνδράμει στην υλοποίηση αυτής της ερευνητικής εργασίας μέσω της διάθεσης των αναλωσίμων, των οικονομικών πόρων αλλά και του πολύτιμου του χρόνου για την καθοδήγηση στην συλλογή των δεδομένων, την εύρεση των απαραίτητων αναλωσίμων, την επεξεργασία των αποτελεσμάτων και την συγγραφή της παρούσης εργασίας.

Στόχος του εγχειρήματος ήταν η μελέτη της έκφρασης τριών επιλεγμένων γονιδίων σε ασθενείς με νέα διάγνωση και με υποτροπή πολλαπλού μυελώματος, η σύγκρισή τους με ομάδα μαρτύρων και η διερεύνηση του πιθανού τους ρόλου στην εξέλιξη της νόσου σε μοριακό επίπεδο. Ο Καθηγητής Γιαννακούλας ήταν από την πρώτη στιγμή δίπλα μου, οδηγώντας με στα μονοπάτια της Μοριακής Αιματολογίας, άγνωστα για εμένα εκείνη την στιγμή και επισημαίνοντάς μου τις δυσκολίες και τα ακανθώδη σημεία αυτής της διαδρομής. Θα ήθελα όμως να ευχαριστήσω και τον κ. Σπελέτα, Καθηγητή Ιατρικής Ανοσολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν. Θεσσαλίας και Διευθυντή του ομώνυμου Εργαστηρίου, ο οποίος με φιλοξένησε στο εργαστήριό του και μου έδειξε τον τρόπο λειτουργίας ενός εργαστηρίου που ασχολείται με μοριακές τεχνικές, τόσο για διαγνωστικούς όσο και ερευνητικούς σκοπούς όπως και την κ. Καλαλά Φανή, Επίκουρο Καθηγήτρια Ιατρικής Ανοσολογίας για τις χρήσιμες και κατατοπιστικές συμβουλές της.

Ευχαριστίες αρμόζουν επίσης στην τεχνικό του Εργαστηρίου Ανοσολογίας του Τμήματος Ιατρικής κ. Νάνσυ Φουσίκα, η οποία βοήθησε στην εξοικείωση με τις εργαστηριακές τεχνικές και την επίλυση προβλημάτων τεχνικής φύσεως, στην υποψήφια διδάκτορα Μάριον Παπαθανασίου και στην Διευθύντρια του Εργαστηρίου Μοριακής Ιστοπαθολογίας του Τμήματος Ιατρικής κ. Σαμαρά Μαρία για τις μετρήσεις των συγκεντρώσεων των δειγμάτων και τις πολύτιμες συμβουλές τους, στη γραμματέα της Αιματολογικής Κλινικής κ. Ελένη Αργυρούλη για την εύρεση και αρχειοθέτηση των φακέλων των ασθενών. Ιδιαίτερη μνεία οφείλω στην Δρ. Εύα Γραμμουστιάνου, τεχνική σύμβουλο και εμπειρογνώμονα της εταιρείας Qiagen® Κεντρικής Ελλάδας η οποία βοήθησε στην επιλογή των κατάλληλων υλικών αλλά και την επίδειξη των εργαστηριακών τεχνικών με απόλυτη σαφήνεια. Τέλος, αφιερώνω την ερευνητική αυτή εργασία στους γονείς μου, Νικόλαο και Χρύσα, και στα αδέρφια μου, Βασίλειο και Παύλο, οι οποίοι στάθηκαν αρωγοί καθ' όλη την πορεία. Εύχομαι αυτή η εργασία να συνεισφέρει στην αποκάλυψη των μηχανισμών του οστικού μεταβολισμού σε μία τόσο σύνθετη νόσο, όπως αυτήν του πολλαπλού μυελώματος, και τη διερεύνηση νέων θεραπευτικών μοριακών στόχων.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ – ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ

Το πολλαπλό μυέλωμα, ένα αιματολογικό νόσημα το οποίο ανήκει στην κατηγορία των non-Hodgkin λεμφωμάτων, χαρακτηρίζεται από οστεοπενία, οστικές διαβρώσεις και οστεολυτικές βλάβες οδηγώντας σε παθολογικά κατάγματα, νεφρική βλάβη, οστικά άλγη και ελάττωση της συνολικής ποιότητας ζωής αυτής της κατηγορίας των ασθενών. Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η μέτρηση της διαφορικής έκφρασης των γονιδίων *BMP-2*, *BMP-6* και *Smad6* που εμπλέκονται στην οστική ομοιοστασία και τη διερεύνηση των υποκείμενων μοριακών μηχανισμών. Αρχικά έγινε άντληση από τους κλινικούς φακέλους που διατηρούνται στο αρχείο της Αιματολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Λάρισας των δημογραφικών, παθολογοανατομικών, κυτταρογενετικών, βιοχημικών και θεραπευτικών δεδομένων των ασθενών. Στην Αιματολογική Κλινική διενεργήθηκε, με την συναίνεση των ασθενών, οστεομυελική βιοψία σε 39 ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα, εκ των οποίων οι 20 εξ αυτών είχαν νεοδιαγνωστεί ενώ οι 19 από αυτούς είχαν υποτροπιάσει αφού είχαν λάβει πρώτη γραμμής θεραπεία. Η ομάδα των μαρτύρων αποτελούνταν από 9 ασθενείς, διαγνωσμένοι με Hodgkin ή non-Hodgkin λέμφωμα, εξαιρουμένου του πολλαπλού μυελώματος. Στο Εργαστήριο Ιατρικής Ανοσολογίας απομονώθηκε στοιβάδα μονοπύρηνων κυττάρων από όλα τα δείγματα και ύστερα απομονώθηκε RNA, το οποίο φωτομετρήθηκε και ακολούθησε η σύνθεση του cDNA από την ίδια αρχική ποσότητα RNA. Στην συνέχεια χρησιμοποιώντας σταθερή συγκέντρωση cDNA πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο αντίστροφης μεταγραφής (real-time RT-qPCR) με σκοπό τη μέτρηση της διαφορικής έκφρασης των γονιδίων *BMP-2*, *BMP-6* και *Smad6* μεταξύ των ασθενών και των μαρτύρων. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η *β2-μικροσφαιρίνη*. Τα αποτελέσματα στη συνέχεια υπεβλήθησαν σε στατιστική ανάλυση με χρήση του προγράμματος GraphPad Prism, όπου δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή των επιπέδων *BMP-2* μεταξύ ασθενών και μαρτύρων, ενώ βρέθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της *BMP-6* κατά 4.8 φορές στους ασθενείς με νέα διάγνωση και 2.56 φορές αύξηση σε ασθενείς με υποτροπή. Τέλος, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή των επιπέδων του *Smad6* στους ασθενείς με νέα διάγνωση σε σύγκριση με τους μάρτυρες ενώ ανευρέθη στατιστικά σημαντική ελάττωση κατά 1.5 φορές στους ασθενείς με υποτροπή σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Η ανεύρεση αυξημένης *BMP-6* είναι πιθανόν να υποδεικνύει ευνοϊκότερη πρόγνωση στους ασθενείς με νέα διάγνωση σε σχέση με τους ασθενείς σε υποτροπή, ενώ η ελάττωση του ανασταλτικού *Smad6* τη διατήρηση της σηματοδότησης των BMPs.

**Λέξεις κλειδιά: BMPs, Smads, MM, RT-qPCR, οστική νόσος, CRAB, RNA, cDNA**

## **ABSTRACT – KEYWORDS**

Multiple Myeloma belongs to a large group of hematological malignancies and in particular non-Hodgkin lymphomas. Its main features are osteopenia, lytic bone lesions, pathological fractures, bone pain, anemia and kidney failure that greatly diminish the qualitative aspect of patients' lives. We extracted patient blood marrow samples and measured the differential expression of *BMP-2*, *BMP-6* and *Smad6* genes, which are heavily involved in the bone homeostasis and explain the underlying molecular pathways. Initially a search of the patients' files kept at the Hematology Clinic of University Hospital of Larisa was done to extract information regarding the demographics, the histopathological examination of bone marrow aspirates, the cytogenetic background, the biochemical profile, and the therapeutic treatment of every participant. At the Hematology Clinic bone marrow was aspirated by experienced hematologist after consent from 39 patients diagnosed with multiple myeloma, of which 20 were newly diagnosed and 19 were relapsed after induction therapy. The control group consisted of 9 patients, with a Hodgkin or non-Hodgkin lymphoma diagnosis, except for multiple myeloma. At the Laboratory of Medical Immunology, a pellet of mononuclear cells was isolated from every patient and then RNA was extracted, which was then measured via a spectrophotometer and cDNA was synthesized from the same initial amount of RNA. Next, using constant concentration of cDNA real-time RT-qPCR was performed and the differential expression of *BMP-2*, *BMP-6* and *Smad6* was measured between patients and controls. As a reference gene *b2-microglobulin* was used. The results were then subjected to statistical analysis using GraphPad Prism, where no statistically significant change in *BMP-2* levels was found between patients and controls, while a statistically significant 4.8-fold increase in *BMP-6* was found in patients with a new diagnosis and 2.56-fold increase in patients with relapse. Finally, no statistically significant change in *Smad6* levels was found in patients with new diagnosis, while a statistically significant 1.5-fold decrease was found in patients with relapse. The finding of increased BMP-6 is likely to indicate a more favorable prognosis in patients with a new diagnosis compared to patients in relapse, while the reduction of inhibitory Smad6 is associated with the preservation of BMPs signaling.

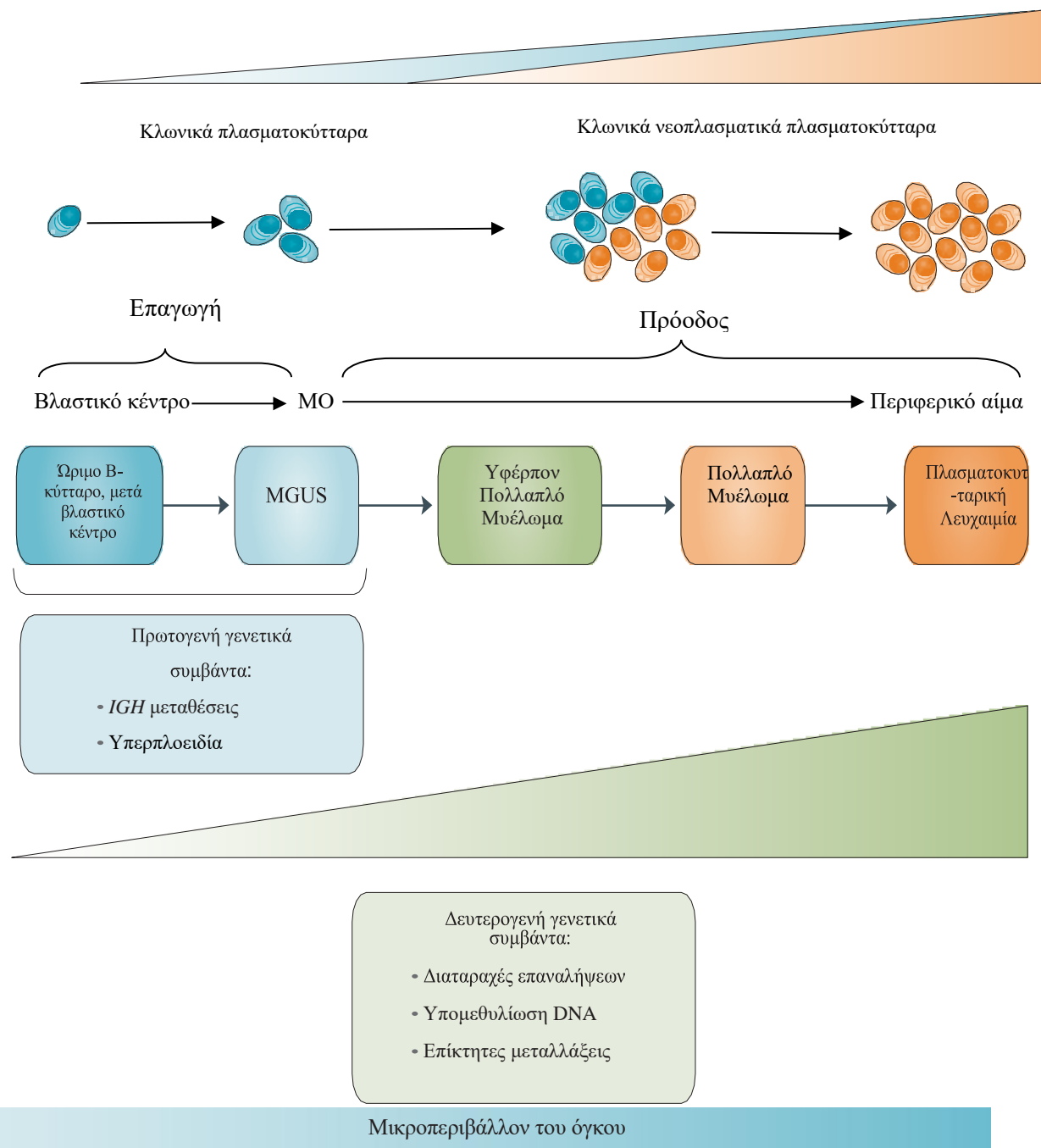
**Key words: BMPs, Smads, MM, RT-qPCR, bone disease, CRAB, RNA, cDNA**

# I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το πολλαπλό μυέλωμα (Multiple Myeloma, MM) αποτελεί κακοήθεια των τελικώς διαφοροποιημένων πλασματοκυττάρων (B-κύτταρα στο τελικό στάδιο διαφοροποίησης) και αποτελεί τη δεύτερη συχνότερη αιματολογική κακοήθεια μετά το Non-Hodgkin λέμφωμα (Non-Hodgkin Lymphoma, NHL)(1, 2, 3). Τα νεοπλασματικά κύτταρα εδράζονται αρχικά στον μυελό των οστών (MO) αλλά σε προχωρημένα στάδια της νόσου ανευρίσκονται στην κυκλοφορία του αίματος καθώς και σε εξωμυελικές θέσεις (μαλακοί ιστοί και όργανα)(4). Στην συντριπτική πλειοψηφία των ασθενών ανευρίσκεται μονοκλωνική ανοσοσφαιρίνη (M protein ή μονοκλωνική πρωτεΐνη), προϊόν παραγωγής των πλασματοκυττάρων, ωστόσο σε ένα ποσοστό 15 – 20% των ασθενών ανευρίσκονται μόνο ελεύθερες ελαφρές αλυσίδες (Free Light Chain, FLC) και αρκετά σπανιότερα (<3%) δεν ανευρίσκεται κανένα μονοκλωνικό κλάσμα (5, 6). Η νόσος εκδηλώνεται ως απόρροια της μονοκλωνικής πρωτεΐνης, των παραγόμενων κυτταροκινών και περιλαμβάνει βλάβες τελικών οργάνων οι οποίες εκδηλώνονται με υπερασβεστιαμία, νεφρική ανεπάρκεια, αναιμία και οστική νόσο, η οποία χαρακτηρίζεται από λυτικές βλάβες και παθολογικά κατάγματα. Όλα τα ανωτέρα περιγράφονται με τον όρο CRAB (Calcium elevation, Renal insufficiency, Anemia, Bone lesions)(7).

Το πολλαπλό μυέλωμα ανήκει σε μία κατηγορία ασθενειών που ονομάζονται μονοκλωνικές γαμμαπάθειες. Ανάμεσα σε αυτές η πλέον συχνότερη είναι η μονοκλωνική γαμμαπάθεια αδιευκρίνιστης σημασίας (Monoclonal Gammopathy Unspecified Significance, MGUS), χαρακτηριστικά της οποίας είναι η διήθηση του μυελού των οστών με νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα και η έκκριση μονοκλωνικής πρωτεΐνης, χωρίς να είναι συμπτωματική, ωστόσο, συνήθως προηγείται της ανάπτυξης του πολλαπλού μυελώματος. Μεταξύ του MM και του MGUS αναπτύσσεται μία ενδιάμεση νοσολογική οντότητα γνωστή ως υφέρπον πολλαπλό μυέλωμα (Smoltering Multiple Myeloma, SMM)(8, 9, 10, 11) (Εικ.1).



**Εικόνα 1 | Η αναπτυξιακή πορεία των μονοκλωνικών γαμμαπαθειών.** Η αναπτυξιακή πορεία ενός πολλαπλού μυελώματος είναι μια πολυβηματική διαδικασία εκκινώντας από τις πρόδρομες μορφές όπως το MGUS και το SMM. Παρά την κλινική διάκριση μεταξύ των τριών αυτών οντοτήτων, υπάρχουν πολλές βιολογικές ομοιότητες. Ένα πολλαπλό μυέλωμα μπορεί να αναπτυχθεί έξωθεν του MO, ως εξωμυελικό μυέλωμα ή πλασματοκυτταρική λευχαιμία. Τα πρωτογενή γενετικά συμβάντα αφορούν τις χρωμοσωμικές μεταθέσεις στα γονίδια των βαρέων αλυσίδων (Immunoglobulin Heavy Chain, IGH) και την ανευπλοειδία (κυρίως την υπερδιπλοειδία). Οι δευτερογενείς γενετικές βλάβες συσσωρεύονται κατά την εξέλιξη του μυελώματος. [Πηγή:(12)]

Το μονήρες πλασματοκύττωμα είναι μία αιματολογική κακοήθεια αρχικού σταδίου μεταξύ των MGUS, SMM και MM. Αναπτύσσεται κυρίως στα οστά που έχουν τη δυνατότητα αιμοποίησης (πλευρές, σπόνδυλοι, λαγόνια, μηριαία οστά) με ή χωρίς εξωστική επέκταση(13). Τα εξωμυελικά πλασματοκυττώματα δεν προσβάλλουν τα οστά και εντοπίζονται κυρίως στην κεφαλή, τον τράχηλο, τους πνεύμονες και το γαστρεντερικό σύστημα. Η διάγνωση επικυρώνεται από την ιστολογικά επιβεβαιωμένη ύπαρξη πλασματοκυττώματος (οστικού ή εξωμυελικού), την φυσιολογική βιοψία ΜΟ και την απουσία λυτικών εστιών στην αξονική τομογραφία-τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET-CT) ή την ολοσωματική μαγνητική τομογραφία (whole-body MRI). Η ανίχνευση χαμηλών επιπέδων πλασματοκυττάρων με παθολογικό φαινότυπο με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης MM(14, 15). Αντιμετωπίζεται με ακτινοβολία (40-50 Gy) της προσβληθείσας περιοχής. Ωστόσο υπάρχει και η περίπτωση ασθενών με μονήρες πλασματοκύττωμα και ελάσσονα προσβολή του ΜΟ (<10%), οι οποίοι λαμβάνουν την ίδια αντιμετώπιση με ασθενείς με μονήρες πλασματοκύττωμα. Ωστόσο, η πιθανότητα υποτροπής μετά τη θεραπεία ή προόδου σε MM είναι 10% για ασθενείς της πρώτης κατηγορίας και 20-60% για τους ασθενείς της δεύτερης κατηγορίας(16).

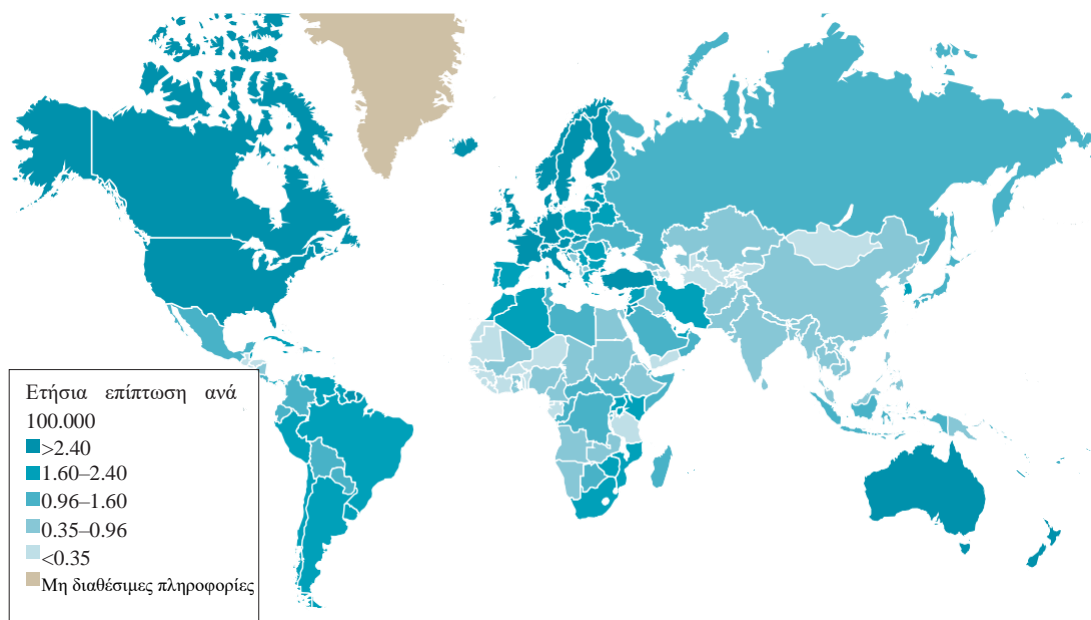
Η εξωμυελική νόσος είναι συχνότερη στους ασθενείς με υποτροπή και έχει πτωχή πρόγνωση. Είναι αποτέλεσμα της αιματογενούς διασποράς των πλασματοκυττάρων και χαρακτηρίζεται από την παρουσία εστιών μαλακού ιστού σε εξωμυελικές θέσεις όπως το δέρμα, οι λεμφαδένες, ο εγκέφαλος, την υπεζωκοτική συλλογή ή τη λεπτομηνιγγική νόσο(17). Η πλασματοκυτταρική λευχαιμία θεωρείται η πλέον επιθετική μορφή του MM και χαρακτηρίζεται από την ανεύρεση στο περιφερικό αίμα  $>2 \times 10^9/L$  πλασματοκυττάρων ή πλασματοκυττάρωση  $>20\%$  του συνολικού ποσοστού των λευκοκυττάρων. Η πρωτοπαθής πλασματοκυτταρική λευχαιμία αναπτύσσεται de novo ενώ η δευτεροπαθής αποτελεί λευχαιμική εκτροπή τελευταίου σταδίου MM. Η πρωτοπαθής χαρακτηρίζεται από επιθετική συμπεριφορά και πτωχή πρόγνωση καθώς οι ασθενείς υποκύπτουν νωρίς στις επιπλοκές της νόσου(18).

Η διάγνωση της MGUS και του SMM πραγματοποιείται με την τυχαία ανεύρεση Μ πρωτεΐνης σε εργαστηριακό έλεγχο άλλης νόσου. Η ετήσια πιθανότητα μίας MGUS να μεταπέσει σε MM ή κάποια σχετική κακοήθεια είναι 1%, ενώ η αντίστοιχη πιθανότητα ενός SMM είναι 10%(10, 11). Σε βάθος 25 ετών το 15% των ασθενών με MGUS θα μεταπέσουν σε MM ή άλλη σχετιζόμενη κατάσταση [αμυλοείδωση ελαφρών αλύσεων (AL amyloidosis), Μακροσφαιριναιμία Waldstrom ή σύνδρομο λεμφοϋπερπλασίας]. Ο ορισμός CRAB μπορεί να χαρακτηριστεί ως συντηρητικός, υπό την έννοια ότι η χρήση του στόχευε τους ασθενείς με MGUS ή SMM ώστε να αποφύγουν τη λήψη τοξικής χημειοθεραπείας. Από την άλλη πλευρά η χρήση νέων βιοδεικτών, η οποία έδωσε τη δυνατότητα της πρώιμης έναρξης θεραπείας σε ασθενείς με υψηλή πιθανότητα να μεταπέσουν

σε MM που απαιτεί θεραπεία, επέβαλε την αναθεώρηση των διαγνωστικών κριτηρίων. Τέλος, με την ανάπτυξη νέων γενετικών τεχνικών κατανοήθηκαν καλύτερα και βαθύτερα οι υποκείμενοι βιολογικοί μηχανισμοί, τόσο σε επίπεδο χρωμοσωμάτων όσο και γονιδίων, αλλάζοντας τη θεώρηση του MM ως μίας ομάδας νοσημάτων με κοινό κλινικό φαινότυπο.

## 1.1 Επιδημιολογία

Η συχνότητα του MM είναι 1% μεταξύ όλων των νεοπλασματικών νόσων ενώ είναι η δεύτερη πιο συχνή αιματολογική κακοήθεια, με ετήσια επίπτωση 5 νέων περιστατικών ανά 100.000. Η διάμεση ηλικία διάγνωσης είναι τα 70 έτη. Η επίπτωση είναι υψηλότερη στην Ευρώπη και τις αγγλοσαξονικές χώρες από ότι στην Ασία και στην Αφρική, γεγονός που οφείλεται στη διακύμανση της διάγνωσης (Εικ. 2). Μεταξύ του 1990 και του 2016 διαπιστώθηκε 126% αύξηση της επίπτωσης του MM παγκοσμίως, η οποία οφείλεται στην αύξηση του πληθυσμού, την παράταση του προσδόκιμου ζωής, αλλά και των διαγνωστικών μέσων, ιδιαίτερα στις ανεπτυγμένες χώρες(19). Ο επιπολασμός του MM επίσης αυξήθηκε λόγω της εισαγωγής νέων θεραπευτικών παραγόντων στην κλινική πρακτική και της αυτόλογης μεταμόσχευσης αιμοποιητικών κυττάρων (Autologous Stem Cell Transplantation, ASCT), που βελτίωσαν την συνολική επιβίωση των ασθενών(20).



**Εικόνα 2 | Επίπτωση του MM το 2012.** Η επίπτωση διαφοροποιείται μεταξύ των χωρών αλλά είναι υψηλότερη στις ανεπτυγμένες χώρες. [Πηγή:(1)]

## 1.2 Παράγοντες κινδύνου

### 1.2.1 Περιβαλλοντικοί και επαγγελματικοί παράγοντες

Η ακριβής αιτιολογία του MM δεν είναι πλήρως διευκρινισμένη, ωστόσο, διάφοροι παράγοντες κινδύνου έχουν μελετηθεί ως προς τον αιτιολογικό τους ρόλο. Μία μελέτη έδειξε αυξημένη κατά τρεις φορές την πιθανότητα ανάπτυξης MM σε άτομα που εκτέθηκαν σε ακτινοβολία  $\geq 0.5\text{Gy}$  σε σχέση με την ομάδα μαρτύρων 25 έτη ύστερα από την έκρηξη της βόμβας υδρογόνου στη Χιροσίμα και στο Ναγκασάκι(21). Ωστόσο, έτερη έρευνα η οποία μελέτησε δεδομένα από το 1950 έως το 1987 κατέληξε στο συμπέρασμα πως άτομα που εκτέθηκαν σε ακτινοβολία  $< 4\text{ Gy}$  δεν έχουν υψηλότερη πιθανότητα ανάπτυξης MM σε σχέση με τους υγιείς(22).

Όσον αφορά τους επαγγελματικούς παράγοντες έκθεσης, μία μεγάλη μετα-ανάλυση στις ΗΠΑ ανέφερε αυξημένο κίνδυνο ( $\text{RiskRatio} = 1.38$ ) για ανάπτυξη MM στον αγροτικό πληθυσμό χωρίς να καταλήγει όμως αν ο κίνδυνος προέρχεται από την έκθεση σε φυτοφάρμακα, διαλύτες ή λοιμώδεις παράγοντες(23). Ωστόσο, η χρήση συνθετικών βαφών μαλλιών έχει συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο για ανάπτυξη MM(24).

### 1.2.2 Γενετικοί παράγοντες

Στην βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί οκτώ οικογένειες με δύο ή περισσότερους συγγενείς α' βαθμού με πολλαπλό μυέλωμα(25), ενώ οι συγγενείς α' βαθμού διατρέχουν διπλάσιο κίνδυνο ανάπτυξης MGUS(26). Από μεγάλες μελέτες συσχέτισης γονιδιώματος (Genome Wide Association Studies, GWAS) έχουν ανευρεθεί ποικίλοι γονιδιακοί τόποι, όπως μεταλλάξεις στις περιοχές 6p25 και 16p13 που σχετίζονται με χαμηλότερη επιβίωση αλλά και αρκετοί μη-ταυτόσημοι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) που σχετίζονται με ενεργοποίηση του γονιδίου *myc* και πρόοδο της νόσου(27, 28, 29).

## 1.3 Παθογενετικοί μηχανισμοί

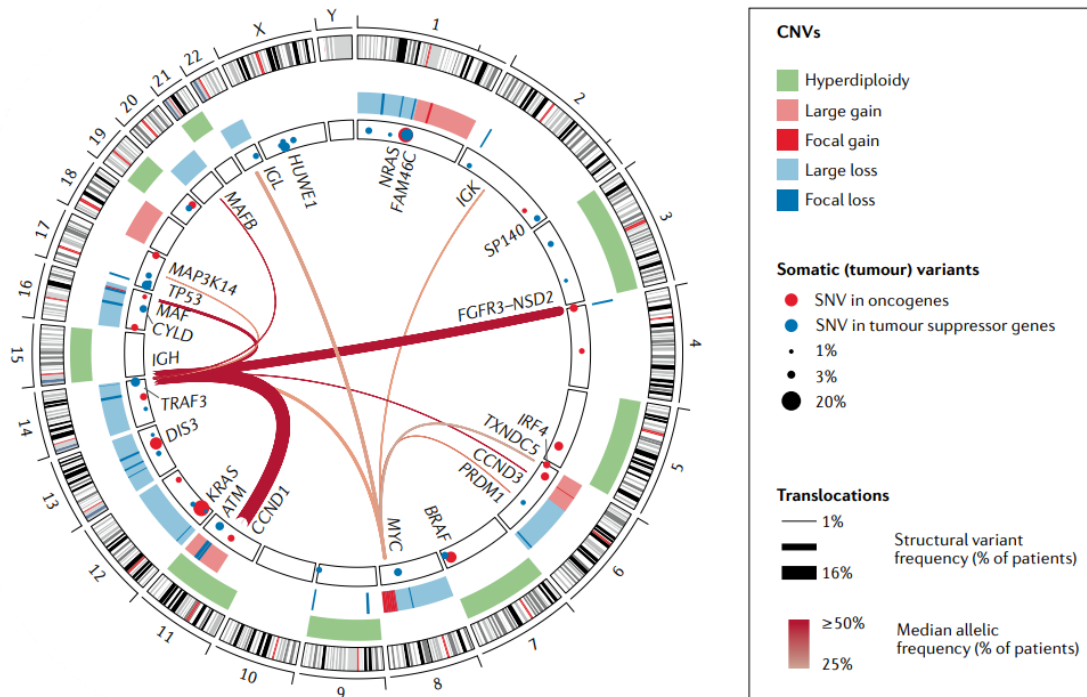
Απαραίτητη για την κατανόηση της νόσου είναι η ανασκόπηση της εξελικτικής πορείας των Β-κυττάρων. Τα ανώριμα Β-κύτταρα προέρχονται από τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (Hematoietic Stem Cells, HSCs) που διαφοροποιούνται στο ΜΟ και στα δευτερογενή λεμφικά όργανα σε παρθένα Β-κύτταρα και τελικά σε πλασματοκύτταρα. Στο ΜΟ τα ανώριμα Β-κύτταρα υπόκεινται σε αναδιατάξεις των V(D)J γονιδίων, παράγοντας όλους τους τύπους των ανοσοσφαιρινών(30). Β-λεμφοκύτταρα τα οποία περιέχουν το επιφανειακό σύμπλεγμα IgH-IgL (δομή του Β-κυτταρικού υποδοχέα, BCR) μεταναστεύουν σε δευτερογενή λεμφικά όργανα, μεταξύ των οποίων ο σπλην και οι λεμφαδένες. Σε αυτά τα δευτερογενή λεμφικά όργανα τα Β-

κύτταρα υφίστανται σωματικές υπερμεταλλάξεις, μεταβολή της συγγένειας σύνδεσης του υποδοχέα καθώς και αλλαγές της τάξης της ανοσοσφαιρίνης, οδηγώντας στην δημιουργία διακριτών και μοναδικών ως προς την αναγνώριση αντιγονικών επιτόπων Β-κυτταρικών κλώνων. Η διάσπαση της διπλής έλικας του DNA στους γενετικούς τόπους της ανοσοσφαιρίνης είναι απαραίτητη για τις σωματικές υπερμεταλλάξεις και την αλλαγή της τάξης της ανοσοσφαιρίνης. Τα προκύπτοντα τμήματα δύνανται να συνενωθούν με άλλα παρόμοια τμήματα από άλλους γενετικούς τόπους καταλήγοντας σε χρωμοσωμικές μετατοπίσεις (chromosomal translocations). Τις περισσότερες φορές αυτές οι ανακατατάξεις δεν οδηγούν σε κάποια βιολογική διεργασία (π.χ. αύξηση, πολλαπλασιασμός) αλλά ενίοτε η σύντηξη με ογκογονίδια προσφέρει στους Β-κλώνους εξελικτικό πλεονέκτημα, έχοντας ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη του MGUS και του SMM. Επίσης έχει υποτεθεί από μελέτες η συνεργική δράση της ανευπλοειδίας και ιδιαίτερα της υποδιπλοειδίας (<46 χρωμοσώματα) ως επιβαρυντικός παράγων πρόγνωσης.

### **1.3.1 Έναρξη νόσου – Πρωτογενή γενετικά γεγονότα**

Το MM χαρακτηρίζεται από κλινική και βιολογική ετερογένεια η οποία αφορά γενετικές αλλαγές ως καθοδηγητικά σημεία της μυελωματογένεσης(31). Παρόλο το γεγονός πως δεν έχουν εξακριβωθεί τα ακριβή γενετικά γεγονότα τα οποία οδηγούν στην μετάπτωση των πρόδρομων μορφών σε MM, ασθενείς οι οποίοι χαρακτηρίζονται από γενετικές και επιγενετικές αλλαγές, συμπεριλαμβανομένων της DNA μεθυλίωσης και της μεταγραφικής αποσιώπησης (microRNA), έχουν υψηλότερη πιθανότητα ανάπτυξης MM. Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί και αναδειχθεί περίπου 80 μεταλλάξεις από σχετικές μελέτες. Επίσης, μεγάλες μελέτες ασθενών με πρόδρομες μορφές καθώς και MM έχουν δείξει ενδοκλωνική ετερογένεια και δαρβίνεια εξέλιξη, με χαρακτηριστικό την ύπαρξη διακριτών πληθυσμών πλασματοκυττάρων με διαφορετικές μεταλλάξεις (*KRAS*, *BRAF*, *NRAS*, *TP53*, *DIS3*) και την επικράτηση ορισμένων από αυτούς καθώς η νόσος εξελίσσεται. Οι μεταλλάξεις αυτές αφενός προσδίδουν σε ορισμένους κλώνους εξελικτικό πλεονέκτημα και προωθούν την περαιτέρω εξέλιξη της νόσου, αφετέρου ευθύνονται για την μεγάλη ανομοιογένεια μεταξύ των ασθενών και την ως εκ τούτου αδυναμία εύρεσης μοναδικής θεραπείας(31, 32, 33, 34, 35, 36) (Εικ. 3).





**Εικόνα 3 | Σχηματικό διάγραμμα απεικόνισης των γενετικών ανωμαλιών στο MM.** Τα πρωτογενή γενετικά γεγονότα αφορούν αναδιατάξεις *IGH* και υπερδιπλοεδία στο ώριμο B-κύτταρο. Δευτερογενή γενετικά γεγονότα περιλαμβάνουν αριθμητικές και δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες (CNV — Copy Number Variants), μη-συνώνυμους μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (SNVs — Single Nucleotide Variants), δομικές παραλλαγές και επιγενετικές τροποποιήσεις. [Πηγή:(37)]

Τα πρωτογενή γενετικά γεγονότα περιλαμβάνουν τις αντιμεταθέσεις του γονιδίου της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης (*IGH* — Immunoglobulin Heavy Chain) και μίας σειράς συνεργαζόμενων γονιδίων όπως το *NSD2* (Nuclear Receptor Binding SET Domain Protein 2, *MMSET*), το *FGFR3* (Fibroblast Growth Factor Receptor 3, υποδοχέας του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών) και αυτό της κυκλίνης D1 (*CCND1*)(38, 39, 40, 41). Η σύντηξη του ενισχυτή του *IGH* με τα συνεργαζόμενα γονίδια οδηγεί σε αυξημένη δραστηριότητα των τελευταίων κυρίως μέσω ανώμαλης αλλαγής τάξης ανοσοσφαιρίνης και V(D)J αναδιατάξεων κατά την ωρίμαση των B-κυττάρων(36). Διαμετάθεση t(11;14) οδηγεί σε αυξημένη έκφραση της κυκλίνης D1 η οποία ανευρίσκεται στο 16% των ασθενών με MM και 13% με MGUS.

Διαμετάθεση t(4;14) ενισχύει την έκφραση του *NSD2*, που οδηγεί σε επιγενετική αποδιοργάνωση λόγω αυξημένης παραγωγής της μεθυλοτρανσφεράσης της ιστόνης 3, και ενίοτε του *FGFR3*, που οδηγεί σε ενεργοποίηση του μονοπατιού των RAS/mitogen-activated protein kinase (MAPK) και ανευρίσκεται στο 12% των ασθενών MM και στο 1-3% των ασθενών με MGUS(42). Οι συγκεκριμένοι ασθενείς παρουσιάζουν ένα ιδιαίτερο και μοναδικό πρότυπο μεθυσίας DNA και ιστονών, το οποίο φαίνεται να σχετίζεται με διαφοροποιημένη καθοδική

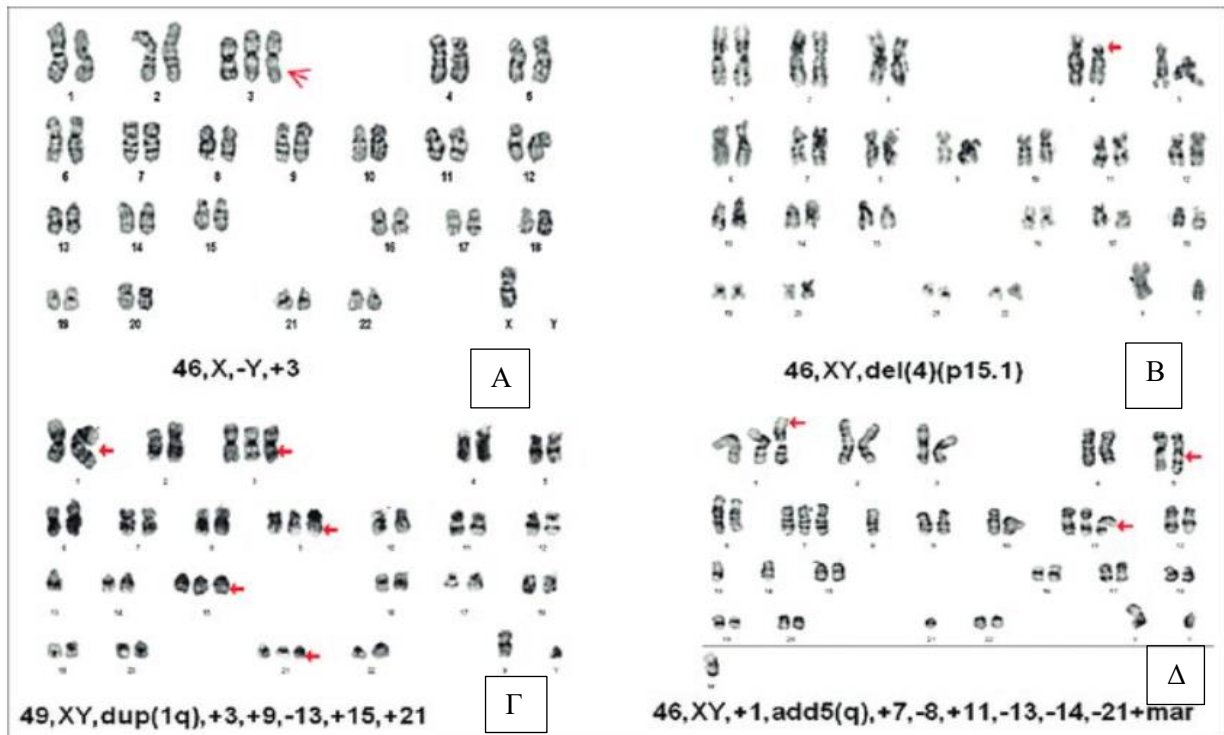
γονιδιακή έκφραση (downstream gene expression), καθώς φαίνεται ότι ο χρόνος μετάπτωσης από SMM σε MM είναι μικρότερος στους ασθενείς με t(4;14) (28 μήνες) από ότι σε ασθενείς με t(11;14) (55 μήνες), υποδεικνύοντας την επιρρέπεια σε δευτερογενείς μεταλλάξεις(43). Άλλες αιτιολογικές διαμεταθέσεις περιλαμβάνουν την t(14;16) στο *MAF* (Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogene) που ανευρίσκεται στο 3% των ασθενών, η t(14;20) στο *MAFB* που ανευρίσκεται στο 1.5% των ασθενών και η t(6;14) στο *CCND3* που ανευρίσκεται σε <1% των ασθενών. Στη μίτωση οι τρεις D-κυκλίνες (*CCND1*, *CCND2*, και *CCND3*) λειτουργούν ως σύμπλεγμα συνδεδεμένες με τις κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες CDK4 και CDK6 προκειμένου να φωσφορυλιώσουν την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος 1 (*RB1* – Retinoblastoma Protein 1), η οποία είναι συνδεδεμένη και καταστέλλει τη μεταγραφική δραστηριότητα του E2F μεταγραφικού παράγοντα. Η φωσφορυλίωση της *RB1* οδηγεί στην απελευθέρωση του E2F και τη μετάβαση στη φάση S(44).

Άλλες χρωμοσωμικές βλάβες περιλαμβάνουν απώλεια του μικρού βραχίονα του χρωμοσώματος 1 [del(1p)] στα γονίδια *CDKN2C*, *FAF1* (Fas Associated Factor 1) και *FAM46C/TENT5C* (Terminal Nucleotidyltransferase 5C). Η τελευταία σχετίζεται με απώλεια της δυνατότητας των πλασματοκυττάρων να απομακρύνουν τα συσσωματώματα της Ig μέσω αυτοφαγίας και της πρόκλησης stress στο ενδοπλασματικό δίκτυο του κυττάρου και κυτταροτοξικότητας(45). Επίσης σε ασθενείς με MM έχει βρεθεί η προσθήκη του μεγάλου βραχίονα του χρωμοσώματος 1 [gain(1q)] η οποία ανευρίσκεται σε ποσοστό 40% των ασθενών με t(4;14), η διαγραφή του μεγάλου βραχίονα του χρωμοσώματος 13 [del(13q)] που οδηγεί σε απώλεια του *RB1* και του *DIS3* (Exosome Endoribonuclease And 3'-5' Exoribonuclease), η απώλεια του μικρού βραχίονα του χρωμοσώματος 17 [del(17p)] με απώλεια του *TP53*, η οποία ανευρίσκεται σε 10% των ασθενών και κυρίως στο τελικό στάδιο της νόσου, και τέλος η απώλεια του μεγάλου βραχίονα του χρωμοσώματος 11 [del(11q)] με απώλεια των γονιδίων *BIRC2* (Baculoviral IAP Repeat Containing 2) και *BIRC3* (Baculoviral IAP Repeat Containing 3) που σχετίζονται με την ενεργοποίηση του φλεγμονώδους καταρράκτη του NF-κB(40, 41, 46, 47, 48).

Η αυξημένη συχνότητα ανεύρεσης del(17p) και διαμετάθεσης t(8;14) η οποία διασυνδέει τον ενισχυτή του *IGH* με το *myc* (Myelocytomatosis) ογκογονίδιο έχει συσχετιστεί με την πρόοδο και υποτροπή του MM (refractory MM) και την ανάπτυξη πλασματοκυτταρικής λευχαιμίας. Η πρωτεΐνη MYC, η οποία έχει από μελέτες ανευρεθεί αποσταθεροποιημένη σε ποσοστό 49% των ασθενών, πρωτοδιαγνωσθέντων και υπό θεραπεία, είναι υπεύθυνη για την έως και 15% συνολική κυτταρική γονιδιακή ρύθμιση, μεταξύ των οποίων και η έκφραση του *CCND2* και του *ENO1* (Enolase 1), που εμπλέκεται στη γλυκόλυση(46, 49).

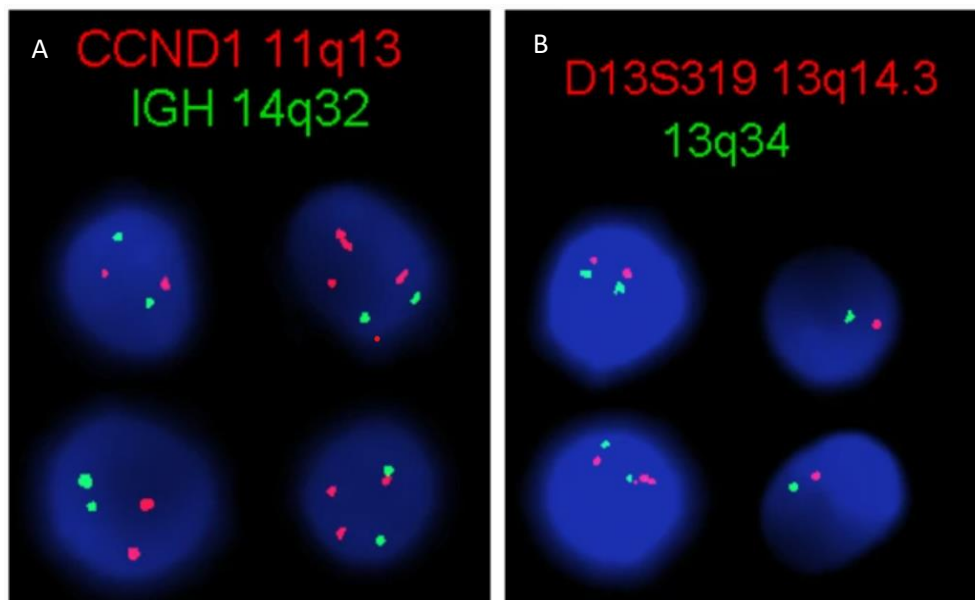
Μεταξύ των ασθενών με MM η πιο συχνή μορφή ανευπλοειδίας είναι η υπερδιπλοειδία. Η συνύπαρξη υπερδιπλοειδίας με αναδιατάξεις *IGH* είναι λιγότερη συχνή, ωστόσο έχουν αναφερθεί κάποιοι ασθενείς με συνύπαρξη των παραπάνω. Σε μία σειρά 965 ασθενών το 35% είχαν <46 χρωμοσώματα (υποδιπλοειδία), το 13% είχαν 46 χρωμοσώματα (ψευδοδιπλοειδία), το 14% είχαν 47-50 χρωμοσώματα (ήπια υπερδιπλοειδία) και 38% είχαν >50 χρωμοσώματα (υψηλού βαθμού υπερδιπλοειδία)(50). Η υπερδιπλοειδία χαρακτηρίζεται από συνύπαρξη τρισωμιών κάποιων εκ των χρωμοσωμάτων 3, 5, 7, 9, 11, 15 και 19 σε ασθενείς με MM. Παρόλα αυτά οι τρισωμίες 3 και 5 έχουν συσχετισθεί με ευνοϊκή πρόγνωση, αναιρώντας τη δυσμενή πορεία των ασθενών με t(4;14) ενώ η τρισωμία 21 με χειρότερη εξέλιξη.

Από την άλλη πλευρά η υποδιπλοειδία σχετίζεται με τη χειρότερη πρόγνωση από όλες τις άλλες ανευδιπλοειδίες ενώ αξιοσημείωτη είναι η υποπερίπτωση της υπεραπλοειδίας στην οποία ανευρίσκονται στον καρυότυπο μονοσωμίες των περιττών χρωμοσωμάτων (κυρίως των χρωμοσωμάτων 1 και 13) και δισωμίες των άρτιων χρωμοσωμάτων (κυρίως του 18). Η μελέτη των χρωμοσωμικών ανωμαλιών πραγματοποιείται με καρυότυπο όπου κύτταρα από το μυελό των οστών, και συγκεκριμένα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα επώάζονται με την δράση αυξητικών παραγόντων και στο στάδιο μετάφασης λύονται, απελευθερώνοντας τα διπλασιασμένα χρωμοσώματα. Στη συνέχεια τα χρωμοσώματα επιστρώνονται και ταξινομούνται κατά σειρά φθίνοντος μεγέθους (χρωμόσωμα 1 → X/Y) σε αντικειμενοφόρο πλάκα και παρατηρούνται σε οπτικό μικροσκόπιο (Εικ. 4).



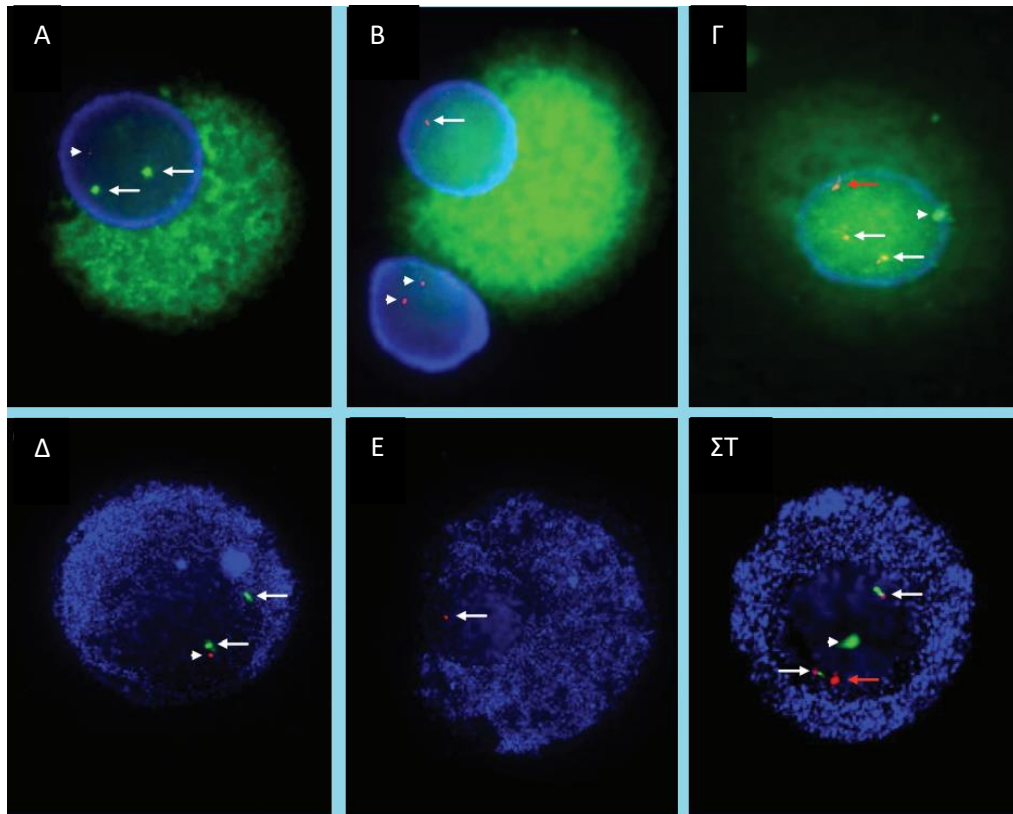
**Εικόνα 4 | Καρυότυπος ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα. Αναδεικνύεται η μεγάλη καρυοτυπική ετερογένεια των ασθενών και η ως εκ τούτου διαφορετική πορεία του MM.** Α. Ψευδοδιπλοειδία, τρισωμία 3, απώλεια χρωμοσώματος Y. Β. Ψευδοδιπλοειδία, έλλειψη μικρού βραχίονα χρωμοσώματος 4. Γ. Υπερδιπλοειδία, διπλασιασμός μεγάλου βραχίονα χρωμοσώματος 1, τριπλοειδία χρωμοσωμάτων 3, 9, 15, 21, απώλεια χρωμοσώματος 13. Δ. Ψευδοδιπλοειδία, διπλασιασμός χρωμοσωμάτων 1, 7, 11, απώλεια χρωμοσωμάτων 8, 13, 14, 21 και προσθήκη στο μεγάλο βραχίονα χρωμοσώματος 5. [Πηγή: Royal AP, Lubna SS, Angel PB, Mysorekar VV, Sundareshan TS. Chromosomal aberrations in multiple myeloma: A study on Indian population. Acta Med Int 2018; 5:74-8 Chromosomal aberrations in multiple myeloma: A study on Indian population. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/329891170\\_Chromosomal\\_aberrations\\_in\\_multiple\\_myeloma\\_A\\_study\\_on\\_Indian\\_population](https://www.researchgate.net/publication/329891170_Chromosomal_aberrations_in_multiple_myeloma_A_study_on_Indian_population) (πρόσβαση στις 23 Δεκ. 2022)]

Ανάλογη είναι η διαδικασία του φθορίζοντος in situ υβριδισμού (FISH — Fluorescent In Situ Hybridisation) που χρησιμοποιεί ειδικούς ιχνηθέτες (probes) οι οποίοι έχουν συμπληρωματική αλληλουχία προς την αλληλουχία που μελετάται και έχουν την ιδιότητα να φθορίζουν όταν υβριδίζονται με αυτήν. Προηγείται αποδιάταξη της διπλής έλικας του DNA και τα χρωμοσώματα παρατηρούνται σε μικροσκόπιο φθορισμού (Εικ. 5, 6).



**Εικόνα 5 | Μελέτη κυτταρογενετικών ανωμαλιών με τη μέθοδο FISH σε ασθενείς με MM.** Στις εικόνες A και B στην αριστερή στήλη κάθε εικόνας απεικονίζονται φυσιολογικά κύτταρα ενώ στη δεξιά παθολογικά κύτταρα. A. Παρατηρούνται τρία κόκκινα σήματα φθορισμού που υβριδίζονται στο γονιδιακό τόπο του *CCND1* του χρωμοσώματος 11 στα παθολογικά κύτταρα, υποδεικνύοντας τρισωμία 11. B. Παρατηρούνται στα φυσιολογικά κύτταρα ένα ζεύγος από κόκκινο και πράσινο σήμα φθορισμού στην άπω και την εγγύς περιοχή του μεγάλου βραχίονα του χρωμοσώματος 13, αλλά ένα μόνο σήμα πράσινου και κόκκινου φθορισμού στα παθολογικά κύτταρα υποδεικνύοντας μονοσωμία 13. [Πηγή:(51)]

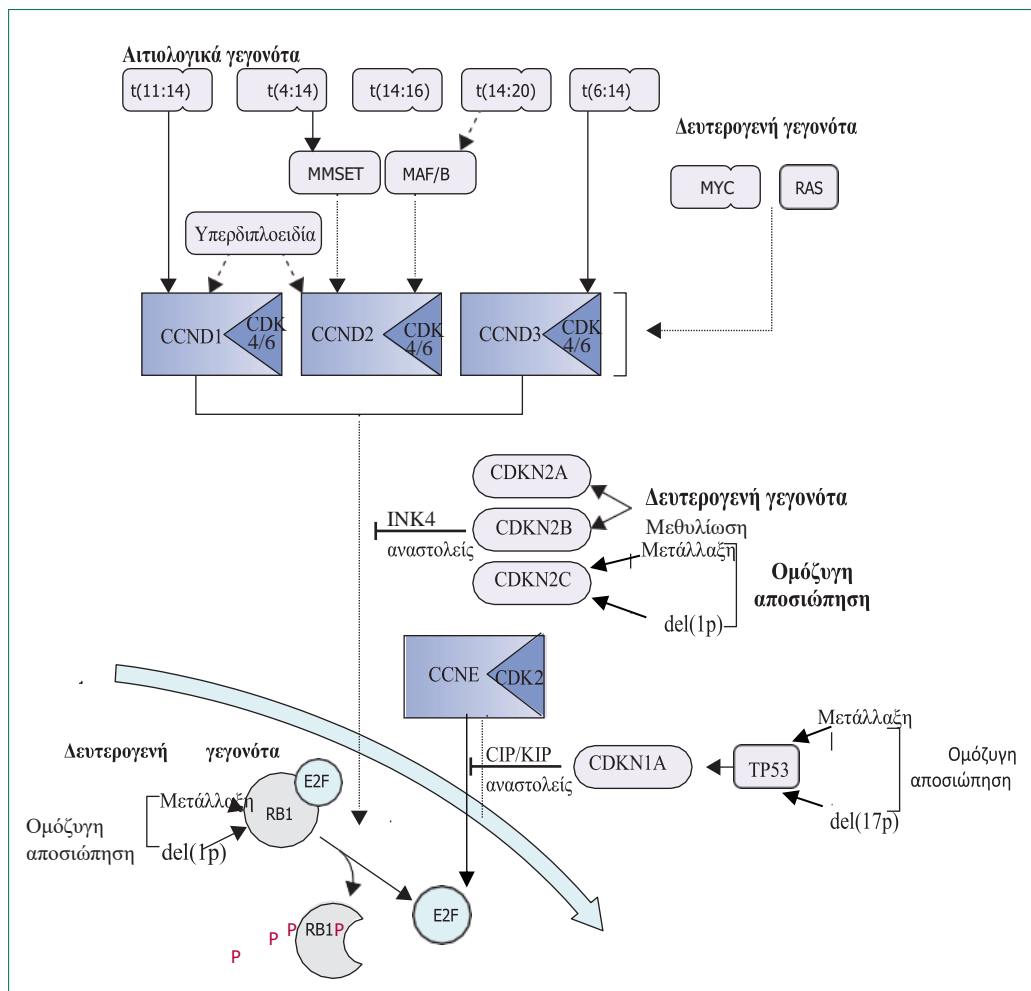
Μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι μικροσυστοιχιών ανέδειξαν την ύπαρξη 7 υποομάδων MM, η καθεμία από τις οποίες χαρακτηρίζεται από διακριτά γενετικά πρότυπα έκφρασης. Η πρώτη υποομάδα αποτελείται από την διαμετάθεση t(4;14), οδηγώντας σε υπερέκφραση των *MMSET* και *FGFR3*, η δεύτερη από τη διαμετάθεση t(14;16) ή t(14;20), η οποία οδηγεί σε υπερέκφραση του *MAF*. Οι δύο αυτές υποομάδες έχουν συσχετιστεί με κακή πρόγνωση. Η τρίτη και η τέταρτη υποομάδα (CD1, CD2) χαρακτηρίζονται από αυξημένη έκφραση των *CCND1*, *CCND3* λόγω διαμετάθεσης t(11;14) ή t(6;14). Η πέμπτη χαρακτηρίζεται από υπερδιπλοειδία κυρίως μέσω υπερέκφρασης του *TNFSF10* (Tumor Necrosis Factor Superfamily member 10).



**Εικόνα 6 | Ανίχνευση κυτταρογενετικών ανωμαλιών με τη μέθοδο FISH και κυτταρομορφολογική αξιολόγηση πλασματοκυττάρων ασθενών MM.** Α. Πλασματοκύτταρο θετικό στην χρώση με αντίσωμα έναντι κ και λ ελαφρών αλύσων συνδεδεμένο με φθοριόχρωμα FITC (Fluorescein isothiocyanate) (πράσινο κυτταρόπλασμα). Απεικονίζονται δύο πράσινα σήματα (βέλη) στην περιοχή του κεντρομεριδίου του χρωμοσώματος 17 καθώς και απώλεια του *TP53* από το 17p με κόκκινο σήμα (κεφαλή βέλους). Β. Πλασματοκύτταρο θετικό στην χρώση με αντίσωμα έναντι κ και λ ελαφρών αλύσων συνδεδεμένο με φθοριόχρωμα FITC (πράσινο κυτταρόπλασμα) το οποίο παρουσιάζει διαγραφή στο 13q14.3 με ένα κόκκινο σήμα (βέλος) και κύτταρο αρνητικό για αντίσωμα κ-λ FITC (μη-πλασματοκύτταρο) με δύο κόκκινα σήματα στο 13q14.3 (κεφαλές βελών). Γ. Πλασματοκύτταρο θετικό στη χρώση με αντίσωμα έναντι κ και λ ελαφρών αλύσων συνδεδεμένο με φθοριόχρωμα FITC (πράσινο κυτταρόπλασμα) το οποίο παρουσιάζει σήματα σύντηξης γονιδίων (σύντηξη *IgH-FGFR3* και *FGFR3-IgH*, λευκά βέλη), φυσιολογικό πράσινο σήμα *IgH* (κεφαλή βέλους) και φυσιολογικό κόκκινο σήμα *FGFR3* (κόκκινο βέλος). Δ. Αντίστοιχη εικόνα με την Α όπου όμως το πλασματοκύτταρο παρουσιάζει κυανό κυτταρόπλασμα λόγω χρώσης με αντι-CD138 αντίσωμα, το οποίο είναι ειδικό έναντι των πλασματοκυττάρων. Οι ενδείξεις των βελών και της κεφαλής του βέλους αντιστοιχούν στις κυτταρογενετικές ανωμαλίες της εικόνας Α. Ε. Εικόνα πλασματοκυττάρου θετικού στη χρώση αντι-CD138 (κυανό κυτταρόπλασμα) το οποίο παρουσιάζει διαγραφή του 13q14.3 με κόκκινο σήμα (βέλος). ΣΤ. CD138+ πλασματοκύτταρο που παρουσιάζει σήματα σύντηξης γονιδίων (σύντηξη *IgH-FGFR3* και *FGFR3-IgH*, λευκά βέλη), φυσιολογικό πράσινο σήμα *IgH* (κεφαλή βέλους) και φυσιολογικό κόκκινο σήμα *FGFR3* (κόκκινο βέλος). [Πηγή: Wan, T. S., & Ma, E. S. (2012). The role of FISH in hematologic cancer. *International Journal of Hematologic Oncology*, 1(1), 71–86. doi:10.2217/ijh.12.9]

Οι δύο τελευταίες υποομάδες σχετίζονται με την υπερέκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό, γονιδίων καρκινικών αντιγόνων του όρχεος (cancer testis antigens) και γονιδίων που σχετίζονται με τη φλεγμονή όπως αυτό του NF-κB. Οι δύο αυτές υποομάδες χαρακτηρίζονται από πτωχή πρόγνωση καθώς τα υπερεκφραζόμενα γονίδια προσδίδουν αντοχή

σε επιλεγμένα θεραπευτικά σχήματα. Η ενσωμάτωση του γενετικού προφίλ των ασθενών σε ταξινομικά συστήματα διαστρωμάτωσης έχει συμβάλει σε καταλληλότερη σταδιοποίηση και έναρξη καταλληλότερης θεραπείας(50, 52, 53, 54, 55) (Πίνακας 1). Οι παραπάνω περιγραφείσες ανωμαλίες διαταράσσουν τον κυτταρικό κύκλο, παρεμβαίνοντας στην μετάβαση από την G1 φάση στην φάση S του κυτταρικού κύκλου (Εικ. 7).



**Εικόνα 7 | Απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου στο MM.** Τόσο τα αιτιολογικά γεγονότα όσο και τα δευτερογενή γεγονότα αποδιοργανώνουν τον κυτταρικό κύκλο, οδηγώντας σε ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και κλωνική αύξηση. [Πηγή:(47)]

Κλινική Διάγνωση		
Κυτταρογενετική ανωμαλία	Υφάρπτον Πολλαπλό Μυέλωμα	Πολλαπλό Μυέλωμα
Τρισωμίες	Ενδιάμεσος (intermediate) κίνδυνος προόδου, ΜΧΠ: 3 έτη	Καλή πρόγνωση, τυπικού κινδύνου ΜΜ, (ΣΕ): 7-10 έτη, εξαιρετική ανταπόκριση στη λεναλιδομίδη
t(11;14) (q13;q32)	Τυπικός (standard) κίνδυνος προόδου, ΜΧΠ: 5 έτη	Καλή πρόγνωση, τυπικού κινδύνου ΜΜ, ΣΕ: 7-10 έτη
t(6;14) (p21;q32)	Τυπικός κίνδυνος προόδου, ΜΧΠ: 5 έτη	Καλή πρόγνωση, τυπικού κινδύνου ΜΜ, ΣΕ: 7-10 έτη
t(4;14) (p16;q32)	Υψηλός (high) κίνδυνος προόδου, ΜΧΠ: 2 έτη	Ενδιαμέσου κινδύνου ΜΜ, ΣΕ: 5 έτη, πρώιμη ASCT, έναρξη βορτεζομίδης
t(14;16) (q32;q23)	Τυπικός κίνδυνος προόδου, ΜΧΠ: 5 έτη	Υψηλού κινδύνου ΜΜ, ΣΕ:3 έτη, ανεύρεση υψηλών επιπέδων FLC και οξείας νεφρικής βλάβης σε αρχική διάγνωση
t(14;20) (q32;q11)	Τυπικός κίνδυνος προόδου, ΜΧΠ: 5 έτη	Υψηλού κινδύνου ΜΜ, ΣΕ:3 έτη
Gain(1q21)	Υψηλός κίνδυνος προόδου, ΜΧΠ: 2 έτη	Ενδιαμέσου κινδύνου ΜΜ, ΣΕ: 5 έτη
Del(17p)	Υψηλός κίνδυνος προόδου, ΜΧΠ: 2 έτη	Υψηλού κινδύνου ΜΜ, ΣΕ:3 έτη
Τρισωμία με οποιοδήποτε συνδυασμό διαμετάθεσης IGH	Τυπικός κίνδυνος προόδου, ΜΧΠ: 5 έτη	Δυνατόν να βελτιώσει την πρόγνωση όταν συνδυάζεται με υψηλού κινδύνου διαμετάθεση IGH ή del(17p)
Μονοσωμία 13 ή Μονοσωμία 14	Τυπικός κίνδυνος προόδου, ΜΧΠ: 5 έτη	Η επίδραση στην πρόγνωση δεν είναι ξεκάθαρη
Φυσιολογικός καρύοτυπος	Χαμηλός (low) κίνδυνος προόδου, ΜΧΠ: 7-10 έτη	Καλή πρόγνωση, ΣΕ >7-10 έτη, πιθανώς αντανάκλα χαμηλό νεοπλασματικό φορτίο

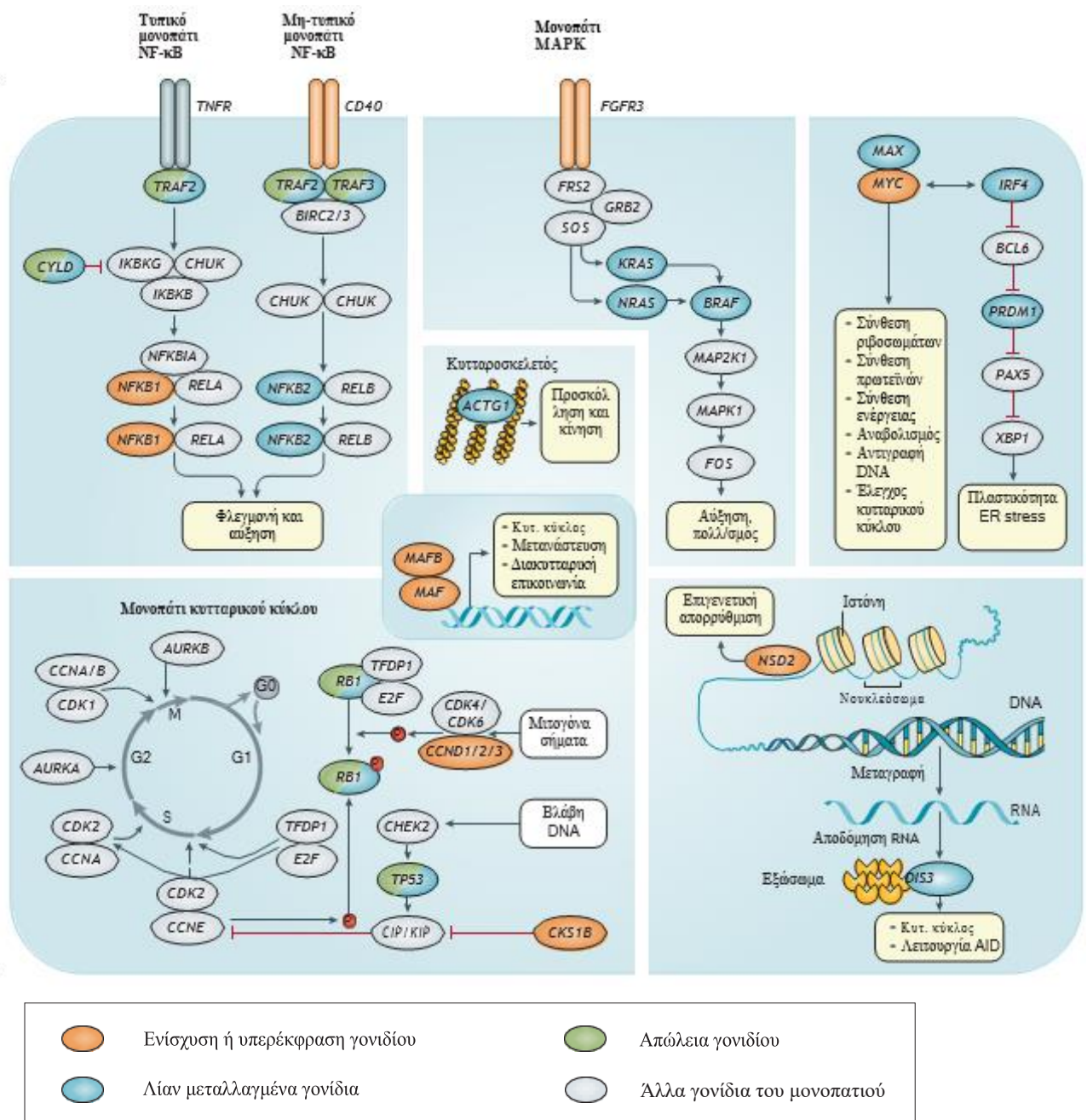
Πίνακας 1 | Επίδραση κυτταρογενετικών ανωμαλιών στην κλινική πορεία και την πρόγνωση του ΜΜ (ΜΧΠ: Μέσος Χρόνος Προόδου, ΣΕ: Συνολική Επιβίωση). [Πηγή: (56)]

### 1.3.2 Δευτερογενή γενετικά γεγονότα — Κλωνικά μοντέλα ανάπτυξης

Η αλληλούχιση επόμενης γενεάς (NGS — Next Generation Sequencing) ανέδειξε την απουσία μίας και μοναδικής μετάλλαξης που οδηγεί στην ανάπτυξη του ΜΜ, αλλά την συνύπαρξη υποκλώνων νεοπλασματικών πλασματοκυττάρων(32, 33, 36, 41). Τα πρωτογενή γενετικά γεγονότα δεν είναι ικανά αυτά καθαυτά να προκαλέσουν ενεργή νόσο ΜΜ αλλά παρατηρούνται σε ασθενείς με MGUS και SMM σταθερά για πολλά έτη(31, 57). Επομένως, έχει υποτεθεί πως δευτερογενή γενετικά γεγονότα ευθύνονται για τον μετασχηματισμό των νεοπλασματικών

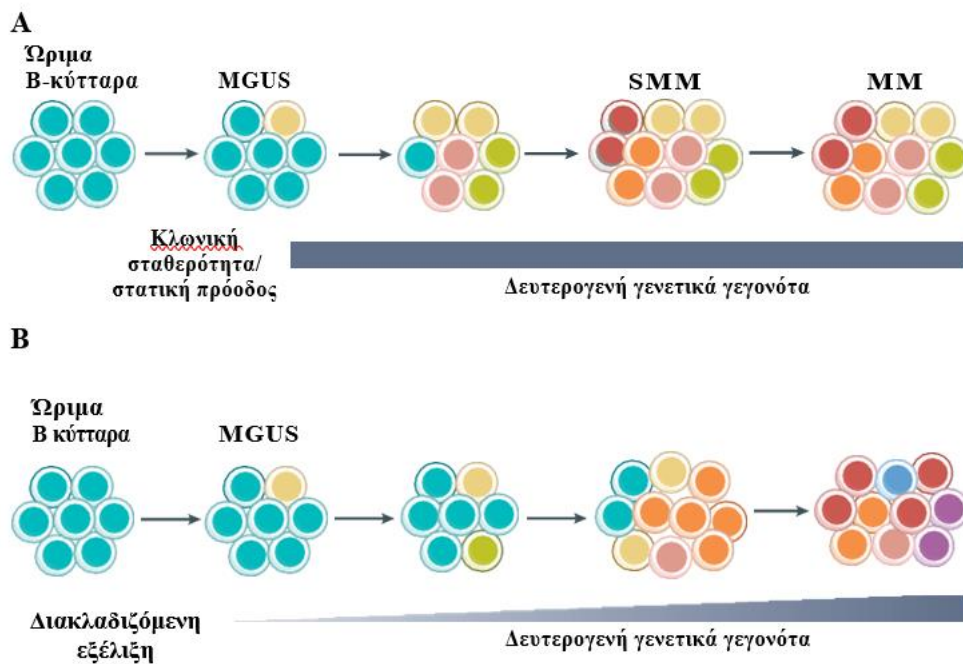


πλασματοκυττάρων. Οι πλέον συχνές μεταλλάξεις ανευρίσκονται στα γονίδια *KRAS* (23% ασθενών), *NRAS* (20% ασθενών), *FAM46C* (11% των ασθενών), *DIS3* (11% των ασθενών) και *TP53* (8% των ασθενών). Άλλες λιγότερο συχνές αλλά όχι λιγότερο σημαντικές μεταλλάξεις αφορούν τα *BRAF*, *TRAF3*, *PRDM1*, *CYLD*, *RBI*, *IRF4*, *EGFR1*, *MAX*, *HIST1H1E* και *ACTG1*(32, 33, 36). Τα γονίδια αυτά εμπλέκονται σε πληθώρα μονοπατιών σηματοδότησης ενώ τα επίπεδα mRNA αυτών είναι χαμηλά, υποδεικνύοντας την δυνατότητα προσδιορισμού του μεταλλαγμένου μεταγραφικού προφίλ (Εικ. 8).



**Εικόνα 8 | Σηματοδοτικά μονοπάτια στο MM.** Στο MM εν αντιθέσει με άλλα B-κυτταρικά νεοπλάσματα υπάρχει ενεργοποίηση του μη-τυπικού μονοπατιού του NF-κB λόγω μεταλλάξεων και διαγραφών των *TRAF2* και *TRAF3*, του *NFKB2* αλλά και ενίοτε της τυπικής οδού λόγω μεταλλάξεων στο *CYLD*. [Πηγή: (58, 59)]

Οι μελέτες έχουν αναδείξει δύο κλωνικά μοντέλα ανάπτυξης MM από τα πρόδρομα στάδια, το μοντέλο της κλωνικής σταθερότητας/στατικής προόδου και το μοντέλο της αυτόματης εξέλιξης(33, 37). Το μοντέλο της κλωνικής σταθερότητας περιγράφει την ύπαρξη σε ασθενείς με MGUS και SMM υποκλώνων εξαλλαγμένων πλασματοκυττάρων MM με καθόλου ή ελάχιστες αλλαγές στην μικροαρχιτεκτονική των υποκλώνων κατά την πρόοδο σε MM. Από την άλλη πλευρά, το μοντέλο της αυτόματης εξέλιξης χαρακτηρίζεται από μία διακλαδιζόμενη αρχιτεκτονική κατά την οποία σωματικές μεταλλάξεις προσδίδουν σε ορισμένους υποκλώνους εξελικτικό πλεονέκτημα (Εικ. 9). Αυτά τα μοντέλα αποτέλεσαν τη βάση της υπόθεσης εργασίας κατά την οποία ασθενείς με ταχεία εξέλιξη από τα πρόδρομα στάδια σε MM φέρουν υποκλώνους με συγκεκριμένο γενετικό αποτύπωμα και ως εκ του τούτου αυτή η πορεία θα μπορούσε να διακοπεί με τις σωστές μεθόδους ανίχνευσης και διάγνωσης, εφαρμόζοντας προληπτικές μεθόδους και μεθόδους ιατρικής ακριβείας.



**Εικόνα 9 |** Μελέτες NGS σε δείγματα που λήφθηκαν είτε από διαφορετικούς ασθενείς είτε από τους ίδιους ασθενείς σε διαφορετικά σημεία της νόσου αποκάλυψαν δύο μοντέλα κλωνικής ανάπτυξης. Α. Κλωνική σταθερότητα/στατική πρόοδος ευρέθη μόνο σε δείγματα ίδιων ασθενών υποστηρίζοντας την κλωνική συνεργασία. Δεν παρατηρείται αύξηση των δευτερογενών γενετικών γεγονότων κατά την εξέλιξη της νόσου (ροζ, κίτρινοι και πορτοκαλί υποκλώνοι), αλλά η πολύ αργή και σταδιακή εξαφάνιση ή/και ανάδειξη υπαρχόντων υποκλώνων (κόκκινοι υποκλώνοι). Β. Η διακλαδιζόμενη εξέλιξη ωστόσο έχει παρατηρηθεί και στα δύο είδη μελετών και αφορά κυρίως τον κλωνικό ανταγωνισμό κατά τον οποίο η άθροιση επιφερόμενων μεταλλάξεων επί ορισμένων υποκλώνων (κίτρινοι υποκλώνοι) προσδίδει εξελικτικό πλεονέκτημα, ο οποίος συνοδεύεται από την στοχαστική αύξηση του νεοπλασματικού φορτίου και την αυτόματη εξέλιξη (πορτοκαλί, ροζ, μπλε, κόκκινοι και μωβ υποκλώνοι). Η αλληλεπίδραση με το μικροπεριβάλλον σαφώς εμπλέκεται στην παραπάνω διαδικασία. [Πηγές: (33, 37)]

### 1.3.3 Επιγενετικές ανωμαλίες

Τα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA ασθενών με MM παρουσιάζουν μεγάλη διακύμανση, με ορισμένους εξ αυτών να εμφανίζουν είτε καθολική υπομεθυλίωση είτε καθολική υπερμεθυλίωση σε σύγκριση με φυσιολογικά πλασματοκύτταρα. Μεταξύ ασθενών με MM και MGUS τα επίπεδα υπερμεθυλίωσης φαίνεται να είναι παρόμοια, ωστόσο τα επίπεδα υπομεθυλίωσης φαίνεται να είναι ιδιαίτερος αυξημένα στους ασθενείς με MM, υποδεικνύοντας την συμμετοχή αυτής στην πρόοδο της νόσου(9, 60). Υπερμεθυλίωση ενισχυτών γονιδίων συνδέεται με ελαττωμένη έκφραση των γονιδίων των ενισχυτών(61).

Τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs παρουσιάζουν ποικίλη γονιδιακή έκφραση. Έχει παρατηρηθεί αυξημένη έκφραση των miR-19a και miR-19b στο MM που έχουν ως κύριο στόχο την καταστολή του *SOCS1* (*S*uppressor of *C*ytokine *S*ignaling *1*) και ενεργοποίηση του μονοπατιού JAK-STAT (*J*anus *K*inase-*S*ignal *T*ransducer and *A*ctivator of *T*ranscription). Το μονοπάτι των JAK-STAT είναι υπεύθυνο για την απόκριση των πλασματοκυττάρων στις κυτταροκίνες και την περαιτέρω επιβίωσή τους(62, 63, 64).

### 1.3.4 Μικροπεριβάλλον

Το μικροπεριβάλλον του MO αποτελείται από μία πλειάδα διαφορετικών κυτταρικών τύπων που έχουν ως σκοπό την ανάπτυξη των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Περιλαμβάνει το κυτταρικό σκέλος (αιμοποιητικά και μη-αιμοποιητικά/στρωματικά κύτταρα, λιποκύτταρα, ινοβλάστες, οστεοβλάστες, οστεοκλάστες, ενδοθηλιακά κύτταρα, λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα), την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (κολλαγόνο, λαμινίνη, ινωδονεκτίνη, θρομβοσπονδίνη, πρωτεογλυκάνες) και το διαλυτό σκέλος [κυτταροκίνες, αυξητικοί παράγοντες, διαλυτές ισομορφές παραγόντων κυτταρική προσκόλλησης π.χ. sVCAM-1 (*s*erum *V*ascular *C*ell *A*dhesion *M*olecule-*1*), sICAM-1 (*s*erum *I*ntracellular *A*dhesion *M*olecule-*1*), sP-selectin, sE-selectin](65).

Στο πολλαπλό μυέλωμα τα βιολογικά φαινόμενα που παρατηρούνται οφείλονται μεταξύ άλλων και στην ενδομυελική αλληλεπίδραση κυττάρων ξενιστή και νεοπλασματικών κυττάρων. Η άμεση επαφή των στρωματικών κυττάρων με τα πλασματοκύτταρα, κυρίως μέσω των μορίων προσκόλλησης, και η έμμεση σηματοδότηση μέσω κυτταροκινών οδηγεί στον μετασχηματισμό, την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των μυελωματικών κυττάρων(66, 67, 68, 69). Ένας αριθμός διαλυτών παραγόντων όπως οι IL-6, BAFF (*B*-cell *A*ctivating *F*actor), APRIL (*A* Proliferation Inducing Ligand), RANK (*R*eceptor *A*ctivator of *NF-κ*B), VEGF (*V*ascular *E*ndothelial *G*rowth *F*actor), CSF1 (*C*olony *S*timulating *F*actor-*1*), FGF-2 (*F*ibroblast *G*rowth *F*actor-*2*), IL-8 και αγγειοποιητίνη-1 δύνανται να ενισχύσουν την ανάπτυξη, την αύξηση, την

επιβίωση, τη μετανάστευση και την αντοχή των MM κυττάρων στα φάρμακα(70, 71). Η πρωτεΐνη Bcl-2 (B-cell lymphoma-2), η οποία προσδίδει αντι-αποπτωτική ικανότητα στα MM κύτταρα, φαίνεται να κατέχει σημαντική θέση στην επιβίωση των MM κυττάρων στα αρχικά στάδια χαμηλού βαθμού πολλαπλασιασμού της νόσου, ενώ χάνει την σημασία της σε προχωρημένα υψηλού βαθμού πολλαπλασιασμού στάδια της νόσου. Τα αποτελέσματα της χρήσης αναστολέων Bcl-2 όπως το venetoclax αποδεικνύονται ενθαρρυντικά σε αυτήν την υποομάδα ασθενών(72).

Όλα τα προαναφερθέντα μονοπάτια οδηγούν σε οστική νόσο και νεοαγγειογένεση, οι οποίες σε συνδυασμό με το υποξικό περιβάλλον, τις δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS, Reactive Oxygen Species), τους δραστικούς νιτρόδεις διαμεσολαβητές (RNI, Reactive Nitrogen Intermediates) οδηγούν σε περαιτέρω γενετική αστάθεια, επιλογή αδρανών κλώνων και φαρμακευτική αντοχή(73, 74).

#### **1.3.4.1 Μεσεγχυματικά κύτταρα μυελού των οστών**

Τα μεσεγχυματικά κύτταρα είναι υπεύθυνα για την υποστήριξη και τη ρύθμιση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, καθώς έχουν τις δυνατότητες της αυτοανανέωσης, της διαφοροποίησης, της κυτταρικής σηματοδότησης, της συνέργειας στην εγκατάσταση των MM κυττάρων και της ανοσοτροποποίησης(75, 76). Οι λειτουργίες αυτές επιτελούνται μέσω διαφόρων μορίων, όπως μορίων προσκόλλησης (VCAM-1, ICAM-1), αυξητικών παραγόντων όπως ο αυξητικός παράγων των βλαστοκυττάρων (SCF, Stem Cell Factor), ο αυξητικός παράγων μεταμόρφωσης (TGF-β, Transforming Growth Factor- β), ο επιδερμικός αυξητικός παράγων (EGF, Epidermal Growth Factor), ο παράγων διέγερσης των κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (GM-CSF, Granulocyte Macrophage Stimulating Factor) και ο αυξητικός παράγων των ηπατοκυττάρων (HGF, Hepatocyte Growth Factor), καθώς και κυτταροκινών (IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-7 και IL-8), αγγειογενετικών παραγόντων (VEGF, PDGF – Platelet Derived Growth Factor) και ανοσοτροποποιητικών μορίων (PGE-2, Prostaglandin-E2)(77, 78, 79, 80, 81, 82).

Ωστόσο, όπως και σε άλλες αιματολογικές νεοπλασίες, έτσι και στο MM τα μεσεγχυματικά κύτταρα απορρυθμίζονται οδηγώντας στην έναρξη ή/και την πρόοδο της νόσου. Χαρακτηριστικά η αλληλεπίδραση αυτών με τα MM κύτταρα αλλάζει την έκφραση ορισμένων αγγειογενετικών και αυξητικών παραγόντων καθώς και επιφανειακών μορίων όπως το CD40/CD40L, που σχετίζεται με την αναγνώριση από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, το VCAM-1, ICAM-1, το LFA-3 (Lymphocyte Function associated Antigen-3), καθώς και μία σειρά κυτταροκινών μεταξύ των οποίων οι IL-6, IL-10, TGF-β, MIP-1b (Macrophage Inflammatory Protein-1b) και IL-7. Αυτή η ομάδα των τροποποιημένων μεσεγχυματικών κυττάρων ευθύνεται για την ελάττωση της οστεοβλαστικής ικανότητας και της φαρμακευτικής αντοχής των MM κυττάρων, όπως συμβαίνει

με την αντίσταση στην βορτεζομίδη, μέσω αύξησης του μονοπατιού του NF-κB λόγω αυξημένης έκφρασης IL-8(83, 84, 85, 86, 87, 88, 89).

Επίσης τα μεσεγχυματικά κύτταρα παράγουν διαλυτούς παράγοντες εκ των οποίων και τα εξωκυττάρια κυστίδια, τα οποία διαχωρίζονται βάσει των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους σε εξωσώματα και μικροκυστίδια(90). Τα εξωκυττάρια κυστίδια σε υγιή άτομα αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των MM *in vitro*, ωστόσο στους ασθενείς με MM έχουν την αντίθετη ιδιότητα να ενεργοποιούν το μονοπάτι AKT (serine-threonine protein kinase), που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό, και να αναστέλλουν τα μονοπάτια p38, p53 και JNK(91, 92, 93, 94). Τα εξωκυττάρια κυστίδια των ασθενών MM αναστέλλουν επίσης τη διαφοροποίηση και την επιμετάλλωση των μεσεγχυματικών κυττάρων ενώ συμμετέχουν και στην εγκατάσταση των MM κυττάρων(95). Η αλληλεπίδραση των οστεοβλαστών, των οστεοκλαστών και των οστεοκυττάρων αναλύεται εκτενέστερα στην ενότητα της οστικής νόσου (κεφάλαιο 5).

#### 1.3.4.2 Λιπώδης ιστός

Ο λιπώδης ιστός του ΜΟ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των MM. Μάλιστα έχει βρεθεί πως εξαφανίζεται σταδιακά κατά την πορεία της νόσου, υποσημαίνοντας την συμμετοχή του στα αρχικά στάδια της νόσου(96, 97). Τα λιποκύτταρα προσφέρουν ενέργεια ενώ παράγουν λιποκίνες (λεπτίνη, λιπονεκτίνη, ρεισιστίνη) και αυξητικούς παράγοντες όπως IL-6, TNF-α (Tumor Necrosis Factor α), MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1), οι οποίοι εμπλέκονται στην μυελωματογένεση και στην πρόοδο της νόσου. Έχουν επίσης την ικανότητα να προάγουν την ανάπτυξη των MM κυττάρων *in vitro* και να τα προστατεύουν από την κυτταροτοξική δράση των φαρμάκων(98).

Τα λιποκύτταρα που προέρχονται από τα μεσεγχυματικά κύτταρα του ΜΟ αλληλεπιδρούν με τα MM κύτταρα και φαίνεται πως η παχυσαρκία συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης MM. Υψηλά επίπεδα λιπονεκτίνης σχετίζονται με ελαττωμένη αύξηση MM κυττάρων και αγγειογένεση μέσω διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών [cyclic AMP-dependent protein kinase α, signal transducer and activator transcription 3 (STAT3), MAPK, β-κατενίνη και PI3K/AKT]. Από την έτερη πλευρά η ελάττωση της λιπονεκτίνης στην παχυσαρκία συμβάλλει μέσω της καταστολής των παραπάνω μονοπατιών στην αύξηση, τη μετανάστευση και τη φαρμακευτική αντοχή των MM κυττάρων(99, 100). Η λεπτίνη, η οποία εκκρίνεται από τα μεσεγχυματικά κύτταρα του ΜΟ συμμετέχει μέσω ρύθμισης του μονοπατιού RANKL/OPG (Osteoprotegerin) στη μετάβαση από MGUS σε MM, ενώ η ρεισιστίνη, μία τρίτη λιποκίνη, προστατεύει τα MM κύτταρα από την απόπτωση που επάγει η χημειοθεραπεία.

### 1.3.4.3 Μόρια προσκόλλησης

Η επαφή των MM κυττάρων με τα υπόλοιπα κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος (μεσεγχυματικά, οστεοβλάστες, οστεοκλάστες, ενδοθηλιακά κύτταρα, λεμφοκύτταρα) γίνεται με μόρια κυτταρικής προσκόλλησης όπως τα CD44 (H-CAM), CD56 (N-CAM), μόρια της οικογένειας των CD49 ιντεγκρινών, στην οποία ανήκουν το VLA-4 (Very Late Antigen 4), LFA-1, η συνδεκάνη και η σελεκτίνη. Το VLA-4 συνδέεται με το VCAM-1 ή την ινωδονεκτίνη και το LFA-1 με το ICAM-1 φέρνοντας τα MM κύτταρα σε επαφή με τα μεσεγχυματικά κύτταρα του MO(101, 102, 103, 104). Η σύνδεση αυτή ενεργοποιεί το μονοπάτι των p42/44 MAPK και NF-κB, επάγοντας την έκφραση περισσότερων μορίων προσκόλλησης στην επιφάνεια των MM κυττάρων και των μεσεγχυματικών κυττάρων του MO.

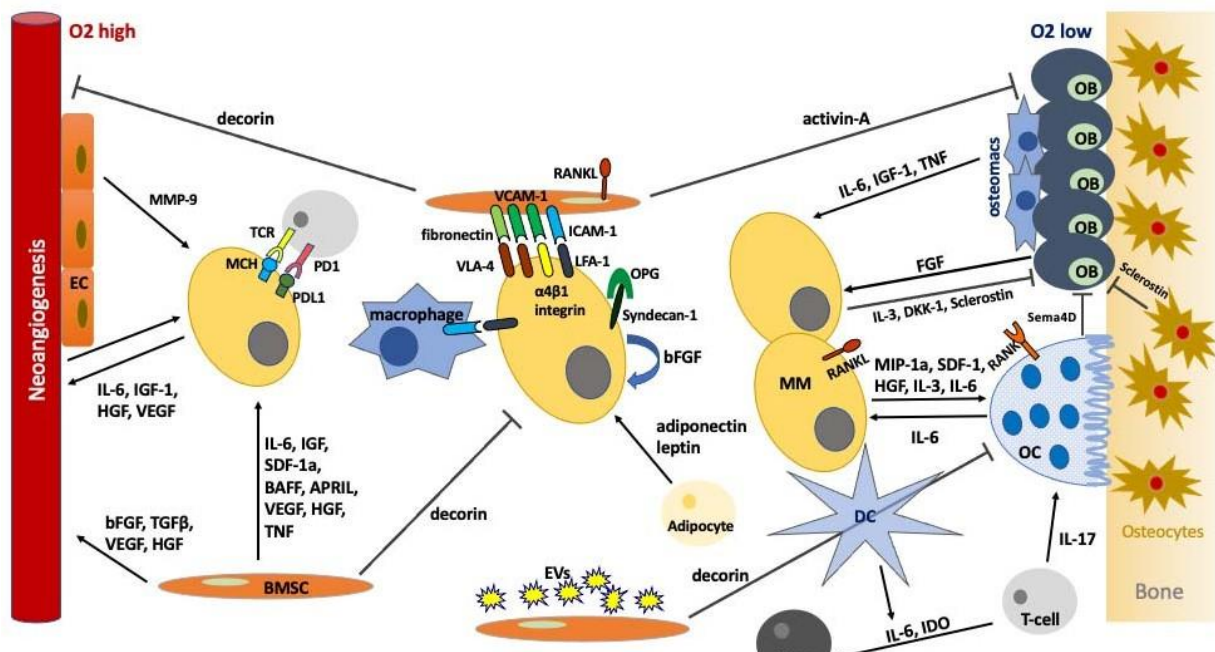
Η έκθεση των MM κυττάρων στην IL-6 έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της φωσφορυλίωσης του STAT3 και την ενεργοποίηση των εμπλεκόμενων στην επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό γονιδίων(105). Ένα έτερο σύστημα που σχετίζεται με την αλλαγή του κυτταροσκελετού είναι η έκφραση του συνδέτη της CXC χημειοκίνης 12 (CXCL-12, CXC Chemokine Ligand 12) από τα μεσεγχυματικά κύτταρα και του υποδοχέα του CXCR-4 (CXCR-4, CXC Chemokine Receptor 4) από τα μυελωματικά κύτταρα. Ο CXCL-12 επίσης επάγει την έκφραση του VLA-4, ενισχύοντας την σύνδεση των MM κυττάρων με τα μεσεγχυματικά κύτταρα. Το VLA-5 έχει συσχετισθεί με την προσκόλληση των MM κυττάρων στον MO. Απώλεια έκφρασης CD56, VLA-5 και συνδεκάνης σε συνδυασμό με έκφραση των CD11b, LFA-1 συνδέεται με μετανάστευση των πλασματοκυττάρων από τον MO και ανάπτυξη πλασματοκυτταρικής λευχαιμίας. Η τροποποιημένη έκφραση των μορίων προσκόλλησης μπορεί επίσης να συμβάλει και στην θεραπευτική απόκριση των ασθενών(106, 107).

### 1.3.4.4 Κυτταροκίνες και αυξητικοί παράγοντες

Στην ανάπτυξη του MM συμβάλλει μία σειρά κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων. Η IL-6 διαδραματίζει ιδιαίτερα καίριο ρόλο στην ανάπτυξη του MM. Η IL-6, παραγόμενη από τα στρωματικά κύτταρα του MO, αφού αυτά εκτεθούν στη δράση της IL-1 και του TNF, επάγει την έκφραση πρωτεϊνών οξείας φάσης. Φυσιολογικά εμπλέκεται στην ανάπτυξη των πλασμαβλαστών και την τελική τους διαφοροποίηση σε πλασματοκύτταρα(108). Στα MM κύτταρα επάγει αύξηση και πολλαπλασιασμό μέσω αυξημένης έκφρασης της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος αλλά όχι διαφοροποίηση καθώς τα κύτταρα αυτά δεν έχουν αυτήν την ικανότητα. Είναι δυνατόν να παράγεται και από τα MM κύτταρα δρώντας με έναν αυτοκρινή τρόπο, ωστόσο *in vitro* μελέτες έχουν δείξει πως αυτή παράγεται κυρίως από τα κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος ενώ τα επίπεδα της είναι ιδιαίτερος αυξημένα στο MM σε σχέση με υγιή άτομα, γεγονός που την καθιστά

σημαντικό τελεστή της προόδου της νόσου του MGUS σε MM (109, 110). Ωστόσο παραμένει ακόμη υπό διερεύνηση ο ρόλος των αυξημένων επιπέδων του διαλυτού υποδοχέα της IL-6 στο αίμα και στα ούρα των ασθενών με MM(111, 112, 113, 114).

Επίσης, φαίνεται να εμπλέκεται και στην τροποποίηση του ανοσοφαινοτύπου καθώς τα δενδριτικά κύτταρα εκφράζουν μειωμένα τα CD40, CD80, HLA-DR μόρια στην επιφάνεια τους καθιστώντας ασθενέστερη την αντιγονοπαρουσίαση των μυελωματικών κυττάρων και την ενεργοποίηση των T-βοηθητικών κυττάρων. Τέλος η IL-6 εκκρίνεται και από τους οστεοκλάστες δημιουργώντας ένα φαύλο κύκλο ενεργοποιώντας τα MM κύτταρα, τα οποία αποκρινόμενα, εκκρίνουν RANKL οδηγώντας σε περαιτέρω ενεργοποίηση των οστεοκλαστών και οστική απορρόφηση(115, 116, 117, 118, 119). Παρόμοια είναι και η δράση του παράγοντα διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων (G-CSF) ο οποίος οδηγεί σε πολλαπλασιασμό των MM κυττάρων, αγγειογένεση και αύξηση του όγκου μέσω ενεργοποίησης μονοπατιών STAT3 στα ουδετερόφιλα(120, 121). Τέλος, η IL-10, η οποία παράγεται από τα T-ρυθμιστικά κύτταρα, είναι υπεύθυνη για την ανάπτυξη του MM καθώς σχετίζεται με πτωχή ανταπόκριση και πρόγνωση (122). Επίσης, επηρεάζει πολλαπλά σηματοδοτικά μονοπάτια όπως της ενεργοποίησης των μακροφάγων, της παραγωγής κυτταροκινών και της αγγειογένεσης ενώ έχει υποτεθεί και η ανάπτυξη δευτερογενών νεοπλασιών(122, 123, 124) (Εικ. 10).



**Εικόνα 10** | Το MM χαρακτηρίζεται από ένα σύνθετο σύστημα αλληλεπιδράσεων των MM κυττάρων με τα κύτταρα στρώματος είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω κυτταροκινών, διαλυτών μορίων και αυξητικών παραγόντων. [Πηγή: (2)]

### 1.3.5 Ανοσοτροποποίηση

#### 1.3.5.1 Κυτταρική αδράνεια

Η νεοπλασματική αδράνεια είναι ένα ετερογενές φαινόμενο ως προς τον ορισμό του, ο οποίος τροποποιείται αναλόγως του πλαισίου χρήσης του. Η έννοια της κυτταρικής αδράνειας αναφέρεται σε μία κατάσταση μακροχρόνιας ηρεμίας σε επίπεδο μοναδιαίου κυττάρου. Έχουν προταθεί και άλλοι όροι όπως λειτουργική αδράνεια (π.χ. αδράνεια νεοπλασματικής μάζας) σε πιο προχωρημένους όγκους όπου η διατήρηση μεταξύ της ανάπτυξης και της εξάλειψης του όγκου διατηρείται χάρη στην επενέργεια εξωτερικών παραγόντων(125, 126). Σε υγιή άτομα εντός του ΜΟ επικρατούν συνθήκες που διατηρούν τα HSCs σε μακροχρόνια αδράνεια. Η διήθηση του ΜΟ με νεοπλασματικά κύτταρα διαταράσσει αυτήν την λεπτή ισορροπία οδηγώντας τα MM κύτταρα σε μακροχρόνια αδράνεια και αυτός είναι ο λόγος που σε ασθενείς με MM, απομακρυσμένες εστίες μπορούν να βρεθούν μετά αρκετά μακρύ χρονικό διάστημα (>10 έτη μετά την χειρουργική αφαίρεση της πρωτογενούς εστίας) (125, 127). Σε αυτό το πλαίσιο ανεδείχθη το δυναμικό αδράνειας που επάγεται από τα ίδια τα MM κύτταρα όταν αυτά ανευρίσκονται σε οστεοβλαστικές δοκίδες. Τα HSCs εγκαθίστανται γύρω από περιαγγειακούς χώρους ενώ τα λεμφοειδή προγονικά κύτταρα κοντά σε οστεοβλαστικές δοκίδες, υποδεικνύοντας τη διαφορετική χωρική απαίτηση των HSCs και των MM κυττάρων(128, 129).

Μάλιστα ενώ φαίνεται οι οστεοβλάστες να προσδίδουν αντοχή στη θεραπεία και αδράνεια στα MM κύτταρα, η επαγόμενη μέσω RANKL ενεργοποίηση των MM κυττάρων από τους οστεοκλάστες δείχνει την δυναμική πλαστικότητα στις αλληλεπιδράσεις των MM κυττάρων με το μικροπεριβάλλον. Ενδιαφέρον εύρημα επίσης αποτελεί η αυξημένη έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη μυελοειδή σειρά από τα MM κύτταρα, ιδιαίτερος της έκφρασης του AXL [μέλος της οικογένειας των τυροσινικών κινασών νεοπλασματικά-σχετιζόμενων μακροφάγων (TAM, Tumor Associated Macrophage)], καθώς φάνηκε πως η αναστολή αυτού με τη χρήση μικρών μορίων επανενεργοποίησε τα αδρανή MM κύτταρα, ενώ ποσοτικές μελέτες RNA-sequencing έδειξαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στους ασθενείς MGUS σε σχέση με τους ασθενείς MM, υποδεικνύοντας τον ευεργετικό του ρόλο στην πρόοδο της νόσου(130) (Εικ. 11Α).

#### 1.3.5.2 Αγγειακή αδράνεια

Η έννοια της αγγειακής αδράνειας δεν έχει ακόμη αποδειχθεί ωστόσο διαπιστώθηκαν από μελέτες αυξημένα επίπεδα ενδοθηλιακών προγονικών κυττάρων στο αίμα των ασθενών MM, τα οποία επάγουν τη δημιουργία νέων αγγείων εντός του μυελού ενώ η πυκνότητα του μικροαγγειακού δικτύου εντός του ΜΟ συσχετίστηκε με τη βαρύτητα της νόσου(131, 132). Ο κύριος αγγειογενετικός παράγων ο οποίος παράγεται από τα μεσεγχυματικά κύτταρα είναι ο VEGFa.



Ωστόσο και τα MM κύτταρα έχουν την δυνατότητα να τον παράγουν. Υποδοχείς αυτού, οι VEGFR-2, εκφράζονται στην πλασματική μεμβράνη των πλασματοκυττάρων και των ενδοθηλιακών κυττάρων του MM. Έτσι η σύνδεση αυτών οδηγεί στην ενεργοποίηση της οδού RAF-1/MEK-1 και αναστολή της απόπτωσης οδηγώντας σε αυξημένη επιβίωση. Πέραν αυτού και άλλα ογκογονίδια όπως το *RAS*, *Src* και *Fos* ενισχύονται από την σύνδεση του VEGFa στα MM κύτταρα αυτοκρινώς(133).

Αυξημένα επίπεδα PDGF-b έχουν βρεθεί σε ασθενείς με ανθεκτικότητα στη θεραπεία με αλκυλιωτικούς παράγοντες καθώς αυξάνουν την έκφραση του ογκογονιδίου *c-myc* ενώ και αυξημένα επίπεδα FGF-b έχουν βρεθεί να επάγουν την νεοαγγειογένεση και την έκκριση IL-6 από τα στρωματικά κύτταρα, η οποία προκαλεί περαιτέρω ενεργοποίηση των MM κυττάρων όπως έχει περιγραφεί(134, 135).

Τα μακροφάγα επίσης συμμετέχουν στην νεοαγγειογένεση μέσω έκκρισης αγγειογενετικών παραγόντων και αλλαγών στην μικραγγειακή αρχιτεκτονική μέσω επαφής(136). Μάλιστα έχει βρεθεί θετική συσχέτιση μεταξύ της διήθησης CD163+ M2 TAMs και μεγάλης πυκνότητας μικραγγειακού δικτύου στον ΜΟ. Η υποομάδα αυτή των μακροφάγων έχει τη δυνατότητα να οργανώνει δομές τύπου αγγείων, που σημαίνει ότι τα κύτταρα αυτά έχουν επαναπρογραμματιστεί να επάγουν νεοαγγειογένεση. Η επιλεκτική διαγραφή του *VEGF* σε κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα ή NK κύτταρα αλλάζει δραματικά τη διαδικασία της αγγειογένεσης και της αύξησης του όγκου, δίνοντας βαρύνουσα σημασία στην ανοσολογικά επαγόμενη αγγειογένεση(137, 138) (Εικ. 11B).

### **1.3.5.3 Ανοσολογικά επαγόμενη αδράνεια**

Σε ό,τι αφορά την ανοσολογικά επαγόμενη αδράνεια αυτή αποτελεί μέρος της νεοπλασματικής ανοσοτροποποίησης (cancer immunoeediting) που συμβαίνει σε όλους τους όγκους. Συνοπτικά αποτελείται από τρεις φάσεις, τη φάση της εξάλειψης όπου τα νεοπλασματικά κύτταρα αναγνωρίζονται και καταστρέφονται από τα ανοσιακά κύτταρα, τη φάση της διαφυγής όπου ο όγκος αναπτύσσεται με μεγαλύτερο ρυθμό νέκρωσης και μεθίσταται και μία ενδιάμεση φάση δυναμικής ισορροπίας, όπου τα νεοπλασματικά κύτταρα ανανεώνονται και καταστρέφονται με τον ίδιο ρυθμό. Συνήθως οι όγκοι όταν διαγιγνώσκονται βρίσκονται στη φάση της διαφυγής, ωστόσο είναι δυνατόν η φάση της ισορροπίας να οδηγεί σε μακροχρόνια αδράνεια, αν και τελικώς ο όγκος οδηγείται σε φάση διαφυγής(139, 140, 141, 142, 143).

Το πεδίο της ανοσοτροποποίησης δεν είναι καλά χαρακτηρισμένο στο MM ωστόσο έχει αναδειχθεί ο σημαντικός ρόλος των NK κυττάρων και των T λεμφοκυττάρων και των ενεργών μορίων της περφορίνης και της ιντερφερόνης-γ στην αναγνώριση και εξάλειψη των MM κυττάρων. Ιδιαίτερα σημαντικό έχει αναδειχθεί το επιφανειακό μόριο CD226 των NK και T-

λεμφοκυττάρων που οδηγεί στη σύνδεση με τα μόρια CD112 και CD155, τα οποία υπερεκφράζονται λόγω στρες στην επιφάνεια των MM κυττάρων οδηγώντας σε αυξημένη αναγνώριση, ενώ μεταλλάξεις στο CD226 συνδέθηκαν με ταχύτερη ανάπτυξη παραπρωτεϊναιμίας και μικρότερη επιβίωση(144, 145, 146). Σημαντικές στην πρόοδο της νόσου είναι οι αντιγονοειδικές T-κυτταρικές απαντήσεις καθώς φαίνεται διαγραφή γονιδίων υποδοχέων, όπως αυτού του *SOX2* (*SRY-Box Transcription Factor 2*, εμβρυϊκό αντιγόνο προγονικών κυττάρων), είχε ως αποτέλεσμα την πρόοδο σε ενεργό MM σε ασθενείς με MGUS(147).

Η μετάβαση από τη φάση της ισορροπίας στη φάση της διαφυγής δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί αν και έχει υποτεθεί πως η γενετική αστάθεια των MM κυττάρων μπορεί να οφείλεται στη δράση του ανοσιακού συστήματος, κάνοντας αναγκαία την επιλογή ανθεκτικών κλώνων με μηχανισμούς γενετικών και επιγενετικών τροποποιήσεων, ενώ νεότερα δεδομένα ιδιαίτερος μετά την εισαγωγή της ASCT και των ανοσοτροποποιητικών φαρμάκων υποστηρίζουν ότι σε ένα μικρό ποσοστό των ασθενών με MM είναι αναστρέψιμη η πορεία από τη φάση της διαφυγής στη φάση της ισορροπίας(148, 149).

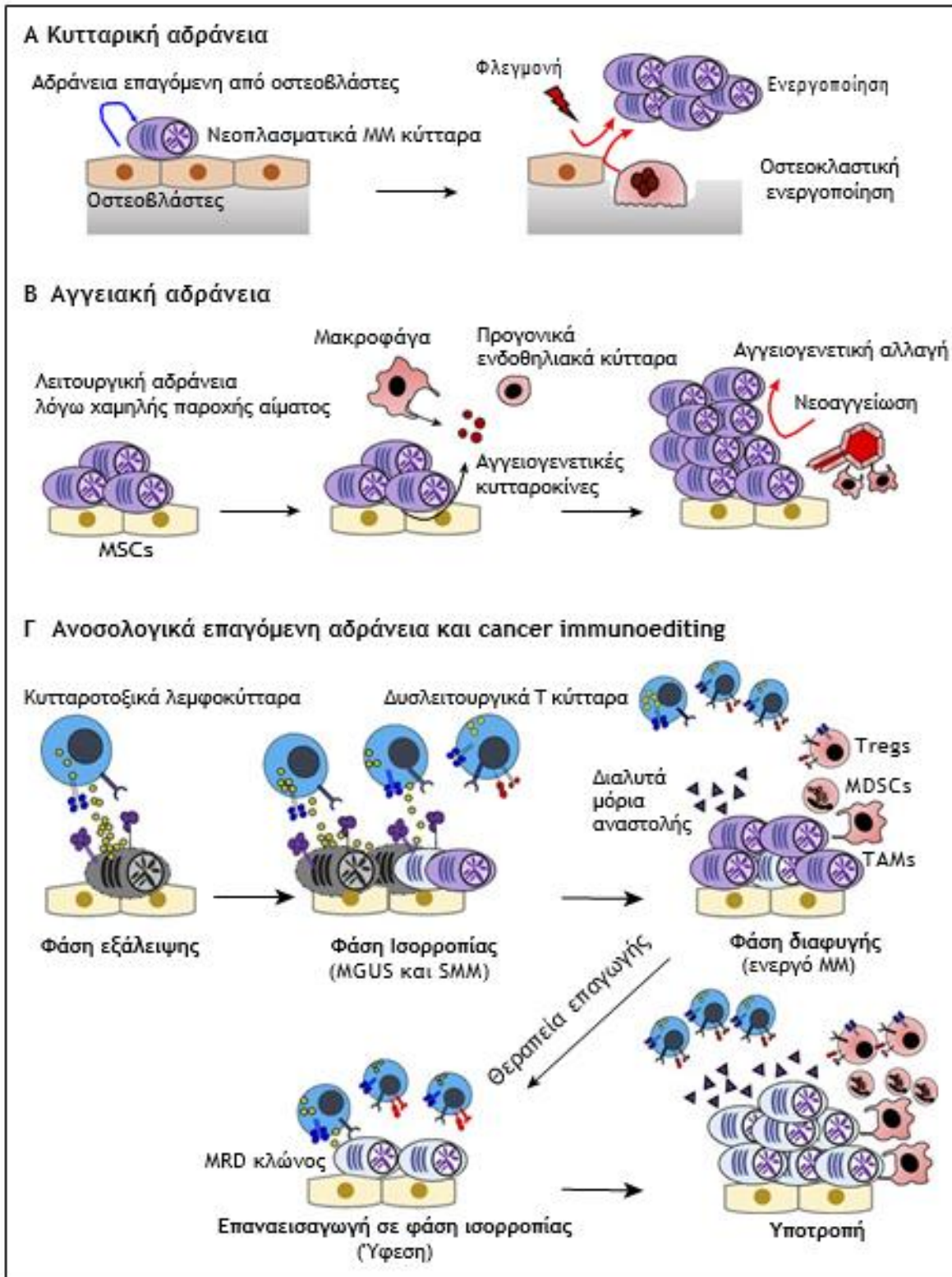
Οι μηχανισμοί της ανοσοκαταστολής που παρατηρούνται στο MM είναι αρκετά σύνθετοι και αποτελούν αντικείμενο εντατικής έρευνας ωστόσο μπορούν να συνοψιστούν στην εμπλοκή τριών συνιστωσών: τη δυσλειτουργία/αποκλεισμό των T-βοηθητικών και κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων, την κινητοποίηση ανοσοκατασταλτικών κυττάρων και μεταβολιτών/κυτταροκινών που βοηθούν στην ανάπτυξη του όγκου. Οι ασθενείς με MM έχει βρεθεί πως εκφράζουν >1 καρκινικά αντιγόνα (MAGE, BAGE, GAGE) και από in silico μελέτες έχουν βρεθεί αρκετά ανοσογονικά νεοαντιγόνα τα οποία προκαλούν T-κυτταρικές απαντήσεις. Μάλιστα το φορτίο των νεοαντιγόνων και των μεταλλάξεων βρέθηκε σε υψηλότερα επίπεδα στους ασθενείς με υποτροπή και συσχετίστηκε με ελαττωμένη επιβίωση σε νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς MM(150, 151, 152). Όλα τα προηγούμενα ωστόσο θα πρέπει να ληφθούν με επιφύλαξη καθώς φαίνεται πως η πορεία του MM είναι πολυπαραγοντική και το φορτίο των μεταλλάξεων δύναται να οφείλεται και στις χρωμοσωμικές ανωμαλίες που παρατηρούνται στη νόσο και επηρεάζουν την επιθετικότητα της νόσου(153).

Χαρακτηριστικό στο MM είναι ο αλλαγμένος φαινότυπος των T-κυττάρων με σαφή υπεροχή των Th-17, τα οποία ενεργοποιούνται από τις IL-1, IL-6, που παράγονται από το μικροπεριβάλλον, επάγουν μέσω της παραγωγής και έκκρισης IL-17 την ανάπτυξη των MM κυττάρων(118, 154). Φαίνεται ότι η πρόοδος του MM αλλάζει και δημιουργεί νέους και μοναδικούς ανοσοφαινοτύπους σε περιοχές του ΜΟ (niches) καθιστώντας εξαιρετικά δύσκολο τον συνολικό χαρακτηρισμό των ανοσοκυττάρων. Παρόλο που ιστοειδικά δραστικά T-κύτταρα

παρατηρούνται στο MGUS, αυτός ο υποπληθυσμός στο MM φαίνεται να εκλείπει και να αντικαθίσταται από γηρασμένα και αποδυναμωμένα T-κύτταρα(155, 156, 157).

Μελέτες έχουν καταδείξει την συσσώρευση γηρασμένων CD57+ CD8+ T-κυττάρων στο MM, ενώ τα CD8+ T-κύτταρα από νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς σπάνια χαρακτηρίζονται από υψηλή έκφραση υποδοχέων σημείων ανοσιακού ελέγχου (immune checkpoint receptors) όπως PD-1 (Protein Death-1), CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4), TIM3 (T-cell Immunoglobulin and Mucin domain-containing-3), LAG-3 (Lymphocyte-activation Gene 3), που είναι και το κύριο χαρακτηριστικό της εξάντλησης των T-κυττάρων(158). Τελευταία στο ίδιο πλαίσιο αναδείχθηκε ο ρόλος του υποδοχέα TIGIT (T-cell Immunoreceptor with Immunoglobulin and ITIM domains), ο οποίος έχει αντίθετη λειτουργία από αυτή του CD226 όπως περιγράφηκε παραπάνω. Τούτο σημαίνει πως ανταγωνίζεται τον CD226 στην κυτταροτοξική σύναψη μοιραζόμενος κοινούς συνδέτες, ρυθμίζει αρνητικά την επαφή T-κυττάρου και δενδριτικού κυττάρου και αναστέλλει τα TIGIT<sup>+</sup> T-ρυθμιστικά. Το TIGIT εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα από τα CD8+ T-κύτταρα ασθενών με MM και τα TIGIT<sup>+</sup> T-κύτταρα εμφανίζουν ανοσοπάρεση(159, 160).

Η ύπαρξη ανοσοκατασταλτικών κυττάρων έχει αναδειχθεί κυρίως μέσω των TAMs και των κατασταλτικών κυττάρων που προέρχονται από τα μυελοειδή προγονικά κύτταρα (MDSCs, Myeloid-derived Suppressor Cells)(161). Στη λειτουργία των MDSCs συμβάλλουν τα DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns) και οι υποδοχείς της φυσικής ανοσίας TLRs (Toll-like Receptors). Αρχικά αναπτύσσονται και στη συνέχεια μεταναστεύουν από χημειοκίνες που εκκρίνουν τα TAMs στο μικροπεριβάλλον του όγκου. CD14<sup>+</sup> μονοκύτταρα ασθενών MM εκφράζουν ελαττωμένα επίπεδα μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης II και προωθούν την ανάπτυξη του MM, δεικνύοντας τον πρωθύστερο ογκογονικό προγραμματισμό τους πριν τη μετατροπή τους σε TAMs(161, 162). Η S100A9 πρωτεΐνη (μέλος των DAMPs) δρα αυτοκρινώς και ενεργοποιεί τα MDSCs ενώ ταυτόχρονα ενεργοποιεί τον καταρράκτη του φλεγμονοσώματος στα MM, συνδεδεμένη με τον κυτταρικό υποδοχέα TLR-4 και επάγοντας την παραγωγή IL-18(163, 164, 165, 166). Το ποσοστό των T-ρυθμιστικών στα CD4<sup>+</sup> T-κύτταρα είναι υψηλότερο στο MO σε σχέση με το περιφερικό αίμα υπό σταθερές συνθήκες. Τα T-ρυθμιστικά αυτά κύτταρα εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα μορίων ανοσολογικών σημείων ελέγχου σε σχέση με τα T-ρυθμιστικά υγιών ατόμων, γεγονός που αποτελεί αντικείμενο έρευνας νέων ανοσοτροποποιητικών θεραπειών(167) (Εικ. 11Γ).



Εικόνα 11 | Αδράνεια και cancer immunoeediting στις πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες. [Πηγή: (168)]

## 2. ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Οι ασθενείς με πρόδρομες μορφές MM (MGUS ή SMM) είναι συνήθως ασυμπτωματικοί και η νόσος ανευρίσκεται στα πλαίσια διενέργειας ελέγχου άλλου νοσήματος. Μάλιστα η διάγνωση των MGUS ή SMM μπορεί να διαπιστωθεί λόγω αυξημένης ταχύτητας καθίζησης ερυθρών ή αυξημένης ποσότητας πρωτεΐνης στο αίμα ή/και στα ούρα. Οι MM ασθενείς έχουν τυπική συμπτωματολογία η οποία αποδίδεται σε βλάβη τελικού οργάνου που προκαλεί η μονοκλωνική πρωτεΐνη Μ, όπως αδυναμία και ζάλη λόγω αναιμίας, οστικά άλγη λόγω οστικής νόσου και νευρολογικά συμπτώματα λόγω υπερασβεστιαμίας, υπεργλοιοτότητας ή συμπίεσης του νωτιαίου μυελού λόγω βλαβών στην σπονδυλική στήλη(169). Η συνύπαρξη παθολογικών καταστάσεων όπως είναι η αμυλοείδωση μπορεί να οδηγεί σε εμφάνιση συμπτωματολογίας σχετιζόμενη με την συσσώρευση του αμυλοειδούς στα τελικά όργανα.

Τα πλέον χρησιμοποιούμενα διαγνωστικά κριτήρια είναι αυτά που έχει συντάξει η Διεθνής Επιτροπή Εργασίας για το Πολλαπλό Μυέλωμα(7) (Πίν. 1). Η ύπαρξη των σχετιζόμενων με το μυέλωμα γεγονότων (Myeloma Defining Events, MDEs) είναι το κύριο χαρακτηριστικό διάκρισης του MM από τις άλλες πλασματοκυτταρικές διαταραχές. Αυτά περιλαμβάνουν ένα ή περισσότερα CRAB κριτήρια, την ανεύρεση κλωνικής πλασματοκυτταρικής διήθησης  $\geq 60\%$  MO, λόγο ελαφρών αλύσων (FLC, Free Light Chain)  $\geq 100$ , με συγκέντρωση της παθολογικής ελαφριάς αλυσίδας  $>100\text{mg/L}$  και την ύπαρξη δύο ή περισσότερων εστιακών αλλοιώσεων στη μαγνητική τομογραφία. Πιο συγκεκριμένα τα CRAB κριτήρια περιλαμβάνουν υπερασβεστιαμία με επίπεδα ασβεστίου  $>1\text{ mg/dl}$  υψηλότερα από το ανώτερο όριο των φυσιολογικών επιπέδων ( $>11\text{ mg/dl}$ ) στον ορό, νεφρική ανεπάρκεια με ρυθμό κάθαρσης κρεατινίνης  $<40\text{ ml/min}$  ή επίπεδα κρεατινίνης  $>2\text{ mg/dl}$ , αναιμία με ελάττωση αιμοσφαιρίνης  $>2\text{ g/dl}$  κάτω από το κατώτερο όριο των φυσιολογικών επιπέδων ( $<10\text{ g/dl}$ ) και την ανεύρεση μίας ή περισσότερων λυτικών εστιών με κλασικές απεικονιστικές μεθόδους ή αξονική τομογραφία (CT, whole body low-dose CT) ή συνδυασμό αξονικής τομογραφίας και τομογραφίας εκπομπής ποζιτρονίων (PET-CT). Για τη διάγνωση χρησιμοποιούνται τα εξής κριτήρια: ανεύρεση ιστολογικής κλωνικής πλασματοκυτταρικής διήθησης  $\geq 10\%$  MO ή ιστολογική διάγνωση οστικού ή εξωμυελικού πλασματοκυττώματος και είτε ένα ή περισσότερα από τα κριτήρια CRAB είτε λόγο ελαφρών αλύσων  $\geq 100$ , με συγκέντρωση της παθολογικής ελαφριάς αλυσίδας  $>100\text{ mg/L}$ .

Πάθηση	Ορισμός Πάθησης
Non-IgM MGUS	Πρέπει να πληρούνται και τα τρία κριτήρια: Μονοκλωνική πρωτεΐνη ορού (όχι του τύπου IgM) $<3\text{ g/dL}$ Κλωνικά πλασματοκύτταρα MO $<10\%*$

Απουσία βλαβών τελικού οργάνου όπως κριτήρια CRAB που αποδίδονται σε πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες	
Smoldering MM	<p>Πρέπει να πληρούνται και τα δύο κριτήρια:</p> <p>Μονοκλωνική πρωτεΐνη ορού (IgG or IgA) <math>\geq 3</math> gm/dL, ή μονοκλωνική πρωτεΐνη ορού <math>\geq 500</math> mg ανά 24 h ή και κλωνικά πλασματοκύτταρα MO 10%–60%</p> <p>Απουσία MDEs ή αμυλοείδωσης</p>
MM	<p>Πρέπει να πληρούνται και τα δύο κριτήρια:</p> <p>Κλωνική πλασματοκυτταρική διήθηση <math>\geq 10\%</math> ή ιστολογική διάγνωση οστικού ή εξωμυελικού πλασματοκυττώματος</p> <p>Ένα ή περισσότερα από τα κάτωθι MDEs πρέπει να πληρούνται:</p> <p>Στοιχεία βλάβης τελικού οργάνου που μπορούν να αποδοθούν στην υποκείμενη πλασματοκυτταρική διαταραχή και συγκεκριμένα:</p> <p>Υπερασβεστιαμία: ασβέστιο ορού <math>&gt; 0.25</math> mmol/L (<math>\geq 1</math> mg/dL) υψηλότερο από το ανώτερο φυσιολογικό όριο ή <math>&gt; 2.7</math> mmol/L (<math>\geq 11</math> mg/dL)</p> <p>Νεφρική Ανεπάρκεια: κάθαρση κρεατινίνης <math>&lt; 40</math> mL/min ή κρεατινίνη ορού <math>&gt; 177</math> mmol/L (<math>&gt; 2</math> mg/dL)</p> <p>Αναμία: ελάττωση αιμοσφαιρίνης <math>&gt; 2</math> g/dL κάτω από το κατώτερο όριο του φυσιολογικού, ή τιμή αιμοσφαιρίνης <math>&lt; 10</math> g/dL</p> <p>Οστικές βλάβες: μία ή περισσότερες οστεολυτικές εστίες στις ακτινογραφίες οστών, CT ή PET-CT</p> <p>Κλωνική πλασματοκυτταρική διήθηση MO <math>\geq 60\%</math></p> <p>Λόγος FLC ορού <math>\geq 100</math> (συγκέντρωση παθολογικής FLC <math>\geq 100</math> mg/L)</p> <p><math>&gt; 1</math> εστιακή βλάβη στην MRI (τουλάχιστον 5 χιλιοστά σε μέγεθος)</p>
IgM MGUS	<p>Πρέπει να πληρούνται και τα τρία κριτήρια:</p> <p>Συγκέντρωση μονοκλωνικής IgM στον ορό <math>&lt; 3</math> gm/dL</p> <p>Πλασματοκυτταρική διήθηση MO <math>&lt; 10\%</math></p> <p>Απουσία αναμίας, υπεργλυκότητας, λεμφαδενοπάθειας ή ηπατοσπληνομεγαλίας, οι οποίες μπορούν να αποδοθούν στην υποκείμενη λεμφοϋπερπλαστική διαταραχή</p>
MGUS Ελαφρών Αλυσών	<p>Πρέπει να πληρούνται όλα τα κριτήρια:</p> <p>Παθολογικός FLC λόγος (<math>&lt; 0.26</math> or <math>&gt; 1.65</math>)</p> <p>Αυξημένα επίπεδα της παθολογικής ελαφριάς αλυσίδας (αυξημένα επίπεδα ελεύθερης κάπια αλυσίδας σε ασθενείς με λόγο FLC <math>&gt; 1.65</math> και αυξημένα επίπεδα ελεύθερης λάμδα αλυσίδας σε ασθενείς με λόγο FLC <math>&lt; 0.26</math>)</p> <p>Απουσία έκφρασης βαριάς αλυσίδας ή ανοσοκαθίλωσης</p> <p>Απουσία βλάβης τελικού οργάνου που οφείλεται σε CRAB</p> <p>Κλωνικά πλασματοκύτταρα MO <math>&lt; 10\%</math></p> <p>Μονοκλωνική πρωτεΐνη ούρων <math>&lt; 500</math> mg/24 h</p>
Μονήρες Πλασματοκύττωμα	<p>Πρέπει να πληρούνται και τα τέσσερα κριτήρια:</p> <p>Ιστολογικά επιβεβαιωμένη μονήρης βλάβη οστού ή μαλακού ιστού με παρουσία κλωνικών πλασματοκυττάρων</p> <p>Φυσιολογικός MO χωρίς παρουσία κλωνικών πλασματοκυττάρων</p> <p>Φυσιολογικές απεικονιστικές εξετάσεις πλην την μονήρους εστίας</p> <p>Απουσία βλάβης τελικού οργάνου που οφείλεται σε CRAB</p>

**Πίνακας 1 | Διαγνωστικά κριτήρια της Διεθνούς Επιτροπής Εργασίας για το Πολλαπλό Μυέλωμα και τις πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες.** Συντομογραφίες: MGUS, monoclonal gammopathy of undertermined significance; CRAB features, hypercalcemia, renal insufficiency, anemia, and bone lesions; MM, multiple myeloma; FLC, free light chain; SMM, smoldering multiple myeloma.\*Σε ασθενείς χαμηλού κινδύνου MGUS μπορεί να μην διενεργηθεί βιοψία MO (IgG τύπος, M protein  $< 15$  gm/L, φυσιολογικό FLC λόγος) στους οποίους δεν υπάρχουν κλινικά στοιχεία που παραπέμπουν σε μυέλωμα. [Πηγή: (49)]

## 2.1 Κλινική αξιολόγηση

Η κλινική αξιολόγηση περιλαμβάνει τη λήψη του ιατρικού και οικογενειακού ιστορικού καθώς και την κλινική εξέταση του ασθενούς. Το οικογενειακό ιστορικό θα πρέπει να εστιαστεί στην ύπαρξη συγγενών πρώτου βαθμού με αιματολογικές κακοήθειες ιδίως λέμφωμα, χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία και πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες. Το λοιπό ιατρικό ιστορικό θα πρέπει να εστιαστεί σε συννοσηρότητες όπως η αρτηριακή υπέρταση, ο σακχαρώδης διαβήτης και η νεφρική νόσος που μπορούν να επηρεάσουν τις θεραπευτικές αποφάσεις.

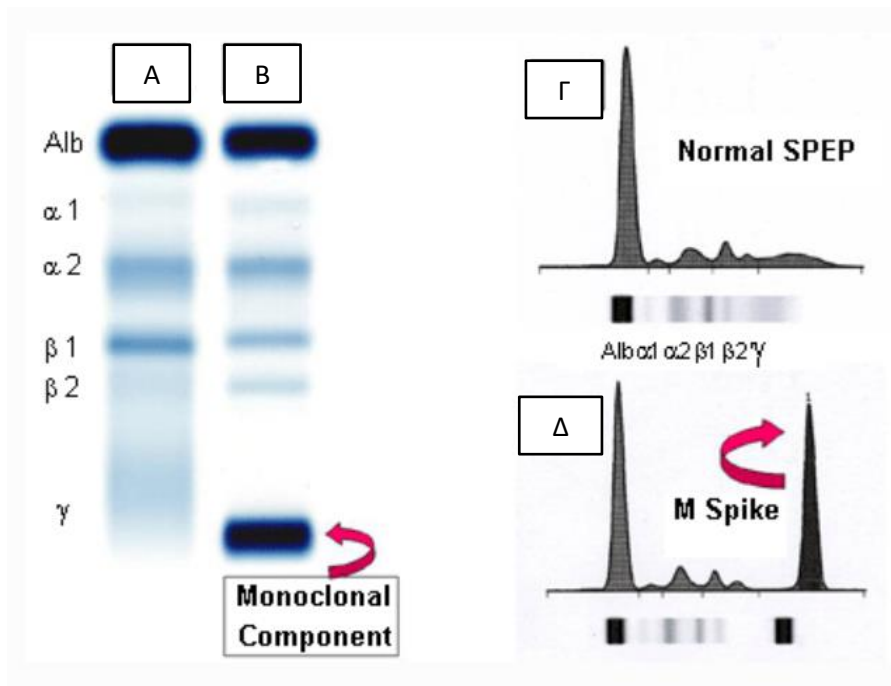
## 2.2 Εργαστηριακός έλεγχος

Ο εργαστηριακός έλεγχος περιλαμβάνει γενική αίματος με στοιχεία από όλες τις κυτταρικές σειρές (ερυθρά αιμοσφαίρια, λευκοκύτταρα, αιμοπετάλια) καθώς και επίχρισμα περιφερικού αίματος. Διενεργείται επίσης ένα πλήρες βιοχημικό πάνελ εξετάσεων μεταξύ των οποίων ηπατικών ενζύμων, δεικτών νεφρικής λειτουργίας (ρυθμός σπειραματικής διήθησης, ηλεκτρολύτες, ασβέστιο, κρεατινίνη, γαλακτική αφυδρογονάση, επίπεδα αλβουμίνης). Ως νεφρική νόσο του MM τα κριτήρια ορίζουν μόνο ως MDE τη νεφροπάθεια από κυλίνδρους ελαφρών αλυσίδων. Άλλες νεφρικές νόσοι, όπως η νόσος εξ εναποθέσεως ελαφρών αλύσων, η μεμβρανοϋπερπλαστική σπειραματονεφρίτιδα και η αμυλοείδωση από ελαφρές αλυσίδες αμυλοειδούς θεωρούνται μεμονωμένες οντότητες και για αυτόν το λόγο συστήνεται η βιοψία νεφρού σε ασθενείς με κυλινδρουρία, ιδιαίτερα αν τα επίπεδα των FLC είναι μικρότερα από 500 mg/L(170).

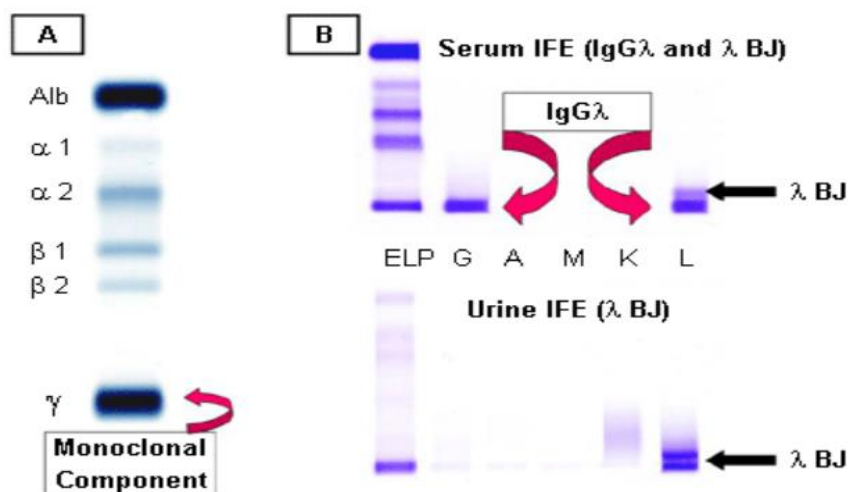
Επίσης πρέπει να προσδιοριστούν τα επίπεδα των μονοκλωνικών πρωτεϊνών και της β2-μικροσφαιρίνης. Τα επίπεδα της β2-μικροσφαιρίνης έχουν εισαχθεί στα αναθεωρημένα διαγνωστικά κριτήρια και για αυτό αποτελούν μέρος της διαγνωστικής προσέγγισης(171). Επιπλέον, θα πρέπει να εξετάζεται τόσο ο ορός όσο και τα ούρα για την ανίχνευση μονοκλωνικού κλάσματος πρωτεΐνης με τη χρήση ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών. Η ανοσοκαθήλωση ορού είναι η καλύτερη μέθοδος για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό της βαριάς και ελαφριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης. Σε δείγμα ούρων 24ώρου επίσης μπορεί να πραγματοποιηθεί ηλεκτροφόρηση και ανοσοκαθήλωση. Επιπρόσθετα, ο προσδιορισμός των επιπέδων των ελαφριών αλυσίδων ενδείκνυται σε ασθενείς με ολιγοεκκριτικό ή μη-εκκριτικό MM, αν και σε ασθενείς με μη-εκκριτικό MM έχει βρεθεί φυσιολογικός λόγος ελαφρών αλύσων και για αυτό το λόγο δεν αποτελεί απαραίτητο κριτήριο διάγνωσης(7) (Εικ. 12, 13).

Απαραίτητη για τη διάγνωση είναι η διενέργεια οστεομυελικής βιοψίας και μυελογράμματος και η ανεύρεση >10% διήθηση του MO από πλασματοκύτταρα παρουσία MDE (Εικ. 14). Η κλωνικότητα των πλασματοκυττάρων μπορεί να αξιολογηθεί στη βιοψία με τη χρήση ανοσοϊστοχημικών χρώσεων και συγκεκριμένα χρώση CD138+ (συνδεκάνη 1) ή χρώση

ανοσοϋπεροξειδάσης ή χρήση ανοσοφθορισμού. Ο ανοσοφαινότυπος τέλος μπορεί να προσδιοριστεί και με κυτταρομετρία ροής.



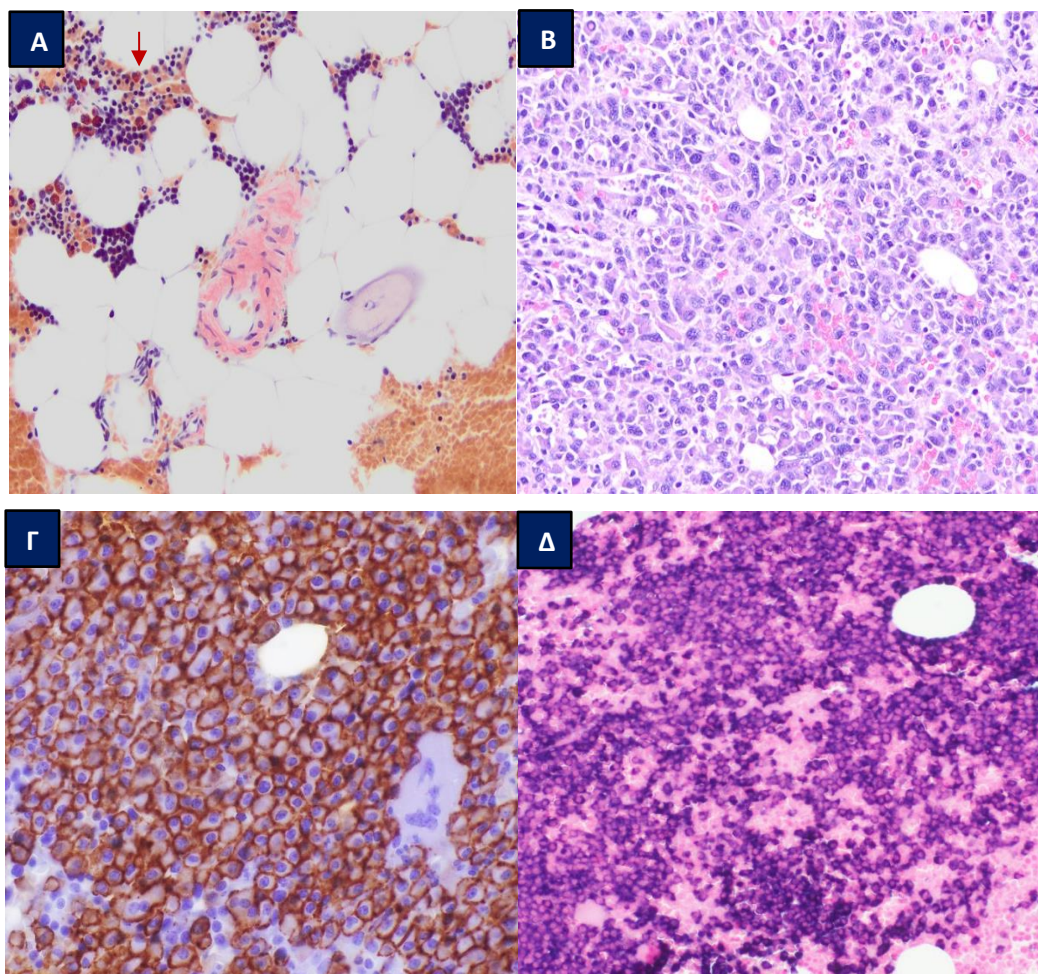
**Εικόνα 12 | Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών ορού.** Α. Φυσιολογικός ορός. Β. Ορός ασθενή με MM όπου διακρίνεται μονοκλωνικό κλάσμα (κόκκινο βέλος). Γ. Διάγραμμα ηλεκτροφόρησης φυσιολογικού ορού. Δ. Διάγραμμα ηλεκτροφόρησης όπου διακρίνεται κορυφή M πρωτεΐνης στην περιοχή των γ-σφαιρινών (κόκκινο βέλος) [Πηγή: <https://mykindofscience.com/2017/06/11/clinical-perspectives-multiple-myeloma-and-serum-protein-electrophoresis/>. Πρόσβαση: 30 Δεκ. 2022]



**Εικόνα 13 |** Α. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών ορού όπου φαίνεται μονοκλωνική M πρωτεΐνη. Β. Ανοσοκαθίλωση ορού (επάνω), μονοκλωνική ζώνη IgG-βαριά αλυσίδα και μονοκλωνική ζώνη λ ελαφράς αλυσίδας. Ανοσοκαθίλωση ούρων (κάτω), δίκλωνη ζώνη λ ελαφράς αλυσίδας, πρωτεϊνουρία Bence-Jones.



[Πηγή: <https://mykindofscience.com/2017/06/11/clinical-perspectives-multiple-myeloma-and-serum-protein-electrophoresis/>. Πρόσβαση: 30 Δεκ. 2022]



**Εικόνα 14 | Ιστολογικές τομές από οστεομυελικές βιοψίες ασθενών MM.** Α. Εναπόθεση αμυλοειδούς σε πλασματοκύτταρα χρωσμένα με κόκκινο του Congo (κόκκινο βέλος). Β. Εκτεταμένη διήθηση ΜΟ από νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα. Αναγνωρίζονται πολυπύρνα πλειόμορφα πλασματοκύτταρα. Γ. Θετική αντι-CD138+ χρώση έναντι πλασματοκυττάρων (καφεοειδής απεικόνιση κυτταροπλάσματος). Δ. In situ υβριδισμός έναντι κ ελαφρών αλυσίδων (μωβ απεικόνιση κυτταροπλάσματος). [Πηγή: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/lymphomamyeloma.html>. Πρόσβαση: 30 Δεκ. 2022]

### 2.3 Απεικονιστικός έλεγχος

Η οστική νόσος θα πρέπει να αξιολογείται κατά τη διάγνωση σε όλους τους ασθενείς σύμφωνα με τα νέα κριτήρια που έχει θεσπίσει η Διεθνής Ομάδας Εργασίας για το MM και περιλαμβάνει τη χρήση κλασικών αλλά και νεότερων απεικονιστικών μεθόδων όπως η CT και η <sup>18</sup>F<sub>2</sub>FDG (Fluorodeoxyglucose) PET-CT. Η επιλογή της εκάστοτε μεθόδου εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα. Στόχος είναι η χρήση ευαίσθητων μεθόδων προκειμένου να γίνει ανίχνευση των λυτικών εστιών σε προωιότερο στάδιο καθώς η παρουσία λυτικής εστίας μεγέθους τουλάχιστον 5 χιλιοστών σε μέγεθος θέτει τη διάγνωση MM. Επίσης η MRI οσφυϊκής μοίρας σπονδυλικής

στήλης και λαγονίων ή ακόμα και ολοσωματική MRI επιβάλλεται ιδίως σε ασθενείς με απουσία CRAB κριτηρίων και ασθενείς με SMM. Η MRI δίνει λεπτομερείς πληροφορίες για τη διήθηση του μυελού καθώς και την ύπαρξη εστιακών αλλοιώσεων καθώς η ανεύρεση αυτών σε ασθενείς με SMM συνδέθηκε με σημαντικά μικρότερο μέσο χρόνο προόδου σε MM σε σχέση με ασθενείς χωρίς εστιακές αλλοιώσεις(172, 173) (Εικ.15).



**Εικόνα 15 | Απεικονιστικός έλεγχος στο MM.** Α. Απλή ακτινογραφία κρανίου όπου απεικονίζονται πολλαπλές ακτινοδιαγαστικές λυτικές εστίες στο θόλο του κρανίου. Β Απλή ακτινογραφία λεκάνης-ισχίων όπου απεικονίζονται πολλαπλές οστεολυτικές εστίες των οστών της σπονδυλικής στήλης, των λαγονίων οστών και των μηριαίων οστών. Γ. Αξονική τομογραφία σπονδυλικής στήλης, οστικό παράθυρο, όπου διακρίνονται συμπίεστικά κατάγματα στους Θ12-Ο2 σπονδύλους. Δ. MRI T1 ακολουθία, υψηλού σήματος ενδομυελικό μόρφωμα που αντιστοιχεί σε εντοπισμένη διήθηση από MM στη διάφυση του μηριαίου οστού. Ε. MRI T2 ακολουθία, όπου διακρίνεται ανομοιογενούς έντασης σήμα στα σώματα των σπονδύλων της θωρακικής και οσφυϊκής μοίρας της σπονδυλικής στήλης, υποδεικνύοντας διήθηση πολλαπλών σπονδύλων από νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα. [Πηγή: <https://radiopaedia.org/articles/multiple-myeloma-1?lang=us>. Πρόσβαση: 30 Δεκ. 2022]

## 2.4 Επιπρόσθετες εξετάσεις

Σε περίπτωση λεπτομηνιγικής διήθησης διενεργείται οσφουονωτιαία παρακέντηση για βιοχημική, κυτταρολογική εξέταση και ανοσοφαινότυπο. Για την αξιολόγηση εξωμυελικής νόσου μπορεί να διενεργηθεί <sup>18</sup>FDG-PET-CT. Επίσης σε ασθενείς με πρωτεϊνουρία, ανεξήγητη καρδιακή ανεπάρκεια, ηπατομεγαλία, γαστρεντερικά συμπτώματα, μακρογλωσσία και (αυτόνομη) νευροπάθεια θα πρέπει να διενεργηθεί και έλεγχος για αμυλοείδωση. Τέλος αξιολόγηση κρυσφαιρινών θα πρέπει να διενεργείται σε ασθενείς με συμπτώματα κρυσφαιρινικής αγγειίτιδας όπως δερματικές εκδηλώσεις (ισχαιμία δακτύλων, δερματική νέκρωση ή φαινόμενο Raynaud εκλυόμενο από ψύχος), αρθρίτιδας, νευροπάθειας ή νεφρικής νόσου (σπειραματονεφρίτιδα) και αιμολυτικής αναιμίας(12).

## 2.5 Νέες μέθοδοι ανίχνευσης

Μία αρκετά νέα και ελπιδοφόρα μέθοδος προσδιορισμού του γενετικού προφίλ είναι η υγρή βιοψία η οποία δίνει τη δυνατότητα ανίχνευσης των κυκλοφορούντων νεοπλασματικών κυττάρων (CTCs, Circulating Tumor Cells) και του εξωκυττάρου, ελεύθερου DNA (cfDNA, cell-free DNA). Τα CTCs είναι πολύ λίγα νεοπλασματικά κύτταρα τα οποία έχουν εξαγγιωθεί από τον ΜΟ στο περιφερικό αίμα, και είναι υπεύθυνα για τη μετάσταση και την εγκατάσταση ΜΜ κυττάρων σε διαφορετικές θέσεις του σκελετού, απουσία πλασματοκυτταρικής λευχαιμίας(174). Δεδομένου του γεγονότος πως αυτά τα κύτταρα περιέχουν ολόκληρο το γενετικό υλικό μπορούν να χρησιμοποιηθούν για γονιδιωματική και πρωτεομική ανάλυση. Ωστόσο, η επιλογή από ένα μεγάλο σύνολο λευκοκυττάρων των CTCs και η ανάλυση του γενετικού τους υλικού καθίσταται τεχνικά δύσκολη και απαιτητική. Από την άλλη πλευρά το cfDNA, το οποίο είναι απελευθερωμένο από τα κύτταρα και κυκλοφορεί στο περιφερικό αίμα, μπορεί να προέρχεται και από τα νεοπλασματικά κύτταρα καθιστώντας το κατάλληλο για ανάλυση μεταλλάξεων αλλά και μη-γενετικών χαρακτηριστικών όπως η τοπολογία, τα πρότυπα μεθύλιωσης και οι περιοχές διάσπασης(175, 176, 177).

Μάλιστα οι αρχικές μαζικές γενετικές μελέτες, στις οποίες αναλύθηκαν κατά ζεύγη δείγματα από βιοψίες ΜΟ και περιφερικού αίματος, κατέδειξαν πως οι υγρές βιοψίες αντικατοπτρίζουν ακριβώς τις κλωνικές μεταλλάξεις και τη γενετική ετερογένεια του ΜΜ συγκρινόμενες με τις οστεομυελικές βιοψίες(178, 179, 180, 181, 182, 183). Οι παραπάνω μελέτες ανέδειξαν τη χρήση των CTCs για τον προσδιορισμό του μεταγραφικού και γενετικού προφίλ των νεοπλασματικών κυττάρων των ασθενών ΜΜ, επιτρέποντας τη διαστρωμάτωση κινδύνου και την εφαρμογή τεχνικών ιατρικής ακριβείας (precision medicine).

Η χρήση της υγρής βιοψίας θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και σε ασθενείς με πρόδρομες μορφές MM πριν την εμφάνιση κλινικής συμπτωματολογίας. Πέραν του προσδιορισμού των μεταλλάξεων δυνατή είναι και η ανάλυση του μεταγραφικού προφίλ επιτρέποντας την ποσοτική μέτρηση της μεταγραφικής και μεταφραστικής δραστηριότητας, οι οποίες δρουν ως κινητήριες δυνάμεις στην εξέλιξη του ογκογονικού φαινοτύπου. Γενετικές μελέτες στα CTCs υπέδειξαν πιθανούς μοριακούς μηχανισμούς διαφυγής αυτών των κυττάρων από το ΜΟ, κυρίως μέσω της διαφορικής έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στη φλεγμονή, την υποξία, τον κυτταρικό κύκλο, την κυτταρική μετανάστευση και το μεσεγγυματικό μετασχηματισμό(181, 184). Η δυνατότητα επανειλημμένων δειγμάτων νεοπλασματικών κυττάρων (καθώς ο όγκος δεν αφαιρείται) σε συνδυασμό με τον αυξημένο αριθμό κυκλοφορούντων MM κυττάρων (ενώ οι συμπαγείς όγκοι αποδίδουν ~1-10 CTCs ανά ml αίματος, στο MM τα δείγματα ασθενών αποδίδουν 10-100 φορές υψηλότερα CTCs) αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα της υγρής βιοψίας(182, 185). Ένα επιπλέον πλεονέκτημα είναι ο προσδιορισμός της κλωνικής ετερογένειας όπως περιγράφηκε παραπάνω λόγω αδυναμίας λήψης οστεομυελικών βιοψιών από πολλαπλά σημεία του όγκου.

Η χρήση των CTCs ωστόσο στην κλινική πράξη χαρακτηρίζεται εν τοις πράγμασι ως περιορισμένη λόγω της χαμηλής απόδοσης CTCs και της αδυναμίας διενέργειας FISH, η οποία απαιτεί μεγάλο αριθμό νεοπλασματικών κυττάρων, σε ασθενείς με MM. Επίσης ενώ στην εξωμυελική νόσο και στην πλασματοκυτταρική λευχαιμία τα CTCs αποτελούν σημαντικό ποσοστό των κυκλοφορούντων λευκοκυττάρων, σε καταστάσεις χαμηλού νεοπλασματικού φορτίου, όπως μετά από θεραπευτική ανταπόκριση, η μέθοδος αποδίδει περισσότερα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα σε σχέση με την οστεομυελική βιοψία. Η πρόκληση της υγρής βιοψίας είναι η αύξηση της ευαισθησίας μέσω απομόνωσης περισσότερων CTCs και ενώ είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί μέσω κυτταρομετρίας ροής, η έλλειψη προτυποποίησης (standardization) μεταξύ των διαγνωστικών κέντρων καθιστά ενίοτε δυνατή την ανίχνευση CTCs σε μόλις 27% των ασθενών(186). Επίσης η σύζευξη μορφολογικών εικόνων CTCs με συστήματα τεχνητής νοημοσύνης και βαθιάς μάθησης είναι ιδιαιτέρως ελπιδοφόρα καθώς μπορεί να προτυποποιήσει την αναγνώριση αυτών και να μειώσει τα σφάλματα (bias) και τον χρόνο ανάλυσης. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η ανάπτυξη από τους επιστήμονες ενός νευρωνικού δικτύου βασισμένο σε αλγορίθμους τεχνητής νοημοσύνης το οποίο αναγνωρίζει και ταξινομεί τα CTCs που απομονώνονται χρησιμοποιώντας την πλατφόρμα CellSearch(187).

## **2.6 Διαστρωμάτωση κινδύνου και προγνωστικοί παράγοντες**

Πολλοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των κυτταρογενετικών ανωμαλιών και των βιοδεικτών, δρουν ως προγνωστικοί δείκτες για τους ασθενείς MM. Οι κυτταρογενετικές

ανωμαλίες θα πρέπει να αξιολογούνται στο ΜΟ όλων των ασθενών MM(188). Οι del(17p) και t(4;14) θεωρούνται ιδιαίτερης βαρύτητας καθώς παρουσία αυτών συνεπάγεται πτωχή πρόγνωση. Ωστόσο η παρουσία αριθμητικών χρωμοσωμιακών ανωμαλιών, όπως είναι η τρισωμία 3 και 5 τροποποιεί την πτωχή πρόγνωση των παραπάνω κυτταρογενετικών ανωμαλιών(50, 189). Ωστόσο, άλλες ανωμαλίες όπως η del(6p) σε ασθενείς με del(17p) ή del(1p32) σε ασθενείς με t(4;14) επιδεινώνουν την πρόγνωση(190). Η ύπαρξη της del(1p) μπορεί να επιδεινώσει την καλή πρόγνωση της t(11;14)(191, 192).

Το σύστημα διαστρωμάτωσης κινδύνου το οποίο έχει προταθεί από τη Διεθνή Ομάδα Εργασίας για το Πολλαπλό Μυέλωμα αναφέρει πως οι del(17p), t(4;14), t(14;16), t(14;20) σε συνδυασμό με μη-υπερδιπλοειδικό καρύοτυπο θεωρούνται υψηλού κινδύνου προγνωστικοί παράγοντες σε ασθενείς με MM ανεξαρτήτως θεραπείας(193). Έτερα συστήματα διαστρωμάτωσης ωστόσο θεωρούν την t(4;14) ενδιαμέσου κινδύνου, δεδομένης της καλύτερης ανταπόκρισης στη θεραπεία με αναστολείς πρωτεασώματος(191). Συνδυασμοί τριών ή περισσότερων κυτταρογενετικών ανωμαλιών επιφέρουν στον ασθενή πολύ υψηλό κίνδυνο, με μέση επιβίωση <2 έτη(194).

Έχουν προταθεί ποικίλα συστήματα διαστρωμάτωσης για το MM όπως το Διεθνές Ταξινομικό Σύστημα (International Staging System, ISS)(195). Το συγκεκριμένο σύστημα διακρίνει τους ασθενείς σε τρεις διαφορετικές κατηγορίες, καθεμία από τις οποίες φέρει διαφορετικό προγνωστικό κίνδυνο. Στην αναθεωρημένη του μορφή (Revised International Staging System, R-ISS) συνδυάζει βιοχημικούς δείκτες όπως η β2-μικροσφαιρίνη και η αλβουμίνη με τη γαλακτική αφυδρογονάση και τις κυτταρογενετικές ανωμαλίες οι οποίες προστέθηκαν αργότερα(193, 195, 196) (Πίν. 2). Ωστόσο έχουν περιγραφεί επιπρόσθετοι προγνωστικοί παράγοντες οι οποίοι τροποποιούν την επιβίωση(193) (Πίν. 3).

<b>Σταδιοποίηση κινδύνου</b>
<b>International Staging System</b>
Στάδιο 1: β2-μικροσφαιρίνη ορού <3.5 mg/L, αλβουμίνη ορού ≥3.5 g/dL
Στάδιο 2: όχι στάδιο 1 ή στάδιο 3
Στάδιο 3: β2-μικροσφαιρίνη ορού ≥5.5 mg/L
<b>Revised International Staging System</b>
Στάδιο 1: ISS στάδιο 1, φυσιολογικά επίπεδα LDH, απουσία κυτταρογενετικών ανωμαλιών υψηλού κινδύνου με τη μέθοδο FISH
Στάδιο 2: όχι στάδιο 1 ή στάδιο 3
Στάδιο 3: ISS στάδιο 3 και είτε υψηλού κινδύνου κυτταρογενετικές ανωμαλίες [t(4;14), t(14;16), del(17p)] είτε υψηλότερα του φυσιολογικού επίπεδα LDH

*Πίνακας 2* | **Σταδιοποίηση MM.** [Πηγή: (196)]

Άλλοι προγνωστικοί παράγοντες
• CTCs
• Εξωμυελική νόσος
• Υψηλός ρυθμός πολλαπλασιασμού πλασματοκυττάρων
• Υψηλού κινδύνου γενετική υπογραφή (GEP70, HOVON)
• Μεταλλάξεις στο <i>TP53</i>
• Νεφρική ανεπάρκεια
• Ανοσοπάρεση
• Πλασμαβλαστική μορφολογία MM κυττάρων

Πίνακας 3 | Προγνωστικοί παράγοντες. [Πηγή: (196)]

## 2.7 Θεραπεία

Ο πρωταρχικός θεραπευτικός στόχος στους ασθενείς με MM είναι η επέκταση του προσδόκιμου επιβίωσης και η βελτίωση της ποιότητας ζωής που επιτυγχάνεται με την αντιμετώπιση των επιπλοκών της νόσου και οδηγούν τελικά σε μακροχρόνια ύφεση. Οι θεραπείες στοχεύουν στην ελάττωση του φορτίου των νεοπλασματικών κυττάρων στο ΜΟ, το οποίο αξιολογείται με τη μέτρηση της Μ πρωτεΐνης και των ελαφρών αλύσεων στον ορό. Υψηλότερη ελάττωση συσχετίζεται με μεγαλύτερης διάρκειας έλεγχο της νόσου(197). Οι νεότερες θεραπείες περιλαμβάνουν την εισαγωγή στην κλινική πρακτική αναστολέων πρωτεασώματος (π.χ. bortezomib, ixazomib, carfilzomib), ανοσοτροποποιητικών παραγόντων (π.χ. θαλιδομίδη, λεναλιδομίδη και πομαλιδομίδη), μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι επιφανειακών αντιγόνων των πλασματοκυττάρων (π.χ. daratumumab, elotuzumab, isatuximab) και της ASCT. Τα κορτικοστεροειδή εισάγονται σε συνδυασμό με τις υπόλοιπες θεραπείες (Πίν. 4).

### Εγκεκριμένα φάρμακα στη θεραπεία του MM

Κατηγορία Φαρμάκου	Όνομα Φαρμάκου	Μηχανισμός Δράσης	Τρόπος χορήγησης	Ενδείξεις	Συνδυαστικό σχήμα	Παρενέργειες και προφυλάξεις
Αλκυλιωτικοί παράγοντες	Μελφαλάνη	Ρήξη διπλής έλικας DNA, δημιουργία δεσμών μεταξύ των ελίκων του DNA	Από το στόμα, ενδοφλέβια	Θεραπεία MM	MPT, MPV Υψηλές δόσεις για προετοιμασία για ASCT και αλλογενή SCT	Μυελοκαταστολή, λοιμώξεις, βλεννογονίτιδα, υψηλός κίνδυνος δεύτερης πρωτοπαθούς κακοήθειας
	Κυκλοφωσφαμίδη	Δημιουργία δεσμών μεταξύ των ελίκων του DNA, αντιαιγιογενετικές ιδιότητες σε χαμηλές συγκεντρώσεις	Από το στόμα, ενδοφλέβια	Πρώτης γραμμής και θεραπεία υποτροπής, κινητοποίηση περιφερικών βλαστοκυττάρων	Κορτικοστεροειδή και ανοσοτροποποιητικά (CTD, CRD)/αναστολείς πρωτεασώματος (VCD, VCP, KCD)	Μυελοκαταστολή, λοιμώξεις, αιμορραγική κυστίτιδα, τιτλοποίηση δόσης για ουδετεροπενία και θρομβοπενία
Στεροειδή	Δεξαμεθαζόνη	Αναστέλλουν την έκφραση γονιδίων στόχων μέσω αλληλεπίδρασης με	Από το στόμα ή ενδοφλέβια	Πρώτης γραμμής και θεραπεία υποτροπής	Με όλα τα σχήματα, είτε σε ώσεις είτε εβδομαδιαίως, ως	Λοιμώξεις, υπεργλυκαιμία, αιμυαλμία, ψυχιατρικά συμπτώματα, γαστρίτιδα, δυσπεψία, πεπτικό έλκος

		τον NF-κB και τον API			μονοθεραπεία σε πίεση νωτιαίου μυελού	
<b>Ανθρακυκλίνες</b>	Δοξορουβικίνη	Αναστολέας τοποϊσομεράσης II	Ενδοφλεβίως	Πρώτης γραμμής και θεραπεία υποτροπής	PAD, DT-PACE	Καρδιακή ανεπάρκεια, αυξημένος κίνδυνος δεύτερης πρωτοπαθούς νεοπλασίας, μυελοκαταστολή, λοιμώξεις, διακοπή σε μυοκαρδιοπάθεια
<b>Αναστολείς πρωτεασώματος</b>	Bortezomib	Πρώτης γενεάς αναστρέψιμος αναστολέας 20S υπομονάδας του πρωτεασώματος	Ενδοφλεβίως ή υποδόρια	Πρώτης γραμμής και θεραπεία υποτροπής	Πρώτης γραμμής: MPV, VCD, VRD, VTD Υποτροπή: VCD, VTD, Pano-Vd, dara-Vd, PVd	Περιφερική νευροπάθεια, θρομβοπενία, διάρροια, δυσκοιλιότητα, έρπης ζωστήρ
	Carfilzomib	Δεύτερης γενεάς, επίλεκτικός, μη αναστρέψιμος αναστολέας πρωτεασώματος και ανοσοπρωτεασώματος	Ενδοφλεβίως	Υποτροπή	KRd, δεξαμεθαζόνη-carfilzomib	Υπέρταση, καρδιακή ανεπάρκεια, οξεία νεφρική βλάβη, θρομβωτική μικροαγγειοπάθεια, αναιμία, ουδετεροπενία, νευροπάθεια
	Ixazomib	Αναστρέψιμος αναστολέας πρωτεασώματος	Από το στόμα	Υποτροπή	IRd	Θρομβοπενία, εντερική τοξικότητα, εξάνθημα
<b>Ανοσοτροποποιητικά φάρμακα</b>	Θαλιδομίδη	Σύνδεση με cereblon (CRBN) και σύμπλεγμα E3 ουβικιτινικής λιγάσης οδηγώντας σε πρωτεασωμική αποσύνθεση των IKFZ1 και IKFZ3	Από το στόμα	Πρώτης γραμμής και θεραπεία υποτροπής	MPT, CTD, VTD	Περιφερική νευροπάθεια, φλεβική θρομβοεμβολή, ζάλη, εξάνθημα, δυσκοιλιότητα, τερατογόνες ιδιότητες
	Λεναλιδομίδη	Παρόμοιος τρόπος δράσης με θαλιδομίδη αλλά με διαφορετική συγγένεια σύνδεσης με CRBN	Από το στόμα	Πρώτης γραμμής και θεραπεία υποτροπής	Πρώτης γραμμής: λεναλιδομίδη-δεξαμεθαζόνη, dara-Rd, VRD. Υποτροπή: Λεναλιδομίδη-δεξαμεθαζόνη, dara-Rd, elo-Rd, KRd, IRd	Μυελοκαταστολή, φλεβική θρομβοεμβολή, εξάνθημα, χρόνια διάρροια, κίνδυνος δεύτερης πρωτοπαθούς νεοπλασίας, τιτλοποίηση δόσης σε νεφρική νόσο
	Πομαλιδομίδη	Παρόμοιος τρόπος δράσης με τη λεναλιδομίδη αλλά ισχυρότερη αποσύνθεση των IKFZ1 και IKFZ3 σε σχέση με τη λεναλιδομίδη	Από το στόμα	Θεραπεία υποτροπής	Πομαλιδομίδη-δεξαμεθαζόνη, dara-Pd, elo-Pd, PCd, PVd	Μυελοκαταστολή, φλεβική θρομβοεμβολή, εξάνθημα, νευροπάθεια
<b>Αναστολείς αφακετυλάσης των ιστονών</b>	Panobinostat	Αναστολέας όλων των ιστονών	Από το στόμα	Θεραπεία υποτροπής	Pano-Vd	Θρομβοπενία, διάρροια, ζάλη
<b>Μονοκλωνικά αντισώματα</b>	Elotuzumab	Εξανθρωπισμένο μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι SLAMF7, δρώντας έναντι των MM κυττάρων μέσω ADCC και ADCP, ενεργοποιεί τα NK κύτταρα	Ενδοφλέβια	Θεραπεία υποτροπής	Elo-Rd, elo-Pd	Αντιδράσεις σχετικές με την ενδοφλέβια έγχυση, παρεμβολή στην εργαστηριακή αξιολόγηση ανταπόκρισης σε ασθενείς με IgG-κ Μ πρωτεΐνη
	Daratumumab	Πλήρως ανθρώπινο αντι-CD38 αντίσωμα, το οποίο δρα μέσω ADCC,	Ενδοφλέβια ή υποδόρια χορήγηση	Πρώτης γραμμής και θεραπεία υποτροπής	Πρώτης γραμμής: Dara-VMP, dara-Rd, dara-VTD.	Αντιδράσεις σχετικές με την ενδοφλέβια έγχυση, παρεμβολή στην εργαστηριακή αξιολόγηση

		ADCP, CDC, αλλά και μέσω εξάλειψης των CD38+ Tregs, Bregs και MDSCs ασκώντας ανοσοτροποποιητική δράση			Υποτροπή: μονοθεραπεία, dara-Rd, dara-Vd, dara-Pd, dara-Kd	ανταπόκρισης σε ασθενείς με IgG-κ Μ πρωτεΐνη, παρεμβολή με ορολογικές εξετάσεις προσδιορισμού ομάδας αίματος
	Isatuximab	Χημειρικό αντι-CD38 αντίσωμα, το οποίο προκαλεί άμεση απόπτωση και ασκεί κλασικές Fc-εξαρτώμενες ανοσιακές απαντήσεις (ADCC, ADCP)	Ενδοφλέβια	Θεραπεία υποτροπής	Isa-Pd, Isa-Kd	Αντιδράσεις σχετικές με την ενδοφλέβια έγχυση, παρεμβολή στην εργαστηριακή αξιολόγηση ανταπόκρισης σε ασθενείς με IgG-κ Μ πρωτεΐνη, παρεμβολή με ορολογικές εξετάσεις προσδιορισμού ομάδας αίματος
<b>Συμπλέγματα αντισώματος-φαρμάκου</b>	Belantamab mafodotin	Εξανθρωπισμένο αντι-BCMA αντίσωμα συνδεδεμένο με παράγοντα που διαταράσσει τους μικροσωληνίσκους (monomethyl auristatin F)	Ενδοφλέβια	Θεραπεία υποτροπής	Μονοθεραπεία	Κερατοπάθεια, αναιμία, θρομβοπενία, ουδετεροπενία
<b>Επιλεκτικοί αναστολείς πυρηνικής μεταφοράς</b>	Selinexor	Μπλοκάρισμα της δράσης της exportin 1, αναστολή της πυρηνικής μεταφοράς ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών και αυξητικών παραγόντων	Από το στόμα	Θεραπεία υποτροπής	Selinexor και δεξαμεθαζόνη	Ναυτία, ανορεξία, διάρροια, υπονατρίαμια, θρομβοπενία, ζάλη

**Πίνακας 4** | Σύντομογραφίες: BMCA: B-cell maturation antigen, SLAMF7: επιφανειακό αντιγόνο CD139, ADCC: Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity, ADCP: Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis, ASCT: Autologous Stem Cell Transplantation, Breg: regulatory B-cell, CDC: Complement Dependent Cytotoxicity, CRD: cyclophosphamide-lenalidomide-dexamethasone, CTD: cyclophosphamide-thalidomide-dexamethasone, Dara-Pd: daratumumab-pomalidomide-dexamethasone, Dara-Rd: daratumumab-lenalidomide-dexamethasone, Dara-Vd: daratumumab-bortezomib-dexamethasone, Dara-VMP: bortezomib-melphalan-prednisone-daratumumab, Dara-VTD: bortezomib-thalidomide-dexamethasone-daratumumab, DT-PACE: dexamethasone-thalidomide-cisplatin-doxorubicin-cyclophosphamide-etoposide, Elo-Pd: elotuzumab-pomalidomide-dexamethasone, Elo-Rd: elotuzumab-lenalidomide-dexamethasone, IRD: ixazomib-lenalidomide-dexamethasone, Isa-Kd: isatuximab-carfilzomib-dexamethasone, Isa-Pd: isatuximab-pomalidomide-dexamethasone, KCD: carfilzomib-cyclophosphamide-dexamethasone, KRd: carfilzomib-lenalidomide-dexamethasone, MDSCs: myeloid-derived suppressor cell, MPT: melphalan-prednisone-thalidomide, MPV: melphalan-prednisone-bortezomib, PAD: bortezomib-doxorubicin-dexamethasone, Pano-Vd: Panobinostat-bortezomib-dexamethasone, PCd: pomalidomide-cyclophosphamide-dexamethasone, PVd: pomalidomide-bortezomib-dexamethasone, Treg: regulatory T-cell, VCD: bortezomib-cyclophosphamide-dexamethasone, VCP: bortezomib-cyclophosphamide-prednisone, VRD: bortezomib-lenalidomide-dexamethasone, VTD: bortezomib-thalidomide-dexamethasone. [Πηγή: (198)]

Πέραν των παραπάνω βρίσκονται υπό έρευνα και νεότερα φάρμακα όπως κυτταρικές θεραπείες (CAR-NK κύτταρα, CAR-T κύτταρα, ex vivo τροποποιημένα T-κύτταρα), δυνειδικά αντισώματα και δυνειδικοί δεσμευτές T-κυττάρων (**B**ispecific **T**-cell **E**ngagers, BiTEs), ανοσοτοξίνες (TAK-169, μονή άλυσος αντι-CD38 αντισώματος συνδεδεμένη με την υπομονάδα A της shiga-like τοξίνης του *E.coli*), αναστολείς σημείων ανοσιακού ελέγχου (immune checkpoint blockers) όπως



PD-1/PD-L1 αναστολείς και αναστολείς CTLA-4, παράγοντες έναντι της οικογένειας Bcl-2 οικογένειας (venetoclax) και αναστολείς κινασών (αναστολείς BRAF, MEK, FGFR3, CDKs, AKT)(199).

### **2.7.1 Αρχική θεραπεία**

Η αρχική θεραπεία του MM θα πρέπει να λάβει υπόψιν διάφορους παράγοντες. Ένας από αυτούς είναι η επιλεξιμότητα για ASCT, όπου το κύριο κριτήριο επιλογής είναι η ηλικία καθώς στις περισσότερες κλινικές μελέτες αυτή περιορίζεται για ασθενείς με ηλικία έως τα 65 έτη(200, 201, 202). Ωστόσο από διάφορες μελέτες έχει δειχθεί παρόμοια αποτελεσματικότητα της ASCT και για ηλικιωμένους ασθενείς, υποδεικνύοντας τη σημασία της βιολογικής και όχι της χρονολογικής ηλικίας(203). Το δεύτερο κριτήριο επιλογής για ASCT είναι η ύπαρξη συννοσηροτήτων και ιδιαίτερος καρδιοαναπνευστικών παθήσεων οι οποίες επιδρούν περιοριστικά στην επιλογή της ASCT ενώ η νεφρική ανεπάρκεια ακόμη και υπό αιμοκάθαρση δεν αποτελεί περιοριστικό παράγοντα καθώς το ένα τρίτο των ασθενών MM εμφανίζουν κάποιου βαθμού νεφρική ανεπάρκεια (203). Τέλος παράγων επιλογής είναι η προσωπική εκτίμηση του ασθενούς να λάβει ASCT. Από την άλλη πλευρά θα πρέπει να αξιολογηθούν το performance status, δηλαδή η γενικότερη κατάσταση και κατά πόσο είναι δυνατόν να δεχθεί τη κάθε θεραπεία καθώς και την τοξικότητα αυτής. Ο στόχος της αρχικής θεραπείας είναι η γρήγορη και αποτελεσματική ελάττωση του φορτίου του MM, η αντιμετώπιση των επιπλοκών και των συμπτωμάτων του MM και η συλλογή των βλαστικών κυττάρων από επιλέξιμους για ASCT ασθενείς (Εικ. 16).

### **2.7.2 Φαρμακευτική θεραπεία**

Η ανάπτυξη νέων φαρμάκων έχει προσθέσει πολλές επιλογές στη θεραπευτική φαρέτρα του κλινικού αιματολόγου. Από τις πρώιμες βελτιώσεις στη θεραπεία ήταν η αλλαγή από τη χρήση πολύ υψηλών δόσεων κορτικοστεροειδών σε ώσεις στη χρήση, αν και με μικρότερα ποσοστά ανταπόκρισης, εβδομαδιαίας δόσης καθιστώντας τη χρήση στεροειδών μέρος διαφόρων θεραπευτικών σχημάτων(204). Στη θεραπεία νεοδιαγνωσθέντων ασθενών MM χρησιμοποιείται συνδυασμός αναστολέα πρωτεασώματος και ανοσοτροποποιητικού φαρμάκου. Συγκεκριμένα η χρήση της bortezomib σε συνδυασμό με τη λεναλιδομίδη και τη δεξαμεθαζόνη αποτελεί την αρχική θεραπεία σε όλους τους ασθενείς που μπορούν να δεχτούν τριπλό θεραπευτικό σχήμα(205). Έχουν μελετηθεί επίσης συνδυασμοί διαφορετικών ανοσοτροποποιητικών φαρμάκων και αναστολέων πρωτεασώματος με μεγαλύτερο χρονικό διάστημα ελεύθερο προόδου σε σχέση με ασθενείς MM που λαμβάνουν θαλιδομίδη και δεξαμεθαζόνη(206). Επίσης ο συνδυασμός αναστολέων πρωτεασώματος και αλκυλιωτικών παραγόντων όπως η μελφαλάνη και

η κυκλοφωσφαμίδη έχει μελετηθεί ως θεραπεία εισαγωγής σε ασθενείς επιλέξιμους για μεταμόσχευση και έχει επιδείξει εξαιρετική ανοχή και υψηλά ποσοστά αποτελεσματικότητας σε κλινικές δοκιμές φάσης II(207). Μελέτες εξετάζουν την αντικατάσταση του bortezomib από το carfilzomib λόγω καλύτερων θεραπευτικών αποτελεσμάτων, ωστόσο η επιλογή αναστολέα πρωτεασώματος γίνεται με βάση τη διαθεσιμότητα του φαρμάκου και την εκάστοτε ασφαλιστική κάλυψη.

Για ασθενείς που δεν είναι επιλέξιμοι για ASCT οι θεραπευτικές πρακτικές εστιάζονται στην ανάπτυξη θεραπευτικών σχημάτων βασισμένων στη μελφαλάνη και στην πρεδνιζόνη. Από μελέτες φάσης III ωστόσο δείχθηκε πως ο συνδυασμός των προηγούμενων με αναστολέα πρωτεασώματος είναι ανώτερος ως προς τον ελεύθερο προόδου χρόνο(208, 209, 210). Επίσης ο συνδυασμός λεναλιδομίδης-δεξαμεθαζόνης αποτελεί επίσης επιλογή στη θεραπεία ασθενών που είναι ηλικιωμένοι και ασταθείς(211). Οι δόσεις σε αυτούς τους ασθενείς θα πρέπει να αναπροσαρμόζονται και να ανταποκρίνονται στο performance status και τους υπόλοιπους παράγοντες κινδύνου.

### 2.7.3 ASCT

Η ASCT ως θεραπεία σταθεροποίησης (consolidation) εισήχθη στα πλαίσια κλινικών μελετών φάσης III σε ασθενείς με MM(201, 202, 212). Οι ασθενείς προκειμένου να ετοιμαστούν για την ASCT, υπόκεινται σε απομόνωση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων από το περιφερικό αίμα και ανάπτυξη με GM-CSF με ή χωρίς χημειοθεραπεία. Στη συνέχεια πραγματοποιείται ερήμωση του μυελού και επανεισαγωγή των βλαστικών κυττάρων. Η χρήση της έχει αμφισβητηθεί κυρίως μετά την εισαγωγή στην κλινική πρακτική των νεότερων φαρμάκων ωστόσο από κλινικές μελέτες φάσης III έχει αναδειχθεί ο ρόλος της ASCT να επάγει επαυξημένες ανταποκρίσεις και μακρύτερους συνολικούς και ελεύθερους προόδου χρόνους επιβίωσης(212). Με την αυξανόμενη εφαρμογή θεραπειών σταθεροποίησης και συντήρησης, η ASCT θεωρείται απαραίτητο συμπλήρωμα μια πολυσταδιακής θεραπευτικής πορείας, παρά ως μονοθεραπεία. Ωστόσο παρόλη την βελτίωση της ελεύθερης προόδου επιβίωσης των ασθενών, η χρήση της ASCT δεν έχει αποδειχθεί ανώτερη στην συνολική επιβίωση των ασθενών και για αυτόν το λόγο η εφαρμογή της στη θεραπεία του MM παραμένει ακόμη αμφίβολη(213). Εν αντιθέσει με τα προηγούμενα η χρήση της ASCT σε συνδυασμό με νεότερα φάρμακα σε ασθενείς με υψηλού κινδύνου γενετικές ανωμαλίες [del(17p), t(1;14)] έχει συσχετιστεί με καλύτερη συνολική επιβίωση(214).

#### 2.7.4 Διάρκεια και στόχος της θεραπείας

Οι στόχοι της θεραπείας του MM έχουν αλλάξει κατά τη διάρκεια του χρόνου. Συγκεκριμένα δύο κύριοι παράγοντες συνέβαλαν καίρια στην τροποποίηση των θεραπευτικών στόχων: η εισαγωγή των νεότερων φαρμάκων όπως οι αναστολείς πρωτεασώματος και τα ανοσοτροποποιητικά φάρμακα τα οποία έχουν μικρότερη συνολική τοξικότητα και μπορούν να δοθούν για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα και η επίδραση της βαθιάς ύφεσης στην συνολική επιβίωση, συνδεδεμένη κυρίως με την ανίχνευση ελάχιστης υπολειμματικής νόσου (MRD, Minimal Residual Disease)(215).

Η θεραπεία συντήρησης αποτελεί συνηθισμένη πρακτική σε ασθενείς μετά ASCT. Με βάση τα υπάρχοντα δεδομένα δίνεται ιδιαίτερη βαρύτητα στη χρήση της bortezomib ως θεραπεία συντήρησης σε ασθενείς υψηλού ρίσκου για MM. Πολλές μεταanalύσεις και μελέτες έχουν δείξει πως η επίτευξη βαθιάς ανταπόκρισης, όπως η πλήρης ανταπόκριση υπό την αυστηρή έννοια (απουσία M πρωτεΐνης στα ούρα και στον ορό, <5% διήθηση MO από κλωνικά πλασματοκύτταρα και φυσιολογικός λόγος ελαφρών αλύσων) και αρνητική MRD (απουσία μονοκλωνικής πρωτεΐνης στον ορό και στα ούρα και κλωνική πλασματοκυτταρική διήθηση MO <1/10<sup>5</sup> κύτταρα), μετά από θεραπεία MM οδηγούν σε βελτιωμένη συνολική και ελεύθερη προόδου επιβίωση(216).

#### 2.7.5 Θεραπεία υποτροπής

Η υποτροπή είναι αναπόφευκτη για πολλούς ασθενείς, πολλοί εκ των οποίων δεν είναι υποψήφιοι για περαιτέρω θεραπείες. Η υποτροπή ορίζεται ως αύξηση της M πρωτεΐνης ή των ελαφρών αλύσων ενώ η βιοχημική υποτροπή εάν δεν υπάρχουν κλινικά συμπτώματα. Η θεραπεία συνιστάται σε ασθενείς με CRAB σημεία ή απότομη αύξηση M πρωτεΐνης (π.χ. διπλασιασμός εντός δύο μηνών). Η βέλτιστη θεραπευτική επιλογή εξαρτάται από τους παράγοντες του ασθενούς (ηλικία, αστάθεια, συννοσηρότητες, performance status), χαρακτηριστικά της νόσου (κυτταρογενετικές ανωμαλίες, απότομη αύξηση της M πρωτεΐνης), προτίμηση χορήγησης (από του στόματος, ενδοφλέβια), θεραπευτικούς παράγοντες (ανταπόκριση, τοξικότητα), ζητήματα διαθεσιμότητας και ασφαλιστικής κάλυψης(217).

##### 2.7.5.1 Πρώτη υποτροπή

Τα σχήματα που έχουν καθιερωθεί στην αντιμετώπιση του υποτροπιάζοντος και εμμένοντος MM περιλαμβάνουν συνδυασμούς λεναλιδομίδης-δεξαμεθαζόνης, carfilzomib-δεξαμεθαζόνης και bortezomib-δεξαμεθαζόνης. Η μελέτη ENDEAVOR μάλιστα κατέδειξε υψηλότερη ανταπόκριση, ελεύθερη προόδου και συνολική επιβίωση στη χρήση του σχήματος carfilzomib-δεξαμεθαζόνης έναντι bortezomib-δεξαμεθαζόνης(218, 219). Τυχαιοποιημένες μελέτες μάλιστα έχουν καταδείξει

πως η εισαγωγή τρίτου φαρμάκου με διαφορετικό τρόπο δράσης στα προηγούμενα σχήματα επιτυγχάνει καλύτερη ανταπόκριση, βαθύτερη ύφεση και μεγαλύτερη ελεύθερη προόδου επιβίωση. Τα τέσσερα μέχρι τώρα εγκεκριμένα σχήματα περιλαμβάνουν τη χρήση αναστολέων πρωτεασώματος (bortezomib, ixazomib) σε συνδυασμό με λεναλιδομίδη(220, 221).

Μονοκλωνικά αντισώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με λεναλιδομίδη-δεξαμεθαζόνη. Παράδειγμα αυτών η εισαγωγή του elotuzumab, αντι-SLAMF7 αντισώματος, το οποίο βελτιώνει την ελεύθερη προόδου επιβίωση(222, 223, 224). Το daratumumab, ένα αντι-CD38 αντίσωμα, χρησιμοποιείται είτε ως μονοθεραπεία είτε ως συνδυασμός λεναλιδομίδης-δεξαμεθαζόνης, έχοντας επιδείξει υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης και ελεύθερη προόδου επιβίωση σε σύγκριση με τα διπλά σχήματα(225, 226). Ασθενείς οι οποίοι είναι ανθεκτικοί στους συνδυασμούς λεναλιδομίδης, μεταβαίνουν σε συνδυασμούς με bortezomib και προσθήκη daratumumab, panobinostat (αναστολέας αποακετυλάσης ιστονών) ή πομαλιδομίδης(227, 228, 229).

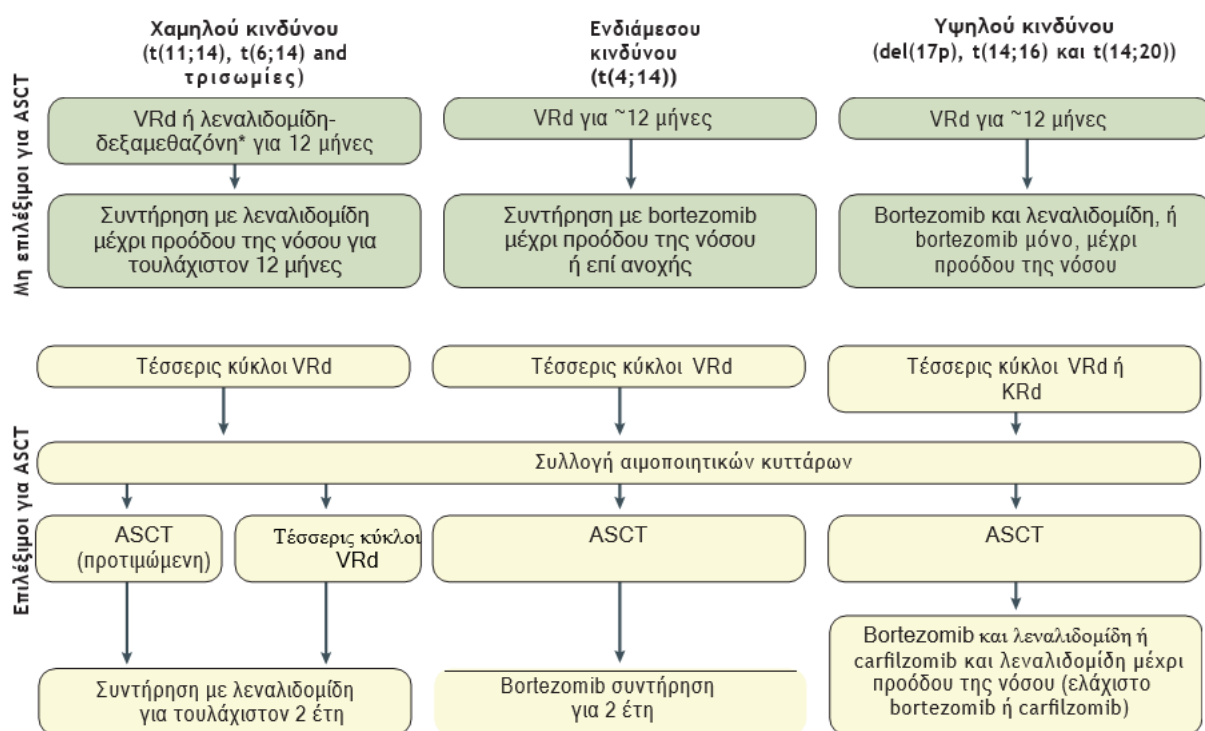
Μετά την θεραπεία επανεισαγωγής, σταθεροποίηση με συνδυασμό υψηλών δόσεων θεραπείας και ASCT συστήνεται σε ασθενείς με πρώτη υποτροπή οι οποίοι δεν έχουν υποβληθεί σε ASCT εκ των προτέρων ή στους οποίους ο χρόνος ανταπόκρισης μετά ASCT ήταν τουλάχιστον 24 μήνες(230). Αλλογενής μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων θα πρέπει να λογίζεται σε ασθενείς με πρόιμη υποτροπή μετά ASCT, ιδανικά στα πλαίσια κλινικών δοκιμών. Η πρόιμη υποτροπή ( $\leq 12$  μήνες) μετά την λήψη πρώτης γραμμής θεραπείας συσχετίζεται με ανθεκτική νόσο και ελαττωμένη συνολική επιβίωση ( $< 24$  μήνες). Στους ασθενείς συνήθως ανευρίσκονται υψηλού ρίσκου γενετικές αλλοιώσεις(231, 232).

### 2.7.5.2 Δεύτερη υποτροπή

Ασθενείς οι οποίοι είναι διπλά ανθεκτικοί (π.χ. σε λεναλιδομίδη και bortezomib) έχουν όφελος από τη χρήση romalidomide, carfilzomib ή daratumumab. Η επιλογή εξαρτάται από την προηγούμενη θεραπεία και τη διάρκεια της ανταπόκρισης. Ο συνδυασμός romalidomide-δεξαμεθαζόνης με daratumumab ή elotuzumab έχει λάβει έγκριση(233, 234). Ο FDA και ο EMA έχουν δώσει έγκριση για συνδυασμό romalidomide-δεξαμεθαζόνης με isatuximab(235), ενώ εάν δεν είναι διαθέσιμα τα μονοκλωνικά αντισώματα μπορούν να χρησιμοποιηθεί η κυκλοφωσφαμίδη(236). Η χρήση τέλος του daratumumab ως μονοθεραπεία έχει προταθεί σε ασθενείς με προχωρημένο MM(237).

## 2.7.6. Τριπλά ανθεκτικό MM

Οι ασθενείς με ανθεκτική νόσο σε αναστολείς πρωτεασώματος, ανοσοτροποποιητικά φάρμακα και αντι-CD38 αντισώματα έχουν ολιγόμηνη συνολική επιβίωση. Σε αυτήν την ομάδα ασθενών η χρήση του Selinexor (εκλεκτικός αναστολέας exportin 1) σε συνδυασμό με δεξαμεθαζόνη είναι αποτελεσματική σε 25% των ασθενών(238). Μία άλλη θεραπευτική επιλογή είναι η χρήση του belantamab mafoditin [ένα σύμπλοκο αντισώματος-φαρμάκου που στοχεύει τον BCMA (ή TNFRSF17)] το οποίο έχει ποσοστά ανταπόκρισης 30% των ασθενών(239). Πρόσφατα έχει πάρει έγκριση από τον FDA η πρώτη (Chimeric Antigen Receptor) CAR-T cell θεραπεία η οποία στοχεύει το επιφανειακό αντιγόνο ωρίμασης των Β-κυττάρων για το MM, ονόματι idecabtagene vicleucel (Ide-cel/Abecma)(240, 241). Στην CAR-T cell θεραπεία τα T-κύτταρα συλλέγονται από το περιφερικό αίμα του ασθενούς και τροποποιούνται *in vitro* για να στοχεύουν μία επιφανειακή πρωτεΐνη των MM κυττάρων. Τα γενετικά τροποποιημένα T-κύτταρα εισάγονται ξανά στον ασθενή μετά από ανοσοκατασταλτική χημειοθεραπεία προκειμένου να μην καταστραφούν τα CAR-T cells από το ανοσιακό σύστημα του ασθενούς.



**Εικόνα 16 | Προτεινόμενος αλγόριθμος για τη θεραπεία του MM.** KRd: carfilzomib-lenalidomide-dexamethasone, VRd: bortezomib-lenalidomide-dexamethasone. \*Αφορά θεραπεία σε ασθενείς  $\geq 75$  ετών ή ασταθείς. [Πηγή:(12)]

## 2.8 Υποστηρικτική θεραπεία

Οι ασθενείς με MM φέρουν ένα σημαντικό φορτίο νόσου και θεραπείας, το οποίο προκαλεί επιπλοκές (π.χ. λοιμώξεις, οστική νόσος και γαστρεντερικά συμπτώματα), καθυστερεί ή διακόπτει τα θεραπευτικά σχήματα και τελικά μειώνει το προσδόκιμο ζωής(242, 243). Οι λοιμώξεις, η καρδιαγγειακή και η νεφρική νόσος ευθύνονται κατά κύριο λόγο για πρώιμους θανάτους στο MM(244, 245). Η πρόληψη της μη αποδεκτής τοξικότητας μέσω προσεκτικής παρακολούθησης σε συνδυασμό με την τιτλοποίηση της δόσης σε ασταθείς ασθενείς είναι υψίστης σημασίας για την ελάττωση της πρώιμης θνησιμότητας (Εικ. 17).

### 2.8.1 Οστική νόσος

Στους ασθενείς που βρίσκονται υπό αγωγή γίνεται έναρξη με διφωσφονικά ή denosumab (IgG2 αντίσωμα έναντι του RANKL). Η οστεονέκρωση της κάτω γνάθου αποτελεί συχνή παρενέργεια συνδεδεμένη με τη λήψη διφωσφονικών ενώ η χρήση τους θα πρέπει να περιορίζεται σε ασθενείς με επηρεασμένη νεφρική λειτουργία (246). Το denosumab δύναται να χρησιμοποιηθεί σε ασθενείς με νεφρική νόσο, ωστόσο αυξάνει τον κίνδυνο οστεονέκρωσης κάτω γνάθου(247). Τοπική ακτινοβολία μπορεί να μειώσει τον οστικό πόνο ενώ χειρουργική παρέμβαση απαιτείται είτε για την θεραπεία καταγμάτων είτε για την πρόληψη καταγμάτων σε μακρά οστά με πολλαπλές λυτικές εστίες(247).

### 2.8.2 Λοιμώξεις

Οι βακτηριακές λοιμώξεις είναι συχνές σε ασθενείς με ενεργό MM οι οποίοι βρίσκονται σε αρχική θεραπεία και η αντιμικροβιακή προφύλαξη συστήνεται ιδιαίτερα τους πρώτους 3 μήνες της θεραπείας(243, 248). Η χρήση λεβοφλοξασίνης και τριμεθοπρίμης-σουλφομεθαξοζόλης ελάττωσαν τα ποσοστά ουδετεροπενικού πυρετού και θανάτων χωρίς τη δημιουργία αντιμικροβιακής αντοχής(249). Αν και η ουδετεροπενία είναι σπάνια κατά τη διάγνωση, οι θεραπείες μπορούν να προκαλέσουν σημαντικές κυτταροπενίες και ιδιαίτερα στα πλαίσια ASCT. Η υποκατάσταση με γ-σφαιρίνη ενδείκνυται σε ασθενείς με υποτροπιάζουσες βακτηριακές λοιμώξεις και συνυπάρχουσα υπογαμμασφαιριναιμία(250).

Οι κατευθυντήριες οδηγίες επίσης προτείνουν τον εμβολιασμό έναντι γρίπης, *Streptococcus pneumoniae* και *Haemophilus influenzae* τύπου B(251). Τα εμβόλια ζώντων εξασθενημένων μικροοργανισμών αντενδείκνυται λόγω της διαταραχής στις T-κυτταρικές απαντήσεις που προκαλούν οι αναστολείς πρωτεασώματος, τα μονοκλωνικά αντισώματα, τα ανοσοτροποποιητικά φάρμακα και μετά από ASCT. Για αυτόν το λόγο συστήνεται προφύλαξη για έρπη ζωστήρα(251). Συστήνεται επίσης ορολογικός έλεγχος για ηπατίτιδα Β και σε περίπτωση προηγούμενης

λοίμωξης (θετικό πυρηνικό αντιγόνο έναντι του ιού) συνδρομή ηπατολόγου και έναρξη προφύλαξης.

### **2.8.3 Καρδιαγγειακή και θρομβοεμβολική νόσος**

Η θρομβοπροφύλαξη συνιστάται σε ασθενείς που βρίσκονται σε θεραπεία με ανοσοτροποποιητικούς παράγοντες και συγκεκριμένα ασπιρίνη σε ασθενείς χαμηλού κινδύνου και ηπαρίνη χαμηλού μοριακού βάρους ενδοφλεβίως ή από του στόματος νεότερα αντιπηκτικά με μετάβαση σε ασπιρίνη μετά 4 μήνες(252, 253, 254). Ιστορικό θρομβοεμβολικού επεισοδίου επίσης απαιτεί την έναρξη αντιπηκτικής αγωγής.

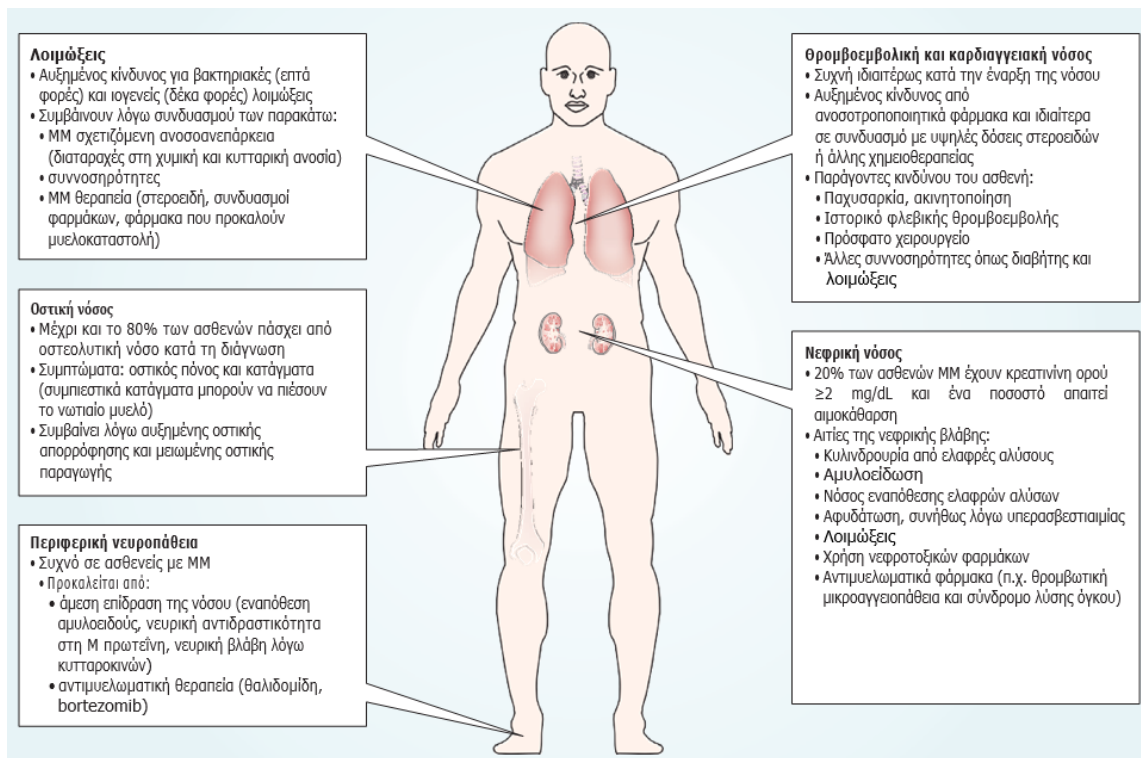
Η καρδιαγγειακή νόσος συνδέεται κυρίως με την υποκείμενη πλασματοκυτταρική δυσκρασία (αμυλοείδωση, αναιμία, νεφρική δυσλειτουργία) ή τη θεραπεία. Παρατηρείται συνήθως σε ασθενείς ηλικίας >75 ετών ή σε αυτούς με προϋπάρχουσες καρδιαγγειακές παθήσεις(252). Οι ανθρακυκλίνες ελαττώνουν την καρδιακή συσταλτικότητα και τα ανοσοτροποποιητικά φάρμακα είναι υπεύθυνα για την πρόκληση αρρυθμιών. Η carfilzomib έχει συνδεθεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης αρτηριακής υπέρτασης, πνευμονικής υπέρτασης και καρδιακής ανεπάρκειας(219, 255).

### **2.8.4 Περιφερική νευροπάθεια**

Η περιφερική νευροπάθεια συνήθως εμφανίζεται με τη μορφή πόνου, αιμωδίας στα χέρια και στα πόδια. Πρώτης γενεάς ανοσοτροποποιητικοί παράγοντες και αναστολείς πρωτεασώματος (θαλιδομίδη και bortezomib) έχουν ενοχοποιηθεί για την πρόκληση αισθητικοκινητικής και αυτόνομης νευροπάθειας(256). Η θεραπεία συνήθως περιλαμβάνει νευροληπτικούς παράγοντες, αντικαταθλιπτικά, αντιεπιληπτικά ή χρήση τοπικών θεραπειών πόνου.

### **2.8.5 Νεφρική δυσλειτουργία**

Η ύπαρξη νόσου κατά την διάγνωση σχετίζεται με βραχύτερη επιβίωση, πιθανώς λόγω συνύπαρξης βαρύτερης νόσου, χαμηλότερες δόσεις έναρξης και τιτλοποίηση δόσεων αντιμυελωματικών φαρμάκων λόγω τοξικότητας(257). Αντιστροφή της νεφρικής βλάβης συνδέεται με καλύτερη πρόγνωση. Επιπρόσθετα, στους ασθενείς με νεφρική νόσο η θεραπεία θα πρέπει να άρχεται το δυνατόν συντομότερα προκειμένου να ελαττωθεί το φορτίο των ελαφρών αλύσεων στα νεφρά. Τα σχήματα με τη bortezomib δεν επηρεάζονται από τη νεφρική λειτουργία και μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σε αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς(242, 257, 258).



Εικόνα 17 | Συστηματικές επιδράσεις του MM και της θεραπείας του.

### 3. ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ BMPs

#### 3.1 Υπεροικογένεια TGF-β

Οι BMPs αποτελούν μια εκτεταμένη ομάδα φυλογενετικά διατηρημένων πρωτεϊνών οι οποίες ανήκουν στην υπεροικογένεια του TGF-β (Transforming Growth Factor-β) και είναι η πολυπληθέστερη ομάδα, έχοντας αναγνωριστεί 20 μέχρι στιγμής(259, 260). Αρχικά είχαν απομονωθεί από οστά και οι λειτουργίες τους είχαν μελετηθεί στην ανάπτυξη των ασπόνδυλων. Παρόλη τη δομική και λειτουργική ομοιότητα προς τα υπόλοιπα μέρη της υπεροικογένειας των TGF-β, η πολυπλοκότητα της σηματοδότησής τους υπερβαίνει σε μεγάλο βαθμό τους ρυθμιστικούς σηματοδοτικούς μηχανισμούς των υπολοίπων μελών. Τα υπόλοιπα μέλη της υπεροικογένειας αποτελούν ο TGF, η activin, ο NODAL, οι GDFs (Growth and Differentiation Factors) και η AMH (Anti-Mullerian Hormone)(261, 262, 263, 264). Αν και η αρχική αναγνώρισή τους έγινε στο πλαίσιο επαγωγής έκτοπης ανάπτυξης οστού, ωστόσο η εμπλοκή τους σε μία πλειάδα αναπτυξιακών διεργασιών έχει οδηγήσει τους ειδικούς στην αλλαγή του ονόματός τους σε Body Morphogenetic Proteins. Βάσει της ομοιότητας της ακολουθίας τους οι BMPs διαχωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες: α) BMP-2, BMP-4, β) BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8a, BMP-8b, γ) BMP-9, BMP-10, δ) BMP-12, BMP-13, BMP-14, BMP-15, BMP-16. Η BMP-1 δρα ως μεταλλοπρωτεάση. Οι BMPs εμπλέκονται στα αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης επάγοντας την ανάπτυξη του Mullerian αγωγού, που θα οδηγήσει στο θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα, στον



καθορισμό της πρόσθιας και οπίσθιας πολικότητας του εμβρύου καθώς και την ανάπτυξη του ενδοκαρδίου (BMP-10). Καθορίζουν επίσης την πολικότητα του αναπτυσσόμενου πεπτικού σωλήνα, τη νευριδίωση και την ανάπτυξη της νευρικής πλάκας μέσω της BMP-4(265, 266).

### 3.2 Μεταλλάξεις

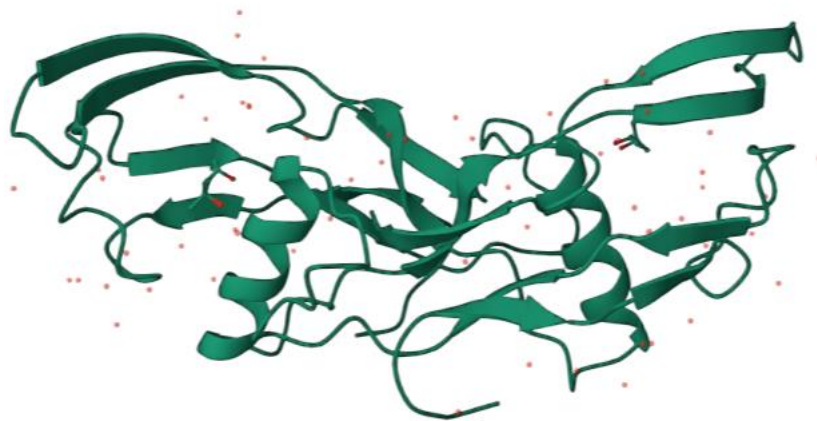
Μελέτες οι οποίες αφορούν σε μεταλλάξεις των BMPs και των υποδοχέων (BMPRs) τους έχουν δείξει πως οι BMPs παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο σε αρκετές κληρονομούμενες ασθένειες και καρκίνους. Μεταλλάξεις στο γονίδιο της BMP-5 έχουν συσχετιστεί με ελαττωμένο εύρος μακρών οστών, ανωμαλίες στη διάπλαση των σπονδυλικών αποφύσεων και συνολικά ελαττωμένη σωματική μάζα(267, 268). Μεταλλάξεις στον GDF-5 και στην BMP-11 οδηγούν σε βραχυποδία στους μυς και χονδροδυσπλασία στους ανθρώπους(269, 270). Τα γονίδια των BMP-5 και GDF-5 μάλιστα εδράζονται στο χρωμόσωμα 20. Έκτοπη έκφραση της BMP-4 βρέθηκε σε ασθενείς με προοδευτική οστεοποιοί νοδυσπλασία μία σπάνια αυτοσωμικά επικρατής πάθηση που χαρακτηρίζεται από συγγενείς δυσπλασίες του μεγάλου δακτύλου των κάτω άκρων και έκτοπη ενδοχόνδρια οστεοποίηση σε συγκεκριμένες ανατομικές θέσεις(271, 272). Υπερέκφραση των BMP-2, BMP-4 και BMP-5 έχει βρεθεί σε καρκίνο του στόματος(273) και υπερέκφραση των BMP-3 και BMP-2 σε καρκίνο του προστάτη(274).

### 3.3 Βιοσύνθεση, βιοδιαθεσιμότητα και βιοδραστικότητα

Η ανίχνευση των επιπέδων του mRNA ή της πρωτεΐνης των BMPs δεν αποτελεί αξιόπιστο δείκτη ενεργότητας αυτών στο παρακείμενο περιβάλλον. Παρόλο που τα επίπεδα των πρωτεϊνών είναι απαραίτητα για τη λειτουργία των BMPs ωστόσο σημαντική κρίνεται η βιοδιαθεσιμότητα αυτών σε ένα συγκεκριμένο κύτταρο. Η βιοδιαθεσιμότητα τροποποιείται στο εξωκυττάριο περιβάλλον. Παράδειγμα αυτής αποτελεί ο ρόλος της BMP-4 στον καθορισμό του εμβρυϊκού ραχιαίου και κοιλιακού άξονα, όπου τα διαφορετικά επίπεδα της πρωτεΐνης μεταξύ εμβρυϊκών και εξωεμβρυϊκών κυττάρων καθορίζουν την κυτταρική διαφοροποίηση(275, 276, 277).

Οι BMPs συντίθεται από τους οστεοβλάστες ως ένα πρόδρομο μόριο 400-500 αμινοξέων, το οποίο στο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο περιέχει ένα πεπτίδιο σήματος (prodomain), ένα πεπτίδιο υπεύθυνο για τη σωστή χωρική αναδίπλωση και στο COOH-τελικό άκρο ένα μη συντηρημένο προπεπτίδιο. Η COOH-τελική ενεργή περιοχή του προπεπτιδίου αποκόβεται από μια furin-like κονβερτάση στη διβασική αλληλουχία Arg-x-x-Arg, απελευθερώνοντας το ώριμο μόριο, το οποίο διμερίζεται δημιουργώντας την ενεργή BMP. Οι ώριμες BMPs αποτελούνται από 50-100 αμινοξέα με 7 κυστεΐνες, εκ των οποίων οι 6 δημιουργούν 3 ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς γνωστούς ως cysteine knots. Η έβδομη κυστεΐνη χρησιμοποιείται για το διμερισμό με ένα ακόμα μονομερές

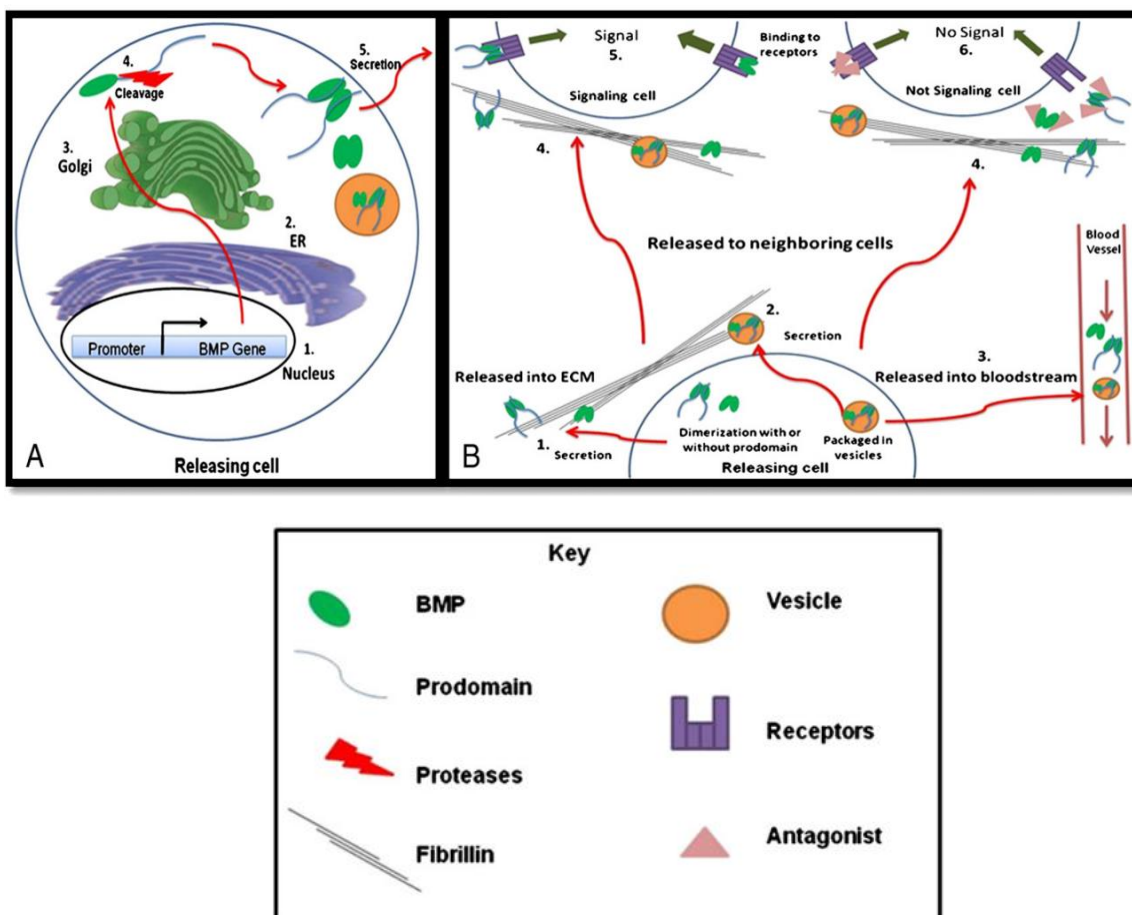
BMP σχηματίζοντας δισουλφιδικό δεσμό και οδηγώντας στο ενεργό σηματοδοτικό μόριο. Με εξαίρεση τις BMP-3, GDF-9 και BMP-15, από τις οποίες ελλείπει η έβδομη κυστεΐνη και οι οποίες λειτουργούν ως μονομερή, όλες οι υπόλοιπες BMPs σχηματίζουν είτε ομοδιμερή είτε ετεροδιμερή. Στο διμερές που σχηματίζεται η  $\alpha$ -έλικα του ενός μονομερούς βρίσκεται απέναντι από την κοίλη επιφάνεια που σχηματίζουν τα δύο ζεύγη των  $\beta$ -κλώνων του έτερου μονομερούς (Εικ. 18). Ετεροδιμερισμός BMP2/5, BMP2/6, BMP2/7 και BMP4/7 έχει παρατηρηθεί σε *in vivo* και *in vitro* πειράματα και φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματικός από τον ομοδιμερισμό(278, 279, 280, 281, 282, 283). Μετά την πρωτεολυτική αποκοπή της prodomain περιοχής αυτή συνδέεται μη ομοιοπολικά με το ώριμο ενεργές BMP διμερές. Αρχικά είχε υποτεθεί ότι η prodomain περιοχή δεν αποκόπτονταν ή ότι η ενεργός ώριμη πρωτεΐνη απαιτούσε πρωτεολυτική αποκοπή από το εξωκυττάριο περιβάλλον, όπως στην περίπτωση του TGF- $\beta$ . Η σύνδεση με την περιοχή prodomain καθοδηγεί την BMP σε στοιχεία της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και συγκεκριμένα τα μικροϊνίδια, όπου η περιοχή prodomain διαμεσολαβεί τη σύνδεση με τις fibrillins. Με αυτό τον τρόπο οι BMPs θα απελευθερώνονταν ως ώριμες ενεργείς μορφές και θα διαχεόταν μακριά από το κύτταρο που τις παρήγε ενώ αυτές οι οποίες θα παρέμεναν χαλαρά συνδεδεμένες με τις περιοχές prodomain θα συγκεντρώνονταν στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία εφόσον αυτή περιείχε μικροϊνίδια καθώς οι BMPs ή η περιοχή prodomain δεν περιέχουν άλλες σημαντικές περιοχές σύνδεσης(284, 285, 286).



Εικόνα 18 | Τρισδιάστατη δομή της BMP-2. [Πηγή: <https://www.rcsb.org/structure/3BMP>]

Εξαίρεση στα προηγούμενα αποτελεί η περίπτωση της BMP-4 η οποία υπόκειται σε μια ιστοειδική δευτερεύουσα πρωτεολυτική διάσπαση εντός της περιοχής prodomain, η οποία παράγει μια μακριά και μια βραχεία περιοχή prodomain, οι οποίες φαίνεται να επιδρούν στον τρόπο έκκρισης του αυξητικού παράγοντα είτε με την διαλυτή (βραχεία) είτε με τη συνδεδεμένη (μακριά) μορφή και οδηγούν στα ανάλογα κατά περίπτωση σηματοδοτικά αποτελέσματα. Επίσης

η BMP-2 ενδέχεται να υπόκειται σε μια δεύτερη πρωτεολυτική αποκοπή(287, 288, 289). Η βιοδραστικότητα των διμερών BMPs δεν φαίνεται να επηρεάζεται από την σύνδεση τους με περιοχές prodomain στη διαλυτή μορφή, όπως αποδείχθηκε από πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκε η BMP-7 και όπου οι υποδοχείς τύπου II αποσυνέδεαν συναγωνιστικά το διμερές από την περιοχή prodomain(285). Ωστόσο η σύνδεση με τον τύπου II υποδοχέα ελαττώθηκε σημαντικά όταν το σύμπλεγμα ακινητοποιήθηκε. Αυτό δεν ισχύει στην περίπτωση του υποδοχέα τύπου I καθώς η περιοχή prodomain μπλοκάρει τη σύνδεση των επιφανειακών επιτόπων του διμερούς BMP που συνδέονται με τον υποδοχέα τύπου II. Η βιολογική αδράνεια λοιπόν σε αυτή την περίπτωση εξαρτάται από την απελευθέρωση του συμπλέγματος prodomain/BMP από την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία είτε μέσω αποσύνδεσης της prodomain από τη fibrillin είτε της απελευθέρωσης του διμερούς BMP από την prodomain περιοχή. Οι μεταλλοπρωτεάσες της θεμέλιας ουσίας μπορούν να απελευθερώσουν το σύμπλοκο συνδεδεμένο με πρωτεΐνες της θεμέλιας ουσίας (κολλαγόνο τύπου IV, fibrillin και ίσως ινωδονεκτίνη) επιδρώντας στην κινητική και τη βιοδιαθεσιμότητα των BMPs(290) (Εικ. 19).



**Εικόνα 19 | Η εξωκυττάρια ρύθμιση και βιοδιαθεσιμότητα των BMPs.** Α. Έκκριση των BMPs. 1. Μεταγραφή. 2. Μετάφραση στο ενδοπλασματικό δίκτυο. 3. Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στο Golgi. 4. Πρωτεολυτική διάσπαση και διμερισμός. 5. Έκκριση των BMPs είτε σε διμερή μορφή, είτε σε κυστίδια. Β. Μετα-εκκριτική πορεία των BMPs. 1. Έκκριση των διμερών BMPs συνδεδεμένων με ή χωρίς την

περιοχή prodomain και αλληλεπιδράσεις με θεμέλια ουσία. 2. Έκκριση σε κυστίδια θεμέλιας ουσίας. 3. Έκκριση στην κυκλοφορία του αίματος. 4. Αλληλεπίδραση BMPs με κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος. 5. Μεταγωγή σήματος από τα διμερή. 6. Ανταγωνιστική αναστολή μεταγωγής σήματος. [Πηγή: (291)]

### 3.4 Ο ρόλος των κυστιδίων της θεμέλιας ουσίας

Ένα άλλο γνώρισμα της βιολογίας των BMPs αφορά την εύρεση των BMP1-7, ως συστατικών στοιχείων των κυστιδίων της θεμέλιας ουσίας, που εναποτίθενται από τα χονδροκύτταρα της αυξητικής πλάκας. Τα κυστίδια της θεμέλιας ουσίας προέρχονται από την πλασματική μεμβράνη των χονδροκυττάρων και αποτελούν πυρήνες επιμετάλλωσης. Τα μικροκυστίδια αποτελούν όπως έχει αναφερθεί (εξωσώματα) μορφή διακυτταρικής επικοινωνίας μεταξύ διαφορετικών τύπων κυττάρων τα οποία είτε γειτνιάζουν είτε βρίσκονται σε απόσταση. Η μορφή με την οποία υπάρχουν εντός αυτών των κυστιδίων οι BMPs (ως διμερή ή συμπλέγματα με την prodomain) δεν έχει αποσαφηνιστεί. Η ύπαρξη επίσης αυτών εντός των κυστιδίων ως ελεύθερων ομο- ή ετεροδιμερών θα τις καθιστούσε ενεργές μετά τη ρήξη των μικροκυστιδίων στα πλαίσια της διαδικασίας επιμετάλλωσης ενώ η σύνδεση αυτών με στοιχεία της πλασματικής μεμβράνης των κυστιδίων ίσως να τα καθιστούσε ενεργά a priori (292, 293, 294, 295, 296, 297).

### 3.5 Ανταγωνιστές

Το ζήτημα της βιοδιαθεσιμότητας των BMPs ωστόσο εμπλέκει και την παρουσία ενός ή περισσότερων ανταγωνιστών. Μέχρι στιγμής έχουν αναφερθεί πάνω από 15 ανταγωνιστές με βάση το μέγεθος του κόμβου κυστεϊνών (cysteine knot). Σε αυτούς περιλαμβάνονται η οικογένεια των Differential screening-selected gene Abbreviative in Neuroblastoma (Dan), Twisted Gastrulation (Tsg), Chordin (Chd), Noggin (Nog), ventroptin (Chrd11), Follistatin (Fst) και FLRG-follistatin related gene (Fstl3). Η οικογένεια των Dan διαιρείται σε τέσσερις υποοικογένειες: α) Dan (NO3/Nb11, neuroblastoma suppressor of tumorigenicity 1), β) [PRDC — Protein Related to Dan and Cerberus (Grem2)], gremlin (DRM — Downregulated by v-mos/IHG-2 — Induced in High Glucose-2), γ) Cerberus (Cer1) και coco (Dand5), δ) USAG-1 — Uterine Sensitization-Associated Gene-1 (Sostdc1-sclerostin domain containing 1) και Sclerostin (σκληροστίνη)(298, 299). Άλλοι ανταγωνιστές με τους οποίους έρχονται σε άμεση επαφή οι BMPs είναι οι Xnr3(Xenopus nodal related3), Lefty (Left-Right Determinant), BMP-3 και BMP-15. Η ανασταλτική τους δράση έγκειται στη δομική απουσία του έβδομου καταλοίπου της κυστεϊνης απαραίτητου για τον διμερισμό, ενώ ως μηχανισμοί έχουν προταθεί είτε η απόκρυψη των περιοχών σύνδεσης των BMPs με τους υποδοχείς τύπου I και II είτε όπως η BMP-3 ο συναγωνισμός στη σύνδεση με τον υποδοχέα(300). Οι ανταγωνιστές μεταξύ τους έχουν

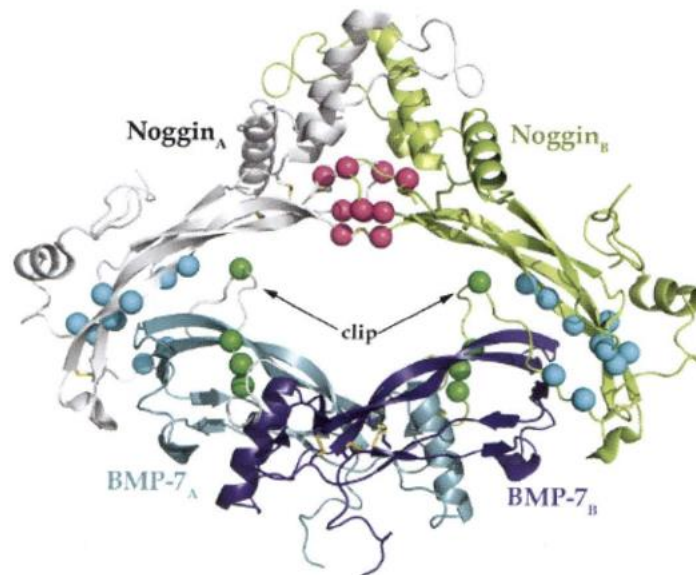
διαφορετικό μέγεθος, ακολουθία και τρόπο αλληλεπίδρασης με τις BMPs. Κάποιοι εξ αυτών συνδέονται με άλλους συνδέτες της υπερικογένειας των TGF-β με μεγαλύτερη συγγένεια, ενώ η λειτουργία κάποιων δεν είναι αμιγώς ανταγωνιστική όπως του Tsg, ο οποίος παρουσία του συμπλέγματος BMP/Chordin, επάγει την BMP-1 ώστε να πρωτεολύσει το σύμπλεγμα, απελευθερώνοντας την BMP. Επίσης η παρουσία διαφορετικών ανταγωνιστών μπορεί να δράσει εξουδετερωτικά όπως αυτή των Noggin και Sclerostin. Η σύνδεση επίσης ανταγωνιστών όπως της οικογένειας Noggin και Chordin με μόρια θεϊκής ηπαράνης που βρίσκονται στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία δημιουργεί περαιτέρω πολυπλοκότητα στην αλληλεπίδραση των BMPs με τους υποδοχείς, καθώς η σύνδεση ευνοεί τη διατήρηση των ανταγωνιστών κοντά στην κυτταρική επιφάνεια. Από την άλλη πλευρά η θεϊκή ηπαράνη λειτουργεί ως συνυποδοχέας βοηθώντας την δημιουργία συμπλόκων BMP-υποδοχέων αλλά αγκυροβολώντας ταυτόχρονα τις BMPs μειώνει το πεδίο δράσης τους(301, 302).

### 3.5.1 Οι ανταγωνιστές Noggin, Chordin, DAN και Cerberus

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν στη διαδικασία της εμβρυογένεσης οι ανταγωνιστές Noggin, Chordin, DAN και Cerberus. Η Noggin είναι μια μικρή γλυκοπρωτεΐνη 32 kDa που παράγεται ως ομοδιμερές, ενώ η Chordin είναι μια μεγάλη πρωτεΐνη 941 αμινοξέων, 120 kDa. Η COOH-τελική περιοχή της Noggin είναι πλούσια σε Cys ενώ η Chordin περιέχει επαναλήψεις πλούσιες σε Cys, όμοιες με τις επαναλήψεις τύπου I θρομβοσπονδίνης, του προκολλαγόνου I και III και του παράγοντα von Willebrand (Εικ. 20). Παρά τις δομικές τους διαφορές και οι δύο συνδέονται εξειδικευμένα με την BMP-4, εμποδίζοντας τη διαφοροποίηση των κυττάρων του εξωδέρματος σε επιδερμίδα, οδηγώντας στη δημιουργία νευρικού ιστού. Υπερέκφραση της Noggin οδηγεί σε έμβρυα με μεγάλα κεφάλια, καθώς η λέξη Noggin σημαίνει κεφαλή στην αγγλική. Η Noggin επίσης εμπλέκεται στη δημιουργία του σκελετού καθώς απουσία έκφρασης αυτής οδηγεί σε υπερβολική ποσότητα χόνδρων και απουσία σχηματισμού αρθρώσεων.

Ο Cerberus είναι μια πρωτεΐνη 270 αμινοξέων που εκφράζεται στο μπροστινό τμήμα του ενδοδέρματος στο στάδιο του γαστριδίου. Περιέχει κόμβο κυστίνης και συνδέεται και αυτός με την BMP-4 αλλά επίσης συνδέεται και τον επαγωγέα του μεσοδέρματος Xnr1 και τον επαγωγέα του δευτερεύοντος άξονα, τον Xwnt8 (Xenopus Wnt-1 related 8) σε διαφορετικές θέσεις: ο Xnr1 και η BMP-4 συνδέονται στον κόμβο κυστίνης και ο Xwnt8 στο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο του Cerberus. Η έγχυση mRNA του Cerberus σε έμβρυα Xenopus προκαλεί εκτοπικές κεφαλές (εξού και το όνομα του), επαγωγή του νευρικού ιστού και αύξηση του μεγέθους της καρδιάς και του ήπατος(303, 304).

Η πρωτεΐνη CRIM1 (Cysteine-rich Motor Neuron 1) είναι μία γλυκοσυλιωμένη διαμεμβρανική πρωτεΐνη της οικογένειας Chordin. Η CRIM1 δρα ως ανταγωνιστής αναστέλλοντας την παραγωγή και ωρίμαση των BMPs και επηρεάζοντας την έκκριση και αποδέσμευση των BMPs στον εξωκυττάριο χώρο(305).



*Εικόνα 20* | **Αναστολή της BMP7 από τη Noggin.** Η Noggin συνδέεται με την BMP-7 μέσω της περιοχής συνδέτη και της περιοχής δακτύλου και αποτρέπει αποτελεσματικά τη σύνδεση των υποδοχέων τύπου I και τύπου II αναστέλλοντας την περαιτέρω σηματοδότηση των BMPs.

### 3.6 Οι υποδοχείς των BMPs

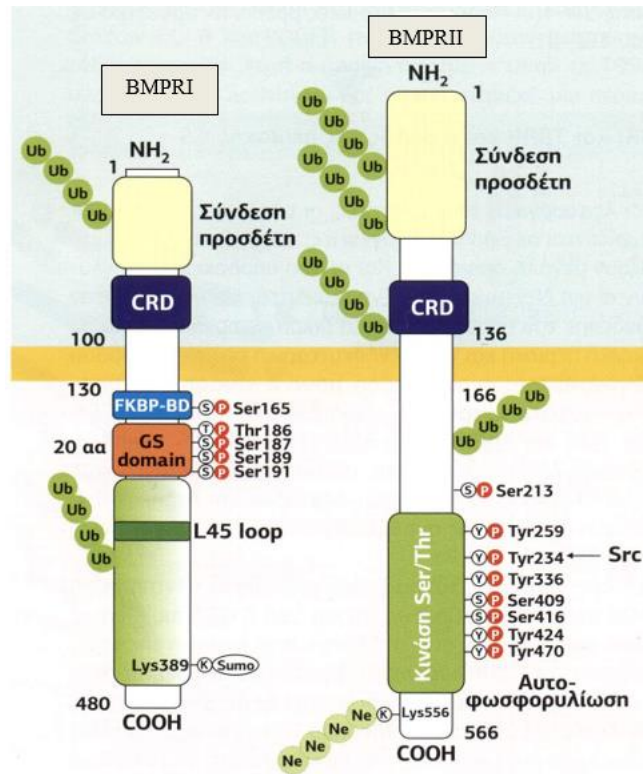
Η οικογένεια του TGF- $\beta$ , μέρος της οποίας αποτελούν και οι BMPs ενεργοποιούν μία οικογένεια υποδοχέων με ενδογενή δράση κινάσης Ser/Thr (Serine/Threonine). Η οικογένεια αυτή στον άνθρωπο περιλαμβάνει 7 υποδοχείς τύπου I και 5 υποδοχείς τύπου II. Συγκεκριμένα για τους υποδοχείς τύπου I των BMPs υπάρχει η ομάδα ALK3 (Activin-like Kinase 3), η οποία περιέχει τον ALK3 (BMPRIa), τον ALK6 (BMPRIb), η ομάδα ALK1 που περιέχει τους υποδοχείς ALK1 (Acvr11) και ALK2 (ActRI) και η ομάδα ALK5 που περιέχει τον ALK4 (ActRIb). Για τους υποδοχείς τύπου II οι BMPs συνδέονται με τους υποδοχείς τύπου II των activin και BMP/GDF ActRII και ActRIIb και τον υποδοχέα τύπου των BMP/GDF, BMPRII. Επίσης μία συντημημένη μορφή του BMPRII, στην οποία απουσιάζει μεγάλο μέρος του COOH-τελικού άκρου έχει αναγνωριστεί(281, 306).

### 3.6.1 Δομή των υποδοχέων

Και οι δύο τύποι υποδοχέων είναι γλυκοπρωτεΐνες οι οποίες περιέχουν α) μία N-γλυκοσυλιωμένη εξωκυτταρική περιοχή, στην οποία βρίσκεται η θέση σύνδεσης του προσδέτη και μία μικρή περιοχή πλούσια σε Cys CRD (Cystein Rich Domain), β) μία διαμεμβρανική περιοχή και γ) μία ενδοκυττάρια περιοχή με δράση κίνησης Ser/Thr στο COOH-τελικό τους άκρο. Ωστόσο μόνο η κινάση των υποδοχέων τύπου II είναι ιδιόσυστατη ενεργή. Αυτό που διαφοροποιεί τους υποδοχείς τύπου I είναι μία υψηλά συντηρημένη περιοχή 30 καταλοίπων, η GS περιοχή (πλούσια σε Gly και Ser) ή GS box, η οποία βρίσκεται κυτταροπλασματικά ακριβώς πριν την καταλυτική περιοχή της κινάσης και ρυθμίζει την ενεργότητα του BMPRI. Η περιοχή GS συνδέεται με την περιοχή της κινάσης αλλά λόγω της ευκαμπτότητάς της μεταπίπτει μεταξύ συνδεδεμένης και μη συνδεδεμένης κατάστασης, ενεργοποιώντας ή απενεργοποιώντας τον υποδοχέα BMPRI.

Η μετάβαση στην ενεργή διαμόρφωση αναστέλλεται από την ανασταλτική πρωτεΐνη ανοσοφιλίνη FKBP12 (immunophilin FKBP12), η οποία συνδέεται στην περιοχή GS και την σταθεροποιεί. Η FKBP12 (FK506 Binding Protein 12 kDa) είναι μία πρωτεΐνη 12 kDa η οποία ανακαλύφθηκε το 1991 ως υποδοχέας του ανοσοκατασταλτικού φαρμάκου FK506-tacrolimus, το οποίο δρα ως αναστολέας της καλσινευρίνης. Παρόλο που εντοπίστηκε για πρώτη φορά στα T-λεμφοκύτταρα εντούτοις ανευρίσκεται σε όλους τους ιστούς με ιδιαίτερα υψηλή συγκέντρωση στον εγκέφαλο. Η FKBP12 αποτελεί επίσης υπομονάδα των ενδοκυτταρικών καναλιών  $Ca^{+2}$ , των υποδοχέων της  $IP_3$  (Inositol Triphosphate, τριφωσφορική ινοσιτόλη) και των υποδοχέων της ρυανοδίνης. Διαδραματίζει εξαιρετικά σημαντικό ρόλο καθώς ποντίκια *knockdown FKBP12* πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής, εκδηλώνοντας πολλαπλές ανωμαλίες, όπως καρδιακή υπερτροφία και αυξημένη απελευθέρωση  $Ca^{+2}$  μέσω του υποδοχέα ρυανοδίνης(307, 308) (Εικ. 21).

Η φωσφορυλίωση του BMPRIa/b από τον BMPRII αίρει την αναστολή και ενεργοποιεί τον BMPRI. Οι υποδοχείς τύπου II καθώς στερούνται της περιοχής GS δεν υπόκεινται σε ανασταλτικό έλεγχο και με αυτόν τον τρόπο είναι ιδιόσυστατα ενεργείς και σε αναμονή για τη φωσφορυλίωση του υποδοχέα τύπου I. Οι υπομονάδες του τύπου I υποδοχέα καθορίζουν την εξειδικευμένη μεταγωγή του σήματος μέσω αλλαγών στην αλληλουχία των αμινοξέων του βρόχου L45 της κινάσης του BMPRIa/b εν συγκρίσει με τον TβRI, καθώς θα ενεργοποιήσουν διαφορετικές υπομονάδες Smad.



Εικόνα 21 | Δομικές περιοχές των υποδοχέων των BMPs. [Πηγή: Ζίφα Διακυτταρική Επικοινωνία-Μεταγωγή Σήματος, 4<sup>η</sup> έκδοση, Βολος, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, 2019: 762]

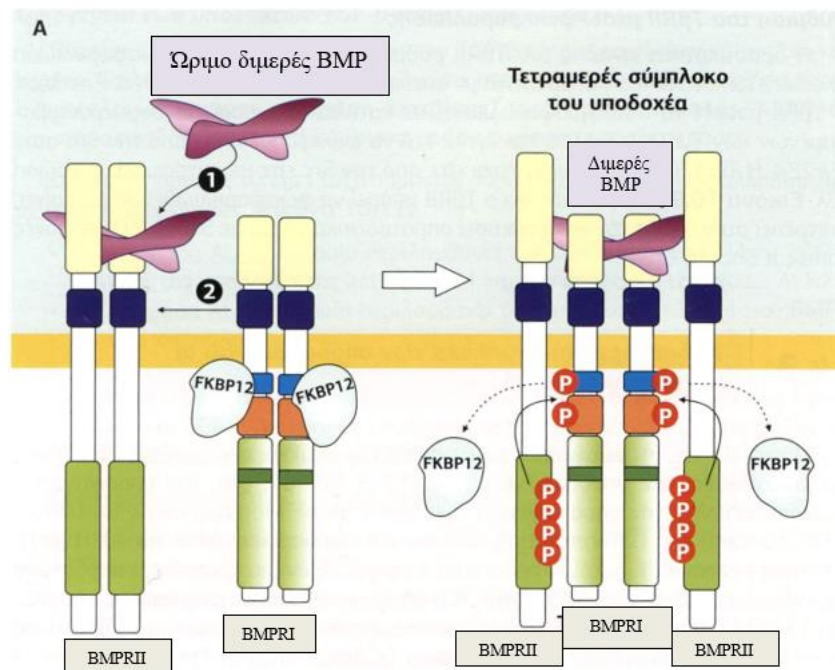
### 3.7 Σύνδεση με τους υποδοχείς και μεταγωγή του σήματος

Ο ρόλος του διμερούς BMP είναι να φέρει κοντά του δύο τύπους υποδοχέων, επιτρέποντας τη φωσφορυλίωση του BMPRIa/b από τον BMPRII, δημιουργώντας ένα συμμετρικό σύμπλοκο 2:2:2. Λόγω του ότι στη σηματοδότηση των BMPs η στρατολόγηση των υποδοχέων είναι διαδοχική αλλά όχι συνεργική, καθώς δεν υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των εξωκυτταρικών περιοχών των υποδοχέων, υπάρχουν προσχηματισμένα ετεροτετραμερή σύμπλοκα υποδοχέων των BMPs, τα οποία σταθεροποιούνται με αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυτταροπλασματικών περιοχών των υποδοχέων, ενισχύοντας την υπόθεση περί προσχηματισμένων συμπλόκων υποδοχέων. Αυτός ο τρόπος είναι υπεύθυνος για την Smad σηματοδότηση των BMPs. Η επαγόμενη από τις BMPs ωστόσο στρατολόγηση των υποδοχέων τύπου II στο σύμπλοκο BMP/υποδοχέα τύπου I οδηγεί σε ενεργοποίηση του μονοπατιού MAPK/p38. Η σύνδεση των διαφορετικών τύπων I υποδοχέων με τις BMPs εξαρτάται από δομικά χαρακτηριστικά και κατάλοιπα τα οποία εκτίθενται στις περιοχές αλληλεπίδρασης υποδοχέα/συνδέτη. Οι BMP-2/-4,



BMP-5/-6/-7 και BMP-12/-13/-14 συνδέονται με τους ALK3/6 ενώ οι BMP-5/-6/-7 συνδέονται και με τον ALK2. Οι BMP-9/-10 συνδέονται και με τον ALK2 και με τον ALK1. Ιδιαίτερα η έκφραση των ALK1 γίνεται σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων όπως τα ενδοθηλιακά. Οι BMPs μπορεί να υπόκεινται σε μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις όπως η N-γλυκοσυλίωση της BMP6 που είναι απαραίτητη για τη σύνδεση με τον ActRI. Επίσης είναι δυνατή η σύνδεση των BMPs με μονομερή τύπου I υποδοχέα, αλλά σε υψηλότερη συγκέντρωση(309, 310).

Η ενεργοποίηση γίνεται ως εξής: το διμερές σύμπλοκο BMP συνδέεται με το προσχηματισμένο ετεροτετραμερές υποδοχέων αλλάζοντας τη διαμόρφωση του υποδοχέα τύπου I και απομακρύνοντας την ανασταλτική πρωτεΐνη FKBP12. Στη συνέχεια η ιδιοσύστατα ενεργή κινάση Ser/Thr του υποδοχέα τύπου II φωσφορυλιώνει τις Ser/Thr στην ακολουθία TTSGSGSGL (τις Thr186, Ser187, Ser189 και Ser191) της περιοχής GS των υποδοχέων τύπου I, απομακρύνοντας τον περιορισμό που ασκεί αυτή η περιοχή, που είναι ενσφηνωμένη στο N-λοβό, αποτρέποντας την επανασύνδεση της FKBP12 και ενισχύοντας την αλληλεπίδραση των υποδοχέων τύπου I με τους μεταγραφικούς παράγοντες Smad. Με αυτόν τον τρόπο αποκαλύπτεται το ενεργό κέντρο της κινάσης του υποδοχέα τύπου I και καθίσταται προσβάσιμο στο ATP και στα πρωτεϊνικά υποστρώματα (Εικ. 22). Η δραστηριότητα κινάσης του υποδοχέα τύπου II ρυθμίζεται θετικά με αυτοφωσφορυλίωση της Ser213 και της Ser409 και αρνητικά με αυτοφωσφορυλίωση της Ser416. Αυτοφωσφορυλίωση επίσης μπορεί να γίνει σε κατάλοιπα τυροσίνης (Tyr259, Tyr336, Tyr424) ή φωσφορυλίωση από την Src (sarcoma) κινάση. Η φωσφορυλίωση στα κατάλοιπα τυροσίνης επιτρέπει την σύνδεση με σηματοδοτικά μόρια με SH2 (Src Homology 2) ή PTB(Phosphotyrosine Binding) περιοχές(311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318).



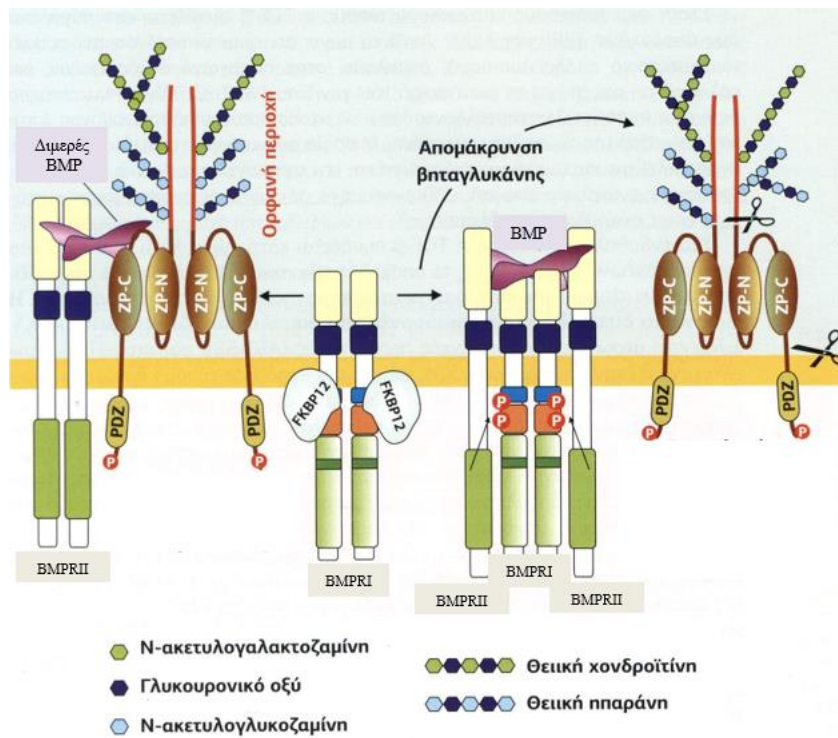
*Εικόνα 22* | **Ολιγομερισμός των υποδοχέων με την σύνδεση του διμερούς BMP.** [Πηγή: Ζίφα Διακυτταρική Επικοινωνία-Μεταγωγή Σήματος, 4<sup>η</sup> έκδοση, Βολος, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, 2019: 763]

### **3.8 Συμπληρωματικοί υποδοχείς**

#### **3.8.1 Η βηταγλυκάνη**

Στη σηματοδότηση των BMPs εμπλέκονται και συμπληρωματικοί υποδοχείς. Η βηταγλυκάνη και η ενδογλίνη αποτελούν τους υποδοχείς τύπου III. Η βηταγλυκάνη διευκολύνει τη σύνδεση των BMPs με τους υποδοχείς τύπου I (ALK3, ALK6) και με τη σύνδεση της στο σύμπλοκο BMP και ALK3/6 σταθεροποιεί τον ALK3 στην κυτταρική επιφάνεια ενώ διαμεσολαβεί στην ενδοκυττάρωση του ALK6 και την σηματοδότηση μέσω β-arrestin (319). Η βηταγλυκάνη είναι ο πιο άφθονος και ο πιο μεγάλος (250-350 kDa) από τους υποδοχείς τύπου III. Είναι μια διαμεμβρανική πρωτεογλυκάνη με αλυσίδες θειικής χονδροϊτίνης και θειικής ηπαράνης. Η εξωκυττάρια περιοχή της περιλαμβάνει μία περιοχή ZP (Zona Pellucida Domain), 260 αμινοξέων με 8 καλά συντηρημένες κυστεΐνες, η οποία έχει δύο λοβούς (ZP-N, ZP-C) που διαχωρίζονται με έναν linker (συνδέτη). Ο κάθε λοβός συνεισφέρει χωριστά στη σύνδεση του προσδέτη και μαζί σχηματίζουν μία περιοχή υψηλής συγγένειας σύνδεσης. Επίσης υπάρχει και μία ορφανή περιοχή η οποία δεν παρουσιάζει καμία ομοιότητα με άλλες πρωτεΐνες στο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο. Το κυτταροπλασματικό άκρο της βηταγλυκάνης περιέχει μια περιοχή ZPD, η οποία είναι υπεύθυνη για την αγκυροβόληση επιφανειακών υποδοχέων με στοιχεία του κυτταροσκελετού (ακτίνη), και μία θέση φωσφορυλίωσης από κινάσες Ser/Thr, μεταξύ αυτών και από υποδοχείς τύπου II.

Η βηταγλυκάνη βρίσκεται στη μεμβράνη ως ομοδιμερές, με τις δύο υπομονάδες της να συνδέονται μεταξύ τους με μη ομοιοπολικές συνδέσεις. Ωστόσο, πέραν του διεγερτικού ρόλου στην σηματοδότηση των BMPs ανάλογα με τις συνθήκες και τον κυτταρικό τύπο, η βηταγλυκάνη μπορεί να δράσει ανασταλτικά, όπως με την περίπτωση της inhibin η οποία συνδέεται με τους υποδοχείς ActRII σχηματίζοντας σταθερά σύμπλοκα με τη βηταγλυκάνη και οδηγώντας σε εξάντληση των ActRII. Το σύμπλοκο δεν μεταδίδει την ενδοκυττάρια σηματοδότηση καθώς δεν στρατολογεί τον υποδοχέα ActRIB (ALK4). Σε ενήλικες η έλλειψη βηταγλυκάνης σχετίζεται με τον σχηματισμό όγκων(319, 320, 321, 322) (Εικ. 23).



*Εικόνα 23* | Η ηπαρτανή και ο ρόλος της στη σηματοδότηση των BMPs. [Πηγή: Ζίφα Διακυτταρική Επικοινωνία-Μεταγωγή Σήματος, 4<sup>η</sup> έκδοση, Βολος, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, 2019: 767]

### 3.8.2 Η ενδογλίνη

Η ενδογλίνη (CD 105) αποτελεί μία ομοδιμερή διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη 633 αμινοξέων και 180 kDa, που εκφράζεται σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους, όπως τα ενδοθηλιακά κύτταρα ύστερα από φλεγμονώδη ερεθίσματα, επάγοντας αγγειογένεση. Έχει παρόμοια μορφή με τη ηπαρτανή αλλά στερείται αλυσίδων θειικής ηπαράνης. Στο εξωκυττάριο τμήμα περιέχει μία περιοχή ZPD, η οποία περιέχει την Cys582, υπεύθυνη για το διμερισμό της ενδογλίνης και μία ορφανή περιοχή. Το βραχύ κυτταροπλασματικό της τμήμα αποτελείται από μία περιοχή PDZ, η οποία αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες όπως η RhoGEF (Rho Guanine nucleotide Exchange Factor) και η eNOS (endothelial Nitric Oxide Synthase). Η ενδογλίνη επάγει την σύνδεση των BMP-9/-10 με τους υποδοχείς BMPRII και ALK1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Συνδέεται μέσω της εξωκυττάριας περιοχής στον BMPRII, ενώ με τον υποδοχέα τύπου I συνδέεται μέσω της κυτταροπλασματικής της περιοχής, μόνο όταν είναι ανενεργός, ενώ μόλις ενεργοποιείται διαχωρίζεται άμεσα από την ενδογλίνη. Το κυτταροπλασματικό COOH-τελικό άκρο της ενδογλίνης είναι φωσφορυλιωμένο λόγω της ιδιοσύστατης κινάσης του BMPRII. Η παρουσία της ενδογλίνης σχετίζεται με τη ρύθμιση της αγγειογένεσης και της μετανάστευσης, μέσω του μονοπατιού Smad1/5/8 (323, 324).

### 3.8.3 O Cripto

Ο Cripto αποτελεί μία μικρή γλυκοπρωτεΐνη η οποία συνδέεται με μία άγκυρα GPI (Glycosylphosphatidylinositol) σε σχεδίες λιπιδίων της μεμβράνης. Αποτελείται από μία περιοχή EGF-like (Epithelial Growth Factor-like) και μία περιοχή CFC (Cripto, Frl-1, Cryptic domain) η οποία αποτελείται από 40 αμινοξέα, συγκρατείται με τρεις ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς και συνδέει τον ALK4 με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Ο Nodal, ένα μέλος της υπερικογένειας των TGF-β, είναι συνυποδοχέας του Cripto. Ο Cripto δρα είτε cis (αυτοκρινώς) είτε trans [αποκοπτόμενος από την κυτταρική μεμβράνη μέσω της δράσης GPI-PLD (Glycosylphosphatidylinositol Phospholipase D)], συνδεόμενος μέσω του EGF-like μοτίβου και χάρη σε μία Ο-φουκοσυλίωση της εξωκυτταρικής περιοχής του με τον Nodal. Η ταυτόχρονη σύνδεση του με τον ALK4 μέσω του CFC μοτίβου, επιτρέπει στον Nodal να συνδεθεί στο σύμπλοκο ALK4 και ActRII/IIb. Αυτή η σύνδεση θα ενεργοποιήσει την φωσφορυλίωση των Smad2/3, οι οποίοι θα μεταβούν ως σύμπλοκο με τον Smad4 στον πυρήνα για να ξεκινήσει η μεταγραφική δραστηριότητα γονιδίων στόχων, όπως ο ίδιος ο Nodal και οι ανταγωνιστές του Lefty και Cerberus. Ο Lefty ανταγωνίζεται την σύνδεση του Nodal με τους υποδοχείς ALK4 και ActRII/IIb, ενώ ο Cerberus συνδέεται άμεσα με τον εξωκυττάριο Nodal εμποδίζοντας την σηματοδότηση. Τα τρία αυτά μόρια ρυθμίζουν την επαγωγή του μεσοδέρματος, την δεξιά-αριστερή ασυμμετρία και τη διαμόρφωση του νευρικού ιστού(325, 326).

### 3.8.4 Άλλοι συμπληρωματικοί υποδοχείς

Μία άλλη κατηγορία συνυποδοχέων είναι η glycosylphosphatidylinositol-linked οικογένεια των RGM (Repulsive Guidance Molecules). Περιέχει τις RGMa, RGMb ή DRAGON, RGMc ή hemojuvelin (HJV) και RGMd οι οποίες αποτελούνται από ένα NH<sub>2</sub>-τελικό πεπτίδιο σήματος, μία διαμεμβρανική περιοχή von Willebrand factor type D και μία GPI άγκυρα. Αυτοί οι συνυποδοχείς συνδέονται με υψηλή συγγένεια με τους υποδοχείς τύπου I και τις BMP-2/-4 τροποποιώντας τη σύνδεσή τους με τους υποδοχείς τύπου II και εν τέλει αυξάνοντας την κυτταρική ευαισθησία στις BMPs(326).

Οι BMPs αλληλεπιδρούν και με άλλους υποδοχείς όπως ο RTK (Receptor Tyrosine Kinase), ο c-kit, ο Ror2 (Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2) και GPCR (G-protein Coupled Receptor) υποδοχείς. Ο BAMBI (BMP and Activin Membrane-Bound Inhibitor) είναι ένας γενικός ανταγωνιστής της οικογένειας των TGF-β. Είναι μία μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη η οποία δρα ως ψευδοϋποδοχέας, καθώς απουσιάζει η ενδοκυτταρική περιοχή κινάσης Ser/Thr, σχηματίζοντας σταθερά σύμπλοκα με τους υποδοχείς τύπου II, μειώνοντας τα διαθέσιμα επίπεδα

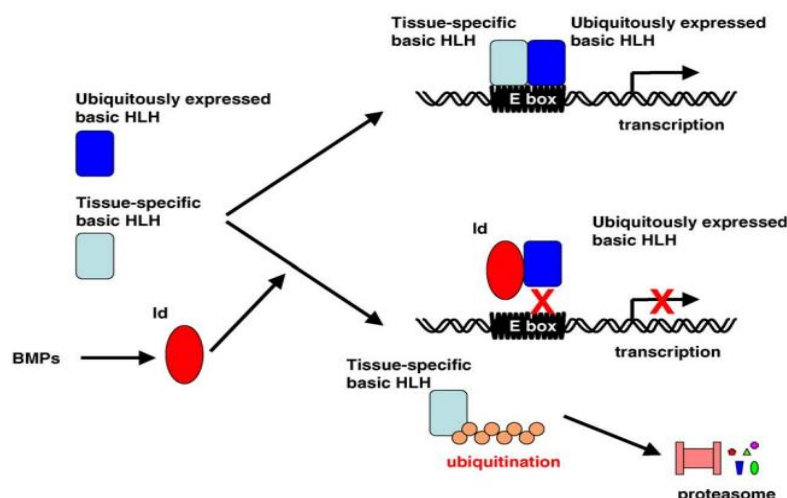
αυτών για τη σύνδεση με τους υποδοχείς τύπου I. Η BMP-4 είναι απαραίτητη για την έκφραση του BAMBI, καθιστώντας τον BAMBI αρνητικό ρυθμιστή (327).

Οι BMPs σηματοδοτούν είτε μέσω του μονοπατιού των Smad είτε μέσω άλλων μονοπατιών (MAPKS, p38, JNK, ROCK, Akt/κινάση PI3K).

### 3.9 Id γονίδια

Μεταξύ των γονιδίων στόχων οι πρωτεΐνες Id (Inhibitor of Differentiation or inhibitor of DNA binding) εκφράζονται από ποικιλία κυτταρικών τύπων και είναι από τα σημαντικότερα γονιδια-στόχοι των BMPs(328). Λειτουργούν ως αρνητικοί ρυθμιστές της κυτταρικής διαφοροποίησης και θετικοί ρυθμιστές του κυτταρικού πολλαπλασιασμού(329). Οι τέσσερις Id πρωτεΐνες εμφανίζουν παρόμοιες αλλά όχι πανομοιότυπες βιολογικές λειτουργίες. Οι βασικοί HLH (Helix-Loop-Helix) μεταγραφικοί παράγοντες παράγονται σε όλα τα κύτταρα αδιακρίτως και αλληλεπιδρούν με τους ιστοειδικούς HLH παράγοντες, σηματοδοτώντας την έναρξη της μεταγραφής γονιδίων που περιέχουν της ακολουθία E-box (Enhancer box) στους ενισχυτές τους. Οι ιστοειδικοί HLH μεταγραφικοί παράγοντες περιλαμβάνουν την μυογενίνη και την MyoD (Myoblast Determination protein) στους μύς και την NeuroD (Neurogenic Differentiation), Mash1 (Achaete-Scute Family BHLH Transcription Factor 1) και neurogenin στους νευρώνες(330, 331).

Οι Id πρωτεΐνες περιέχουν περιοχές αλληλεπίδρασης με τα μοτίβα HLH και έτσι λόγω έλλειψης περιοχών σύνδεσης με το DNA, συνδέονται με τους βασικούς HLH μεταγραφικούς παράγοντες αναστέλλοντας τη μεταγραφική τους δραστηριότητα. Με αυτόν τον τρόπο οι Id πρωτεΐνες αναστέλλουν τη μεταγραφή που επάγουν τα ετεροδιμερή MyoD/myogenin ή NeuroD/Mash1/neurogenin, διακόπτοντας τη μυογένεση και τη νευρογένεση. Οι Smad1/5/8 επίσης επάγουν την έκφραση του Id1(332) (Εικ. 24).



Εικόνα 24 | Αλληλεπίδραση των Id γονιδίων με τους HLH μεταγραφικούς παράγοντες και ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. [Πηγή: (315)]

## 4. ΟΙ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ Smad

Η πρωτεΐνη Mad (Mothers Against Decapentaplegic) αναγνωρίστηκε το 1999 στη *Drosophila*, είναι το πρώτο μέλος της οικογένειας Smad και είναι ομόλογη με τους Smad1/5 των θηλαστικών(333). Αργότερα αναγνωρίστηκαν στη *Drosophila* οι dSmad2, Medea και Dad, ομόλογες των Smad2/3, Smad4 και Smad6/7 αντίστοιχα. Η οικογένεια Smad του *Caenorhabditis elegans* αποτελείται από τους Sma1, Sma2, Sma3 (Small), λόγω του μικρού μεγέθους σώματος της λάρβας που επάγεται από τη σηματοδότηση μέσω TGF-β υποδοχέων που έχουν ενεργοποιηθεί από το στρες(334). Το όνομα Smad προήλθε από την ομολογία της ανθρώπινης Smad1 με τις πρωτεΐνες Sma και Mad(335, 336, 337, 338).

Διαιρούνται σε τρεις κατηγορίες:

- R-Smads (Receptor activated Smads) οι οποίοι αλληλεπιδρούν με υποδοχείς είτε των TGF-β (Smad2, Smad3) είτε των BMPs (Smad1, Smad5, Smad8/9)(336, 337, 338).
- Co-Smad (Common mediator Smad – κοινός μεσολαβητής) είναι ο Smad4 ο οποίος συνοδεύει τους R-Smads στον πυρήνα. Δεν συνδέεται με τους BMPRs αλλά μόνο με τους R-Smads ενώ το COOH-άκρο στερείται του μοτίβου Ser-x-Ser(339).
- I-Smads (Inhibitory Smads) είναι οι ανασταλτικοί Smads, Smad6 και Smad7, οι οποίοι ανταγωνίζονται τους R-Smads και διακόπτουν τη μεταγωγή σήματος μέσω πολλαπλών μηχανισμών όπως θα αναλυθούν παρακάτω(340, 341).

Στους R-Smads, ο Smad1 και οι ομόλογοι Smad5 και Smad8 αποτελούν υποστρώματα για τον BMPRI και διαμεσολαβούν στα BMP σήματα. Οι Smad2 και Smad3 αποτελούν υποστρώματα για τον TβRI και διαμεσολαβούν σε σήματα TGF-β και activin. Υπερέκφραση του Smad1 σε έμβρυα *Xenopus* μιμείται την επαγωγή του κοιλιακού μεσοδέρματος από την BMP-4 ενώ ο Smad2 μιμείται την επαγωγή του ραχιαίου μεσοδέρματος και τον σχηματισμό του άξονα από την activin. Ο Smad4 είναι ο μόνος γνωστός στα θηλαστικά και συμμετέχει ως κοινός ενδιάμεσος στα μονοπάτια των BMPs, TGF-β και activin. Από τους I-Smads ο Smad6 αναστέλλει επιλεκτικά το μονοπάτι των BMPs ενώ ο Smad7 αναστέλλει τα μονοπάτια των BMPs και TGF-β(342, 343).

### 4.1 Δομή

Οι μεταγραφικοί παράγοντες Smad, πρωτεΐνες μήκους 500 αμινοξέων χωρίς ενζυμικά καταλυτικά κέντρα, αλληλεπιδρούν μέσω της δομής τους με το DNA, με άλλες ρυθμιστικές πρωτεΐνες και μεταγραφικούς συνενεργοποιητές και συγκαταστολείς. Αποτελούνται από δύο σφαιρικές περιοχές: MH1 (N-Mad Homology 1), MH2 (C-Mad Homology 2), οι οποίες συνδέονται με έναν

linker. Η περιοχή MH1 είναι συντηρημένη σε όλους τους R-Smads και στον Smad4, αλλά όχι στους I-Smads, η MH2 περιοχή είναι συντηρημένη σε όλους τους Smads, ενώ η συνδετική περιοχή δεν είναι συντηρημένη.

#### 4.1.1. Ο ρόλος της περιοχής MH1

1. Αυτοαναστολή: Η περιοχή MH1 αλληλεπιδρά με την περιοχή MH2 συμβάλλοντας στην αυτοαναστολή των Smads σε κατάσταση ηρεμίας. Με αυτόν τον τρόπο εμποδίζεται η δράση των Smads απουσία προσδέτη (BMPs)(338).
2. Είσοδος στον πυρήνα: Οι Smads περιέχουν στην περιοχή MH1 ένα NLS (Nuclear Localization Signal) μοτίβο, το οποίο αναγνωρίζεται από τις importins, συμβάλλοντας στην εισαγωγή των Smads στον πυρήνα(344, 345).
3. Αλληλεπίδραση με μεταγραφικούς παράγοντες(345).
4. Ικανότητα δέσμευσης με το DNA: Η περιοχή MH1 αποτελείται από 4 α-έλικες και 3 ομάδες αντιπαράλληλων β-hairpins (φουρκέτα). Η περιοχή της φουρκέτας αποτελείται από δύο αντιπαράλληλους β-κλώνους όπου το N-τελικό άκρο του ενός φύλλου βρίσκεται απέναντι από το C-τελικό άκρο του επόμενου, συνδεόμενα μεταξύ τους με έναν βρόχο δύο έως πέντε αμινοξέων. Οι περιοχές αυτές είναι υπεύθυνες για την πρόσδεση των R-Smads στη μεγάλη αύλακα του DNA. Οι δύο από τις τρεις β-hairpin σταθεροποιούνται από ένα στενά συνδεδεμένο άτομο  $Zn^{+2}$ . Η περιοχή αυτή αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'-CAGAC- 3' στο δίκλωνο DNA, η οποία είναι γνωστή ως SBE (Smad Binding Element)(344).

#### 4.1.2 Η συνδετική περιοχή – linker

Η συνδετική περιοχή (linker), ως περιοχή διασύνδεσης των περιοχών MH1 και MH2, είναι λιγότερο συντηρημένη, ωστόσο οι θέσεις φωσφορυλίωσης και το μοτίβο PY(Pro-Tyr) (-PPxY) που περιέχει είναι εξαιρετικά συντηρημένα στους R-Smads στα μετάζωα. Σε αυτές τις θέσεις συνδέονται πρωτεΐνες που περιέχουν περιοχές WW (Trp-Trp).

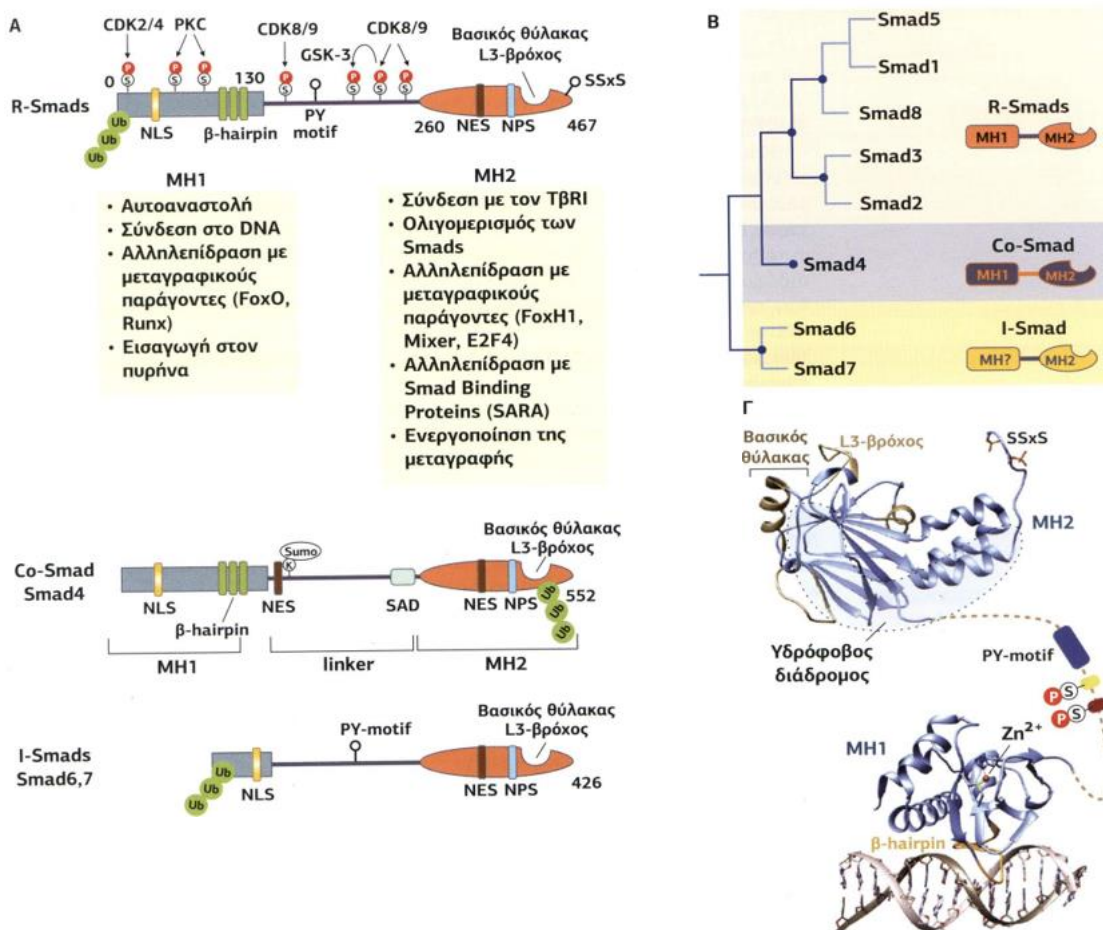
Στο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο του linker του Co-Smad βρίσκεται μια περιοχή NES (Nuclear Export Sequences), που συμβάλλει στην έξοδο του από τον πυρήνα καθώς αλληλεπιδρά με την exportin CRM1 (Chromosome Region Maintenance 1) και στο COOH-τελικό άκρο μία περιοχή SAD (Smad Activation Domain), που συνεργεί στην αλληλεπίδραση του Smad4 με τους R-Smads(346, 347).

### 4.1.3 Ο ρόλος της περιοχής MH2

Η περιοχή MH2 συνδέεται με πρωτεΐνες, με υποδοχείς (στην περίπτωση των R-Smads), με άλλους Smads και με μεταγραφικούς συμπαράγοντες(336). Η περιοχή MH2 καθορίζεται από δύο ομάδες αντιπαράλληλων πέντε και έξι β-κλώνων, αντίστοιχα, διευθετημένων ως β-sandwich, που περιβάλλεται από μία τριπλή δεσμίδα από α-έλικες από τη μία πλευρά και από μια ομάδα ενός μεγάλου βρόχου και μιας α-έλικας από την άλλη. Η περιοχή MH2 περιέχει έναν L3 βρόχο και έναν γειτονικό θετικά φορτισμένο θύλακα που καλύπτεται με βασικά αμινοξέα τα οποία αλληλεπιδρούν με το μοτίβο των δι-p-Ser. Στην περίπτωση των R-Smads αλληλεπιδρούν με τον βρόχο L45 της κινάσης των υποδοχέων τύπου I, ενώ στην περίπτωση του Co-Smad με τους φωσφορυλιωμένους R-Smads. Η αλληλεπίδραση αυτών των δύο βρόχων καθορίζει την εξειδίκευση της σύνδεσης(348).

Μια ομάδα από υδρόφοβα μοτίβα της MH2 περιοχής δημιουργούν έναν υδρόφοβο διάδρομο (hydrophobic corridor) που μεσολαβεί στις αλληλεπιδράσεις με κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, όπως η SARA (Smad Anchor Receptor Activation), με πρωτεΐνες των πυρηνικών πόρων (Nup214) και με μεταγραφικούς συμπαράγοντες. Σε κατάσταση ηρεμίας οι R-Smads και Smad4 συνδέονται με συγκεκριμένες πρωτεΐνες, π.χ. Disabled2, Axin, SARA, TRAP1 (Smad4) παραμένοντας στο κυτταρόπλασμα και εμποδίζοντας τη μεταφορά τους στον πυρήνα(348, 349) (Εικ. 25).





**Εικόνα 25** | Συνολική εικόνα της δομής των Smads και ο ρόλος της κάθε περιοχής τους. Α. Οι περιοχές και θέσεις σύνδεσης των Smads. Β. Ταξινόμηση των Smads. Γ. Κρυσταλλική δομή του Smad3. [Πηγή: Ζίφα Διακυτταρική Επικοινωνία-Μεταγωγή Σήματος, 4<sup>η</sup> έκδοση, Βολος, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, 2019: 777]

## 4.2 Σηματοδότηση

Με τη φωσφορυλίωση της περιοχής GS του υποδοχέα τύπου I δημιουργείται ένα επαναλαμβανόμενο μοτίβο pSer-x-pSer, το οποίο χρησιμεύει ως σημείο σύνδεσης για τους μεταγραφικούς παράγοντες R-Smads. Οι υποδοχείς ALK1, ALK2, ALK3 και ALK6 των BMPs αναγνωρίζουν τους Smads1/5/8. Μετά την σύνδεση του ενεργοποιημένου BMPRI με τον R-Smad, η περιοχή κινάσης του BMPRI φωσφορυλιώνει τον R-Smad σε δύο κατάλοιπα Ser στην COOH-τελική περιοχή Ser-Val-Ser (Ser-Met-Ser στον Smad2). Το pSer-x-pSer είναι το χαρακτηριστικό μοτίβο ενεργοποίησης του μονοπατιού BMP/Smad, το οποίο εμφανίζεται τόσο στην περιοχή GS των υποδοχέων τύπου I κατά τη φωσφορυλίωση από τους υποδοχείς τύπου II, όσο και στο COOH-τελικό άκρο των R-Smads κατά τη φωσφορυλίωσή τους από τους υποδοχείς τύπου I. Αυτή η

μονάδα δι-pSer αποτελεί την όξινη ουρά, που συνδέεται στον βασικό θύλακα και στον L3 βρόχο στην περιοχή MH2 των R-Smads ή του Co-Smad(336, 339, 350, 351).

Μετά τη φωσφορυλίωσή τους οι R-Smads σχηματίζουν τριμερή σύμπλοκα με τον κοινό διαμεσολαβητή Smad4, καθώς το COOH-τελικό φωσφορυλιωμένο μοτίβο pSer-x-pSer συνδέεται με τον L3 βρόχο της Co-Smad και μεταφέρονται στον πυρήνα. Οι Smads είτε αλληλεπιδρούν μέσω του μοτίβου NLS με την  $\beta$ -importin, η οποία συνδέεται με την  $\alpha$ -importin και μέσω αλληλεπίδρασης των importins με τις nucleoporins των πυρηνικών πόρων εισέρχονται στον πυρήνα, είτε συνδέονται άμεσα με τις nucleoporins Nup214 και Nup153 και εισέρχονται στον πυρήνα χωρίς τη μεσολάβηση των importins. Η θέση σύνδεσης για αυτές τις nucleoporins βρίσκεται στον υδρόφοβο διάδρομο της περιοχής MH2 των Smad1/5 και επικαλύπτεται με τη θέση πρόσδεσης για την περιοχή SBD (Smad Binding Domain) της SARA(336, 346, 352).

Εκτός από το ίδιο το σύμπλοκο των Smads οι BMPs δεν παρέχουν ακριβείς πληροφορίες για τα γονίδια που θα αναγνωριστούν από το σύμπλεγμα. Το πλαίσιο αναγνώρισης παρέχεται από δύο κατηγορίες μορίων που αλληλεπιδρούν με τους Smads: συμπαράγοντες σύνδεσης στο DNA και μεταγραφικοί συνενεργοποιητές ή συγκαταστολείς. Η συγγένεια των Smads για τη συγγενή αλληλουχία τους είναι πολύ χαμηλή για να επιτευχθεί μη-ενισχυμένη σύνδεση στο DNA. Το τριμερές σύμπλοκο επαρκεί για τη σύνδεση σε ορισμένα μόνο γονίδια που έχουν δύο ή περισσότερες αλληλουχίες CACAG ή περιοχές πλούσιες σε GC οι οποίες περιέχουν τα μοτίβα GCCG, CGCC, CAGC, GGCGCC, GGAGCC. Έτσι η σύνδεση σε εκκινήτες γίνεται από σύμπλοκα που πληρούν τις συνδυασμένες απαιτήσεις ειδικότητας αλληλουχίας ενός δεδομένου συνδυασμού Smad-συμπαράγοντα, οι οποίες εξαρτώνται από το είδος του κυττάρου, το στάδιο διαφοροποίησης ή τις μεταβολικές συνθήκες του κυττάρου. Οι Smads έχουν βρεθεί να συνδέονται με μεγάλη ποικιλία μεταγραφικών παραγόντων. Εκτός των διαφορετικών μεταγραφικών παραγόντων, η πρόσβαση στη χρωματίνη φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μεταγραφική απόκριση των κυττάρων στις BMPs και ειδικότερα συγκεκριμένες τροποποιήσεις των ιστονών επηρεάζουν τη σύνδεση των Smads. Στην παρούσα εργασία θα αναλυθούν οι μεταγραφικοί παράγοντες που σχετίζονται με τους Smad1/5/8 του μονοπατιού των BMPs(345, 353, 354) (Εικ. 26).

### **4.3 Smad-επαγόμενοι μεταγραφικοί παράγοντες**

#### **4.3.1 Runx2**

Ο Runx2 (Runt-related Transcription Factor 2) αποτελεί μία οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων που ρυθμίζουν πολυάριθμες βιολογικές λειτουργίες όπως η αιμοποίηση, ο σχηματισμός οστών και η ομοιοστασία του γαστρικού βλεννογόνου(355). Έχουν αναγνωριστεί

τρεις ισομορφές στα θηλαστικά οι οποίες αλληλεπιδρούν με τους R-Smads. Ποντίκια στα οποία λείπει το *Runx2* παρουσιάζουν πλήρη αδυναμία σχηματισμού οστών. Μετάλλαξη ή απουσία ενός αλληλομόρφου του γονιδίου *Runx2* σχετίζεται με την ανάπτυξη της αυτοσωμικά επικρατούς νόσου κλειδοκρανιακής δυσπλασίας. Οι πρωτεΐνες *Runx* αλληλεπιδρούν με τη β-υπομονάδα του PEBP2 (Polyomavirus Enhancer Binding Protein 2), σταθεροποιούμενες και προστατευόμενες από την πρωτεασωμική διάσπαση μέσω ουβικουτίνωσης. Ο *Runx2* και οι *Smad1/5/8* αλληλεπιδρούν μεταξύ τους σε απόκριση στις BMPs, και ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων στόχων που οδηγούν σε διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων σε οστεοβλάστες(356, 357).

#### 4.3.2 GATA4/5/6

Ο GATA4/5/6 αποτελεί μία υποοικογένεια μεταγραφικών παραγόντων που εκφράζονται κατά τα αναπτυξιακά στάδια της καρδιάς και του εντέρου(358, 359). Περιέχει μία περιοχή δακτύλου  $Zn^{+2}$  που συνδέεται με το DNA(360). Οι BMPs επάγουν την έκφραση GATA4/5/6 και τη συνεργική σύνδεση των *Smad4* και GATA4/5/6 στον ενισχυτή του γονιδίου *NKX25*, που είναι υπεύθυνο για την καρδιακή ανάπτυξη(361, 362, 363).

#### 4.3.3 Menin

Η Menin είναι το προϊόν του *MEN1* (multiple endocrine neoplasia 1) γονιδίου και εμπλέκεται στη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων σε οστεοβλάστες. Συνδέεται με τους *Smad1/5/8* και σε συνεργασία με τον *Runx2* επάγει τη μεταγραφική έκφραση σε πρώιμα στάδια της διαφοροποίησης των οστεοβλαστών. Ωστόσο η Menin αλληλεπιδρά και με τον *Smad3* ρυθμίζοντας όμως αρνητικά αυτήν τη φορά τη μεταγραφική δραστηριότητα στα όψιμα στάδια διαφοροποίησης των οστεοβλαστών. Παρατηρείται λοιπόν ο διττός ρόλος της Menin(364).

#### 4.3.4 YY1

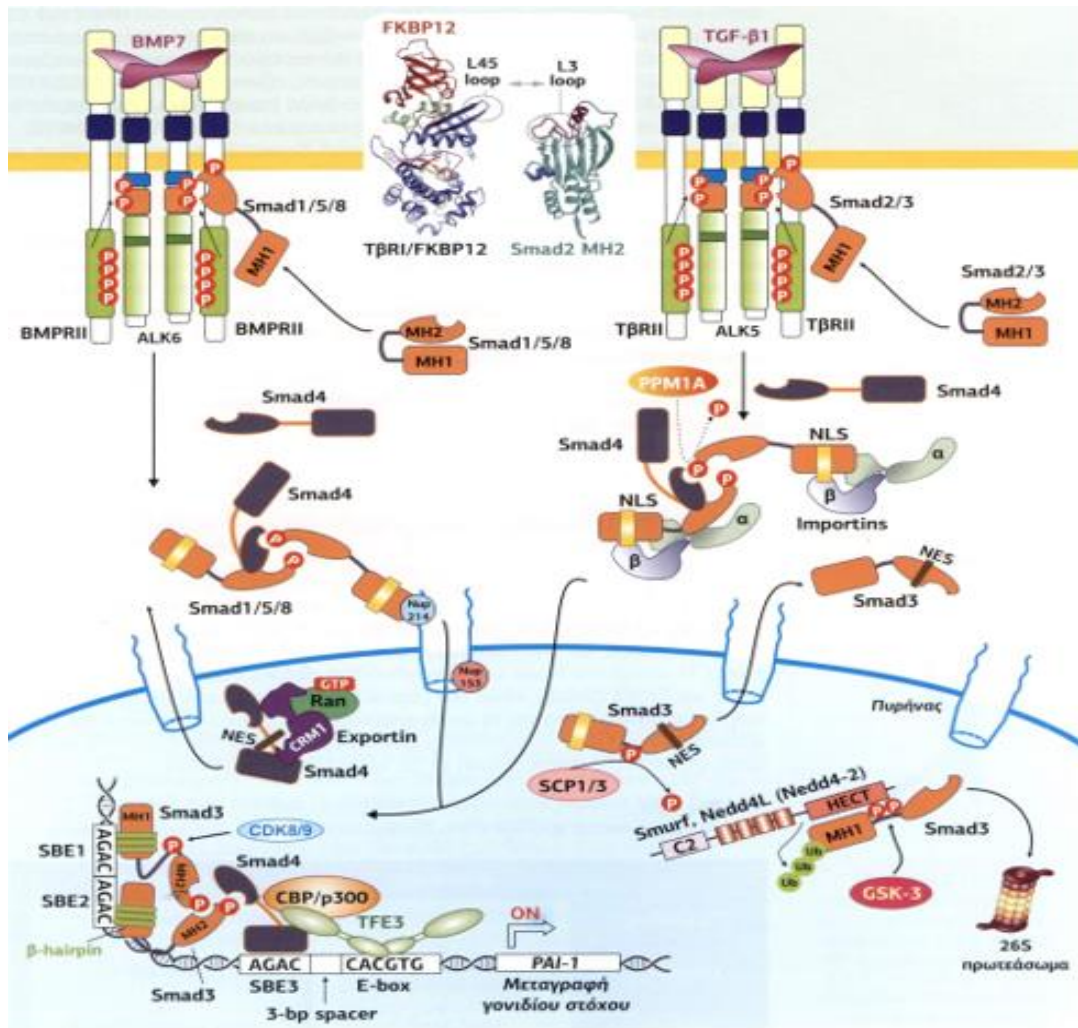
Ο YY1 (Yin-Yang 1) ρυθμίζει αρνητικά τη μεταγραφή πολλών γονιδίων. Αναστέλλει την επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης των *Id1* και *PAI-1* των TGF-β και BMPs(365). Ο YY1 αλληλεπιδρά με τους *Smad4* και μαζί με τους *Smad1* και *Smad2/3* αναστέλλει την σύνδεση με τα SBEs. Ο YY1 αναστέλλει τη μεταγραφική δραστηριότητα των Smads, ενώ εμπλέκεται και στην επαγωγή του *NKX25* και του *GATI* (GABA Transporter 1)(366, 367, 368, 369).

#### 4.3.5 OAZ, Hoxc-8, SIP1

Ο OAZ (Olf-1/EBF Associated Zinc finger) ενεργοποιείται από τους Smads1/5/8 υπό την επίδραση των BMPs και επάγει την ενεργοποίηση του *Vent2* συνδεδεμένος άμεσα με το DNA. Ο Hoxc-8 (Homeobox-c8) είναι μεταγραφικός καταστολέας. Ο Smad1 συνδέεται με τον Hoxc-8, απομακρύνοντας τον από τη θέση σύνδεσης του DNA και επάγει την έκφραση του γονιδίου της *osteopontin*. Η SIP1 (Smad Interacting Protein 1) επάγεται από τον TGF-β ασκώντας κατασταλτικό έλεγχο στην έκφραση της E-cadherin προάγοντας την μετάσταση (370, 371, 372).

#### 4.3.6 p300 και CBP

Και οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες έχουν περιοχές ακετυλοτρανσφεράσης των ιστονών. Επάγουν την μεταγραφική έκφραση των γονιδίων στόχων προκαλώντας χαλάρωση της δομής των νουκλεοσωμάτων και αυξάνοντας την πρόσβαση της μεταγραφικής μηχανής. Ο τρόπος δράσης είναι μέσω αλληλεπίδρασης με τους R-Smads. Η CBP (CREB Binding Protein) σε συνεργασία με τους Smad1/5/4 προσδένεται στον ενισχυτή του CSF1 (Colony-Stimulating Factor-1) σε μυοβλαστοκύτταρα C2C12 ποντικού(373). Ο μεταγραφικός παράγοντας p300 επίσης συνδέεται και με τον Runx επάγοντας τη μεταγραφή των γονιδιακών στόχων του Runx ενώ ακετυλιώνει σε κατάλοιπα Lys τον Runx3 αποτρέποντας την ουβικουιτίνωση από τους Smurf (Smad ubiquitination regulatory factor)(374).



Εικόνα 26 | Το σηματοδοτικό μονοπάτι των BMPs και του TGF-β μέσω των Smads. [Πηγή: Ζίφα Διακυτταρική Επικοινωνία-Μεταγωγή Σήματος, 4<sup>η</sup> έκδοση, Βολος, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, 2019: 773]

#### 4.4 Μεταγραφική δραστηριότητα των R-Smads και ρύθμιση

Μέσα στον πυρήνα οι R-Smads φωσφορυλιώνονται από τις κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες CDK 8/9 (Cyclin Dependent Kinase 8/9), γεγονός που μεγιστοποιεί τη μεταγραφική τους δραστηριότητα, ευνοώντας τις αλληλεπιδράσεις με τους συνενεργοποιητές και προετοιμάζοντας τους R-Smads για φωσφορυλίωση από την κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου 3 (GSK3 – Glycogen Synthase Kinase 3). Η GSK3 μετατρέπει τη θέση πρόσδεσης των συνενεργοποιητών του linker σε μία θέση πρόσδεσης για τις περιοχές HECT των E3 λιγασών ουβικουιτίνης, Smurf1 και Smurf2, για αποικοδόμηση στα πρωτεασώματα. Στο μονοπάτι των BMPs, οι CDK8/9 φωσφορυλιώνουν τις Ser206, Ser214 του Smad1 δημιουργώντας θέσεις σύνδεσης που αναγνωρίζονται από τις περιοχές WW του μεταγραφικού παράγοντα YAP1 (Yes-Associated Protein 1). Αυτές οι φωσφορυλιώσεις

διευκολύνουν έπειτα τη φωσφορυλίωση των Thr202 και Ser210 από την GSK-3 οδηγώντας όπως εξηγήθηκε παραπάνω στην σύνδεση του Smurf1.

Ο YAP συνδέεται με την pSer206 μέσω της WW1 περιοχής και με το μοτίβο PY μέσω της WW2. Ωστόσο μετά την φωσφορυλίωση από την GSK-3 η λιγάση Smurf1 γίνεται η προτιμώμενη πρωτεΐνη σύνδεσης, επειδή αναγνωρίζει το ζεύγος των φωσφορυλιωμένων pSer210 και pSer214 συν το μοτίβο PY. Η φωσφορυλίωση από τις CDK8/9 αντιστρέφεται από τις πυρηνικές φωσφατάσες SCP1-3 (Small C-terminal domain phosphatases 1-3) οι οποίες αποφωσφορυλιώνουν τους Smads στην περιοχή linker, παρατείνοντας και ενισχύοντας τη BMP σηματοδότηση(353, 354, 375).

#### **4.5 Η ανακύκλωση των υποδοχέων**

Η ενδοκύτωση των υποδοχέων είναι απαραίτητη για τη ρύθμιση του μονοπατιού των Smad. Η ενδοκύτωση γίνεται είτε ιδιόσυστατα είτε μετά την σύνδεση του προσδέτη, μετά από φωσφορυλίωση ή ουβικουιτίνωση, καθώς οι υποδοχείς τύπου I και II υφίστανται διαρκώς εσωτερίκευση. Απουσία προσδέτη μόλις ενσωματωθούν στα πρώιμα ενδοσώματα οι υποδοχείς των BMPs, επιστρέφουν πίσω στην πλασματική μεμβράνη με τη βοήθεια της GTPάσης Rab11 και των ενδοσωμάτων ανακύκλωσης. Μετά την σύνδεση του προσδέτη στον υποδοχέα διακρίνονται δύο οδοί εσωτερίκευσης. Η εσωτερίκευση από κλαθρίνη σε πρώιμα ενδοσώματα που περιέχουν τη SARA, η οποία προάγει τη σηματοδότηση των Smads, και η εσωτερίκευση των υποδοχέων που βρίσκονται σε λιπιδικές σχεδίες της μεμβράνης, που περιέχουν καβεολίνη (lipid rafts – caveolar compartments), όπου συνδέονται μέσω των I-Smads (Smad7/Smurf2, Smad6/Smurf1) και οδηγούν τους υποδοχείς σε αποικοδόμηση στα πρωτεασώματα μέσω πολυ-ουβικουιτίνωσης(376, 377).

##### **4.5.1 Ενδοκύτωση υποδοχέων μέσω κυστιδίων καλυμμένων με κλαθρίνη**

Οι υποδοχείς αρχικά συγκεντρώνονται σε εγκολπώσεις της μεμβράνης καλυμμένες με κλαθρίνη, AP2 (Activator Protein 2) και άλλες βοηθητικές πρωτεΐνες όπως συναπτοταγμίνη και amphiphysin. Οι κοιλότητες διογκώνονται και αποκόπτονται από την πλασματική μεμβράνη με τη βοήθεια της GTPάσης δυναμίνης. Μετά την απομάκρυνση της κλαθρίνης, τα κυστίδια τελικά συντήκονται με τα πρώιμα ενδοσώματα, όπου μεταφέρονται και οι υποδοχείς. Στα πρώιμα ενδοσώματα βρίσκεται η πρωτεΐνη SARA η οποία ενισχύει την σηματοδότηση του TGF-β. Οι υποδοχείς των BMPs στην συνέχεια είτε επιστρέφουν μέσω της GTPάσης Rab11 στην πλασματική μεμβράνη με τη βοήθεια των όψιμων ενδοσωμάτων είτε μέσω των όψιμων

ενδοσωμάτων οδηγούνται στα λυσοσώματα για αποικοδόμηση με τη βοήθεια της GTPάσης Rab7(378, 379).

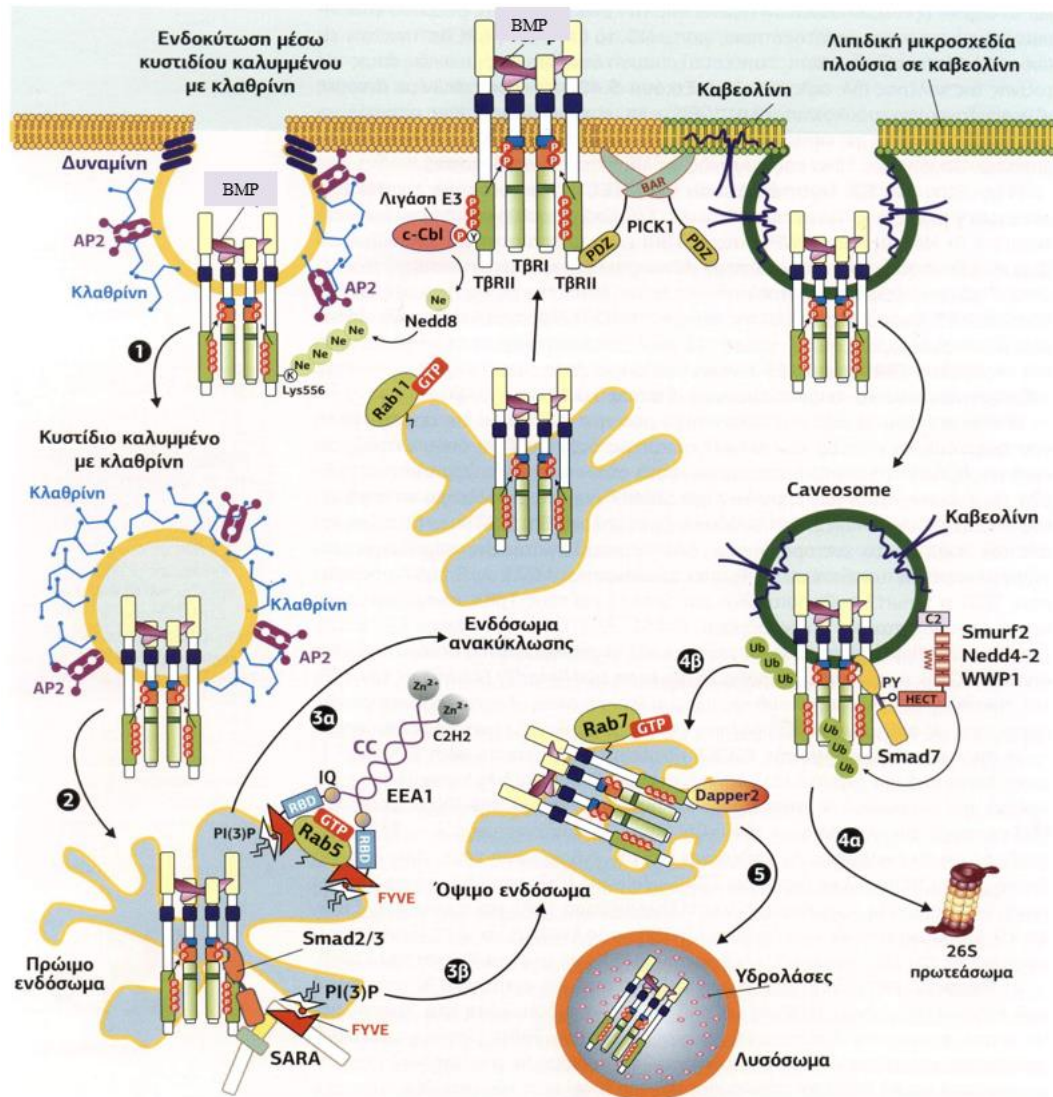
#### 4.5.2 Ενδοκύτωση υποδοχέων που βρίσκονται σε λιπιδικές σχεδίες πλούσιες σε καβεολίνη

Οι λιπιδικές σχεδίες της πλασματικής μεμβράνης είναι εμπλουτισμένες με χοληστερόλη και σφιγγολιπίδια. Όταν αυτά τα εξειδικευμένα μικροδιαμερίσματα χαμηλής πυκνότητας, αδιάλυτα σε απορρυπαντικά, περιέχουν καβεολίνη, τότε ονομάζονται caveole. Η ενδοκύτωση που προκαλείται από σχεδίες λιπιδίων με καβεολίνη προάγει την ουβικουιτίνωση και την αποικοδόμηση των υποδοχέων των BMPs, και τελικά, τη λήξη της σηματοδότησης. Η ουβικουιτίνωση συνίσταται σε ένα ενζυμικό σύμπλοκο που περιέχει την E1 υπομονάδα (ενεργοποιητική), την E2 υπομονάδα (συζευκτική) και την E3 υπομονάδα (συνδετική, ligase) η οποία προσδίδει ενζυμική εξειδίκευση στο υπόστρωμα. Η σύνδεση των E3 λιγασών τύπου WW-HECT (Homologous to the E6-accessory protein C-terminus), Smurf1/2, Nedd4-2 (Neural precursor cell-expressed, developmentally down-regulated 4-2) και WWP1 (WW Domain Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase 1) στους υποδοχείς τύπου I είναι απαραίτητη για την ουβικουιτίνωσή τους, ενώ ο Smad7 δρα ως κρίσιμος προσαρμογέας. Ο Smad7 μέσω του μοτίβου PY του linker συνδέεται με τις περιοχές WW2/3 των E3 λιγασών και μέσω της περιοχής MH2 με την περιοχή GS του υποδοχέα τύπου I επάγοντας τη συναρμολόγηση του συμπλόκου BMPRI/E3-λιγάση/Smad7 οδηγώντας σε ουβικουιτίνωση τόσο του υποδοχέα όσο και του ίδιου(379, 380).

Ο Smad7 βρίσκεται σε αυξημένα επίπεδα στον πυρήνα, όπου εντοπίζεται κατά προτίμηση. Εκεί συνδέεται με τον Smurf2 και εξέρχεται ως σύμπλοκο από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα όπου στρατολογεί τους υποδοχείς τύπου I στα caveasomes. Στην συνέχεια ο Smurf2 ουβικουιτίνώνει τον υποδοχέα τύπου I και τον Smad7 οδηγώντας τους στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση. Η ίδια αλληλεπίδραση συμβαίνει με τον Smad6 και τον Smurf1. Ο TSC-22 (TGF- $\beta$ -Stimulated Clone 22), ένας μεταγραφικός παράγοντας, διαταράσσει τη σύνδεση Smad7/Smurf2 με τον BMPRI οδηγώντας σε θετική ανατροφοδότηση της BMP σηματοδότησης, μειώνοντας την ουβικουιτίνωση των υποδοχέων(377).

Η πρωτεΐνη προσαρμογής PICK1 (Protein that Interacts with C Kinase 1), η οποία περιέχει μια περιοχή PDZ και μία περιοχή BAR (Bin/Amphiphysin/Rvs), αλληλεπιδρά άμεσα με το COOH-τελικό άκρο των BMPRII μέσω της περιοχής PDZ και προωθεί την αλληλεπίδραση BMPRII κι caveolin-1. Η Dapper2 εμφανίζεται στα όψιμα ενδοσώματα και επιταχύνει τη μεταφορά των ενδοκυτωμένων υποδοχέων από τα όψιμα ενδοσώματα στα λυσοσώματα και την επακόλουθη αποικοδόμηση των υποδοχέων τύπου II(381) (Εικ. 27).

Η μέχρι τώρα έρευνα υποδεικνύει πως με την ανακύκλωση υποδοχέων μέσω κλαθρίνης ενισχύεται η σηματοδότηση μέσω Smad ενώ μέσω καβεολίνης η εναλλακτική σηματοδότηση των BMPs.



Εικόνα 27 | Ανακύκλωση των υποδοχέων. [Πηγή: Ζίφα Διακυτταρική Επικοινωνία-Μεταγωγή Σήματος, 4<sup>η</sup> έκδοση, Βολος, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, 2019: 780]

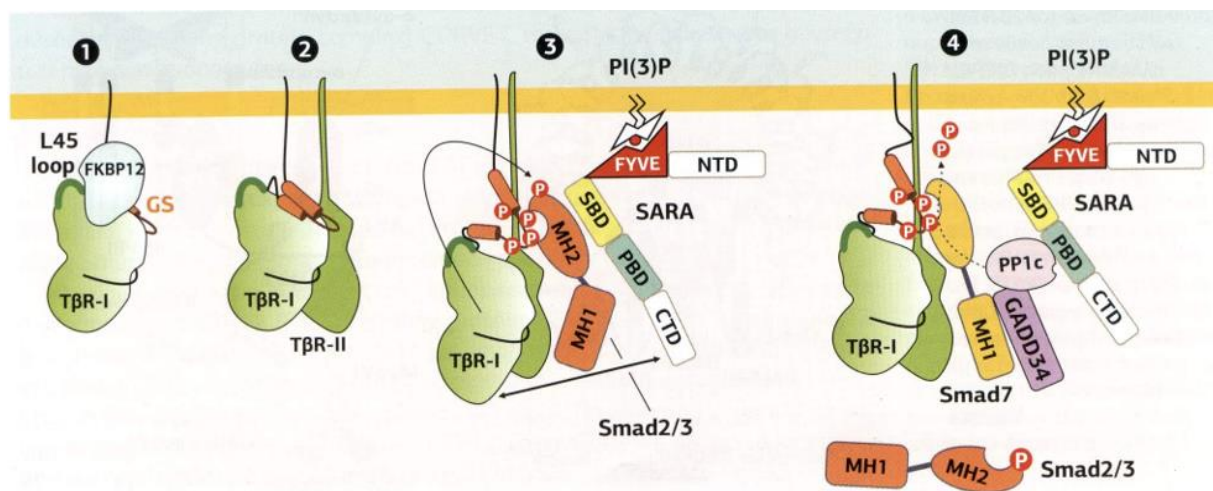
## 4.6 Αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες και περαιτέρω ρύθμιση

### 4.6.1 Η πρωτεΐνη SARA

Η πρωτεΐνη SARA συγκρατεί τους Smad1/5/8 στην πλασματική μεμβράνη διευκολύνοντας την αλληλεπίδραση με τον ενεργοποιημένο BMPRI. Όταν οι Smad1/5/8 φωσφορυλιωθούν στο μοτίβο Ser-x-Ser διαχωρίζονται από τη SARA και δημιουργούν σύμπλοκο με τον Smad4. Η SARA έχει μία περιοχή FYVE (Fab1p, YOTB, Vac1p και EEA1) η οποία συνδέεται με τα φωσφολιπίδια PI(3)P (Phosphatidylinositol 3-Phosphate) της μεμβράνης, μία περιοχή SBD, η οποία συνδέεται με την περιοχή MH2 της περιοχής των Smad1/5/8 και μία COOH-τελική περιοχή, η οποία



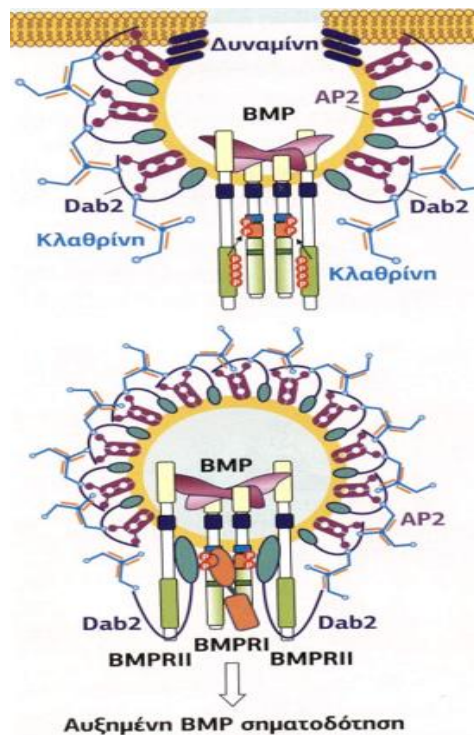
συνδέεται με το σύμπλοκο BMPRs. Η SARA βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη, απαντάται κυρίως όμως στη μεμβράνη των πρώιμων ενδοσωμάτων, συνδεόμενη μέσω της περιοχής FYVE με τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης των ενδοσωμάτων. Η SARA ωστόσο ασκεί και αρνητικό έλεγχο στην BMP σηματοδότηση καθώς συνδέεται με την πρωτεϊνική φωσφατάση 1 (PP1 — Protein Phosphatase 1) στο COOH-τελικό άκρο μεσολαβώντας την αποφωσφορυλίωση των BMPRs. Ο Smad7 εμπλέκεται στην αποφωσφορυλίωση καθώς συνδεόμενος με την πρωτεΐνη GADD34 (Growth Arrest and DNA Damage Protein 34), η οποία αποτελεί ρυθμιστική υπομονάδα της PP1, στρατολογεί την καταλυτική υπομονάδα PP1c. Η SARA δρα ως πρωτεΐνη σκαλωσιάς για τη σύνδεση της PP1c στο σύμπλοκο Smad7/GADD34(382, 383) (Εικ. 28).



**Εικόνα 28 | Ο ρόλος της SARA στην εσωτερίκευση των BMPRs και στη σηματοδότηση μέσω ενδοσωμάτων.** [Πηγή: Ζίφα Διακυτταρική Επικοινωνία-Μεταγωγή Σήματος, 4<sup>η</sup> έκδοση, Βολος, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, 2019: 781]

#### 4.6.2 Η πρωτεΐνη Dab2

Η Dab2 (Disable-2) ανακαλύφθηκε ως γονίδιο που εκφράζεται σε καρκινικούς όγκους ωθηκών (DOC — Differentially expressed gene in human Ovarian Carcinoma). Στο NH<sub>2</sub>-τελικό άκρο περιέχει μια περιοχή PTB και στο COOH-τελικό άκρο μια περιοχή πλούσια σε προλίνη. Συσσωρεύεται στα κυστίδια καλυμμένα με κλαθρίνη και AP2 και αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο των υποδοχέων BMPRs, απουσία και παρουσία των BMPs. Έχει αποδειχθεί ότι διευκολύνει τη σηματοδότηση των BMPs δρώντας ως γέφυρα ανάμεσα στον BMPRI και BMPRII και βοηθώντας στην αλληλεπίδραση των R-Smads με τον BMPRI. Η απουσία της έχει δραματική επίπτωση στην ανακύκλωση και τον εντοπισμό των BMPRs στα ενδοσώματα, καθώς διακόπτει την ανακύκλωση και παρατείνει την παραμονή των BMPRII στα όψιμα ενδοσώματα(384, 385).



*Εικόνα 29* | Ο ρόλος της **Dab2** στην εσωτερίκευση των **BMPRs** και στη σηματοδότηση μέσω ενδοσωμάτων. [Πηγή: Ζίφα Διακυτταρική Επικοινωνία-Μεταγωγή Σήματος, 4<sup>η</sup> έκδοση, Βολος, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, 2019: 782]

#### 4.6.3 Οι πρωτεΐνες **Ski** και **SnoN**

Η **Ski** είχε αναγνωριστεί ως ογκογονίδιο του Sloan-Kettering ρετροϊού των πτηνών. Η **v-Ski** (**v**iral-**Ski**) έχει βραχύτερα NH<sub>2</sub>-τελικό και COOH-τελικό άκρο από την **c-Ski** (**c**ellular-**Ski**) και επάγει τον μετασχηματισμό των ινοβλαστών. Η **SnoN** (**S**ki **n**ovel protein) ομοιάζει δομικά με την **Ski** και στρατολογεί **HDACs** (**H**istone **D**eacetylases). Με αυτόν τον τρόπο αποακετυλιώνει τις ιστόνες επάγοντας καταστολή της μεταγραφικής έκφρασης των γονιδίων-στόχων. Τόσο η **c-Ski** όσο και η **SnoN** αλληλεπιδρούν με τους **Smads2/3** με το NH<sub>2</sub>-τελικό και με τον βρόχο I της μεσαίας περιοχής τους με τον **Smad4** αναστέλλοντας την σηματοδότηση τόσο του **TGF-β** όσο και των **BMPs** (386, 387, 388, 389).

#### 4.6.4 Η κινάση **CDK6** και οι πρωτεΐνες **CIZ**, **SANE**, **U-CHIP** και **Tob**

Η **CDK6** αναστέλλει την διαφοροποίηση των οστεοβλαστών, χωρίς να επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό, ενώ ο **BMP-2** ασκεί αρνητική ρύθμιση στα επίπεδα της **CDK6** (390). Η **CIZ** (**C**as-**i**nteracting **Z**inc finger protein) ανταγωνίζεται την σηματοδότηση των **Smad1/5** αναστέλλοντας την έκφραση της **αλκαλικής φωσφατάσης**, της **οστεοκαλσίνης**, του **Runx2** και του **κολλαγόνου τύπου I** (391). Η πρωτεΐνη **SANE** (**S**mad1 **a**ntagonistic **e**ffector) έχει ομοιότητα με την

πρωτεΐνη του πυρηνικού φακέλου MAN1. Συνδέεται με το σύμπλοκο Smad1/5 και BMPRI αναστέλλοντας τη φωσφορυλίωση του Smad1 και διακόπτοντας τη BMP σηματοδότηση. Η Ubiquitin dependent E3 λιγάση CHIP (Carboxy-terminus of Hsp70-interacting Protein) επάγει πρωτεασωματική αποικοδόμηση των Smad1 και Smad4 μέσω ουβικουιτίνωσης(392).

Επίσης, ο μεταγραφικός καταστολέας Tob (Transducer of ErbB2) αναστέλλει την BMP σηματοδότηση στους οστεοβλάστες μέσω αλληλεπίδρασης με τους Smad1/5/8. Επίσης σχηματίζει σύμπλοκα με τους I-Smads αναστέλλοντας την περαιτέρω μεταγωγή σήματος αφού αλληλεπιδράσουν με τους υποδοχείς τύπου I(393).

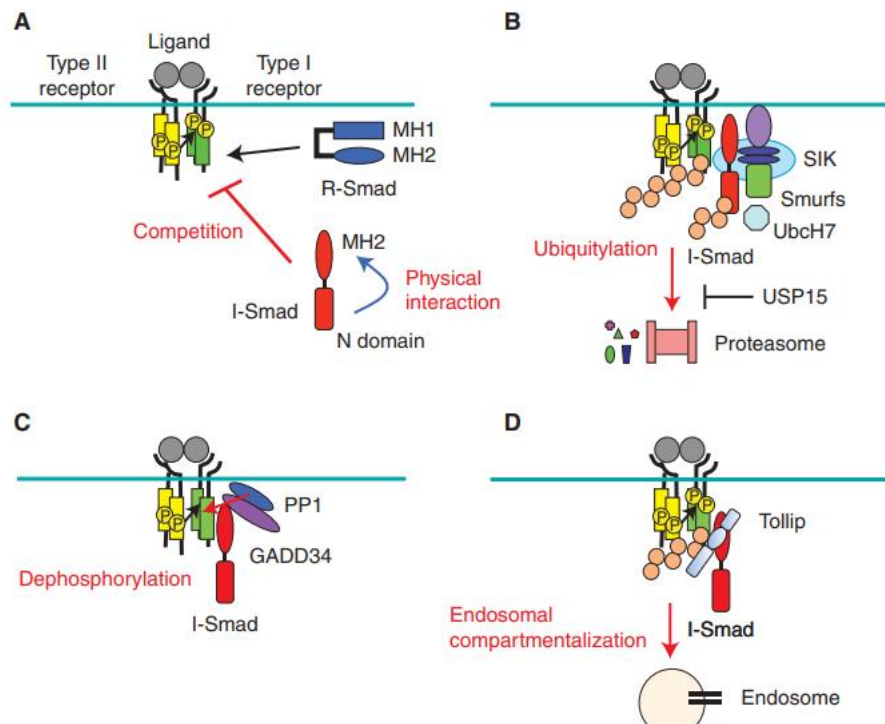
#### 4.6.5 I-Smads

Η δραστηριότητα του Smad6 φαίνεται να αυξάνεται όταν αυτός αλληλεπιδρά με τον Smurf1 καθώς η αυξημένη συνέκφρασή τους σε χονδροκύτταρα οδηγεί σε καθυστερημένη οστεοποίηση. Ο Smurf1 αλληλεπιδρά μάλιστα με το μεταγραφικό παράγοντα Runx2 οδηγώντας τον σε αποικοδόμηση με επακόλουθη ελάττωση της παραγωγής αλκαλικής φωσφατάσης και οστεοκαλσίνης στους οστεοβλάστες(394). Η πρωτεΐνη SIK (Salt-Inducible Kinase) αλληλεπιδρά με το σύμπλεγμα Smad7/Smurf2 διακόπτοντας την σηματοδότηση των BMPs(395), ενώ η USP15 (Ubiquitin Specific Peptidase 15) αντιρροπεί την αποικοδόμηση των υποδοχέων τύπου I από το ίδιο σύμπλεγμα(396). Ο Smad6 επίσης αλληλεπιδρά με τον ενεργοποιημένο Smad1 εμποδίζοντας τη δημιουργία συμπλόκου με τον Smad4 και καταστέλλοντας την μεταγραφή του *Id1*(342). Συνδέεται όμως και με τον μεταγραφικό αναστολέα CtBP (C-terminal Binding Protein) μέσω του μοτίβου PLDLS της περιοχής linker, αναστέλλοντας τη μεταγραφή μέσω αποακετυλίωσης των ιστονών(397).

Επίσης συνδέεται με τους Hoxc8/9, σε απόκριση στις BMPs προκαλώντας καταστολή της έκφρασης της οστεοποντίνης(398). Η HDAC και η SIRT1 (Sirtuin 1) αποακετυλιώνουν τον Smad7 και επάγουν την ουβικουιτίνωση του, ενώ η ακετυλίωση από την p300 στις Lys64 και Lys70 αποτρέπει την αποικοδόμηση του(399). Η Arkadia, μία E3 ubiquitin ligase τύπου δακτυλίου, ουβικουιτίνώνει τους Smad6 και Smad7 όχι όμως τους υποδοχείς τύπου I ενισχύοντας την TGF-β σηματοδότηση, ενώ ασκεί ανασταλτικό έλεγχο στην έκφραση των c-Ski και SnoN(400, 401).

Ο Smad6 υφίσταται επιπρόσθετα μεθυλίωση στην Arg38 από την πρωτεΐνη PRMT1 (Protein Arginine N-Methyltransferase 1)(402). Η PRMT1 συνδέεται με τους υποδοχείς τύπου II στην ηρεμία, ωστόσο η σύνδεση των BMPs στους υποδοχείς τύπου I οδηγεί σε μεθυλίωση του Smad6 και απομάκρυνση του από τον υποδοχέα τύπου I επιτρέποντας την μεταγωγή σήματος καθοδικά(403). Τέλος η κυτταροπλασματική πρωτεΐνη AMSH (Associated Molecule with the

SH3-domain of STAM) συνδέεται άμεσα με τον Smad6 και αποτρέπει την σύνδεσή του με τον BMPRI και τον Smad1 μετά τη σύνδεση του προσδέτη(404).



**Εικόνα 30 | Ρύθμιση των BMPs μέσω των I-Smads.** A. Αναστολή των BMPs μέσω αλληλεπίδρασης των R-Smads με τους I-Smads. Η NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή του Smad7 συνδέεται με την περιοχή MH2 του R-Smad. B. Οι Smurfs και άλλες E3 λιγάσες ουβικουιτίνης επάγουν την αποικοδόμηση των υποδοχέων μέσω συνέργειας με τους I-Smads. C. Το σύμπλοκο GADD34–PP1c επάγει την αποφωσφορυλίωση των ενεργοποιημένων υποδοχέων τύπου I αλληλεπιδρώντας με τους I-Smads. D. Η πρωτεΐνη Tollip διαμεσολαβεί την απομάκρυνση και λυσοσωμιακή αποικοδόμηση των υποδοχέων μέσω δημιουργίας ενδοσωμάτων. [Πηγή: (315)]

#### 4.7 Μη-Smad σηματοδοτικά μονοπάτια των BMPs

Τα μη -Smads σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούν οι BMPs είναι:

- 1) Το μονοπάτι των MAP (Mitogen Activated Protein) κινασών μέσω της GTPάσης Ras (Rat Sarcoma), η οποία ενεργοποιεί το μονοπάτι των ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinases 1/2) και μέσω της TAK1 (Transforming growth factor beta-activated kinase 1) (MAPKK/MEK1) τα μονοπάτια JNK (c-Jun N-terminal kinases) και p38 MAPK.
- 2) Το μονοπάτι της κινάσης ROCK (Rho-associated protein kinase): μέσω της GTPάσης Rho ενεργοποιείται η ROCK, η οποία φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την κινάση LIMK2 (LIM Domain Kinase 2). Η LIMK2 αναστέλλει τη δράση της κοφιλίνης, μία πρωτεΐνης που δεσμεύεται στην ακτίνη οδηγώντας στον αποπολυμερισμό της. Συνεπώς οι BMPs ευνοούν τον πολυμερισμό της ακτίνης του κυτταροσκελετού.
- 3) Το μονοπάτι της κινάσης PI3K (Phosphoinositide 3-kinases) και μέσω της παραγωγής PIP<sub>3</sub> το μονοπάτι της κινάσης Akt (Protein kinase B).

#### 4.7.1 Ενεργοποίηση ERK1/2

Η ενεργοποίηση της Ras με γρήγορη ανταλλαγή του GDP με GTP στη Ras κινάση σε απόκριση στις BMPs οδηγεί στη στρατολόγηση και ενεργοποίηση της μεμβρανικής κινάσης Raf (proto-oncogene serine/threonine-protein kinase) και στη συνέχεια των κινασών MEK1 και ERK1/2. Η κινητική της φωσφορυλίωσης ποικίλλει ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, όπου σε ορισμένους υπάρχει καθυστερημένη απόκριση υποδεικνύοντας πρωτεϊνική έκφραση ενώ σε άλλους άμεση (εντός 5-10 λεπτών), ανάλογη της απόκρισης σε αυξητικούς παράγοντες. Η σύνδεση των αυξητικών παραγόντων στους υποδοχείς RTK έχει ως αποτέλεσμα τον διμερισμό τους και την ενεργοποίηση μέσω αυτο- και trans- φωσφορυλίωσης καταλοίπων Tyr στην ενδοκυττάρια περιοχή των RTKs. Αυτές αποτελούν περιοχές σύνδεσης πρωτεϊνών σκαλωσιάς όπως οι Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2)/SOS (Son of Sevenless) και Src. Η σύνδεση του συμπλέγματος Grb2/SOS στον υποδοχέα RTK μεταφέρει τον SOS στην πλασματική μεμβράνη, όπου ενεργοποιεί τη Ras ανταλλάσσοντας το GDP με GTP. Η Ras-GTP συνδέει τη Raf και ενεργοποιεί έναν καταρράκτη MAPKs, που περιλαμβάνει τις MEK1 και ERK1/2. Στο μονοπάτι συμμετέχει και μία άλλη πρωτεΐνη προσαρμογής, η Shc (Src Homology 2 Domain-Containing), η οποία συνδέεται με το σύμπλοκο Grb2/SOS. Ο υποδοχέας τύπου II δυνατόν να υφίσταται αυτοφωσφορυλίωση σε τρία κατάλοιπα τυροσίνης (Tyr259, Tyr336 και την Tyr424), ενώ η κινάση Src είναι δυνατόν να φωσφορυλιώσει τον υποδοχέα τύπου II στην Tyr234, η οποία μπορεί να αποτελέσει θέση σύνδεσης για το σύμπλοκο Shc/Grb2-SOS. Η στρατολόγηση του συμπλόκου Shc/Grb2-SOS μπορεί να γίνει και από τον υποδοχέα τύπου I μέσω αυτο- ή trans-φωσφορυλίωσης(405, 406, 407, 408).

Το μονοπάτι των ERK1/2 εμπλέκεται στην μετάπτωση των επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά (EMT — Epithelial to Mesenchymal Transition). Τα επιθηλιακά κύτταρα συνδέονται με τα γειτονικά τους μέσω μορίων προσκόλλησης, εκ των οποίων το σημαντικότερο αποτελεί η E-καδερίνη, ενώ η επικοινωνία επιτυγχάνεται μέσω χασματοσυνδέσεων (gap junctions). Τα μεσεγχυματικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από κυτταρικές προσεκβολές (αποφυάδες) οι οποίες διαπερνούν τη θεμέλια ουσία, παράγουν ένζυμα που προκαλούν διάσπαση των πρωτεϊνών της θεμέλιας ουσίας και εμφανίζουν χαλαρή οργάνωση. Η μετάβαση αυτή χαρακτηρίζεται από αλλαγές στον κυτταροσκελετό και στον φαινότυπο των επιθηλιακών κυττάρων τα οποία εμφανίζουν αυξημένη διεισδυτικότητα και μετανάστευση.

Οι μεταγραφικοί παράγοντες που εμπλέκονται είναι οι Snail οι οποίοι καταστέλλουν την έκφραση της E-καδερίνης και ενεργοποιούν τη μεταγραφή των γονιδίων των μεταλλοπρωτεασών και της βιμεντίνης. Οι ERK1 φωσφορυλιώνουν τους Smad1/2/3 αναστέλλοντας τη δράση τους(408, 409).

#### 4.7.2 Ενεργοποίηση της JNK και του p38

Είναι το καλύτερο χαρακτηρισμένο μη-Smad μονοπάτι. Σε αυτό εμπλέκεται η TAK1 ή MAP3K. Αυτή συνδέεται μέσω ενός παράγοντα, ονόματι TRAF6 (TNF Receptor-Associated Factor 6) στον BMPRI. Ο TRAF6 συνδέεται με τους ενεργοποιημένους υποδοχείς τύπου I μέσω της περιοχής TRAF γεγονός που οδηγεί στην ενεργοποίηση της ενσωματωμένης στον TRAF6 E3 λιγάσης η οποία οδηγεί στην Lys63-πολυουβικουιτίνωση. Η τελευταία καθιστά τον TRAF6 ικανό να δράσει ως σκαλωσιά και να στρατολογήσει πρωτεϊνικά σύμπλοκα μεσολαβώντας την ενεργοποίησή τους. Η σύνδεση της TAK1 με τον TRAF6 οδηγεί στην Lys63-πολυουβικουιτίνωση της στη Lys158 και τη Lys209. Η πολυουβικουιτινωμένη TAK1 συνδέεται με τις ειδικές πρωτεΐνες TABs (TAK1-Binding Proteins 1, 2 και 3). Οι πρωτεΐνες TAB δεν αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς τύπου I αλλά είναι απαραίτητες για την ενεργοποίηση της TAK1. Μετά τη δημιουργία του συμπλόκου TAK1-TAB1-TAB2 ή TAK1-TAB1-TAB3 η TAK1 αυτοφωσφορυλιώνεται στις Thr178, Thr184, Thr187 και Ser192 του βρόχου ενεργοποίησης. Οι TABs ρυθμίζονται και αυτές μέσω φωσφορυλίωσης στις Ser423, Thr431, Ser438, Ser452, Ser453, Ser456 και Ser457, χωρίς ωστόσο να είναι ξεκάθαρος ο ρόλος τους στην ενεργοποίηση της TAK1. Ωστόσο, έχει δειχθεί ότι η κινάση p38, μέσω αρνητικής ανατροφοδότησης, απενεργοποιεί την TAK1 φωσφορυλιώνοντας τις Ser423 και Thr431 της TAB1. Η TAB1 Lys63-πολυουβικουιτινώνεται από την κινάση MEKK1 (MEK Kinase 1), η οποία έχει και δραστηριότητα E3 λιγάσης της ουβικουιτίνης, που μεσολαβείται από την περιοχή PHD (Plant Homodomain) της. Οι BMPs επάγουν την MEKK1 PHD-μεσολαβούμενη πολυουβικουιτίνωση της TAB1 σε 4 κατάλοιπα, Lys294, Lys319, Lys335 και Lys350(410).

Η TAB1 βρέθηκε να αλληλεπιδρά και με την E3 λιγάση της ουβικουιτίνης XIAP (X-linked Inhibitor of Appoptosis), η οποία έχει την ικανότητα να συνδέει την TAK1 με υποδοχείς των TGF-β/BMPs μέσω της ικανότητάς της να αλληλεπιδρά με τους BMPRs και με την TAB1. Η TAK1 ενεργοποιεί το μονοπάτι IKK (IκB kinase)/NF-κB και τα μονοπάτια των MAPKs MKK4 – JNK1 και MKK3/6 – p38, ενώ ρυθμίζει αρνητικά τη λειτουργία των Smads, αλληλεπιδρώντας με την περιοχή MH2 των Smads και παρεμβαίνοντας δραματικά στην ενεργοποίηση των R-Smad και στην υποκυτταρική κατανομή τους. Αυξάνουν επίσης τα επίπεδα του Smad7 αναστέλλοντας περαιτέρω δράση των R-Smads. Η TAK1 συμμετέχει στην σηματοδότηση προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως η IL-1, ο TNF-α, οι προσδέτες των υποδοχέων TLR (Toll-like Receptors) και τα αντιγόνα των TcRs (T-cell Receptors) και BcRs (B-cell Receptors). Το μονοπάτι MKK3/6 – p38 MAPK ενεργοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα ATF2 και επάγει την έκφραση του κολλαγόνου τύπου I και IV, που συμμετέχει στην EMT. Το μονοπάτι MKK4 – JNK1 ενεργοποιεί

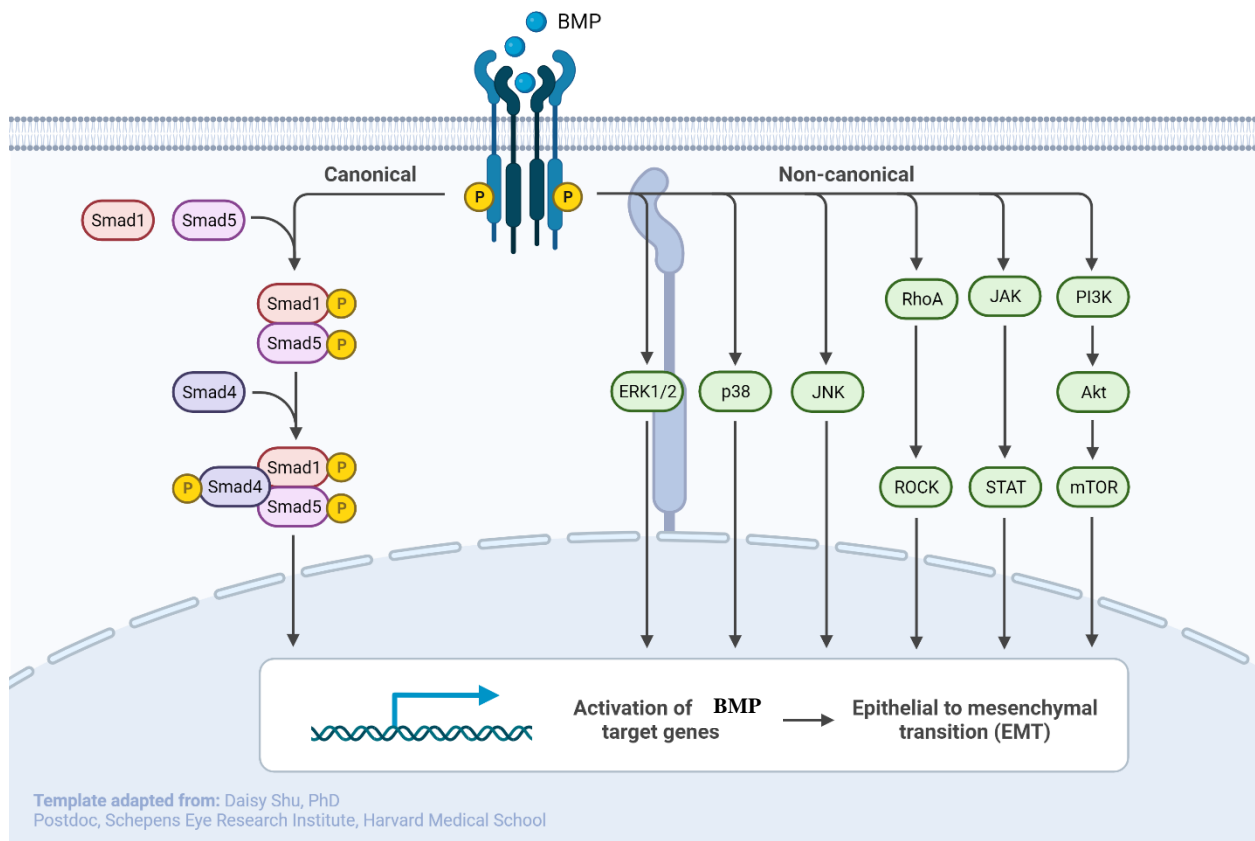
το μεταγραφικό παράγοντα AP-1 που επάγει την έκφραση της ινωδονεκτίνης και προκαλεί ίνωση. Η TAK1 επίσης μεσολαβεί την επαγωγή του μεσοδέρματος από τις BMPs(354, 407, 410, 411).

#### **4.7.3 Μονοπάτι της κινάσης ROCK**

Οι BMPs ανάλογα με τη θέση των BMPRs ενεργοποιούν ή αναστέλλουν τις GTPάσες της οικογένειας Rho ανεξάρτητα από τους Smads. Με έναν μηχανισμό, όχι πλήρως κατανοητό, οι BMPs ενεργοποιούν την RhoA, η οποία ενεργοποιεί το μονοπάτι της κινάσης ROCK. Η ROCK φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την κινάση LIMK2, η οποία φωσφορυλιώνει και αναστέλλει την κοφιλίνη, μια πρωτεΐνη που δεσμεύεται στην ακτίνη και οδηγεί στον αποπολυμερισμό της. Η αναστολή της κοφιλίνης ευνοεί τον πολυμερισμό της ακτίνης. Στη σηματοδότηση εμπλέκεται ο παράγων Smurf1, ο οποίος ουβικουιτινώνει την RhoA, στοχεύοντας την αποικοδόμησή της. Μέσω της ρύθμισης της αποικοδόμησης RhoA οι BMPs προάγουν την καταστροφή των στεγανών συνδέσμων και προκαλούν αναδιάταξη του κυτταροσκελετού της ακτίνης στα φιλοπόδια προωθώντας τη μετανάστευση(412, 413, 414).

#### **4.7.4 Μονοπάτι της κινάσης PI3K**

Το μονοπάτι PI3K/Akt εμπλέκεται στην EMT, στην αναδιοργάνωση του σκελετού της ακτίνης, διευκολύνοντας την κυτταρική μετανάστευση και την αναστολή της επαγόμενης απόπτωσης από τις BMPs(413).



Εικόνα 31 | Επαγωγή μη-κανονικών μονοπατιών από τις BMPs.

## 5. ΟΣΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΣΤΟ ΜΜ

### 5.1 Οστική αναδόμηση, απορρόφηση και σχηματισμός

Η οστική αναδόμηση είναι μία διαδικασία που συμβαίνει καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής και συνίσταται στη λεπτή ισορροπία μεταξύ της οστικής απορρόφησης και του οστικού σχηματισμού. Σε αυτή τη διαδικασία συμμετέχουν κυτταροκίνες και αυξητικοί παράγοντες, μεταξύ των οποίων οι BMPs και οι παράγοντες Smads. Αυτοί επηρεάζουν τους οστεοβλάστες και τους οστεοκλάστες, τους δύο κύριους κυτταρικούς τελεστές στην δυναμική αυτή διαδικασία. Η έκκριση BMPs καθώς και άλλων αυξητικών παραγόντων όπως ο TGF- $\beta$  και ο IGF (Insulin Growth Factor) από την διασπώμενη θεμέλια ουσία και τα κύτταρα με οστεοκλαστικό χαρακτήρα ενεργοποιεί την οστεογένεση από τα αρχέγονα μεσεγχευματικά κύτταρα των οστεοβλαστών. Εν συνεχεία τα διαφοροποιημένα χονδροκύτταρα και οι ενεργοί οστεοβλάστες παράγουν οργανική θεμέλια ουσία, στην οποία ενσωματώνονται ανόργανα άλατα(415).

#### 5.1.1 Οστεοβλάστες, οστεοκύτταρα και οστεοκλάστες

Οι οστεοβλάστες προέρχονται από τα αρχέγονα μεσεγχευματικά κύτταρα. Είναι υπεύθυνοι για την δημιουργία νέου οστού μετά την οστική απορρόφηση η οποία μεσολαβείται από τους



οστεοκλάστες. Οι παράγοντες Runx2 και τα μονοπάτια των Wnt (Wingless related integration site)/β-catenin και DKK-1 (Dickkopf1) συμβάλλουν στη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών. Τέλος οι ώριμοι οστεοβλάστες που έχουν ενσωματωθεί στην επιμεταλλωμένη θεμέλιο ουσία υφίστανται απόπτωση και μετατρέπονται σε αδρανή οστεοκύτταρα(416, 417, 418).

Τα οστεοκύτταρα αποτελούν το 95% όλων των κυττάρων του οστού και βρίσκονται ενσωματωμένα σε ένα βοθριωτό, δίκην καναλιών δίκτυο, ωστόσο επικοινωνούν με τα κύτταρα της οστικής επιφάνειας μέσω κυτταροπλασματικών αποφυάδων. Τα οστεοκύτταρα εκφράζουν παρακρινείς παράγοντες όπως ο RANKL, η sclerostin και η OPG (Osteoprotegerin) που ρυθμίζουν τους οστεοβλάστες και τους οστεοκλάστες(419).

Οι οστεοκλάστες είναι πολυπύρηννα κύτταρα που έχουν προέλθει από την σύντηξη μονοπύρηννων/μακροφάγων και ο κύριος ρόλος τους είναι η αποδόμηση της θεμέλιας ουσίας μέσω έκκρισης υδροχλωρικού οξέος. Ο παράγοντας M-CSF (Monocyte/macrophage Colony Stimulating Factor) οδηγεί την οστεοκλαστογένεση ενώ ο RANKL εμπλέκεται στην διαφοροποίηση και την ενεργοποίηση του ώριμου οστεοκλάστη(420). Έχουν την ικανότητα σχηματισμού κυτταρικών προσεκβολών που συνδέονται στεγανά με την επιφάνεια του οστού και επιτρέπουν έτσι την ακριβή αποδόμηση του οστού. Ο μεταγραφικός παράγοντας Nfatc1 (Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1), ο οποίος βρίσκεται καθοδικά στο μονοπάτι των BMPs/TGF-β ρυθμίζει γονίδια υπεύθυνα για την οστεοκλαστογένεση όπως το *AP-1*, *PU.1* (*S*pi-1 *P*roto-*O*ncogene) και *MITF* (*M*icrophthalmia-associated *T*ranscription *F*actor). Το *PU.1* σχετίζεται με την ανάπτυξη των οστεοκλαστών, των μυελοειδών κυττάρων και των B-κυττάρων.

Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB φωσφορυλιώνεται από την κινάση TRAF6, συνδέεται με το σύμπλοκο TAK1-TAB1 και οδηγείται στον πυρήνα για να επάγει την έκφραση γονιδίων-στόχων. Η πρωτεΐνη-σκαλωσιά XIAP η οποία συμμετέχει στο μονοπάτι του TRAF6 αλληλεπιδρά όπως αναφέρθηκε ήδη και με τους BMPRs συνδέοντας τις BMPs με τα ενδοκυττάρια μονοπάτια της οστεοκλαστογένεσης(421, 422, 423, 424). Οι παράγοντες Wnt σχετίζονται με την οστεοκλαστογένεση αν και ο ρόλος τους δεν είναι ξεκάθαρος ακόμη καθώς η διπλή σηματοδότηση μέσω κανονικών και μη-κανονικών μονοπατιών και η επικοινωνία με άλλα μονοπάτια όπως του TGF-β/BMP επιδρά στο βιολογικό αποτέλεσμα. Από μελέτες ωστόσο έχει δειχθεί και ο αναβολικός ρόλος των οστεοκλαστών καθώς η συγκαλλιέργεια με οστεοβλάστες οδήγησε στην έκφραση mRNA γονιδίων που συνδέονται με οστεογένεση [*Alph* (*A*lkaline *P*hosphatase), *Runx2*, *Col1*(*C*ollagen type I alpha *1*)], δεικνύοντας τη στενή επαφή και επικοινωνία μεταξύ αυτών των δύο κυτταρικών πληθυσμών(425).

## 5.1.2 Ο ρόλος των BMUs και των MM κυττάρων στον (απο)συντονισμό του οστικού μεταβολισμού

Οι αναβολικές και καταβολικές διαδικασίες διασυνδέονται μέσω των βασικών πολυκύτταρων μονάδων (BMU – Basic Multicellular Units) που ομοιάζουν με το ανατομικό μικροπεριβάλλον όπου συμβαίνει η οστική αναδόμηση. Αποτελούνται από οστεοκύτταρα, οστεοβλάστες, οστεοκλάστες καθώς και αγγεία και στρωματικά κύτταρα(426). Οι λειτουργικές και αρχιτεκτονικές αυτές μονάδες κινούνται στον τρισδιάστατο χώρο, δίχως να έρχονται σε άμεση με το MO, καθώς καλύπτονται από έναν «θόλο» κυττάρων με ιδιότητες οστεοβλαστών, που εφάπτεται με τα τριχοειδή αποτελώντας το οστικό διαμέρισμα αναδιαμόρφωσης (BRC – Bone Remodeling Compartment). Αυτό το διαμέρισμα είναι ιδιαίτερα σημαντικής αξίας καθώς διαμεσολαβεί στην έκκριση μορίων όπως η βιταμίνη D, τα οιστρογόνα, οι θυρεοειδικές και παραθυρεοειδικές ορμόνες και οι BMPs(427). Διαταραχή του «θόλου» οδηγεί σε διατάραξη του οστικού μεταβολισμού και της λειτουργίας των οστεοκλαστών και των οστεοβλαστών(428).

Ένα επιπλέον στοιχείο της οστικής αναδόμησης αποτελεί η νεοαγγειογένεση καθώς αποτελεί μέσο παροχής οστεογενετικών πρόδρομων ουσιών, κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων. Τα κύτταρα των BMUs παράγουν μόρια όπως ο VEGF και ο EGF δεικνύοντας την αμφίδρομη επικοινωνία μεταξύ των αγγείων και των ιστών(429, 430, 431, 432). Τέλος τα κύτταρα του ανοσιακού συστήματος εμπλέκονται και τροποποιούν την αντίδραση των BMUs όπως έχουν αναλυθεί στο υποκεφάλαιο της ανοσοτροποποίησης του μικροπεριβάλλοντος (υποενότητα 1.3.5) (433).

Στο MM η ισορροπία μεταξύ των οστεοβλαστών-οστεοκλαστών-οστεοκυττάρων διαταράσσεται σε μοριακό επίπεδο, επιδρώντας στον οστικό μεταβολισμό και προκαλώντας υπερασβεστιαμία, οστικά άλγη και παθολογικά κατάγματα. Η διάσπαση του BRC οδηγεί στην εισβολή των MM κυττάρων, τα οποία διαταράσσουν την μικροαρχιτεκτονική και εκκρίνουν μόρια όπως ο DCR3 (Decoy Receptor 3), ο οποίος ανήκει στην οικογένεια TNF και επάγει την διαφοροποίηση και την ενεργοποίηση των οστεοκλαστών.

## 5.2 Μοριακά μονοπάτια της αυξημένης οστεοκλαστικής δραστηριότητας

### 5.2.1 RANK/RANKL/OPG

Ο RANK (Receptor Activator of NF-κB) είναι διαμεμβρανικός υποδοχέας ο οποίος ανήκει στην οικογένεια του TNF και εκφράζεται στην επιφάνεια των πρόδρομων μορφών οστεοκλαστών. Ο RANKL είναι μία κυτταροκίνη, η οποία εκφράζεται στην πλασματική μεμβράνη των BMSCs (Bone Marrow Stem Cells) και των ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων. Αποκόβεται από τη μεταλλοπρωτεάση disintegrin TNFα-κονβερτάση στη διαλυτή του μορφή(434). Η σύνδεση του

RANK με τον RANKL οδηγεί στην σύντηξη των πρόδρομων οστεοκλαστών μέσω της έκφρασης του DC-STAMP (Dendrocyte Expressed Seven Transmembrane Protein). Η έκφραση του ρυθμίζεται από τους μεταγραφικούς παράγοντες Nfatc1 και NF-κB(435, 436).

Η OPG είναι μέλος της οικογένειας του TNF και παράγεται από τα BMSCs και τους οστεοβλάστες. Δρα ως ψευδοϋποδοχέας του RANKL και αναστέλλει την οστεοκλαστογένεση. Τα επίπεδα του μειώνονται από τη δράση ερεθισμάτων που ευνοούν την οστική απορρόφηση όπως η βιταμίνη D, η παραθορμόνη, τα κορτικοστεροειδή και οι κυτταροκίνες (IL-1, IL-7, TNFα)(434, 437).

Στο MM τα MM κύτταρα αλληλεπιδρούν με το μικροπεριβάλλον ενεργοποιώντας σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία οδηγούν σε αυξημένη RANKL και ελαττωμένη OPG. Τα MM κύτταρα επίσης παράγουν RANKL και PTHrP (Parathormone-related Peptide) ενεργοποιώντας τους οστεοβλάστες και τα BMSCs με παρακρινή τρόπο(438). Τα MM κύτταρα επίσης παράγουν συνδεκάνη-1, μία πρωτεογλυκάνη θειικής ηπαράνης η οποία δεσμεύει την OPG. Τα MM κύτταρα στην συνέχεια ενδοκυτώνουν το σύμπλεγμα συνδεκάνη-1/OPG και το οδηγούν για πρωτεόλυση(439). Τα επίπεδα της OPG είναι μειωμένα σε ασθενείς MM με οστεολυτική νόσο, ενώ ο λόγος RANKL/OPG σχετίζεται με την πρόγνωση της οστεολυτικής νόσου(440).

### 5.2.2 Μονοπάτι των Notch

Το μονοπάτι των Notch περιλαμβάνει τέσσερις διαμεμβρανικούς υποδοχείς (Notch 1-4). Η σύνδεσή τους με τους προσδέτες Jagged-1,2 και Delta-like 1,3,4 που εκφράζονται από τα γειτονικά κύτταρα επάγει δύο πρωτεολυτικές διασπάσεις από την ADAM/TACE (A disintegrin and metalloprotease /Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme) και τη γ-σεκρετάση. Το ενδοκυττάριο τμήμα του Notch μεταναστεύει στον πυρήνα επάγοντας μεταγραφικές και επιγενετικές τροποποιήσεις οδηγώντας στην έκφραση του *c-myc* και του *HES-1*(440).

Τα MM κύτταρα εκφράζουν τους Notch1,2,3 και μπορούν να δράσουν είτε αυτοκρινώς συνδεδεμένοι με τους προσδέτες Jagged1,2 είτε παρακρινώς σε παρακείμενα BMSCs και MM κύτταρα συνδεδεμένοι με τους προσδέτες Jagged και Delta-like(441). Η ανώμαλη έκφραση του Jagged-2 από τα MM κύτταρα αποτελεί πρώιμο φαινόμενο στους ασθενείς με MGUS ενώ η έκφραση Jagged-1 συνδέεται με τη μετάβαση από MGUS σε MM(440). Η δράση του Notch είναι η επαγωγή της έκφρασης του RANKL από τα MM κύτταρα. Ο RANKL συνδέεται με τον RANK στην επιφάνεια των προ-οστεοκλαστών και αυτοί εκφράζουν υποδοχείς Notch2 στην επιφάνειά τους. Η έκφραση των υποδοχέων Notch από τους προ-οστεοκλάστες και τα BMSCs ενισχύεται και από την σύνδεση με τους Jagged, που παράγονται από τα παρακείμενα MM κύτταρα. Έρευνες επίσης δείχνουν πως το μονοπάτι των Notch εμπλέκεται στην διαμόρφωση ενός ευνοϊκού

μεταστατικού περιβάλλοντος μέσω της έκφρασης μορίων προσκόλλησης, χημειοκινών και αγγειογενετικών παραγόντων που διαταράσσουν μεταξύ άλλων και την ανοσοεπιτήρηση(426, 441, 442).

### 5.2.3 Osteopontin

Η osteopontin αποτελεί μία πρωτεογλυκάνη της θεμέλιας ουσίας η οποία παράγεται από τους οστεοκλάστες και επάγει την ενεργοποίησή τους όπως και την αγγειογένεση(443). Για αυτόν το λόγο χρησιμοποιείται ως βιοδείκτης της οστεοκλαστικής δραστηριότητας και της νεοαγγειογένεσης ενώ τα υψηλά επίπεδα οστεοποντίνης συσχετίζονται με εκτεταμένη οστεολυτική νόσο(444). Ωστόσο σε ασθενείς με MM και αντιμεταθέσεις *MAF* η οστεοποντίνη φαίνεται να ασκεί προστατευτικό ρόλο στην οστική απορρόφηση μέσω τροποποίησης της διακυτταρικής επικοινωνίας μεταξύ των MM κυττάρων και των οστεοκλαστών(445).

### 5.2.4 CCL-3 (MIP-1 $\alpha$ )/ CCL-20

Ο CCL-3 [Chemokine (C-C motif) ligand 3] ή MIP-1 $\alpha$  (Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$ ) είναι μία χημειοκίνη που παράγεται από τα MM κύτταρα και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επαγωγή της οστικής νόσου(446). Ο CCL-3 συνδέεται με τους CCR1 και CCR5 υποδοχείς οι οποίοι εκφράζονται στην επιφάνεια των BMSCs, των οστεοβλαστών, των MM κυττάρων και των οστεοκλαστών. Ο CCL-3 έλκει τους προ-οστεοκλάστες οδηγώντας σε οστεοκλαστογένεση ενώ επάγει την έκφραση RANKL και IL-6(447). Αναστέλλει επιπλέον την έκφραση του *Runx2* και του *osterix*, βασικών μεταγραφικών παραγόντων στην οστεοβλαστική διαφοροποίηση και επιμετάλλωση ενώ ενισχύει την επιβίωση και την εγκατάσταση των MM κυττάρων στο MO(448). Σε ασθενείς με διαμετάθεση t(4;14) η αυξημένη έκφραση του *FGFR3* ενισχύει την παραγωγή CCL-3, υποδεικνύοντας το βιολογικό μηχανισμό της συγκεκριμένης κυτταρογενετικής ανωμαλίας(449). Ο CCL-20 είναι μια έτερη χημειοκίνη η οποία εμπλέκεται στο μονοπάτι των Th-17 λεμφοκυττάρων, συνδέεται με τον CCR-6 υποδοχέα, που εκφράζεται από τα κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος, και επάγει την οστεοκλαστογένεση(450).

### 5.2.5 Activin A

Η Activin A, μέλος της οικογένειας των TGF- $\beta$  συνδέεται με τον υποδοχέα τύπου I (ALK4) και τύπου II (ActRIIA/B) και σχηματίζει ετεροδιμερή. Σηματοδοτεί μέσω του συμπλόκου Smad2/3/4 στον πυρήνα ενώ σε αναλογία με τις BMPs σηματοδοτεί και αυτή μέσω non-Smad μονοπατιών όπως τα μονοπάτια Akt/PI3K, MAPK/ERK, JNK και WNT/ $\beta$ -catenin(451). Η Activin A ανταγωνίζεται επίσης τις BMPs, αποτρέποντάς τις να συνδεθούν με τους υποδοχείς τους και

οδηγώντας σε αναστολή της αποπτωτικής ικανότητας των BMPs στα MM κύτταρα, ενώ επάγει την οστεοκλαστογένεση μέσω ενίσχυσης των μονοπατιών NF-κB και RANK(452). Τα επίπεδα της Activin A συσχετίζονται με τα επίπεδα της periostin σε ασθενείς που διαγιγνώσκονται με MM ενώ υψηλά επίπεδα αυτής συνδέονται με προχωρημένη οστική νόσο και πτωχή πρόγνωση(453, 454).

### 5.2.6 Ιντερλευκίνες

Η IL-3 επάγει την έκκριση της Activin A, αναστέλλει την διαφοροποίηση των οστεοβλαστών και προάγει την οστεοκλαστογένεση σε προκλινικά μοντέλα MM. Τα επίπεδα της αυξάνονται σε ασθενείς με MM ενώ η κύρια πηγή παραγωγής αυτής είναι τα T-λεμφοκύτταρα και τα CD45+ αιμοποιητικά κύτταρα τα οποία διαμεσολαβούν στην καταστολή των οστεοβλαστών(455).

Η IL-6 όπως αναφέρθηκε αποτελεί σημαντική κυτταροκίνη καθώς εμπλέκεται στην οστεοκλαστική διαφοροποίηση, την επιβίωση των MM κυττάρων και την έκκριση VEGF που επάγει την αγγειογένεση και την περαιτέρω ενεργοποίηση των οστεοκλαστών ενώ μαζί με την MMP-9 (Matrix Metalloprotease 9) αποτελούν δείκτες οστικής νόσου στους ασθενείς MM. Επίσης ενεργοποιεί και το μονοπάτι PI3K/Akt/mTOR, το οποίο ρυθμίζει την έκφραση της IL-6, VEGF και osteopontin. Παρόμοιες βιολογικές λειτουργίες ασκεί και η IL-17, η οποία παράγεται από τα Th-17 και NK κύτταρα(456).

### 5.2.7 TNF

Ο TNF-α συνεργάζεται με τον RANKL στην επαγωγή οστεοκλαστογένεσης(457). Ο BAFF (B-cell Activating Factor) είναι μέλος της υπερικογένειας των TNF και εκκρίνεται από τα BMSCs, τους οστεοκλάστες και τα MM κύτταρα. Το καθοδικό σηματοδοτικό αποτέλεσμα είναι η επιβίωση των MM κυττάρων και η ενεργοποίηση του φλεγμονώδους μονοπατιού NF-κB. Τα επίπεδα του BAFF ανευρίσκονται αυξημένα σε ασθενείς με MM(458).

### 5.2.8 BTK και SDF-1α

Η BTK (Bruton Tyrosine Kinase) είναι μία κινάση της οικογένειας TEC (Tec Protein Tyrosine Kinase) η οποία εμπλέκεται στην ενεργοποίηση του BcR και της οστεοκλαστικής διαφοροποίησης(459). Ο SDF-1α (Stromal cell-derived Factor 1α) είναι μία χημειοκίνη η οποία επικουρεί στη μετανάστευση και την εγκατάσταση των MM κυττάρων στο MO μέσω σύνδεσης με τον υποδοχέα CXCR-4 (CXC chemokine recceptor type 4). Οι προ-οστεοκλάστες που εκφράζουν BTK και CXCR-4 ανταποκρίνονται στην έκκριση του SDF-1α, ο οποίος επάγει την έκφραση της BTK στα MM κύτταρα(460). Το μονοπάτι της BTK αποτελεί έναν υποσχόμενο

θεραπευτικό στόχο καθώς η ανασταλτική στόχευση της BTK σε προκλινικά μοντέλα βελτίωσε την πορεία της οστικής νόσου.

### 5.2.9 Annexin II

Η Annexin II συνιστά ένα ασβεστιο-εξαρτώμενο μέλος της οικογένειας annexin η οποία εκφράζεται στην επιφάνεια των BMSCs, των ενδοθηλιακών κυττάρων, των μονοκυττάρων και των MM κυττάρων. Διαμεσολαβεί τη μετανάστευση και την προσκόλληση των MM κυττάρων, την αγγειογένεση και την οστεοκλαστογένεση ενώ ανευρίσκεται σε υψηλά επίπεδα σε ασθενείς με MM και σχετίζεται με πτωχή πρόγνωση(133, 461).

### 5.2.10 TGF-β και Smads

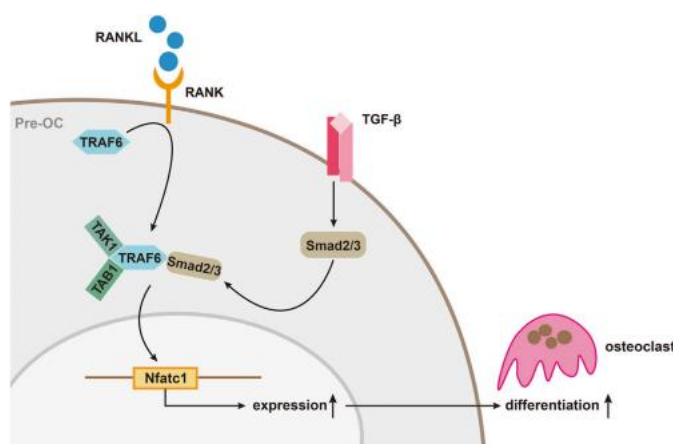
Η σύνδεση του TGF-β με την παραγωγή και τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών είναι γνωστή από μελέτες. Ωστόσο, φαίνεται ο ρόλος του TGF-β να είναι διττός καθώς από τη μία πλευρά δρα άμεσα στα μακροφάγα του ΜΟ επάγοντας την παραγωγή M-CSF και τη σύντηξη οστεοκλαστών και από την άλλη πλευρά έμμεσα επάγοντας την έκφραση OPG από τα κύτταρα του στρώματος και τους οστεοβλάστες επιδρώντας στο μονοπάτι RANK/RANKL/OPG. Η διττή αυτή λειτουργία εξηγείται είτε από την σχεδίαση των *in vitro* μοντέλων είτε από τη διαφορετική διαβάθμιση και το στάδιο στο οποίο δρα ο TGF-β(462, 463, 464).

Ωστόσο τα καθοδικά γονίδια του RANK/RANKL που διαμεσολαβούνται από τα μόρια TRAF6, NF-κB, AP-1 και MAPK είναι κοινά και στα μονοπάτια των BMPs και TGF-β όπως αναλύθηκαν παραπάνω. Ο TGF-β ενισχύει την RANKL μεσολαβούμενη δημιουργία των συμπλόκων Smad2/3 και Smad4 τα οποία μεταφέρονται στον πυρήνα και συνδέονται στην περιοχή έκφρασης του *Nfatc1* στους οστεοκλάστες. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της σύνδεσης της περιοχής MH2 του Smad3 με τον TRAF6, ο οποίος έχει συνδεθεί με τους παράγοντες TAK1-TAB1 (465, 466) (Εικ. 32).

Σε αντίθεση με τα προηγούμενα ο TGF-β αυξάνει τη διαμεσολαβούμενη μέσω Smad μεταγραφική έκφραση του Smad6, ο οποίος ρυθμίζει αρνητικά το μονοπάτι του TRAF6. Ο Smad6 συνδέεται με τον TRAF6 και την επαγόμενη από τον TNF-α πρωτεΐνη A20 μέσω διακριτών περιοχών. Η πρωτεΐνη A20 αναστέλλει τις λιγάσες ουβικουιτίνης, συμπεριλαμβανομένης και της TRAF6 και δρα ως αρνητικός ρυθμιστής του μονοπατιού NF-κB. Με την αναστολή της TRAF6 ο Smad6 δρα ως αρνητικός ρυθμιστής των μονοπατιών p38/MAPK και JNK(467, 468, 469).

Διαγραφή του *Smad4* σε προ-οστεοκλάστες οδηγεί σε ελαττωμένους, μικρότερους και αδρανέστερους οστεοκλάστες, το οποίο πιστοποιείται από την ελαττωμένη έκφραση των *Nfatc1* και *DC-STAMP* και τα μειωμένα επίπεδα φωσφορυλιωμένου Smad2/3. Αντίθετα η μερική

διαγραφή του *Smad4* σε ώριμους οστεοκλάστες ενισχύει τον σχηματισμό τους και την οστική απορρόφηση, το οποίο σχετίζεται με την τροποποιημένη ευαισθησία των οστεοκλαστών στον TGF- $\beta$ , αλλά όχι στις BMPs(470, 471).



Εικόνα 32 | Η συνεργική δράση των RANKL και TGF- $\beta$  στην οστεοκλαστική διαφοροποίηση.  
[Πηγή: (472)]

### 5.2.11 BMPs

Οι υποδοχείς των BMPs φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην σύζευξη της αναδόμησης και της απορρόφησης οστού, καθώς αποσιωπητικές μεταλλάξεις στον BMPRIA των οστεοκλαστών συσχετίστηκαν με αυξημένη οστεοβλαστική διαφοροποίηση και αλλαγές στην έκφραση γονιδίων όπως του *Cx43* (*Connexin 43*)/*Gja1* (*Gap Junction Protein Alpha 1*), τα οποία σχετίζονται με τη διακυτταρική επικοινωνία(473, 474). Η μέτρηση δε των επιπέδων mRNA των *PU.1* και *MITF* σε προ-οστεοκλάστες ήταν αυξημένη ενώ τα αντίστοιχα επίπεδα όψιμων δεικτών διαφοροποίησης ήταν ελαττωμένα, αναδεικνύοντας το ρόλο του BMPRIA στην πρόωμη και όψιμη πορεία διαφοροποίησης των οστεοκλαστών(470, 475). Σε μοντέλα ποντικών από την άλλη πλευρά με διαγραφή του *bmpr1b* αναδείχθηκε αυξημένη ανάπτυξη, μεγαλύτερη επιβίωση και ελαττωμένη απόπτωση των οστεοκλαστών, οι οποίοι χαρακτηρίζονται όμως από ελαττωμένη ικανότητα απορρόφησης(476).

Επιπλέον, η διαγραφή του *bmpr2* σε οστεοκλάστες οδήγησε σε ελαττωμένη διαφοροποίηση και λειτουργία. Ο κλινικός φαινότυπος χαρακτηρίζεται από αυξημένη οστική μάζα και οστεοπέτρωση, ενώ σε μοριακό επίπεδο οι αλλαγές αφορούν τα μη-κανονικά μονοπάτια (MAPK) των BMPs αλλά όχι το μονοπάτι των Smads(477).

Από τις BMPs, η BMP-2 βρίσκεται στενά συνδεδεμένη με την οστεοκλαστογένεση και την οστική απορρόφηση αυτών παρουσία των κυττάρων του στρώματος(478). Επάγει μέσω των Smad1/5/4 την ενεργοποίηση της CBP πρωτεΐνης η οποία καθοδηγεί το σύμπλοκο Smad1/5/4

στον πυρήνα και επάγει την έκφραση του CSF-1. Σε knockout Smad1/5/4 πειραματικά μοντέλα παρατηρήθηκε ελάττωση της οστεοκλαστικής δραστηριότητας και των δεικτών διαφοροποίησης οστεοκλαστών υπογραμμίζοντας τον σημαντικό τους ρόλο στη διαφοροποίηση. Υπό την επίδραση της IL-1α η BMP-2 και ο RANKL μαζί συνεργούν στον σχηματισμό, τη διαφοροποίηση και την επιβίωση των οστεοκλαστών. Επίσης BMP-2 που προέρχεται από τα μακροφάγα του ΜΟ επάγει αυτοκρινώς κανονικά σηματοδοτικά μονοπάτια στους οστεοκλάστες(475, 479, 480), ενώ η επιλογή μεταξύ κανονικών και μη-κανονικών μονοπατιών εξαρτάται από το στάδιο διαφοροποίησης, όπου η σηματοδότηση μέσω p38 παρατηρείται σε προ-οστεοκλάστες και η σηματοδότηση μέσω Smad στο στάδιο της σύντηξης των οστεοκλαστών(477). Η επαφή οστεοβλαστών και οστεοκλαστών ex vivo ανέδειξε την σημασία της επαφής των κυτταρικών τύπων στην βιολογική επίδραση της BMP-2 και συγκεκριμένα την επαγωγή της οστεοβλαστογένεσης και την αναστολή της οστεοκλαστογένεσης μέσω του μονοπατιού EphrinB2/EphB4(481).

Η BMP-6 αποτελεί έναν ισχυρό επαγωγέα των οστεοβλαστών λόγω της αντίστασης στη noggin(482, 483, 484). Ωστόσο, στους οστεοκλάστες ο ρόλος της είναι ασθενέστερος στην επαγωγή τους σε σχέση με την BMP-2 και πάντως αυτή η επίδραση εμφανίζεται σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις(485, 486, 487). Στους οστεοκλάστες ανευρίσκονται υψηλά επίπεδα BMP-6 mRNA, γεγονός το οποίο αποδίδει στην BMP-6 ένα συζευκτικό ρόλο μεταξύ της οστικής απορρόφησης και σχηματισμού, αλλά και του λεπτού συντονισμού όλης της ομοιοστασίας του οστικού μεταβολισμού(488).

Τέλος οι BMPs σηματοδοτούν μέσω μη-κανονικών μονοπατιών (p38, JNK, ERK) και επάγουν την έκφραση προφλεγμονωδών παραγόντων και γονιδίων που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση, τον σχηματισμό και τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών.

## **5.3 Μοριακά μονοπάτια ελαττωμένης οστεοβλαστικής δραστηριότητας**

### **5.3.1 Μονοπάτι Wnt/ $\beta$ -catenin**

Το μονοπάτι Wnt (Wingless and integration-1) εμπλέκεται άμεσα στην οστική νόσο των ασθενών(434, 489). Η κανονική σηματοδότηση του Wnt επιτελείται μέσω της σύνδεσης του προσδέτη σε ένα σύμπλοκο που αποτελείται από τους υποδοχείς LRP5/6 (Lipoprotein-related Protein 5/6) και έναν διαμεμβρανικό υποδοχέα της οικογένειας FZD (Frizzled). Εν συνεχεία δημιουργείται ένα σύμπλοκο που αποτελείται από τους παράγοντες DVL (Disheveled), Axin, FRAT1 (Frequently Rearranged In Advanced T-Cell Lymphomas 1) και GSK-3 $\beta$ , το οποίο αποτρέπει τη διάσπαση της  $\beta$ -catenin και επιτρέπει τη μεταφορά της στον πυρήνα όπου ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα TCF (T-cell Factor)/LEF (Lymphoid Enhancer Factor),



ο οποίος ενεργοποιεί τη μεταγραφική μηχανή και επιτρέπει την έκφραση γονιδίων που ευνοούν τον οστικό σχηματισμό όπως η OPG και αναστέλλουν την οστική απορρόφηση(490). Η PTH (Parathyroid Hormone) δύναται να ενεργοποιήσει το ίδιο μονοπάτι απουσία Wnt προσδετών.

Σε προκλινικά μοντέλα *in vivo* η αλληλεπίδραση του Wnt μονοπατιού με το μικροπεριβάλλον αποτρέπει την εγκατάσταση MM οστικής νόσου(491). Ωστόσο λόγω των επιδράσεων του μονοπατιού στον κυτταρικό κύκλο και τις διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις, έχει αναδειχθεί πως η ανώμαλη σηματοδότηση και συγκεκριμένα η μη-κανονική σηματοδότηση που περιλαμβάνει τα μονοπάτια ROCK, RAC-JNK-Runx2 και Wnt-Ca<sup>2+</sup> ευθύνεται για την φαρμακευτική αντοχή των MM κυττάρων μέσω έκφρασης μορίων προσκόλλησης που προστατεύουν τα MM κύτταρα από τη δράση των φαρμάκων(473, 474). Τα μόρια Wif-1 (Wnt inhibitory factor-1), SOSTDC-1 (Sclerostin Domain Containing-1), DKK-1, sFRP-2/3 (soluble Frizzled Related Protein 2/3) και sclerostin αποτελούν ανταγωνιστές του μονοπατιού(492).

### 5.3.2 SFRP

Οι SFRP (Secreted Frizzled-Related Proteins) αποτελούν ανταγωνιστές του Wnt μονοπατιού μέσω σύνδεσης και σχηματισμού συμπλόκου με τους υποδοχείς LRP5/6 και FDZ, αναστέλλοντας την σύνδεση των Wnt συνδετών(493). Παράγονται από τους αρχέγονους οστεοβλάστες και τα MM κύτταρα και αναστέλλουν την οστεοβλαστική δραστηριότητα. Η SFRP-1 παράγεται συνεχώς από τους πρώιμους οστεοβλάστες και αναστέλλει έως και το 70% του Wnt μονοπατιού, ενώ τα επίπεδα της ελαττώνονται καθώς αυτοί ωριμάζουν(492, 494, 495). Τα αυξημένα ποσοστά προ-οστεοβλαστών και τα μειωμένα ποσοστά ώριμων οστεοβλαστών οδηγούν σε αυξημένα επίπεδα SFRP, τα οποία είναι υπεύθυνα για την ελαττωμένη οστική μάζα, την τροποποίηση των βιομηχανικών ιδιοτήτων του οστού αλλά και την αυξημένη απόπτωση των χονδροκυττάρων(496). Μάλιστα η έκφραση SFRP-2 είναι αυξημένη σε ασθενείς MM με προχωρημένη οστική νόσο, ενώ η έκφραση SFRP-3 αυξάνεται κατά τη μετάβαση από το στάδιο MGUS στο MM(497). Τέλος, η υπερέκφραση SFRP-4 από τους οστεοβλάστες μειώνει την επιβίωση και ως εκ τούτου την οστεογένεση(498).

### 5.3.3 DKK-1

Ο DKK-1 ανταγωνίζεται το μονοπάτι Wnt εσωτερικεύοντας με τη βοήθεια των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών Kremen1/2 τους LRP5/6 αναστέλλοντας τη μεταφορά της β-catenin στον πυρήνα(499). Ο DKK-1 παράγεται από τους οστεοβλάστες και τα BMSCs και αναστέλλει αυτοκρινώς με τη βοήθεια της σκληροστίνης την οστεοβλαστογένεση αποτρέποντας τη διαφοροποίηση των BMSCs σε ώριμους οστεοβλάστες(500). Τα MM κύτταρα συμβάλλουν στην αναστολή της

οστεοβλαστογένεσης μέσω της έκκρισης DKK-1. Ο DKK-1 επάγει έμμεσα την οστεοκλαστογένεση μέσω αύξησης του RANKL και ελάττωσης της OPG που παράγεται από τους ανώριμους οστεοβλάστες και τα BMSCs(501). Αυξημένα επίπεδα DKK-1 στον ορό και στον ΜΟ έχουν περιγραφεί σε ασθενείς ΜΜ με οστική νόσο, ενώ ο αριθμός των οστεολυτικών βλαβών σχετίζεται με τα επίπεδα του DKK-1(500).

#### 5.3.4 Sclerostin

Η sclerostin, η οποία παράγεται από τα οστεοκύτταρα, είναι μία πρωτεΐνη που περιέχει έναν βρόχο κυστεΐνης και αποτελεί το προϊόν έκφρασης του *SOST*. Η sclerostin επάγει την απόπτωση των ώριμων οστεοβλαστών μέσω του μονοπατιού των κασπασών, αναστέλλει την οστεοβλαστογένεση και την επιμετάλλωση των οστών και επάγει την οστεοκλαστογένεση αυξάνοντας το λόγο RANKL/OPG(502). Η sclerostin ανταγωνίζεται το μονοπάτι Wnt συνδεόμενη με το εξωκυττάριο τμήμα των LRP5/6 που βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη των προ-οστεοβλαστών. Αποτρέπεται έτσι ο σχηματισμός του συμπλόκου DVL-Axin-FRAT1-GSK-3β και η GSK-3β φωσφορυλιώνει την β-catenin οδηγώντας την για πρωτεασωμική αποικοδόμηση μέσω ουβικουιτίνωσης. Οι μεταγραφικοί παράγοντες TCF/LEF καταστέλλονται από τον Groucho και καταστέλλεται η έκφραση των σχετιζόμενων με τον σχηματισμό του οστού γονιδίων(456). Η sclerostin αποτρέπει επίσης την σύνδεση των BMPs με τους υποδοχείς τύπου I και II διακόπτοντας την διαδικασία της οστεοβλαστογένεσης. Ανευρίσκεται αυξημένη σε ασθενείς ΜΜ με κάταγμα αλλά και σε όσους βρίσκονται σε προχωρημένο στάδιο κατά R-ISS, ενώ αποτελεί δυσμενή προγνωστικό παράγοντα για τους ασθενείς με ΜΜ(461).

#### 5.3.5 Periostin

Η periostin είναι μία πρωτεΐνη κυτταρικής προσκόλλησης που περιέχει δισουλφιδικούς δεσμούς και παράγεται από τα BMSCs. Εκφράζεται στο περίοστεο ως απάντηση σε μηχανικά ερεθίσματα και αποτελεί ειδικό οστεοβλαστικό παράγοντα. Παράγεται επίσης κατά την οστεοκλαστογένεση *in vitro* αλλά και στα αρχικά στάδια της οστεοβλαστογένεσης, ενώ μειώνεται στο στάδιο της επιμετάλλωσης(503). Αποτελεί μέρος της θεμέλιας ουσίας αλλά εμπλέκεται και στο μονοπάτι Wnt. Η periostin επίσης εμπλέκεται στην αύξηση του όγκου και στη μετάσταση. Υψηλά επίπεδα periostin σχετίζονται με εκτεταμένη οστική νόσο(504).

#### 5.3.6 Runx2, GFI-1, IL-7

Ο RUNX2/CBFA1 (Core-Binding Factor Runt domain subunit 1) εμπλέκεται στο μη-κανονικό μονοπάτι του Wnt και συνιστά σημαντικό ρυθμιστή της οστεοβλαστογένεσης. Τα ΜΜ κύτταρα

αναστέλλουν την έκφραση του *RUNX2* στα BMSCs και στους οστεοβλάστες ανακόπτοντας τη διαφοροποίησή τους. Μάλιστα σε βιοψίες ασθενών ανευρίσκονται λιγότεροι *RUNX2*-θετικοί οστεοβλάστες. Ωστόσο τα MM κύτταρα υπερεκφράζουν *RUNX2* ενώ τα επίπεδα έκφρασης του *RUNX2* σχετίζονται με προχωρημένη νόσο και πτωχή πρόγνωση. Ο *RUNX2* στα MM κύτταρα επάγει το μονοπάτι Akt/ $\beta$ -catenin/survivin επιδρώντας στην εγκατάσταση των MM κυττάρων στον ΜΟ. Η πρωτεΐνη CYR61/CCN1 (Cysteine Rich 61 protein) παράγεται στο μικροπεριβάλλον του ΜΟ και επάγει τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών μέσω ενίσχυσης της έκφρασης του *RUNX2*(505, 506).

Ο GFI-1 (Growth Factor Independence-1) είναι μεταγραφικός καταστολέας του *RUNX2* και αναστέλλει την έκφρασή του. Τα BMSCs ασθενών MM εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα GFI-1. Ο GFI-1 επίσης στρατολογεί ακετυλάσες των ιστονών και άλλους επιγενετικούς τροποποιητές του *RUNX2* εκκινητή(507).

Στη ρύθμιση της έκφρασης του *RUNX2* εμπλέκεται και η IL-7 η οποία ασκεί αρνητικό μεταγραφικό έλεγχο στον *RUNX2*, ενεργοποιεί τα T-λεμφοκύτταρα, τα οποία παράγουν RANKL, και συνεργεί με τον GFI-1 στην καταστολή του *RUNX2*. Τα επίπεδα της IL-7 ανευρίσκονται αυξημένα στο ΜΟ ασθενών με MM(505).

### 5.3.7 EphrinB2/EphB4

Οι υποδοχείς Eph είναι υποδοχείς τυροσινικής κινάσης που ενεργοποιούνται από τις εφρίνες και κατέχουν αμφιμονοσήμαντο ρόλο στον οστικό μεταβολισμό. Η EphrinB2 εκφράζεται στους οστεοκλάστες και επάγεται από την PTH, ενώ η EphB4 εκφράζεται στους οστεοβλάστες και στα BMSCs(508). Η σύνδεση EphrinB2/EphB4 οδηγεί σε ενεργοποίηση δύο σηματοδοτικών μονοπατιών, το πρόσθιο το οποίο ενισχύει την οστεοβλαστική διαφοροποίηση καταστέλλοντας την έκφραση RhoA και το οπίσθιο το οποίο αναστέλλει την οστεοκλαστική διαφοροποίηση καταστέλλοντας τη μεταγραφή των *Fos* (*FBJ Murine Osteosarcoma*) και *Nfatc1*. Τόσο η EphrinB2 όσο και όσο η EphB4 ελαττώνονται στα BMSCs των ασθενών με MM(509).

### 5.3.8 Υπερουκογένεια TNF

Ο TNF- $\alpha$  αναστέλλει την διαφοροποίηση των προ-οστεοβλαστών και αναστέλλει τον *RUNX2*, τον συνενεργοποιητή TAZ και τον osterix. Ο osterix αποτελεί σημαντικό παράγοντα διαφοροποίησης των οστεοβλαστών(507). Ο LIGHT ένα έτερο μέλος της οικογένειας TNF συνδέεται με τους υποδοχείς HVEM (Herpesvirus entry mediator) και LT $\beta$ R (Lymphotoxin beta recceptor) και ενεργοποιεί το μονοπάτι του TNF αλλάζοντας την καθοδική γονιδιακή έκφραση. Ο LIGHT εκφράζεται από τα CD14+ μονοκύτταρα, τα CD8+ T-λεμφοκύτταρα και τα ουδετερόφιλα.

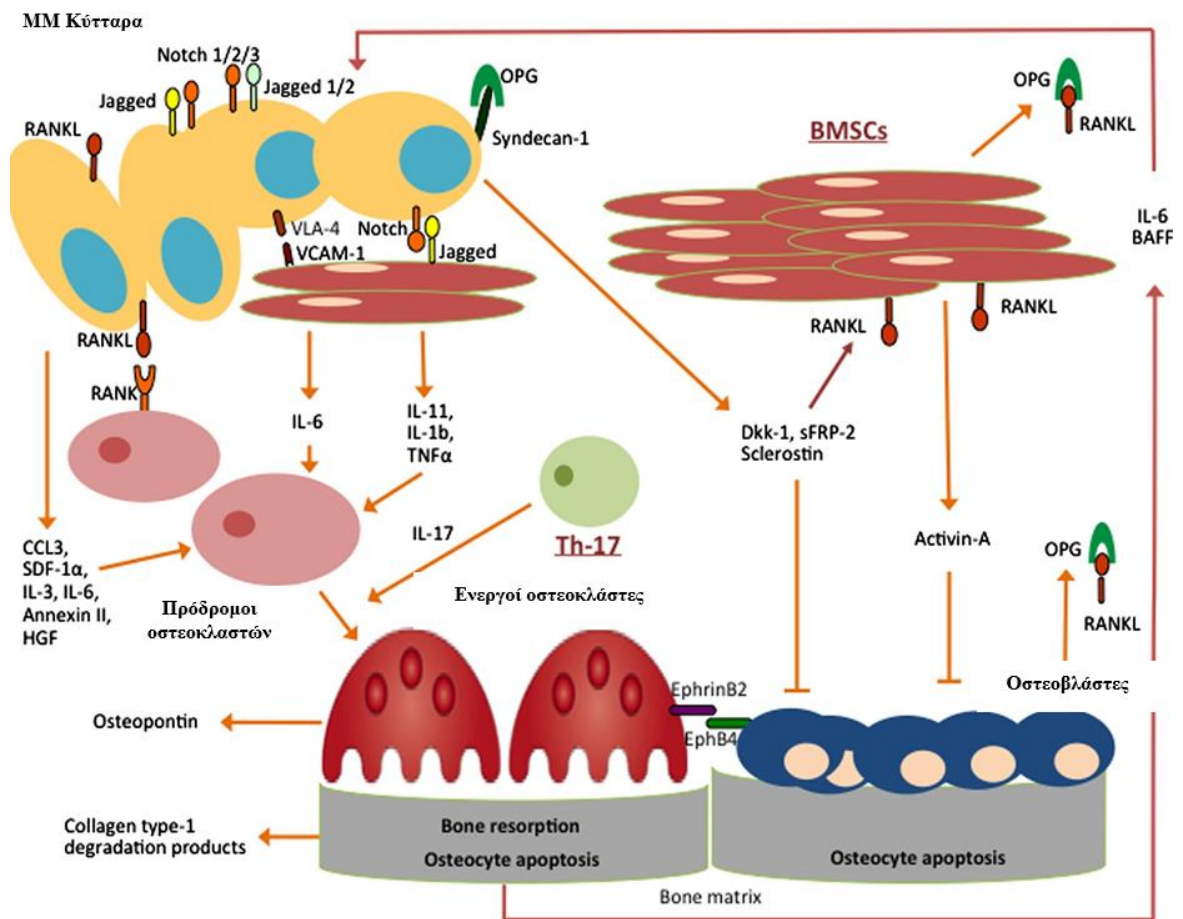
Ελαττώνει την οστεοβλαστογένεση αναστέλλοντας τη δημιουργία των οστεοβλαστών, την παραγωγή της οστεοκαλσίνης και του κολλαγόνου τύπου I, ενώ επάγει και την παραγωγή της sclerostin από τα μονοκύτταρα. Τέλος συνεργεί με τον RANKL και ενεργοποιεί τα μονοπάτια Akt, NF-κB και JNK(510).

### 5.3.9 BMPs και TGF-β

Στους προ-οστεοβλάστες έχουν αναγνωριστεί περίπου 184 γονίδια επαγόμενα από τις BMPs(511). Αυτά διαχωρίζονται σε πρώιμα-άμεσα γονίδια (2 ώρες μετά την έκθεση σε BMP-2), πρώιμα-ενδιάμεσα γονίδια (6 ώρες μετά την έκθεση σε BMP-2) και πρώιμα-όψιμα γονίδια (24 ώρες μετά την έκθεση σε BMP-2). Τα πρώιμα-άμεσα γονίδια ρυθμίζουν τη μεταγωγή σήματος όπως τα *Id1-3*, *Smad6*, *Smad7*, *OASIS* (*c-AMP Responsive Element Binding Protein 3 Like 1*), *Prx2* (*Paired Related Homeobox 2*), *TIEG* (*TGF-β Inducible Early Growth Response*) και *Snail*. Τα ενδιάμεσα και όψιμα πρώιμα γονίδια σχετίζονται με την οστεοβλαστική διαφοροποίηση(512, 513). Τα γονίδια *Hey1* και *Tcf7* είναι μεταγραφικοί παράγοντες που εκφράζονται στους οστεοβλάστες και εμπλέκονται στα μονοπάτια των Notch και Wnt(514, 515).

Στους ασθενείς MM παρατηρείται αυξημένη παραγωγή HGF από τα MM κύτταρα, ο οποίος παρεμβαίνει στην επαγόμενη από την BMP-2 ενεργοποίηση των *Runx2* και *osterix*, μέσω αναστολής της μεταφοράς των Smad1/5/4 στον πυρήνα(516). Άλλοι παράγοντες οι οποίοι αναφέρθηκαν όπως ο Smad6, ο Smad7, η Activin A, η sclerostin, η IL-3 και ο DKK-1 αναστέλλουν την BMP σηματοδότηση οδηγώντας σε αναστολή της οστεοβλαστογένεσης. Οι BMP-2 και BMP-7 επίσης επάγουν την αύξηση της έκφρασης του Smad6 μέσω μηχανισμού αρνητικής ανατροφοδότησης. Η ενεργοποίηση μη-κανονικών μονοπατιών από τις BMPs όπως η επαγωγή της Cox-2 (*Cyclooxygenase-2*) και του AP-1 επάγουν την οστεοβλαστογένεση(517).

Ο ρόλος του TGF-β στους οστεοβλάστες είναι διαφορούμενος, καθώς από τη μία πλευρά είναι απαραίτητος για την επαγωγή των προ-οστεοβλαστών ενώ από την έτερη πλευρά αναστέλλει την ωρίμαση των οστεοβλαστών. Παράγεται αρχικά από τους οστεοβλάστες και τα οστεοκύτταρα σε ανενεργή μορφή, είναι συνδεδεμένος με την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία και στην συνέχεια ενεργοποιείται από τους οστεοκλάστες κατά τη διαδικασία της οστικής απορρόφησης. Σηματοδοτεί μέσω του Smad3, ο οποίος συνδέεται ως ειδικός ενεργοποιητής του υποκινητή του *osteopontin*. Επίσης αναστέλλει την έκφραση της osteocalcin που συμμετέχει στην ωρίμαση και την επιμετάλλωση των οστεοβλαστών σχηματίζοντας ένα ανασταλτικό σύμπλοκο με τον Runx2 και την HDAC στον υποκινητή του *osteocalcin* (503, 518).



Εικόνα 33 | Σχηματική αναπαράσταση των σηματοδοτικών μονοπατιών της οστικής νόσου του MM. [Πηγή: (133)]

## 5.4 MicroRNAs

Τα microRNAs (miRs) αποτελούν μία ομάδα μη-κωδικοποιητικών RNAs, τα οποία παρουσιάζουν ρυθμιστικό ρόλο. Είναι μονόκλιωνα μόρια, μήκους 21 νουκλεοτιδίων τα οποία παράγονται αρχικά ως μεγάλου μήκους πρωτογενή μονόκλιωνα μόρια RNA και στη συνέχεια αποκόπτονται από τις RNases DROSHA (Double-Stranded RNA-Specific Endoribonuclease) και DICER. Μετά την αποκοπή τους συνήθως κατευθύνονται με βάση τη συμπληρωματικότητα σε μόρια mRNA και συνδέονται συνήθως στην 3' αμετάφραστη περιοχή, αλλά και στην 5' αμετάφραστη και την κωδικοποιητική περιοχή, οδηγώντας είτε σε αναστολή της μετάφρασης είτε σε αποικοδόμηση. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί και η ενίσχυση της μετάφρασης, ειδικότερα σε ό,τι αφορά την σύνδεση στην 5' αμετάφραστη περιοχή(434). Ο ρόλος τους χαρακτηρίζεται είτε ως ογκογονικός είτε ως ογκοκατασταλτικός. Τα miRs εμπλέκονται σε αρκετές αιματολογικές κακοήθειες και απορρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση που σχετίζεται με μονοπάτια επιβίωσης, απόπτωσης,

μετανάστευσης και αγγειογένεσης(439). Η έκφραση τους είναι συνήθως αποτέλεσμα είτε γενετικών αλλαγών (προσθήκες, αντιμεταθέσεις, διαγραφές), είτε επιγενετικών (μεθυλίωση) αλλαγών. Τα miRs επιπλέον επηρεάζουν την λειτουργία των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών, αποτελώντας μέρος της παθοφυσιολογίας της οστικής νόσου(440, 519).

#### **5.4.1 miR221-5p**

Το miR221-5-p βρέθηκε αυξημένο στα BMSCs ασθενών με MM σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες. Ο στόχος του είναι ο Smad3 ο οποίος ενεργοποιεί τα μονοπάτια του Runx2/osteopontin και επάγει την οστεοβλαστογένεση. Η αναστολή του Smad3 οδηγεί σε ελαττωμένη οστική αναδόμηση και οστεοπενία. Η καταστολή του miR221-5-p ενεργοποιεί επιπλέον το μονοπάτι PI3K/AKT/mTOR το οποίο διεγείρει την οστεοβλαστική διαφοροποίηση των BMSCs. Η αναστολή του miR221-5p οδηγεί στην ενεργοποίηση του PI3K/AKT/mTOR μονοπατιού το οποίο συνδέεται με την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την επαγωγή της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης των MM-MSCs(520).

#### **5.4.2 miR135b-5p**

Το miR135b-5p αναστέλλει τον Smad5 και ελαττώνει τα επίπεδα έκφρασης της αλκαλικής φωσφατάσης, της οστικής σιελοπρωτεΐνης, της osteoprotegerin και του κολλαγόνου τύπου I στους οστεοβλάστες. Τα MM κύτταρα εκκρίνουν διαλυτούς παράγοντες που διεγείρουν τα BMSCs να παράγουν σε υψηλά επίπεδα miR135b-5p. Η επικοινωνία αυτή φαίνεται να διαμεσολαβείται από εξωκυττάρια κυστίδια(521).

#### **5.4.3 miR203a-3p**

Το miR203a-3p φαίνεται να ρυθμίζει αρνητικά το μονοπάτι των BMPs στοχεύοντας τον Smad8/9. Τα μονοπάτια των TGF-β/BMP και Wnt επικοινωνούν μεταξύ τους καθώς φαίνεται πως ρυθμίζουν την δραστηριότητα των TCF και LEF μεταγραφικών παραγόντων. Το miR203a-3p αναστέλλει και το μονοπάτι του Wnt/β-catenin οδηγώντας στην υπόθεση ότι η συμβολή του στην οστική νόσο πραγματοποιείται μέσω της αρνητικής ρύθμισης και των δύο σηματοδοτικών οδών(456, 522).

#### **5.4.4 miR34a-5p**

Τέλος, το miR34a-5p έχει ογκοκατασταλτικό χαρακτήρα, καθώς φαίνεται πως η υπερέκφρασή του σχετίζεται με ελαττωμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό *in vitro* και ελαττωμένο αριθμό οστεολυτικών βλαβών. Συνδέεται και καταστέλλει τον TGIF2 (Transforming Growth Factor-

Beta-Induced Factor 2). Ο TGIF2 αποτελεί έναν μεταγραφικό ρυθμιστή, ο οποίος είτε συνδέεται άμεσα με τα *Smad* γονίδια, στρατολογώντας HDACs είτε αλληλεπιδρά με του *Smad2/3* αναστέλλοντας την μεταγωγή του σήματος. Επομένως το miR34a-5p ενισχύει τη σηματοδότηση των *Smad*, καταστέλλοντας τη δημιουργία νέων οστεολυτικών εστιών(523).

## 5.5 Θεραπεία οστικής νόσου

Η ανακάλυψη νέων μοριακών μονοπατιών και σηματοδοτικών μορίων έχει οδηγήσει στην εισαγωγή νέων θεραπειών που στοχεύουν διαφορετικούς τελεστές όλων των παραπάνω μονοπατιών. Η θεραπεία σε νέους ασθενείς περιλαμβάνει την χρήση των δισφωσφονικών όπως το αλενδρονικό οξύ που αναστέλλουν το μονοπάτι των RANKL ενώ σε ασθενείς με νεφρική νόσο χρησιμοποιείται το μονοκλωνικό αντίσωμα denosumab που στοχεύει στο ίδιο μονοπάτι(524, 525). Στις συμβατικές θεραπείες χρησιμοποιούνται η ASCT, η οποία επαναφέρει τον λόγο RANKL/OPG και μειώνει την οστική απορρόφηση, η ακτινοβολία και οι σπονδυλοπλαστική ως μέθοδοι ελάττωσης του πόνου και βελτίωσης της ποιότητας ζωής των ασθενών MM. Η syndecan-1, η οποία δεσμεύει τις BMPs στην θεμέλια ουσία αποτελεί μελλοντικό θεραπευτικό στόχο. Νεότερα φάρμακα αποτελούν οι αναστολείς BTK(526), τα αντισώματα αντι-DKK1(527), αντι-Sclerostin(528), οι αγωνιστές OPG(529), οι ανταγωνιστές TGF-β (SRI31277)(530) και Activin A (Sotatercept)(531), τα ραδιονουκλίδια (radium-223, samarium-153) (532, 533) και η ανασυνδυασμένη PTH(534).

## II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 6. ΥΛΙΚΑ

Το βιολογικό υλικό που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν μυελικά αναρροφήματα μυελού των οστών (BM) που ελήφθησαν από ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα (ομάδα ασθενών) και από ασθενείς με άλλα αιματολογικά νεοπλάσματα (λεμφώματα) χωρίς διήθηση μυελού (ομάδα μαρτύρων) στα πλαίσια διάγνωσης, σταδιοποίησης και παρακολούθησης στην Αιματολογική Κλινική του ΠΓΝΛ. Όλοι οι ασθενείς που περιλήφθηκαν στη μελέτη ενημερώθηκαν και συναίνεσαν για τη διαδικασία καθώς και τη μετέπειτα χρήση του βιολογικού τους υλικού. Παρακάτω παρουσιάζονται τα υλικά/αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης.

Για την αποθήκευση του μυελού των οστών (MO) έγινε χρήση των κάτωθι υλικών:

ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΜΥΕΛΟΥ ΟΣΤΩΝ			
ΥΛΙΚΑ	ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΤΑΛΟΓΟΥ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΑΡΤΙΔΑΣ
Σωληνάρια γενικής αίματος	5mL σωληνάρια Aysset® Tube EDTA 3K	70644	10193

Πίνακας 5

Για την απομόνωση της στοιβάδας μονοπύρηνων κυττάρων από ολικό αίμα μυελού των οστών χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά:

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΣΤΟΙΒΑΔΑΣ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ			
ΥΛΙΚΑ	ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΤΑΛΟΓΟΥ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΑΡΤΙΔΑΣ
Αποστειρωμένες σύριγγες	5mL 21 x ½ Gauge sterile syringes, Violak International SA®	11-3006	2104001
Ρυθμιστικό Διάλυμα PBS	PBS (Phosphate Buffered Solution) pH = 7.2, Gibco®	70013-016	1945217
Φικόλη	Lymphoprep®, Stemcell Technologies®	07851/07861	00419
Σωληνάρια φυγοκέντρησης	15mL centrifuge tubes, Biologix®	10-9151	MO001236R1406X-01
Αποστειρωμένα Eppendorf® σωληνάρια	1.5 mL sterile tubes Eppendorf Safe Lock®	0030120086	022363204

Πίνακας 6



Για την **απομόνωση του RNA (Ribonucleic Acid)** έγινε χρήση του εμπορικά διαθέσιμου πακέτου (kit) E.Z.N.A<sup>®</sup> Total RNA Kit I (200), της εταιρείας Omega Biotek<sup>®</sup>, με αριθμό καταλόγου R6834-02 και αριθμό παρτίδας R683428858 – 62. Τα υλικά παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.

<b>ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA</b>			
<b>ΥΛΙΚΑ</b>	<b>ΟΝΟΜΑΣΙΑ</b>	<b>ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΤΑΛΟΓΟΥ</b>	<b>ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΑΡΤΙΔΑΣ</b>
Στήλες διοξειδίου πυριτίου	HiBIND <sup>®</sup> RNA Mini Columns, Omega Biotek <sup>®</sup>	R6834-02	R683428858 – 62
2-μερκαπτοαιθανόλη	β-ME, Omega Biotek <sup>®</sup>	R6834-02	R683428858 – 62
Σωληνάρια Συλλογής	2 mL Collection Tubes, Omega Biotek <sup>®</sup>	R6834-02	R683428858 – 62
Λυτικό διάλυμα	TRK Lysis Buffer, Omega Biotek <sup>®</sup>	R6834-02	R683428858 – 62
Διάλυμα αλκοόλης I	RNA Wash Buffer I, Omega Biotek <sup>®</sup>	R6834-02	R683428858 – 62
Διάλυμα αλκοόλης II	RNA Wash Buffer II, Omega Biotek <sup>®</sup>	R6834-02	R683428858 – 62
Αποστειρωμένο νερό	Nuclease-free Water, Omega Biotek <sup>®</sup>	R6834-02	R683428858 – 62
Tips με φίλτρα	Filter tips 0.5-10 µL, Brand <sup>®</sup>	732724	0000004689
Στήλες ομογενοποίησης	Omega <sup>®</sup> Homogenizer Mini Columns, Omega Biotek <sup>®</sup>	RHCR000	29449EX40
Αποστειρωμένα σωληνάρια Eppendorf <sup>®</sup>	1.5 mL αποστειρωμένα σωληνάρια Eppendorf Safe Lock <sup>®</sup>	0030120086	022363204
Αιθανόλη 99.8% μετουσιωμένη	Ethanol 99.8% denatured with IPA, MEK και Bitrex, PanReactAppliChem <sup>®</sup>	131086.1211	0K011191
Σετ DNase I	E.Z.N.A <sup>®</sup> RNase-Free DNase I Kit, Omega Biotek <sup>®</sup>	E1091	E109132006
Διάλυμα απενεργοποίησης ριβονουκλεασών	RNase Xterminator, 500 mL, Gibco <sup>®</sup>	GB43.5005	7E50421A
Αποστειρωμένο νερό	Ultra-pure, distilled, DNase, RNase - Free water, 500 mL, Gibco <sup>®</sup>	10977-018	468605

Πίνακας 7

Στον Πίνακα 8 παρουσιάζονται τα υλικά **παρασκευής της γέλης** για την ηλεκτροφόρηση του RNA.

<b>ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΓΕΛΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ</b>			
<b>ΥΛΙΚΑ</b>	<b>ΟΝΟΜΑΣΙΑ</b>	<b>ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΤΑΛΟΓΟΥ</b>	<b>ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΑΡΤΙΔΑΣ</b>
Αγαρόζη	Ultra-Pure Agarose, ThermoFisherScientific <sup>®</sup> , 500g	16500500	0001151021
Βρωμιούχο αιθίδιο	UltraPure™ Ethidium Bromide, 10 mg/mL, ThermoFisherScientific <sup>®</sup>	15585011	22E0356439
Ρυθμιστικό Διάλυμα TBE	TBE (Tris-Borate EDTA), ThermoFisherScientific <sup>®</sup>	B52	01333062
Χρωστική Φόρτωσης RNA	Loading Dye RNA, 6X, ThermoFisherScientific <sup>®</sup>	R0611	01340031
Μάρτυρας 100bp	Ladder 100bp plus DNA, GeneON <sup>®</sup>	304-105	SE92

*Πίνακας 8*

Η **σύνθεση του cDNA (complimentary DNA)** έγινε με τη χρήση του εμπορικού kit QuantiTect<sup>®</sup> Reverse Transcription Kit (50), Qiagen<sup>®</sup>, με αριθμό καταλόγου 205311 και αριθμό παρτίδας 172022019. Τα υλικά παρατίθενται στον πίνακα 9.

<b>ΣΥΝΘΕΣΗ cDNA</b>			
<b>ΥΛΙΚΑ</b>	<b>ΟΝΟΜΑΣΙΑ</b>	<b>ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΤΑΛΟΓΟΥ</b>	<b>ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΑΡΤΙΔΑΣ</b>
Διάλυμα απομάκρυνσης gDNA	gDNA Wipeout Buffer, Qiagen <sup>®</sup>	205311	172022019
Αποστειρωμένο νερό	RNase-free water, Qiagen <sup>®</sup>	205311	172022019
Αντίστροφη μεταγραφή	Quantiscript Reverse Transcriptase, Qiagen <sup>®</sup>	205311	172022019
Αποστειρωμένο νερό	Ultra-pure, distilled, DNase, RNase - Free water, 500 mL, Gibco <sup>®</sup>	10977-018	468605
Ρυθμιστικό διάλυμα αντίστροφης μεταγραφής	Quantiscript Reverse Transcriptase Buffer, Qiagen <sup>®</sup>	205311	172022019

Μίγμα εκκινητών (περιλαμβάνει Mg <sup>2+</sup> και dNTPS)	Reverse Transcriptase LNA PCR Assay, Qiagen®	205311	172022019
---	---	--------	-----------

Πίνακας 9

Για την εκτέλεση της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό kit QuantiNova SYBR® Green PCR Kit (500), Qiagen® με αριθμό καταλόγου 208054 και αριθμό παρτίδας 172021254. Επίσης σχεδιάστηκαν οι εκκινητές των γονιδίων *BMP-2*, *BMP-6*, *Smad6* και *β2-microglobulin*, κατάλληλοι για τους σκοπούς της παρούσης μελέτης, από την εταιρεία Qiagen®. Στον πίνακα 10 παρατίθενται τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου.

<b>ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΠΟΣΟΤΙΚΗΣ PCR ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ</b>			
<b>ΥΛΙΚΑ</b>	<b>ΟΝΟΜΑΣΙΑ</b>	<b>ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΤΑΛΟΓΟΥ</b>	<b>ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΑΡΤΙΔΑΣ</b>
Διάλυμα DNA πολυμεράσης και SYBR Green PCR Buffer	QuantiNova SYBR Green PCR Master Mix	208054	172021254
Εκκινητές <i>BMP-2</i>	QuantiNova LNA PCR Assay, <i>BMP-2</i>	SBH0638609-200	1110790480831
Εκκινητές <i>BMP-6</i>	QuantiNova LNA PCR Assay, <i>BMP-6</i>	SBH0513495-200	1110790480841
Εκκινητές <i>Smad6</i>	QuantiNova LNA PCR Assay, <i>SMAD6</i>	SBH0104025-200	1110790480811
Εκκινητές <i>B2M</i> ( <i>β2- μικροσφαιρίνη</i> )	QuantiNova LNA PCR Assay, <i>B2M</i> ( <i>β2- microglobulin</i> )	SBH0312240-200	1110790480821
Αποστειρωμένο νερό	RNase-free water	208054	172021254

Πίνακας 10

## 7. ΜΕΘΟΔΟΙ

### 7.1 Απομόνωση στοιβάδας μονοπύρηνων κυττάρων

Η απομόνωση της στοιβάδας μονοπύρηνων κυττάρων πραγματοποιείται έχοντας λάβει 3 mL ολικού αίματος από τον μυελό των οστών μέσω οστεομυελικής βιοψίας, μέθοδος που πραγματοποιείται από έμπειρο αιματολόγο και αποθηκεύονται σε φιαλίδια γενικής αίματος που περιέχουν αντιπηκτικό EDTA (Ethylene-Diamine-Tetraacetic Acid) 3K, το οποίο δεσμεύει τα δισθενή ιόντα  $Ca^{2+}$  και αναστέλλει την ενεργοποίηση του καταρράκτη της πήξεως πάνω στη φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα των αιμοπεταλίων, αποτρέποντας την συγκόλληση των κυττάρων. Στην συνέχεια και εντός 24 ωρών το δείγμα μεταφέρεται στο Ανοσολογικό Εργαστήριο του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας προκειμένου να ξεκινήσει η απομόνωση. Όλες οι τεχνικές πραγματοποιήθηκαν τηρώντας τα μέτρα ασφαλείας, δηλαδή χρήση προστατευτική μάσκας, γαντιών μίας χρήσης και εργαστηριακής ποδιάς.

Το δείγμα αρχικά επεξεργάζεται αναρροφώντας το 5 φορές με σύριγγα 21 x ½ Gauge προκειμένου να ομογενοποιηθεί καθώς περιέχει κοκκία και υπολείμματα σπογγώδους οστού. Ύστερα προστίθενται 5 mL διαλύματος PBS, Gibco® το οποίο περιέχει διαφόρους ηλεκτρολύτες ( $NaCl$ ,  $KCl$ ,  $Na_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ) και σκοπό έχει την διατήρηση σταθερού pH = 7.2, το οποίο διατηρεί τα κύτταρα σταθερά και αποτρέπει τη λύση αυτών. Σε 15 mL σωληνάρια φυγοκέντρησης προστίθενται 4 mL στείρας φικόλης (Lymphoprep®, Stemcell Technologies®). Η φικόλη είναι ένας υδρόφιλος, πολυκλαδικός, υψηλού μοριακού βάρους πολυσακχαρίτης, που διαχωρίζει ύστερα από φυγοκέντρηση τα ερυθροκύτταρα από τα λευκοκύτταρα. Επιστοιβάζεται προσεκτικά όλο το αραιωμένο ολικό αίμα χωρίς να προκληθεί διαταραχή στην επιφάνεια της φικόλης και στη συνέχεια φυγοκεντρείται για 30 λεπτά στις 1.200 rcf (relative centrifugal force) με επιτάχυνση +2 και φρένο 0 στη φυγόκεντρο Eppendorf® Centrifuge 5810R. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης τα στοιχεία του αίματος διαχωρίζονται μεταξύ τους, και ειδικότερα στην κορυφή παρατηρείται το υποκίτρινου χρώματος πλάσμα, στη συνέχεια μια νεφελώδης στοιβάδα η οποία περιέχει τα μονοπύρηννα λευκοκύτταρα, η στοιβάδα της φικόλης και τέλος τα ερυθροκύτταρα με τα αιμοπετάλια που έχουν καθιζάνει στο κάτω μέρος του σωληναρίου.

Απορρίπτεται το πλάσμα και με προσεκτικές κινήσεις αναρροφάται η νεφελώδης στοιβάδα επιδιώκοντας να μην αναρροφηθεί πλάσμα και φικόλη και μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο συλλογής. Έπειτα προστίθεται διάλυμα PBS έως τελικού όγκου 8 mL και ανάδευση. Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 1.600 rcf για 5 λεπτά με επιτάχυνση +9 και φρένο +9. Μετά τη φυγοκέντρηση

απορρίπτεται το υπερκείμενο και γίνεται ανασύσταση με 3 mL PBS. Το διάλυμα μεταφέρεται ισόποσα σε 1.5 mL αποστειρωμένα σωληνάρια Eppendorf Safe Lock<sup>®</sup> και φυγοκεντρείται στις 3.000 rcf για 7 λεπτά στη φυγόκεντρο Eppendorf<sup>®</sup> Centrifuge 5424. Τέλος απορρίπτεται το υπερκείμενο και τα κύτταρα μεταφέρονται άμεσα στους -80 °C για μακροπρόθεσμη αποθήκευση χωρίς να υφίσταται αλλοιώσεις το γενετικό υλικό.

## 7.2 Παρασκευή γέλης ηλεκτροφόρησης

Πριν την απομόνωση του RNA θα πρέπει να έχει παρασκευαστεί η γέλη ηλεκτροφόρησης για τον ποιοτικό και ημιποσοτικό έλεγχο του απομονωθέντος RNA. Για την παρασκευή γέλης με συγκέντρωση 1% ζυγίζεται 1 gr αγαρόζης (Ultra-Pure Agarose, ThermoFisherScientific<sup>®</sup>, 500g) και προστίθεται σε γυάλινο ποτήρι ζέσεως. Προστίθενται στο γυάλινο δοχείο ζέσεως 100 mL αραιωμένου διαλύματος TBE (Tris-Borate EDTA, ThermoFisherScientific<sup>®</sup>), που έχει προκύψει από την ανάμιξη 50 mL TBE 10X και 450 mL καθαρού νερού. Το μίγμα περιέχει τα κατάλληλα ιόντα για τη δίοδο του ηλεκτρικού ρεύματος διαμέσου της πηκτής αγαρόζης. Εν συνεχεία θερμαίνεται το ποτήρι ζέσεως προκειμένου να ομογενοποιηθεί η αγαρόζη για 3 λεπτά στα 750W.

Μετά το πέρας της θέρμανσης ζυγίζεται το διάλυμα και αναπληρώνεται με καθαρό νερό μέχρι τον αρχικό όγκο. Στην συνέχεια προστίθενται 5 μL βρωμιούχου αιθιδίου (UltraPure<sup>™</sup> Ethidium Bromide, 10 mg/mL, ThermoFisherScientific<sup>®</sup>), το οποίο παρεμβάλλεται στις βάσεις του DNA και του RNA και εκπέμπει ακτινοβολία όταν εκτεθεί υπό υπεριώδη (UV) ακτινοβολία. Στην συνέχεια απλώνεται το μίγμα με προσοχή στο εκμαγείο, προστίθεται χτένι για την δημιουργία των θέσεων φόρτωσης των δειγμάτων και αφαιρούνται τυχόν φυσαλίδες αέρα. Αφήνεται για 30 λεπτά να πήξει σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C) οπότε και αφαιρείται το χτένι και αποκολλάται από το εκμαγείο για να τοποθετηθεί στην συσκευή της ηλεκτροφόρησης.

## 7.3 Απομόνωση RNA

Η απομόνωση του RNA είναι μια ευαίσθητη και προσεκτική διαδικασία, λόγω της αστάθειας του μονόκλωνου μορίου RNA και της ύπαρξης ενζύμων, των ριβονουκλεασών (RNases), στο περιβάλλον, στον αέρα και στις επιφάνειες, που διασπούν το RNA. Ως εκ τούτου πρέπει να ληφθούν ιδιαίτερες προφυλάξεις.

Οι πάγκοι εργασίας θα πρέπει να καθαρίζονται και να απολυμαίνονται με χλωρίνη συγκέντρωσης 10% προκειμένου να απαλειφθεί ο κίνδυνος επιμόλυνσης ή αποσύνθεσης του RNA. Πριν την έναρξη της απομόνωσης χρησιμοποιείται διάλυμα απενεργοποίησης των ριβονουκλεασών (RNAse Xterminator, 500 mL, Gibco<sup>®</sup>) σε όλον το εργαστηριακό εξοπλισμό (πιπέττες, φυγόκεντροι κ.τ.λ.) και στους πάγκους εργασίας. Οι πιπέττες θα πρέπει να

ακτινοβολούνται υπό UV ακτινοβολία για 30 λεπτά προκειμένου να καταστραφεί το γενετικό υλικό, κυρίως μέσω της διάσπασης του δίκλωνου DNA (DNA Strand Breaks). Καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας θα πρέπει να αλλάζονται συχνά τα γάντια μιας χρήσης για την αποφυγή επιμόλυνσης και καταστροφής του RNA.

Στα δείγματα τα οποία διατηρούνται στους -80 °C, αφ' ης στιγμής αφαιρεθούν από την κατάψυξη προστίθενται 700  $\mu$ L λυτικού μίγματος και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά, ώστε να λυθούν όλα τα κύτταρα. Το μίγμα περιέχει λυτικό διάλυμα (TRK Lysis Buffer, Omega Biotek<sup>®</sup>) και διάλυμα  $\beta$ -μερκαπτοαιθανόλης ( $\beta$ -ME, Omega Biotek<sup>®</sup>) με αναλογία 20  $\mu$ L  $\beta$ -ME ανά 1.000  $\mu$ L λυτικού διαλύματος. Η δράση της  $\beta$ -ME είναι να μετουσιώνει τις ριβονουκλεάσες, απενεργοποιώντας τις. Τα κύτταρα υπό τη δράση του λυτικού διαλύματος λύνονται καθώς αυτό περιέχει χασοτρόπες ουσίες (θειοκυανιούχος γουανιδίνη), οι οποίες αυξάνουν την συνολική εντροπία του συστήματος, εξασθενίζουν τους δεσμούς υδρογόνου και τις δυνάμεις Van der Waals, διαταράσσουν τη φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα ανοίγοντας χάσματα στις κυτταρικές μεμβράνες, αποδιατάσσουν τις πρωτεΐνες και εντέλει λύνουν τα κύτταρα, απελευθερώνοντας τα νουκλεϊκά οξέα.

Στην συνέχεια μεταφέρονται 700  $\mu$ L του δείγματος σε στήλη ομογενοποίησης (Omega<sup>®</sup> Homogenizer Mini Columns Omega Biotek<sup>®</sup>) και φυγοκεντρώνονται για 2 λεπτά σε 15.000 g. Στο στάδιο αυτό της ομογενοποίησης DNA, κυτταρικές μεμβράνες και μεγαλομοριακές πρωτεΐνες δεσμεύονται από την στήλη, ενώ το RNA περνάει στο υποκείμενο διάλυμα. Σκοπός του σταδίου αυτού είναι η αφαίρεση των πρωτεϊνών και του DNA από το λυμένο δείγμα. Απορρίπτεται η στήλη ομογενοποίησης και προστίθενται στο υποκείμενο διάλυμα 700  $\mu$ L αιθανόλης 70%, οπότε και αναδεύονται με ήπιες κινήσεις με τη χρήση της πιπέτας. Ύστερα, 700  $\mu$ L δείγματος φορτώνονται στην στήλη διοξειδίου του πυριτίου (HiBIND<sup>®</sup> RNA Mini Columns, Omega Biotek<sup>®</sup>) και φυγοκεντρώνονται για 1 λεπτό σε 12.000 g. Το μονόκλωνο RNA φορτίζεται θετικά στο διάλυμα αιθανόλης το οποίο αποδίδει H<sup>+</sup> έτσι ώστε να συνδεθεί στην αρνητικά φορτισμένη στήλη ενώ τα υπολείμματα μεμβρανών, DNA και πρωτεϊνών διέρχονται από την στήλη στο υποκείμενο διάλυμα. Επαναλαμβάνεται η προηγούμενη διαδικασία άλλη μία φορά, ώστε να φορτωθούν και τα υπόλοιπα 700  $\mu$ L. Ακολούθως προστίθενται 250  $\mu$ L διαλύματος αλκοόλης I (Wash Buffer I) στην στήλη και φυγοκεντρώνονται για 1 λεπτό σε 12.000 g. Η πλύση με διάλυμα αλκοόλης έχει σκοπό την απομάκρυνση του λυτικού διαλύματος καθώς και προσμίξεων, ώστε να καθαριστεί το RNA που είναι δεσμευμένο στη στήλη.

Ακολουθεί η διαδικασία πέψης με DNase I, ώστε να απομακρυνθεί το DNA, καθώς μπορεί να παρεμβληθεί στη μέθοδο της ποσοτικής PCR αποδίδοντας ανακριβή αποτελέσματα. Απορρίπτεται το υποκείμενο από το προηγούμενο βήμα και προστίθενται 75  $\mu$ L μίγματος DNase I. Το μίγμα

περιέχει 73.5  $\mu\text{L}$  DNase I digestion buffer και 1.5  $\mu\text{L}$  DNase I ένζυμο. Επωάζεται η στήλη σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθενται 250  $\mu\text{L}$  Wash Buffer I και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για άλλα 2 λεπτά. Στην συνέχεια φυγοκεντρείται για 1 λεπτό προκειμένου να απομακρυνθεί το μίγμα DNase I από την στήλη. Απορρίπτεται το υποκείμενο, προστίθενται 500  $\mu\text{L}$  διαλύματος αλκοόλης II (Wash Buffer II) και φυγοκεντρείται η στήλη για 1 λεπτό σε 12.000 g. Επαναλαμβάνεται άλλη μία φορά το προηγούμενο βήμα.

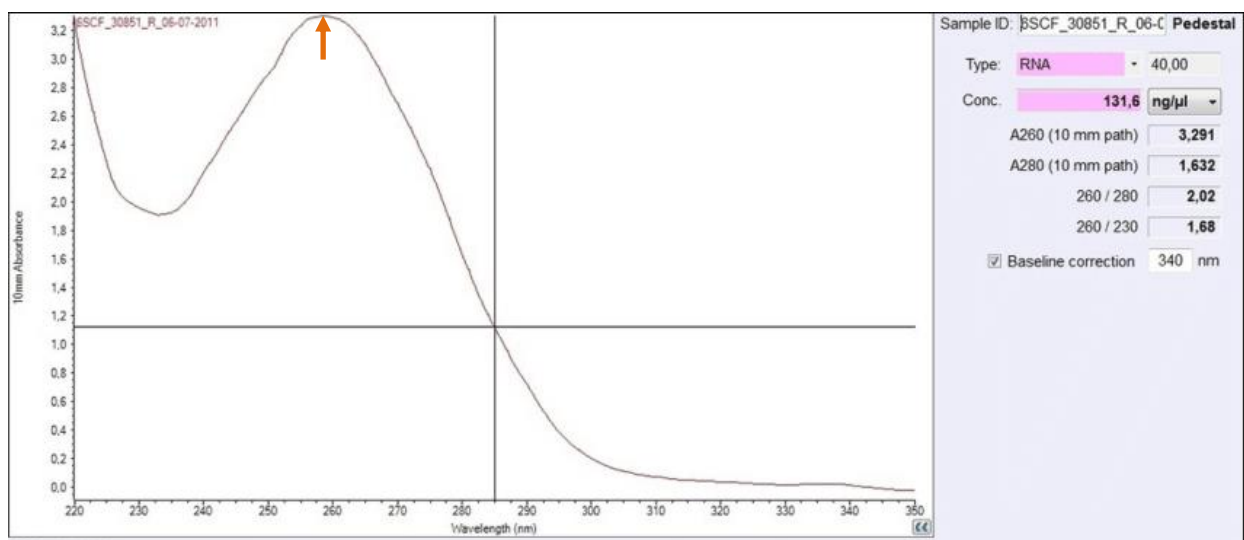
Η στήλη ύστερα φυγοκεντρείται για 2 λεπτά σε 15.000 g ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα των διαλυμάτων αλκοόλης, τα οποία είναι πτητικά. Η στήλη μεταφέρεται σε σωληνάριο Eppendorf® και προστίθενται 40  $\mu\text{L}$  αποστειρωμένου νερού (Nuclease-free Water, Omega Biotek®), επωάζεται για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στην συνέχεια φυγοκεντρείται για 2 λεπτά σε 15.000 g. Το δείγμα αποθηκεύεται στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **7.4 Ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος απομονωθέντος RNA**

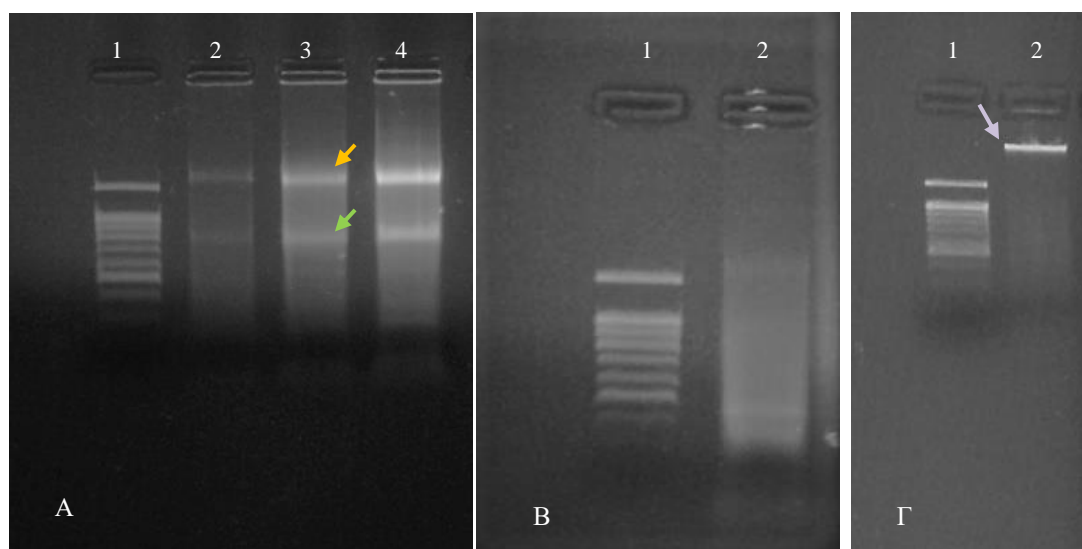
Από το απομονωμένο RNA λαμβάνονται 3  $\mu\text{L}$ , εκ των οποίων τα 2  $\mu\text{L}$  χρησιμοποιούνται για την ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης ενώ το 1  $\mu\text{L}$  για φασματομετρία προκειμένου να προσδιοριστεί η ποσότητα και η καθαρότητα του RNA.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA έγινε με τη χρήση του μηχανήματος NanoDrop™ 2000 ThermoFisherScientific®. Η μέθοδος βασίζεται στην διαφορετική απορρόφηση του RNA, του DNA και των πρωτεϊνών όταν εκτίθενται σε μία δέσμη ακτινοβολίας. Στην πράξη μετράται η απορρόφηση του RNA σε μήκος κύματος 260 nm, όπου 1 μονάδα αντιστοιχεί σε 40  $\mu\text{g}$  RNA ανά mL ( $A_{260} = 1 = 40\text{ }\mu\text{g/mL}$ ). Επίσης υπολογίζεται ο λόγος  $A_{260}/A_{280}$  ο οποίος δείχνει την καθαρότητα του RNA και την ύπαρξη υπολειμμάτων DNA στο δείγμα. Ο λόγος αυτός θα πρέπει να είναι μεγαλύτερος του 1.8. Όλα τα δείγματα που φωτομετρήθηκαν είχαν λόγο  $A_{260}/A_{280}$  μεγαλύτερο του 1.8 ενώ υπολογίστηκε και η συγκέντρωση του κάθε δείγματος (Εικ. 34).

Τα δείγματα επίσης ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη αγαρόζης όπου προστέθηκε σε κάθε δείγμα 1  $\mu\text{L}$  χρωστικής φόρτωσης RNA προκειμένου να είναι εμφανής η πορεία διαμέσου της γέλης. Επίσης στη γέλη φορτώνεται ο μάρτυρας 100 bp (Ladder 100bp plus DNA, GeneON®) για την αναγνώριση των διαφορετικού μήκους υπομονάδων του RNA. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν για 30 λεπτά, σε τάση 120V και ένταση ρεύματος 400mA. Στην ηλεκτροφόρηση του RNA φαίνονται δύο ευδιάκριτες ζώνες, οι οποίες περιέχουν τη 28S και τη 18S υπομονάδα του ριβοσωμιακού RNA. Η ζώνη της 28S υπομονάδας έχει διπλάσιο πάχος από την 18S υπομονάδα. Σε περίπτωση δράσης ριβονουκλεασών το RNA διασπάται και απεικονίζεται με μία θολή εικόνα συνεχών ζωνών (smear) ενώ επί παραμονής gDNA (genomic DNA), αυτό λόγω του μεγάλου μοριακού βάρους παραμένει στην θέση φόρτωσης του γενετικού υλικού στη γέλη (Εικ. 35).



**Εικόνα 34** | Υπολογισμός συγκέντρωσης RNA και λόγου A260/280 με τη χρήση του NanoDrop™ 2000 ThermoFisherScientific®. Παρατηρείται μονήρης κορυφή της καμπύλης απορρόφησης στα 260 nm (πορτοκαλί βέλος).



**Εικόνα 35** | Ηλεκτροφόρηση RNA σε πηκτική αгарόζης 1%. Α. Ηλεκτροφόρηση τριών δειγμάτων με ευδιάκριτη απεικόνιση των 28S rRNA (πορτοκαλί βέλος) και 18S rRNA (πράσινο βέλος) στις θέσεις φόρτωσης 2, 3, 4. Στη θέση 1 φορτώνεται ο μάρτυρας 100 bp DNA (Ladder 100bp plus DNA, GeneON®). Β. Ηλεκτροφόρηση δείγματος στη θέση 2 όπου διακρίνεται κατακερματισμός του RNA (smear). Γ. Ηλεκτροφόρηση δείγματος στη θέση 2 όπου διακρίνεται η παραμονή ζώνης στη θέση φόρτωσης του δείγματος (γκρι βέλος), η οποία αντιστοιχεί σε gDNA.

## 7.5 Σύνθεση cDNA

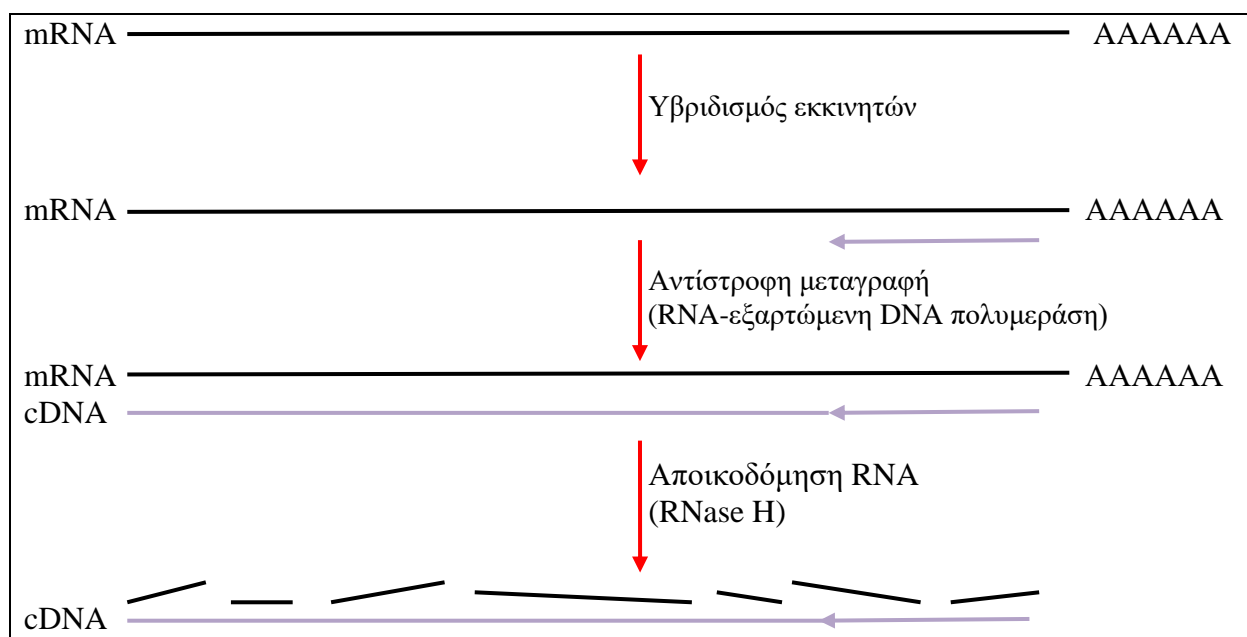
Η σύνθεση του cDNA έγινε με τη χρήση του εμπορικού σετ QuantiTect® Reverse Transcription Kit (50), Qiagen®. Σε αυτή τη μέθοδο όπως και στις προηγούμενες τηρούνται τα μέσα ατομικής προστασίας (γάντια, εργαστηριακή ποδιά και γυαλιά) και ο επιμελής καθαρισμός όλου του εργαστηριακού εξοπλισμού πριν την έναρξη της διαδικασίας λόγω του κινδύνου επιμόλυνσης με



RNases οι οποίες είναι σταθερά και ενεργά ένζυμα. Ύπαρξη ελάχιστων ποσοτήτων αυτών μπορούν να αποδομήσουν το RNA, κάνοντας αναγκαίο τον προσεκτικό χειρισμό.

Η διαδικασία περιλαμβάνει δύο στάδια: την εξάλειψη του γενωμικού DNA και την αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε cDNA. Επιμόλυνση του δείγματος RNA με ίχνη DNA μπορεί να παρεμβληθεί στην ποσοτική PCR αν οι εκκινητές της τελευταίας μπορούν να υβριδιστούν με τις ακολουθίες DNA. Το εμπορικό kit περιλαμβάνει το διάλυμα gDNA Wipeout Buffer το οποίο είναι υπεύθυνο για την απομάκρυνση των ιχνών DNA, είναι θερμοσταθερό και δεν αλλοιώνεται ύστερα από πολλαπλούς κύκλους ψύξης – απόψυξης. Πολύ σημαντικός παράγων στη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής είναι η επιλογή των κατάλληλων εκκινητών, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις που τα γονίδια βρίσκονται στην 5' περιοχή του mRNA. Οι εκκινητές περιέχουν ένα μίγμα ολιγομερών δεοξυθυμιδινών (oligo-dT), τα οποία υβριδίζονται με την πολυαδενυλική ουρά (poly-A) του 3' άκρου του mRNA, και τυχαίων εξαμερών τα οποία υβριδίζονται σε ακολουθίες σε όλο το μήκος του mRNA επιτυγχάνοντας πληρέστερη κάλυψη, ιδιαίτερα των 5' περιοχών, και αυξημένη ως εκ τούτου ευαισθησία.

Το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση γενικώς προέρχεται από RNA ρετροϊούς, όπως ο Avian Myeloblastosis Virus (AMV) που προκαλεί οξεία μυελογενή λευχαιμία στα πτηνά, ο Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV) που προκαλεί λευχαιμία στους μύς και ο Human Immunodeficiency Virus (HIV) ο οποίος προκαλεί το σύνδρομο της επίκτητης ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (AIDS, Acquired Human Immunodeficiency Sndrome). Η αντίστροφη μεταγραφάση είναι ένα πολυλειτουργικό ένζυμο το οποίο διαθέτει 3 διακριτές ενζυματικές λειτουργίες: RNA-εξαρτώμενη DNA πολυμεράση, υβριδιο-εξαρτώμενη (RNA:DNA) εξωριβονουκλεάση (RNase H) και DNA-εξαρτώμενη DNA πολυμεράση. *In vivo* η δράση αυτή επιτρέπει στον ιό να συνθέτει από ένα μονόκλωνο μόριο RNA, ένα δίκλωνο μόριο DNA. *In vitro*, ωστόσο, η αντίστροφη μεταγραφάση χρησιμοποιεί τους δύο πρώτους τρόπους για να παραχθεί ένα μονόκλωνο τμήμα cDNA. Η αντίστροφη μεταγραφάση που χρησιμοποιήθηκε (Quantiscript Reverse Transcriptase, Qiagen®) αποτελεί ένα μίγμα της Omniscript και Sensiscript αντίστροφης μεταγραφάσης, οι οποίες είναι ανασυνδυασμένα ετεροδιμερή ένζυμα που εκφράζονται στο *Escherichia coli*. Η τροποποιημένη αυτή αντίστροφη μεταγραφάση αποδομεί ειδικώς μόνο το RNA από υβρίδια RNA:DNA, αλλά όχι το μονόκλωνο RNA. Επίσης περιέχει αναστολέα RNase A, B, C και ανθρώπινης πλακουντιακής RNase (Εικ. 36).



Εικόνα 36 | Δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης για τη σύνθεση cDNA.

Το ρυθμιστικό διάλυμα αντίστροφης μεταγραφάσης (Quantiscript Reverse Transcriptase Buffer, Qiagen®) περιέχει ιόντα  $Mg^{+2}$  και τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) που είναι απαραίτητα για τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης.

Τα δείγματα που επελέγησαν είχαν λόγο  $A_{260}/A_{280} > 1.8$  και ευδιάκριτες ζώνες 28S rRNA και 18S rRNA στην ηλεκτροφόρηση. Ποσότητα 1  $\mu g$  RNA χρησιμοποιήθηκε από όλα τα δείγματα ανεξαιρέτως της μετρηθείσας συγκέντρωσής τους. Το μεγαλύτερο ποσοστό (>80 %) είναι rRNA, ενώ ένα ποσοστό 1-5 % αποτελεί το mRNA. Τα δείγματα αποψύχονται από τους  $-80^{\circ}C$  στους  $0^{\circ}C$  (πάγος) προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα κατακερματισμού του RNA. Ύστερα αποψύχονται από τους  $-20^{\circ}C$  σε θερμοκρασία δωματίου και προστίθενται το διάλυμα απομάκρυνσης gDNA, η αντίστροφη μεταγραφάση, το ρυθμιστικό διάλυμα αντίστροφης μεταγραφάσης, το μίγμα εκκινητών καθώς και το αποστειρωμένο νερό που περιέχονται στο σετ.

Για την απομάκρυνση του gDNA χρησιμοποιούνται 2  $\mu L$  διαλύματος απομάκρυνσης gDNA, όγκος υποστρώματος RNA που αντιστοιχεί σε 1  $\mu g$  RNA και όγκος αποστειρωμένου νερού, με τελικό όγκο 14  $\mu L$ . Έπειτα το δείγμα επωάζεται στους  $42^{\circ}C$  για 2 λεπτά σε θερμοκυκλοποιητή Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler, ThermoFisherScientific®, και μετά το πέρας τοποθετείται άμεσα στον πάγο. Στην συνέχεια προστίθεται 1  $\mu L$  αντίστροφης μεταγραφάσης, 4  $\mu L$  ρυθμιστικού διαλύματος αντίστροφης μεταγραφάσης και 1  $\mu L$  μίγματος εκκινητών με τελικό όγκο τα 20  $\mu L$ . Το δείγμα τοποθετείται εκ νέου σε θερμοκυκλοποιητή όπου επωάζεται για 15 λεπτά στους  $42^{\circ}C$ , οπότε επιτελείται η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής όπως περιγράφηκε παραπάνω και για 3 λεπτά στους  $95^{\circ}C$  προκειμένου να απενεργοποιηθεί η αντίστροφη μεταγραφάση. Τα

δείγματα τοποθετούνται στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , προκειμένου να χρησιμοποιηθούν στην ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου.

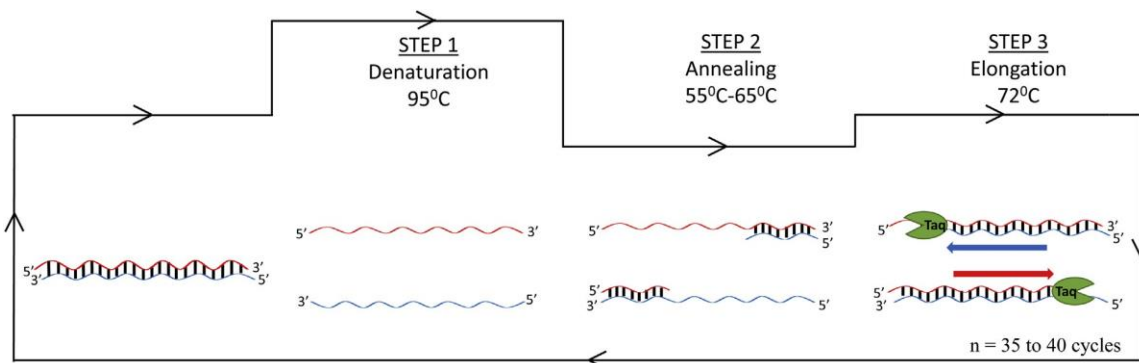
## 7.6 Εκτέλεση ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου αντίστροφης μεταγραφής (real-time RT-qPCR)

### 7.6.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) βασίζεται στην εκθετική ενίσχυση των νουκλεϊκών οξέων από την θερμοσταθερή *Thermus aquaticus* πολυμεράση. Η αντίδραση χρησιμοποιεί ζεύγος ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών (primers), όπου ο κάθε εκκινητής υβριδίζεται με την πρόσθια (forward) ή την ανάστροφη (reverse) αλυσίδα (strand) του δίκλωνου DNA (dsDNA) του γονιδιακού στόχου. Οι υβριδισμένοι εκκινητές δρουν ως υπόστρωμα για την *Taq* DNA πολυμεράση, η οποία δε μπορεί να ξεκινήσει de novo αντιγραφή και η οποία συνθέτει συμπληρωματική DNA αλυσίδα μέσω της διαδοχικής προσθήκης δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs), τα οποία έχουν προστεθεί στο μίγμα (Εικ. 37)

Η πειραματική διαδικασία αποτελείται από τα εξής βήματα:

1. Από το στάδιο της αποδιάταξης στους  $94\text{ ή }95^{\circ}\text{C}$
2. Υβριδοποίηση των εκκινητών στο μονόκλωνο DNA (ssDNA) στους  $55\text{-}65^{\circ}\text{C}$
3. Επέκταση του εκκινητή στους  $72^{\circ}\text{C}$

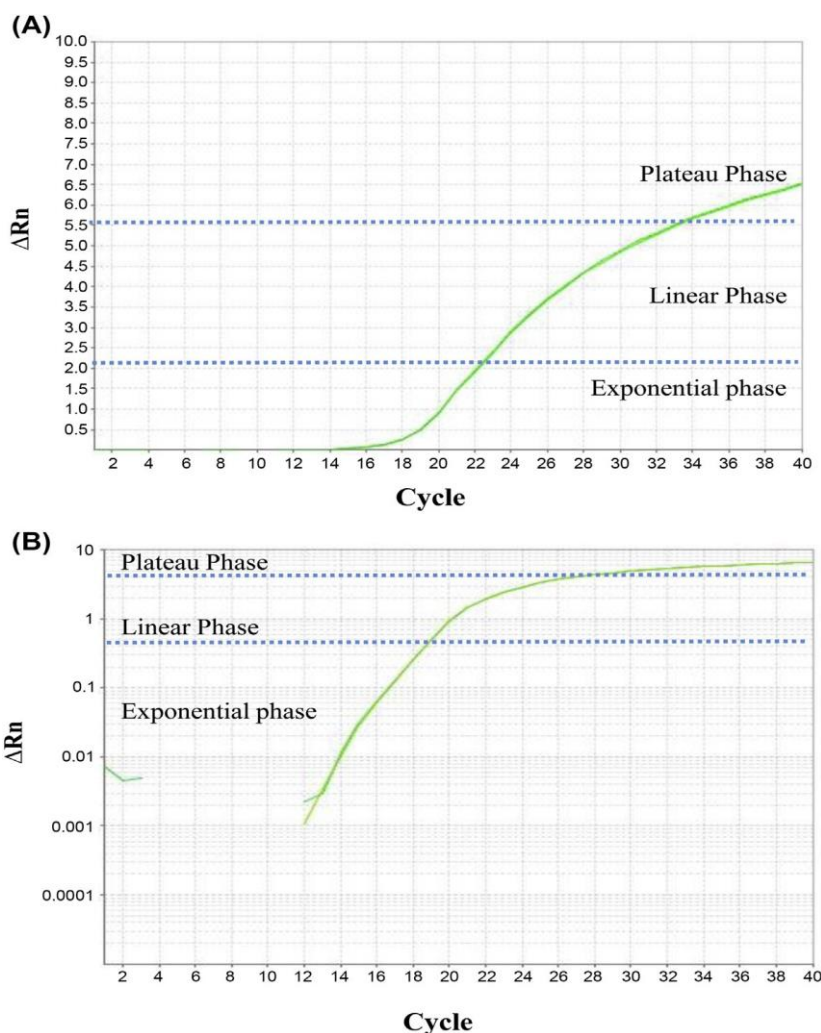


**Εικόνα 37 | Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.** Διακρίνονται τα στάδια της αποδιάταξης (denaturation), υβριδισμού (annealing) και επέκτασης (elongation). Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για 35-40 κύκλους. [Πηγή: George P. PatrinosΦ, Wilhelm Ansorge, Phillip B. Danielson - Molecular Diagnostics, Academic Press, 2016:42]

Με την επανάληψη των παραπάνω βημάτων, συνήθως 30-40 φορές, η αλληλουχία DNA του γονιδίου-στόχου ενισχύεται εκθετικά, οδηγώντας σε δισεκατομμύρια αντίγραφα του αμπλικονίου (amplicon). Η αλληλουχία των χρονικών φάσεων σε μία αντίδραση PCR είναι η εξής (Εικ. 38):

1. Εκθετική ενίσχυση: Σε κάθε κύκλο, η ποσότητα του προϊόντος διπλασιάζεται (υποθέτοντας 100% αποδοτικότητα). Η αντίδραση είναι πολύ ευαίσθητη και ειδική.

2. Γραμμική φάση: Η αντίδραση επιβραδύνεται, λόγω ελαττωμένης δραστηριότητας της *Taq* πολυμεράσης και της κατανάλωσης των αντιδραστηρίων, των dNTPs και των εκκινήτων.
3. Φάση «πλατώ» (plateau): Η αντίδραση έχει ολοκληρωθεί λόγω εξάντλησης των dNTPs και της *Taq* πολυμεράσης.



**Εικόνα 38 | Τυπική πορεία μίας PCR αντίδρασης.** Αποτελείται από τρεις φάσεις: εκθετική (exponential), γραμμική (linear), φάση «πλατώ» (plateau) σε γραμμική (A) και λογαριθμική (B) κλίμακα. Στις γραφικές παραστάσεις στον οριζόντιο άξονα απεικονίζεται ο αριθμός των κύκλων ενώ στον κάθετο άξονα απεικονίζεται η ένταση του σήματος  $\Delta R_n$  (η διαφορά μεταξύ του φθορισμού εκπομπής συγκεκριμένου σημείου και του αρχικού φθορισμού ή του βασικού φθορισμού που έχει οριστεί). [Πηγή: George P. Patrinos, Wilhelm Ansorge, Phillip B. Danielson - Molecular Diagnostics, Academic Press 2016:42]

Ο Kary Mullis περιέγραψε για πρώτη φορά την αντίδραση τη δεκαετία του 1980 και έλαβε το βραβείο Nobel το 1993(535). Η κλασική τεχνική PCR τελικού σημείου μετράει τον σχηματισμό προϊόντος DNA στη φάση του «πλατώ» μετά από έναν αριθμό κύκλων, δίνοντας ποιοτικές πληροφορίες για το γονίδιο στόχο ή το mRNA χωρίς να προσδιορίζει την ακριβή ποσότητα του

DNA ή του RNA. Έκτοτε έχουν περιγραφεί πολλές παραλλαγές και εφαρμογές αυτής της κλασικής PCR του τελικού σημείου, όπως η ημιποσοτική PCR, η ποσοτική PCR ανταγωνισμού και η πιο πρόσφατη καινοτομία, η PCR πραγματικού χρόνου. Η ημιποσοτική μέθοδος μετράει την ποσότητα ενός προϊόντος PCR κατά την εκθετική φάση της αντίδρασης, απαιτώντας τη διακοπή της αντίδρασης μετά από έναν πειραματικά δοκιμασμένο αριθμό κύκλων, ενώ η ανάλυση γίνεται σε μικρή σχετικά γραμμική κλίμακα. Μία άλλη μέθοδος όπως η PCR ανταγωνισμού παρέχει ποσοτικά δεδομένα, ωστόσο απαιτεί πολύ προσεκτικό σχεδιασμό, καθώς ενισχύεται μαζί με το υπό μελέτη δείγμα και ένας εσωτερικός μάρτυρας (cDNA). Σε αυτήν την περίπτωση η ποσοτικοποίηση πραγματοποιείται μέσω τιτλοποίησης μίας άγνωστης ποσότητας του υπό μελέτη δείγματος έναντι διαδοχικών συγκεντρώσεων ενός πρότυπου δείγματος γνωστής συγκέντρωσης. Ο εσωτερικός μάρτυρας αποτελεί DNA-στόχος ο οποίος έχει τροποποιηθεί ελαφρά. Έτσι ενώ σχεδιάζεται ένα μοναδικό ζεύγος ενισχυτών που ενισχύει και το γονίδιο-στόχο και τον ανταγωνιστή μάρτυρα με την ίδια απόδοση, τα δύο εναλλακτικά προϊόντα είναι δυνατόν να διακριθούν μεταξύ τους (π.χ. λόγω διαφορετικού μήκους, διαφορετικών θέσεων αναγνώρισης ενζύμων περιορισμού). Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τον ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό, αλλά η κατασκευή των εσωτερικών μαρτύρων είναι απαιτητική και χρονοβόρα από τεχνικής απόψεως(536).

Η ανίχνευση των προϊόντων των παραπάνω τεχνικών PCR μπορεί να γίνει με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου ή με χρωστική SYBR Green), με σήμανση με φθορισμό ή ραδιενέργεια και ανάλυση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, και ανάλυση κατά Southern. Τα κύρια μειονεκτήματα αυτών των μεθόδων είναι ότι είναι χρονοβόρες διαδικασίες ενώ οι χρησιμοποιούμενες χημικές ουσίες είναι επικίνδυνες και ο κίνδυνος εργαστηριακής μόλυνσης υψηλός.

Μία νέα μέθοδος ανάλυσης και ποσοτικού προσδιορισμού του DNA ή του RNA εισήχθη στα μέσα της δεκαετίας του 1990, η οποία βασίζεται στη μέθοδο PCR κινητικής-φθορισμού και επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό των προϊόντων της PCR πραγματικού χρόνου. Αυτή η μέθοδος χαρακτηρίζεται από υψηλή ακρίβεια και ευαισθησία καθώς επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό των προϊόντων της PCR κατά την εκθετική φάση. Εν αντιθέσει με τις κλασικές τεχνικές ο σχεδιασμός της επιτρέπει να εξάγονται δεδομένα κατά τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού χωρίς να απαιτούνται χειρισμοί μετά την PCR. Όπως ήταν φυσικό έφερε επανάσταση στη μοριακή έρευνα και διαγνωστική. Η RT-qPCR (Reverse Transcriptase q-PCR) επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό του RNA και εισήχθη στη μοριακή διαγνωστική την ίδια περίπου περίοδο με την qPCR. Η μόνη διαφορά με την προηγούμενη είναι η ύπαρξη ενός επιπλέον

βήματος, τη μετατροπή του RNA σε συμπληρωματικό DNA (cDNA). Ακολουθεί την ίδια εκθετική αύξηση αν και σε μικρότερο βαθμό(537, 538, 539).

### **7.6.2 Βασικές αρχές της PCR σε πραγματικό χρόνο**

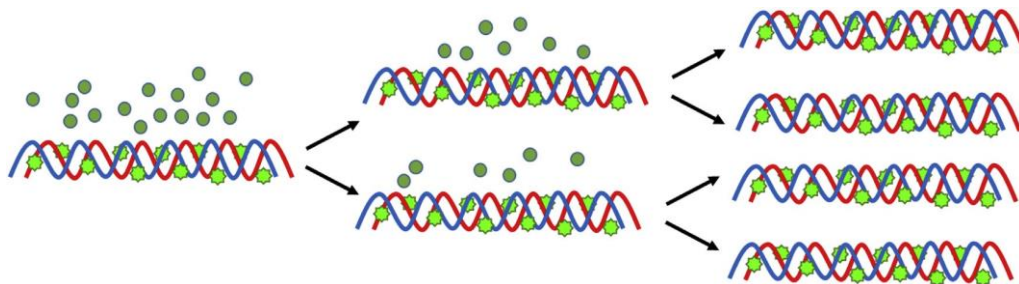
Μία δεκαετία μετά την εισαγωγή της κλασικής PCR τελικού σημείου, η εισαγωγή των διπλά-επισημασμένων ολιγονουκλεοτιδικών ανιχνευτών οδήγησε στην qPCR (quantitative PCR). Με τα χρόνια εισήχθησαν διαφορετικές μέθοδοι ανίχνευσης, οι οποίες χρησιμοποιούνται σήμερα. Αυτές αποτελούν τους ανιχνευτές υδρόλυσης (κλασικό σύστημα TaqMan), τις χρωστικές που παρεμβάλλονται στο DNA, τους ανιχνευτές υβριδοποίησης, τους μοριακούς φάρους, τους «σκορπιούς», καθώς και άλλες τεχνικές όπως οι ανιχνευτές δέσμευσης στη μικρή αύλακα (Minor Groove Binding Probes), οι ανιχνευτές-εκκινητές και τα τροποποιημένα νουκλεϊκά οξέα. Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα είναι ο συνδυασμός της τεχνικής των χρωστικών που παρεμβάλλονται στο DNA και των τροποποιημένων νουκλεϊκών οξέων, οι οποίες θα αναλυθούν παρακάτω.

### **7.6.3 PCR σε πραγματικό χρόνο με χρωστικές που παρεμβάλλονται στο DNA**

Η τεχνική των χρωστικών που παρεμβάλλονται στο DNA (DNA intercalating dyes) προσδιορίζει ποιοτικά και ποσοτικά τα προϊόντα PCR μέσω φθορίζουσών χρωστικών που παρεμβάλλονται στο DNA(539). Η ενσωμάτωση των χρωστικών αυτών στο DNA αποδίδει φθορισμό ο οποίος καταγράφεται. Περιγράφηκε αρχικά από τον Higuchi το 1993 ο οποίος παρακολούθησε την αύξηση του φθορισμού του βρωμιούχου αιθιδίου με τη χρήση μιας κάμερας CCD (Charged Coupled Device) ή «συσκευή (διάταξη) συζευγμένου φορτίου». Η μέθοδος αυτή ονομάστηκε «PCR της κινητικής».

Λίγο αργότερα η χρωστική SYBR Green I (N',N'-dimethyl-N-[4-[(E)-(3-methyl-1,3-benzothiazol-2-ylidene)methyl]-1-phenylquinolin-1-ium-2-yl]-N-propylpropane-1,3-diamine), μία ασύμμετρη χρώση κυανίνης, η οποία είναι λιγότερο τοξική από το βρωμιούχο αιθίδιο και ενσωματώνεται στο dsDNA, κατέστη ευρέως χρησιμοποιούμενη(540). Λίγο αργότερα εμφανίστηκαν και άλλες τεχνικές όπως η SYBR Green Save, EvaGreen, SYBR Gold, SYTO, BEBO (4-[(3-methyl-6-(benzothiazole-2-yl)-2,3-dihydro-(benzo-1,3-thiazole)-2-methylidene)]-1-methyl-pyridinium iodide) (541) και BOXTO (4-[6-(benzoxazole-2-yl-(3-methyl-)-2,3-dihydro-(benzo-1,3-thiazole)-2-methylidene)]-1-methyl-quinolinium chloride)(542). Όλες αυτές οι χρωστικές ενσωματώνονται στην ελάσσονα αύλακα του dsDNA, οδηγώντας σε μεγάλη αύξηση του φθορισμού του. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης η ποσότητα του δίκλωνου τμήματος που μελετάται αυξάνεται εκθετικά με παράλληλη αύξηση της ενσωμάτωσης και του φθορισμού της

χρωστικής. Σε κάθε κύκλο, ο εκπεμπόμενος φθορισμός αυξάνεται σταδιακά κατά τη φάση επιμήκυνσης της αντίδρασης, ενώ είναι μικρός ή απουσιάζει εντελώς κατά τη φάση της αποδιάταξης (Εικ. 39).

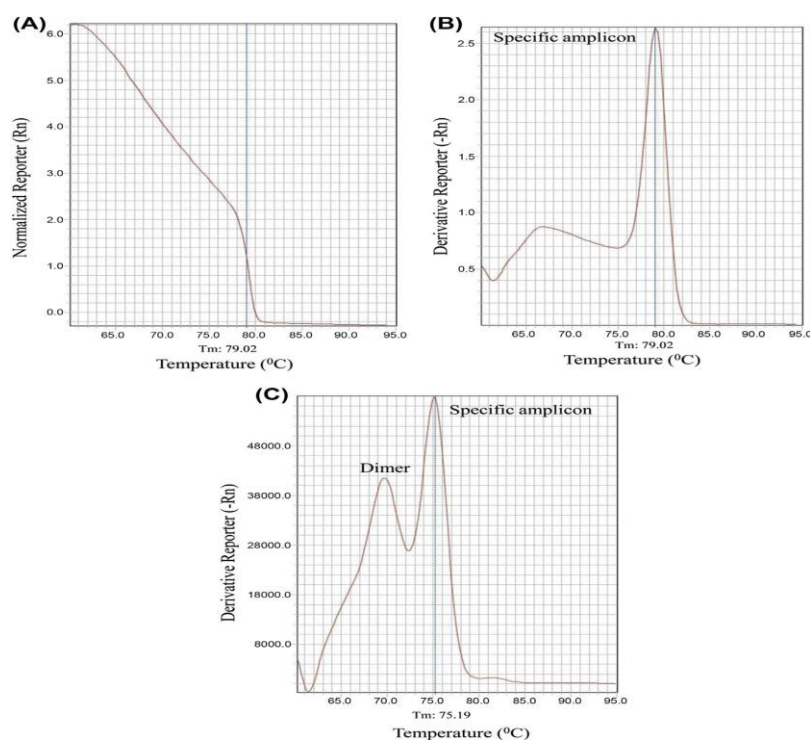


**Εικόνα 39 | Χρωστικές που παρεμβάλλονται στο DNA.** Οι χρωστικές παρεμβάλλονται στην μικρή αύλακα του dsDNA. Στο διάλυμα όταν είναι ελεύθερες δεν εκπέμπουν φθορισμό (πράσινος κύκλος), ενώ όταν παρεμβάλλονται στο dsDNA η χρωστική εκπέμπει φθορισμό (πράσινο αστέρι). [Πηγή: George P. Patrinos, Wilhelm Ansorge, Phillip B. Danielson - Molecular Diagnostics, Academic Press 2016:45]

Ωστόσο έχουν αναφερθεί κάποια μειονεκτήματα από τη χρήση της SYBR Green I σε σχέση με τις υπόλοιπες χρωστικές, όπως η αναστολή της PCR ενίσχυσης σε μεγάλη συγκέντρωση, η επίδραση στη θερμοκρασία τήξης του PCR προϊόντος και η επιλεκτική πρόσδεση σε ακολουθίες DNA(543). Παρόλα αυτά το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της χρήσης αυτών των χρωστικών σε σχέση με τη χρήση ανιχνευτών σημασμένων με φθορισμό είναι ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν με οποιοδήποτε ζεύγος εκκινητών και σε οποιοδήποτε στόχο. Επίσης είναι οικονομικά φθηνότερες και απαιτούν λιγότερο εξειδικευμένες γνώσεις από ότι ο σχεδιασμός ανιχνευτών σημασμένων με φθορισμό. Αντίστοιχα, η ειδικότητα τους είναι μικρότερη λόγω του κινδύνου πολλαπλασιασμού μη ειδικών προϊόντων της PCR ή διμερών των εκκινητών.

Η διάκριση ειδικών από μη ειδικά προϊόντα της PCR υλοποιείται από την εκτέλεση ανάλυσης με καμπύλη τήξης (melting curve analysis), μετά τον τερματισμό της PCR(544). Με αυτόν τον τρόπο το κλάσμα του φθορισμού που προέρχεται από τον ειδικό στόχο μπορεί να διακριθεί από το φθορισμό που προέρχεται από διμερή εκκινητή ή από προϊόντα μη ειδικού πολλαπλασιασμού. Η βασική μέθοδος της ανάλυσης είναι η σταδιακή αύξηση από τους 60°C στους 95°C, όπου παρακολουθείται συνεχώς η εκπομπή του φθορισμού. Η εκπομπή φθορισμού θα είναι υψηλή σε χαμηλές θερμοκρασίες (όταν όλα τα προϊόντα της PCR είναι δίκλιωνα) και ελαττώνεται δραματικά στην θερμοκρασία τήξης του PCR προϊόντος. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο γεγονός ότι τα προϊόντα της PCR με διαφορετικό μήκος ή ποσοστό γουανίνης-κυτοσίνης έχουν διαφορετικές θερμοκρασίες τήξης και άρα διακριτές κορυφές στη γραφική παράσταση της πρώτης αρνητικής παραγώγου του φθορισμού έναντι της θερμοκρασίας. Έτσι για παράδειγμα τα διμερή εκκινητών λόγω του μικρότερου μήκους τους έχουν χαμηλότερη θερμοκρασία τήξης και άρα εμφανίζεται

κορυφή σε χαμηλότερη θερμοκρασία σε σχέση με το ειδικό PCR προϊόν ενώ σε περίπτωση επιμόλυνσης του δείγματος από γενωμικό DNA εμφανίζεται κορυφή σε υψηλότερη θερμοκρασία, η οποία και θα αποτυπωθεί στη γραφική παράσταση επιμόλυνσης του δείγματος από γενωμικό DNA (Εικ. 40).



**Εικόνα 40 | Ανάλυση με καμπύλη τήξης με τη χρήση χρωστικών που παρεμβάλλονται στο DNA.**

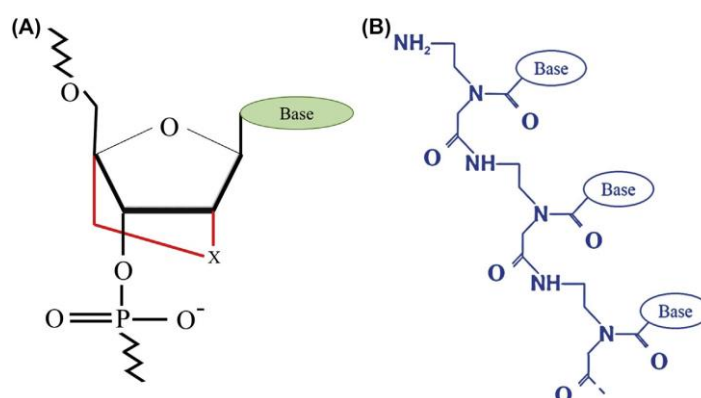
A. Με τη μετατροπή του dsDNA σε ssDNA λόγω σταδιακής αύξησης θερμοκρασίας πέφτει απότομα η εκπομπή φθορισμού. B, C. Γραφικές παραστάσεις της πρώτης αρνητικής παραγώγου του φθορισμού στον κάθετο άξονα και της θερμοκρασίας στον οριζόντιο άξονα. Στην περίπτωση ειδικού προϊόντος παρατηρείται μονήρης κορυφή (B), ενώ στην περίπτωση διμερών-εκκινητών δεύτερη κορυφή σε μικρότερη θερμοκρασία (C). [Πηγή: George P. Patrinos, Wilhelm Ansorge, Phillip B. Danielson - Molecular Diagnostics, Academic Press 2016:45]

#### 7.6.4 PCR σε πραγματικό χρόνο με τη χρήση τροποποιημένων νουκλεϊκών οξέων

Στις κλασικές τεχνικές της ποσοτικής PCR οι ανιχνευτές και οι εκκινητές συντίθενται με βάση κλασικά νουκλεϊκά οξέα. Σε συγκεκριμένες περιπτώσεις ωστόσο χρησιμοποιούνται συνθετικά ανάλογα. Αυτή είναι η περίπτωση των LNA (Locked Nucleic Acid) ανιχνευτών. Το LNA είναι ένα χημικά επεξεργασμένο RNA μόριο, στο οποίο ο δακτύλιος ριβόζης έχει μία επιπλέον γέφυρα η οποία συνδέει το 2' οξυγόνο με τον 4' άνθρακα (Εικ. 41). Αυτή η τροποποίηση αυξάνει



εξαιρετικά την συγγένεια υβριδισμού του ανιχνευτή με το DNA ή το RNA. Λόγω αυτών των ιδιοτήτων καθίσταται δυνατός ο σχεδιασμός πολύ μικρών ανιχνευτών με μεγάλη συγγένεια σύνδεσης, καθιστώντας τους κατάλληλους για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση SNPs ή miRNA. Για κάθε μονομερές LNA αυξάνεται η θερμοκρασία τήξης ( $T_m$ ) του υβριδίου RNA:DNA κατά 2-8°C. Η στοχευμένη ενσωμάτωση των LNAs εντός των εκκινητών καθιστά δυνατή την διάκριση μεταξύ όμοιων αλληλουχιών, οι οποίες ενίοτε διαφέρουν κατά ένα νουκλεοτίδιο. Άλλα παραδείγματα αφορούν τα PNAs (Peptide Nucleic Acids) (545, 546) και τη χρήση του συστήματος Plexor™ (547) που χρησιμοποιεί την ισογουανίνη και την 5'-methylisocytosine, τα οποία δεν θα αναλυθούν στην παρούσα εργασία.



*Εικόνα 41 | Δομή LNA (A) και PNA (B).* [Πηγή: George P. Patrinos, Wilhelm Ansorge, Phillip B. Danielson - Molecular Diagnostics, Academic Press 2016:48]

### 7.6.5 Θερμοκυκλοποιητές πραγματικού χρόνου

Από την ανάπτυξη της μεθόδου στα μέσα της δεκαετίας του 1990 τα όργανα έχουν υποστεί σημαντικές αλλαγές. Ο πρώτος θερμοκυκλοποιητής 7700 SDS από την Applied Biosystems καταλάμβανε σχεδόν έναν ολόκληρο εργαστηριακό πάγκο εργασίας, χρησιμοποιούσε ένα δαπανηρό λέιζερ ως πηγή φωτός και μπορούσε να εγκατασταθεί μόνο σε κλιματιζόμενο χώρο. Τα δεδομένα λαμβάνονταν επίσης μόνο μετά το πέρας της αντίδρασης. Με την εξέλιξη της τεχνολογίας, αναπτύχθηκαν συστήματα που είχαν την δυνατότητα ανίχνευσης του PCR προϊόντος καθώς αυτό σχηματιζόταν, δηλαδή σε πραγματικό χρόνο. Τα νεότερα μηχανήματα είναι πολύ μικρότερα σε μέγεθος, χρησιμοποιούν οικονομικότερες λυχνίες βολφραμίου-αλογόνου ή διόδους εκπομπής φωτός. Επιπρόσθετα έχουν αναπτυχθεί φορητές συσκευές για επιτόπια ανάλυση, όπως σε περιπτώσεις προσδιορισμού των παθογόνων σε εξάρσεις. Η ανάπτυξη μεγάλης ποικιλίας μηχανημάτων από διαφορετικές εταιρείες έχει οδηγήσει σε πτώση του κόστους, καθιστώντας τα μέρος του βασικού εξοπλισμού μοριακών και διαγνωστικών εργαστηρίων.

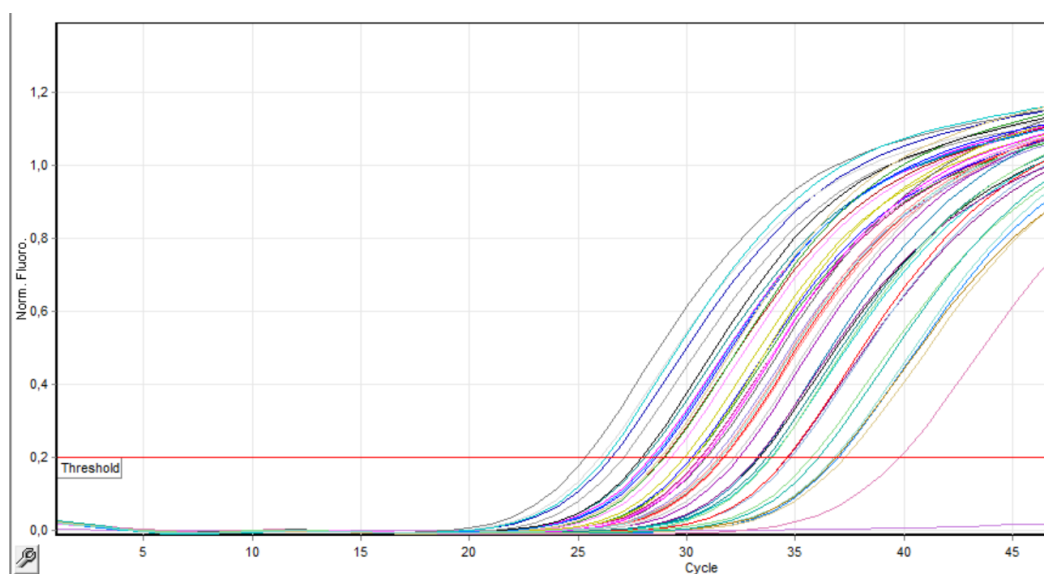
Όλες οι πιθανές εφαρμογές της qPCR μπορούν να πραγματοποιηθούν σε όλα τα μηχανήματα, ωστόσο κάθε μηχανήμα υπερτερεί σε ορισμένες εφαρμογές της qPCR κυρίως σε ό,τι αφορά την ειδικότητα και την ευαισθησία, την ταχύτητα και το κόστος. Για την ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης, η διάρκεια της αντίδρασης δεν είναι ο σημαντικότερος παράγοντας, αλλά αντίθετα πρέπει να επιλεγεί μια συσκευή που να έχει τη δυνατότητα μεγάλου αριθμού δειγμάτων. Οι περισσότεροι θερμοκυκλοποιητές έχουν δυνατότητα πολλαπλής PCR (multiplex PCR), διαθέτουν υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια και προσφέρουν λογισμικό φιλικό προς το χρήστη.

### 7.6.6 Λήψη δεδομένων

Η δυνατότητα παρακολούθησης της διεργασίας του πολλαπλασιασμού σε πραγματικό χρόνο, κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης της αντίδρασης PCR, επέφερε επανάσταση στον τρόπο λήψης των δεδομένων. Στην αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου οι αντιδράσεις συνήθως χαρακτηρίζονται από το χρονικό σημείο (τον κύκλο πολλαπλασιασμού) στο οποίο η ποσότητα του προϊόντος της PCR υπερβαίνει το κατώφλι ανίχνευσης. Επιπλέον, ο ποσοτικός προσδιορισμός βασίζεται σε μια εγγενή ιδιότητα της αντίδρασης PCR, ότι δηλαδή όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός μορίων DNA στην αρχή της αντίδρασης τόσο μικρότερος είναι ο αριθμός των κύκλων πολλαπλασιασμού που χρειάζονται για να παραχθεί ένας ορισμένος αριθμός προϊόντων. Η ανάλυση PCR πραγματικού χρόνου αξιοποιεί το γεγονός ότι η παραγωγή του προϊόντος συσχετίζεται γραμμικά με τον εκπεμπόμενο φθορισμό, ο οποίος μετράται κατά την πορεία της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο. Η αύξηση του εκπεμπόμενου φθορισμού αποτελεί επομένως άμεση συνέπεια του πολλαπλασιασμού του μορίου-στόχου κατά την PCR(548).

Στην τυπική γραφική παράσταση πολλαπλασιασμού κατά την PCR στους πρώτους κύκλους της αντίδρασης παρατηρείται μικρή ή μηδενική μεταβολή στο φθορισμό. Οι τιμές αυτές στο στάδιο αυτό αποτελούν το βασικό επίπεδο (baseline). Σε κάθε χρονικό σημείο κατά την πορεία των κύκλων της PCR μετράται η εκπομπή φθορισμού από το προϊόν και ορίζεται ως  $Rn^+$ . Αναλογικά  $Rn^-$  είναι η εκπομπή φθορισμού στο βασικό επίπεδο. Η αύξηση του φθορισμού υπολογίζεται από το πρόγραμμα του ηλεκτρονικού υπολογιστή και παρίσταται γραφικά στον άξονα y ως τιμή  $\Delta Rn$ , σύμφωνα με την εξίσωση  $\Delta Rn = Rn^+ - Rn^-$ . Συνεπώς η τιμή αυτή εξαρτάται από τον σχηματισμό του ειδικού προϊόντος της PCR. Το όριο ανίχνευσης (threshold) επιλέγεται αυθαίρετα με βάση τη διακύμανση της τιμής του βασικού επιπέδου. Ως όριο συνήθως επιλέγεται το δεκαπλάσιο της τυπικής απόκλισης του βασικού επιπέδου, όπως αυτό υπολογίζεται από τον κύκλο 3 έως τον κύκλο 15. Ως κύκλος ορίου (threshold cycle, Ct) ορίζεται το σημείο στο οποίο η τιμή της  $\Delta Rn$  υπερβαίνει το επιλεγμένο όριο. Η τιμή Ct αντιστοιχεί στον αριθμό του κύκλου στο συγκεκριμένο σημείο. Κατά συνέπεια, οι τιμές Ct μειώνονται γραμμικά καθώς αυξάνεται η αρχική

ποσότητα του μορίου-στόχου. Η τιμή Ct χρησιμοποιείται για την ποσοτική μέτρηση του μορίου-στόχου που προστέθηκε στην αντίδραση της αντίδρασης PCR (Εικ. 42).



Εικόνα 42 | Προσδιορισμός Ct μέσω ορισμού ορίου ανίχνευσης.

#### 7.6.7 Ποσοτικός προσδιορισμός με τη μέθοδο του συγκριτικού Ct

Μία μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον σχετικό ποσοτικό προσδιορισμό είναι η μέθοδος συγκριτικού Ct, η αλλιώς μέθοδος  $\Delta\Delta Ct$  (549). Τα επίπεδα της σχετικής έκφρασης υπολογίζεται στη μέθοδο αυτή με τη βοήθεια αριθμητικών τύπων, σε σύγκριση με έναν βαθμονομητή (calibrator). Ως calibrator μπορεί π.χ. να χρησιμοποιηθεί ένα δείγμα-μάρτυρας το οποίο δεν έχει υποστεί πειραματική επεξεργασία. Η τιμή έπειτα κανονικοποιείται με βάση ένα ενδογενές γονίδιο σταθερής έκφρασης («housekeeping gene»). Η ποσότητα του στόχου, σε σχέση με το βαθμονομητή και μετά από κανονικοποίηση για το ενδογενές γονίδιο, υπολογίζεται από τον τύπο  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , όπου  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{δείγματος}} - \Delta Ct_{\text{βαθμονομητή}}$ . Ως  $\Delta Ct$  επίσης ορίζεται η διαφορά της τιμής Ct του γονιδίου-στόχου από την τιμή Ct του γονιδίου σταθερής έκφρασης. Με αυτόν τον τρόπο ο μαθηματικός τύπος δίνει την κανονικοποιημένη έκφραση του γονιδίου-στόχου στο άγνωστο δείγμα, σε σχέση με την κανονικοποιημένη έκφραση του δείγματος βαθμονομητή. Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται μόνο όταν η απόδοση του πολλαπλασιασμού του γονιδίου στόχου και του γονιδίου σταθερής έκφρασης, μέσω της PCR, είναι σχεδόν ίσες.

#### 7.6.8. Πειραματική εκτέλεση real-time RT-qPCR

Τα QuantiNova LNA PCR Assays που χρησιμοποιήθηκαν έχουν περάσει από αυστηρό ποιοτικό έλεγχο κατά ISO σύστημα από την εταιρία Qiagen. Παρακάτω δίνονται οι αλληλουχίες κάθε αμπλικονίου για τα *BMP-2*, *BMP-6* και *Smad6* και  *$\beta 2$ -microglobulin* γονίδια.

*BMP-6*, ENST00000283147.7, RefSeq NM\_001718.6;NM\_001718, Chr.6: 7726099 – 7881728, εξώνια 4-5, εξώνιο 7

AMPLICON: Έναρξη: 2008 bp, Μήκος: 108 bp, Συνολικό μήκος: 3784 bp

2008 5' GTC GTAATCGCTC TACCAGTCC CAGGACGTGG CGCGGGTCTC CAGTGCTTCA  
2061 GATTACAACA GCAGTGAATT GAAAACAGCC TGCAGGAAGC ATG 3'

*BMP-2*, ENST00000378827, RefSeq NM\_001200.4;NM\_001200, Chr.20: 6767686 – 6780246, εξώνια 1-2, εξώνιο 3

AMPLICON: Έναρξη: 1136 bp, Μήκος: 102 bp, Συνολικό μήκος: 3545 bp

1136 5' TCTTT CAATGGACGT GTCCCCGCGT GCTTCTTAGA CGGACTGCGG  
1181 TCTCCTAAG GTCGACCATG GTGGCCGGGA CCCGCTGTCT  
1221 TCTAGCGTTG CTGCTTCC 3'

*Smad6*, ENST00000288840, RefSeq NM\_005585.5;NM\_005585, Chr.15: 66702236 – 66782849, εξώνια 3-4

AMPLICON: Έναρξη: 1898 bp, Μήκος: 88 bp, Συνολικό μήκος: 3828 bp

1898 5' TC TGTCCGATTC CACATTGTCT TACTGAAA CGGAGGCTAC CAACTCCCTC  
1950 ATCACTGCTC CGGGTGAATT CTCAGACGCC AGCATG 3'

*β2-microglobulin*, ENST00000648006, RefSeq NM\_004048.4, Chr.15: 44711517 – 44718877, εξώνια 1-2

AMPLICON: Έναρξη: 18 bp, Μήκος: 98 bp, Συνολικό μήκος: 943 bp

18 5' AGCAT TCGGGCCGAG ATGTCTCGCT CCGTGGCCTT AGCTGTGCTC  
61 GCGCTACTCT CTCTTCTGG CCTGGAGGCT ATCCAGCGTA CTCCAAAGAT  
111 TCAGGT 3'

To QuantiNova SYBR Green PCR Master Mix περιλαμβάνει την QuantiNova DNA πολυμεράση και το QuantiNova SYBR Green PCR Buffer. Η σύνθεση τους εξασφαλίζει υψηλή ακρίβεια και ευαισθησία οδηγώντας σε ελάττωση του χρόνου των σταδίων της αποδιάταξης και του υβριδισμού/επέκτασης. Η QuantiNova DNA πολυμεράση είναι απενεργοποιημένη σε θερμοκρασία δωματίου και υψηλότερες θερμοκρασίες. Ο μηχανισμός hot-start (εκκίνηση σε υψηλή θερμοκρασία), ο οποίος διαμεσολαβείται μέσω αντισώματος αποτρέπει το σχηματισμό και την επέκταση μη ειδικών PCR προϊόντων και διμερών-εκκινητών κατά την έναρξη της αντίδρασης

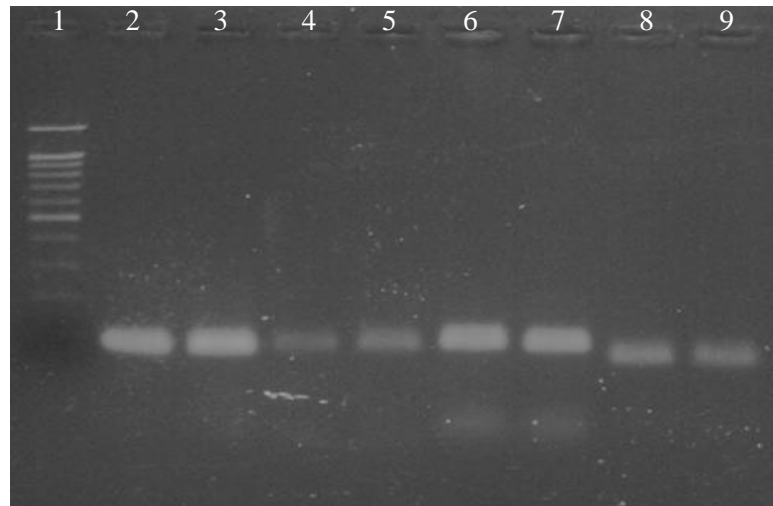
και της αποδιάταξης. Επομένως ο μηχανισμός επιτρέπει υψηλότερη ειδικότητα και ακριβέστερη ποσοτικοποίηση. Η DNA πολυμεράση απελευθερώνεται από το QuantiNova Antibody και τον συνδεδεμένο QuantiNova Guard όταν η θερμοκρασία αυξηθεί στους 95°C.

Η κανονικοποίηση χρησιμοποιείται για την αποφυγή της τεχνικής και βιολογικής διακύμανσης μεταξύ των δειγμάτων που δεν ερμηνεύονται υπό το πρίσμα των εξεταζόμενων βιολογικών φαινομένων. Για αυτόν το λόγο χρησιμοποιούνται γονίδια αναφοράς που είναι σταθερά εκφραζόμενα. Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε η *β2-μικροσφαιρίνη*, η οποία αποτελεί μέρος του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης I και εκφράζεται σε όλα τα εμπύρνα κύτταρα.

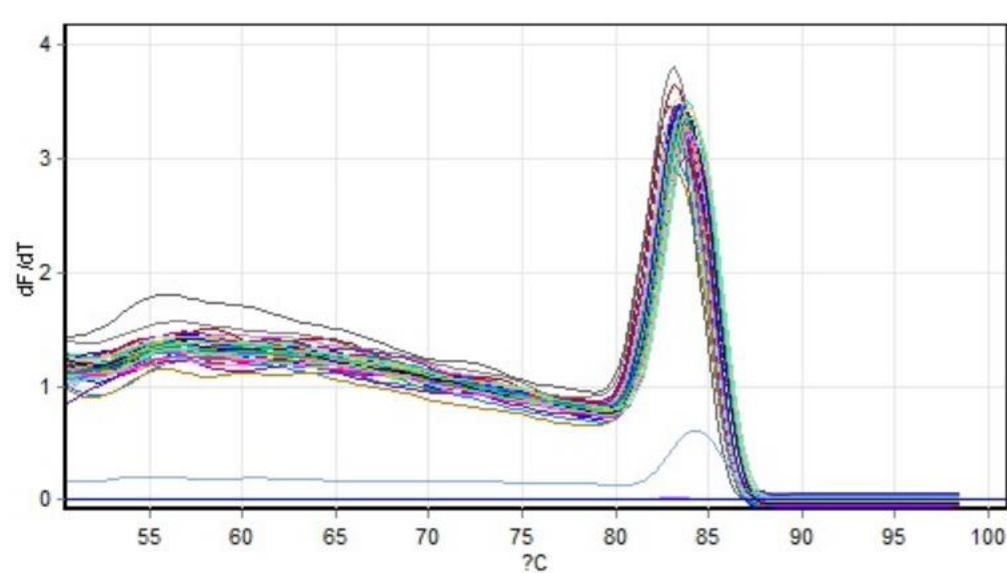
Η διαδικασία περιλαμβάνει την απόψυξη σε θερμοκρασία δωματίου των QuantiNova SYBR Green PCR Master Mix, QuantiNova LNA PCR Assay, αποστειρωμένου νερού και του cDNA. Τα δείγματα cDNA αραιώθηκαν σε αναλογία 1:25 και χρησιμοποιήθηκαν 20ng cDNA για την αντίδραση. Χρησιμοποιήθηκαν για κάθε αντίδραση RT-qPCR 10 μL QuantiNova SYBR Green PCR Master Mix, 2 μL QuantiNova LNA PCR Assay και 6 μL αποστειρωμένου νερού. Το μίγμα αναδεύεται επαρκώς και μοιράζεται σε κάθε σωληνάριο αντίδρασης. Στην συνέχεια προστίθενται 2 μL δείγματος cDNA σε κάθε σωληνάριο, το οποίο σφραγίζεται και ονοματοδοτείται. Στην συνέχεια εισάγονται οι ρυθμίσεις του θερμοκυκλοποιητή:

1. Θερμική ενεργοποίηση (hot-start): 2 λεπτά στους 95 °C, προκειμένου να ενεργοποιηθεί η DNA πολυμεράση
2. Αποδιάταξη για 5 sec στους 95 °C
3. Συνδυασμένος υβριδισμός και επέκταση για 10 sec στους 60 °C

Τα βήματα 2 και 3 επαναλαμβάνονται 45 φορές (45 κύκλοι) και εν συνεχεία μετά το πέρας της διαδικασίας μπορεί να διενεργηθεί είτε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης (Εικ. 43) είτε να διενεργηθεί καμπύλη τήξης (Εικ. 44) όπου δίνονται οι θερμοκρασίες τήξης του κάθε αμπλικονίου από την εταιρία.



*Εικόνα 43* | Ηλεκτροφόρηση προϊόντων RT-qPCR. Θέση 1: μάρτυρας, θέσεις 2-3: *β2-microglobulin*, θέσεις 4-5: *BMP-2*, θέσεις 6-7: *BMP-6*, θέσεις 8-9: *Smad6*.



*Εικόνα 44* | Γραφική παράσταση καμπύλης τήξης προϊόντων (melt curve analysis) RT-qPCR. Παρατηρείται μονήρης κορυφή των προϊόντων, υποδεικνύοντας την ειδικότητα της αντίδρασης.

## 8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα στοιχεία που συλλέχθηκαν από τους φακέλους των ασθενών στην Αιματολογική Κλινική του ΠΓΝΑ παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ	ΔΙΑΓΝΩΣΗ (N=20)	ΥΠΟΤΡΟΠΗ (N=19)
Φύλο (Α/Θ)	9/11	7/12
Οστική νόσος	I:10, II:2, III:8	I:2, II:2, III:15
Τύπος Μυελώματος	IgG: 11, IgA: 6, IgM: 1, FLC: 1	IgG: 14, IgA: 1, IgD: 1, IgG+IgA: 1, PCL: 1, Hypog: 1
R-ISS	ISS-1: 6, ISS-2: 11, ISS-3: 3	ISS-1: 2, ISS-2: 15, ISS-3: 2
Θάνατοι	0	3

**Πίνακας 11 | Κλινικοεργαστηριακά ευρήματα και σταδιοποίηση των ασθενών.** Η οστική νόσος ορίζεται ως ήπια (βαθμού I) αν έχουν ανευρεθεί (<2) εστίες, μέτρια (βαθμού II) με ανεύρεση 2-4 εστιών και σοβαρή (βαθμού III) όταν έχουν ανευρεθεί >4 εστίες με απλή ακτινογραφία, WBLDCT, MRI. Μάλιστα σε δύο ασθενείς της ομάδας της νεοδιάγνωσης και έναν της ομάδας της υποτροπής ανευρέθηκε μονήρες πλασματοκύττωμα. Α: Άρρεν, Θ: Θήλυ, Hypog: Hypoglobulinemia, PCL: Plasma Cell Leukemia, R-ISS: Revised International Staging System.

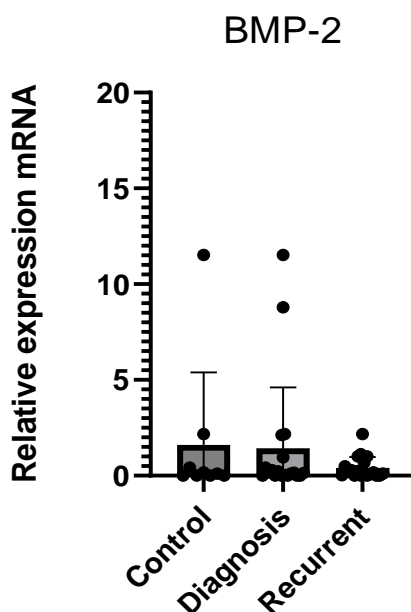
Σε όλους τους ασθενείς στους οποίους διενεργήθηκε οστεομυελική βιοψία έγιναν ανοσοϊστοχημικές χρώσεις έναντι CD138 και ελαφρών κ/λ αλυσίδων προκειμένου να προσδιοριστούν το ποσοστό των πλασματοκυττάρων και η κλωνικότητά τους. Η εξέταση FISH έγινε σε όλους τους ασθενείς προκειμένου να προσδιοριστούν οι κυτταρογενετικές ανωμαλίες και ιδιαίτερα οι t(4;14), t(14;16) και del(17p) οι οποίες σχετίζονται με κακή πρόγνωση.

Για την ανάλυση των στατιστικών αποτελεσμάτων έγινε λογαριθμικός μετασχηματισμός των τιμών των  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , προκειμένου να χρησιμοποιηθούν γραμμικές τιμές και στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε το παραμετρικό t-test με Welch διόρθωση υποθέτοντας άνιση τυπική απόκλιση μεταξύ των δειγμάτων λόγω και της βιολογικής διακύμανσης των επιπέδων του mRNA μεταξύ ασθενών και μαρτύρων. Ως κατώφλι στατιστικά σημαντικής διαφοράς ορίστηκε η τιμή  $p$ -value = 0.05.

### **BMP-2**

Η γραφική παράσταση της σχετικής συγκέντρωσης του BMP-2 αναδεικνύει πως ο μέσος όρος των control είναι  $mean_{control} = 1.6$ , των ασθενών με νέα διάγνωση  $mean_{diagnosis} = 1.568$  και των ασθενών με υποτροπή  $mean_{recurrent} = 0.4$ . Με βάση τα παραπάνω η έκφραση του BMP-2 στους ασθενείς με νέα διάγνωση είναι αμετάβλητη ενώ σε ασθενείς με υποτροπή είναι 4 φορές μικρότερη. Ωστόσο,

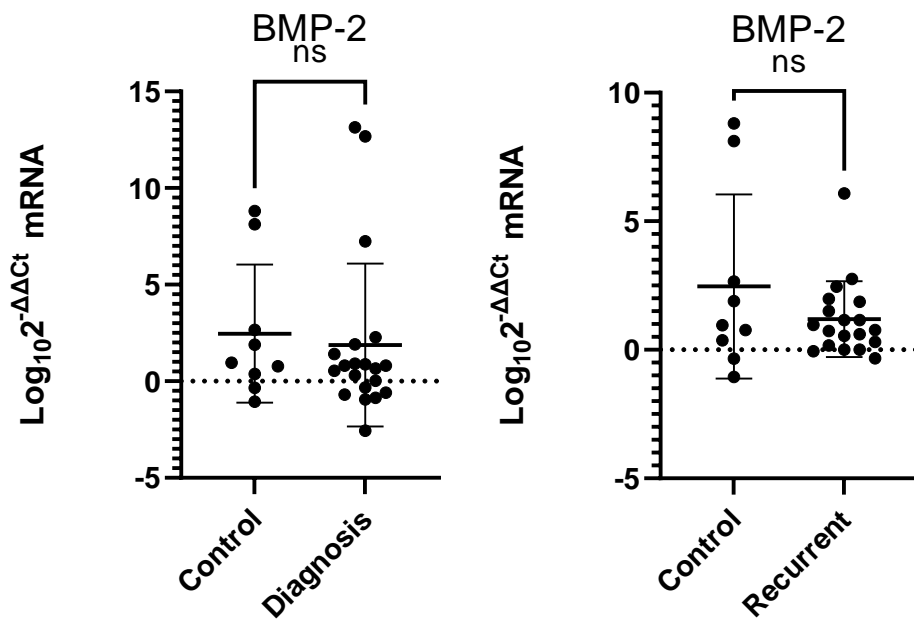
λόγω της εκθετικής φύσης των δεδομένων ο έλεγχος της στατιστικής σημαντικότητας έγινε ύστερα από τη μετατροπή των δεδομένων σε δεκαδική λογαριθμική μορφή (Εικ. 45).



**Εικόνα 45** | Γραφική παράσταση της σχετικής συγκέντρωσης mRNA του *BMP-2* μεταξύ μαρτύρων, ασθενών με νέα διάγνωση και ασθενών με υποτροπή.

Η στατιστική ανάλυση ανέδειξε πως δεν υπάρχει σημαντική διαφορά ( $p = 0.7043$ ) στα επίπεδα του mRNA του *BMP-2* μεταξύ ασθενών με νέα διάγνωση και μαρτύρων. Ο μέσος όρος για τους μάρτυρες είναι  $\text{mean}_{\text{control}} = 2.526$  και για τους ασθενείς  $\text{mean}_{\text{diagnosis}} = 1.94$  και το 95% CI = [-3,779 - 2,606]. Αντίστοιχα δεν αναδείχθηκε στατιστικά σημαντικά διαφορά ( $p = 0.3288$ ) στα επίπεδα του mRNA του *BMP-2* μεταξύ ασθενών σε υποτροπή και μαρτύρων. Ο μέσος όρος για τους μάρτυρες είναι  $\text{mean}_{\text{control}} = 2.526$  και για τους ασθενείς με υποτροπή  $\text{mean}_{\text{recurrent}} = 1.249$  και το 95% CI = [-3,779 - 2,606]. Από τα παραπάνω προκύπτει πως δεν υπάρχει σημαντική αλλαγή στη γονιδιακή έκφραση του *BMP-2* μεταξύ ασθενών με νέα διάγνωση και μαρτύρων καθώς και ασθενών με υποτροπή και μαρτύρων (Εικ. 46).

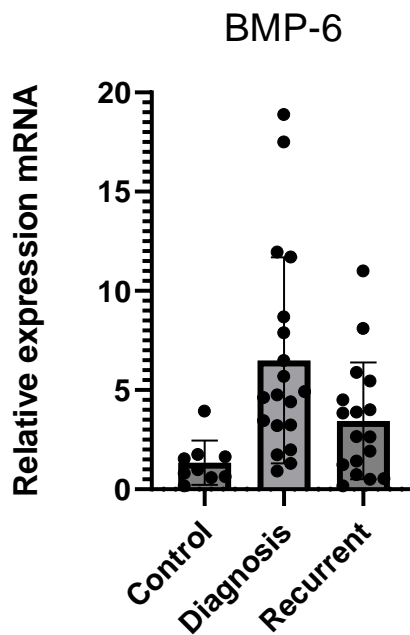




Εικόνα 46 | Γραφικές παραστάσεις απεικόνισης του  $\text{Log}_{10} 2^{-\Delta\Delta C_t}$  της σχετικής συγκέντρωσης mRNA του *BMP-2* μεταξύ μαρτύρων, ασθενών με νέα διάγνωση και ασθενών με υποτροπή. ns: not significant

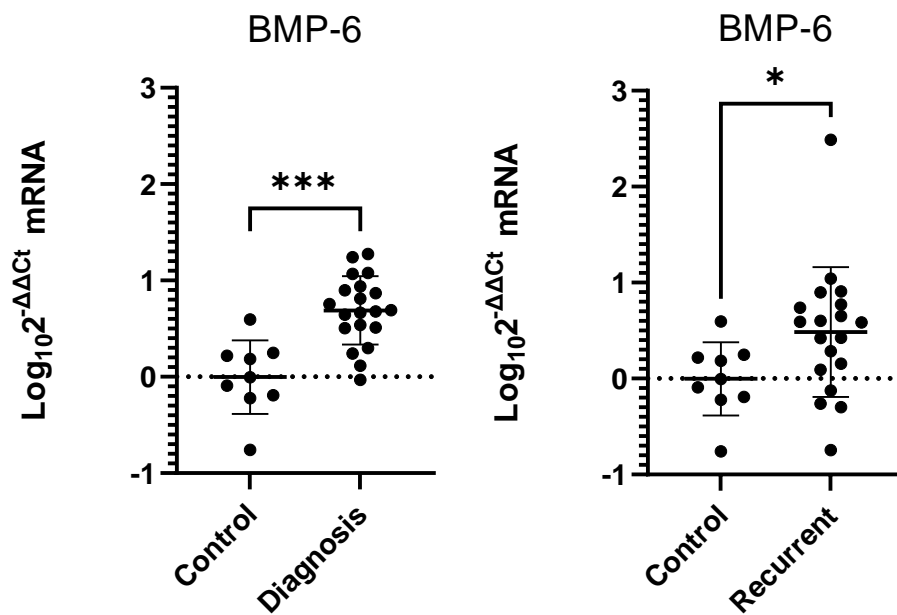
### ***BMP-6***

Η γραφική παράσταση της σχετικής συγκέντρωσης του *BMP-6* αναδεικνύει πως ο μέσος όρος των control είναι  $\text{mean}_{\text{control}} = 1.345$ , των ασθενών με νέα διάγνωση  $\text{mean}_{\text{diagnosis}} = 6.5$  και των ασθενών με υποτροπή  $\text{mean}_{\text{recurrent}} = 3.445$ . Με βάση τα παραπάνω η έκφραση του *BMP-6* στους ασθενείς με νέα διάγνωση είναι 4.8 φορές μεγαλύτερη ενώ σε ασθενείς με υποτροπή είναι 2.56 φορές μεγαλύτερη (Εικ. 47).



**Εικόνα 47** | Γραφική παράσταση της σχετικής συγκέντρωσης mRNA του *BMP-6* μεταξύ μαρτύρων, ασθενών με νέα διάγνωση και ασθενών με υποτροπή.

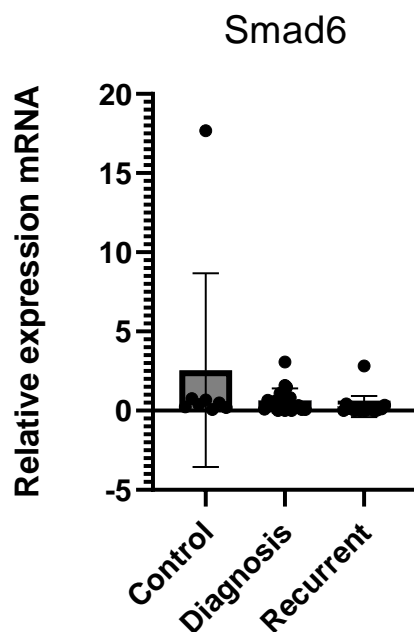
Η στατιστική ανάλυση ανέδειξε πως υπάρχει σημαντική διαφορά ( $p = 0.0004$ ) στα επίπεδα του mRNA του *BMP-6* μεταξύ ασθενών με νέα διάγνωση και μαρτύρων. Ο μέσος όρος για τους μάρτυρες είναι  $\text{mean}_{\text{control}} = -0.002676$  και για τους ασθενείς  $\text{mean}_{\text{diagnosis}} = 0,6989$  και το 95% CI = [0.3716 – 1,013]. Αντίστοιχα, αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p = 0.0226$ ) στα επίπεδα του mRNA του *BMP-6* μεταξύ ασθενών σε υποτροπή και μαρτύρων. Ο μέσος όρος για τους μάρτυρες είναι  $\text{mean}_{\text{control}} = -0.002676$  και για τους ασθενείς με υποτροπή  $\text{mean}_{\text{recurrent}} = 0.4855$  και το 95% CI = [0.07438 – 0.0919]. Από τα παραπάνω προκύπτει πως υπάρχει σημαντική αλλαγή στη γονιδιακή έκφραση του *BMP-6* μεταξύ ασθενών με νέα διάγνωση και μαρτύρων καθώς και ασθενών με υποτροπή και μαρτύρων (Εικ. 48).



*Εικόνα 48* | Γραφικές παραστάσεις απεικόνισης του  $\text{Log}_{10}2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  της σχετικής συγκέντρωσης mRNA του *BMP6* μεταξύ μαρτύρων, ασθενών με νέα διάγνωση και ασθενών με υποτροπή. \*\*\**p*-value = 0.0004, \**p*-value = 0.0226

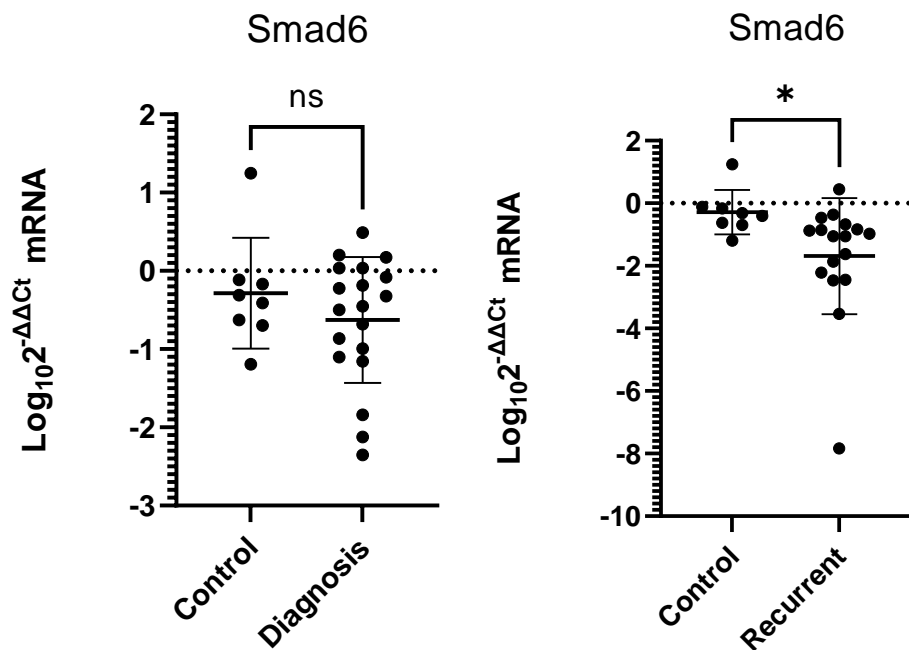
### *Smad6*

Η γραφική παράσταση της σχετικής συγκέντρωσης του *Smad6* αναδεικνύει πως ο μέσος όρος των control είναι  $\text{mean}_{\text{control}} = 0.4035$ , των ασθενών με νέα διάγνωση  $\text{mean}_{\text{diagnosis}} = 0.6411$  και των ασθενών με υποτροπή  $\text{mean}_{\text{recurrent}} = 0.2611$ . Με βάση τα παραπάνω η έκφραση του *Smad6* στους ασθενείς με νέα διάγνωση είναι 1.58 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με τους μάρτυρες ενώ σε ασθενείς με υποτροπή είναι 1.5 φορές μικρότερη σε σχέση με τους μάρτυρες (Εικ. 49).



**Εικόνα 49** | Γραφική παράσταση της σχετικής συγκέντρωσης mRNA του *Smad6* μεταξύ μαρτύρων, ασθενών με νέα διάγνωση και ασθενών με υποτροπή.

Η στατιστική ανάλυση ανέδειξε πως δεν υπάρχει σημαντική διαφορά ( $p = 0.2861$ ) στα επίπεδα του mRNA του *Smad6* μεταξύ ασθενών με νέα διάγνωση και μαρτύρων. Ο μέσος όρος για τους μάρτυρες είναι  $\text{mean}_{\text{control}} = -0.2842$  και για τους ασθενείς  $\text{mean}_{\text{diagnosis}} = -0.6285$  και το 95% CI =  $[-0.3192 - -0.6285]$ . Αντιθέτως, αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p = 0.012$ ) στα επίπεδα του mRNA του *Smad6* μεταξύ ασθενών σε υποτροπή και μαρτύρων. Ο μέσος όρος για τους μάρτυρες είναι  $\text{mean}_{\text{control}} = -0.2842$  και για τους ασθενείς με υποτροπή  $\text{mean}_{\text{recurrent}} = -1.689$  και το 95% CI =  $[-2.47 - -0.3396]$ . Από τα παραπάνω προκύπτει πως δεν υπάρχει σημαντική αλλαγή στη γονιδιακή έκφραση του *Smad6* μεταξύ ασθενών με νέα διάγνωση και μαρτύρων ενώ υπάρχει σημαντική αλλαγή στη γονιδιακή έκφραση του *Smad6* μεταξύ ασθενών με υποτροπή και μαρτύρων (Εικ. 50).



Εικόνα 50 | Γραφικές παραστάσεις απεικόνισης του  $\text{Log}_{10}2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  της σχετικής συγκέντρωσης mRNA του *Smad6* μεταξύ μαρτύρων, ασθενών με νέα διάγνωση και ασθενών με υποτροπή. ns: not significant, \* $p$ -value = 0.012

## 9. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μελέτη των επιπέδων των BMPs και των Smads σε μυελικές σειρές, σε πειραματόζωα καθώς και σε δείγματα ασθενών έχει αποτελέσει αντικείμενο εντατικής έρευνας τα παρελθόντα έτη. Ο ακριβής ρόλος των BMPs στην παθογένεια του πολλαπλού μυελώματος και ιδιαίτερα στην εμφάνιση της οστικής νόσου που το χαρακτηρίζει παραμένει ασαφής και υπό διερεύνηση. Τα λίγα βιβλιογραφικά δεδομένα που αφορούν σε *in vivo* δείγματα μυελού ασθενών αποτέλεσαν το έναυσμα για την παρούσα μελέτη, η οποία ελπίζουμε να προσθέσει κάποια επιπλέον νεότερα δεδομένα που αφορούν στο ρόλο των BMP-2, BMP-6 και του μεταγραφικού παράγοντα Smad6 στην παθογένεια του πολλαπλού μυελώματος. Οι Ishisaki et al. περιέγραψαν σε υβριδώματα Β-κυττάρων που υπερέκφραζαν Smad6 την αλληλεπίδραση με τα μονοπάτια των BMPs. Τα αποτελέσματα ανέδειξαν την αύξηση της έκφρασης του mRNA του Smad6 μετά την επίδραση της BMP-2 στα υβριδώματα Β-κυττάρων, ενώ η μέτρηση των επιπέδων του Smad6 με τη μέθοδο Northern Blot όταν τα κύτταρα αυτά παραμένουν στη G1 φάση του κύκλου μετά την έκθεση σε BMP-2 υπέδειξε την επαγόμενη έκφραση του ανασταλτικού Smad6 μέσω αρνητικής ανατροφοδότησης. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα της ανταγωνιστικής δράσης του Smad6 στην επαγόμενη από την BMP-2 αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης, καθώς μείωσε τα επίπεδα του φωσφορυλιωμένου Smad1/5(550).

Οι Kimura et al. μελέτησαν την αλληλεπίδραση της BMP-2 και των μονοπατιών των JNK-p38 και IL-6 σε MH-60 μυελωματικά κύτταρα. Ανέδειξαν πως η επαγόμενη από τη BMP-2 αναστολή του κυτταρικού κύκλου και η καθήλωση στη φάση G1 δεν επηρεάζει το μονοπάτι της IL-6 καθώς τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της STAT3 καθοδικά της IL-6 δεν αλλάζουν. Η STAT3 εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της bcl-2 αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης και σχετίζεται με την αύξηση και την επιβίωση των κυττάρων. Ωστόσο ανέδειξαν πως η BMP-2 ενεργοποιεί μέσω των TAK1-TAB1 το μονοπάτι της απόπτωσης που οδηγεί στην ενεργοποίηση του p-38 και την έκφραση του Fas, ο οποίος επάγει ταχεία απόπτωση μέσω ενεργοποίησης των κασπασών 3, 8 και τον κατακερματισμό του DNA. Ο Smad6 αναστέλλει αυτό το μονοπάτι συνδεδεμένος άμεσα με την TAK1 και αλλάζει την στερεοδιαμόρφωση του καταλυτικού κέντρου της κινάσης TAK1. Με αυτόν τον τρόπο ο Smad6 αναδεικνύεται ως πιθανός αναστολέας της σηματοδότησης εκτός των BMPs και των προφλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-1)(551).

Οι Falcone et al. μελέτησαν τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της STAT3 σε μυελωματικά U266 κύτταρα και ανέδειξαν πως η ελάττωση αυτών προσδίδει αυξημένη ευαισθησία στην απόπτωση μέσω Fas, κυρίως μέσω της καταστολής των επιπέδων του bcl-2. Η Bcl-2 αναστέλλει σχηματίζοντας ετεροδιμερή με τις πρωτεΐνες Bad, Bax και Bak. Η IL-6, η οποία επάγει το μονοπάτι των STAT3, αναδεικνύεται κύριος ρυθμιστής της ανάπτυξης και της επιβίωσης των MM

κυττάρων. Επιπρόσθετα η εύρεση ιδιόσυστατης ενεργούς STAT3 των MM κυττάρων ενισχύει την συσσώρευση μεταλλάξεων των *ras* και *c-myc* που ανευρίσκονται σε ασθενείς με MM(552).

Οι Hjertner et al. ανέδειξαν την ανασταλτική δράση της BMP-4 σε κυτταρικές σειρές εξαρτώμενες από την IL-6, μέσω αποφωσφορυλίωσης της STAT3. Ο προτεινόμενος μηχανισμός από την ερευνητική ομάδα είναι η ενεργοποίηση τυροσινικών φωσφατασών οι οποίες αποφωσφορυλιώνουν τους παράγοντες STAT3 ή σηματοδοτικά μόρια ανοδικά του μονοπατιού της IL-6. Ωστόσο σε διαφορετικές μυελωματικές κυτταρικές σειρές δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στα επίπεδα φωσφορυλίωσης της STAT3 παρά την επαγωγή της απόπτωσης, πιθανόν με διαφορετικό μηχανισμό(553).

Οι Ro et al. διερεύνησαν τις βιολογικές επιπτώσεις των BMP-5, BMP-6 και BMP-7 σε ανθρώπινα μυελωματικά κύτταρα κυτταρικών σειρών. Ανέδειξαν πως οι ανωτέρω αναφερθείσες BMPs αναστέλλουν την ανάπτυξη και επάγουν την απόπτωση τόσο σε εξαρτώμενες όσο και ανεξάρτητες από την IL-6 κυτταρικές σειρές, εν αντιθέσει με την BMP-4 η οποία δεν προκάλεσε απόπτωση σε ανεξάρτητες από IL-6 κυτταρικές σειρές, πιθανόν λόγω σύνδεσης σε διαφορετικούς υποδοχές τύπου I (Alk-3 και Alk-6 για την BMP-4 και Alk-2 για τις BMP-6, -7). Η ερευνητική ομάδα μάλιστα ανέφερε πως η αναστολή της ανάπτυξης αλλά όχι και της απόπτωσης σε ANBL-6 μυελωματικά κύτταρα μπορεί να οφείλεται είτε στην ενδογενή αντοχή της συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς στα αποπτωτικά σήματα ή λόγω της διαμόρφωσης ετεροδιμερών συμπλόκων των υποδοχών τύπου I, οι οποίοι επάγουν την Smad σηματοδότηση και όχι τον επαγόμενο από την BMP-2 σχηματισμό ομοδιμερών συμπλόκων υποδοχέα τύπου I που ενεργοποιούν το μονοπάτι των MAPK/p-38 και την έκφραση του Fas. Αυτή η δυσκολία στον καθορισμό του βιολογικού αποτελέσματος των BMPs έρχεται να προστεθεί στην αδυναμία προσδιορισμού των BMPs στον ΜΟ ασθενών MM και αυτό διότι εμπλέκονται τόσο ανταγωνιστές των BMPs (noggin, follistatin) όσο και κυτταρικοί υποπληθυσμοί που επικοινωνούν και τροποποιούν τα σήματα(554).

Η ερευνητική ομάδα των Nishihara και Ikeda απέδειξε την ανασταλτική δράση της BMP-2 στον κυτταρικό κύκλο και την επαγωγή της απόπτωσης μέσω αύξησης των πρωτεϊνών p-21 και p-27, οι οποίες συνδεδεμένες και αναστέλλουσες τις CDKs είχαν ως αποτέλεσμα την υποφωσφορυλίωση της Rb πρωτεΐνης. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε τόσο σε κυτταρικές σειρές όσο και σε πρωτογενή MM κύτταρα απομονωμένα από ασθενείς MM. Παρατήρησαν πως η επίδραση της BMP-2 στην αναστολή της ανάπτυξης και την επαγωγή της απόπτωσης ήταν ασθενέστερη στα πρωτογενή MM κύτταρα, πιθανόν λόγω της εξάρτησής τους από τις κυτταροκίνες του μικροπεριβάλλοντος, ιδίως της IL-6, η οποία ελλείπει και καθιστά τα MM κύτταρα επιρρεπή σε απόπτωση. Επικύρωσαν τα αποτελέσματα των Falcone et al. περί ελάττωσης των επιπέδων της STAT3 και της επαγωγής της απόπτωσης, αποδεικνύοντας τη δράση των BMPs

μέσω εναλλακτικών μονοπατιών όπως των JAK/STAT ενώ απέδειξαν όπως και οι Kimura et al. την απόπτωση των MM κυττάρων μέσω του μονοπατιού των MAPK/p-38(555).

Οι Kersten et al. διερεύνησαν τις βιολογικές επιπτώσεις της BMP-6 σε ώριμα περιφερικά B-κύτταρα. Ανέδειξαν την αύξηση της φωσφορυλίωσης του Smad1/5 και την επαγωγή της έκφρασης του *Id1*. Η αύξηση των επιπέδων της *Id1* κατά τέσσερις φορές σε B-κύτταρα εκτεθειμένα σε BMP-6 ανέδειξε την επιλεκτική της δράση καθώς τα επίπεδα των *Id2-4* παρέμειναν σχετικά σταθερά. Η *Id1* εκφράζεται στα πρόδρομα B-κύτταρα και ευθύνεται για την αναστολή της περαιτέρω διαφοροποίησης των B-κυττάρων, εφόσον αύξηση της έκφρασής της οδηγεί σε ταχύ πολλαπλασιασμό των B-κυττάρων, υψηλού βαθμού απόπτωση και ανάπτυξη B-λεμφωμάτων. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν την αναστολή της ανάπτυξης των ώριμων B-κυττάρων. Η μελέτη έθεσε σημαντικά ερωτήματα στον ρόλο τελικά της BMP-6 σε ό,τι αφορά την ανάπτυξη των B-κυττάρων, καθώς η ανεύρεση υψηλών επιπέδων mRNA *BMP-6* σε ασθενείς με DLBCL (Diffuse Large B-Cell Lymphomas) συσχετίζεται με πτωχή πρόγνωση(556).

Οι Seckinger et al. μελέτησαν τα επίπεδα και τις βιολογικές επιδράσεις της BMP-6 σε δείγματα ασθενών MM. Αρχικά, ανέδειξαν πως τα ποσοστά έκφρασης της *BMP-6* είναι υψηλότερα σε ασθενείς με MM και τα επίπεδα αυτής σχετίζονται άμεσα με την διήθηση του MO με MM κύτταρα. Μάλιστα τα MM κύτταρα εκφράζουν την *BMP-6* αρκετές φορές υψηλότερα σε σχέση με τα BMSCs. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη ανεύρεση φωσφορυλιωμένων συμπλόκων Smad1/5-Smad4 σε MM κύτταρα ασθενών σε σχέση με φυσιολογικά πλασματοκύτταρα. Επιπρόσθετα, η έκφραση της *BMP-6* ανευρίσκεται κυρίως στο στάδιο των πλασματοκυττάρων ενώ απουσιάζει στα B-κύτταρα μνήμης και είναι εξαιρετικά ελαττωμένη σε πολλαπλασιαζόμενους πλασμαβλάστες. Η υπόθεση αυτή σχετίζεται με έναν ενδεχόμενο αντιπολλαπλασιαστικό ρόλο που ασκεί η BMP-6 στα τελικώς διαφοροποιημένα B-κύτταρα και για αυτό τα επίπεδα του *BMP-6* ανευρίσκονται υψηλότερα σε ασθενείς με νέα διάγνωση σε σχέση με ασθενείς με προχωρημένη νόσο, ωσάν αυτά τα MM κύτταρα να διατηρούν μία πρότερη «μνήμη» πριν εξαλλαχθούν περαιτέρω. Η ερευνητική ομάδα μάλιστα πρότεινε τη μέτρηση των επιπέδων του *BMP-6* ως ανεξάρτητου προγνωστικού δείκτη για την συνολική επιβίωση των ασθενών με MM παράλληλα με το ISS σύστημα, υποθέτοντας την ανασταλτική δράση που ασκεί η BMP-6 στην συσσώρευση γενετικών βλαβών(557). Τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας συμφωνούν με την αύξηση των επιπέδων του *BMP-6* στους ασθενείς σε σχέση με τους μάρτυρες ενώ τα επίπεδα του *BMP-6* ανευρίσκονται υψηλότερα σε ασθενείς με νέα διάγνωση σε σχέση με ασθενείς με υποτροπή.

Οι Holien et al. διερεύνησαν του μοριακούς μηχανισμούς της επαγόμενης από τις BMPs απόπτωσης στα MM κύτταρα ανθρώπινων δειγμάτων. Προηγουμένως είχε αναδειχθεί η



υπερέκφραση του *myc* στα MM κύτταρα και την εξάρτηση τους από την MYC πρωτεΐνη, η οποία ρυθμίζει ένα μεγάλο ποσοστό κυτταρικών γονιδίων(558). Σύμφωνα με άλλες πειραματικές μελέτες η MYC πρωτεΐνη εμπλέκεται στα μονοπάτια των MAPK/p-38, p-53 και JAK/STAT. Ωστόσο τόσο η αποσιώπηση μέσω siRNA του p-53 όσο και η συγκαλλιέργεια με παράγοντες-αναστολείς του p-38 και των JAK/STAT δεν ελάττωσε την επαγόμενη από τις BMPs απόπτωση των MM κυττάρων. Οι BMPs αναστέλλουν την έκφραση της MYC οδηγώντας σε απόπτωση η οποία όμως αργεί να εμφανιστεί, πιθανότατα λόγω της καθυστερημένης εμφάνισης των βιολογικών αποτελεσμάτων της καταστολής του *myc*. Η απόπτωση που επάγεται από τις BMPs μέσω καταστολής της MYC δεν παρατηρήθηκε σε ασθενείς με αναδιατάξεις μεταξύ του *IGH-myc* υποδεικνύοντας τον ρόλο της MYC στην επιβίωση των κυττάρων. Τα αποτελέσματα της απόπτωσης ήταν περισσότερο εμφανή με τη χρήση της BMP-6 ενώ αξιοσημείωτο ήταν το γεγονός πως MM κύτταρα από ασθενείς με ιδιόσυστατα ενεργούς Smad ήταν ανθεκτικοί στην αποπτωτική δράση των BMPs(559). Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί η άποψη πως η απόπτωση που επάγουν οι BMPs έχει χαρακτήρα απουσίας/αποστέρησης αυξητικού παράγοντα παρά έκφρασης ταχέων αποπτωτικών παραγόντων όπως ο Fas, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με τις μελέτες που υποστήριζαν την επαγωγή του Fas μέσω του μονοπατιού των MAPK/p-38. Ωστόσο σύμφωνα με τα νεότερα δεδομένα, οι BMPs δρουν μέσω και των δυο μονοπατιών.

Μία έτερη μελέτη από τους Fukuda et al. διερεύνησε επίσης το μηχανισμό πρόκλησης απόπτωσης σε μυελωματικές κυτταρικές σειρές. Αποκάλυψαν την πρόκληση stress στο ενδοπλασματικό δίκτυο των MM κυττάρων, που προκαλείται από την BMP-4 οδηγώντας στην ενεργοποίηση μέσω απελευθέρωσης  $Ca^{+2}$  των κασπασών. Τα MM κύτταρα είναι επιρρεπή στην απόπτωση που προκαλείται από την συσσώρευση παθολογικών ανοσοσφαιρινών. Η BMP-4 επάγει την έκφραση του p-53 το οποίο ενισχύει την έκφραση των πρωτεϊνών BAX και puma, οι οποίες προκαλούν βλάβες στη μεμβράνη των μιτοχονδρίων και του ενδοπλασματικού δικτύου αυξάνοντας το stress. Επίσης φάνηκε πως η φωσφορυλίωση του Smad1/5 μέσω της BMP-4 οδηγεί στη σύνδεση και τη σταθεροποίηση της p-53, ενισχύοντας την αποπτωτική της δράση(560).

Μία σημαντική μελέτη από τους Grcevic et al. διερεύνησε τα επίπεδα των BMPs, των Smads και των BMPRs σε 32 ασθενείς. Σε αυτή την μελέτη ανευρέθηκε περίπου 40 φορές αύξηση των επιπέδων του mRNA του *BMP-6* στους ασθενείς με MM σε σχέση με τους μάρτυρες ενώ δεν ανευρέθηκαν στατιστικά σημαντικά διαφορές για το *BMP-2* και το *Smad6*. Επιπρόσθετα ανευρέθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης των υποδοχέων της BMP-6 (*ACVR1* και *ACVR2A*). Τα αποτελέσματα της δικής μας μελέτης συμφωνούν ως προς τα ευρήματα για την BMP-2 και την BMP-6 αλλά ανέδειξαν την ελαττωμένη έκφραση του Smad6 στους ασθενείς με υποτροπή. Η μελέτη των Grcevic et al. δεν κατηγοριοποίησε περαιτέρω τους ασθενείς σε ασθενείς

με νέα διάγνωση και σε ασθενείς με υποτροπή, ομαδοποιώντας τα μετρούμενα επίπεδα ετερογενών υποομάδων και καθιστώντας δύσκολη την συστηματική ερμηνεία αυτών. Επίσης από τη μελέτη ανευρέθηκε αυξημένη έκφραση των BMPs στο μικροπεριβάλλον ενώ η BMP-6 απεδείχθη η πλέον ευαίσθητη και η ειδική ως βιοδείκτης των MM κυττάρων σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Ως κύρια πηγή των BMPs μάλιστα ανεδείχθησαν τα CD138+ νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα. Φαίνεται πως ο κύριος μηχανισμός δράσης είναι η επαγωγή της έκφρασης του *Id1* που αναστέλλει την απόπτωση μέσω TRAIL και προστατεύει τα κύτταρα από τη δράση του bortezomib. Η συγκεκριμένη μελέτη επίσης διαπίστωσε αύξηση της έκφρασης του Smad6 μετά από έκθεση της μυελωματικής κυτταρικής σειράς Thiel στις BMPs. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής φαίνεται να αντικρούουν τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών ως προς την βιολογική δράση των BMPs ωστόσο ήταν η μοναδική μελέτη η οποία μέτρησε τα επίπεδα έκφρασης των BMPs και των υποδοχέων τους σε MM κύτταρα ασθενών(561). Η φαινομενική αντίκρουση μεταξύ των παραπάνω μελετών οφείλεται στην βιολογική ετερογένεια και τις καλλιεργητικές συνθήκες των διαφόρων μυελωματικών κυτταρικών σειρών.

Οι Neri et al. ανέλυσαν τη βιολογική δραστηριότητα *in vivo* σε πειραματόζωα με MM που ασκεί η Atip. Η Atip αναστέλλει την αύξηση των MM κυττάρων μέσω ενεργοποίησης των κασπασών, αποφωσφορύλιωσης των Jak2/STAT3 και του NF-κB και αναστολής της έκφρασης της Bcl-2. Ύστερα προσδιόρισαν τη μεταβολή της γονιδιακής έκφρασης στα πειραματόζωα μετά από ένα χρονικό διάστημα έκθεσης στην Atip. Ανευρέθηκε αύξηση των επιπέδων της BMP-2 κατά 13 φορές μετά την έκθεση στην Atip, υποδεικνύοντας τον προστατευτικό ρόλο που ασκεί η BMP-2 στην πρόληψη της οστικής νόσου(562).

Μελέτη που ανέλυσε με τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών τη γονιδιακή έκφραση δειγμάτων ασθενών με MGUS ανέδειξε αύξηση κατά 2.78 φορές του *BMP-6* σε σχέση με τους μάρτυρες. Αυτό το αποτέλεσμα αναδεικνύει σύμφωνα και με τα προηγούμενα πως τα MM κύτταρα σε πρώιμα στάδια διατηρούν την έκφραση του *BMP-6* καθώς φαίνεται πως υψηλότερα επίπεδα *BMP-6* σχετίζονται με καλύτερη πρόγνωση(563).

Σε μία μελέτη του 2017 οι Lagler et al. μελέτησαν διεξοδικότερα την αντι-μυελωματική δράση της BMP-2. Τα αποτελέσματα τους υποδεικνύουν πως η BMP-2 δεν ασκεί αποπτωτική δράση καθώς ο χρόνος απόκρισης των κυττάρων στην έναρξη αποπτωτικών μονοπατιών είναι εξαιρετικά μεγάλος (48-72 ώρες), ενώ η απόπτωση πραγματοποιείται εντός ολίγων ωρών (6 ώρες) υπό το πρίσμα της δράσης των κλασικών αποπτωτικών μορίων (TRAIL, FasL). Επίσης δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική αλλαγή στη μορφολογία και τον αριθμό των MM κυττάρων ακόμη και 4 ημέρες μετά την έκθεση ενώ η χρήση τεχνικών αναστολέων απόπτωσης απεδείχθη αναποτελεσματική στην αντι-πολλαπλασιαστική δράση της BMP-2. Η μελέτη συμφώνησε με τις

προηγούμενες έρευνες σε ό,τι αφορά την δράση της BMP-2 στην αναστολή της προόδου του κυτταρικού κύκλου και την καθήλωση στη φάση G1 μέσω γονιδιακής ανάλυσης, όπου δεν ανευρέθηκε αύξηση των γονιδίων που σχετίζονται με απόπτωση αλλά ελάττωση γονιδίων με αντι-αποπτωτική δράση, οδηγώντας στο συμπέρασμα πως επάγει μία παύση του κυτταρικού κύκλου(564).

Τέλος, μία μελέτη του 2021 ανέλυσε το μεταγραφικό προφίλ του μικροπεριβάλλοντος από πειραματόζωα με MM με τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών, αναδεικνύοντας το ρόλο του στην παθογένεια της οστικής νόσου. Τα στοιχεία ανέδειξαν πως η χρήση αναστολέων των BMPRs οδήγησε σε αύξηση του οστικού όγκου, ελαττωμένη οστεοκλαστογένεση και αυξημένη οστεοβλαστική διαφοροποίηση. Η χρήση εξουδετερωτικού αντισώματος έναντι της BMP-6 δεν επηρέασε την πορεία της οστικής νόσου αλλά βελτίωσε την αναιμία μέσω ελάττωσης της επιδίνης. Συνεχίζοντας διαπίστωσαν πως η επαφή των MM κυττάρων με τα στρωματικά κύτταρα διατάραξε την αναστολή του κυτταρικού κύκλου των MM κυττάρων χωρίς όμως να αυξάνει το συνολικό φορτίο της νόσου. Πιθανώς η επαγόμενη από τις BMPs αναστολή της προόδου της οστικής νόσου να οδήγησε και σε ελάττωση του νεοπλασματικού φορτίου. Η ερευνητική ομάδα επέκτεινε και τις ήδη αποδεδειγμένες απόψεις περί της συμβολής των BMPs στην οστική νόσο καθώς διαπίστωσε ελάττωση του αριθμού των οστεοκλαστών όταν τα κύτταρα εκτέθηκαν σε αναστολείς των BMPRs, υποδεικνύοντας την άμεση και όχι την έμμεση μέσω MM κυττάρων ή του μικροπεριβάλλοντος επίδραση των BMPs στους οστεοκλάστες. Ανέλυσαν επίσης το γενετικό προφίλ των πρόδρομων στρωματικών κυττάρων όπου ανευρέθηκε ενισχυμένο το γενετικό σετ συνδεδεμένο με τη «οστική απώλεια» αλλά και αυτό του «οστικού σχηματισμού». Η ύπαρξη αυξημένου αριθμού οστεοβλαστών στα αρχικά στάδια του MM παρατηρείται στην προσπάθεια του οργανισμού να υπερκεράσει την αύξηση των οστεοκλαστών και την οστική απορρόφηση και για αυτό ανευρίσκονται ενισχυμένα γονίδια αμφότερων των γενετικών σετ.

Επίσης διαπίστωσαν πως η αναστολή της BMP σηματοδότησης σε προ-οστεοβλάστες επάγει μέσω ελάττωσης των επιπέδων της DKK-1 και sclerostin την αυξημένη διαφοροποίηση των προ-οστεοβλαστών σε ώριμους οστεοβλάστες μέσω αύξησης της έκφρασης του *Runx2*. Αυτό οδηγεί αναπόφευκτα στο συμπέρασμα της αλληλεπίδρασης μεταξύ του Wnt μονοπατιού και του μονοπατιού των BMPs. Σε πειραματόζωα με διπλή διαγραφή του *Bmpr1a* ανευρίσκονται ελαττωμένα επίπεδα Smad6, αναδεικνύοντας τη σχέση μεταξύ των BMPs και του ανασταλτικού Smad6, όπως διαπιστώθηκε και από προηγούμενες μελέτες. Επίσης κατά αντιστοιχία με τα προηγούμενα η αναστολή του BMPR1a οδήγησε σε αυξημένη έκφραση γονιδίων σχετιζόμενα με τον σχηματισμό θεμέλιας ουσίας, κολλαγόνου και την οστεοβλαστική διαφοροποίηση από τα στρωματικά προγονικά κύτταρα, όπως υποδεικνύει η έκφραση του VDR (Vitamin D Recptor)

και του *osterix*, κύριων βιοδεικτών των οστεοβλαστών. Τέλος η ερευνητική ομάδα διαπίστωσε την αύξηση του ποσοστού των MM κυττάρων στο BRC, ως απόκριση της αναστολής των BMPs γεγονός που σημαίνει πως η αναστολή του μονοπατιού των BMPs σχετίζεται με την αύξηση των BMSCs και την επαγωγή της κυτταρικής αδράνειας των MM κυττάρων(565).

Τα παραπάνω αποτελέσματα ανέδειξαν τον σημαντικό ρόλο του μικροπεριβάλλοντος καθώς τα MM κύτταρα διαφεύγουν την κυτταροτοξική δράση των BMPs χρησιμοποιώντας ως μηχανισμό κάλυψης τα γειτονικά κύτταρα αλλά και τα επίπεδα των ανταγωνιστών των BMPs που παράγονται από τους οστεοβλάστες. Η συγκαλλιέργεια MM κυττάρων και οστεοβλαστών αυξάνει τα επίπεδα της *Sost1* σε αμφοτέρους τους κυτταρικούς πληθυσμούς, όταν σε ξεχωριστές συνθήκες τα επίπεδα έκφρασης του *Sost1* είναι χαμηλά στα MM κύτταρα και στους οστεοβλάστες. Τα MM κύτταρα που βρίσκονται ιδιαίτερα στην περιοχή του ενδοστέου προστατεύονται από τις υψηλές συγκεντρώσεις των ανταγωνιστών. Όλα τα παραπάνω οδηγούν στο συμπέρασμα πως παρά τα ευεργετικά αποτελέσματα των BMPs στους οστεοβλάστες, η δράση τους εξασθενίζει λόγω της δυσλειτουργίας και της ελάττωσης του αριθμού των οστεοβλαστών, αλλά και της επαγωγής της οστεοκλαστογένεσης.

Συμπερασματικά, από τα πειράματα που διενεργήθηκαν σε ό,τι αφορά την BMP-2 δεν ανευρέθηκε διαφορά στη γονιδιακή έκφραση μεταξύ της ομάδας ασθενών και της ομάδας μαρτύρων. Σε ό,τι αφορά την BMP-6 ανευρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη γονιδιακή έκφραση μεταξύ των ομάδων των ασθενών και των μαρτύρων. Συγκεκριμένα, στους ασθενείς με νέα διάγνωση είναι 4.8 φορές μεγαλύτερη ενώ σε ασθενείς με υποτροπή είναι 2.56 φορές μεγαλύτερη σε σύγκριση με την ομάδα των μαρτύρων. Σε ό,τι αφορά τον *Smad6* δεν ανευρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη γονιδιακή έκφραση μεταξύ των ασθενών με νέα διάγνωση και των μαρτύρων ενώ ανευρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά της γονιδιακής έκφρασης μεταξύ ασθενών με υποτροπή και μαρτύρων. Ειδικότερα, στους ασθενείς με υποτροπή η έκφραση ελαττώθηκε κατά 1.5 φορές λιγότερο. Σύμφωνα με τα προηγούμενα η BMP-2 φαίνεται να μην αλλάζει την κλινική πορεία ή την εικόνα των ασθενών με MM καθώς τα επίπεδα αυτής δεν φαίνεται να αυξάνονται ή να μειώνονται. Αντιθέτως, η BMP-6 αναδεικνύεται σημαντικός ρυθμιστής των MM κυττάρων σε ό,τι αφορά την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό. Η αύξηση της μπορεί να υποδεικνύει είτε αυξημένη καθήλωση στη θεμέλια ουσία και αδυναμία δράσης δρώντας με μηχανισμό θετικής ανατροφοδότησης είτε να εμπλέκεται στην επαγωγή γονιδίων που αναστέλλουν την απόπτωση όπως παρομοίως έχει αναδειχθεί ως δυσμενής προγνωστικός παράγοντας σε B-λεμφώματα. Επίσης, η έκφραση του *Smad6* φαίνεται να ελαττώνεται στους ασθενείς με υποτροπή υποδεικνύοντας πως τα MM έχουν αναπτύξει μηχανισμούς εξάρτησης από τις BMPs και επάγουν την καταστολή του *Smad6* μέσω εναλλακτικών σηματοδοτικών

μονοπατιών ή έκφρασης αναστολέων. Ο ρόλος των BMPs φαίνεται ακόμη διαφορούμενος ως προς το βιολογικό αποτέλεσμα ωστόσο περαιτέρω πειράματα καθώς και ανάπτυξη ακριβέστερων εργαστηριακών τεχνικών είναι δυνατόν να επεκτείνουν τις πληροφορίες για την σηματοδότηση στο MM.

Συνοψίζοντας, οι BMPs ως μόρια με πλειοτροπική δράση έχουν μελετηθεί σε πολλούς διαφορετικούς καρκίνους ωστόσο η σημασία τους έχει αναδειχθεί στη μελέτη του MM. Οι μέχρι στιγμής έρευνες παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία ως προς τον τεχνικό σχεδιασμό, τη χρήση κυτταρικών σειρών με μεγάλη βιολογική ετερογένεια ενώ είναι ελάχιστες οι έρευνες σε κλινικά δείγματα. Η αδυναμία προσέγγισης του *in vivo* μικροπεριβάλλοντος οδήγησε του ερευνητές σε υποθέσεις για τους πιθανούς μηχανισμούς δράσης, οι οποίες ενδεχομένως να απορρίπτονταν υπό το φως νέων αποτελεσμάτων. Ιδιαίτερα χρήσιμες είναι οι νέες τεχνολογίες αλληλούχισης επόμενης γενεάς και ανάλυσης μοναδιαίων κυττάρων (single cell analysis) οι οποίες επέτρεψαν την αποσαφήνιση της γενετικής ετερογένειας των κλωνικών υποπληθυσμών των MM κυττάρων και επέτρεψαν τον σωστότερο σχεδιασμό φαρμάκων. Επέτρεψαν επίσης και την βαθύτερη κατανόηση των κυτταρικών αλληλεπιδράσεων και της βιολογικής συμπεριφοράς των MM κυττάρων. Οι μελλοντικές τεχνολογικές εξελίξεις σε συνδυασμό με την ανάπτυξη πληρέστερων και εγγύτερων στο ανθρώπινο μικροπεριβάλλον κυτταρικών μοντέλων είναι δυνατόν να αποκαλύψουν περαιτέρω το ρόλο των BMPs στο πολλαπλό μύελωμα και την οστική νόσο.

## ΠΗΓΕΣ – ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-86.
2. Giannakoulas N, Ntanasis-Stathopoulos I, Terpos E. The Role of Marrow Microenvironment in the Growth and Development of Malignant Plasma Cells in Multiple Myeloma. *Int J Mol Sci*. 2021;22(9).
3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2016;66(1):7-30.
4. Sidana S, Tandon N, Dispenzieri A, Gertz MA, Dingli D, Jevremovic D, et al. Prognostic significance of circulating plasma cells by multi-parametric flow cytometry in light chain amyloidosis. *Leukemia*. 2018;32(6):1421-6.
5. Drayson M, Tang LX, Drew R, Mead GP, Carr-Smith H, Bradwell AR. Serum free light-chain measurements for identifying and monitoring patients with nonsecretory multiple myeloma. *Blood*. 2001;97(9):2900-2.
6. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Dispenzieri A, et al. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc*. 2003;78(1):21-33.
7. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2014;15(12):e538-48.
8. Turesson I, Velez R, Kristinsson SY, Landgren O. Patterns of multiple myeloma during the past 5 decades: stable incidence rates for all age groups in the population but rapidly changing age distribution in the clinic. *Mayo Clin Proc*. 2010;85(3):225-30.
9. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, Katzmann JA, Caporaso NE, Hayes RB, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood*. 2009;113(22):5412-7.
10. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak MF, et al. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med*. 2002;346(8):564-9.
11. Kyle RA, Remstein ED, Therneau TM, Dispenzieri A, Kurtin PJ, Hodnefield JM, et al. Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2007;356(25):2582-90.
12. Kumar SK, Rajkumar V, Kyle RA, van Duin M, Sonneveld P, Mateos MV, et al. Multiple myeloma. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17046.
13. Caers J, Paiva B, Zamagni E, Leleu X, Bladé J, Kristinsson SY, et al. Diagnosis, treatment, and response assessment in solitary plasmacytoma: updated recommendations from a European Expert Panel. *J Hematol Oncol*. 2018;11(1):10.
14. Hill QA, Rawstron AC, de Tute RM, Owen RG. Outcome prediction in plasmacytoma of bone: a risk model utilizing bone marrow flow cytometry and light-chain analysis. *Blood*. 2014;124(8):1296-9.
15. Paiva B, Chandia M, Vidriales MB, Colado E, Caballero-Velázquez T, Escalante F, et al. Multiparameter flow cytometry for staging of solitary bone plasmacytoma: new criteria for risk of progression to myeloma. *Blood*. 2014;124(8):1300-3.
16. Rajkumar SV. Updated Diagnostic Criteria and Staging System for Multiple Myeloma. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2016;35:e418-23.
17. Bhutani M, Foureau DM, Atrash S, Voorhees PM, Usmani SZ. Extramedullary multiple myeloma. *Leukemia*. 2020;34(1):1-20.
18. van de Donk NW, Lokhorst HM, Anderson KC, Richardson PG. How I treat plasma cell leukemia. *Blood*. 2012;120(12):2376-89.
19. Cowan AJ, Allen C, Barac A, Basaleem H, Bensenor I, Curado MP, et al. Global Burden of Multiple Myeloma: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *JAMA Oncol*. 2018;4(9):1221-7.

20. Kumar SK, Dispenzieri A, Lacy MQ, Gertz MA, Buadi FK, Pandey S, et al. Continued improvement in survival in multiple myeloma: changes in early mortality and outcomes in older patients. *Leukemia*. 2014;28(5):1122-8.
21. Ichimaru M, Ishimaru T, Mikami M, Matsunaga M. Multiple myeloma among atomic bomb survivors in Hiroshima and Nagasaki, 1950-76: relationship to radiation dose absorbed by marrow. *J Natl Cancer Inst*. 1982;69(2):323-8.
22. Preston DL, Kusumi S, Tomonaga M, Izumi S, Ron E, Kuramoto A, et al. Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987. *Radiat Res*. 1994;137(2 Suppl):S68-97.
23. Khuder SA, Mutgi AB. Meta-analyses of multiple myeloma and farming. *Am J Ind Med*. 1997;32(5):510-6.
24. Altekruse SF, Henley SJ, Thun MJ. Deaths from hematopoietic and other cancers in relation to permanent hair dye use in a large prospective study (United States). *Cancer Causes Control*. 1999;10(6):617-25.
25. Maldonado JE, Kyle RA. Familial myeloma. Report of eight families and a study of serum proteins in their relatives. *Am J Med*. 1974;57(6):875-84.
26. Vachon CM, Kyle RA, Therneau TM, Foreman BJ, Larson DR, Colby CL, et al. Increased risk of monoclonal gammopathy in first-degree relatives of patients with multiple myeloma or monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*. 2009;114(4):785-90.
27. Johnson DC, Weinhold N, Mitchell JS, Chen B, Kaiser M, Begum DB, et al. Genome-wide association study identifies variation at 6q25.1 associated with survival in multiple myeloma. *Nat Commun*. 2016;7:10290.
28. Ziv E, Dean E, Hu D, Martino A, Serie D, Curtin K, et al. Genome-wide association study identifies variants at 16p13 associated with survival in multiple myeloma patients. *Nat Commun*. 2015;6:7539.
29. Magrangeas F, Kuiper R, Avet-Loiseau H, Gouraud W, Guérin-Charbonnel C, Ferrer L, et al. A Genome-Wide Association Study Identifies a Novel Locus for Bortezomib-Induced Peripheral Neuropathy in European Patients with Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res*. 2016;22(17):4350-5.
30. González D, van der Burg M, García-Sanz R, Fenton JA, Langerak AW, González M, et al. Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood*. 2007;110(9):3112-21.
31. Chapman MA, Lawrence MS, Keats JJ, Cibulskis K, Sougnez C, Schinzel AC, et al. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature*. 2011;471(7339):467-72.
32. Lohr JG, Stojanov P, Carter SL, Cruz-Gordillo P, Lawrence MS, Auclair D, et al. Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy. *Cancer Cell*. 2014;25(1):91-101.
33. Bolli N, Avet-Loiseau H, Wedge DC, Van Loo P, Alexandrov LB, Martincorena I, et al. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nat Commun*. 2014;5:2997.
34. Maura F, Bolli N, Angelopoulos N, Dawson KJ, Leongamornlert D, Martincorena I, et al. Genomic landscape and chronological reconstruction of driver events in multiple myeloma. *Nat Commun*. 2019;10(1):3835.
35. Walker BA, Mavrommatis K, Wardell CP, Ashby TC, Bauer M, Davies FE, et al. Identification of novel mutational drivers reveals oncogene dependencies in multiple myeloma. *Blood*. 2018;132(6):587-97.
36. Walker BA, Boyle EM, Wardell CP, Murison A, Begum DB, Dahir NM, et al. Mutational Spectrum, Copy Number Changes, and Outcome: Results of a Sequencing Study of Patients With Newly Diagnosed Myeloma. *J Clin Oncol*. 2015;33(33):3911-20.
37. Dutta AK, Fink JL, Grady JP, Morgan GJ, Mullighan CG, To LB, et al. Subclonal evolution in disease progression from MGUS/SMM to multiple myeloma is characterised by clonal stability. *Leukemia*. 2019;33(2):457-68.
38. Bergsagel PL, Chesi M, Nardini E, Brents LA, Kirby SL, Kuehl WM. Promiscuous translocations into immunoglobulin heavy chain switch regions in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(24):13931-6.

39. Bergsagel PL, Kuehl WM. Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2005;23(26):6333-8.
40. Manier S, Kawano Y, Bianchi G, Roccaro AM, Ghobrial IM. Cell autonomous and microenvironmental regulation of tumor progression in precursor states of multiple myeloma. *Curr Opin Hematol*. 2016;23(4):426-33.
41. Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(5):335-48.
42. Chesi M, Brents LA, Ely SA, Bais C, Robbiani DF, Mesri EA, et al. Activated fibroblast growth factor receptor 3 is an oncogene that contributes to tumor progression in multiple myeloma. *Blood*. 2001;97(3):729-36.
43. Chesi M, Nardini E, Lim RS, Smith KD, Kuehl WM, Bergsagel PL. The t(4;14) translocation in myeloma dysregulates both FGFR3 and a novel gene, MMSET, resulting in IgH/MMSET hybrid transcripts. *Blood*. 1998;92(9):3025-34.
44. Dimova DK, Dyson NJ. The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene*. 2005;24(17):2810-26.
45. Manfrini N, Mancino M, Miluzio A, Oliveto S, Balestra M, Calamita P, et al. FAM46C and FNDC3A Are Multiple Myeloma Tumor Suppressors That Act in Concert to Impair Clearing of Protein Aggregates and Autophagy. *Cancer Res*. 2020;80(21):4693-706.
46. Avet-Loiseau H, Hulin C, Campion L, Rodon P, Marit G, Attal M, et al. Chromosomal abnormalities are major prognostic factors in elderly patients with multiple myeloma: the intergroupe francophone du myélome experience. *J Clin Oncol*. 2013;31(22):2806-9.
47. Pawlyn C, Morgan GJ. Evolutionary biology of high-risk multiple myeloma. *Nat Rev Cancer*. 2017;17(9):543-56.
48. Weinhold N, Ashby C, Rasche L, Chavan SS, Stein C, Stephens OW, et al. Clonal selection and double-hit events involving tumor suppressor genes underlie relapse in myeloma. *Blood*. 2016;128(13):1735-44.
49. Bouchard C, Thieke K, Maier A, Saffrich R, Hanley-Hyde J, Ansorge W, et al. Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *EMBO J*. 1999;18(19):5321-33.
50. Chretien ML, Corre J, Lauwers-Cances V, Magrangeas F, Cleynen A, Yon E, et al. Understanding the role of hyperdiploidy in myeloma prognosis: which trisomies really matter? *Blood*. 2015;126(25):2713-9.
51. Fitzpatrick MJ, Nardi V, Sohani AR. Plasma cell myeloma: role of histopathology, immunophenotyping, and genetic testing. *Skeletal Radiol*. 2022;51(1):17-30.
52. Broyl A, Hose D, Lokhorst H, de Knegt Y, Peeters J, Jauch A, et al. Gene expression profiling for molecular classification of multiple myeloma in newly diagnosed patients. *Blood*. 2010;116(14):2543-53.
53. Kuiper R, Broyl A, de Knegt Y, van Vliet MH, van Beers EH, van der Holt B, et al. A gene expression signature for high-risk multiple myeloma. *Leukemia*. 2012;26(11):2406-13.
54. Shaughnessy JD, Jr., Zhan F, Burington BE, Huang Y, Colla S, Hanamura I, et al. A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1. *Blood*. 2007;109(6):2276-84.
55. Zhan F, Huang Y, Colla S, Stewart JP, Hanamura I, Gupta S, et al. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood*. 2006;108(6):2020-8.
56. Rajan AM, Rajkumar SV. Interpretation of cytogenetic results in multiple myeloma for clinical practice. *Blood Cancer J*. 2015;5(10):e365.
57. Fonseca R, Bailey RJ, Ahmann GJ, Rajkumar SV, Hoyer JD, Lust JA, et al. Genomic abnormalities in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*. 2002;100(4):1417-24.
58. Manier S, Salem KZ, Park J, Landau DA, Getz G, Ghobrial IM. Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14(2):100-13.
59. Otto T, Sicinski P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2017;17(2):93-115.



60. van de Donk NW, Palumbo A, Johnsen HE, Engelhardt M, Gay F, Gregersen H, et al. The clinical relevance and management of monoclonal gammopathy of undetermined significance and related disorders: recommendations from the European Myeloma Network. *Haematologica*. 2014;99(6):984-96.
61. Maciocia N, Wechalekar A, Yong K. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering myeloma (SMM): a practical guide to management. *Hematol Oncol*. 2017;35(4):432-9.
62. Feraud JP, Bridoux F, Dispenzieri A, Jaccard A, Kyle RA, Leung N, et al. Monoclonal gammopathy of clinical significance: a novel concept with therapeutic implications. *Blood*. 2018;132(14):1478-85.
63. Mateos MV, Hernández MT, Giraldo P, de la Rubia J, de Arriba F, Corral LL, et al. Lenalidomide plus dexamethasone versus observation in patients with high-risk smoldering multiple myeloma (QuiRedex): long-term follow-up of a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2016;17(8):1127-36.
64. Mateos MV, Kumar S, Dimopoulos MA, González-Calle V, Kastritis E, Hajek R, et al. International Myeloma Working Group risk stratification model for smoldering multiple myeloma (SMM). *Blood Cancer J*. 2020;10(10):102.
65. Reagan MR, Rosen CJ. Navigating the bone marrow niche: translational insights and cancer-driven dysfunction. *Nat Rev Rheumatol*. 2016;12(3):154-68.
66. De Raeve HR, Vanderkerken K. The role of the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. *Histol Histopathol*. 2005;20(4):1227-50.
67. Klein B, Bataille R. Cytokine network in human multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1992;6(2):273-84.
68. Mitsiades CS, Mitsiades NS, Munshi NC, Richardson PG, Anderson KC. The role of the bone microenvironment in the pathophysiology and therapeutic management of multiple myeloma: interplay of growth factors, their receptors and stromal interactions. *Eur J Cancer*. 2006;42(11):1564-73.
69. Reagan MR, Liaw L, Rosen CJ, Ghobrial IM. Dynamic interplay between bone and multiple myeloma: emerging roles of the osteoblast. *Bone*. 2015;75:161-9.
70. Berardi S, Ria R, Reale A, De Luisi A, Catacchio I, Moschetta M, et al. Multiple myeloma macrophages: pivotal players in the tumor microenvironment. *J Oncol*. 2013;2013:183602.
71. Giuliani N, Storti P, Bolzoni M, Palma BD, Bonomini S. Angiogenesis and multiple myeloma. *Cancer Microenviron*. 2011;4(3):325-37.
72. Kumar S, Kaufman JL, Gasparetto C, Mikhael J, Vij R, Pegourie B, et al. Efficacy of venetoclax as targeted therapy for relapsed/refractory t(11;14) multiple myeloma. *Blood*. 2017;130(22):2401-9.
73. Asosingh K, De Raeve H, de Ridder M, Storme GA, Willems A, Van Riet I, et al. Role of the hypoxic bone marrow microenvironment in 5T2MM murine myeloma tumor progression. *Haematologica*. 2005;90(6):810-7.
74. Martin SK, Diamond P, Williams SA, To LB, Peet DJ, Fujii N, et al. Hypoxia-inducible factor-2 is a novel regulator of aberrant CXCL12 expression in multiple myeloma plasma cells. *Haematologica*. 2010;95(5):776-84.
75. Cominal JG, da Costa Cacemiro M, Pinto-Simões B, Kolb HJ, Malmegrim KCR, de Castro FA. Emerging Role of Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles in Pathogenesis of Haematological Malignancies. *Stem Cells Int*. 2019;2019:6854080.
76. Kim J, Denu RA, Dollar BA, Escalante LE, Kuether JP, Callander NS, et al. Macrophages and mesenchymal stromal cells support survival and proliferation of multiple myeloma cells. *Br J Haematol*. 2012;158(3):336-46.
77. Boiret N, Rapatel C, Veyrat-Masson R, Guillouard L, Guérin JJ, Pigeon P, et al. Characterization of nonexpanded mesenchymal progenitor cells from normal adult human bone marrow. *Exp Hematol*. 2005;33(2):219-25.
78. Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(14):7841-5.
79. Dazzi F, Ramasamy R, Glennie S, Jones SP, Roberts I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev*. 2006;20(3):161-71.

80. Gneccchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res.* 2008;103(11):1204-19.
81. Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol.* 2001;189(1):54-63.
82. Kim EJ, Kim N, Cho SG. The potential use of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Mol Med.* 2013;45(1):e2.
83. André T, Najjar M, Stamatopoulos B, Pieters K, Pradier O, Bron D, et al. Immune impairments in multiple myeloma bone marrow mesenchymal stromal cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2015;64(2):213-24.
84. Garayoa M, Garcia JL, Santamaria C, Garcia-Gomez A, Blanco JF, Pandiella A, et al. Mesenchymal stem cells from multiple myeloma patients display distinct genomic profile as compared with those from normal donors. *Leukemia.* 2009;23(8):1515-27.
85. Garcia-Gomez A, Sanchez-Guijo F, Del Cañizo MC, San Miguel JF, Garayoa M. Multiple myeloma mesenchymal stromal cells: Contribution to myeloma bone disease and therapeutics. *World J Stem Cells.* 2014;6(3):322-43.
86. Markovina S, Callander NS, O'Connor SL, Xu G, Shi Y, Leith CP, et al. Bone marrow stromal cells from multiple myeloma patients uniquely induce bortezomib resistant NF-kappaB activity in myeloma cells. *Mol Cancer.* 2010;9:176.
87. Reagan MR, Ghobrial IM. Multiple myeloma mesenchymal stem cells: characterization, origin, and tumor-promoting effects. *Clin Cancer Res.* 2012;18(2):342-9.
88. Xu S, De Veirman K, De Becker A, Vanderkerken K, Van Riet I. Mesenchymal stem cells in multiple myeloma: a therapeutical tool or target? *Leukemia.* 2018;32(7):1500-14.
89. Yang H, Zheng Y, Zhang Y, Cao Z, Jiang Y. Mesenchymal stem cells derived from multiple myeloma patients protect against chemotherapy through autophagy-dependent activation of NF-κB signaling. *Leuk Res.* 2017;60:82-8.
90. Cocucci E, Meldolesi J. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends Cell Biol.* 2015;25(6):364-72.
91. Baglio SR, Rooijers K, Koppers-Lalic D, Verweij FJ, Pérez Lanzón M, Zini N, et al. Human bone marrow- and adipose-mesenchymal stem cells secrete exosomes enriched in distinctive miRNA and tRNA species. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6(1):127.
92. Dabbah M, Attar-Schneider O, Tartakover Matalon S, Shefler I, Jarchwsky Dolberg O, Lishner M, et al. Microvesicles derived from normal and multiple myeloma bone marrow mesenchymal stem cells differentially modulate myeloma cells' phenotype and translation initiation. *Carcinogenesis.* 2017;38(7):708-16.
93. Roccaro AM, Sacco A, Maiso P, Azab AK, Tai YT, Reagan M, et al. BM mesenchymal stromal cell-derived exosomes facilitate multiple myeloma progression. *J Clin Invest.* 2013;123(4):1542-55.
94. Wang J, Hendrix A, Hernot S, Lemaire M, De Bruyne E, Van Valckenborgh E, et al. Bone marrow stromal cell-derived exosomes as communicators in drug resistance in multiple myeloma cells. *Blood.* 2014;124(4):555-66.
95. Liu Z, Liu H, Li Y, Shao Q, Chen J, Song J, et al. Multiple myeloma-derived exosomes inhibit osteoblastic differentiation and improve IL-6 secretion of BMSCs from multiple myeloma. *J Investig Med.* 2020;68(1):45-51.
96. Berardo S, Sukhovei L, Andorno S, Carriero A, Stecco A. Quantitative bone marrow magnetic resonance imaging through apparent diffusion coefficient and fat fraction in multiple myeloma patients. *Radiol Med.* 2021;126(3):445-52.
97. Koutoulidis V, Terpos E, Klapa I, Cheliotis G, Ntanasis-Stathopoulos I, Boultađaki A, et al. Whole-Body Low-Dose CT in Multiple Myeloma: Diagnostic Value of Appendicular Medullary Patterns of Attenuation. *AJR Am J Roentgenol.* 2021;216(3):742-51.
98. Liu Z, Xu J, He J, Liu H, Lin P, Wan X, et al. Mature adipocytes in bone marrow protect myeloma cells against chemotherapy through autophagy activation. *Oncotarget.* 2015;6(33):34329-41.
99. Dalamaga M, Diakopoulos KN, Mantzoros CS. The role of adiponectin in cancer: a review of current evidence. *Endocr Rev.* 2012;33(4):547-94.

100. Islam R, Altundag K, Kurt M, Altundag O, Turen S. Association between obesity and multiple myeloma in postmenopausal women may be attributed to increased aromatization of androgen in adipose tissue. *Med Hypotheses*. 2005;65(5):1001-2.
101. Michigami T, Shimizu N, Williams PJ, Niewolna M, Dallas SL, Mundy GR, et al. Cell-cell contact between marrow stromal cells and myeloma cells via VCAM-1 and alpha(4)beta(1)-integrin enhances production of osteoclast-stimulating activity. *Blood*. 2000;96(5):1953-60.
102. Pellat-Deceunynck C, Barillé S, Puthier D, Rapp MJ, Harousseau JL, Bataille R, et al. Adhesion molecules on human myeloma cells: significant changes in expression related to malignancy, tumor spreading, and immortalization. *Cancer Res*. 1995;55(16):3647-53.
103. Sanz-Rodríguez F, Ruiz-Velasco N, Pascual-Salcedo D, Teixidó J. Characterization of VLA-4-dependent myeloma cell adhesion to fibronectin and VCAM-1. *Br J Haematol*. 1999;107(4):825-34.
104. Teoh G, Anderson KC. Interaction of tumor and host cells with adhesion and extracellular matrix molecules in the development of multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1997;11(1):27-42.
105. Shain KH, Yarde DN, Meads MB, Huang M, Jove R, Hazlehurst LA, et al. Beta1 integrin adhesion enhances IL-6-mediated STAT3 signaling in myeloma cells: implications for microenvironment influence on tumor survival and proliferation. *Cancer Res*. 2009;69(3):1009-15.
106. Fernández de Larrea C, Kyle RA, Durie BG, Ludwig H, Usmani S, Vesole DH, et al. Plasma cell leukemia: consensus statement on diagnostic requirements, response criteria and treatment recommendations by the International Myeloma Working Group. *Leukemia*. 2013;27(4):780-91.
107. Terpos E, Migkou M, Christoulas D, Gavriatopoulou M, Eleutherakis-Papaiakovou E, Kanellias N, et al. Increased circulating VCAM-1 correlates with advanced disease and poor survival in patients with multiple myeloma: reduction by post-bortezomib and lenalidomide treatment. *Blood Cancer J*. 2016;6(5):e428.
108. Akira S, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol*. 1993;54:1-78.
109. Lauta VM. Interleukin-6 and the network of several cytokines in multiple myeloma: an overview of clinical and experimental data. *Cytokine*. 2001;16(3):79-86.
110. Urashima M, Ogata A, Chauhan D, Vidriales MB, Teoh G, Hoshi Y, et al. Interleukin-6 promotes multiple myeloma cell growth via phosphorylation of retinoblastoma protein. *Blood*. 1996;88(6):2219-27.
111. Gaillard JP, Bataille R, Brailly H, Zuber C, Yasukawa K, Attal M, et al. Increased and highly stable levels of functional soluble interleukin-6 receptor in sera of patients with monoclonal gammopathy. *Eur J Immunol*. 1993;23(4):820-4.
112. Kyrtsolis MC, Dedoussis G, Zervas C, Perifanis V, Baxevanis C, Stamatelou M, et al. Soluble interleukin-6 receptor (sIL-6R), a new prognostic factor in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 1996;93(2):398-400.
113. Papadaki H, Kyriakou D, Foudoulakis A, Markidou F, Alexandrakis M, Eliopoulos GD. Serum levels of soluble IL-6 receptor in multiple myeloma as indicator of disease activity. *Acta Haematol*. 1997;97(4):191-5.
114. Stasi R, Brunetti M, Parma A, Di Giulio C, Terzoli E, Pagano A. The prognostic value of soluble interleukin-6 receptor in patients with multiple myeloma. *Cancer*. 1998;82(10):1860-6.
115. Abe M, Hiura K, Wilde J, Shioyasono A, Moriyama K, Hashimoto T, et al. Osteoclasts enhance myeloma cell growth and survival via cell-cell contact: a vicious cycle between bone destruction and myeloma expansion. *Blood*. 2004;104(8):2484-91.
116. Anderson KC, Jones RM, Morimoto C, Leavitt P, Barut BA. Response patterns of purified myeloma cells to hematopoietic growth factors. *Blood*. 1989;73(7):1915-24.
117. Noonan K, Marchionni L, Anderson J, Pardoll D, Roodman GD, Borrello I. A novel role of IL-17-producing lymphocytes in mediating lytic bone disease in multiple myeloma. *Blood*. 2010;116(18):3554-63.
118. Prabhala RH, Pelluru D, Fulciniti M, Prabhala HK, Nanjappa P, Song W, et al. Elevated IL-17 produced by TH17 cells promotes myeloma cell growth and inhibits immune function in multiple myeloma. *Blood*. 2010;115(26):5385-92.
119. Ratta M, Fagnoni F, Curti A, Vescovini R, Sansoni P, Oliviero B, et al. Dendritic cells are functionally defective in multiple myeloma: the role of interleukin-6. *Blood*. 2002;100(1):230-7.

120. Klein B. Cytokine, cytokine receptors, transduction signals, and oncogenes in human multiple myeloma. *Semin Hematol.* 1995;32(1):4-19.
121. Yan B, Wei JJ, Yuan Y, Sun R, Li D, Luo J, et al. IL-6 cooperates with G-CSF to induce protumor function of neutrophils in bone marrow by enhancing STAT3 activation. *J Immunol.* 2013;190(11):5882-93.
122. Wang H, Wang L, Chi PD, Wang WD, Chen XQ, Geng QR, et al. High level of interleukin-10 in serum predicts poor prognosis in multiple myeloma. *Br J Cancer.* 2016;114(4):463-8.
123. Alexandrakis MG, Goulidaki N, Pappa CA, Boula A, Psarakis F, Neonakis I, et al. Interleukin-10 Induces Both Plasma Cell Proliferation and Angiogenesis in Multiple Myeloma. *Pathol Oncol Res.* 2015;21(4):929-34.
124. Howard M, O'Garra A, Ishida H, de Waal Malefyt R, de Vries J. Biological properties of interleukin 10. *J Clin Immunol.* 1992;12(4):239-47.
125. Croucher PI, McDonald MM, Martin TJ. Bone metastasis: the importance of the neighbourhood. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(6):373-86.
126. Yeh AC, Ramaswamy S. Mechanisms of Cancer Cell Dormancy--Another Hallmark of Cancer? *Cancer Res.* 2015;75(23):5014-22.
127. Erratum: Chen Z, Orlowski RZ, Wang M, Kwak L, McCarty N. Osteoblastic niche supports the growth of quiescent multiple myeloma cells. *Blood.* 2014;123(14):2204-2208. *Blood.* 2016;127(22):2777.
128. Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature.* 2014;505(7483):327-34.
129. Wei Q, Frenette PS. Niches for Hematopoietic Stem Cells and Their Progeny. *Immunity.* 2018;48(4):632-48.
130. Khoo WH, Ledergor G, Weiner A, Roden DL, Terry RL, McDonald MM, et al. A niche-dependent myeloid transcriptome signature defines dormant myeloma cells. *Blood.* 2019;134(1):30-43.
131. Rajkumar SV, Mesa RA, Fonseca R, Schroeder G, Plevak MF, Dispenzieri A, et al. Bone marrow angiogenesis in 400 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma, and primary amyloidosis. *Clin Cancer Res.* 2002;8(7):2210-6.
132. Zhang H, Vakil V, Braunstein M, Smith EL, Maroney J, Chen L, et al. Circulating endothelial progenitor cells in multiple myeloma: implications and significance. *Blood.* 2005;105(8):3286-94.
133. Terpos E, Ntanasis-Stathopoulos I, Gavriatopoulou M, Dimopoulos MA. Pathogenesis of bone disease in multiple myeloma: from bench to bedside. *Blood Cancer J.* 2018;8(1):7.
134. Greco C, D'Agnano I, Vitelli G, Vona R, Marino M, Mottolese M, et al. c-MYC deregulation is involved in melphalan resistance of multiple myeloma: role of PDGF-BB. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2006;19(1):67-79.
135. Otsuki T, Yamada O, Yata K, Sakaguchi H, Kurebayashi J, Nakazawa N, et al. Expression of fibroblast growth factor and FGF-receptor family genes in human myeloma cells, including lines possessing t(4;14)(q16.3;q32. 3) and FGFR3 translocation. *Int J Oncol.* 1999;15(6):1205-12.
136. Corliss BA, Azimi MS, Munson JM, Peirce SM, Murfee WL. Macrophages: An Inflammatory Link Between Angiogenesis and Lymphangiogenesis. *Microcirculation.* 2016;23(2):95-121.
137. Gotthardt D, Putz EM, Grundschober E, Prchal-Murphy M, Straka E, Kudweis P, et al. STAT5 Is a Key Regulator in NK Cells and Acts as a Molecular Switch from Tumor Surveillance to Tumor Promotion. *Cancer Discov.* 2016;6(4):414-29.
138. Palazon A, Tyrakis PA, Macias D, Veliça P, Rundqvist H, Fitzpatrick S, et al. An HIF-1 $\alpha$ /VEGF-A Axis in Cytotoxic T Cells Regulates Tumor Progression. *Cancer Cell.* 2017;32(5):669-83 e5.
139. Koebel CM, Vermi W, Swann JB, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ, et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature.* 2007;450(7171):903-7.
140. MacKie RM, Reid R, Junor B. Fatal melanoma transferred in a donated kidney 16 years after melanoma surgery. *N Engl J Med.* 2003;348(6):567-8.
141. Nakamura K, Smyth MJ. Targeting cancer-related inflammation in the era of immunotherapy. *Immunol Cell Biol.* 2017;95(4):325-32.
142. Park SL, Buzzai A, Rautela J, Hor JL, Hochheiser K, Efferm M, et al. Tissue-resident memory CD8(+) T cells promote melanoma-immune equilibrium in skin. *Nature.* 2019;565(7739):366-71.

143. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011;331(6024):1565-70.
144. Carbone E, Neri P, Mesuraca M, Fulciniti MT, Otsuki T, Pende D, et al. HLA class I, NKG2D, and natural cytotoxicity receptors regulate multiple myeloma cell recognition by natural killer cells. *Blood*. 2005;105(1):251-8.
145. El-Sherbiny YM, Meade JL, Holmes TD, McGonagle D, Mackie SL, Morgan AW, et al. The requirement for DNAM-1, NKG2D, and NKp46 in the natural killer cell-mediated killing of myeloma cells. *Cancer Res*. 2007;67(18):8444-9.
146. Guillerey C, Ferrari de Andrade L, Vuckovic S, Miles K, Ngiow SF, Yong MC, et al. Immunosurveillance and therapy of multiple myeloma are CD226 dependent. *J Clin Invest*. 2015;125(5):2077-89.
147. Dhodapkar MV, Sexton R, Das R, Dhodapkar KM, Zhang L, Sundaram R, et al. Prospective analysis of antigen-specific immunity, stem-cell antigens, and immune checkpoints in monoclonal gammopathy. *Blood*. 2015;126(22):2475-8.
148. Takeda K, Nakayama M, Hayakawa Y, Kojima Y, Ikeda H, Imai N, et al. IFN- $\gamma$  is required for cytotoxic T cell-dependent cancer genome immunoediting. *Nat Commun*. 2017;8:14607.
149. Vuckovic S, Minnie SA, Smith D, Gartlan KH, Watkins TS, Markey KA, et al. Bone marrow transplantation generates T cell-dependent control of myeloma in mice. *J Clin Invest*. 2019;129(1):106-21.
150. Miller A, Asmann Y, Cattaneo L, Braggio E, Keats J, Auclair D, et al. High somatic mutation and neoantigen burden are correlated with decreased progression-free survival in multiple myeloma. *Blood Cancer J*. 2017;7(9):e612.
151. Perumal D, Imai N, Laganà A, Finnigan J, Melnekoff D, Leshchenko VV, et al. Mutation-derived Neoantigen-specific T-cell Responses in Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res*. 2020;26(2):450-64.
152. van Baren N, Brasseur F, Godelaine D, Hames G, Ferrant A, Lehmann F, et al. Genes encoding tumor-specific antigens are expressed in human myeloma cells. *Blood*. 1999;94(4):1156-64.
153. Perrot A, Lauwers-Cances V, Tournay E, Hulin C, Chretien ML, Royer B, et al. Development and Validation of a Cytogenetic Prognostic Index Predicting Survival in Multiple Myeloma. *J Clin Oncol*. 2019;37(19):1657-65.
154. Prabhala RH, Fulciniti M, Pelluru D, Rashid N, Nigroiu A, Nanjappa P, et al. Targeting IL-17A in multiple myeloma: a potential novel therapeutic approach in myeloma. *Leukemia*. 2016;30(2):379-89.
155. Bailur JK, McCachren SS, Doxie DB, Shrestha M, Pendleton K, Nooka AK, et al. Early alterations in stem-like/resident T cells, innate and myeloid cells in the bone marrow in preneoplastic gammopathy. *JCI Insight*. 2019;5(11).
156. Suen H, Brown R, Yang S, Weatherburn C, Ho PJ, Woodland N, et al. Multiple myeloma causes clonal T-cell immunosenescence: identification of potential novel targets for promoting tumour immunity and implications for checkpoint blockade. *Leukemia*. 2016;30(8):1716-24.
157. Zelle-Rieser C, Thangavadivel S, Biedermann R, Brunner A, Stoitzner P, Willenbacher E, et al. T cells in multiple myeloma display features of exhaustion and senescence at the tumor site. *J Hematol Oncol*. 2016;9(1):116.
158. Guillerey C, Harjunpää H, Carrié N, Kassem S, Teo T, Miles K, et al. TIGIT immune checkpoint blockade restores CD8(+) T-cell immunity against multiple myeloma. *Blood*. 2018;132(16):1689-94.
159. Minnie SA, Kuns RD, Gartlan KH, et al. Myeloma escape after stem cell transplantation is a consequence of T-cell exhaustion and is prevented by TIGIT blockade. *Blood*. 2018;132(16):1675-1688. *Blood*. 2019;134(21):1878.
160. Manieri NA, Chiang EY, Grogan JL. TIGIT: A Key Inhibitor of the Cancer Immunity Cycle. *Trends Immunol*. 2017;38(1):20-8.
161. Nakamura K, Smyth MJ. Myeloid immunosuppression and immune checkpoints in the tumor microenvironment. *Cell Mol Immunol*. 2020;17(1):1-12.
162. Zavidij O, Haradhvala NJ, Mouhieddine TH, Sklavenitis-Pistofidis R, Cai S, Reidy M, et al. Single-cell RNA sequencing reveals compromised immune microenvironment in precursor stages of multiple myeloma. *Nat Cancer*. 2020;1(5):493-506.

163. De Veirman K, De Beule N, Maes K, Menu E, De Bruyne E, De Raeve H, et al. Extracellular S100A9 Protein in Bone Marrow Supports Multiple Myeloma Survival by Stimulating Angiogenesis and Cytokine Secretion. *Cancer Immunol Res.* 2017;5(10):839-46.
164. Nakamura K, Kassem S, Cleynen A, Chrétien ML, Guillerey C, Putz EM, et al. Dysregulated IL-18 Is a Key Driver of Immunosuppression and a Possible Therapeutic Target in the Multiple Myeloma Microenvironment. *Cancer Cell.* 2018;33(4):634-48 e5.
165. Ramachandran IR, Martner A, Pisklakova A, Condamine T, Chase T, Vogl T, et al. Myeloid-derived suppressor cells regulate growth of multiple myeloma by inhibiting T cells in bone marrow. *J Immunol.* 2013;190(7):3815-23.
166. Sinha P, Okoro C, Foell D, Freeze HH, Ostrand-Rosenberg S, Srikrishna G. Proinflammatory S100 proteins regulate the accumulation of myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol.* 2008;181(7):4666-75.
167. Zhao E, Xu H, Wang L, Kryczek I, Wu K, Hu Y, et al. Bone marrow and the control of immunity. *Cell Mol Immunol.* 2012;9(1):11-9.
168. Nakamura K, Smyth MJ, Martinet L. Cancer immunoediting and immune dysregulation in multiple myeloma. *Blood.* 2020;136(24):2731-40.
169. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2004;351(18):1860-73.
170. Hutchison CA, Batuman V, Behrens J, Bridoux F, Sirac C, Dispenzieri A, et al. The pathogenesis and diagnosis of acute kidney injury in multiple myeloma. *Nat Rev Nephrol.* 2011;8(1):43-51.
171. Dimopoulos M, Kyle R, Femand JP, Rajkumar SV, San Miguel J, Chanan-Khan A, et al. Consensus recommendations for standard investigative workup: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 3. *Blood.* 2011;117(18):4701-5.
172. Hillengass J, Fechtner K, Weber MA, Bäuerle T, Ayyaz S, Heiss C, et al. Prognostic significance of focal lesions in whole-body magnetic resonance imaging in patients with asymptomatic multiple myeloma. *J Clin Oncol.* 2010;28(9):1606-10.
173. Kastiris E, Mouloupoulos LA, Terpos E, Koutoulidis V, Dimopoulos MA. The prognostic importance of the presence of more than one focal lesion in spine MRI of patients with asymptomatic (smoldering) multiple myeloma. *Leukemia.* 2014;28(12):2402-3.
174. Ghobrial IM. Myeloma as a model for the process of metastasis: implications for therapy. *Blood.* 2012;120(1):20-30.
175. Cristiano S, Leal A, Phallen J, Fiksel J, Adleff V, Bruhm DC, et al. Genome-wide cell-free DNA fragmentation in patients with cancer. *Nature.* 2019;570(7761):385-9.
176. Liu MC, Oxnard GR, Klein EA, Swanton C, Seiden MV. Sensitive and specific multi-cancer detection and localization using methylation signatures in cell-free DNA. *Ann Oncol.* 2020;31(6):745-59.
177. Shen SY, Singhania R, Fehringer G, Chakravarthy A, Roehrl MHA, Chadwick D, et al. Sensitive tumour detection and classification using plasma cell-free DNA methylomes. *Nature.* 2018;563(7732):579-83.
178. Garcés JJ, Bretones G, Burgos L, Valdes-Mas R, Puig N, Cedena MT, et al. Circulating tumor cells for comprehensive and multiregional non-invasive genetic characterization of multiple myeloma. *Leukemia.* 2020;34(11):3007-18.
179. Guo G, Raje NS, Seifer C, Kloeber J, Isenhardt R, Ha G, et al. Genomic discovery and clonal tracking in multiple myeloma by cell-free DNA sequencing. *Leukemia.* 2018;32(8):1838-41.
180. Kis O, Kaedbey R, Chow S, Danesh A, Dowar M, Li T, et al. Circulating tumour DNA sequence analysis as an alternative to multiple myeloma bone marrow aspirates. *Nat Commun.* 2017;8:15086.
181. Lohr JG, Kim S, Gould J, Knoechel B, Drier Y, Cotton MJ, et al. Genetic interrogation of circulating multiple myeloma cells at single-cell resolution. *Sci Transl Med.* 2016;8(363):363ra147.
182. Manier S, Park J, Capelletti M, Bustoros M, Freeman SS, Ha G, et al. Whole-exome sequencing of cell-free DNA and circulating tumor cells in multiple myeloma. *Nat Commun.* 2018;9(1):1691.
183. Mishima Y, Paiva B, Shi J, Park J, Manier S, Takagi S, et al. The Mutational Landscape of Circulating Tumor Cells in Multiple Myeloma. *Cell Rep.* 2017;19(1):218-24.
184. Garcés JJ, Simicek M, Vicari M, Brozova L, Burgos L, Bezdekova R, et al. Transcriptional profiling of circulating tumor cells in multiple myeloma: a new model to understand disease dissemination. *Leukemia.* 2020;34(2):589-603.

185. Foulk B, Schaffer M, Gross S, Rao C, Smirnov D, Connelly MC, et al. Enumeration and characterization of circulating multiple myeloma cells in patients with plasma cell disorders. *Br J Haematol.* 2018;180(1):71-81.
186. Nowakowski GS, Witzig TE, Dingli D, Tracz MJ, Gertz MA, Lacy MQ, et al. Circulating plasma cells detected by flow cytometry as a predictor of survival in 302 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood.* 2005;106(7):2276-9.
187. Wang S, Zhou Y, Qin X, Nair S, Huang X, Liu Y. Label-free detection of rare circulating tumor cells by image analysis and machine learning. *Sci Rep.* 2020;10(1):12226.
188. Sonneveld P, Avet-Loiseau H, Lonial S, Usmani S, Siegel D, Anderson KC, et al. Treatment of multiple myeloma with high-risk cytogenetics: a consensus of the International Myeloma Working Group. *Blood.* 2016;127(24):2955-62.
189. Kumar S, Fonseca R, Ketterling RP, Dispenzieri A, Lacy MQ, Gertz MA, et al. Trisomies in multiple myeloma: impact on survival in patients with high-risk cytogenetics. *Blood.* 2012;119(9):2100-5.
190. Hebraud B, Magrangeas F, Cleyne A, Lauwers-Cances V, Chretien ML, Hulin C, et al. Role of additional chromosomal changes in the prognostic value of t(4;14) and del(17p) in multiple myeloma: the IFM experience. *Blood.* 2015;125(13):2095-100.
191. Leiba M, Duek A, Amariglio N, Avigdor A, Benyamini N, Hardan I, et al. Translocation t(11;14) in newly diagnosed patients with multiple myeloma: Is it always favorable? *Genes Chromosomes Cancer.* 2016;55(9):710-8.
192. Mikhael JR, Dingli D, Roy V, Reeder CB, Buadi FK, Hayman SR, et al. Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) consensus guidelines 2013. *Mayo Clin Proc.* 2013;88(4):360-76.
193. Chng WJ, Dispenzieri A, Chim CS, Fonseca R, Goldschmidt H, Lentzsch S, et al. IMWG consensus on risk stratification in multiple myeloma. *Leukemia.* 2014;28(2):269-77.
194. Boyd KD, Ross FM, Chiecchio L, Dagrada GP, Konn ZJ, Tapper WJ, et al. A novel prognostic model in myeloma based on co-segregating adverse FISH lesions and the ISS: analysis of patients treated in the MRC Myeloma IX trial. *Leukemia.* 2012;26(2):349-55.
195. Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Bladé J, et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol.* 2005;23(15):3412-20.
196. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosinol L, et al. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol.* 2015;33(26):2863-9.
197. Lonial S, Anderson KC. Association of response endpoints with survival outcomes in multiple myeloma. *Leukemia.* 2014;28(2):258-68.
198. Cowan AJ, Green DJ, Kwok M, Lee S, Coffey DG, Holmberg LA, et al. Diagnosis and Management of Multiple Myeloma: A Review. *JAMA.* 2022;327(5):464-77.
199. van de Donk N, Pawlyn C, Yong KL. Multiple myeloma. *Lancet.* 2021;397(10272):410-27.
200. Attal M, Harousseau JL. Standard therapy versus autologous transplantation in multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1997;11(1):133-46.
201. Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, Sotto JJ, Fuzibet JG, Rossi JF, et al. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Français du Myélome. *N Engl J Med.* 1996;335(2):91-7.
202. Child JA, Morgan GJ, Davies FE, Owen RG, Bell SE, Hawkins K, et al. High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2003;348(19):1875-83.
203. Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A, Hayman SR, Kumar S, Leung N, et al. Impact of age and serum creatinine value on outcome after autologous blood stem cell transplantation for patients with multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant.* 2007;39(10):605-11.
204. Rajkumar SV, Jacobus S, Callander NS, Fonseca R, Vesole DH, Williams ME, et al. Lenalidomide plus high-dose dexamethasone versus lenalidomide plus low-dose dexamethasone as initial therapy for newly diagnosed multiple myeloma: an open-label randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2010;11(1):29-37.

205. Durie BGM, Hoering A, Abidi MH, Rajkumar SV, Epstein J, Kahanic SP, et al. Bortezomib with lenalidomide and dexamethasone versus lenalidomide and dexamethasone alone in patients with newly diagnosed myeloma without intent for immediate autologous stem-cell transplant (SWOG S0777): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2017;389(10068):519-27.
206. Cavo M, Tacchetti P, Patriarca F, Petrucci MT, Pantani L, Galli M, et al. Bortezomib with thalidomide plus dexamethasone compared with thalidomide plus dexamethasone as induction therapy before, and consolidation therapy after, double autologous stem-cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma: a randomised phase 3 study. *Lancet*. 2010;376(9758):2075-85.
207. Kumar S, Flinn I, Richardson PG, Hari P, Callander N, Noga SJ, et al. Randomized, multicenter, phase 2 study (EVOLUTION) of combinations of bortezomib, dexamethasone, cyclophosphamide, and lenalidomide in previously untreated multiple myeloma. *Blood*. 2012;119(19):4375-82.
208. Facon T, Mary JY, Hulin C, Benboubker L, Attal M, Pegourie B, et al. Melphalan and prednisone plus thalidomide versus melphalan and prednisone alone or reduced-intensity autologous stem cell transplantation in elderly patients with multiple myeloma (IFM 99-06): a randomised trial. *Lancet*. 2007;370(9594):1209-18.
209. Palumbo A, Bringhen S, Caravita T, Merla E, Capparella V, Callea V, et al. Oral melphalan and prednisone chemotherapy plus thalidomide compared with melphalan and prednisone alone in elderly patients with multiple myeloma: randomised controlled trial. *Lancet*. 2006;367(9513):825-31.
210. San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK, Dimopoulos MA, Shpilberg O, Kropff M, et al. Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2008;359(9):906-17.
211. Benboubker L, Dimopoulos MA, Dispenzieri A, Catalano J, Belch AR, Cavo M, et al. Lenalidomide and dexamethasone in transplant-ineligible patients with myeloma. *N Engl J Med*. 2014;371(10):906-17.
212. Palumbo A, Cavallo F, Gay F, Di Raimondo F, Ben Yehuda D, Petrucci MT, et al. Autologous transplantation and maintenance therapy in multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2014;371(10):895-905.
213. Kumar A, Kharfan-Dabaja MA, Glasmacher A, Djulbegovic B. Tandem versus single autologous hematopoietic cell transplantation for the treatment of multiple myeloma: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(2):100-6.
214. Sonneveld P, Schmidt-Wolf IG, van der Holt B, El Jarari L, Bertsch U, Salwender H, et al. Bortezomib induction and maintenance treatment in patients with newly diagnosed multiple myeloma: results of the randomized phase III HOVON-65/ GMMG-HD4 trial. *J Clin Oncol*. 2012;30(24):2946-55.
215. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, Durie B, Landgren O, Moreau P, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2016;17(8):e328-e46.
216. Munshi NC, Avet-Loiseau H, Rawstron AC, Owen RG, Child JA, Thakurta A, et al. Association of Minimal Residual Disease With Superior Survival Outcomes in Patients With Multiple Myeloma: A Meta-analysis. *JAMA Oncol*. 2017;3(1):28-35.
217. Moreau P, San Miguel J, Sonneveld P, Mateos MV, Zamagni E, Avet-Loiseau H, et al. Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2017;28(suppl\_4):iv52-iv61.
218. Dimopoulos MA, Goldschmidt H, Niesvizky R, Joshua D, Chng WJ, Oriol A, et al. Carfilzomib or bortezomib in relapsed or refractory multiple myeloma (ENDEAVOR): an interim overall survival analysis of an open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2017;18(10):1327-37.
219. Dimopoulos MA, Moreau P, Palumbo A, Joshua D, Pour L, Hájek R, et al. Carfilzomib and dexamethasone versus bortezomib and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma (ENDEAVOR): a randomised, phase 3, open-label, multicentre study. *Lancet Oncol*. 2016;17(1):27-38.
220. Moreau P, Masszi T, Grzasko N, Bahlis NJ, Hansson M, Pour L, et al. Oral ixazomib, lenalidomide, and dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2016;374(17):1621-34.
221. Siegel DS, Dimopoulos MA, Ludwig H, Facon T, Goldschmidt H, Jakubowiak A, et al. Improvement in Overall Survival With Carfilzomib, Lenalidomide, and Dexamethasone in Patients With Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *J Clin Oncol*. 2018;36(8):728-34.



222. Dimopoulos MA, Lonial S, Betts KA, Chen C, Zichlin ML, Brun A, et al. Elotuzumab plus lenalidomide and dexamethasone in relapsed/refractory multiple myeloma: Extended 4-year follow-up and analysis of relative progression-free survival from the randomized ELOQUENT-2 trial. *Cancer*. 2018;124(20):4032-43.
223. Lonial S, Dimopoulos M, Palumbo A, White D, Grosicki S, Spicka I, et al. Elotuzumab Therapy for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2015;373(7):621-31.
224. Zonder JA, Mohrbacher AF, Singhal S, van Rhee F, Bensinger WI, Ding H, et al. A phase 1, multicenter, open-label, dose escalation study of elotuzumab in patients with advanced multiple myeloma. *Blood*. 2012;120(3):552-9.
225. Dimopoulos MA, Oriol A, Nahi H, San-Miguel J, Bahlis NJ, Usmani SZ, et al. Daratumumab, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2016;375(14):1319-31.
226. Lokhorst HM, Plesner T, Laubach JP, Nahi H, Gimsing P, Hansson M, et al. Targeting CD38 with Daratumumab Monotherapy in Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2015;373(13):1207-19.
227. Palumbo A, Chanan-Khan A, Weisel K, Nooka AK, Masszi T, Beksac M, et al. Daratumumab, Bortezomib, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2016;375(8):754-66.
228. Richardson PG, Oriol A, Beksac M, Liberati AM, Galli M, Schjesvold F, et al. Pomalidomide, bortezomib, and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma previously treated with lenalidomide (OPTIMISMM): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2019;20(6):781-94.
229. San-Miguel JF, Hungria VT, Yoon SS, Beksac M, Dimopoulos MA, Elghandour A, et al. Panobinostat plus bortezomib and dexamethasone versus placebo plus bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma: a multicentre, randomised, double-blind phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15(11):1195-206.
230. Cook G, Williams C, Brown JM, Cairns DA, Cavenagh J, Snowden JA, et al. High-dose chemotherapy plus autologous stem-cell transplantation as consolidation therapy in patients with relapsed multiple myeloma after previous autologous stem-cell transplantation (NCRI Myeloma X Relapse [Intensive trial]): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15(8):874-85.
231. Chavda SJ, Maciocia PM, Mesiri P, Counsell N, Kothari J, Bird A, et al. A new prognostic model for myeloma patients relapsing from upfront autologous transplantation based on ISS and PFS1. *Br J Haematol*. 2019;185(2):350-3.
232. Kumar SK, Dispenzieri A, Fraser R, Mingwei F, Akpek G, Cornell R, et al. Early relapse after autologous hematopoietic cell transplantation remains a poor prognostic factor in multiple myeloma but outcomes have improved over time. *Leukemia*. 2018;32(4):986-95.
233. Chari A, Suvannasankha A, Fay JW, Arnulf B, Kaufman JL, Ifthikharuddin JJ, et al. Daratumumab plus pomalidomide and dexamethasone in relapsed and/or refractory multiple myeloma. *Blood*. 2017;130(8):974-81.
234. Dimopoulos MA, Dytfeld D, Grosicki S, Moreau P, Takezako N, Hori M, et al. Elotuzumab plus Pomalidomide and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2018;379(19):1811-22.
235. Attal M, Richardson PG, Rajkumar SV, San-Miguel J, Beksac M, Spicka I, et al. Isatuximab plus pomalidomide and low-dose dexamethasone versus pomalidomide and low-dose dexamethasone in patients with relapsed and refractory multiple myeloma (ICARIA-MM): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 study. *Lancet*. 2019;394(10214):2096-107.
236. Baz RC, Martin TG, 3rd, Lin HY, Zhao X, Shain KH, Cho HJ, et al. Randomized multicenter phase 2 study of pomalidomide, cyclophosphamide, and dexamethasone in relapsed refractory myeloma. *Blood*. 2016;127(21):2561-8.
237. Usmani SZ, Nahi H, Plesner T, Weiss BM, Bahlis NJ, Belch A, et al. Daratumumab monotherapy in patients with heavily pretreated relapsed or refractory multiple myeloma: final results from the phase 2 GEN501 and SIRIUS trials. *Lancet Haematol*. 2020;7(6):e447-e55.
238. Chari A, Vogl DT, Gavriatopoulou M, Nooka AK, Yee AJ, Huff CA, et al. Oral Selinexor-Dexamethasone for Triple-Class Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2019;381(8):727-38.
239. Lonial S, Lee HC, Badros A, Trudel S, Nooka AK, Chari A, et al. Belantamab mafodotin for relapsed or refractory multiple myeloma (DREAMM-2): a two-arm, randomised, open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2020;21(2):207-21.

240. Munshi NC, Anderson LD, Jr., Shah N, Madduri D, Berdeja J, Lonial S, et al. Idecabtagene Vicleucel in Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2021;384(8):705-16.
241. Raje N, Berdeja J, Lin Y, Siegel D, Jagannath S, Madduri D, et al. Anti-BCMA CAR T-Cell Therapy bb2121 in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2019;380(18):1726-37.
242. Bringhen S, Mateos MV, Zweegman S, Larocca A, Falcone AP, Oriol A, et al. Age and organ damage correlate with poor survival in myeloma patients: meta-analysis of 1435 individual patient data from 4 randomized trials. *Haematologica*. 2013;98(6):980-7.
243. Dumontet C, Hulin C, Dimopoulos MA, Belch A, Dispenzieri A, Ludwig H, et al. A predictive model for risk of early grade  $\geq 3$  infection in patients with multiple myeloma not eligible for transplant: analysis of the FIRST trial. *Leukemia*. 2018;32(6):1404-13.
244. Augustson BM, Begum G, Dunn JA, Barth NJ, Davies F, Morgan G, et al. Early mortality after diagnosis of multiple myeloma: analysis of patients entered onto the United Kingdom Medical Research Council trials between 1980 and 2002--Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. *J Clin Oncol*. 2005;23(36):9219-26.
245. Blimark C, Holmberg E, Mellqvist UH, Landgren O, Björkholm M, Hultcrantz M, et al. Multiple myeloma and infections: a population-based study on 9253 multiple myeloma patients. *Haematologica*. 2015;100(1):107-13.
246. Terpos E, Morgan G, Dimopoulos MA, Drake MT, Lentzsch S, Raje N, et al. International Myeloma Working Group recommendations for the treatment of multiple myeloma-related bone disease. *J Clin Oncol*. 2013;31(18):2347-57.
247. Raje N, Terpos E, Willenbacher W, Shimizu K, García-Sanz R, Durie B, et al. Denosumab versus zoledronic acid in bone disease treatment of newly diagnosed multiple myeloma: an international, double-blind, double-dummy, randomised, controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2018;19(3):370-81.
248. Teh BW, Harrison SJ, Worth LJ, Spelman T, Thursky KA, Slavin MA. Risks, severity and timing of infections in patients with multiple myeloma: a longitudinal cohort study in the era of immunomodulatory drug therapy. *Br J Haematol*. 2015;171(1):100-8.
249. Drayson MT, Bowcock S, Planche T, Iqbal G, Pratt G, Yong K, et al. Levofloxacin prophylaxis in patients with newly diagnosed myeloma (TEAMM): a multicentre, double-blind, placebo-controlled, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2019;20(12):1760-72.
250. Chapel HM, Lee M, Hargreaves R, Pamphilon DH, Prentice AG. Randomised trial of intravenous immunoglobulin as prophylaxis against infection in plateau-phase multiple myeloma. The UK Group for Immunoglobulin Replacement Therapy in Multiple Myeloma. *Lancet*. 1994;343(8905):1059-63.
251. Ludwig H, Delforge M, Facon T, Einsele H, Gay F, Moreau P, et al. Prevention and management of adverse events of novel agents in multiple myeloma: a consensus of the European Myeloma Network. *Leukemia*. 2018;32(7):1542-60.
252. Bringhen S, Milan A, Ferri C, Wäsch R, Gay F, Larocca A, et al. Cardiovascular adverse events in modern myeloma therapy - Incidence and risks. A review from the European Myeloma Network (EMN) and Italian Society of Arterial Hypertension (SIIA). *Haematologica*. 2018;103(9):1422-32.
253. Palumbo A, Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Richardson PG, San Miguel J, Barlogie B, et al. Prevention of thalidomide- and lenalidomide-associated thrombosis in myeloma. *Leukemia*. 2008;22(2):414-23.
254. Pegourie B, Karlin L, Benboubker L, Orsini-Piocelle F, Tiab M, Auger-Quittet S, et al. Apixaban for the prevention of thromboembolism in immunomodulatory-treated myeloma patients: Myelaxat, a phase 2 pilot study. *Am J Hematol*. 2019;94(6):635-40.
255. Stewart AK, Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Masszi T, Špička I, Oriol A, et al. Carfilzomib, lenalidomide, and dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2015;372(2):142-52.
256. Richardson PG, Delforge M, Beksac M, Wen P, Jongen JL, Sezer O, et al. Management of treatment-emergent peripheral neuropathy in multiple myeloma. *Leukemia*. 2012;26(4):595-608.
257. Dimopoulos MA, Richardson PG, Schlag R, Khuageva NK, Shpilberg O, Kastritis E, et al. VMP (Bortezomib, Melphalan, and Prednisone) is active and well tolerated in newly diagnosed patients with multiple myeloma with moderately impaired renal function, and results in reversal of renal impairment: cohort analysis of the phase III VISTA study. *J Clin Oncol*. 2009;27(36):6086-93.

258. Scheid C, Sonneveld P, Schmidt-Wolf IG, van der Holt B, el Jarari L, Bertsch U, et al. Bortezomib before and after autologous stem cell transplantation overcomes the negative prognostic impact of renal impairment in newly diagnosed multiple myeloma: a subgroup analysis from the HOVON-65/GMMG-HD4 trial. *Haematologica*. 2014;99(1):148-54.
259. Kawabata M, Imamura T, Miyazono K. Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1998;9(1):49-61.
260. Lavery K, Swain P, Falb D, Alaoui-Ismaili MH. BMP-2/4 and BMP-6/7 differentially utilize cell surface receptors to induce osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Biol Chem*. 2008;283(30):20948-58.
261. Anderson KV, Schneider DS, Morisato D, Jin Y, Ferguson EL. Extracellular morphogens in *Drosophila* embryonic dorsal-ventral patterning. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1992;57:409-17.
262. Ferguson EL, Anderson KV. Localized enhancement and repression of the activity of the TGF-beta family member, decapentaplegic, is necessary for dorsal-ventral pattern formation in the *Drosophila* embryo. *Development*. 1992;114(3):583-97.
263. Ray RP, Arora K, Nüsslein-Volhard C, Gelbart WM. The control of cell fate along the dorsal-ventral axis of the *Drosophila* embryo. *Development*. 1991;113(1):35-54.
264. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science*. 1965;150(3698):893-9.
265. Wagner DO, Sieber C, Bhushan R, Börgermann JH, Graf D, Knaus P. BMPs: from bone to body morphogenetic proteins. *Sci Signal*. 2010;3(107):mr1.
266. Mazerbourg S, Hsueh AJ. Genomic analyses facilitate identification of receptors and signalling pathways for growth differentiation factor 9 and related orphan bone morphogenetic protein/growth differentiation factor ligands. *Hum Reprod Update*. 2006;12(4):373-83.
267. von Bubnoff A, Cho KW. Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network? *Dev Biol*. 2001;239(1):1-14.
268. Kingsley DM, Bland AE, Grubber JM, Marker PC, Russell LB, Copeland NG, et al. The mouse short ear skeletal morphogenesis locus is associated with defects in a bone morphogenetic member of the TGF beta superfamily. *Cell*. 1992;71(3):399-410.
269. Mikić B, van der Meulen MC, Kingsley DM, Carter DR. Long bone geometry and strength in adult BMP-5 deficient mice. *Bone*. 1995;16(4):445-54.
270. Thomas JT, Kilpatrick MW, Lin K, Erlacher L, Lembessis P, Costa T, et al. Disruption of human limb morphogenesis by a dominant negative mutation in CDMP1. *Nat Genet*. 1997;17(1):58-64.
271. Thomas JT, Lin K, Nandedkar M, Camargo M, Cervenka J, Luyten FP. A human chondrodysplasia due to a mutation in a TGF-beta superfamily member. *Nat Genet*. 1996;12(3):315-7.
272. Gannon FH, Kaplan FS, Olmsted E, Finkel GC, Zasloff MA, Shore E. Bone morphogenetic protein 2/4 in early fibromatous lesions of fibrodysplasia ossificans progressiva. *Hum Pathol*. 1997;28(3):339-43.
273. Xu MQ, Feldman G, Le Merrer M, Shugart YY, Glaser DL, Urtizberea JA, et al. Linkage exclusion and mutational analysis of the noggin gene in patients with fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). *Clin Genet*. 2000;58(4):291-8.
274. Jin Y, Tipoe GL, Liong EC, Lau TY, Fung PC, Leung KM. Overexpression of BMP-2/4, -5 and BMPRII associated with malignancy of oral epithelium. *Oral Oncol*. 2001;37(3):225-33.
275. Harris SE, Harris MA, Mahy P, Wozney J, Feng JQ, Mundy GR. Expression of bone morphogenetic protein messenger RNAs by normal rat and human prostate and prostate cancer cells. *Prostate*. 1994;24(4):204-11.
276. Ducy P, Karsenty G. The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney Int*. 2000;57(6):2207-14.
277. Lawson KA, Dunn NR, Roelen BA, Zeinstra LM, Davis AM, Wright CV, et al. Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev*. 1999;13(4):424-36.
278. Zhao GQ. Consequences of knocking out BMP signaling in the mouse. *Genesis*. 2003;35(1):43-56.
279. Israel DI, Nove J, Kerns KM, Kaufman RJ, Rosen V, Cox KA, et al. Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity in vitro and in vivo. *Growth Factors*. 1996;13(3-4):291-300.
280. Little SC, Mullins MC. Bone morphogenetic protein heterodimers assemble heteromeric type I receptor complexes to pattern the dorsoventral axis. *Nat Cell Biol*. 2009;11(5):637-43.

281. Nelsen SM, Christian JL. Site-specific cleavage of BMP4 by furin, PC6, and PC7. *J Biol Chem.* 2009;284(40):27157-66.
282. Nohe A, Keating E, Knaus P, Petersen NO. Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cell Signal.* 2004;16(3):291-9.
283. Sieber C, Kopf J, Hiepen C, Knaus P. Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009;20(5-6):343-55.
284. Xiao YT, Xiang LX, Shao JZ. Bone morphogenetic protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;362(3):550-3.
285. Brown MA, Zhao Q, Baker KA, Naik C, Chen C, Pukac L, et al. Crystal structure of BMP-9 and functional interactions with pro-region and receptors. *J Biol Chem.* 2005;280(26):25111-8.
286. Sengle G, Charbonneau NL, Ono RN, Sasaki T, Alvarez J, Keene DR, et al. Targeting of bone morphogenetic protein growth factor complexes to fibrillin. *J Biol Chem.* 2008;283(20):13874-88.
287. Sengle G, Ono RN, Lyons KM, Bächinger HP, Sakai LY. A new model for growth factor activation: type II receptors compete with the prodomain for BMP-7. *J Mol Biol.* 2008;381(4):1025-39.
288. Degnin C, Jean F, Thomas G, Christian JL. Cleavages within the prodomain direct intracellular trafficking and degradation of mature bone morphogenetic protein-4. *Mol Biol Cell.* 2004;15(11):5012-20.
289. Goldman DC, Hackenmiller R, Nakayama T, Sopory S, Wong C, Kulesa H, et al. Mutation of an upstream cleavage site in the BMP4 prodomain leads to tissue-specific loss of activity. *Development.* 2006;133(10):1933-42.
290. Sopory S, Nelsen SM, Degnin C, Wong C, Christian JL. Regulation of bone morphogenetic protein-4 activity by sequence elements within the prodomain. *J Biol Chem.* 2006;281(45):34021-31.
291. Ramirez F, Rifkin DB. Extracellular microfibrils: contextual platforms for TGFbeta and BMP signaling. *Curr Opin Cell Biol.* 2009;21(5):616-22.
292. Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S, King D, Julian J, Nohe A. Bone morphogenetic proteins: a critical review. *Cell Signal.* 2011;23(4):609-20.
293. Anderson HC. Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. *J Cell Biol.* 1969;41(1):59-72.
294. Bonucci E. Fine structure of early cartilage calcification. *J Ultrastruct Res.* 1967;20(1):33-50.
295. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol.* 2009;19(2):43-51.
296. Nahar NN, Missana LR, Garimella R, Tague SE, Anderson HC. Matrix vesicles are carriers of bone morphogenetic proteins (BMPs), vascular endothelial growth factor (VEGF), and noncollagenous matrix proteins. *J Bone Miner Metab.* 2008;26(5):514-9.
297. Wu LN, Yoshimori T, Genge BR, Sauer GR, Kirsch T, Ishikawa Y, et al. Characterization of the nucleational core complex responsible for mineral induction by growth plate cartilage matrix vesicles. *J Biol Chem.* 1993;268(33):25084-94.
298. Xiao Z, Blonder J, Zhou M, Veenstra TD. Proteomic analysis of extracellular matrix and vesicles. *J Proteomics.* 2009;72(1):34-45.
299. Avsian-Kretchmer O, Hsueh AJ. Comparative genomic analysis of the eight-membered ring cystine knot-containing bone morphogenetic protein antagonists. *Mol Endocrinol.* 2004;18(1):1-12.
300. Vitt UA, Hsu SY, Hsueh AJ. Evolution and classification of cystine knot-containing hormones and related extracellular signaling molecules. *Mol Endocrinol.* 2001;15(5):681-94.
301. Rosen V. BMP and BMP inhibitors in bone. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1068:19-25.
302. Ikeya M, Fukushima K, Kawada M, Onishi S, Furuta Y, Yonemura S, et al. Cv2, functioning as a pro-BMP factor via twisted gastrulation, is required for early development of nephron precursors. *Dev Biol.* 2010;337(2):405-14.
303. Thompson TB, Lerch TF, Cook RW, Woodruff TK, Jardetzky TS. The structure of the follistatin:activin complex reveals antagonism of both type I and type II receptor binding. *Dev Cell.* 2005;9(4):535-43.
304. Groppe J, Greenwald J, Wiater E, Rodriguez-Leon J, Economides AN, Kwiatkowski W, et al. Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin. *Nature.* 2002;420(6916):636-42.

305. Walsh DW, Godson C, Brazil DP, Martin F. Extracellular BMP-antagonist regulation in development and disease: tied up in knots. *Trends Cell Biol.* 2010;20(5):244-56.
306. Wilkinson L, Kolle G, Wen D, Piper M, Scott J, Little M. CRIM1 regulates the rate of processing and delivery of bone morphogenetic proteins to the cell surface. *J Biol Chem.* 2003;278(36):34181-8.
307. Liu F, Ventura F, Doody J, Massagué J. Human type II receptor for bone morphogenetic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol Cell Biol.* 1995;15(7):3479-86.
308. Han S. Crystal structure of activin receptor type IIB kinase domain. *Vitam Horm.* 2011;85:29-38.
309. Heldin CH, Moustakas A. Signaling Receptors for TGF- $\beta$  Family Members. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016;8(8).
310. Cash JN, Angerman EB, Kattamuri C, Nolan K, Zhao H, Sidis Y, et al. Structure of myostatin-follistatin-like 3: N-terminal domains of follistatin-type molecules exhibit alternate modes of binding. *J Biol Chem.* 2012;287(2):1043-53.
311. Hinck AP. Structural studies of the TGF- $\beta$ s and their receptors - insights into evolution of the TGF- $\beta$  superfamily. *FEBS Lett.* 2012;586(14):1860-70.
312. Nohe A, Hassel S, Ehrlich M, Neubauer F, Sebald W, Henis YI, et al. The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways. *J Biol Chem.* 2002;277(7):5330-8.
313. Huse M, Chen YG, Massagué J, Kuriyan J. Crystal structure of the cytoplasmic domain of the type I TGF beta receptor in complex with FKBP12. *Cell.* 1999;96(3):425-36.
314. Akiyama S, Katagiri T, Namiki M, Yamaji N, Yamamoto N, Miyama K, et al. Constitutively active BMP type I receptors transduce BMP-2 signals without the ligand in C2C12 myoblasts. *Exp Cell Res.* 1997;235(2):362-9.
315. Wieser R, Wrana JL, Massagué J. GS domain mutations that constitutively activate T beta R-I, the downstream signaling component in the TGF-beta receptor complex. *EMBO J.* 1995;14(10):2199-208.
316. Miyazono K, Maeda S, Imamura T. BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16(3):251-63.
317. Gomez-Puerto MC, Iyengar PV, García de Vinuesa A, Ten Dijke P, Sanchez-Duffhues G. Bone morphogenetic protein receptor signal transduction in human disease. *J Pathol.* 2019;247(1):9-20.
318. Scharpfenecker M, van Dinther M, Liu Z, van Bezooijen RL, Zhao Q, Pukac L, et al. BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. *J Cell Sci.* 2007;120(Pt 6):964-72.
319. Rosenzweig BL, Imamura T, Okadome T, Cox GN, Yamashita H, ten Dijke P, et al. Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(17):7632-6.
320. Lee NY, Kirkbride KC, Sheu RD, Blobe GC. The transforming growth factor-beta type III receptor mediates distinct subcellular trafficking and downstream signaling of activin-like kinase (ALK)3 and ALK6 receptors. *Mol Biol Cell.* 2009;20(20):4362-70.
321. Bilandzic M, Stenvers KL. Betaglycan: a multifunctional accessory. *Mol Cell Endocrinol.* 2011;339(1-2):180-9.
322. ten Dijke P, Goumans MJ, Pardali E. Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis.* 2008;11(1):79-89.
323. Kirkbride KC, Townsend TA, Bruinsma MW, Barnett JV, Blobe GC. Bone morphogenetic proteins signal through the transforming growth factor-beta type III receptor. *J Biol Chem.* 2008;283(12):7628-37.
324. Castonguay R, Werner ED, Matthews RG, Presman E, Mulivor AW, Solban N, et al. Soluble endoglin specifically binds bone morphogenetic proteins 9 and 10 via its orphan domain, inhibits blood vessel formation, and suppresses tumor growth. *J Biol Chem.* 2011;286(34):30034-46.
325. Blanco FJ, Santibanez JF, Guerrero-Esteo M, Langa C, Vary CP, Bernabeu C. Interaction and functional interplay between endoglin and ALK-1, two components of the endothelial transforming growth factor-beta receptor complex. *J Cell Physiol.* 2005;204(2):574-84.
326. Yeo C, Whitman M. Nodal signals to Smads through Cripto-dependent and Cripto-independent mechanisms. *Mol Cell.* 2001;7(5):949-57.

327. Corradini E, Babitt JL, Lin HY. The RGM/DRAGON family of BMP co-receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009;20(5-6):389-98.
328. Onichtchouk D, Chen YG, Dosch R, Gawantka V, Delius H, Massagué J, et al. Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature.* 1999;401(6752):480-5.
329. Ogata T, Wozney JM, Benezra R, Noda M. Bone morphogenetic protein 2 transiently enhances expression of a gene, *Id* (inhibitor of differentiation), encoding a helix-loop-helix molecule in osteoblast-like cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(19):9219-22.
330. Yokota Y, Mori S. Role of *Id* family proteins in growth control. *J Cell Physiol.* 2002;190(1):21-8.
331. Rawls A, Olson EN. MyoD meets its maker. *Cell.* 1997;89(1):5-8.
332. Nakashima K, Takizawa T, Ochiai W, Yanagisawa M, Hisatsune T, Nakafuku M, et al. BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mouse brain cells from neurogenesis to astrocytogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(10):5868-73.
333. Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, ten Dijke P. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J.* 2002;21(7):1743-53.
334. Sekelsky JJ, Newfeld SJ, Raftery LA, Chartoff EH, Gelbart WM. Genetic characterization and cloning of mothers against *dpp*, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* 1995;139(3):1347-58.
335. Raftery LA, Twombly V, Wharton K, Gelbart WM. Genetic screens to identify elements of the decapentaplegic signaling pathway in *Drosophila*. *Genetics.* 1995;139(1):241-54.
336. Savage C, Das P, Finelli AL, Townsend SR, Sun CY, Baird SE, et al. *Caenorhabditis elegans* genes *sma-2*, *sma-3*, and *sma-4* define a conserved family of transforming growth factor beta pathway components. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(2):790-4.
337. Kretzschmar M, Liu F, Hata A, Doody J, Massagué J. The TGF-beta family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Genes Dev.* 1997;11(8):984-95.
338. Graff JM, Bansal A, Melton DA. *Xenopus* Mad proteins transduce distinct subsets of signals for the TGF beta superfamily. *Cell.* 1996;85(4):479-87.
339. Liu F, Hata A, Baker JC, Doody J, Cárcamo J, Harland RM, et al. A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator. *Nature.* 1996;381(6583):620-3.
340. Zhang Y, Feng X, We R, Derynck R. Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF-beta response. *Nature.* 1996;383(6596):168-72.
341. Imamura T, Takase M, Nishihara A, Oeda E, Hanai J, Kawabata M, et al. Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature.* 1997;389(6651):622-6.
342. Nakao A, Afrakhte M, Morén A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, et al. Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature.* 1997;389(6651):631-5.
343. Hata A, Lagna G, Massagué J, Hemmati-Brivanlou A. Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev.* 1998;12(2):186-97.
344. Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, Cai J, Xu YY, Grinnell BW, et al. The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell.* 1997;89(7):1165-73.
345. Kim J, Johnson K, Chen HJ, Carroll S, Laughon A. *Drosophila* Mad binds to DNA and directly mediates activation of vestigial by Decapentaplegic. *Nature.* 1997;388(6639):304-8.
346. Liu F, Pouppnot C, Massagué J. Dual role of the Smad4/DPC4 tumor suppressor in TGFbeta-inducible transcriptional complexes. *Genes Dev.* 1997;11(23):3157-67.
347. Hata A, Lo RS, Wotton D, Lagna G, Massagué J. Mutations increasing autoinhibition inactivate tumour suppressors Smad2 and Smad4. *Nature.* 1997;388(6637):82-7.
348. Wu RY, Zhang Y, Feng XH, Derynck R. Heteromeric and homomeric interactions correlate with signaling activity and functional cooperativity of Smad3 and Smad4/DPC4. *Mol Cell Biol.* 1997;17(5):2521-8.
349. Shi Y, Hata A, Lo RS, Massagué J, Pavletich NP. A structural basis for mutational inactivation of the tumour suppressor Smad4. *Nature.* 1997;388(6637):87-93.

350. Lo RS, Chen YG, Shi Y, Pavletich NP, Massagué J. The L3 loop: a structural motif determining specific interactions between SMAD proteins and TGF-beta receptors. *EMBO J.* 1998;17(4):996-1005.
351. Hoodless PA, Haerry T, Abdollah S, Stapleton M, O'Connor MB, Attisano L, et al. MADR1, a MAD-related protein that functions in BMP2 signaling pathways. *Cell.* 1996;85(4):489-500.
352. Nakao A, Imamura T, Souchelnytskyi S, Kawabata M, Ishisaki A, Oeda E, et al. TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *EMBO J.* 1997;16(17):5353-62.
353. Lagna G, Hata A, Hemmati-Brivanlou A, Massagué J. Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways. *Nature.* 1996;383(6603):832-6.
354. Massagué J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev.* 2005;19(23):2783-810.
355. Zi Z, Chapnick DA, Liu X. Dynamics of TGF- $\beta$ /Smad signaling. *FEBS Lett.* 2012;586(14):1921-8.
356. Ito Y, Miyazono K. RUNX transcription factors as key targets of TGF-beta superfamily signaling. *Curr Opin Genet Dev.* 2003;13(1):43-7.
357. Zhang YW, Yasui N, Ito K, Huang G, Fujii M, Hanai J, et al. A RUNX2/PEBP2alpha A/CBFA1 mutation displaying impaired transactivation and Smad interaction in cleidocranial dysplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(19):10549-54.
358. Miyazono K, Maeda S, Imamura T. Coordinate regulation of cell growth and differentiation by TGF-beta superfamily and Runx proteins. *Oncogene.* 2004;23(24):4232-7.
359. Gao X, Sedgwick T, Shi YB, Evans T. Distinct functions are implicated for the GATA-4, -5, and -6 transcription factors in the regulation of intestine epithelial cell differentiation. *Mol Cell Biol.* 1998;18(5):2901-11.
360. Laverriere AC, MacNeill C, Mueller C, Poelmann RE, Burch JB, Evans T. GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut. *J Biol Chem.* 1994;269(37):23177-84.
361. Molkentin JD. The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem.* 2000;275(50):38949-52.
362. Daoud G, Kempf H, Kumar D, Kozhemyakina E, Holowacz T, Kim DW, et al. BMP-mediated induction of GATA4/5/6 blocks somitic responsiveness to SHH. *Development.* 2014;141(20):3978-87.
363. Schultheiss TM, Burch JB, Lassar AB. A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis. *Genes Dev.* 1997;11(4):451-62.
364. Rojas A, De Val S, Heidt AB, Xu SM, Bristow J, Black BL. Gata4 expression in lateral mesoderm is downstream of BMP4 and is activated directly by Forkhead and GATA transcription factors through a distal enhancer element. *Development.* 2005;132(15):3405-17.
365. Shi Y, Wang YF, Jayaraman L, Yang H, Massagué J, Pavletich NP. Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling. *Cell.* 1998;94(5):585-94.
366. Chai J, Wu JW, Yan N, Massagué J, Pavletich NP, Shi Y. Features of a Smad3 MH1-DNA complex. Roles of water and zinc in DNA binding. *J Biol Chem.* 2003;278(22):20327-31.
367. Yao M, Niu G, Sheng Z, Wang Z, Fei J. Identification of a Smad4/YY1-recognized and BMP2-responsive transcriptional regulatory module in the promoter of mouse GABA transporter subtype I (Gat1) gene. *J Neurosci.* 2010;30(11):4062-71.
368. Kurisaki K, Kurisaki A, Valcourt U, Terentiev AA, Pardali K, Ten Dijke P, et al. Nuclear factor YY1 inhibits transforming growth factor beta- and bone morphogenetic protein-induced cell differentiation. *Mol Cell Biol.* 2003;23(13):4494-510.
369. Pashmforoush M, Lu JT, Chen H, Amand TS, Kondo R, Pradervand S, et al. Nkx2-5 pathways and congenital heart disease; loss of ventricular myocyte lineage specification leads to progressive cardiomyopathy and complete heart block. *Cell.* 2004;117(3):373-86.
370. Lee KH, Evans S, Ruan TY, Lassar AB. SMAD-mediated modulation of YY1 activity regulates the BMP response and cardiac-specific expression of a GATA4/5/6-dependent chick Nkx2.5 enhancer. *Development.* 2004;131(19):4709-23.
371. Hata A, Seoane J, Lagna G, Montalvo E, Hemmati-Brivanlou A, Massagué J. OAZ uses distinct DNA- and protein-binding zinc fingers in separate BMP-Smad and Olf signaling pathways. *Cell.* 2000;100(2):229-40.
372. Shi X, Yang X, Chen D, Chang Z, Cao X. Smad1 interacts with homeobox DNA-binding proteins in bone morphogenetic protein signaling. *J Biol Chem.* 1999;274(19):13711-7.

373. Comijn J, Berx G, Vermassen P, Verschueren K, van Grunsven L, Bruyneel E, et al. The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell*. 2001;7(6):1267-78.
374. Ghosh-Choudhury N, Singha PK, Woodruff K, St Clair P, Bsoul S, Werner SL, et al. Concerted action of Smad and CREB-binding protein regulates bone morphogenetic protein-2-stimulated osteoblastic colony-stimulating factor-1 expression. *J Biol Chem*. 2006;281(29):20160-70.
375. Jin YH, Jeon EJ, Li QL, Lee YH, Choi JK, Kim WJ, et al. Transforming growth factor-beta stimulates p300-dependent RUNX3 acetylation, which inhibits ubiquitination-mediated degradation. *J Biol Chem*. 2004;279(28):29409-17.
376. Xiao Z, Liu X, Henis YI, Lodish HF. A distinct nuclear localization signal in the N terminus of Smad 3 determines its ligand-induced nuclear translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(14):7853-8.
377. Finnson KW, Arany PR, Philip A. Transforming Growth Factor Beta Signaling in Cutaneous Wound Healing: Lessons Learned from Animal Studies. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2013;2(5):225-37.
378. ten Dijke P, Hill CS. New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci*. 2004;29(5):265-73.
379. Izzi L, Attisano L. Regulation of the TGFbeta signalling pathway by ubiquitin-mediated degradation. *Oncogene*. 2004;23(11):2071-8.
380. Kang JS, Liu C, Derynck R. New regulatory mechanisms of TGF-beta receptor function. *Trends Cell Biol*. 2009;19(8):385-94.
381. Lutz M, Knaus P. Integration of the TGF-beta pathway into the cellular signalling network. *Cell Signal*. 2002;14(12):977-88.
382. Zhao B, Chen YG. Regulation of TGF- $\beta$  Signal Transduction. *Scientifica (Cairo)*. 2014;2014:874065.
383. Sflomos G, Kostaras E, Panopoulou E, Pappas N, Kyrkou A, Politou AS, et al. ERBIN is a new SARA-interacting protein: competition between SARA and SMAD2 and SMAD3 for binding to ERBIN. *J Cell Sci*. 2011;124(Pt 19):3209-22.
384. Shi W, Sun C, He B, Xiong W, Shi X, Yao D, et al. GADD34-PP1c recruited by Smad7 dephosphorylates TGFbeta type I receptor. *J Cell Biol*. 2004;164(2):291-300.
385. Finkielstein CV, Capelluto DG. Disabled-2: A modular scaffold protein with multifaceted functions in signaling. *Bioessays*. 2016;38 Suppl 1:S45-55.
386. Penheiter SG, Singh RD, Repellin CE, Wilkes MC, Edens M, Howe PH, et al. Type II transforming growth factor-beta receptor recycling is dependent upon the clathrin adaptor protein Dab2. *Mol Biol Cell*. 2010;21(22):4009-19.
387. Liu X, Sun Y, Weinberg RA, Lodish HF. Ski/Sno and TGF-beta signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2001;12(1):1-8.
388. Mizuide M, Hara T, Furuya T, Takeda M, Kusanagi K, Inada Y, et al. Two short segments of Smad3 are important for specific interaction of Smad3 with c-Ski and SnoN. *J Biol Chem*. 2003;278(1):531-6.
389. Wu JW, Krawitz AR, Chai J, Li W, Zhang F, Luo K, et al. Structural mechanism of Smad4 recognition by the nuclear oncoprotein Ski: insights on Ski-mediated repression of TGF-beta signaling. *Cell*. 2002;111(3):357-67.
390. Qin BY, Lam SS, Correia JJ, Lin K. Smad3 allostery links TGF-beta receptor kinase activation to transcriptional control. *Genes Dev*. 2002;16(15):1950-63.
391. Ogasawara T, Kawaguchi H, Jinno S, Hoshi K, Itaka K, Takato T, et al. Bone morphogenetic protein 2-induced osteoblast differentiation requires Smad-mediated down-regulation of Cdk6. *Mol Cell Biol*. 2004;24(15):6560-8.
392. Shen ZJ, Nakamoto T, Tsuji K, Nifuji A, Miyazono K, Komori T, et al. Negative regulation of bone morphogenetic protein/Smad signaling by Cas-interacting zinc finger protein in osteoblasts. *J Biol Chem*. 2002;277(33):29840-6.
393. Raju GP, Dimova N, Klein PS, Huang HC. SANE, a novel LEM domain protein, regulates bone morphogenetic protein signaling through interaction with Smad1. *J Biol Chem*. 2003;278(1):428-37.
394. Yoshida Y, von Bubnoff A, Ikematsu N, Blitz IL, Tsuzuku JK, Yoshida EH, et al. Tob proteins enhance inhibitory Smad-receptor interactions to repress BMP signaling. *Mech Dev*. 2003;120(5):629-37.



395. Horiki M, Imamura T, Okamoto M, Hayashi M, Murai J, Myoui A, et al. Smad6/Smurf1 overexpression in cartilage delays chondrocyte hypertrophy and causes dwarfism with osteopenia. *J Cell Biol.* 2004;165(3):433-45.
396. Kowanzetz M, Lönn P, Vanlandewijck M, Kowanzetz K, Heldin CH, Moustakas A. TGFbeta induces SIK to negatively regulate type I receptor kinase signaling. *J Cell Biol.* 2008;182(4):655-62.
397. Eichhorn PJ, Rodón L, González-Juncà A, Dirac A, Gili M, Martínez-Sáez E, et al. USP15 stabilizes TGF- $\beta$  receptor I and promotes oncogenesis through the activation of TGF- $\beta$  signaling in glioblastoma. *Nat Med.* 2012;18(3):429-35.
398. Lin X, Liang YY, Sun B, Liang M, Shi Y, Brunnicardi FC, et al. Smad6 recruits transcription corepressor CtBP to repress bone morphogenetic protein-induced transcription. *Mol Cell Biol.* 2003;23(24):9081-93.
399. Bai Y, Yang C, Hu K, Elly C, Liu YC. Itch E3 ligase-mediated regulation of TGF-beta signaling by modulating smad2 phosphorylation. *Mol Cell.* 2004;15(5):825-31.
400. Grönroos E, Hellman U, Heldin CH, Ericsson J. Control of Smad7 stability by competition between acetylation and ubiquitination. *Mol Cell.* 2002;10(3):483-93.
401. Koinuma D, Shinozaki M, Komuro A, Goto K, Saitoh M, Hanyu A, et al. Arkadia amplifies TGF-beta superfamily signalling through degradation of Smad7. *EMBO J.* 2003;22(24):6458-70.
402. Tsubakihara Y, Hikita A, Yamamoto S, Matsushita S, Matsushita N, Oshima Y, et al. Arkadia enhances BMP signalling through ubiquitylation and degradation of Smad6. *J Biochem.* 2015;158(1):61-71.
403. Inamitsu M, Itoh S, Hellman U, Ten Dijke P, Kato M. Methylation of Smad6 by protein arginine N-methyltransferase 1. *FEBS Lett.* 2006;580(28-29):6603-11.
404. Xu J, Wang AH, Oses-Prieto J, Makhijani K, Katsuno Y, Pei M, et al. Arginine Methylation Initiates BMP-Induced Smad Signaling. *Mol Cell.* 2013;51(1):5-19.
405. Itoh F, Asao H, Sugamura K, Heldin CH, ten Dijke P, Itoh S. Promoting bone morphogenetic protein signaling through negative regulation of inhibitory Smads. *EMBO J.* 2001;20(15):4132-42.
406. Gui T, Sun Y, Shimokado A, Muragaki Y. The Roles of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in TGF- $\beta$ -Induced Epithelial-Mesenchymal Transition. *J Signal Transduct.* 2012;2012:289243.
407. Miyazawa K, Miyazono K. Regulation of TGF- $\beta$  Family Signaling by Inhibitory Smads. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017;9(3).
408. Wakefield LM, Roberts AB. TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev.* 2002;12(1):22-9.
409. Zhang YE. Non-Smad Signaling Pathways of the TGF- $\beta$  Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017;9(2).
410. Nisticò P, Bissell MJ, Radisky DC. Epithelial-mesenchymal transition: general principles and pathological relevance with special emphasis on the role of matrix metalloproteinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(2).
411. Hirata Y, Takahashi M, Morishita T, Noguchi T, Matsuzawa A. Post-Translational Modifications of the TAK1-TAB Complex. *Int J Mol Sci.* 2017;18(1).
412. Kim SI, Choi ME. TGF- $\beta$ -activated kinase-1: New insights into the mechanism of TGF- $\beta$  signaling and kidney disease. *Kidney Res Clin Pract.* 2012;31(2):94-105.
413. Lim J, Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development. *Development.* 2012;139(19):3471-86.
414. Moustakas A, Heldin CH. Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci.* 2005;118(Pt 16):3573-84.
415. Moustakas A, Heldin CH. Dynamic control of TGF-beta signaling and its links to the cytoskeleton. *FEBS Lett.* 2008;582(14):2051-65.
416. Sims NA, Martin TJ. Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. *Bonekey Rep.* 2014;3:481.
417. Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol.* 2008;61(5):577-87.
418. Gavriatopoulou M, Dimopoulos MA, Christoulas D, Migkou M, Iakovaki M, Gkatzamanidou M, et al. Dickkopf-1: a suitable target for the management of myeloma bone disease. *Expert Opin Ther Targets.* 2009;13(7):839-48.

419. Khosla S, Westendorf JJ, Oursler MJ. Building bone to reverse osteoporosis and repair fractures. *J Clin Invest*. 2008;118(2):421-8.
420. Kyriazoglou A, Ntanasis-Stathopoulos I, Terpos E, Fotiou D, Kastiris E, Dimopoulos MA, et al. Emerging Insights Into the Role of the Hippo Pathway in Multiple Myeloma and Associated Bone Disease. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2020;20(2):57-62.
421. Vallet S, Mukherjee S, Vaghela N, Hideshima T, Fulciniti M, Pozzi S, et al. Activin A promotes multiple myeloma-induced osteolysis and is a promising target for myeloma bone disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(11):5124-9.
422. Qi B, Cong Q, Li P, Ma G, Guo X, Yeh J, et al. Ablation of Tak1 in osteoclast progenitor leads to defects in skeletal growth and bone remodeling in mice. *Sci Rep*. 2014;4:7158.
423. Yamaguchi K, Nagai S, Ninomiya-Tsuji J, Nishita M, Tamai K, Irie K, et al. XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway. *EMBO J*. 1999;18(1):179-87.
424. Albers J, Keller J, Baranowsky A, Beil FT, Catala-Lehnen P, Schulze J, et al. Canonical Wnt signaling inhibits osteoclastogenesis independent of osteoprotegerin. *J Cell Biol*. 2013;200(4):537-49.
425. Maeda K, Kobayashi Y, Udagawa N, Uehara S, Ishihara A, Mizoguchi T, et al. Wnt5a-Ror2 signaling between osteoblast-lineage cells and osteoclast precursors enhances osteoclastogenesis. *Nat Med*. 2012;18(3):405-12.
426. Luo G, Sun SJ, Weng TJ, Li XM, Wang ZG, Zhang B.
427. Parfitt AM. Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression. *Bone*. 2002;30(1):5-7.
428. Chim SM, Tickner J, Chow ST, Kuek V, Guo B, Zhang G, et al. Angiogenic factors in bone local environment. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2013;24(3):297-310.
429. Jensen PR, Andersen TL, Sjøe K, Hauge EM, Bollerslev J, Amling M, et al. Premature loss of bone remodeling compartment canopies is associated with deficient bone formation: a study of healthy individuals and patients with Cushing's syndrome. *J Bone Miner Res*. 2012;27(4):770-80.
430. Ai-Aql ZS, Alagl AS, Graves DT, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *J Dent Res*. 2008;87(2):107-18.
431. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med*. 1999;5(6):623-8.
432. Kusumbe AP, Ramasamy SK, Adams RH. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone. *Nature*. 2014;507(7492):323-8.
433. Ramasamy SK, Kusumbe AP, Wang L, Adams RH. Endothelial Notch activity promotes angiogenesis and osteogenesis in bone. *Nature*. 2014;507(7492):376-80.
434. Weitzmann MN, Pacifici R. T cells: unexpected players in the bone loss induced by estrogen deficiency and in basal bone homeostasis. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1116:360-75.
435. Gu W, Xu Y, Xie X, Wang T, Ko JH, Zhou T. The role of RNA structure at 5' untranslated region in microRNA-mediated gene regulation. *RNA*. 2014;20(9):1369-75.
436. Courtial N, Smink JJ, Kuvardina ON, Leutz A, Göthert JR, Lausen J. Tal1 regulates osteoclast differentiation through suppression of the master regulator of cell fusion DC-STAMP. *FASEB J*. 2012;26(2):523-32.
437. Verma SK, Leikina E, Melikov K, Gebert C, Kram V, Young MF, et al. Cell-surface phosphatidylserine regulates osteoclast precursor fusion. *J Biol Chem*. 2018;293(1):254-70.
438. Gebert LFR, MacRae IJ. Regulation of microRNA function in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(1):21-37.
439. Soliman AM, Lin TS, Mahakkanukrauh P, Das S. Role of microRNAs in Diagnosis, Prognosis and Management of Multiple Myeloma. *Int J Mol Sci*. 2020;21(20).
440. Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2016;1:15004.
441. Shi K, Lu J, Zhao Y, Wang L, Li J, Qi B, et al. MicroRNA-214 suppresses osteogenic differentiation of C2C12 myoblast cells by targeting Osterix. *Bone*. 2013;55(2):487-94.

442. Pitari MR, Rossi M, Amodio N, Botta C, Morelli E, Federico C, et al. Inhibition of miR-21 restores RANKL/OPG ratio in multiple myeloma-derived bone marrow stromal cells and impairs the resorbing activity of mature osteoclasts. *Oncotarget*. 2015;6(29):27343-58.
443. Murugaiyan G, da Cunha AP, Ajay AK, Joller N, Garo LP, Kumaradevan S, et al. MicroRNA-21 promotes Th17 differentiation and mediates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest*. 2015;125(3):1069-80.
444. Rossi M, Altomare E, Botta C, Gallo Cantafio ME, Sarvide S, Caracciolo D, et al. miR-21 antagonism abrogates Th17 tumor promoting functions in multiple myeloma. *Leukemia*. 2021;35(3):823-34.
445. Hengeveld PJ, Kersten MJ. B-cell activating factor in the pathophysiology of multiple myeloma: a target for therapy? *Blood Cancer J*. 2015;5(2):e282.
446. Terpos E, Politou M, Viniou N, Rahemtulla A. Significance of macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1alpha) in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 2005;46(12):1699-707.
447. Terpos E, Politou M, Szydlo R, Goldman JM, Apperley JF, Rahemtulla A. Serum levels of macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1alpha) correlate with the extent of bone disease and survival in patients with multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2003;123(1):106-9.
448. Botta C, Cucè M, Pitari MR, Caracciolo D, Gullà A, Morelli E, et al. MiR-29b antagonizes the pro-inflammatory tumor-promoting activity of multiple myeloma-educated dendritic cells. *Leukemia*. 2018;32(4):1003-15.
449. Abu-Amer Y. NF- $\kappa$ B signaling and bone resorption. *Osteoporos Int*. 2013;24(9):2377-86.
450. Fu R, Liu H, Zhao S, Wang Y, Li L, Gao S, et al. Osteoblast inhibition by chemokine cytokine ligand3 in myeloma-induced bone disease. *Cancer Cell Int*. 2014;14(1):132.
451. Marie PJ. Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Arch Biochem Biophys*. 2008;473(2):98-105.
452. Pearce RN, Sordillo EM, Yaccoby S, Wong BR, Liau DF, Colman N, et al. Multiple myeloma disrupts the TRANCE/ osteoprotegerin cytokine axis to trigger bone destruction and promote tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(20):11581-6.
453. Standal T, Seidel C, Hjertner Ø, Plesner T, Sanderson RD, Waage A, et al. Osteoprotegerin is bound, internalized, and degraded by multiple myeloma cells. *Blood*. 2002;100(8):3002-7.
454. Farrugia AN, Atkins GJ, To LB, Pan B, Horvath N, Kostakis P, et al. Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand expression by human myeloma cells mediates osteoclast formation in vitro and correlates with bone destruction in vivo. *Cancer Res*. 2003;63(17):5438-45.
455. Qiang YW, Chen Y, Stephens O, Brown N, Chen B, Epstein J, et al. Myeloma-derived Dickkopf-1 disrupts Wnt-regulated osteoprotegerin and RANKL production by osteoblasts: a potential mechanism underlying osteolytic bone lesions in multiple myeloma. *Blood*. 2008;112(1):196-207.
456. Arai A, Mizoguchi T, Harada S, Kobayashi Y, Nakamichi Y, Yasuda H, et al. Fos plays an essential role in the upregulation of RANK expression in osteoclast precursors within the bone microenvironment. *J Cell Sci*. 2012;125(Pt 12):2910-7.
457. Baron R, Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med*. 2013;19(2):179-92.
458. Bennett CN, Longo KA, Wright WS, Suva LJ, Lane TF, Hankenson KD, et al. Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(9):3324-9.
459. Almeida M, Han L, Bellido T, Manolagas SC, Kousteni S. Wnt proteins prevent apoptosis of both uncommitted osteoblast progenitors and differentiated osteoblasts by beta-catenin-dependent and - independent signaling cascades involving Src/ERK and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT. *J Biol Chem*. 2005;280(50):41342-51.
460. Gunn WG, Conley A, Deininger L, Olson SD, Prockop DJ, Gregory CA. A crosstalk between myeloma cells and marrow stromal cells stimulates production of DKK1 and interleukin-6: a potential role in the development of lytic bone disease and tumor progression in multiple myeloma. *Stem Cells*. 2006;24(4):986-91.
461. Colucci S, Brunetti G, Oranger A, Mori G, Sardone F, Specchia G, et al. Myeloma cells suppress osteoblasts through sclerostin secretion. *Blood Cancer J*. 2011;1(6):e27.

462. Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Hayes T, Skonier JE, et al. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *EMBO J.* 2003;22(23):6267-76.
463. Fox SW, Lovibond AC. Current insights into the role of transforming growth factor-beta in bone resorption. *Mol Cell Endocrinol.* 2005;243(1-2):19-26.
464. Sriarj W, Aoki K, Ohya K, Takahashi M, Takagi Y, Shimokawa H. TGF- $\beta$  in dentin matrix extract induces osteoclastogenesis in vitro. *Odontology.* 2015;103(1):9-18.
465. Yan T, Riggs BL, Boyle WJ, Khosla S. Regulation of osteoclastogenesis and RANK expression by TGF-beta1. *J Cell Biochem.* 2001;83(2):320-5.
466. Fennen M, Pap T, Dankbar B. Smad-dependent mechanisms of inflammatory bone destruction. *Arthritis Res Ther.* 2016;18(1):279.
467. Yasui T, Kadono Y, Nakamura M, Oshima Y, Matsumoto T, Masuda H, et al. Regulation of RANKL-induced osteoclastogenesis by TGF- $\beta$  through molecular interaction between Smad3 and Traf6. *J Bone Miner Res.* 2011;26(7):1447-56.
468. Afrakhte M, Morén A, Jossan S, Itoh S, Sampath K, Westermark B, et al. Induction of inhibitory Smad6 and Smad7 mRNA by TGF-beta family members. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;249(2):505-11.
469. Jung SM, Lee JH, Park J, Oh YS, Lee SK, Park JS, et al. Smad6 inhibits non-canonical TGF- $\beta$ 1 signalling by recruiting the deubiquitinase A20 to TRAF6. *Nat Commun.* 2013;4:2562.
470. Krikos A, Laherty CD, Dixit VM. Transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha-inducible zinc finger protein, A20, is mediated by kappa B elements. *J Biol Chem.* 1992;267(25):17971-6.
471. Li A, Cong Q, Xia X, Leong WF, Yeh J, Miao D, et al. Pharmacologic Calcitriol Inhibits Osteoclast Lineage Commitment via the BMP-Smad1 and I $\kappa$ B-NF- $\kappa$ B Pathways. *J Bone Miner Res.* 2017;32(7):1406-20.
472. Morita M, Yoshida S, Iwasaki R, Yasui T, Sato Y, Kobayashi T, et al. Smad4 is required to inhibit osteoclastogenesis and maintain bone mass. *Sci Rep.* 2016;6:35221.
473. Zou ML, Chen ZH, Teng YY, Liu SY, Jia Y, Zhang KW, et al. The Smad Dependent TGF- $\beta$  and BMP Signaling Pathway in Bone Remodeling and Therapies. *Front Mol Biosci.* 2021;8:593310.
474. Kamiya N, Shuxian L, Yamaguchi R, Phipps M, Aruwajoye O, Adapala NS, et al. Targeted disruption of BMP signaling through type IA receptor (BMPRI1A) in osteocyte suppresses SOST and RANKL, leading to dramatic increase in bone mass, bone mineral density and mechanical strength. *Bone.* 2016;91:53-63.
475. Okamoto M, Murai J, Imai Y, Ikegami D, Kamiya N, Kato S, et al. Conditional deletion of *Bmpr1a* in differentiated osteoclasts increases osteoblastic bone formation, increasing volume of remodeling bone in mice. *J Bone Miner Res.* 2011;26(10):2511-22.
476. Itoh K, Udagawa N, Katagiri T, Iemura S, Ueno N, Yasuda H, et al. Bone morphogenetic protein 2 stimulates osteoclast differentiation and survival supported by receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand. *Endocrinology.* 2001;142(8):3656-62.
477. Shi C, Iura A, Terajima M, Liu F, Lyons K, Pan H, et al. Deletion of BMP receptor type IB decreased bone mass in association with compromised osteoblastic differentiation of bone marrow mesenchymal progenitors. *Sci Rep.* 2016;6:24256.
478. Broege A, Pham L, Jensen ED, Emery A, Huang TH, Stemig M, et al. Bone morphogenetic proteins signal via SMAD and mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways at distinct times during osteoclastogenesis. *J Biol Chem.* 2013;288(52):37230-40.
479. Kanatani M, Sugimoto T, Kaji H, Kobayashi T, Nishiyama K, Fukase M, et al. Stimulatory effect of bone morphogenetic protein-2 on osteoclast-like cell formation and bone-resorbing activity. *J Bone Miner Res.* 1995;10(11):1681-90.
480. Abe E, Yamamoto M, Taguchi Y, Lecka-Czernik B, O'Brien CA, Economides AN, et al. Essential requirement of BMPs-2/4 for both osteoblast and osteoclast formation in murine bone marrow cultures from adult mice: antagonism by noggin. *J Bone Miner Res.* 2000;15(4):663-73.
481. Jensen ED, Pham L, Billington CJ, Jr., Espe K, Carlson AE, Westendorf JJ, et al. Bone morphogenetic protein 2 directly enhances differentiation of murine osteoclast precursors. *J Cell Biochem.* 2010;109(4):672-82.

482. Xu Y, Yang Y, Hua Z, Li S, Yang Z, Liu Q, et al. BMP2 immune complexes promote new bone formation by facilitating the direct contact between osteoclasts and osteoblasts. *Biomaterials*. 2021;275:120890.
483. Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, et al. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am*. 2003;85(8):1544-52.
484. Friedman MS, Long MW, Hankenson KD. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells is regulated by bone morphogenetic protein-6. *J Cell Biochem*. 2006;98(3):538-54.
485. Paul S, Lee JC, Yeh LC. A comparative study on BMP-induced osteoclastogenesis and osteoblastogenesis in primary cultures of adult rat bone marrow cells. *Growth Factors*. 2009;27(2):121-31.
486. Lademann F, Hofbauer LC, Rauner M. The Bone Morphogenetic Protein Pathway: The Osteoclastic Perspective. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:586031.
487. Vukicevic S, Grgurevic L. BMP-6 and mesenchymal stem cell differentiation. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009;20(5-6):441-8.
488. Wutzl A, Brozek W, Lernbass I, Rauner M, Hofbauer G, Schopper C, et al. Bone morphogenetic proteins 5 and 6 stimulate osteoclast generation. *J Biomed Mater Res A*. 2006;77(1):75-83.
489. Garimella R, Tague SE, Zhang J, Belibi F, Nahar N, Sun BH, et al. Expression and synthesis of bone morphogenetic proteins by osteoclasts: a possible path to anabolic bone remodeling. *J Histochem Cytochem*. 2008;56(6):569-77.
490. Acunzo M, Romano G, Wernicke D, Croce CM. MicroRNA and cancer--a brief overview. *Adv Biol Regul*. 2015;57:1-9.
491. Fan FY, Deng R, Qiu L, Wen Q, Zeng Y, Gao L, et al. miR-203a-3p.1 is involved in the regulation of osteogenic differentiation by directly targeting Smad9 in MM-MSCs. *Oncol Lett*. 2019;18(6):6339-46.
492. Liu H, Peng F, Liu Z, Jiang F, Li L, Gao S, et al. CYR61/CCN1 stimulates proliferation and differentiation of osteoblasts in vitro and contributes to bone remodeling in vivo in myeloma bone disease. *Int J Oncol*. 2017;50(2):631-9.
493. Westendorf JJ, Kahler RA, Schroeder TM. Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *Gene*. 2004;341:19-39.
494. Roodman GD. Novel targets for myeloma bone disease. *Expert Opin Ther Targets*. 2008;12(11):1377-87.
495. Fulciniti M, Tassone P, Hideshima T, Vallet S, Nanjappa P, Ettenberg SA, et al. Anti-DKK1 mAb (BHQ880) as a potential therapeutic agent for multiple myeloma. *Blood*. 2009;114(2):371-9.
496. James IE, Kumar S, Barnes MR, Gress CJ, Hand AT, Dodds RA, et al. FrzB-2: a human secreted frizzled-related protein with a potential role in chondrocyte apoptosis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2000;8(6):452-63.
497. Wang FS, Lin CL, Chen YJ, Wang CJ, Yang KD, Huang YT, et al. Secreted frizzled-related protein 1 modulates glucocorticoid attenuation of osteogenic activities and bone mass. *Endocrinology*. 2005;146(5):2415-23.
498. De Vos J, Couderc G, Tarte K, Jourdan M, Requirand G, Delteil MC, et al. Identifying intercellular signaling genes expressed in malignant plasma cells by using complementary DNA arrays. *Blood*. 2001;98(3):771-80.
499. Nakanishi R, Akiyama H, Kimura H, Otsuki B, Shimizu M, Tsuboyama T, et al. Osteoblast-targeted expression of Sfrp4 in mice results in low bone mass. *J Bone Miner Res*. 2008;23(2):271-7.
500. Mao B, Wu W, Davidson G, Marhold J, Li M, Mechler BM, et al. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature*. 2002;417(6889):664-7.
501. Tian E, Zhan F, Walker R, Rasmussen E, Ma Y, Barlogie B, et al. The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2003;349(26):2483-94.
502. Palma BD, Guasco D, Pedrazzoni M, Bolzoni M, Accardi F, Costa F, et al. Osteolytic lesions, cytogenetic features and bone marrow levels of cytokines and chemokines in multiple myeloma patients: Role of chemokine (C-C motif) ligand 20. *Leukemia*. 2016;30(2):409-16.

503. Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Turcott E, Skonier JE, Winkler DG, et al. Sclerostin promotes the apoptosis of human osteoblastic cells: a novel regulation of bone formation. *Bone*. 2004;35(4):828-35.
504. Merle B, Bouet G, Rousseau JC, Bertholon C, Garnero P. Periostin and transforming growth factor  $\beta$ -induced protein (TGF $\beta$ 1p) are both expressed by osteoblasts and osteoclasts. *Cell Biol Int*. 2014;38(3):398-404.
505. Terpos E, Christoulas D, Kastritis E, Bagratuni T, Gavriatopoulou M, Roussou M, et al. High levels of periostin correlate with increased fracture rate, diffuse MRI pattern, abnormal bone remodeling and advanced disease stage in patients with newly diagnosed symptomatic multiple myeloma. *Blood Cancer J*. 2016;6(10):e482.
506. Giuliani N, Colla S, Morandi F, Lazzaretti M, Sala R, Bonomini S, et al. Myeloma cells block RUNX2/CBFA1 activity in human bone marrow osteoblast progenitors and inhibit osteoblast formation and differentiation. *Blood*. 2005;106(7):2472-83.
507. Trotter TN, Li M, Pan Q, Peker D, Rowan PD, Li J, et al. Myeloma cell-derived Runx2 promotes myeloma progression in bone. *Blood*. 2015;125(23):3598-608.
508. D'Souza S, del Prete D, Jin S, Sun Q, Huston AJ, Kostov FE, et al. Gfi1 expressed in bone marrow stromal cells is a novel osteoblast suppressor in patients with multiple myeloma bone disease. *Blood*. 2011;118(26):6871-80.
509. Zhao C, Irie N, Takada Y, Shimoda K, Miyamoto T, Nishiwaki T, et al. Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. *Cell Metab*. 2006;4(2):111-21.
510. Pennisi A, Ling W, Li X, Khan S, Shaughnessy JD, Jr., Barlogie B, et al. The ephrinB2/EphB4 axis is dysregulated in osteoprogenitors from myeloma patients and its activation affects myeloma bone disease and tumor growth. *Blood*. 2009;114(9):1803-12.
511. Brunetti G, Rizzi R, Oranger A, Gigante I, Mori G, Taurino G, et al. LIGHT/TNFSF14 increases osteoclastogenesis and decreases osteoblastogenesis in multiple myeloma-bone disease. *Oncotarget*. 2014;5(24):12950-67.
512. Korchynskiy O, Decherig KJ, Sijbers AM, Olijve W, ten Dijke P. Gene array analysis of bone morphogenetic protein type I receptor-induced osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res*. 2003;18(7):1177-85.
513. Clancy BM, Johnson JD, Lambert AJ, Rezvankhah S, Wong A, Resmini C, et al. A gene expression profile for endochondral bone formation: oligonucleotide microarrays establish novel connections between known genes and BMP-2-induced bone formation in mouse quadriceps. *Bone*. 2003;33(1):46-63.
514. Peng Y, Kang Q, Cheng H, Li X, Sun MH, Jiang W, et al. Transcriptional characterization of bone morphogenetic proteins (BMPs)-mediated osteogenic signaling. *J Cell Biochem*. 2003;90(6):1149-65.
515. de Jong DS, Vaes BL, Decherig KJ, Feijen A, Hendriks JM, Wehrens R, et al. Identification of novel regulators associated with early-phase osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res*. 2004;19(6):947-58.
516. Kowanz M, Valcourt U, Bergström R, Heldin CH, Moustakas A. Id2 and Id3 define the potency of cell proliferation and differentiation responses to transforming growth factor beta and bone morphogenetic protein. *Mol Cell Biol*. 2004;24(10):4241-54.
517. Standal T, Abildgaard N, Fagerli UM, Stordal B, Hjertner O, Borset M, et al. HGF inhibits BMP-induced osteoblastogenesis: possible implications for the bone disease of multiple myeloma. *Blood*. 2007;109(7):3024-30.
518. Ryoo HM, Lee MH, Kim YJ. Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells. *Gene*. 2006;366(1):51-7.
519. Takeuchi K, Abe M, Hiasa M, Oda A, Amou H, Kido S, et al. Tgf-Beta inhibition restores terminal osteoblast differentiation to suppress myeloma growth. *PLoS One*. 2010;5(3):e9870.
520. Zhao C, Sun W, Zhang P, Ling S, Li Y, Zhao D, et al. miR-214 promotes osteoclastogenesis by targeting Pten/PI3k/Akt pathway. *RNA Biol*. 2015;12(3):343-53.
521. Fan FY, Deng R, Lai SH, Wen Q, Zeng Y, Gao L, et al. Inhibition of microRNA-221-5p induces osteogenic differentiation by directly targeting smad3 in myeloma bone disease mesenchymal stem cells. *Oncol Lett*. 2019;18(6):6536-44.

522. Xu S, Cecilia Santini G, De Veirman K, Vande Broek I, Leleu X, De Becker A, et al. Upregulation of miR-135b is involved in the impaired osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from multiple myeloma patients. *PLoS One*. 2013;8(11):e79752.
523. Akhmetshina A, Palumbo K, Dees C, Bergmann C, Venalis P, Zerr P, et al. Activation of canonical Wnt signalling is required for TGF- $\beta$ -mediated fibrosis. *Nat Commun*. 2012;3:735.
524. Wu S, He X, Li M, Shi F, Wu D, Pan M, et al. MiRNA-34a overexpression inhibits multiple myeloma cancer stem cell growth in mice by suppressing TGIF2. *Am J Transl Res*. 2016;8(12):5433-43.
525. Raje N, Roodman GD. Advances in the biology and treatment of bone disease in multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2011;17(6):1278-86.
526. Dunford JE, Thompson K, Coxon FP, Luckman SP, Hahn FM, Poulter CD, et al. Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;296(2):235-42.
527. Cinar M, Hamedani F, Mo Z, Cinar B, Amin HM, Alkan S. Bruton tyrosine kinase is commonly overexpressed in mantle cell lymphoma and its attenuation by Ibrutinib induces apoptosis. *Leuk Res*. 2013;37(10):1271-7.
528. Yaccoby S, Ling W, Zhan F, Walker R, Barlogie B, Shaughnessy JD, Jr. Antibody-based inhibition of DKK1 suppresses tumor-induced bone resorption and multiple myeloma growth in vivo. *Blood*. 2007;109(5):2106-11.
529. Gavriatopoulou M, Dimopoulos MA, Kastiris E, Terpos E. Emerging treatment approaches for myeloma-related bone disease. *Expert Rev Hematol*. 2017;10(3):217-28.
530. Body JJ, Greipp P, Coleman RE, Facon T, Geurs F, Femand JP, et al. A phase I study of AMG-0007, a recombinant osteoprotegerin construct, in patients with multiple myeloma or breast carcinoma related bone metastases. *Cancer*. 2003;97(3 Suppl):887-92.
531. Lu A, Pallero MA, Lei W, Hong H, Yang Y, Suto MJ, et al. Inhibition of Transforming Growth Factor- $\beta$  Activation Diminishes Tumor Progression and Osteolytic Bone Disease in Mouse Models of Multiple Myeloma. *Am J Pathol*. 2016;186(3):678-90.
532. Abramson HN. Monoclonal Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma: An Update. *Int J Mol Sci*. 2018;19(12).
533. Autio KA, Pandit-Taskar N, Carrasquillo JA, Stephenson RD, Slovin SF, Rathkopf DE, et al. Repetitively dosed docetaxel and <sup>153</sup>samarium-EDTMP as an antitumor strategy for metastatic castration-resistant prostate cancer. *Cancer*. 2013;119(17):3186-94.
534. Parker C, Nilsson S, Heinrich D, Helle SI, O'Sullivan JM, Fosså SD, et al. Alpha emitter radium-223 and survival in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med*. 2013;369(3):213-23.
535. Koski AM, Sikiö A, Forslund T. Teriparatide treatment complicated by malignant myeloma. *BMJ Case Rep*. 2010;2010.
536. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986;51 Pt 1:263-73.
537. Clementi M, Bagnarelli P, Manzin A, Menzo S. Competitive polymerase chain reaction and analysis of viral activity at the molecular level. *Genet Anal Tech Appl*. 1994;11(1):1-6.
538. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996;6(10):986-94.
539. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*. 1993;11(9):1026-30.
540. Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res*. 1996;6(10):995-1001.
541. Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(12):e103.
542. Bengtsson M, Karlsson HJ, Westman G, Kubista M. A new minor groove binding asymmetric cyanine reporter dye for real-time PCR. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(8):e45.
543. Ahmad AI. BOXTO as a real-time thermal cycling reporter dye. *J Biosci*. 2007;32(2):229-39.

544. Gudnason H, Dufva M, Bang DD, Wolff A. Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(19):e127.
545. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem.* 1997;245(2):154-60.
546. Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science.* 1991;254(5037):1497-500.
547. Paris C, Moreau V, Deglane G, Voirin E, Erbacher P, Lenne-Samuel N. Zip nucleic acids are potent hydrolysis probes for quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(7):e95.
548. Buh Gasparic M, Cankar K, Zel J, Gruden K. Comparison of different real-time PCR chemistries and their suitability for detection and quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnol.* 2008;8:26.
549. Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods.* 2001;25(4):386-401.
550. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
551. Ishisaki A, Yamato K, Hashimoto S, Nakao A, Tamaki K, Nonaka K, et al. Differential inhibition of Smad6 and Smad7 on bone morphogenetic protein- and activin-mediated growth arrest and apoptosis in B cells. *J Biol Chem.* 1999;274(19):13637-42.
552. Kimura N, Matsuo R, Shibuya H, Nakashima K, Taga T. BMP2-induced apoptosis is mediated by activation of the TAK1-p38 kinase pathway that is negatively regulated by Smad6. *J Biol Chem.* 2000;275(23):17647-52.
553. Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, Turkson J, Levitzki A, Savino R, et al. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity.* 1999;10(1):105-15.
554. Hjertner O, Hjorth-Hansen H, Børset M, Seidel C, Waage A, Sundan A. Bone morphogenetic protein-4 inhibits proliferation and induces apoptosis of multiple myeloma cells. *Blood.* 2001;97(2):516-22.
555. Ro TB, Holt RU, Brenne AT, Hjorth-Hansen H, Waage A, Hjertner O, et al. Bone morphogenetic protein-5, -6 and -7 inhibit growth and induce apoptosis in human myeloma cells. *Oncogene.* 2004;23(17):3024-32.
556. Kawamura C, Kizaki M, Yamato K, Uchida H, Fukuchi Y, Hattori Y, et al. Bone morphogenetic protein-2 induces apoptosis in human myeloma cells with modulation of STAT3. *Blood.* 2000;96(6):2005-11.
557. Kersten C, Sivertsen EA, Hystad ME, Forfang L, Smeland EB, Myklebust JH. BMP-6 inhibits growth of mature human B cells; induction of Smad phosphorylation and upregulation of Id1. *BMC Immunol.* 2005;6:9.
558. Seckinger A, Meissner T, Moreaux J, Goldschmidt H, Fuhler GM, Benner A, et al. Bone morphogenetic protein 6: a member of a novel class of prognostic factors expressed by normal and malignant plasma cells inhibiting proliferation and angiogenesis. *Oncogene.* 2009;28(44):3866-79.
559. Chng WJ, Huang GF, Chung TH, Ng SB, Gonzalez-Paz N, Troska-Price T, et al. Clinical and biological implications of MYC activation: a common difference between MGUS and newly diagnosed multiple myeloma. *Leukemia.* 2011;25(6):1026-35.
560. Holien T, Våtsveen TK, Hella H, Rampa C, Brede G, Grøseth LA, et al. Bone morphogenetic proteins induce apoptosis in multiple myeloma cells by Smad-dependent repression of MYC. *Leukemia.* 2012;26(5):1073-80.
561. Fukuda N, Saitoh M, Kobayashi N, Miyazono K. Execution of BMP-4-induced apoptosis by p53-dependent ER dysfunction in myeloma and B-cell hybridoma cells. *Oncogene.* 2006;25(25):3509-17.
562. Grcević D, Kusec R, Kovacic N, Lukić A, Lukić IK, Ivcević S, et al. Bone morphogenetic proteins and receptors are over-expressed in bone-marrow cells of multiple myeloma patients and support myeloma cells by inducing ID genes. *Leuk Res.* 2010;34(6):742-51.



563. Neri P, Tassone P, Shamma M, Yasui H, Schipani E, Batchu RB, et al. Biological pathways and in vivo antitumor activity induced by Atiprimod in myeloma. *Leukemia*. 2007;21(12):2519-26.
564. Zhan F, Barlogie B, Arzoumanian V, Huang Y, Williams DR, Hollmig K, et al. Gene-expression signature of benign monoclonal gammopathy evident in multiple myeloma is linked to good prognosis. *Blood*. 2007;109(4):1692-700.
565. Lagler C, El-Mesery M, Kübler AC, Müller-Richter UDA, Stühmer T, Nickel J, et al. The anti-myeloma activity of bone morphogenetic protein 2 predominantly relies on the induction of growth arrest and is apoptosis-independent. *PLoS One*. 2017;12(10):e0185720.
566. Gooding S, Olechnowicz SWZ, Morris EV, Armitage AE, Arezes J, Frost J, et al. Transcriptomic profiling of the myeloma bone-lining niche reveals BMP signalling inhibition to improve bone disease. *Nat Commun*. 2019;10(1):4533.