



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

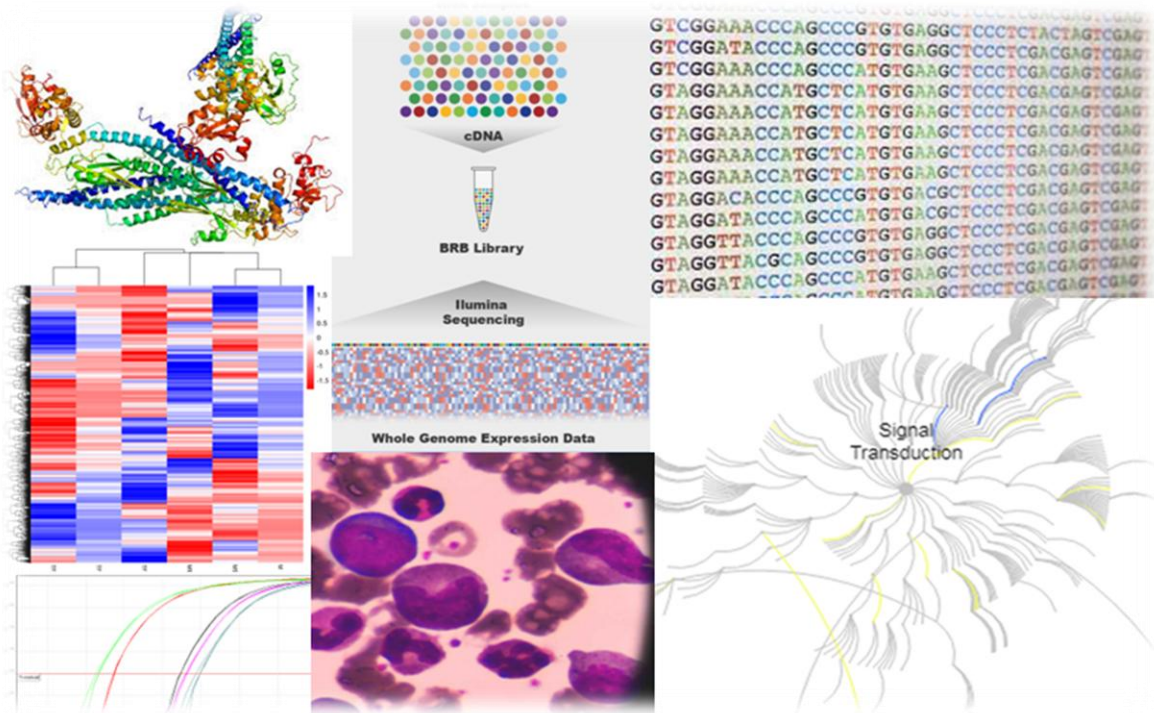
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ
ΣΠΟΥΔΩΝ «ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ»

Δ Ι Π Λ Ω Μ Α Τ Ι Κ Η Ε Ρ Γ Α Σ Ι Α Μ Δ Ε

«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ STAT3 ΚΑΙ STAT5 ΜΕ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ OMICS»



ΧΑΡΙΚΛΕΙΑ ΜΑΚΡΗ

Πτυχιούχος Τμήματος Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο
Αθηνών

ΑΘΗΝΑ 2021



HELLENIC REPUBLIC
National and Kapodistrian
University of Athens
— EST. 1837 —

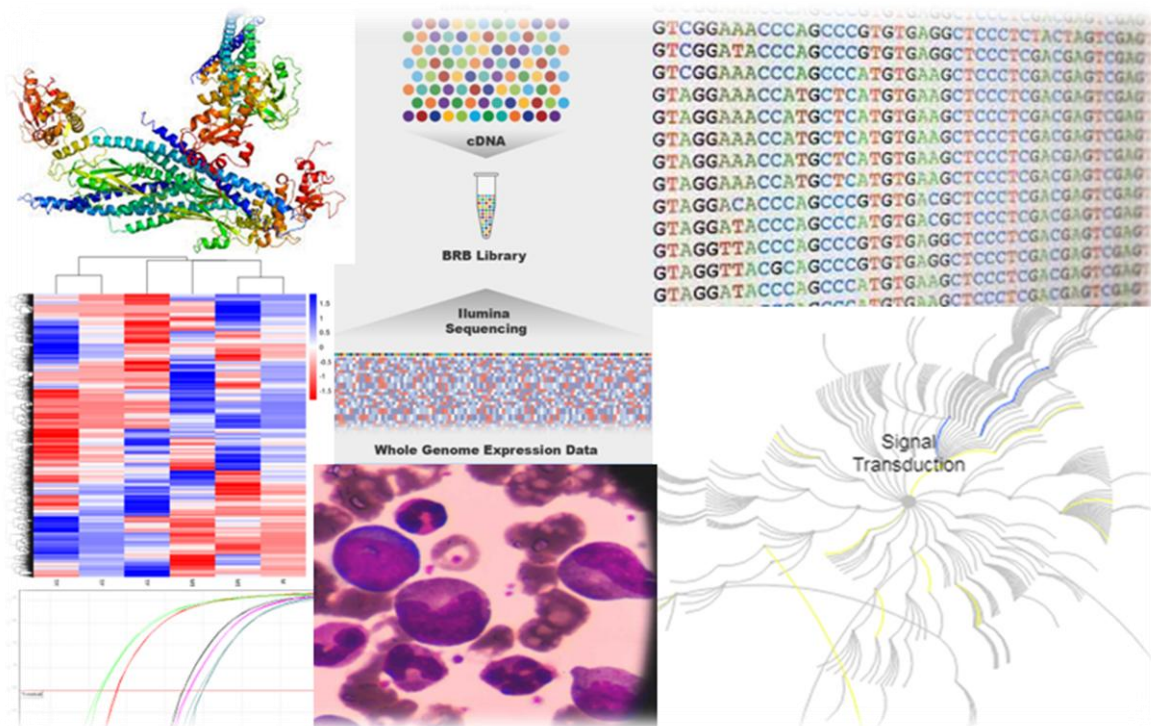
HELLENIC REPUBLIC
National and Kapodistrian
University of Athens

SCHOOL OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

MASTER IN «BIOINFORMATICS»

MASTER THESIS

«STUDY OF MECHANISMS OF ACTION OF STAT3 AND STAT5 USING OMICS APPROACHES»



CHARIKLEIA MAKRI

Biologist, National and Kapodistrian University of Athens

A T H E N S 2 0 2 1



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
—ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837—

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ»

Δ Ι Π Λ Ω Μ Α Τ Ι Κ Η Ε Ρ Γ Α Σ Ι Α Μ Δ Ε

«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ STAT3 ΚΑΙ
STAT5 ΜΕ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ OMICS»

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Βασιλική Α. Οικονομίδου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοφυσικής - Μοριακής
Βιοφυσικής, (Επιβλέπουσα)

Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Ιωάννης Π. Τρουγκάκος, Καθηγητής Βιολογίας Ζωικού Κυττάρου και
Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας

Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Ελένη Κατσαντώνη, Ερευνήτρια Γ', (Επιστημονική Υπεύθυνη)

*Τομέας Βασικής Έρευνας, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Έρευνών της Ακαδημίας
Αθηνών*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	3
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	4
1.1. Αιμοποίηση	4
1.1.1. Διαδικασία αιμοποίησης	4
1.1.2. Προβλήματα στην αιμοποίηση και Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία (ΟΜΛ)	6
1.1.3. Μεταγραφικοί παράγοντες στην αιμοποίηση	12
1.2. Η οικογένεια των παραγόντων STATs	14
1.2.1. Οικογένεια STAT και δομικά χαρακτηριστικά	14
1.2.2. Ενεργοποίηση των STATs	17
1.2.3. Ρύθμιση των STATs	20
1.2.4. Ρόλος των STATs σε φυσιολογική και παθολογική κατάσταση	22
1.2.5. Ο παράγοντας STAT3	24
1.2.6. Ο παράγοντας STAT5	27
1.2.7. Σύνδεση STAT3 και STAT5	29
1.3. Αλληλούχιση επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing - NGS)	30
1.3.1. Τεχνολογίες NGS: Βασικές αρχές και ιστορική αναδρομή	30
1.3.2. Αλληλούχιση RNA (RNA-seq)	32
2. ΣΚΟΠΟΣ	35
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	36
3.1. RNA-seq και βιοπληροφορική ανάλυση δεδομένων	36
3.2. Κυτταρικές σειρές	37
3.3. Δημιουργία κυτταρικών σειρών με KD του STAT3	38
3.3.1. Φορείς short hairpin RNAs (shRNAs)	38
3.3.2. Δημιουργία σωματιδίων λεντιϊών	39
3.3.3. Δημιουργία KDs	40
3.4. Ολικό κυτταρικό εκχύλισμα (Whole cell Extract – WCE)	40
3.5. Στύπωμα Western (Western Blot)	40
3.6. Απομόνωση RNA	41
3.7. Αντίστροφη μεταγραφή και ποσοτική PCR (qPCR)	41
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	42
4.1. Βιοπληροφορική ανάλυση για τον προσδιορισμό γονιδίων στόχων του STAT5A και του STAT5B	42
4.1.1. Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Principal Component Analysis – PCA)	42
4.1.2. Ανάλυση διαφορικής έκφρασης	43
4.1.3. Ανάλυση εμπλουτισμού μονοπατιών (Pathway Enrichment Analysis)	47

4.2. Δημιουργία KDs του STAT3.....	56
4.2.1. RT-qPCRs.....	57
4.2.2. Western Blots.....	59
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	61
6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	64
7. ABSTRACT.....	65
8. ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	66
9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	68

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία με θέμα «Διερεύνηση μηχανισμών δράσης των παραγόντων STAT3 και STAT5 με μεθοδολογίες omics», εκπονήθηκε στο Εργαστήριο της Δρ. Ελένης Κατσαντώνη, στο Κέντρο Βασικής Έρευνας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α.), κατά το ακαδημαϊκό έτος 2020-2021.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Επιστημονική Υπεύθυνη Δρ. Ελένη Κατσαντώνη για την καθοδήγηση και την συνεργασία καθ'όλη την διάρκεια διεξαγωγής της Διπλωματικής Εργασίας. Μέσα από την ευκαιρία που μου έδωσε να γίνω μέλος του Εργαστηρίου της απέκτησα γνώσεις και εμπειρία που είναι ιδιαίτερα σημαντικά για την μετέπειτα σταδιοδρομία μου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου. Αρχικά, την υποψήφια διδάκτορα Ειρήνη Σοφία Φασουλή για την πολύτιμη βοήθεια και τις γνώσεις που μου προσέφερε. Τον συμφοιτητή και φίλο Γιώργο Καρακατσάνη, την Κωνσταντίνα Γιαβή και την Κατερίνα Ηλιοπούλου για την βοήθειά τους και την αρμονική συνεργασία. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την Κατερίνα Νάνου και Χρυσσαυγή Τουμπέκη για τα αποτελέσματα RNA-seq που ανέλυσα στην αρχή της Διπλωματικής Εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον Πρόεδρο του μεταπτυχιακού, Καθηγητή Ιωάννη Τρουγκάκο και την Επιβλέπουσα Αν. Καθηγήτρια Βασιλική Οικονομίδου. Τέλος, ευχαριστώ όλους τους συντελεστές του Μεταπτυχιακού Προγράμματος και ιδιαίτερα την κ. Ευαγγελία Παπατρέχα για την άψογη οργάνωση και την προθυμία της για βοήθεια καθ'όλη την διάρκεια του Μεταπτυχιακού.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Αιμοποίηση

1.1.1. Διαδικασία αιμοποίησης

Η αιμοποίηση αποτελεί την διαδικασία μέσω της οποίας δημιουργούνται όλα τα διαφοροποιημένα κύτταρα του αίματος, στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα ερυθρά αιμοσφαίρια και τα λεμφοκύτταρα (Εικόνα 1). Στους ενήλικες η αιμοποίηση λαμβάνει χώρα κυρίως στον μυελό των οστών, όπου και εντοπίζονται τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα (Haematopoietic Stem Cells - HSCs). Τα κύτταρα αυτά διαθέτουν την ικανότητα του πολλαπλασιασμού, έτσι ώστε να διατηρούν την δυναμική τους. Η παραμονή τους σε αδρανή κατάσταση, ή ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίησή τους ρυθμίζονται τόσο από ενδοκυτταρικά, όσο και από εξωκυτταρικά σήματα (Konieczny and Arranz 2018).

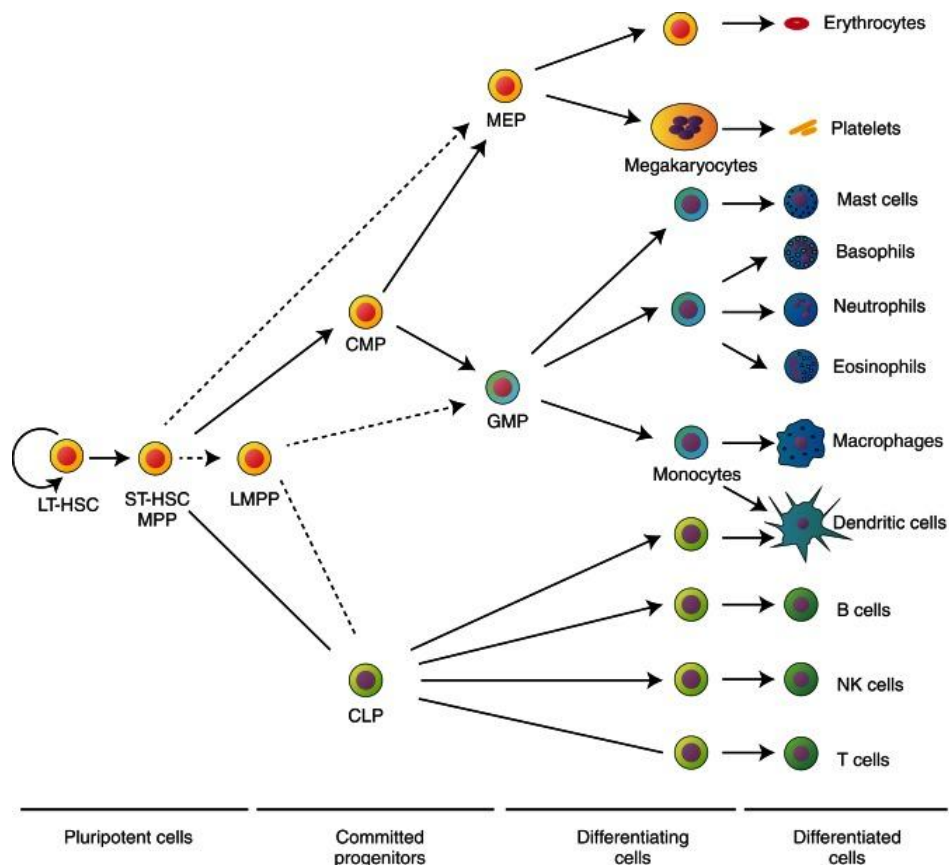
Το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών (το οποίο συμπεριλαμβάνει μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, κύτταρα που σχετίζονται με το νευρικό και τον οστικό ιστό, οστεοβλάστες, αρτηρίδια, μακροφάγα κ.ά.) συμβάλλει στην διατήρηση των μοναδικών χαρακτηριστικών των HSCs, στην ικανότητα γρήγορης απόκρισης στην εξωκυτταρική σηματοδότηση και επιπλέον ρυθμίζει την πορεία διαφοροποίησης και των αριθμό τους (Fasouli and Katsantoni 2021, Konieczny and Arranz 2018). Πλήθος αυξητικών παραγόντων, όπως για παράδειγμα ο παράγοντας βλαστικών κυττάρων SCF (Stem Cell Factor) και η χημειοκίνη CXCL12 (C-X-C motif chemokine 12, γνωστή και ως Stromal Cell-Derived Factor 1-SDF1), που διασφαλίζουν την διατήρηση των HSCs και ελέγχουν την αιμοποίηση εκκρίνονται από τους διάφορους τύπους κυττάρων που διαμορφώνουν το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών (Crane, Jeffery, and Morrison 2017).

Ο ρυθμός παραγωγής ώριμων κυττάρων του αίματος σε έναν ενήλικα άνθρωπο υπερβαίνει το 1 εκατομμύριο κύτταρα ανά δευτερόλεπτο. Το αιμοποιητικό σύστημα των θηλαστικών περιλαμβάνει πάνω από 10 διακριτές κατηγορίες ώριμων κυττάρων, μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνονται, τα ερυθροκύτταρα, τα αιμοπετάλια, τα μακροφάγα, τα κοκκιοκύτταρα, τα μαστικά κύτταρα, τα T- και B- λεμφοκύτταρα, τα φυσικά φονικά κύτταρα και τα δενδριτικά κύτταρα (Εικόνα 1). Όλες οι παραπάνω κατηγορίες κυττάρων προέρχονται μέσω της διαφοροποίησης των HSCs (Seita and Weissman 2010).

Στην δεξαμενή των HSCs απαντώνται τα LT-HSCs (Long-Term self-renewing HSCs) που διατηρούν την ικανότητα πολλαπλασιασμού τους για μεγάλο χρονικό διάστημα, τα ST-HSCs (Short-Term self-renewing HSCs) που έχουν την ικανότητα αυτή για περιορισμένο χρόνο και τα πολυδύναμα προγονικά κύτταρα (Multipotent Progenitors – MPPs) που έχουν χάσει την δυνατότητα πολλαπλασιασμού, αλλά διαθέτουν ακόμα την δυναμική διαφοροποίησης προς όλες τις κατευθύνσεις. Όταν

δεσμευτούν σε μια γραμμή διαφοροποίησης, μυελοειδή ή λεμφοειδή, προκύπτουν τα κοινά προγονικά μυελοειδή (Common Myeloid Progenitors - CMPs) και τα κοινά προγονικά λεμφοειδή κύτταρα (Common Lymphoid Progenitors - CLPs) αντίστοιχα. Τα πρώτα διαφοροποιούνται περαιτέρω σε προγονικά κύτταρα μεγακαρυοκυττάρων/ερυθροκυττάρων (Megakaryocyte/Erythrocyte Progenitors – MEPs) και προγονικά κύτταρα κοκκιοκυττάρων/μακροφάγων (Granulocyte/Macrophage Progenitors - GMPs), ενώ τα δεύτερα σε T- και B-λεμφοκύτταρα, φυσικά φονικά κύτταρα και δενδριτικά κύτταρα (Εικόνα 1) (Dzierzak and Philipsen 2013, Seita and Weissman 2010).

Τα MPPs αποτελούν έναν ανομοιογενή πληθυσμό κυττάρων. Σήμερα η αιμοποίηση μέσω της διαφοροποίησης των HSCs τείνει να θεωρηθεί μια περισσότερο συνεχής διεργασία, παρά μια αυστηρά βηματική μετάβαση από το ένα στάδιο διαφοροποίησης στο επόμενο (Seita and Weissman 2010, Fasouli and Katsantoni 2021).



Εικόνα 1. Διαδικασία της αιμοποίησης.

Από τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα (HSCs) προκύπτουν μέσω διαφοροποίησης όλες οι κατηγορίες των ώριμων κυττάρων του αίματος. LT-HSC, Long-Term Hematopoietic Stem Cell; ST-HSC, Short-Term HSCs; MPP, Multipotential Progenitors; LMPP, Lymphoid-Primed Multipotential Progenitor; CLP, Common Lymphocyte Progenitor; CMP, Common Myeloid Progenitor; GMP, Granulocyte-Macrophage Progenitor; MEP, Megakaryocyte-Erythroid Progenitor; NK cell, Natural Killer cell (Dzierzak and Philipsen 2013).

1.1.2. Διαταραχές της αιμοποίησης και Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία (ΟΜΛ)

Μέχρι στιγμής, πολλές ασθένειες που σχετίζονται με την διαδικασία της αιμοποίησης έχουν αναφερθεί. Η μεγάλη ετερογένεια αποτελεί χαρακτηριστικό των ασθενειών αυτών λόγω των διαφορών στις αιτίες, το γενετικό και μοριακό υπόβαθρο, το ηλικιακό στάδιο εμφάνισης, τα συμπτώματα και τις θεραπευτικές τους προσεγγίσεις.

Μια μεγάλη κατηγορία ασθενειών σχετίζεται με την αναποτελεσματική ερυθροποίηση. Ο όρος ερυθροποίηση αναφέρεται στην διαδικασία μέσω της οποίας τα ερυθροειδή προγονικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε ώριμα απύρρινα ερυθροκύτταρα (Red Blood Cells – RBCs). Η ερυθροποίηση αποτελεί μια δυναμική και αυστηρά ελεγχόμενη διαδικασία πολλών βημάτων για να διατηρείται η ισορροπία μεταξύ του πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και της επιβίωσης των ερυθροειδών προγονικών κυττάρων (Oikonomidou and Rivella 2018). Σημαντικό ρόλο στην διαδικασία αυτή παίζει η κυτοκίνη ερυθροποιητίνη (Erythropoietin – EPO), η οποία εκκρίνεται από τους νεφρούς και όταν δεσμευτεί σε κατάλληλους υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων, σηματοδοτεί μεταξύ άλλων και την ενεργοποίηση μέσω φωσφορυλίωσης της κινάσης JAK2, η οποία με την σειρά της δεσμεύεται στον παράγοντα STAT5. Το σύμπλοκο JAK2-STAT5 στην συνέχεια εισέρχεται στον πυρήνα και ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων στόχων (Gurta et al. 2018). Η αναποτελεσματική ερυθροποίηση (Ineffective erythropoiesis – IE) χαρακτηρίζεται από μη φυσιολογική διαφοροποίηση ή ωρίμανση των ερυθροειδών προγονικών κυττάρων. Ασθένειες, όπως οι θαλασσαιμίες, με πιο συχνή την β-θαλασσαιμία, η αναιμία και η αιμοχρωμάτωση σχετίζονται με αναποτελεσματική ερυθροποίηση και διαταραχές στην ομοιόσταση του σιδήρου (Gurta et al. 2018, Oikonomidou and Rivella 2018).

Μια άλλη μεγάλη κατηγορία αιμοποιητικών ασθενειών συνδέεται με το φαινόμενο της σχετιζόμενης με την ηλικία κλωνικής αιμοποίησης (Age-Related Clonal Hematopoiesis – ARCH) (Εικόνα 2). Το γήρας επιφέρει μειωμένη αναγεννητική ικανότητα του οργανισμού που επηρεάζει όλα τα συστήματα, λόγω της σταδιακής αδυναμίας των βλαστικών κυττάρων να επιτελέσουν τις βασικές τους λειτουργίες. Το αιμοποιητικό σύστημα και τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα δεν αποτελούν εξαίρεση και διάφορες ασθένειες, όπως η αναιμία, ο εκφυλισμός του ανοσοποιητικού συστήματος, η αυτοανοσία και η μη φυσιολογική παραγωγή μυελοειδών κυττάρων, σχετίζονται με την γήρανση του οργανισμού (Konieczny and Arranz 2018). Οι σχετιζόμενες με την ηλικία σωματικές μεταλλάξεις στα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα συχνά συνδέονται με χρόνιες φλεγμονές, καρδιαγγειακές παθήσεις και εμφάνιση κακοηθειών (Perner et al. 2019).

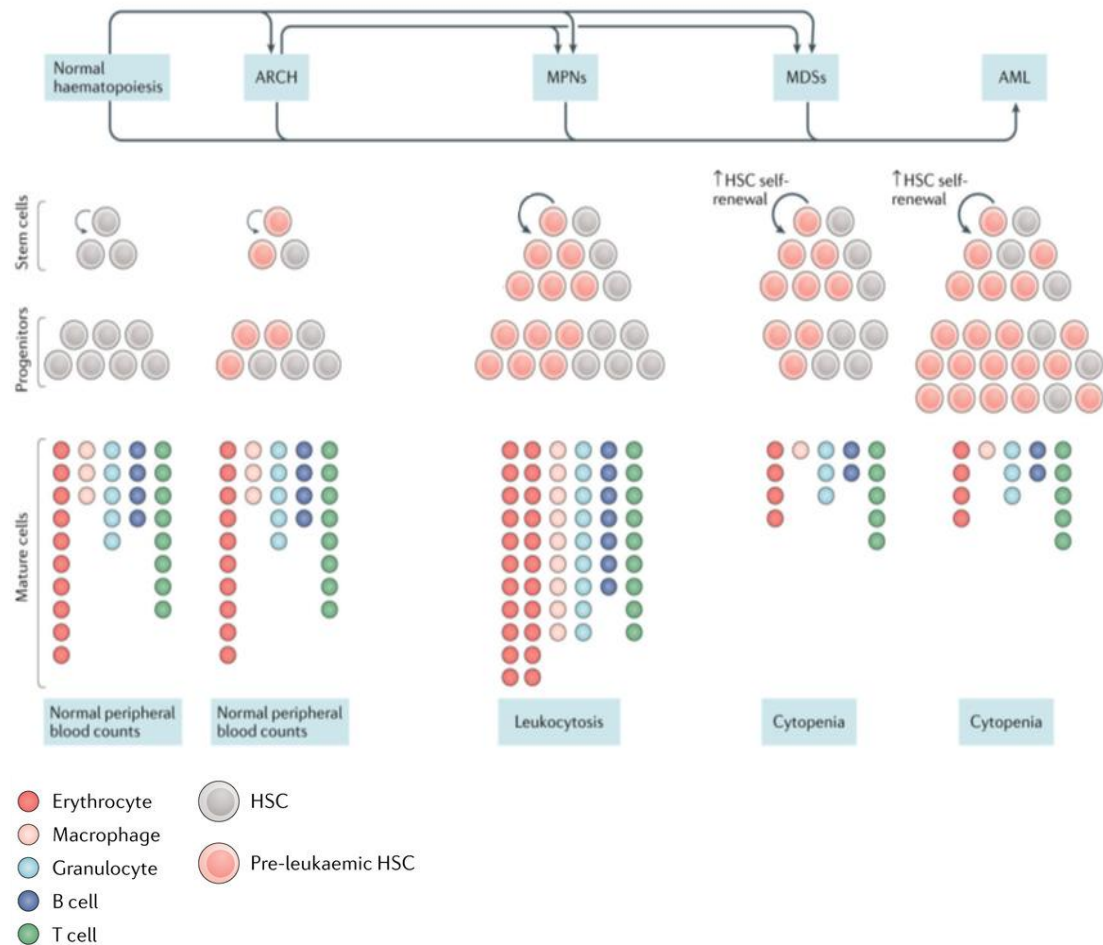
Πρόσφατες γονιδιωματικές μελέτες σε DNA προερχόμενο από περιφερικό αίμα χιλιάδων ατόμων αποκάλυψαν την παρουσία κοινών σωματικών μεταλλάξεων που σχετίζονται με το γήρας και εμπλέκονται σε αιματολογικές κακοήθειες. Αυτές οι

μεταλλάξεις οδηγούν στην δημιουργία ενός ολόκληρου κλώνου αιμοποιητικών κυττάρων, ο οποίος προέρχεται από ένα μόνο αρχικό κύτταρο που φέρει την συγκεκριμένη μετάλλαξη (Jan, Ebert, and Jaiswal 2017). Η κλωνική αιμοποίηση (Clonal Hematopoiesis) είναι μια κοινή προ-κακοήθης κατάσταση που χαρακτηρίζεται από μη φυσιολογική εξάπλωση κλώνων HSCs που φέρουν σωματικές μεταλλάξεις σε γονίδια που έχουν συνδεθεί με λευχαιμία. Το φαινόμενο αυτό, εκτός από άτομα μεγάλης ηλικίας, παρατηρείται με μεγαλύτερη συχνότητα και σε άτομα με λεμφώματα ή συμπαγείς όγκους (Park and Bejar 2020). Τα γονίδια με την μεγαλύτερη συχνότητα μεταλλάξεων σε περιπτώσεις κλωνικής αιμοποίησης συνήθως εμπλέκονται σε λειτουργίες, όπως οι επιγενετικές τροποποιήσεις, η κυτταρική σηματοδότηση, η επιδιόρθωση του DNA, το μάτισμα του RNA, γονίδια δηλαδή που εμπλέκονται και σε περιπτώσεις μυελοειδών κακοηθειών. Για τον λόγο αυτό, έχει προταθεί ότι οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις σχετίζονται με τα πρώτα στάδια ανάπτυξης λευχαιμιών και επηρεάζουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού/διαφοροποίησης των HSCs, την μεταγραφική ρύθμιση ογκογονιδίων ή ογκοκατασταλτικών γονιδίων, την απόκριση σε βλάβες του DNA, καθώς και την ανθεκτικότητα σε παράγοντες που προκαλούν κυτταρικό στρες (Kunimoto and Nakajima 2020). Το γονίδιο *JAK2* εμφανίζει μεγάλη συχνότητα μεταλλάξεων στα κύτταρα του αίματος κατά την γήρανση, οι οποίες είναι σημαντικές για την ανάπτυξη μυελοϋπερπλαστικών νεοπλασμάτων (προ-λευχαιμικό στάδιο). Η πιο συχνή από αυτές τις μεταλλάξεις είναι η V617F που έχει ως αποτέλεσμα την συνεχή δράση της κινάσης με επακόλουθο την ενεργοποίηση των καθοδικών σηματοδοτικών μονοπατιών (Perner et al. 2019).

Η λευχαιμία συνήθως προκύπτει μέσω μιας διαδικασίας πολλών βημάτων που περιλαμβάνει την συσσώρευση γενετικών και επιγενετικών αλλαγών σε προ-λευχαιμικά HSCs, από τα οποία στην συνέχεια προκύπτουν τα λευχαιμικά βλαστικά κύτταρα (Leukaemic Stem Cells - LSCs) που οδηγούν με τη σειρά τους σε ανάπτυξη οξείας μυελογενούς λευχαιμίας (OML) (Acute Myeloid Leukaemia - AML) (Εικόνα 2). Η OML χαρακτηρίζεται από συσσώρευση ανώριμων μυελοβλαστών στον μυελό των οστών και το περιφερικό αίμα. Η OML απαντάται σε όλες τις ηλικίες, αλλά τα μεγαλύτερα ποσοστά εμφάνισης αφορούν ηλικιωμένα άτομα με μέσο όρο διάγνωσης τα 70 έτη (Yamashita et al. 2020). Το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών αλλάζει κατά την γήρανση. Αύξηση της σηματοδότησης που σχετίζεται με φλεγμονή και αλλαγή των εκκρινόμενων αυξητικών παραγόντων ευνοούν την ανάπτυξη λευχαιμιών. Βασική αιτία του φαινομένου αποτελεί η διαφορετική ικανότητα απόκρισης των φυσιολογικών και των μεταλλαγμένων κλώνων HSCs στο στρες που προκαλείται λόγω των αλλαγών αυτών στο μικροπεριβάλλον του μυελού. Πιο συγκεκριμένα, κατά την ανάπτυξη της λευχαιμίας η δεξαμενή των HSCs γίνεται γενετικά ετερογενής, το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την επιλεκτική περιβαλλοντική πίεση, οδηγούν σε κλωνική εξάπλωση των προ-λευχαιμικών HSCs. Αυτή η κλωνική επιλογή μπορεί είτε να καταλήξει σε αυξημένη παραγωγή

συγκεκριμένων διαφοροποιημένων κυττάρων του αίματος, δηλαδή σε μυελοϋπερπλαστικά νεοπλάσματα (Myeloproliferative Neoplasms - MPNs), είτε σε μείωση της ικανότητας των HSCs να διαφοροποιούνται και κατ'επέκταση σε μειωμένη παραγωγή διαφοροποιημένων αιμοποιητικών κυττάρων, δηλαδή σε μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (Myelodysplastic Syndromes - MDSs). Και οι δύο κατηγορίες ασθενειών θεωρούνται προ-λευχαιμικά στάδια που σε πολλές περιπτώσεις θα εξελιχθούν σε ΟΜΛ (Εικόνα 2) (Yamashita et al. 2020, Verovskaya, Dellorusso, and Passegú 2019).

Τα MDSs εμφανίζονται κυρίως σε ηλικιωμένους, με μέσο όρο διάγνωσης τα 70 έτη, όπως και η ΟΜΛ. Βασικά χαρακτηριστικά των συνδρόμων της ομάδας αυτής είναι η απορρύθμιση της διαδικασίας της αιμοποίησης, η δυσπλασία του μυελού των οστών και η αναστολή της διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων και των προγονικών κυττάρων, γεγονός που οδηγεί τόσο σε συσσώρευση ανώριμων αιμοποιητικών κυττάρων, όσο και στην μείωση ώριμων κυττάρων του αίματος στην κυκλοφορία (κυτταροπενία) (Εικόνα 2). Στις περιπτώσεις που ένα MDS εξελίσσεται σε ΟΜΛ, μπορεί είτε να εξαπλώνεται μόνο ένας κλώνος που φέρει κάποια συγκεκριμένη μετάλλαξη (γραμμική μετάβαση), είτε να επικρατούν περισσότεροι από έναν, διαφορετικοί μεταλλαγμένοι κλώνοι (Veiga et al. 2021, Cazzola 2020). Τα MPNs χαρακτηρίζονται κυρίως από την αυξημένη παραγωγή διαφοροποιημένων κυττάρων του αίματος (Εικόνα 2). Το σηματοδοτικό μονοπάτι JAK-STAT φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση των συγκεκριμένων νεοπλασμάτων (Nangalia and Green 2017).



Εικόνα 2. Ασθένειες που σχετίζονται με κλωνική αιμοποίηση.

Η λευχαιμία αναπτύσσεται μέσω συσσώρευσης μεταλλάξεων που ενεργοποιούν τον πολλαπλασιασμό των HSCs και σταματούν την διαφοροποίηση σε προγονικά κύτταρα. Στην σχετιζόμενη με την ηλικία κλωνική αιμοποίηση (ARCH) οι σωματικές μεταλλάξεις οδηγούν σε εξάπλωση συγκεκριμένων κλώνων που προσαρμόζονται καλύτερα στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών, χωρίς όμως εμφανείς αλλαγές στην σύσταση των ώριμων διαφοροποιημένων κυττάρων του αιμοποιητικού συστήματος. Στα μυελοϋπερπλαστικά νεοπλάσματα (MPNs) παρατηρείται υπέρμετρη παραγωγή ώριμων αιμοποιητικών κυττάρων. Αντιθέτως, στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (MDSs) παρατηρείται αυξημένος πολλαπλασιασμός των HSCs, αλλά μειωμένη παραγωγή ώριμων αιμοποιητικών κυττάρων (κυτταροπενία), λόγω αναστολής της διαφοροποίησης. Στην OML παρατηρείται συσσώρευση λευχαιμικών βλαστικών κυττάρων. Παρά το γεγονός ότι οι ασθένειες αυτές συνδέονται μεταξύ τους, και η OML μπορεί να εξελιχθεί από τα MPNs και τα MDSs, κάθε μία μπορεί να προκύψει και *de novo*. HSC, Haematopoietic Stem Cell; ARCH, Age-Related Clonal Haematopoiesis; MPNs, Myeloproliferative Neoplasms; MDSs, Myelodysplastic Syndromes; AML, Acute Myeloid Leukaemia (Yamashita et al. 2020).

Όσον αφορά την OML, θεωρείται η πιο κοινή μορφή οξείας λευχαιμίας στους ενήλικες και αφορά το 80% των περιπτώσεων αυτής της κατηγορίας ασθενειών. Επιδημιολογικά στοιχεία από τις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής επιβεβαιώνουν περισσότερες από 20.000 περιπτώσεις OML κάθε χρόνο. Η συχνότητα εμφάνισης κυμαίνεται από 3 έως 5 περιπτώσεις OML ανά 100.000

άτομα στον πληθυσμό, αλλά αυξάνεται με την ηλικία. Πιο συγκεκριμένα, η συχνότητα για ασθενείς κάτω των 65 ετών είναι περίπου 1.3 ανά 100.000 άτομα, ενώ για άτομα άνω των 65 αυξάνεται σε 12.2 περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα. Παρά το γεγονός ότι έχει σημειωθεί πρόοδος στις θεραπευτικές προσεγγίσεις της ΟΜΛ, η πρόγνωση για τους ηλικιωμένους ασθενείς, που αποτελούν και την πλειοψηφία των περιπτώσεων, παραμένει δυσμενής. Περίπου το 70% των ασθενών ηλικίας μεγαλύτερης των 65 ετών πεθαίνει από την πάθηση μέσα σε διάστημα 1 έτους από την διάγνωση (De Kouchkovsky and Abdul-Hay 2016).

Η διάγνωση της ΟΜΛ μπορεί να προκύψει μέσω κάποιας τυπικής εξέτασης αίματος ή μέσω εμφάνιση επιπλοκών, όπως κάποια λοίμωξη, αιμορραγία ή θρόμβωση. Παρουσία βλαστών $\geq 20\%$ στο περιφερικό αίμα ή στον μυελό των οστών, είτε ανίχνευση συγκεκριμένων γενετικών ανωμαλιών στα κύτταρα του μυελού, υποδεικνύουν την εμφάνιση της ασθένειας. Για την οριστική επιβεβαίωση της διάγνωσης, την καλύτερη κατηγοριοποίηση στους διάφορους υποτύπους και την πρόγνωση της σοβαρότητας της ασθένειας απαιτείται βιοψία μυελού των οστών. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας το 2016 προσδιόρισε 6 διακριτές κατηγορίες ΟΜΛ: (1) ΟΜΛ με περιοδικές γενετικές ανωμαλίες, (2) ΟΜΛ με αλλαγές που σχετίζονται με μυελοδυσπλασία, (3) Μυελοειδή νεοπλάσματα σχετιζόμενα με θεραπεία, (4) ΟΜΛ χωρίς περαιτέρω διευκρίνιση, (5) Μυελοειδές σάρκωμα και (6) Μυελοειδής πολλαπλασιασμός σχετιζόμενος με σύνδρομο Down. Η ΟΜΛ επίσης μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε τρεις ομάδες (ευμενής, ενδιάμεση και δυσμενής), με βάση τον προγνωστικό κίνδυνο, σύμφωνα με κυτταρογενετικά και μοριακά χαρακτηριστικά. Οι συνήθεις θεραπευτικές προσεγγίσεις περιλαμβάνουν κυτταροτοξική χημειοθεραπεία (γενική ή στοχευμένη), χορήγηση υπομεθυλιωτικών παραγόντων (γενικών ή στοχευμένων) και αλλογενή μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (Pelcovits and Niroula 2020).

Η ΟΜΛ είναι μια ασθένεια που χαρακτηρίζεται από υψηλή ετερογένεια. Κάποιοι αιτιακοί παράγοντες για την μειοψηφία των περιπτώσεων ΟΜΛ είναι η έκθεση σε χημειοθεραπεία (για κάποια άλλη μορφή καρκίνου) ή/και σε ιονίζουσα ακτινοβολία, καθώς επίσης και σε χημικές ουσίες, όπως προϊόντα πετρελαίου, οργανικοί διαλύτες και οργανοφωσφορικές ενώσεις (π.χ. εντομοκτόνα). Όμως, η πλειοψηφία των περιπτώσεων οφείλονται σε κάποια γενετική αλλαγή, είτε χρωμοσωμική ανωμαλία είτε σημειακή μετάλλαξη, χωρίς ξεκάθαρη αιτία πρόκλησής τους (Rubnitz, Gibson, and Smith 2010, De Kouchkovsky and Abdul-Hay 2016). Μεγάλες χρωμοσωμικές μεταθέσεις, όπως η t(8:21) και η t(15:17) εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της ασθένειας, όμως οι γονιδιακές μεταλλάξεις ανιχνεύονται σε ποσοστό μεγαλύτερο από το 97% των περιπτώσεων ΟΜΛ, συχνά χωρίς την παράλληλη παρουσία χρωμοσωμικών ανωμαλιών (De Kouchkovsky and Abdul-Hay 2016).

Μελέτες σε ζωικά μοντέλα έχουν οδηγήσει στην πρόταση ενός μηχανισμού λευχαιμογένεσης δύο προϋποθέσεων, σύμφωνα με τον οποίο μπορούν να

κατηγοριοποιηθούν οι διάφορες, σχετιζόμενες με ΟΜΛ, μεταλλάξεις σε δύο ομάδες. Στην ομάδα I ανήκουν οι μεταλλάξεις που ενεργοποιούν μονοπάτια πολλαπλασιασμού και στην ομάδα II μεταλλάξεις που παρεμποδίζουν την φυσιολογική αιμοποιητική διαφοροποίηση. Για να αναπτυχθεί ΟΜΛ θα πρέπει να πραγματοποιηθούν συνδυαστικά μεταλλάξεις και των δύο ομάδων. Μεταλλάξεις της ομάδας I εντοπίζονται στα γονίδια *FLT3*, *K/NRAS*, *TP53* και *c-KIT* σε ποσοστό περίπου 28, 12, 8 και 4% των περιπτώσεων, αντίστοιχα. Μελέτες σε συμπαγείς και αιματολογικές κακοήθειες έχουν υπογραμμίσει τον ρόλο του παράγοντα STAT3 στην επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της κυτταρικής επιβίωσης. Αυξημένη φωσφορυλίωση του παράγοντα αυτού, είτε λόγω αυξημένης έκκρισης κυτοκινών (π.χ. IL-6), είτε λόγω μεταλλάξεων σε υποδοχείς – κινάσες τυροσίνης (π.χ. *FLT3* ή πιο σπάνια *JAK2*), παρατηρείται σε περισσότερες από το 50% των περιπτώσεων ΟΜΛ και συνδέεται με δυσμενή πρόγνωση. Παράλληλα, μεταλλάξεις της ομάδας II έχουν αναφερθεί στα γονίδια *NPM1* και *CEBPA* σε ποσοστό περίπου 27% και 6% των περιπτώσεων αντίστοιχα και παρέχουν καλύτερη πρόγνωση. Αλλαγές σε γονίδια που συμμετέχουν σε επιγενετικές τροποποιήσεις τείνουν να αποτελέσουν μια τρίτη κατηγορία που επηρεάζει την κυτταρική διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό. Για παράδειγμα, μεταλλάξεις στα γονίδια *DNMT3A*, *TET2*, και *IDH1/2*, όλα εκ των οποίων σχετίζονται με μεθυλίωση του DNA, απαντώνται στο 40% των ασθενών με ΟΜΛ (De Kouchkovsky and Abdul-Hay 2016). Μεταλλάξεις στα *TP53*, *IDH1/2*, *DNMT3A*, *TET2* και σε γονίδια που εμπλέκονται στο μάτισμα του RNA έχουν συσχετιστεί περισσότερο με περιπτώσεις *de novo* ΟΜΛ, ενώ μεταλλάξεις στο γονίδιο *PPM1D* με υψηλότερο κίνδυνο για μετάβαση από MDS σε ΟΜΛ (Desai, Hassane, and Roboz 2019).

1.1.3. Μεταγραφικοί παράγοντες στην αιμοποίηση

Οι μεταγραφικοί παράγοντες (Transcription Factors – TFs) είναι ρυθμιστικές πρωτεΐνες που ενεργοποιούν ή καταστέλλουν την μεταγραφή ευκαρυωτικών γονιδίων. Η διαδικασία της αιμοποίησης καθοδηγείται μέσω κυτοκινών, οι οποίες δεσμεύονται σε κατάλληλους υποδοχείς στην επιφάνεια προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων, ή κυττάρων που έχουν αρχίσει ήδη να διαφοροποιούνται, και ενεργοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες–κλειδιά για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και την διαφοροποίηση (Dorritie, McCubrey, and Johnson 2014). Τα δίκτυα μεταγραφικής ρύθμισης που εμπλέκονται στην αιμοποίηση είναι περίπλοκα και φαίνεται να είναι ιδιαίτερα διατηρημένα μεταξύ ανθρώπου και ποντικού (Gao et al. 2020). Επιπλέον, οι μεταγραφικοί παράγοντες που ρυθμίζουν την αιμοποιητική διαδικασία στα διάφορα στάδια ανάπτυξης (εμβρυϊκή και ενήλικη ζωή) είναι διαφορετικοί (Daniel et al. 2020).

Οι TFs δρουν είτε θετικά είτε αρνητικά στην ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την αιμοποίηση. Η έκφραση των γονιδίων αυτών εξαρτάται από τις αλληλεπιδράσεις των μεταγραφικών παραγόντων, τόσο μεταξύ τους όσο και με συν-ρυθμιστικά μόρια, καθώς και από την πρόσδεσή τους σε συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA (Barreda and Belosevic 2001). Μελέτες έχουν δείξει ότι απαιτείται η σωστή ισορροπία μεταξύ μεταγραφικών παραγόντων για να επιτευχθεί με επιτυχία η αιμοποιητική διαδικασία, ενώ οποιαδήποτε αλλαγή της ισορροπίας αυτής μπορεί να οδηγήσει σε ανάπτυξη καρκίνου και λευχαιμίας. Οι μεταγραφικοί παράγοντες φαίνεται να λειτουργούν με ιεραρχική σειρά. Κύτταρα από ασθενείς με ΟΜΛ συχνά χαρακτηρίζονται από μεταλλάξεις σε γονίδια μεταγραφικών παραγόντων, υποδηλώνοντας την εμπλοκή τους στην διαδικασία της λευχαιμογένεσης (Koschmieder et al. 2005).

Μεταξύ των TFs που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της φυσιολογικής αιμοποίησης συγκαταλέγονται και μέλη της οικογένειας STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription). Τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* πειράματα αποδεικνύουν ότι διάφορες επιδράσεις κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων κατά την αιμοποιητική διαδικασία πραγματοποιούνται μέσω μονοπατιών που συμμετέχουν οι παράγοντες STATs. Επιπροσθέτως, σε πολλές αιματολογικές ασθένειες, αλλά και σε συμπαγείς όγκους, έχει παρατηρηθεί συνεχής ενεργοποίηση των μελών της οικογένειας αυτής (Dorritie, McCubrey, and Johnson 2014).

Η κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν την φυσιολογική και παθολογική αιμοποιητική διαδικασία είναι σημαντική προκειμένου να αναπτυχθούν νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ισορροπία μεταξύ των επιπέδων των μεταγραφικών παραγόντων και ο έλεγχος των γονιδίων στόχων τους (Koschmieder et al. 2005). Η δράση των μεταγραφικών παραγόντων μπορεί να είναι συνεργιστική ή ανταγωνιστική. Ενδεικτικά κάποιοι μεταγραφικοί παράγοντες και ο ρόλος τους στην αιμοποίηση παρουσιάζονται στον Πίνακα 1 (Barreda and Belosevic 2001).

Μεταγραφικός παράγοντας	Ρόλος στην αιμοποίηση
PU.1	Ανάπτυξη κυττάρων μυελοειδούς (μακροφάγα, ουδετερόφιλα) και λεμφοειδούς (B- και T- λεμφοκύτταρα) σειράς
C/EBPα	Διαφοροποίηση κοκκιοκυττάρων
C/EBPβ	Ανάπτυξη μακροφάγων και B-λεμφοκυττάρων
C/EBPγ	Ανάπτυξη B-λεμφοκυττάρων και αιμοποίηση στο εμβρυϊκό ήπαρ
C/EBPε	Ρύθμιση τελικού σταδίου διαφοροποίησης ηωσινόφιλων, ουδετερόφιλων και μακροφάγων
HOXA10	Πολλαπλασιασμός αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων και μεγακαρυοκυττάρων
HOXA5	Ρύθμιση διαφοροποίησης κοκκιοκυττάρων/μονοκυττάρων
HOXB4	Πολλαπλασιασμός αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων στο μυελό των οστών
HOXB8	Θετική ρύθμιση στην ανάπτυξη των μακροφάγων / Αρνητική ρύθμιση στην ανάπτυξη κοκκιοκυττάρων
c-Myc	Ρύθμιση πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης προγονικών κυττάρων μυελοειδούς σειράς
AP-1 (Jun/Fos)	Ρύθμιση αποπτωτικών μονοπατιών και ανάπτυξης διαφόρων αιμοποιητικών σειρών, συμπεριλαμβανομένων των μονοκυττάρων / μακροφάγων, κοκκιοκυττάρων, μεγακαρυοκυττάρων, μαστοκυττάρων και κυττάρων της ερυθροειδούς σειράς
GATA	Θετική ρύθμιση στην ανάπτυξη των μεγακαρυοκυττάρων και ερυθροκυττάρων / Αρνητική ρύθμιση στην ανάπτυξη μυελοειδών κυττάρων
STAT1	Διαφοροποίηση μονοπύρηνων φαγοκυττάρων
STAT3	Επαγωγή πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης μέσω σηματοδότησης με IL-6
STAT4	Η έκφραση του STAT4 σχετίζεται με προγονικά κύτταρα της μυελοειδούς σειράς, υπο-εκφράζεται κατά την διαφοροποίηση ερυθροειδών κυττάρων και κοκκιοκυττάρων

Πίνακας 1. Μεταγραφικοί παράγοντες και ο ρόλος τους στην αιμοποιητική διαδικασία (Barreda and Belosevic 2001).

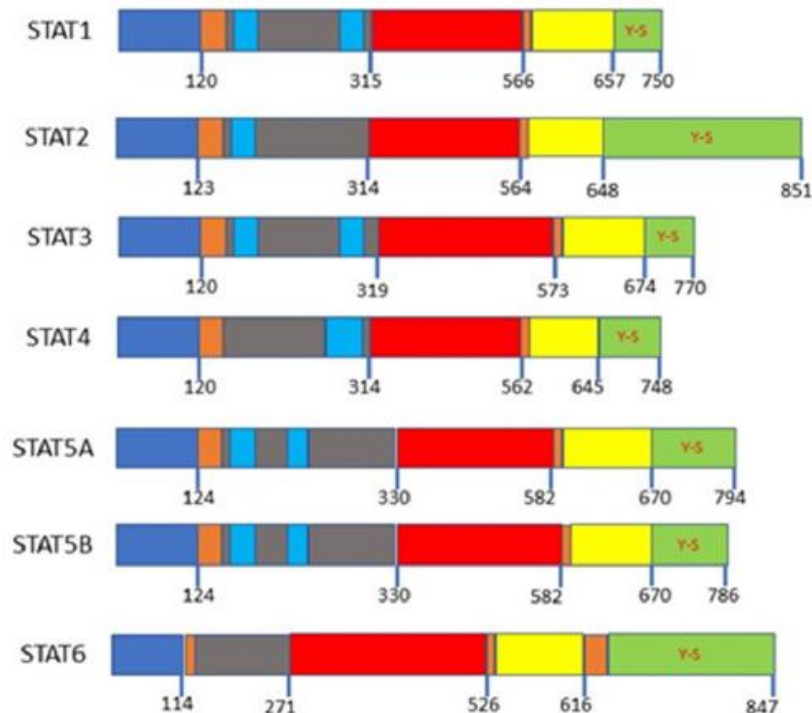
1.2. Η οικογένεια των παραγόντων STATs

1.2.1. Οικογένεια STAT και δομικά χαρακτηριστικά

Η οικογένεια των μεταγωγέων σήματος και ενεργοποιητών της μεταγραφής STAT (Signal transducers and activators of transcription) περιλαμβάνει επτά μέλη, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B και STAT6, τα οποία εμπλέκονται τόσο σε φυσιολογικές κυτταρικές λειτουργίες, όσο και σε σχετιζόμενες με στρες αποκρίσεις και παθολογικές καταστάσεις, όπως ο καρκίνος. Οι παράγοντες STAT αναγνωρίστηκαν ως διακριτή οικογένεια πρωτεϊνών που διαθέτουν την ικανότητα να προσδένονται στο DNA (DNA-binding proteins) το 1994 και παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω του μηχανισμού μέσω του οποίου ενεργοποιούνται, καθώς και της πληθώρας των βιολογικών τους ρόλων, αφού φαίνεται να εμπλέκονται σε διεργασίες όπως η αντι-ικκή απόκριση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η απόπτωση κ.ά. Τα πρώτα μέλη της οικογένειας αναγνωρίστηκαν ως προσδενόμενες στο DNA πρωτεΐνες, που ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων έπειτα από σηματοδότηση με ιντερφερόνη (Interferon – IFN). Πιο συγκεκριμένα, ως απόκριση σηματοδότησης με IFN α /IFN β , σχηματίζεται ένα σύμπλοκο αποτελούμενο από STAT1, STAT2, και την πρωτεΐνη p48, που προσδένεται επίσης στο DNA. Το σύμπλοκο αυτό προσδένεται σε μια αλληλουχία DNA, την ISRE (IFN-Stimulated Response Element) και ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων. Αντίθετα, σηματοδότηση με IFN γ οδηγεί σε σχηματισμό ενός διμερούς STAT1 που προσδένεται στην αλληλουχία GAS (IFN γ -Activated Sequence) του DNA. Ο σχηματισμός των προαναφερόμενων συμπλόκων προϋποθέτει την φωσφορυλίωση ενός καταλοίπου τυροσίνης του STAT2 και του STAT1 ή μόνο του STAT1 αντίστοιχα. Την κλωνοποίηση των γονιδίων *Stat1* και *Stat2*, ακολούθησε η διαπίστωση ότι οι παράγοντες STAT ενεργοποιούνται από διάφορες κυτοκίνες, καθώς και η ταυτοποίηση άλλων πέντε μελών της οικογένειας στα κύτταρα θηλαστικών (Ihle 1996).

Τα γονίδια STAT εντοπίζονται σε τρεις διαφορετικές χρωμοσωμικές περιοχές. Στον άνθρωπο τα γονίδια *STAT1* και *STAT4* βρίσκονται στο χρωμόσωμα 2, τα *STAT2* και *STAT6* στο χρωμόσωμα 12, ενώ τα *STAT3*, *STAT5A* και *STAT5B* στο χρωμόσωμα 17. Οι αντίστοιχες θέσεις στον ποντικό είναι τα χρωμοσώματα 1, 10 και 11 (Brierley and Fish 2005). Παρά το γεγονός ότι τα *STAT5A* και *STAT5B* παρουσιάζουν περίπου 90% ομολογία κωδικοποιούνται από δύο ξεχωριστά γονίδια. Ως προς την ομαδοποίηση των γονιδίων STAT στις χρωμοσωμικές θέσεις, η ομοιότητα που παρατηρείται ανάμεσα στον ποντικό και στον άνθρωπο υποστηρίζει την ύπαρξη ενός αρχικού προγονικού γονιδίου το οποίο διπλασιάστηκε σε διαδοχικά βήματα. Το γεγονός ότι οι STAT2 και STAT6 είναι οι δύο μεγαλύτερες σε μήκος μορφές μεταξύ των STATs και συν-εντοπίζονται στο ίδιο χρωμόσωμα ενισχύει περισσότερο την υπόθεση αυτή (Leonard and O'Shea 1998).

Το μήκος των STATs κυμαίνεται μεταξύ 748 και 851 αμινοξικών καταλοίπων (90 - 115 kDa), με τους STAT2 και STAT6 να παρουσιάζουν το μεγαλύτερο μήκος, 851 και 847 αμινοξικά κατάλοιπα αντίστοιχα (Εικόνα 3) (Loh et al. 2019).



Εικόνα 3. Τα επτά μέλη της οικογένειας STAT με το αντίστοιχο μήκος τους.

Με σκούρο μπλε απεικονίζεται το αμινοτελικό άκρο, με ανοιχτό μπλε το coiled-coil domain, με κόκκινο το DNA binding domain, με κίτρινο το SH2 domain και με πράσινο το καρβοξυτελικό άκρο (Loh et al. 2019).

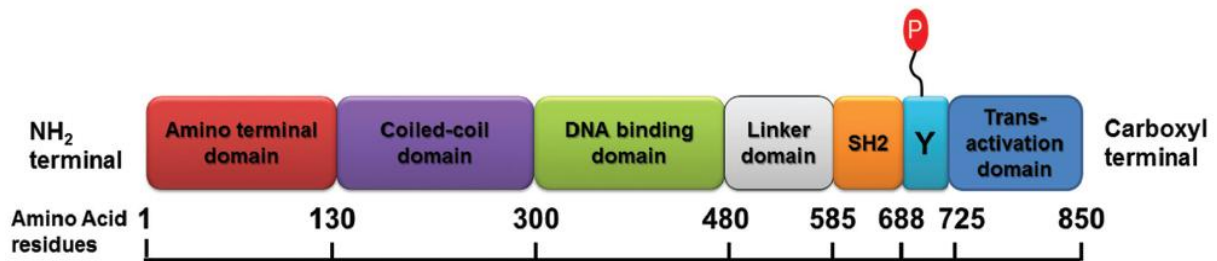
Οι παράγοντες STAT, μετά από κατάλληλη σηματοδότηση, φωσφορυλιώνονται, διμερίζονται και μεταφέρονται στον πυρήνα, όπου και ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων στόχων (Leonard and O'Shea 1998).

Κάθε μία από αυτές τις λειτουργίες πραγματοποιείται από μια διαφορετική περιοχή του παράγοντα. Όλα τα μέλη της οικογένειας μοιράζονται μια συντηρημένη δομή που αποτελείται από 6 διακριτές λειτουργικές περιοχές (domains) (Εικόνα 4) (Kishore and Verma 2012, Brierley and Fish 2005):

- i. **Η περιοχή του αμινοτελικού άκρου (Amino Terminal Domain).** Εκτείνεται από το αμινοξικό κατάλοιπο 1 μέχρι περίπου το 130 και σταθεροποιεί τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ διμερών STAT προς σχηματισμό τετραμερών στα στοιχεία GAS (IFN-Activation Site) και ISGF3 (ISG Factor 3) του DNA. Αυτή η περιοχή είναι καλά συντηρημένη μεταξύ των μελών της οικογένειας και φαίνεται να συμβάλλει στην πρόσδεση των STATs στο DNA, καθώς και να ρυθμίζει την μεταφορά τους στον πυρήνα.
- ii. **Η περιοχή υπερέλικας α-ελίκων (Coiled-Coil Domain).** Αποτελείται από τέσσερις α-έλικες, εκτείνεται περίπου από το αμινοξικό κατάλοιπο 130 μέχρι

το 300 και είναι σημαντική για αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες, όπως ο ρυθμιστικός παράγοντας ιντερφερόνης 9 (IRF-9) και ο μεταγραφικός παράγοντας c-Jun.

- iii. **Η περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DNA Binding Domain).** Περιλαμβάνει αρκετά συντηρημένα κατάλοιπα μεταξύ όλων των μελών της οικογένειας STAT, κάποια από αυτά μάλιστα έρχονται σε άμεση επαφή με το μόριο του DNA και εκτείνεται περίπου μεταξύ των καταλοίπων 300 με 480.
- iv. **Η περιοχή σύνδεσης (Linker Domain).** Εκτείνεται περίπου μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων 480 και 580 και διαχωρίζει την περιοχή πρόσδεσης στο DNA και την περιοχή SH2 . Αποτελείται κυρίως από α-έλικες και φαίνεται να εμπλέκεται στην μεταγραφή.
- v. **Η περιοχή πρόσδεσης σε φωσφορυλιωμένη τυροσίνη (SH2 Domain).** Η περιοχή SH2 (Src Homology 2), που εντοπίζεται περίπου μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων 600 και 700, είναι απαραίτητη για την πρόσδεση των STATs στους υποδοχείς και για την δημιουργία των διμερών. Μέσα στην περιοχή υπάρχει ένα συντηρημένο κατάλοιπο τυροσίνης, το οποίο όταν φωσφορυλιωθεί ενεργοποιεί ένα μόριο STAT οδηγώντας το σε αλληλεπίδραση με την αντίστοιχη περιοχή ενός άλλου μορίου STAT.
- vi. **Η περιοχή ενεργοποίησης μεταγραφής (Transcriptional Activation Domain - TAD).** Εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο. Παρά το γεγονός ότι η TAD είναι συντηρημένη μεταξύ των ομόλογων πρωτεϊνών του ανθρώπου και του ποντικού, το καρβοξυτελικό άκρο διαφέρει πολύ τόσο σε μήκος όσο και σε αλληλουχία μεταξύ των μελών STAT (Εικόνα 3). Μέσω της TAD οι παράγοντες STAT αλληλεπιδρούν με συν-ενεργοποιητές στον πυρήνα ή με ακετυλοτρανσφεράσες ιστονών (Histone Acetyltransferases - HATs), διευκολύνοντας τροποποιήσεις της χρωματίνης και ενεργοποίηση της μεταγραφής. Διάφορες τροποποιήσεις μπορούν να πραγματοποιηθούν σε αμινοξικά κατάλοιπα που ανήκουν στην συγκεκριμένη περιοχή με διαφορετικά αποτελέσματα. Για παράδειγμα, φωσφορυλίωση μιας σερίνης είναι σημαντική για την πλήρη ενεργοποίηση των STATs προς μεταγραφική ρύθμιση ενώ η σουμοϋλίωση ενός καταλοίπου λυσίνης (K703) του STAT1 επιδρά αρνητικά στην δράση του.



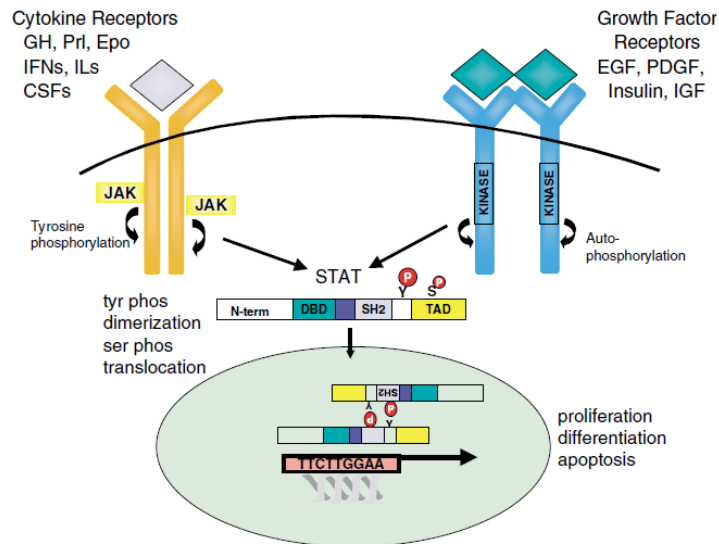
Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση των λειτουργικών περιοχών (domains) των παραγόντων STAT.

SH2: Src Homology Domain 2, Y: κατάλοιπο τυροσίνης με δυνατότητα φωσφορυλίωσης (Kishore and Verma 2012).

1.2.2. Ενεργοποίηση των STATs

Οι παράγοντες STAT συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία ενεργοποιούνται από κυτταροκίνες, αυξητικούς παράγοντες ή ορμόνες. Ακολούθως της σηματοδότησης, οι STATs φωσφορυλιώνονται από πρωτεϊνικές κινάσες, μεταξύ των οποίων οι πιο διαδεδομένες είναι μέλη της οικογένειας των κινασών JAK (Jak1, Jak2, Jak3, Tyk2) (Valentino and Pierre 2006). Το μονοπάτι JAK-STAT εμπλέκεται σε πλήθος φυσιολογικών διεργασιών, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κυτταρική διαφοροποίηση, η ανοσολογική απόκριση, η αιμοποίηση και η διατήρηση των βλαστικών κυττάρων (Katsantoni 2012, Dorritie, McCubrey, and Johnson 2014). Κυτταροκίνες και αυξητικοί παράγοντες, όπως οι ιντερλευκίνες, η ερυθροποιητίνη (EPO) και η θρομβοποιητίνη (TPO) ενεργοποιούν το μονοπάτι JAK-STAT, γεγονός που υποδεικνύει την συμμετοχή του τόσο στην φυσιολογική, όσο και στην αναποτελεσματική αιμοποίηση (Dorritie, McCubrey, and Johnson 2014).

Η πρόσδεση μιας κυτοκίνης στον επιφανειακό υποδοχέα της οδηγεί σε ενεργοποίηση των κινασών JAK, οι οποίες φωσφορυλιώνουν το κυτταροπλασματικό τμήμα του υποδοχέα, δημιουργώντας θέση πρόσδεσης για τους παράγοντες STAT, μέσω της επικράτειας SH2. Έπειτα, οι STATs φωσφορυλιώνονται σε ένα κατάλοιπο τυροσίνης στο καρβοξυτελικό άκρο τους, διμερίζονται και μετακινούνται στον πυρήνα προκειμένου να ρυθμίσουν την μεταγραφή συγκεκριμένων ομάδων γονιδίων, ανάλογα με τον τύπο και την κατάσταση του κυττάρου (Εικόνα 5) (Murray 2007, Valentino and Pierre 2006).



Εικόνα 5. Σηματοδότηση μέσω STAT.

Οι STATs ενεργοποιούνται από υποδοχείς κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων. Στην περίπτωση των υποδοχέων που δεν διαθέτουν και λειτουργία κινάσης, οι κινάσες JAK στρατολογούνται για την φωσφορυλίωση του υποδοχέα. Στην συνέχεια, οι STATs προσδένονται στον φωσφορυλιωμένο υποδοχέα και φωσφορυλιώνονται με την σειρά τους σε ένα κατάλοιπο τυροσίνης ή σερίνης στο καρβοξυτελικό τους άκρο. Οι υποδοχείς αυξητικών παραγόντων φωσφορυλιώνουν άμεσα τους παράγοντες STAT (χωρίς την διαμεσολάβηση των κινάσων JAK). Οι φωσφορυλιωμένοι σε κατάλοιπο τυροσίνης STATs διμερίζονται και μετακινούνται στον πυρήνα, όπου ρυθμίζουν την μεταγραφή γονιδίων στόχων. STATs, Signal Transducers and Activators of Transcription; JAKs, Janus Kinases; GH, Growth Hormone (αυξητική ορμόνη); Prl, Prolactin (προλακτίνη); EPO, Erythropoietin (ερυθροποιητίνη); IFNs, Interferons (ιντερφερόνες); ILs, Interleukins (ιντερλευκίνες); CSFs, Colony Stimulating Factors (παράγοντες διέγερσης αποικιών); EGF, Epidermal Growth Factor (επιδερμικός αυξητικός παράγοντας); PDGF, Platelet-Derived Growth Factor (αυξητικός παράγοντας προερχόμενος από αιμοπετάλια); IGF, Insulin-like Growth Factor (αυξητικός παράγοντας ομοιάζων στην ινσουλίνη); DBD, DNA-Binding Domain; TAD, Transactivation Domain (Silva 2004).

Όλοι οι παράγοντες STAT έχουν την δυνατότητα να σχηματίζουν ομοδιμερή. Επιπλέον, έχουν παρατηρηθεί και ετεροδιμερή, STAT1:STAT3, STAT5A:STAT5B και STAT2:STAT1. Όσον αφορά τους STAT1 και STAT2 έπειτα από σηματοδότηση μέσω ιντερφερόνης τύπου I, μαζί με τον ρυθμιστικό παράγοντα 9 της ιντερφερόνης (Interferon Regulatory Factor 9 - IRF9) δημιουργούν ένα τριμερές σύμπλοκο, γνωστό ως ISGF3 (Interferon-Stimulated Gene Factor 3) (Ivashkin and Hu 2004, Brierley and Fish 2005, Stark, Cheon, and Wang 2018). Τα διμερή των STATs αναγνωρίζουν και δεσμεύονται σε παλίνδρομες αλληλουχίες DNA, μήκους 8-10 ζευγών βάσεων, που περιέχουν την αλληλουχία TTN₄₋₆AA (γνωστή και ως GAS motif). Η συγγένεια της δέσμευσης του κάθε διμερούς εξαρτάται από την ακριβή αλληλουχία. Πιο συγκεκριμένα, για τους STAT1, 3, 4, και 5 η αλληλουχία είναι 5' TTCCNGGAA3', ενώ για τον STAT6 είναι 5'TTCCNNGGAA3' (Brierley and Fish 2005, Stark, Cheon, and Wang 2018).

Μέχρι στιγμής έχουν περιγραφεί ~36 υποδοχείς κυτοκινών που αποκρίνονται στην σηματοδότηση ~38 κυτοκινών. Τα κύτταρα και οι ιστοί, ανάλογα με τον τύπο τους, εκφράζουν διακριτούς συνδυασμούς υποδοχέων και δέχονται σήματα από διαφορετικές κυτταροκίνες που παράγονται σε εξάρτηση με το μικροπεριβάλλον και την απόκριση του οργανισμού σε κάποιο ερέθισμα. Επομένως, το πλήθος συνδυασμών που μπορούν να προκύψουν από τις διαφορετικές κυτοκίνες, τους υποδοχείς, τις τέσσερις κινάσες JAK (Jak1, Jak2, Jak3, Tyk2) και τα επτά μέλη των STAT, επιτρέπουν την ρύθμιση της έκφρασης μοναδικών ομάδων γονιδίων ανά κυτταρικό τύπο και ανά χρονική στιγμή. Για παράδειγμα, κατά την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό αιμοποιητικών κυττάρων ενεργοποιείται σχεδόν αποκλειστικά η κινάση JAK2 (Murray 2007).

Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται συνοπτικά κάποιες κυτοκίνες και ιντερφερόνες που ενεργοποιούν το μονοπάτι JAK-STAT. Οι συνδυασμοί του πίνακα είναι οι βασικότεροι, αλλά στην πραγματικότητα το επίπεδο πολυπλοκότητας είναι μεγαλύτερο και ένας μόνο υποδοχέας μπορεί να ενεργοποιεί περισσότερους από έναν παράγοντες STAT (Stark, Cheon, and Wang 2018).

STATs	JAKs	Κύριες κυτοκίνες
STAT1	JAK1, JAK2, TYK2	Type I, II, and III IFNs
STAT2	JAK1, TYK2	Type I and III IFNs
STAT3	JAK1, JAK2, JAK3, TYK2	IL-6, IL-10, IL-27, IL-21
STAT4	JAK2, TYK2	IL-12, IL-23
STAT5A/B	JAK1, JAK2, JAK3	IL-2, IL-7, IL-9, IL-15, EPO, TPO, GM-CSF, GH, PRL
STAT6	JAK1, JAK2, TYK2	IL-4, IL-13

Πίνακας 2. Σύνοψη κύριων κυτοκινών και ιντερφερονών που ενεργοποιούν τις κινάσες JAK και τους παράγοντες STAT.

Διαφορετικοί συνδυασμοί οδηγούν σε μεταγραφική ρύθμιση διαφορετικών ομάδων γονιδίων στόχων. STATs, Signal Transducers and Activators of Transcription; JAKs, Janus Kinases; IFN, Interferon (ιντερφερόνη); IL, Interleukin (ιντερλευκίνη); EPO, Erythropoietin (ερυθροποιητίνη); TPO, Thrombopoietin (θρομβοποιητίνη); GM-CSF, Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (παράγοντας διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων – μακροφάγων); GH, Growth Hormone (αυξητική ορμόνη); PRL, Prolactin (προλακτίνη) (Stark, Cheon, and Wang 2018).

Εκτός από τις κινάσες JAK, η ενεργοποίηση των παραγόντων STAT μπορεί να πραγματοποιηθεί και από τα μέλη της οικογένειας κινάσων Src (Src Family of Kinases - SFKs), και πιο συγκεκριμένα από την κινάση c-Src. Ο κυτταρικός τύπος και η κυτοκίνη ή ο αυξητικός παράγοντας που ξεκινά την σηματοδότηση φαίνεται να καθορίζουν ποιο μονοπάτι θα ενεργοποιηθεί (Rane and Reddy 2002). Οι δράσεις των STATs που ενεργοποιούνται από την κινάση c-Src έχει φανεί να είναι

διαφορετικές συγκριτικά με αυτές όταν η ενεργοποίηση πραγματοποιείται από τις κινάσες JAK (Silva 2004).

Σημειακές μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν κινάσες JAK έχουν συσχετιστεί με πολλές ασθένειες, συμπεριλαμβανομένων των λευχαιμιών και των μυελοϋπερπλαστικών νεοπλασμάτων (Katsantoni 2012). Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *JAK2* συγκαταλέγονται ανάμεσα στις πιο συχνές μεταλλάξεις στα κύτταρα του αίματος κατά την γήρανση. Η πιο συνηθισμένη μετάλλαξη, η *JAK2-V617F*, οδηγεί σε συνεχή ενεργοποίηση της κινάσης και κατ' επέκταση των STATs. Το μονοπάτι JAK-STAT μπορεί να ενεργοποιηθεί παθολογικά, είτε μέσω συνεχούς σύνδεσης ενός προσδέτη στον υποδοχέα (π.χ. σε περιπτώσεις χρόνιας φλεγμονής), είτε μέσω αυξημένης ενεργότητας μεταλλαγμένων κινασών JAK (Perner et al. 2019). Η ενεργοποίηση των STATs ρυθμίζεται τόσο θετικά όσο και αρνητικά και πολλοί μηχανισμοί αυτορρύθμισης, αλλά και ρύθμισης μέσω άλλων μονοπατιών έχουν περιγραφεί (Ivashkin and Hu 2004). Τα μόρια που συμμετέχουν στο μονοπάτι JAK-STAT ελέγχουν και ελέγχονται από άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως το ERK-MAPK και το PI3K (Katsantoni 2012). Η ρύθμιση των STATs περιγράφεται ακολούθως.

1.2.3. Ρύθμιση των STATs

Πολλοί μηχανισμοί που ρυθμίζουν την δράση των STATs έχουν περιγραφεί και δρουν σε διαφορετικά σημεία του μονοπατιού ενεργοποίησής τους, στοχεύοντας τους υποδοχείς, τις κινάσες JAK ή άμεσα τους παράγοντες STAT. Στους μηχανισμούς αυτούς συγκαταλέγονται η πρωτεόλυση, οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, η αποφωσφορυλίωση και η δράση των μορίων - αναστολέων. Επίσης, η δράση των STATs τροποποιείται και από την ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με συν-ενεργοποιητές της μεταγραφής, όπως οι ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών (Histone acetyltransferases – HATs), που τροποποιούν την χρωματίνη ή που με την σειρά τους αλληλεπιδρούν με μόρια της «βασικής μεταγραφικής μηχανής» (Brierley and Fish 2005, Ivashkin and Hu 2004, Stark, Cheon, and Wang 2018).

Τρεις κύριες ομάδες μορίων-αναστολέων έχουν περιγραφεί. Η πρώτη ομάδα είναι οι φωσφατάσες τυροσίνης, όπως η SHP-1 (SH2-containing Phosphatase - 1) και η CD45, μια διαμεμβρανική φωσφατάση τυροσίνης που εκφράζεται σε αιμοποιητικά κύτταρα και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στα T- και B-λεμφοκύτταρα. Η αποφωσφορυλίωση των STATs είναι απαραίτητη για την αποδέσμευσή τους από το DNA, την έξοδο από τον πυρήνα και την επιστροφή στο κυτταρόπλασμα. Η δεύτερη ομάδα είναι οι αναστολείς των ενεργοποιημένων STATs (Protein Inhibitors of Activated STATs - PIAS). Η οικογένεια των PIAS αποτελείται από τα PIAS1, PIAS3, PIASx και PIASy. Τα PIAS1 και PIAS3 αναστέλλουν τους STAT1 και STAT3 αντίστοιχα, ενώ τα PIASx και PIASy τους STAT1 και STAT4. Η τρίτη ομάδα αναστολέων συνίσταται από τους καταστολείς σηματοδότησης κυτοκινών (Suppressors Of Cytokine Signaling

- SOCS). Οι πρωτεΐνες SOCS (κυρίως οι SOCS 1 και 3) συμβάλλουν στην αρνητική ρύθμιση του μονοπατιού JAK-STAT, είτε μέσω άμεσης πρόσδεσης στις JAK κινάσες, είτε μέσω ανταγωνισμού των STATs για τις θέσεις δέσμευσης στους υποδοχείς (Valentino and Pierre 2006, Kishore and Verma 2012).

Οι παράγοντες STAT αποτελούν υπόστρωμα φωσφορυλίωσης, μεθυλίωσης και άλλων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που ρυθμίζουν τόσο θετικά, όσο και αρνητικά τη δράση τους. Η πιο συχνή και απαραίτητη για τον διμερισμό και επομένως την ενεργοποίηση των STATs τροποποίηση, όπως προαναφέρθηκε, είναι η φωσφορυλίωση ενός καταλοίπου τυροσίνης στο καρβοξυτελικό άκρο. Εκτός από τον διμερισμό, η φωσφορυλίωση pY705 αλλάζει και την διάρκεια πρόσδεσης των STATs στο DNA. Πέρα όμως από την φωσφορυλίωση τυροσίνης έχουν βρεθεί πολλά κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης στους παράγοντες STAT που τροποποιούνται. Το κατάλοιπο σερίνης που φωσφορυλιώνεται και έχει μελετηθεί περισσότερο είναι η σερίνη S727 των STAT1 και STAT3. Η τροποποίηση αυτή αποτελεί απάντηση σε σηματοδότηση από ιντερφερόνες και IL-6 και είναι απαραίτητη για την πλήρη ενεργοποίηση αυτών των παραγόντων. Αντίθετα, η φωσφορυλίωση των σερινών S725 και S779 του STAT5A καθώς και της S730 του STAT5B, έπειτα από σηματοδότηση κυττάρων των μαστικών αδένων με προλακτίνη, οδηγεί σε αρνητική ρύθμιση. Επιπλέον, τα κατάλοιπα λυσίνης μπορούν να ακετυλιωθούν ή να μεθυλιωθούν με προσθήκη μίας έως τριών μεθυλο-ομάδων. Μεθυλίωση μπορεί να πραγματοποιηθεί και σε κατάλοιπα αργινίνης. Αυτές οι τροποποιήσεις είναι αναστρέψιμες και ελέγχουν την λειτουργία των παραγόντων. Αρκετά κατάλοιπα λυσίνης και αργινίνης των STAT1 και STAT3 μεθυλιώνονται και ακετυλιώνονται. Τέλος, μια ακόμα μετα-μεταφραστική τροποποίηση είναι η γλυκοζυλίωση. Για παράδειγμα, η λειτουργία του STAT5A φαίνεται να αλλάζει μέσω γλυκοζυλίωσης του καταλοίπου θρεονίνης T92 (Stark, Cheon, and Wang 2018, Brierley and Fish 2005).

Πριν από την ενεργοποίηση, οι παράγοντες STATs διαθέτουν την ικανότητα να σχηματίζουν μη φωσφορυλιωμένα διμερή μέσω αλληλεπίδρασης των επικρατειών υπερελίκων α-ελίκων (coiled-coil domains). Οι λειτουργίες, μεταξύ άλλων, των μη φωσφορυλιωμένων σε κατάλοιπο τυροσίνης STATs είναι η ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων, η επίδραση στα μιτοχόνδρια (κυρίως του φωσφορυλιωμένου σε σερίνη STAT3) και η τροποποίηση της τοπολογίας της χρωματίνης (όπως στην περίπτωση του STAT5A) (Brierley and Fish 2005, Wingelhofer et al. 2018). Οι μη φωσφορυλιωμένοι παράγοντες STAT (Unphosphorylated STATs - U-STATs) ρυθμίζουν την μεταγραφή διαφορετικών γονιδίων συγκριτικά με τα φωσφορυλιωμένα ανάλογά τους. Πολλά γονίδια στόχοι των U-STATs 1, 2, 3, και 6 κωδικοποιούν πρωτεΐνες που προάγουν την κυτταρική επιβίωση, προτείνοντας ότι οι U-STATs συμβάλλουν στην επιβίωση του κυττάρου υπό συνθήκες στρες (Stark, Cheon, and Wang 2018).

1.2.4. Ρόλος των STATs σε φυσιολογική και παθολογική κατάσταση

Οι παράγοντες STAT εμπλέκονται σε φυσιολογικές κυτταρικές διεργασίες, όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η απόπτωση, στην έμφυτη και την επίκτητη ανοσία, σε αποκρίσεις σχετιζόμενες με το στρες καθώς και σε ασθένειες. Το μονοπάτι JAK - STAT συμμετέχει στις αποκρίσεις του κυττάρου απέναντι σε διάφορες πηγές που προκαλούν στρες, συμπεριλαμβανομένης της υποξίας, των ενδοτοξινών και της υπερϊώδους ακτινοβολίας. Οι STATs που έχουν ενεργοποιηθεί υπό στρες μπορούν να επάγουν είτε την κυτταρική επιβίωση, είτε τον κυτταρικό θάνατο (Katsantoni 2012). Και τα επτά μέλη της οικογένειας έχει αναφερθεί ότι εκφράζονται στους ιστούς της καρδιάς και σε κυτταροκαλλιέργειες καρδιακών μυοκυττάρων, ινοβλαστών και ενδοθηλιακών κυττάρων. Στην καρδιά, ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται σε φλεγμονή, κυτταρική σηματοδότηση, απόπτωση, αγγειογένεση και συγκρότηση της εξωκυττάριας μήτρας (Kishore and Verma 2012).

Μελέτες σε ποντίκια από τα οποία έχει αφαιρεθεί (knockout) κάθε φορά ένα από τα γονίδια των STATs αποκαλύπτουν τον ρόλο τους. Από τα πειράματα αυτά, προκύπτουν τα ακόλουθα. Ο παράγοντας STAT1 συμμετέχει στην αντι-ικκή απόκριση, καθώς και σε άλλες ανοσολογικές και φλεγμονώδεις αντιδράσεις που σηματοδοτούνται από ιντερφερόνες. Ο περιορισμός της φλεγμονής, και η καταστολή αυτοάνοσων διαταραχών είναι κάποιες άλλες δράσεις του STAT1, ο οποίος σε ζωϊκό μοντέλο φαίνεται να έχει προστατευτικό ρόλο στην ρευματοειδή αρθρίτιδα. Εκτός από την συμμετοχή του στο ανοσοποιητικό σύστημα, ο STAT1 ρυθμίζει τον σχηματισμό των οστών, ενώ καταστέλλει και την ανάπτυξη όγκων, παρουσιάζοντας αντικαρκινικές ιδιότητες. Ο STAT2 φαίνεται να ενεργοποιείται μόνο ως απόκριση σε ιική μόλυνση. Επίσης, ποντίκια με αφαίρεση (knockout) του STAT4 αντιμετωπίζουν διαταραχές στην διαφοροποίηση των βοηθητικών κυττάρων Th1 και στις ανοσολογικές αποκρίσεις που διαμεσολαβούνται από κύτταρα. Τέλος, τα γονίδια στόχοι του STAT6 κωδικοποιούν την βαριά αλυσίδα ε της ανοσοσφαιρίνης, πρωτεΐνες του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας II (Major Histocompatibility Complex - MHC class II) και τον μεταγραφικό παράγοντα GATA-3. Τα ποντίκια από τα οποία έχει αφαιρεθεί (knockout) το γονίδιο του STAT6 παρουσιάζουν δυσλειτουργία και μειωμένη διαφοροποίηση των βοηθητικών κυττάρων Th2, καθώς και μειωμένη παραγωγή IgE (Ivashkin and Hu 2004). Όσον αφορά τους παράγοντες STAT3 και STAT5, η ενεργοποίησή τους είναι κριτικής σημασίας για τον σχηματισμό και την λειτουργία των φυσικών φονικών κυττάρων, όπως και των T- και B-λεμφοκυττάρων. Οι πολυάριθμες δράσεις των STAT3 και STAT5 παρουσιάζονται αναλυτικά στις επόμενες ενότητες.

Σε περιπτώσεις καρκίνου οι παράγοντες STAT παρουσιάζουν συνεχή ενεργότητα είτε λόγω αυξημένης ενεργοποίησης κάποιας κινάσης ανοδικά του μονοπατιού ή/και λόγω απώλειας αρνητικής ρύθμισης (Walker, Xiang, and Frank 2014). Η ενεργοποίηση των STATs στον καρκίνο σταματά την διαφοροποίηση των κυττάρων και τα οδηγεί σε αυξημένη επιβίωση και πολλαπλασιασμό. Παραδείγματα

γονιδίων που ενεργοποιούνται σε αυτές τις περιπτώσεις είναι τα γονίδια της κυκλίνης D1, της πρωτεΐνης Bcl-xL (B-cell Lymphoma - Extra Large) και της p53 (Silva 2004). Αυξημένη ενεργοποίηση των STAT3 και STAT5 επάγει χρόνια φλεγμονή, η οποία αυξάνει την πιθανότητα καρκινογένεσης (Loh et al. 2019). Πολλές μορφές καρκίνων, συμπεριλαμβανομένων και των αιματολογικών κακοηθειών, έχουν συσχετιστεί με τα μέλη της οικογένειας. Το πολλαπλό μύελωμα, η λευχαιμία και τα λεμφώματα αποτελούν μερικά παραδείγματα (Vainchenker and Constantinescu 2013). Κατηγορίες συμπαγών κακοηθειών που επηρεάζονται από τους STATs συμπεριλαμβάνουν αυτές του προστάτη, παγκρέατος, πνεύμονα, νεφρών και μαστού (Silva 2004).

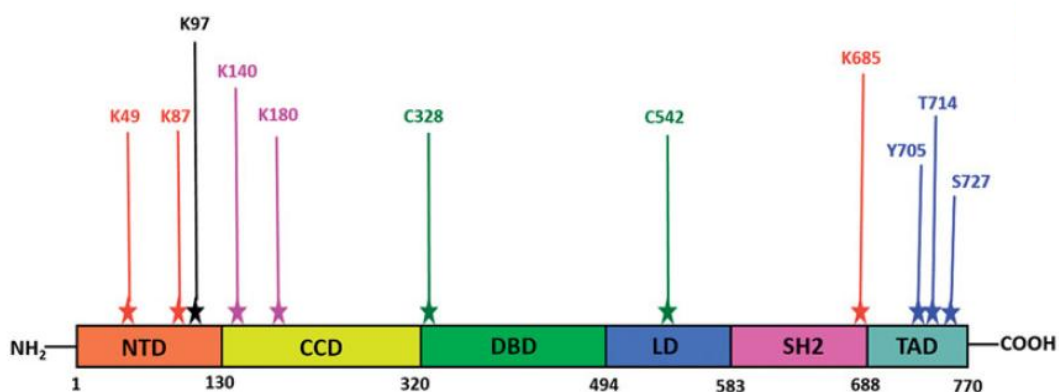
Συνεχής ενεργοποίηση των STAT3, STAT5A και STAT5B έχει καταγραφεί τόσο σε χρόνιες όσο και σε οξείες μορφές λευχαιμίας, μυελογενούς και λεμφοκυτταρικής, και έχει συσχετιστεί με κακή πρόγνωση (Silva 2004). Όσον αφορά τις λευχαιμίες, ο STAT5 εμπλέκεται στην παθογένεση της προ-B οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας και στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία, ενώ συνεχής ενεργοποίηση του STAT3 έχει περιγραφεί σε ασθενείς με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία. Στην OML παρατηρείται επίσης συνεχής ενεργοποίηση των STAT3 και STAT5. Μελέτη ασθενών με OML έδειξε συνεχή ενεργοποίηση του STAT5 στο 80% και του STAT3 στο 74% των περιπτώσεων (Dorritie, McCubrey, and Johnson 2014). Στην OML έχει προταθεί ότι οι κινάσες Src φωσφορυλιώνουν τους παράγοντες STAT και ότι τα γονίδια στόχοι των συνεχώς ενεργοποιημένων STATs είναι διαφορετικά από αυτά των φυσιολογικά ενεργοποιημένων STATs (Vainchenker and Constantinescu 2013).

Λόγω της συμμετοχής τους σε πληθώρα μηχανισμών που οδηγούν σε παθολογικές καταστάσεις, οι παράγοντες της οικογένειας STAT αποτελούν θεραπευτικούς στόχους μεγάλου ενδιαφέροντος. Μέχρι στιγμής υπάρχουν πολλοί λίγοι άμεσοι αναστολείς με υψηλή ειδικότητα. Παράγοντες που έχουν χαρακτηριστεί ως αναστολείς του STAT3 επηρεάζουν την δράση κινασών που ενεργοποιούν τον STAT3, όπως για παράδειγμα τις κινάσες JAK. Φυσικές χημικές ενώσεις, συμπεριλαμβανομένων των κουρκουμίνης, ιντιρουβίνης και καψαϊκίνης, ενώ φαίνονται υποσχόμενες για την θεραπεία λευχαιμιών, δεν είναι ειδικές και μπορεί να επιφέρουν και ανεπιθύμητες παρενέργειες απενεργοποιώντας και άλλα μονοπάτια. Για απευθείας στόχευση των STATs έχουν χρησιμοποιηθεί αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτιδία (antisense oligonucleotides) και μικρά παρεμβαλλόμενα μόρια RNA (Small Interfering RNAs - siRNAs). Τέλος, μια εναλλακτική μέθοδος για ειδική αναστολή των ενεργοποιημένων STATs είναι τα δίκλινα ολιγονουκλεοτιδία που μιμούνται τις αλληλουχίες πρόσδεσης των STATs στο DNA (decoy oligonucleotides), με αποτέλεσμα να τους ανταγωνίζονται (Dorritie, McCubrey, and Johnson 2014). Οι STATs εκτός από θεραπευτικοί στόχοι, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως δείκτες πρόγνωσης του σταδίου της ασθένειας, πρόβλεψης της εξέλιξης της και απόκρισης στην θεραπεία, αφού παρέχουν πληροφορίες για την βιολογική κατάσταση των κυττάρων (Katsantoni 2012).

1.2.5. Ο παράγοντας STAT3

Ο παράγοντας STAT3 χαρακτηρίστηκε πρώτη φορά το 1994, ως μόριο προσδεδεμένο στο DNA έπειτα από σηματοδότηση με ιντερλευκίνη 6 (IL-6) και με τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (epidermal growth factor - EGF) στα ηπατοκύτταρα (Qin et al. 2019, Levy and Lee 2002). Εκτός από την IL-6 και τον EGF, ο STAT3 ενεργοποιείται από τις ιντερλευκίνες 3, 5 και 10 (IL-3, IL-5, IL-10), τις ιντερφερόνες α/β (IFN- α/β), τον αυξητικό παράγοντα των ινοβλαστών (Fibroblast Growth Factor - FGF), τον ομοιάζων στην ινσουλίνη αυξητικό παράγοντα (Insulin-like Growth Factor - IGF), τον παράγοντα διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor - GM-CSF) και τον παράγοντα βλαστικών κυττάρων (Stem Cell Factor – SCF) (Qin et al. 2019, Levy and Lee 2002, Ivashkin and Hu 2004, Dorritie, McCubrey, and Johnson 2014). Στους ιστούς του εγκεφάλου ο STAT3 φαίνεται να ενεργοποιείται από τον ακτινοειδή νευροτροφικό παράγοντα (Ciliary Neurotrophic Factor - CNTF) και την λεπτίνη (Levy and Lee 2002).

Δύο ισομορφές έχουν περιγραφεί, ο STAT3A και ο STAT3B, οι οποίες προκύπτουν με εναλλακτικό μάτισμα και ρυθμίζουν την μεταγραφή διαφορετικών γονιδίων (Loh et al. 2019, Rane and Reddy 2002). Ο STAT3 εκτός από τα κατάλοιπα που φωσφορυλιώνονται, με συχνότερα την τυροσίνη Y705 και την σερίνη S727, διαθέτει και κατάλοιπα που υφίστανται επιπλέον μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, οι οποίες επηρεάζουν την μεταγραφική δράση, τον διμερισμό, την μετακίνηση στον πυρήνα, τον σχηματισμό συμπλόκων με άλλους συν-ενεργοποιητές της μεταγραφής και την αποικοδόμηση του παράγοντα. Για παράδειγμα, η μεθυλίωση της λυσίνης K140 σχετίζεται με ογκογένεση. Στην Εικόνα 6 παρουσιάζονται οι κυριότερες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του STAT3 (Guanizo et al. 2018).



Εικόνα 6. Κύριες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του STAT3.

Τα αμινοξικά κατάλοιπα που φωσφορυλιώνονται συχνότερα και σχετίζονται με μεταγραφική ενεργοποίηση είναι η τυροσίνη Y705 και η σερίνη S727 και εντοπίζονται στην επικράτεια ενεργοποίησης μεταγραφής (TAD). Με μπλε συμβολίζονται οι φωσφορυλιώσεις, με κόκκινο οι ακετυλιώσεις, με μωβ οι μεθυλιώσεις, με μαύρο οι συμπικουτινυλιώσεις και με πράσινο οι προσθήκες γλουταθειόνης. NTD: NH₂-terminal domain; CCD: coiled coil domain; DBD: DNA-binding domain; LD: linker domain, SH2 domain; TAD: transcription activation domain (Guanizo et al. 2018).

Υψηλά ποσοστά έκφρασης του STAT3 εντοπίζονται σε φυσιολογικούς ιστούς και όργανα, συμπεριλαμβανομένων του μυελού των οστών, του περιφερικού νευρικού συστήματος και του πεπτικού συστήματος (Qin et al. 2019). Ο STAT3 συμμετέχει σε ένα μεγάλο εύρος φυσιολογικών διαδικασιών, οι οποίες συχνά είναι αντικρουόμενες (Levy and Lee 2002).

Προσπάθειες δημιουργίας ομόζυγων ποντικών με αφαίρεση του γονιδίου του STAT3 (knockout) οδηγεί σε θνησιμότητα του εμβρύου, επομένως ο παράγοντας αυτός πιθανόν να είναι απαραίτητος για τα πρώτα στάδια ανάπτυξης του εμβρύου (Dorritie, McCubrey, and Johnson 2014, Ivashkin and Hu 2004). Η αφαίρεση του γονιδίου του STAT3 σε κερατινοκύτταρα αποκαλύπτει τον βασικό του ρόλο στην αναδιαμόρφωση του δέρματος και στην επούλωση πληγών. Επιπλέον, ο παράγοντας συμμετέχει στην απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων κατά την φυσιολογική ανάπτυξη των μαστικών αδένων. Επομένως, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και τις συνθήκες ρυθμίζει την απόπτωση ή την κυτταρική επιβίωση (Ivashkin and Hu 2004). Σηματοδότηση με IL-6, ή με άλλες κυτοκίνες, προκαλεί διαφορετικές αποκρίσεις στα κύτταρα, όπως πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων B, τελική διαφοροποίηση και αναστολή της ανάπτυξης στα μονοκύτταρα, και διατήρηση των πολυδύναμων εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων (Levy and Lee 2002).

Όσον αφορά το αιμοποιητικό και το ανοσοποιητικό σύστημα, πολλές λειτουργίες επηρεάζονται από τη δράση του STAT3. Στα λεμφοκύτταρα T ο STAT3 συμβάλλει στην καταστολή της απόπτωσης και στην επαγωγή του πολλαπλασιασμού, μέσω σηματοδότησης με IL-6 και με IL-2. Επίσης, σηματοδότηση μέσω του STAT3 σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα είναι απαραίτητη για την ανοσιακή ανοχή. Σε ποντίκια που έχει αφαιρεθεί το γονίδιο του STAT3 (knockout) στον μυελό των οστών, παρατηρούνται μειωμένα επίπεδα προγονικών και ώριμων κυττάρων B, καθώς και μειωμένος πολλαπλασιασμός των κυττάρων του μυελού των οστών. Σχετικά με τα κύτταρα της μυελοειδούς σειράς, αφαίρεση του γονιδίου του STAT3 έχει ως αποτέλεσμα, την υπερ-ενεργοποίηση των μακροφάγων και την αυξημένη παραγωγή κυτοκινών που σχετίζονται με φλεγμονή, υπογραμμίζοντας την ανοσοκατασταλτική και αντιφλεγμονώδη δράση του STAT3. Στα προγονικά κύτταρα του μυελού των οστών, φαίνεται να ρυθμίζει αρνητικά την κοκκιοποίηση (granulopoiesis) (Ivashkin and Hu 2004, Dorritie, McCubrey, and Johnson 2014).

Εκτός από τον ρόλο του στη μεταγραφή, ο STAT3 συμμετέχει και στην συγκρότηση κυτταροπλασματικών δομών, όπως οι μικροσωληνίσκοι και η μιτωτική άτρακτος (Guanizo et al. 2018). Επίσης, ρυθμίζει μιτοχονδριακές λειτουργίες, με πιο σημαντική την διαδικασία της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων που είναι απαραίτητη για την παραγωγή του ATP (Adenosine Triphosphate). Επιπλέον, ο μιτοχονδριακός παράγοντας STAT3 (mitochondrial STAT3 - mSTAT3) συμμετέχει στην φυσιολογική κυτταρική ομοιόσταση, στην καρδιοπροστασία και στην ανάπτυξη των νευρώνων. Πειράματα CHIP (Chromatin Immunoprecipitation) έχουν δείξει ότι ο

STAT3 προσδένεται στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα (Stark, Cheon, and Wang 2018, Guanizo et al. 2018). Ποντίκια με αφαίρεση του γονιδίου του STAT3 (knockout) παρουσιάζουν διαταραχές στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, συνοδευόμενα από υπερπαραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου και φαινότυπο ταχείας αιματολογικής γήρανσης (Dorritie, McCubrey, and Johnson 2014).

Συνεχής φωσφορυλίωση του STAT3 παρατηρείται σε ποσοστό μεγαλύτερο από το 50% των περιπτώσεων συμπαγών και αιματολογικών κακοηθειών, όπως του μαστού, ωοθηκών, προστάτη, πνεύμονα, πλακώδους καρκινώματος κεφαλής και λαιμού, ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, καθώς και λευχαιμίας, λεμφωμάτων και πολλαπλού μυελώματος (Loh et al. 2019, Guanizo et al. 2018). Αυξημένη έκφραση του STAT3 σε ιστούς όγκων σχετίζεται με χαμηλότερα ποσοστά συνολικής επιβίωσης σε περιπτώσεις καρκίνου του στομάχου, πνεύμονα, ήπατος, προστάτη, παγκρέατος, γλοιώματος και οστεοσαρκώματος. Ενώ για αυτούς τους τύπους καρκίνου ο STAT3 αποτελεί δείκτη κακής πρόγνωσης, αυξημένη έκφραση στον καρκίνο του μαστού σχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση (Wu et al. 2016).

Πολλές κυτταρικές λειτουργίες που οδηγούν σε ογκογένεση ρυθμίζονται από τον STAT3, όπως ο κυτταρικός κύκλος, η απόπτωση, η αγγειογένεση και η μετάσταση, τροποποιώντας την έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν στα μονοπάτια αυτά, από τον STAT3. Παραδείγματα τέτοιων γονιδίων κωδικοποιούν την ρυθμιστική κυκλίνη D1, τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2 (B-cell Lymphoma 2) και Bcl-xL, την μεταλλοπρωτεάση-9 της μήτρας (Matrix Metalloproteinase-9 - MMP-9) και τον αυξητικό αγγειακό ενδοθηλιακό παράγοντα (Vascular Endothelial Growth Factor - VEGF) (Loh et al. 2019, Guanizo et al. 2018).

Σε μοντέλα ΟΜΛ, ο STAT3 είναι απαραίτητος για την καρκινογένεση που επάγεται από το c-kit (Loh et al. 2019, Guanizo et al. 2018). Στα MDSs και στην ΟΜΛ ο STAT3 υπερ-εκφράζεται στα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα και στα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα (Hematopoietic Stem and Progenitor Cells - HSPCs) και αποτελεί δείκτη δυσμενούς πρόγνωσης. Μεταγραφωμική ανάλυση αποκάλυψε ότι ο STAT3 καθοδηγεί την διαφορική έκφραση μεγάλου αριθμού λευχαιμικών γονιδίων, όπως τα *IL1RAP*, *MSI2*, *CXCR2*, *IL8*, και *MCL1* (Shastri et al. 2018).

Η στόχευση του STAT3 ως αντι-καρκινική θεραπεία αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη ιδέα. Παρά το γεγονός ότι πολλοί αναστολείς έχουν δοκιμαστεί, κανείς δεν έχει εγκριθεί για χρήση στην κλινική πράξη (Guanizo et al. 2018). Στις περιπτώσεις μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων και ΟΜΛ, η αναστολή του STAT3 στα βλαστικά κύτταρα μπορεί να αποτρέψει την εξέλιξη σε κακοήθεια. Για παράδειγμα, το AZD9150, ένα αντινοσηματικό νουκλεοτίδιο (antisense oligonucleotide) παρεμποδίζει ειδικά τον STAT3, μειώνοντας τον πολλαπλασιασμό και ενεργοποιώντας την απόπτωση στα λευχαιμικά κύτταρα, χωρίς να επηρεάζει τον STAT5. Τέλος, μείωση της έκφρασης του STAT3 (knock down) φαίνεται να μειώνει την ανάπτυξη των λευχαιμικών κυττάρων *in vivo* (Shastri et al. 2018).

1.2.6. Ο παράγοντας STAT5

Όπως ο STAT3, έτσι και ο STAT5 ενεργοποιείται από μεγάλο αριθμό κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων. Η αυξητική ορμόνη (Growth Hormone - GH), η προλακτίνη (Prolactin – PRL), ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (Epidermal Growth Factor - EGF), ο αυξητικός παράγοντας προερχόμενος από αιμοπετάλια (Platelet-Derived Growth Factor – PDGF), η IL-3, η IL-5, ο παράγοντας διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (Granulocyte / Macrophage Colony-Stimulating Factor - GM-CSF) και η ερυθροποιητίνη (EPO) αποτελούν κάποια από τα βασικά μόρια ενεργοποίησης (Ivashkin and Hu 2004).

Δύο ισομορφές του STAT5 έχουν προσδιοριστεί, ο STAT5A και ο STAT5B, που κωδικοποιούνται από δύο διαφορετικά γονίδια στο ίδιο χρωμόσωμα (χρωμόσωμα 17 στον άνθρωπο και 11 στον ποντικό). Η αλληλουχία αυτών των δύο ισομορφών παρουσιάζει μεγάλη ομολογία και διαφέρει κυρίως στο καρβοξυτελικό άκρο, ενώ η δομική τους ομολογία αγγίζει το 94%. Σηματοδότηση με IL-3 οδηγεί σε ενεργοποίηση, από την κινάση JAK2, του STAT5A με φωσφορυλίωση της τυροσίνης Y694 και του STAT5B με φωσφορυλίωση της τυροσίνης Y699 (Rane and Reddy 2002, Loh et al. 2019). Ο STAT5A σχηματίζει τετραμερή με μεγαλύτερη προτίμηση, ενώ ο STAT5B δεν έχει παρατηρηθεί να τετραμερίζεται. Τέλος σε αρκετές περιπτώσεις, οι δύο ισομορφές σχηματίζουν ετεροδιμερή και δεσμεύονται σε αλληλουχίες ενισχυτών και υποκινητών γονιδίων (Wingelhofer et al. 2018).

Ισχυρή πρόσδεση του STAT5 σε GAS μοτίβα έχει αναφερθεί κυρίως σε περιοχές μακριά από γονίδια (intergenic) που πιθανόν δρουν ως απομακρυσμένοι ενισχυτές. Πολλές πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με τον STAT5 και ρυθμίζουν αρνητικά ή θετικά την μεταγραφή γονιδίων. Παραδείγματα τέτοιων πρωτεϊνών είναι η απομεθυλάση LSD1 (Lysine Specific Demethylase 1) και η αποακετυλάση HDAC3 (Histone Deacetylase 3) που παρουσιάζουν διπλό ρόλο στην ενεργοποίηση και την αναστολή της έκφρασης γονιδίων στόχων του STAT5A, μέσω αποακετυλίωσης και απομεθυλίωσης ιστονών (Nanou et al. 2017, Wingelhofer et al. 2018).

Ο STAT5A εκφράζεται κυρίως στους μαστικούς αδένες ενώ ο STAT5B εκφράζεται περισσότερο στους μύες και στο ήπαρ (Loh et al. 2019). Η πλειοψηφία των λειτουργιών των δύο ισομορφών επικαλύπτεται και γι' αυτό αναφέρονται μαζί ως STAT5, αλλά ο STAT5A δεν μπορεί να αντισταθμίσει λειτουργικά πλήρως την έλλειψη του STAT5B και το αντίστροφο (Rane and Reddy 2002, Ivashkin and Hu 2004).

Ο STAT5 προάγει την κυτταρική επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό, ελέγχοντας την έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στον κυτταρικό κύκλο και την επιβίωση, όπως αυτά των κυκλινών D1 και D2, της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-XL και το πρώτο ογκογονίδιο *PIM-1*. Επιπλέον, εμπλέκεται στην ανανέωση των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων και ρυθμίζει τον κυτταρικό θάνατο μέσω του υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης όγκων (Tumor Necrosis Factor Receptor – TNFR) (Katsantoni 2012). Όσον αφορά την αιμοποιητική διαδικασία και οι δύο ισομορφές

εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό των αιμοποιητικών κυττάρων που επάγεται από σηματοδότηση μέσω IL-3, IL-5 και GM-CSF (Rane and Reddy 2002). Σε ποντίκια με αφαίρεση (knockout) είτε του STAT5A είτε του STAT5B παρατηρούνται φαινοτυπικές διαφορές στην αιμοποίηση σε σύγκριση με ποντίκια φυσικού τύπου, αλλά και μεταξύ τους. Ποντίκια με ταυτόχρονη αφαίρεση (knockout) των STAT5A και STAT5B παρουσιάζουν προβλήματα στην ερυθροποίηση και αναπτύσσουν εμβρυϊκή αναιμία. Επιπλέον, χαρακτηρίζονται από μειωμένο πολλαπλασιασμό λεμφοκυττάρων T σε απόκριση σηματοδότησης με IL-2, από απουσία φυσικών φονικών κυττάρων και τέλος αναπτύσσουν σπληνομεγαλία κάποια στιγμή στην ζωή τους. Η αφαίρεση του STAT5A (knockout) σε ποντίκια προκαλεί μείωση του πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων T, φαινότυπο παρόμοιο με ποντίκια από τα οποία έχει αφαιρεθεί (knockout) ο STAT3. Σημαντικός είναι και ο ρόλος του STAT5 στην κινητικότητα και την επιβίωση των μυελοειδών κυττάρων και κατ'επέκταση στις φλεγμονώδεις αποκρίσεις (Dorritie, McCubrey, and Johnson 2014, Ivashkiv and Hu 2004).

Πέρα από τις επιπτώσεις στο αιμοποιητικό και στο ανοσοποιητικό σύστημα, ταυτόχρονη αφαίρεση (knockout) των STAT5A και STAT5B, δημιουργεί στείρα ποντίκια, ένα μεγάλο ποσοστό των οποίων πεθαίνει μέσα σε λίγες εβδομάδες μετά την γέννηση. Και οι δύο ισομορφές εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών μαστικών κυττάρων έπειτα από σηματοδότηση με προλακτίνη (Ivashkiv and Hu 2004, Rane and Reddy 2002, Wingelhofer et al. 2018).

Συνεχής ενεργοποίηση του STAT5 χαρακτηρίζει πολλούς τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων του καρκίνου μαστού, προστάτη, μελανώματος, ηπατοκυτταρικού καρκινώματος και καρκινώματος των πλακωδών κυττάρων κεφαλής και λαιμού (Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck - SCCHN) (Katsantoni 2012). Υψηλή ενεργότητα του STAT5 έχει παρατηρηθεί και σε περιπτώσεις οστεοσαρκώματος, της πιο κοινής παιδιατρικής κακοήθειας στα οστά (Subramaniam et al. 2020).

Εκτός από τους συμπαγείς όγκους, αυξημένη ενεργοποίηση του STAT5 έχει αναφερθεί και σε πολλές αιματολογικές κακοήθειες, όπως είναι η χρόνια μυελογενής λευχαιμία (Chronic Myelogenous Leukemia – CML), η οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία (Acute Lymphocytic Leukemia – ALL) και τα MPNs (Katsantoni 2012). Συνεχής ενεργότητα του STAT5 προσδιορίζεται και στα κοκκιοκύτταρα ασθενών με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (Chronic Lymphocytic Leukemia – CLL) (Theodorou et al. 2013).

Αναφορικά με την ΟΜΛ, ο STAT5 παίζει ρόλο στην διατήρηση των μυελοειδών λευχαιμικών βλαστικών κυττάρων. Κύτταρα CD34⁺ ΟΜΛ χαρακτηρίζονται από συνεχή ενεργοποίηση του STAT5 και αποσιώπησή του μέσω RNAi σε αυτά τα κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα μειωμένη μακροπρόθεσμη ανάπτυξη. Ωστόσο, η αποσιώπηση του STAT5 προκαλεί μειωμένη ανάπτυξη και των φυσιολογικών προγονικών κυττάρων CD34⁺ του ομφαλικού αίματος,

υποδεικνύοντας τον σημαντικό ρόλο του STAT5 τόσο στην φυσιολογική, όσο και στην λευχαιμική αιμοποίηση (Dorritie, McCubrey, and Johnson 2014). Μικρά χημικά μόρια, όπως η πομοζίδη, τα οποία στοχεύουν την επικράτεια SH2, φαίνονται πολλά υποσχόμενες για την θεραπεία της ΟΜΛ (Subramaniam et al. 2020).

1.2.7. Σύνδεση STAT3 και STAT5

Οι STAT3 και STAT5 παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον γιατί, όπως προαναφέρθηκε, ενεργοποιούνται από ποικιλία προσδετών που ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση, την διακυτταρική επικοινωνία, την αγγειογένεση και πολλά άλλα (Wingelhofer et al. 2018). Άλλες φυσιολογικές διεργασίες στις οποίες εμπλέκονται ο STAT3 και ο STAT5 είναι η απόκριση σε προ-φλεγμονώδη και αντιφλεγμονώδη σηματοδότηση (μέσω IL-6 και IL-10 αντίστοιχα) (Hedl et al. 2019). Η απορρύθμιση της δράσης τους διευκολύνει την ανάπτυξη συμπαγών όγκων και λευχαιμιών. Στα περισσότερα κύτταρα, ο STAT3 και ο STAT5 ενεργοποιούνται μέσω διαφορετικών μηχανισμών και δεσμεύονται σε διακριτά σημεία του DNA για να ρυθμίσουν την έκφραση γονιδίων στόχων. Ωστόσο, σε κάποιες περιοχές DNA, που έχουν συσχετιστεί με ογκογόνο δράση, μπορούν να δεσμευτούν και οι δύο παράγοντες και να δράσουν συνεργατικά ή ανταγωνιστικά. Ο λειτουργικός πλεονασμός είναι ιδιαίτερα εμφανής στα τελικά στάδια της ερυθροποίησης, κατά τα οποία ο STAT3 αντισταθμίζει λειτουργικά την απώλεια του STAT5 (Wingelhofer et al. 2018). Στα καρκινικά κύτταρα ο STAT5 τροποποιεί την ενεργοποίηση και την λειτουργία του STAT3. Επίσης, τα επίπεδα φωσφορυλίωσης τυροσινών των δύο αυτών μελών της οικογένειας των STATs τροποποιούνται από τις ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS) (Linher-Melville and Singh 2017). Παρά το γεγονός ότι ο STAT3 και ο STAT5 παρουσιάζουν δομική ομοιότητα διαδραματίζουν διακριτούς ρόλους και γι'αυτό δεν θεωρούνται παράγοντες με αλληλεπικαλυπτόμενη δράση. Για παράδειγμα, ο STAT5 παρουσιάζει διαφορετικές λειτουργίες από αυτές του STAT3 στον καρκίνο του μαστού (Walker, Xiang, and Frank 2014).

Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω, οι STAT3 και STAT5 παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως θεραπευτικοί στόχοι αντικαρκινικής θεραπείας. Η ανάπτυξη αναστολέων έναντι των παραγόντων αυτών αποτελεί σημαντικό τομέα έρευνας για την αντιμετώπιση συμπαγών κακοηθειών, αλλά και λευχαιμιών (Linher-Melville and Singh 2017, Dorritie, McCubrey, and Johnson 2014). Ακόμα υπάρχουν ζητήματα που αφορούν την βιολογία των STATs που δεν έχουν πλήρως αποσαφηνιστεί και η μελέτη τους είναι απαραίτητη προκειμένου να αποκαλυφθούν και άλλες λειτουργίες.

1.3. Αλληλούχιση επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing - NGS)

1.3.1. Τεχνολογίες NGS: Βασικές αρχές και ιστορική αναδρομή

Η αλληλούχιση μορίων DNA και RNA εφαρμόζεται τα τελευταία 50 χρόνια, με τις μεθόδους μεγάλης κλίμακας μαζικής παράλληλης αλληλούχισης, ή αλληλούχισης νέας γενιάς (Next Generation Sequencing - NGS) να έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία 15 χρόνια. Η πρώτη αλληλούχιση του ανθρώπινου γονιδιώματος διήρκησε 10 χρόνια, ενώ πλέον μπορεί να επιτευχθεί εντός λίγων ωρών. Οι τεχνολογίες NGS έχουν μειώσει κατά πολύ τον χρόνο και το κόστος παραγωγής δεδομένων αλληλούχισης (McCombie, McPherson, and Mardis 2019).

Η πρώτη μέθοδος αλληλούχισης που εφαρμόστηκε ήταν η μέθοδος Sanger το 1977 και αφορούσε αλληλούχιση DNA μορίων, η οποία συνεχίζει να χρησιμοποιείται και αποτελεί ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο σε περιπτώσεις που δεν απαιτείται κάποια από τις τεχνολογίες NGS, όπως ο καθορισμός ενός γονιδίου, ενός μικρού γονιδιώματος (έως 5.000 βάσεις), ενός πλασμιδίου ή ενός προϊόντος PCR. Μέσω της μεθόδου διαβάζονται 600-1.000 βάσεις με μεγάλη ακρίβεια (Slatko, Gardner, and Ausubel 2018).

Οι μέθοδοι “μαζικής παράλληλης” ή “επόμενης γενιάς” αλληλούχισης, στηρίζονται στην βασική αρχή της μεθοδολογίας Sanger. Στην ανάπτυξη των τεχνολογιών NGS οδήγησε η ανάγκη για αλληλούχιση υψηλότερης απόδοσης, μεγαλύτερων γονιδιωμάτων με χαμηλότερο κόστος. Πλέον, υπάρχουν τεχνολογίες δεύτερης, τρίτης και τέταρτης γενιάς. Όσον αφορά τις μεθόδους δεύτερης γενιάς μπορούν να ομαδοποιηθούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες, αυτές της αλληλούχισης μέσω υβριδοποίησης και της αλληλούχισης μέσω σύνθεσης (McCombie, McPherson, and Mardis 2019, Slatko, Gardner, and Ausubel 2018).

Η αλληλούχιση μέσω υβριδοποίησης αναπτύχθηκε το 1980 και περιλαμβάνει ολιγονουκλεοτίδια DNA γνωστών αλληλουχιών (ανιχνευτές) ακινητοποιημένων σε φίλτρα που υβριδοποιούνται σε σημασμένα θραύσματα DNA προς αλληλούχιση. Επαναλαμβανόμενοι κύκλοι υβριδισμού και απομάκρυνσης μη υβριδοποιημένων μορίων, οδηγούν στην αποκάλυψη της αλληλουχίας του επιθυμητού DNA. Διαγνωστικές εφαρμογές, όπως η ανίχνευση σημειακών μεταλλαγών (Single-Nucleotide Polymorphisms - SNP) σε γονίδια που σχετίζονται με ασθένειες και χρωμοσωμικές ανωμαλίες (π.χ. αναδιατάξεις, διπλασιασμοί κ.ά.) αποτελούν στόχο της τεχνολογίας αυτής (Slatko, Gardner, and Ausubel 2018).

Οι περισσότερες πλατφόρμες NGS στηρίζονται στην αλληλούχιση μέσω σύνθεσης. Η διαφορά των μεθόδων αυτών από την Sanger έγκειται στο γεγονός ότι πραγματοποιούν αλληλούχιση υψηλής κάλυψης εκατομμυρίων ή ακόμα και δισεκατομμυρίων DNA τμημάτων μικρού μήκους (50 – 300 νουκλεοτίδια). Στις περισσότερες περιπτώσεις των τεχνολογιών NGS, μεμονωμένα μόρια DNA προς αλληλούχιση είτε διαμοιράζονται σε εκατομμύρια ξεχωριστά πηγάδια ή θαλάμους

είτε συνδέονται σε συγκεκριμένες θέσεις σε ένα στερεό υπόστρωμα. Στην συνέχεια ενισχύονται με PCR ή άλλες μεθόδους και τέλος ακολουθεί το βήμα της σύνθεσης DNA. Το “διάβασμα” της αλληλουχίας πραγματοποιείται ή με άμεση ανίχνευση φθορισμού που εκπέμπεται από την βάση που ενσωματώνεται κάθε φορά κατά την σύνθεση (στις περιπτώσεις που χρησιμοποιούνται σημασμένα νουκλεοτίδια) ή από άλλες έμμεσες χημικές αντιδράσεις (Slatko, Gardner, and Ausubel 2018).

Η τεχνολογία Illumina, μία από τις πιο διαδεδομένες μεταξύ των NGS μεθοδολογιών, χρησιμοποιεί άμεση ανίχνευση φθορισμού. Πιο συγκεκριμένα η αλληλούχιση Illumina, βασίζεται σε μια τεχνική γνωστή ως «ενίσχυση γέφυρας» (bridge amplification) κατά την οποία μόρια DNA (~500 ζεύγη βάσεων) συνδέονται σε κάθε άκρο τους με κατάλληλους προσαρμογείς (adapters), στην συνέχεια ακινητοποιούνται σε στερεό υπόστρωμα (γυάλινη πλάκα) που περιέχει ολιγονουκλεοτίδια με συμπληρωματικές, ως προς τους προσαρμογείς, αλληλουχίες και τέλος χρησιμοποιούνται ως καλούπι για επαναλαμβανόμενες αντιδράσεις ενίσχυσης. Σαν αποτέλεσμα, μετά από πολλούς κύκλους ενίσχυσης, δημιουργούνται πάνω στην πλάκα κλωνικές “συστάδες” αποτελούμενες από περισσότερα από 1.000 αντίγραφα για κάθε θραύσμα DNA προς αλληλούχιση. Κατά τις αντιδράσεις σύνθεσης, κατάλληλα τροποποιημένα νουκλεοτίδια, με διαφορετική φθορίζουσα χρώση για κάθε μία από τις τέσσερις βάσεις, ενσωματώνονται και στη συνέχεια ανιχνεύονται. Τα νουκλεοτίδια αυτά τερματίζουν την σύνθεση σε κάθε κύκλο αντίδρασης και αποδεσμεύονται αμέσως μετά την ανίχνευση, πριν τον επόμενο κύκλο σύνθεσης. Κάποιες από τις εφαρμογές της τεχνολογίας Illumina είναι η αλληλούχιση RNA (RNA-seq) και η αλληλούχιση ανοσοκατακρημνισμένης χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation sequencing - ChIP-seq). Διαφορετικά μοντέλα μηχανημάτων Illumina, όπως το NextSeq, το NovaSeq και το HiSeq παρέχουν διαφορετικά επίπεδα απόδοσης (Slatko, Gardner, and Ausubel 2018).

Στην κατηγορία της έμμεσης ανίχνευσης της ενσωμάτωσης νουκλεοτιδίων μέσω προϊόντων που παράγονται κατά την αντίδραση σύνθεσης χρησιμοποιείται ένας μόνο τύπος μη σημασμένων νουκλεοτιδίων (ή A, ή T, ή C, ή G) ανά κύκλο ενσωμάτωσης. Ένα βήμα ανίχνευσης ακολουθεί κάθε κύκλο και περιλαμβάνει ή την ανίχνευση πυροφωσφορικού που απελευθερώνεται κατά την δημιουργία ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού και αντιδρά με λουσιφεράση για να παραχθεί μια ποσότητα εκπεμπόμενου φωτός που αντιστοιχεί στον αριθμό των ενσωματωμένων νουκλεοτιδίων (π.χ. Pyrosequencing) ή την ανίχνευση της μεταβολής του pH που προκαλείται από την απελευθέρωση ιόντων υδρογόνου πάλι ως παραπροϊόν της ενσωμάτωσης νουκλεοτιδίων στην αναπτυσσόμενη αλυσίδα DNA (π.χ. Ion Torrent) (McCombie, McPherson, and Mardis 2019, Slatko, Gardner, and Ausubel 2018).

Ανεξάρτητα από τον τύπο ανίχνευσης, κάθε πλατφόρμα μετατρέπει τα σήματα που συνέλεξε σε “διαβάσματα” (reads), δηλαδή σε αλληλουχία νουκλεοτιδίων κάθε θραύσματος. Επιπλέον, πραγματοποιείται αξιολόγηση της ποιότητας των δεδομένων και δημιουργούνται αρχεία τα οποία μπορούν να

χρησιμοποιηθούν από τους χρήστες για περαιτέρω ανάλυση και επεξεργασία (McCombie, McPherson, and Mardis 2019).

1.3.2. Αλληλούχιση RNA (RNA-seq)

Η αλληλούχιση μορίων RNA (RNA-seq) εμφανίστηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1990 και αξιοποιεί τις τεχνολογίες NGS για την γρήγορη απόκτηση μιας ολοκληρωμένης εικόνας της μεταγραφικής κατάστασης των βιολογικών δειγμάτων σε μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή. Το RNA-seq χρησιμοποιείται κυρίως στη μελέτη μορίων mRNA, μικρών RNA (small RNA), μη κωδικοποιητικών RNA (non-coding RNA) και κυκλικών RNA (Circular RNA).

Κύριοι στόχοι της μεθόδου RNA-seq είναι η μελέτη της έκφρασης κοινών ή σπάνιων μεταγράφων, ο εντοπισμός περιπτώσεων εναλλακτικού ματίσματος, η ανακάλυψη νέων μεταγράφων και γεγονότων γονιδιακής σύντηξης, ο προσδιορισμός νέων ειδών RNA και η διερεύνηση πτυχών της βιογένεσης και του μεταβολισμού του RNA. Σε σύγκριση με τις μεθόδους που βασίζονται σε μικροσυστοιχίες DNA, το RNA-seq χαρακτηρίζεται από λιγότερο θόρυβο υποβάθρου και μεγαλύτερο εύρος ανίχνευσης. Το πιο σημαντικό πλεονέκτημα της μεθόδου αποτελεί το γεγονός ότι το RNA-seq αποκαλύπτει άμεσα την αλληλουχία, η οποία δεν χρειάζεται να είναι ήδη γνωστή όπως στην περίπτωση των μικροσυστοιχιών για να ανιχνευτεί, επιτρέποντας την ανάλυση αγνώστων γονιδίων και εναλλακτικών μεταγράφων. Αρκετές διαφορετικές τεχνολογίες έχουν αναπτυχθεί για το RNA-seq και πλέον μπορεί να αλληλουχηθεί το RNA ενός μόνο κυττάρου (Single-Cell RNA-seq) (Hrdlickova, Toloue, and Tian 2017, Zhang, He, and Cai 2018).

Το RNA-seq μπορεί να πραγματοποιηθεί από όλες σχεδόν τις πλατφόρμες NGS. Τα περισσότερα πειράματα RNA-seq διεξάγονται σε όργανα που αλληλουχούν μόρια DNA. Επομένως, η προετοιμασία βιβλιοθήκης cDNA από RNA αποτελεί ένα απαραίτητο βήμα. Κάθε cDNA, σε μια βιβλιοθήκη RNA-seq, αποτελείται από ένα μόριο cDNA ορισμένου μήκους που φέρει στα άκρα του αλληλουχίες προσαρμογείς (adapters), όπως απαιτείται για την ενίσχυση και την αλληλούχιση σύμφωνα με την κάθε πλατφόρμα. Η μέθοδος κατασκευής της βιβλιοθήκης cDNA ποικίλλει ανάλογα με το υπό μελέτη είδος RNA, το οποίο μπορεί να διαφέρει ως προς το μήκος, την αλληλουχία, τα δομικά χαρακτηριστικά και την ποσότητα (Hrdlickova, Toloue, and Tian 2017). Τα βασικά βήματα για την κατασκευή βιβλιοθήκης με σκοπό την αλληλούχιση RNA-seq μορίων mRNA είναι τα εξής:

- 1) Απομόνωση ολικού RNA.
- 2) Επιλογή μορίων RNA ενδιαφέροντος.

Διαφορετικοί τύποι RNA μπορούν να ληφθούν με την προσθήκη επιπλέον σταδίων διαχωρισμού και εμπλουτισμού πριν από την σύνθεση του cDNA. Η αλληλούχιση πολυαδενυλιωμένου (Poly A) RNA είναι ίσως η πιο κοινή εφαρμογή του RNA-seq. Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, τα περισσότερα μόρια RNA που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (mRNA) και πολλά μακρά μη

κωδικοποιητικά μόρια RNA (long non coding RNA - lncRNA) (> 200 βάσεις) περιέχουν μια ουρά πολλών καταλοίπων αδενίνης (A). Η επιλογή πολυαδενυλιωμένου RNA μπορεί να πραγματοποιηθεί για παράδειγμα με μαγνητικά σφαιρίδια που φέρουν Poly T ολιγονουκλεοτίδια. Με αυτόν τον τρόπο απομακρύνονται άλλα είδη RNA μορίων, όπως τα miRNA και τα rRNA.

3) Κατακερματισμός του RNA.

Μετά την επιλογή, τα δείγματα RNA υπόκεινται σε κατακερματισμό σε ένα ορισμένο εύρος μεγέθους πριν από την αντίστροφη μεταγραφή.

4) Αντίστροφη μεταγραφή (Κατασκευή cDNA).

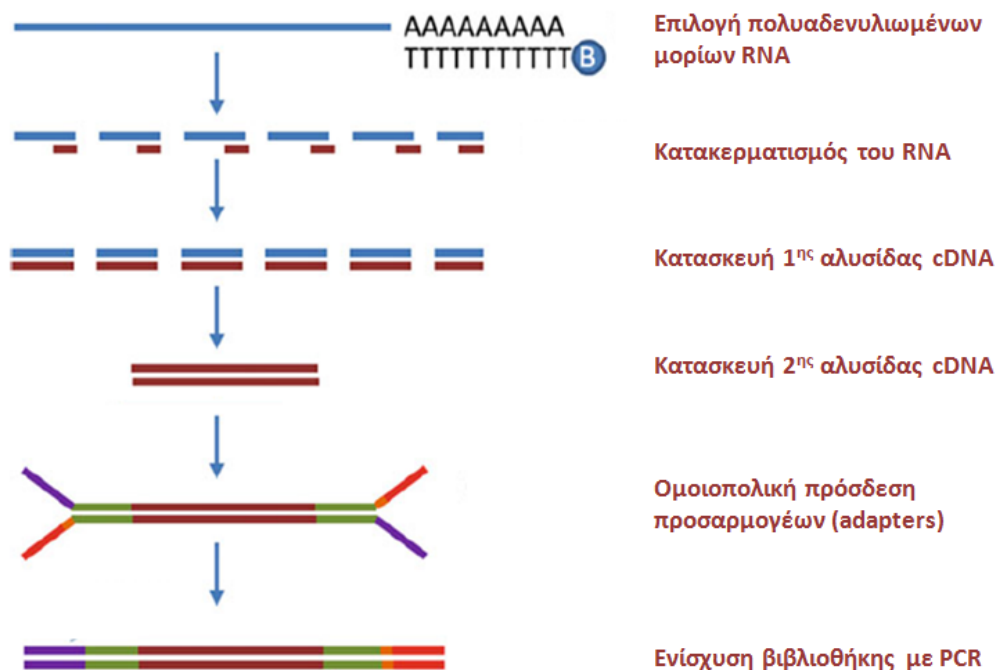
5) Ομοιοπολική πρόσδεση προσαρμογέων (adapters).

6) Ενίσχυση βιβλιοθήκης.

Λόγω του ορίου ανίχνευσης των περισσότερων πλατφορμών αλληλούχισης, οι βιβλιοθήκες cDNA πρέπει να ενισχυθούν με PCR πριν από την αλληλούχιση.

7) Ποιοτικός έλεγχος της βιβλιοθήκης.

Στην Εικόνα 7 παρουσιάζονται διαγραμματικά τα βασικά βήματα κατασκευής βιβλιοθήκης.



Εικόνα 7. Βασικά βήματα κατασκευής βιβλιοθήκης mRNA για αλληλούχιση με πλατφόρμα Illumina.

Τα πολυαδενυλιωμένα μόρια RNA επιλέγονται στις περιπτώσεις που ο στόχος του RNA-seq είναι η μελέτη των μορίων mRNA. Η επιλογή πραγματοποιείται συνήθως με μαγνητικά σφαιρίδια που φέρουν μια αλληλουχία poly T, συμπληρωματική ως προς την poly A ουρά. Στην συνέχεια τα επιλεγμένα μόρια κατακερματίζονται σε θραύσματα συγκεκριμένου μήκους, τα οποία χρησιμοποιούνται ως καλούπια για την κατασκευή cDNA. Στα άκρα των μορίων cDNA συνδέονται ομοιοπολικά προσαρμογείς (adapters) ειδικοί κάθε φορά για την πλατφόρμα αλληλούχισης που θα χρησιμοποιηθεί στην συνέχεια. Τέλος, οι βιβλιοθήκες cDNA ενισχύονται με PCR (Zhang, He, and Cai 2018).

Μετά το πέρας της αλληλούχισης, προκύπτουν αρχεία με “διαβάσματα” (reads) των αλληλουχιών για κάθε δείγμα. Η ανάλυσή τους αποτελεί ένα μεγάλο πεδίο στην βιοπληροφορική ανάλυση και πολλά προγράμματα έχουν αναπτυχθεί για αυτόν τον σκοπό. Ο όγκος και η πολυπλοκότητα των δεδομένων από πειράματα RNA-seq απαιτούν γρήγορα και καλά μαθηματικώς θεμελιωμένα λογισμικά ανάλυσης. Το πρωτόκολλο ανάλυσης ξεκινά με μη επεξεργασμένα “διαβάσματα” αλληλουχίας και καταλήγει σε πληροφορίες για το μεταγράψωμα, λίστες με διαφορετικώς εκφραζόμενα γονίδια κ.ά. Ωστόσο, ακόμη και μικρά πειράματα RNA-seq που αφορούν μόνο ένα δείγμα παράγουν τεράστιους όγκους πληροφορίας (μια κοινή πλατφόρμα αλληλούχισης παράγει περισσότερα από 500 GB σε έναν μόνο κύκλο λειτουργίας). Τα εργαλεία ανάλυσης RNA-seq γενικά εμπίπτουν σε τρεις κατηγορίες: (i) αυτά για στοίχιση (alignment) των “διαβασμάτων” στο γονιδίωμα του οργανισμού από τον οποίο προέρχεται το δείγμα (π.χ. TopHat, HISAT, STAR) (ii) εκείνα για συναρμολόγηση των μεταγράφων ή σχολιασμό του γονιδιώματος και (iii) αυτά για την ποσοτικοποίηση μεταγράφων και γονιδίων (π.χ. HTSeq) (Trapnell et al. 2012).

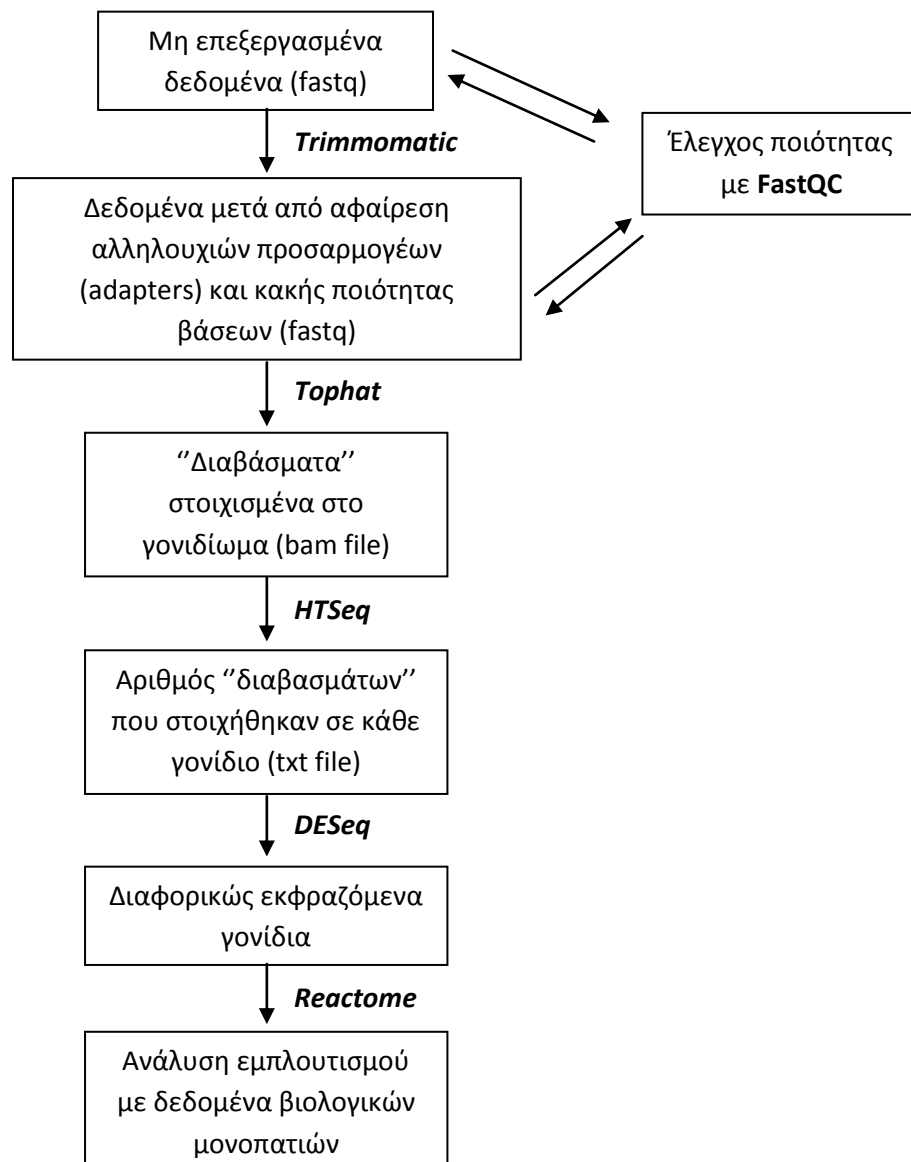
2. ΣΚΟΠΟΣ

Ο στόχος της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας ήταν η διερεύνηση των μηχανισμών μέσω των οποίων οι παράγοντες STAT3 και STAT5 εμπλέκονται στην οξεία μυελογενή λευχαιμία (ΟΜΛ). Για τον σκοπό αυτό, αρχικά πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση σε δεδομένα από RNA-seq, προερχόμενα από knock downs (KDs) των γονιδίων *STAT5A* και *STAT5B* σε κύτταρα της σειράς MOLM-13 (κυτταρική σειρά ΟΜΛ). Η ανάλυση αυτή είχε ως στόχο την αποκάλυψη γονιδίων των οποίων η έκφραση μεταβάλλεται στις περιπτώσεις των KDs σε σύγκριση με τα controls (κύτταρα στα οποία δεν έχει πραγματοποιηθεί KD του γονιδίου *STAT5A* ή *STAT5B* αντίστοιχα) και επομένως γονιδίων που είναι πιο πιθανό να αποτελούν ρυθμιστικούς στόχους του STAT5 σε περιπτώσεις ΟΜΛ. Περαιτέρω ανάλυση εμπλουτισμού των διαφορικώς εκφραζόμενων γονιδίων αποκάλυψε ποια βιολογικά μονοπάτια επηρεάζονται. Τέλος, δημιουργήθηκαν KDs του γονιδίου *STAT3* στις κυτταρικές σειρές MOLM-13 και Kasumi-1 (κυτταρικές σειρές ΟΜΛ), προκειμένου να πραγματοποιηθούν μελλοντικά αντίστοιχα πειράματα RNA-seq και βιοπληροφορικής ανάλυσης για τον προσδιορισμό πιθανών γονιδίων στόχων του STAT3 στην ΟΜΛ.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. RNA-seq και βιοπληροφορική ανάλυση δεδομένων

Αναλύθηκαν δεδομένα RNA-seq του Εργαστηρίου, δειγμάτων της κυτταρικής σειράς M0LM-13. Χρησιμοποιήθηκαν 3 βιολογικά αντίγραφα (biological replicates) που αποτελούν την ομάδα ελέγχου (No target – NT control), 3 βιολογικά αντίγραφα που αντιστοιχούν στην κατάσταση μειωμένης έκφρασης (KD) του γονιδίου *STAT5A* και άλλα 3 στην αντίστοιχη κατάσταση του γονιδίου *STAT5B*. Η αλληλούχιση RNA-seq των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στην πλατφόρμα Illumina NextSeq 500. Τα “διαβάσματα” ήταν μίας κατεύθυνσης (single-end reads) και εξήχθησαν σε αρχεία με μορφή fastq. Τα βασικά βήματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης παρουσιάζονται συνοπτικά στην παρακάτω Εικόνα (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Διάγραμμα των βημάτων της βιοπληροφορικής ανάλυσης των δεδομένων RNA-seq (στα βέλη απεικονίζονται τα προγράμματα ανάλυσης).

Αρχικά, η ποιότητα των “διαβασμάτων” ελέγχθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος FastQC (version 0.11.9.) και προσδιορίστηκε ο αριθμός των βάσεων από την αρχή και το τέλος των “διαβασμάτων” που έχουν κακή ποιότητα και έπρεπε να απομακρυνθούν στο επόμενο βήμα (2 βάσεις από την αρχή και 4 από το τέλος). Η απομάκρυνση των βάσεων με κακή ποιότητα διαβάσματος, αλλά και οι αλληλουχίες των προσαρμογέων (adapters) και των εκκινητών (primers), που σχετίζονται με την πλατφόρμα αλληλούχισης, απομακρύνθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος Trimmomatic (version 0.39.). Στην συνέχεια, τα “διαβάσματα” στοιχήθηκαν στο γονιδίωμα αναφοράς του ανθρώπου (hg38) μέσω του TopHat (version 2.0.10). Το επόμενο βήμα στην ανάλυση ήταν η μετατροπή των δεδομένων στοίχισης σε ποσοτικά δεδομένα έκφρασης. Με το HTSeq (version 0.5.4.) υπολογίστηκε ο αριθμός των “διαβασμάτων” που στοιχήθηκαν σε κάθε γονίδιο. Τέλος, στο DESeq2 (library “DESeq2” στην R) πραγματοποιήθηκε ανάλυση διαφορικής εκφραζόμενων γονιδίων μεταξύ των KDs και των controls. Για την αναπαράσταση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων με $\text{padj} < 0.1$ (μετά από διόρθωση Benjamini – Hochberg) και $|\text{fold change}| > 2$ δημιουργήθηκε heatmap (library “RColorBrewer” και library “gplots” στην R).

3.2. Κυτταρικές σειρές

➤ HEK-293

Η σειρά αυτή δημιουργήθηκε από ανθρώπινα εμβρυϊκά νεφρικά κύτταρα (Stepanenko and Dmitrenko 2015). Στην παρούσα Διπλωματική χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή λεντιϊών. Η διατήρηση της σειράς πραγματοποιήθηκε σε DMEM, 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 1% μίγμα αντιβιοτικών (100 U/ml πενικιλίνη και 100 mg/ml στρεπτομυκίνη).

➤ MOLM-13

Η σειρά αυτή δημιουργήθηκε από κύτταρα περιφερικού αίματος άντρα ασθενή 20 ετών με OML (Matsuo et al. 1997). Η διατήρηση της σειράς πραγματοποιήθηκε σε RPMI, 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 1% μίγμα αντιβιοτικών (100 U/ml πενικιλίνη και 100 mg/ml στρεπτομυκίνη).

➤ Kasumi-1

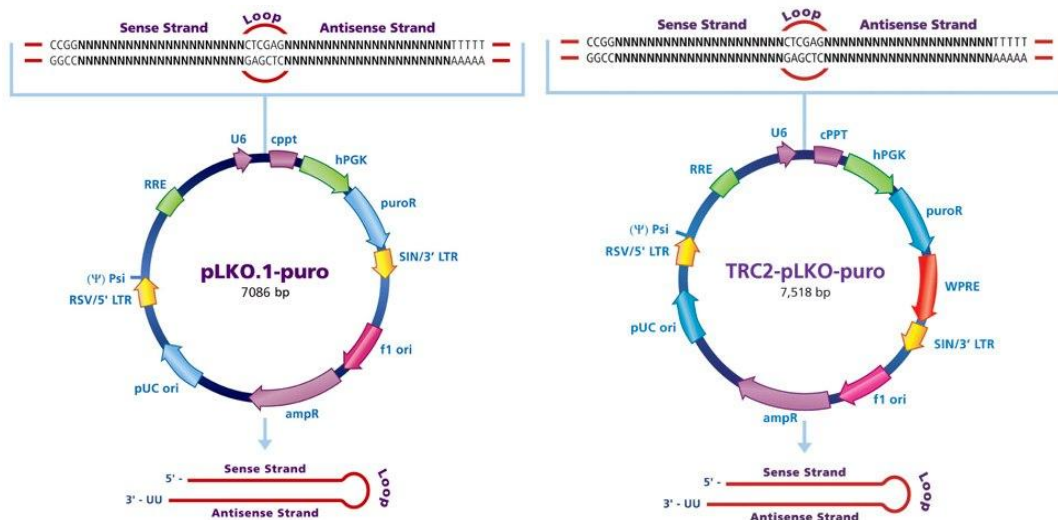
Η σειρά αυτή δημιουργήθηκε από κύτταρα περιφερικού αίματος αγοριού με παιδική μορφή OML (Acute Myeloblastic Leukemia) (Larizza, Magnani, and Beghini 2005). Η διατήρηση της σειράς πραγματοποιήθηκε σε RPMI, 20% FBS (Fetal Bovine Serum), 1% μίγμα αντιβιοτικών (100 U/ml πενικιλίνη και 100 mg/ml στρεπτομυκίνη).

Όλες οι παραπάνω κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε κλίβανο θερμοκρασίας 37°C παρουσία 5% CO₂ και 95% O₂.

3.3. Δημιουργία κυτταρικών σειρών με KD του STAT3

3.3.1. Φορείς short hairpin RNAs (shRNAs)

Προκειμένου να καταστεί δυνατή η μελέτη λειτουργίας γονιδίων με μειωμένη έκφραση σε ένα ευρύ φάσμα κυττάρων θηλαστικών, έχουν αναπτυχθεί βιβλιοθήκες shRNA για τα γονιδιώματα του ανθρώπου και του ποντικού από το RNAi Consortium. Οι βιβλιοθήκες αυτές αποτελούνται από πλασμιδιακούς φορείς (vectors) (Εικόνα 9), που ο καθένας στοχεύει ένα γονίδιο (Moffat et al. 2006).



Εικόνα 9. Πλασμιδιακοί φορείς των βιβλιοθηκών TRC1 και TRC2 αντίστοιχα.

Στους χάρτες των πλασμιδίων παρουσιάζονται όλα τα στοιχεία τους. Σε κάθε περίπτωση, ανάλογα με το γονίδιο στο οποίο στοχεύει το shRNA που κωδικοποιούν οι φορείς, μεταβάλλονται οι sense και antisense αλληλουχίες (Πηγή εικόνων: Product information, MISSION LentiPlex Human and Mouse Pooled shRNA Libraries, Sigma-Aldrich).

Χρησιμοποιήθηκαν οι κάτωθι κλώνοι: ένας κλώνος από την TRC1 βιβλιοθήκη με αλληλουχία shRNA ειδική για την κωδική περιοχή του STAT3 (TRCN0000020840) (Πίνακας 3), 2 κλώνοι από την TRC2 βιβλιοθήκη με αλληλουχίες shRNA επίσης ειδικές για την κωδική περιοχή του STAT3 (TRCN0000329887, TRCN0000329888) (Πίνακας 3) και ένας κλώνος από την TRC2 βιβλιοθήκη με αλληλουχία shRNA που δεν στοχεύει σε κανένα σημείο του ανθρώπινου γονιδιώματος (scrambled sequence) και χρησιμοποιήθηκε ως NT control.

Κωδικός Sigma	TRC	Αλληλουχία shRNA
TRCN0000020840	1	CCGGGCTGACCAACAATCCCAAGAACTCGAGTTCTT GGGATTGTTGGTCAGCTTTTT
TRCN0000329887	2	CCGGGCACAATCTACGAAGAATCAACTCGAGTTGA TTCTTCGTAGATTGTGCTTTTTG
TRCN0000329888	2	CCGGGGCGTCCAGTTCACACTACTAAACTCGAGTTTAG TAGTGAAGTGGACGCCTTTTTG

Πίνακας 3. Κλώνοι από την TRC1 και TRC2 βιβλιοθήκη που χρησιμοποιήθηκαν.
Με κόκκινο παρουσιάζεται η αλληλουχία του "Isor", όπως φαίνεται και στην Εικόνα 9.

Οι κλώνοι παρελήφθησαν ως υγρές καλλιέργειες βακτηρίων *Escherichia coli* DH5 alpha, μετασηματισμένες με τους πλασμιδιακούς φορείς που περιέχουν τα shRNAs. Στην συνέχεια, τα βακτήρια αναπτύχθηκαν σε στερεές καλλιέργειες τρυβλίων με θρεπτικό LB (Luria-Bertani Broth) και αμπικιλίνη (αντιβιοτικό που επέτρεψε να αναπτυχθούν μόνο τα μετασηματισμένα βακτήρια, αφού ο πλασμιδιακός φορέας περιλαμβάνει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη). Έπειτα από επώαση των τρυβλίων στους 37°C, προκειμένου να αναπτυχθούν αποικίες, μονήρεις αποικίες επιλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία υγρών καλλιεργειών μεγάλης κλίμακας (200 ml LB με αμπικιλίνη). Μετά από ~15 ώρες επώασης στους 37°C, από τις υγρές καλλιέργειες απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA με χρήση του kit NucleoBond Xtra Midi MN 740410.50 (Macherey Nagel). Όλη η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του kit για "low copy plasmid purification". Μετά την απομόνωση, η συγκέντρωση του πλασμιδιακού DNA προσδιορίστηκε με φωτομέτρηση σε nanodrop και πραγματοποιήθηκαν πέψεις ελέγχου με περιοριστικά ένζυμα (επώαση στους 37°C για 2 ώρες, διπλές πέψεις με συνδυασμό XhoI/BamHI, XhoI/NcoI, NcoI/BamHI, μονή πέψη με XhoI). Τέλος, οι πλασμιδιακοί φορείς υποβλήθηκαν σε Sanger sequencing στην εταιρεία Eurofins Genomics/VBC-Biotech (ως primer χρησιμοποιήθηκε ο standard primer for PLKO1 της εταιρείας), προκειμένου να διαπιστωθεί η αλληλουχία των shRNAs.

3.3.2. Δημιουργία σωματιδίων λεντιϊών

Τα σωματίδια των λεντιϊών παρήχθησαν μέσω διαμόλυνσης (transfection) κυττάρων HEK293T με τρία πλασμίδια: το pMDG2 (πλασμίδιο που εκφράζει την πρωτεΐνη VSV-G του ιικού φακέλου), το pCMV-DR8.91 (πλασμίδιο που κωδικοποιεί τα ιικά γονίδια *gag* και *pol*, απαραίτητα για την μετάφραση) και το πλασμίδιο που κωδικοποιεί το εκάστοτε shRNA. Η διαμόλυνση πραγματοποιήθηκε με χρήση λιποφεκταμίνης (Lipofectamine 2000, Invitrogen). Τα ιικά σωματίδια συλλέχθηκαν στις 48 και στις 72 ώρες μετά τη διαμόλυνση.

3.3.3. Δημιουργία KDs

Τα ιικά σωματίδια προστέθηκαν σε καλλιέργειες κυττάρων MOLM-13 και Kasumi-1, προκειμένου να δημιουργηθούν τα μεσολαβούμενα από shRNA KDs του *STAT3* (μεταγωγή, transduction). Τα ιικά σωματίδια απομακρύνθηκαν από την καλλιέργεια 48 ώρες μετά την προσθήκη με φυγοκέντρηση. 24 ώρες μετά τη μεταγωγή ξεκίνησε η επιλογή κυττάρων με προσθήκη πουρομυκίνης στο θεραπευτικό των κυτταροκαλλιεργειών (3 µg/ml για τα MOLM-13 και 8 µg/ml για τα Kasumi-1, οι συγκεντρώσεις προσδιορίστηκαν σε παλαιότερα πειράματα του Εργαστηρίου με καμπύλες βιωσιμότητας).

3.4. Ολικό κυτταρικό εκχύλισμα (Whole cell Extract – WCE)

Ολικό κυτταρικό εκχύλισμα από τα κύτταρα με KD του *STAT3* παρασκευάστηκε με προσθήκη διαλύματος κυτταρικής λύσης (Whole Cell Lysis Buffer: 10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM Na_3VO_4 , 10mM NaF, 5mM EDTA, 1mM PMSF και protease inhibitor cocktail (Roche)). Την προσθήκη του διαλύματος ακολούθησε επώαση στους 4°C για 30 λεπτά. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στα εκχυλίσματα προσδιορίστηκε με την μέθοδο Bradford.

3.5. Στύπωμα Western (Western Blot)

Τα δείγματα που προέκυψαν από το ολικό κυτταρικό εκχύλισμα προετοιμάστηκαν για Western Blot με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας 1x Laemli Buffer (Η σύσταση του 2x Buffer είναι η εξής: 4% SDS, 20% γλυκερόλη, 10% 2-μερκαπτοαιθανόλη, 0.004% μπλε της βρωμοφαινόλης και 0.125M Tris HCl, pH ~ 6.8) και επώαση στους 95°C για 5 λεπτά. 25µg πρωτεΐνης (ανά πηγαδάκι) ηλεκτροφορήθηκαν με SDS-PAGE σε gel ακρυλαμίδης 10% στα 120 Volts για περίπου 1 ώρα και 45 λεπτά (Running Buffer: 25 mM Tris, 192 mM γλυκίνη, 0.1% SDS, Marker: BlueEasy Prestained Protein Marker MWP06 Nippon Genetics). Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε υγρή μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Millipore) στα 395mA για περίπου 1 ώρα και 15 λεπτά (Transfer Buffer: 25 mM Tris, 192 mM γλυκίνη, 20% μεθανόλη). Οι μη ειδικές θέσεις της μεμβράνης καλύφθηκαν με blocking για 1 ώρα με 5% γάλα/1 x TBS/0.05% NP40 (TBS: 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.6). Ακολούθησε επώαση 16 ώρες με πρωτογενή αντισώματα anti-Stat3 (Cell Signaling, cs9139, 1:500 στο blocking buffer, μονοκλωνικό αντίσωμα από ποντικό) και anti-β-actin (Sigma, A1978, 1:20.000 στο blocking buffer, μονοκλωνικό αντίσωμα από ποντικό), πλύσεις των πρωτογενών αντισωμάτων με 1 x TBS/0.5 M NaCl/0.3% Triton X-100 και επώαση για 4 ώρες με δευτερογενές αντίσωμα anti-mouse IgG (Sigma, A9044, 1:20.000 στο blocking buffer, αντίσωμα από κουνέλι, συζευγμένο με το ένζυμο της υπεροξειδάσης – HRP). Η οπτικοποίηση των ζωνών πραγματοποιήθηκε με χρήση υποστρώματος της υπεροξειδάσης (Millipore immobilon Forte Western HRP Substrate) σε φωτογραφικό φιλμ. Τέλος, τα φιλμ

μετατράπηκαν σε ψηφιακή μορφή με σάρωση στο Biorad Scanner και οι ζώνες ποσοτικοποιήθηκαν με χρήση του προγράμματος ImageJ.

3.6. Απομόνωση RNA

Απομόνωση ολικού RNA από τα κύτταρα με KD του *STAT3* πραγματοποιήθηκε με χρήση Trizol (TRI Reagent Sigma), σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας. Μετά την απομόνωση το RNA επαναδιαλύθηκε σε DEPC treated water και η συγκέντρωσή του προσδιορίστηκε με φωτομέτρηση στο nanodrop. Τέλος, η ποιότητα των δειγμάτων ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης 2%.

3.7. Αντίστροφη μεταγραφή και ποσοτική PCR (qPCR)

Το ολικό RNA, που απομονώθηκε με Trizol από τα κύτταρα με KD του *STAT3*, υποβλήθηκε σε επεξεργασία με RQ1 RNase-Free DNaseI (Promega) για να απομακρυνθούν τυχόν προσμίξεις DNA. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε αντίστροφη μεταγραφή, για σύνθεση cDNA, με χρήση του ενζύμου MMLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) και εκκινητών με τυχαίες αλληλουχίες (Random Primers). Τέλος για να προσδιοριστούν τα ποσοστά των KDs που επιτεύχθηκαν πραγματοποιήθηκε Real-time PCR στο μηχάνημα Light Cycler 480 (Roche) με SybrGreen και την πολυμεράση Platinum Taq (Invitrogen). Για την κανονικοποίηση χρησιμοποιήθηκε η έκφραση του γονιδίου *HPRT* και η σχετική ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο $\Delta\Delta C_t$. Οι αλληλουχίες των εκκινητών (primers) με κατεύθυνση 5' προς 3' για το γονίδιο *HPRT* είναι: TTGCTTTCCTTGGTCAGGCAGT (forward), GGCTTATATCCAACACTTCGTGGG (reverse) και για το *STAT3* είναι: CAAGCGAGGACTGAGCATC (forward), TTAGCCCATGTGATCTGACAC (reverse). Το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε είναι το εξής:

Βήμα 1 (x1): 50°C για 2 λεπτά

Βήμα 2 (x1): 95°C για 10 λεπτά (αρχική αποδιάταξη DNA και ενεργοποίηση της πολυμεράσης)

Βήμα 3 (x40): 95°C για 15 δευτερόλεπτα (αποδιάταξη)

60°C για 1 λεπτό (υβριδισμός εκκινητών και επιμήκυνση)

Βήμα 4 (x1): 60°C (καμπύλη τήξης)

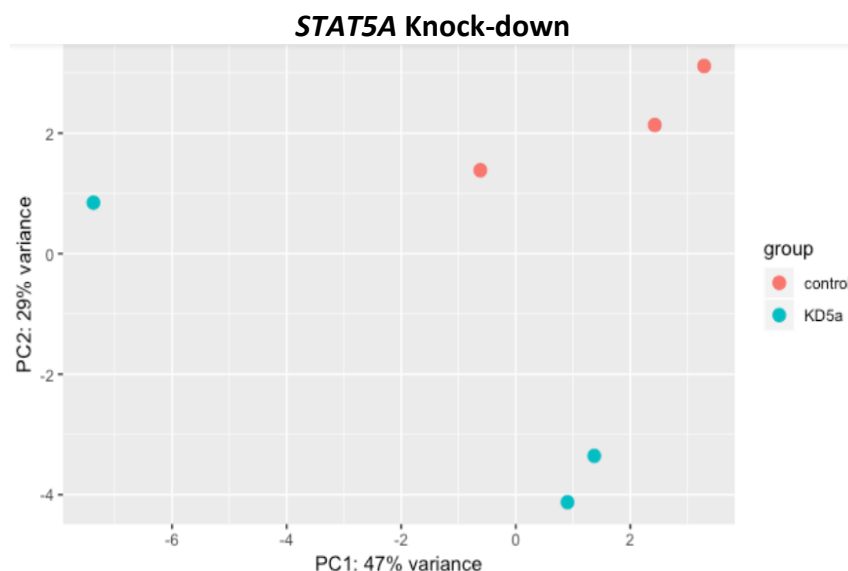
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Βιοπληροφορική ανάλυση για τον προσδιορισμό γονιδίων στόχων του *STAT5A* και του *STAT5B*

Σε δεδομένα RNA-seq που υπήρχαν ήδη στο Εργαστήριο πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση για την εύρεση διαφορικών εκφραζόμενων γονιδίων. Τα δείγματα που αναλύθηκαν προήλθαν από κύτταρα της σειράς MOLM-13 και συγκρίθηκαν 3 βιολογικά αντίγραφα KD του γονιδίου *STAT5A*, 3 βιολογικά αντίγραφα KD του γονιδίου *STAT5B* και 3 βιολογικά αντίγραφα NT control. Στόχος της ανάλυσης ήταν ο προσδιορισμός γονιδίων που ρυθμίζονται από τους παράγοντες *STAT5A* και *STAT5B* στην κυτταρική αυτή σειρά, καθώς και βιολογικών μονοπατιών που επηρεάζονται από την μείωση της έκφρασής τους.

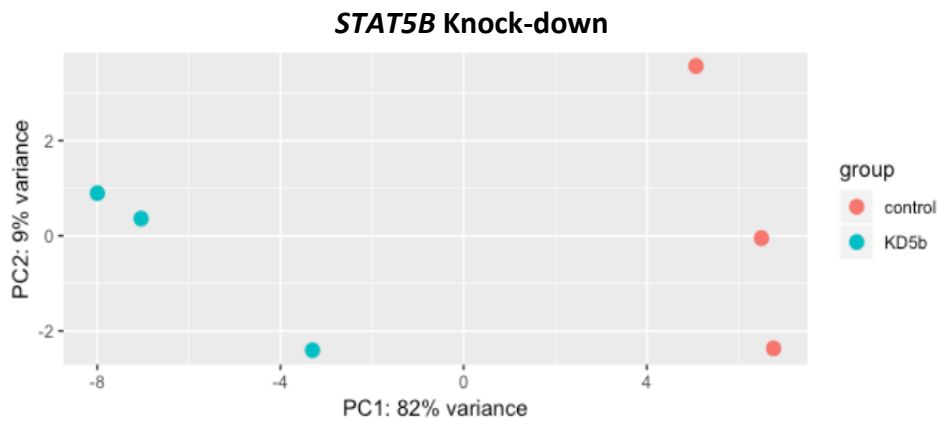
4.1.1. Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Principal Component Analysis – PCA)

Μετά τον μετασχηματισμό των δεδομένων (με λογαρίθμηση), χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος PCA για να απεικονιστούν οι αποστάσεις μεταξύ των δειγμάτων. Η ανάλυση PCA αποτελεί μία γραμμική μέθοδο συμπίεσης δεδομένων. Τα σημεία δεδομένων (δηλαδή το κάθε βιολογικό αντίγραφο σε αυτή την περίπτωση) προβάλλονται στο δισδιάστατο επίπεδο, έτσι ώστε να απλώνονται στις δύο κατευθύνσεις που εξηγούν τις περισσότερες διαφορές στα δείγματα. Ο άξονας x είναι η κατεύθυνση (principal component) που χωρίζει τα σημεία δεδομένων περισσότερο. Η συνάρτηση plotPCA του πακέτου DESeq2 στην R χρησιμοποιήθηκε για τον σκοπό αυτό.



Εικόνα 10. Διάγραμμα PCA των 3 βιολογικών αντιγράφων KD του *STAT5A* (μπλε) και των 3 βιολογικών αντιγράφων NT control (κόκκινο) σε κύτταρα MOLM-13.

Το principal component 1 (PC1) περιγράφει το 47% της συνολικής διακύμανσης των δειγμάτων και το PC2 το 29%.



Εικόνα 11. Διάγραμμα PCA των 3 βιολογικών αντιγράφων KD του STAT5B (μπλε) και των 3 βιολογικών αντιγράφων NT control (κόκκινο) σε κύτταρα MOLM-13.

Το principal component 1 (PC1) περιγράφει το 82% της συνολικής διακύμανσης των δειγμάτων και το PC2 το 9%.

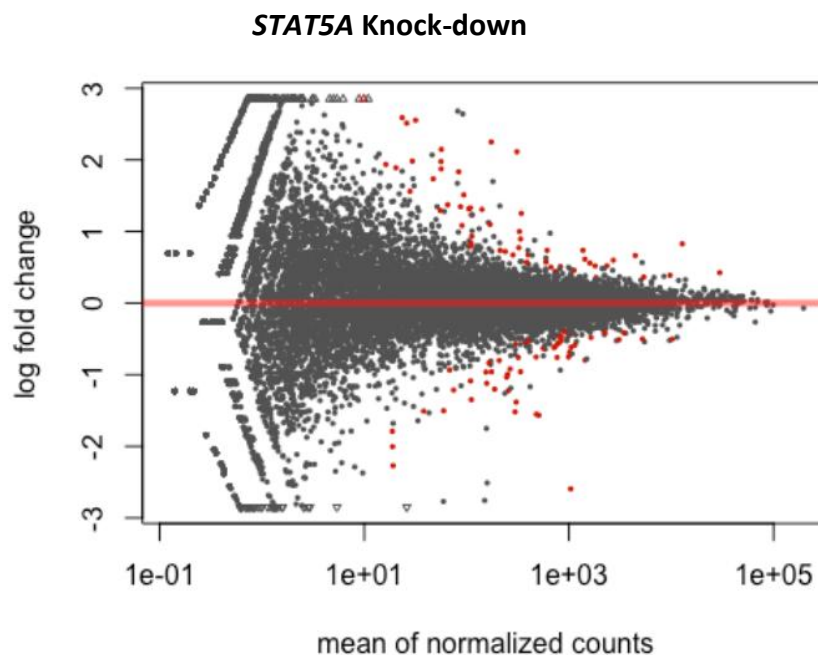
Στην περίπτωση του STAT5B τα δείγματα των KDs διαχωρίζονται αρκετά καλά από τα δείγματα των controls, ενώ στα KDs του STAT5A η ομαδοποίηση δεν είναι βέλτιστη.

4.1.2. Ανάλυση διαφορικής έκφρασης

Για την ανάλυση αυτή χρησιμοποιήθηκε η συνάρτηση DESeq του πακέτου DESeq2 στην R. Τα βασικά συμπεράσματα από την ανάλυση διαφορικής έκφρασης είναι τα ακόλουθα:

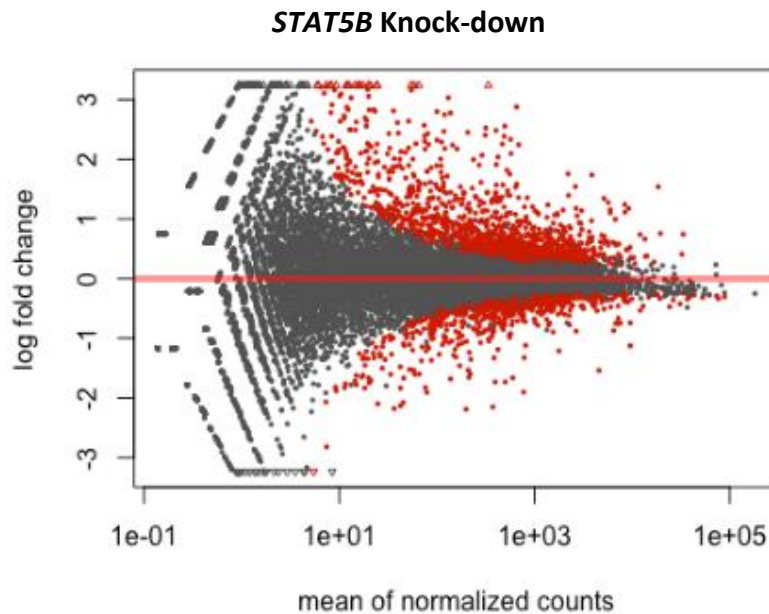
- Στην περίπτωση των KDs του STAT5A επιτεύχθηκε μείωση της έκφρασης του κατά 66% ($p_{adj} = 1.18e^{-16}$, Fold Change (FC) = 0.3411, $\log_2FC = -1.5518$), ενώ στην περίπτωση των KDs του STAT5B κατά 70% ($p_{adj} = 2.47e^{-36}$, Fold Change (FC) = 0.3008, $\log_2FC = -1.7329$).
- Από την σύγκριση των 3 βιολογικών αντιγράφων KD του γονιδίου STAT5A και των 3 βιολογικών αντιγράφων NT control, βρέθηκαν 109 διαφορικά εκφραζόμενα γονίδια. Από αυτά, με στατιστική σημαντικότητα p -adjusted value μικρότερη από 0.1 (μετά από διόρθωση Benjamini – Hochberg), τα 56 γονίδια υπερ-εκφράζονται στην περίπτωση του KD σε σχέση με το control και τα 53 γονίδια υπο-εκφράζονται (Εικόνα 12).
- Αντίστοιχα, από την σύγκριση των 3 βιολογικών αντιγράφων KD του γονιδίου STAT5B και των 3 βιολογικών αντιγράφων no-target control, βρέθηκαν 2.257 διαφορικά εκφραζόμενα γονίδια. Από αυτά, με στατιστική σημαντικότητα p -adjusted value μικρότερη από 0.1 (μετά από διόρθωση Benjamini – Hochberg), τα 1.409 γονίδια υπερ-εκφράζονται στην περίπτωση του KD σε σχέση με το control και τα 848 γονίδια υπο-εκφράζονται (Εικόνα 13).

Για την οπτικοποίηση των διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων χρησιμοποιήθηκε η συνάρτηση plotMA του πακέτου DESeq2 στην R. Ένα διάγραμμα MA (Meta-Analysis) παρέχει μια χρήσιμη επισκόπηση για ένα πείραμα με σύγκριση δύο ομάδων (στην συγκεκριμένη περίπτωση KD και NT control). Στα παρακάτω διαγράμματα (Εικόνες 12, 13) κάθε σημείο αντιπροσωπεύει ένα γονίδιο. Ο άξονας x είναι η μέση έκφραση του γονιδίου σε όλα τα δείγματα (υπολογισμένη ως ο μέσος όρος κανονικοποιημένου αριθμού “διαβασμάτων” που στοιχήθηκαν στο γονίδιο-mean of normalized counts), ο άξονας y είναι ο λογάριθμος του fold change (FC) μεταξύ των δύο συγκρινόμενων καταστάσεων (KD και control). Τα γονίδια με $\text{padj} < 0.1$ εμφανίζονται με κόκκινο χρώμα. Όπως φαίνεται και στα διαγράμματα μόνο τα γονίδια με μεγάλο mean of normalized counts περιέχουν επαρκείς πληροφορίες για να υπολογιστεί μια στατιστικά σημαντική αλλαγή στην έκφραση μεταξύ των δύο καταστάσεων (KD και control).



Εικόνα 12. Διάγραμμα MA των διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων σε KD του STAT5A σε σύγκριση με NT control, σε κύτταρα MOLM-13.

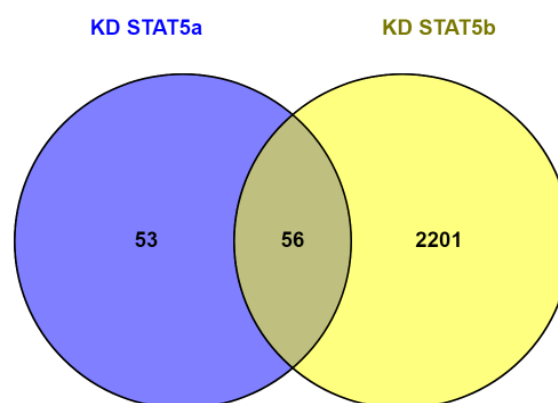
Κάθε σημείο αναπαριστά ένα γονίδιο. Τα γονίδια με $\text{padj} < 0.1$ παρουσιάζονται με κόκκινο χρώμα. Γονίδια με $\log\text{FC} > 0$ υπερ-εκφράζονται στο KD σε σύγκριση με το control, ενώ γονίδια με $\log\text{FC} < 0$ υπο-εκφράζονται. 109 γονίδια με διαφορεική έκφραση εντοπίζονται.



Εικόνα 13. Διάγραμμα MA των διαφορικών εκφραζόμενων γονιδίων σε KD του *STAT5B* σε σύγκριση με NT control, σε κύτταρα MOLM-13.

Κάθε σημείο αναπαριστά ένα γονίδιο. Τα γονίδια με $padj < 0.1$ παρουσιάζονται με κόκκινο χρώμα. Γονίδια με $logFC > 0$ υπερ-εκφράζονται στο KD σε σύγκριση με το control, ενώ γονίδια με $logFC < 0$ υπο-εκφράζονται. 2.257 γονίδια με διαφορετική έκφραση εντοπίζονται.

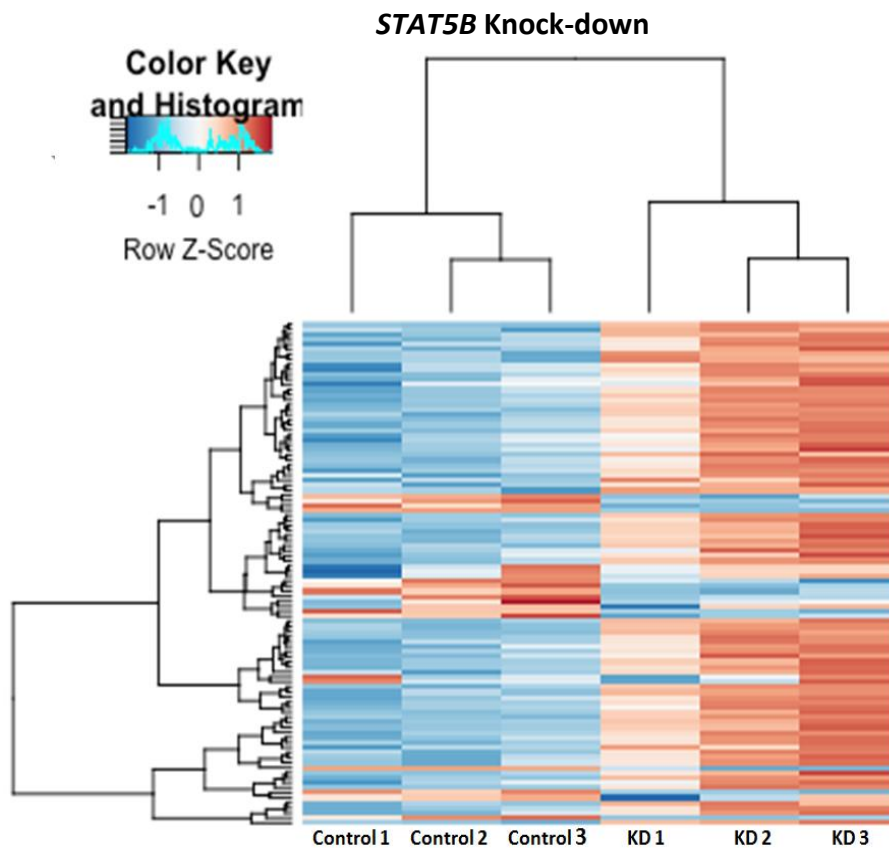
Όπως φαίνεται και στα διαγράμματα MA, τα γονίδια των οποίων η έκφραση μεταβάλλεται στατιστικώς σημαντικά στην περίπτωση του KD του *STAT5B* συγκριτικά με το NT control είναι πολύ περισσότερα από την περίπτωση του KD του *STAT5A*. Στο παρακάτω διάγραμμα Venn (Εικόνα 14) παρουσιάζεται ο αριθμός των κοινών γονιδίων, των οποίων η έκφραση αλλάζει στα KD του *STAT5A* και του *STAT5B* σε σύγκριση με το NT control.



Εικόνα 14. Διάγραμμα Venn των διαφορικών εκφραζόμενων γονιδίων των KDs του *STAT5A* (μπλε) και του *STAT5B* (κίτρινο) σε σύγκριση με το NT control, στα κύτταρα MOLM-13.

Στην περίπτωση του KD του *STAT5A* βρέθηκαν 109 στατιστικώς σημαντικά ($padj < 0.1$) διαφορικών εκφραζόμενα γονίδια, ενώ του *STAT5B* 2.257. Τα 56 από αυτά τα γονίδια είναι κοινά στις δύο καταστάσεις.

Λόγω των πολύ περισσότερων στατιστικώς σημαντικών διαφορικών εκφραζόμενων γονιδίων του KD του *STAT5B* και του καλού διαχωρισμού των βιολογικών αντιγράφων του KD από τα βιολογικά αντίγραφα του NT control στην ανάλυση PCA, επιλέχθηκε ο *STAT5B* για περαιτέρω ανάλυση. Ιεραρχική ομαδοποίηση (clustering) των δειγμάτων (βιολογικά αντίγραφα) KD του *STAT5B* και της ομάδας NT control πραγματοποιήθηκε με βάση το προφίλ έκφρασης. Για τον σκοπό αυτό, χάρτης θερμότητας (Heatmap) δημιουργήθηκε με την συνάρτηση heatmap.2 του πακέτου gplots στην R (Εικόνα 15). Όπως ήταν αναμενόμενο το προφίλ έκφρασης των δειγμάτων KD του *STAT5B* ήταν παρόμοιο, με αποτέλεσμα τα δείγματα αυτά να ομαδοποιούνται μαζί. Αντίστοιχα, παρόμοιο προφίλ έκφρασης παρουσιάζουν και τα δείγματα της ομάδας NT control και σχηματίζουν μία ομάδα (cluster).

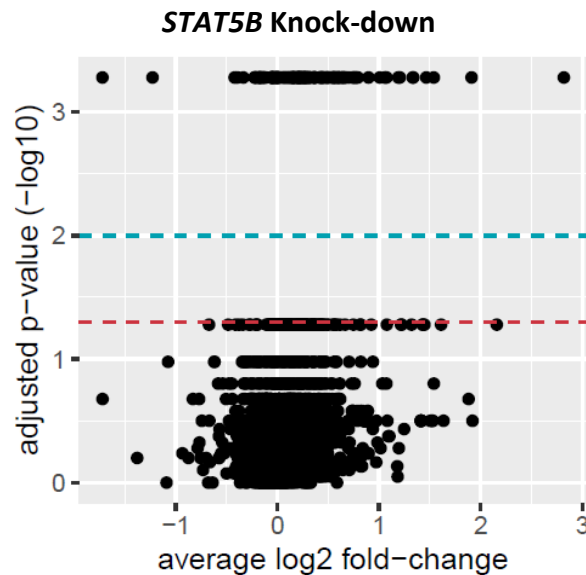


Εικόνα 15. Heatmap των 100 γονιδίων των οποίων η έκφραση μεταβάλλεται περισσότερο στο KD του *STAT5B* σε σύγκριση με το NT control, σε κύτταρα MOLM-13.

Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει ένα δείγμα (βιολογικό αντίγραφο) και κάθε γραμμή ένα γονίδιο (με $\text{padj} < 0.1$). Με μπλε παρουσιάζονται τα γονίδια που υπο-εκφράζονται στην κατάσταση του KD του *STAT5B* συγκριτικά με την κατάσταση control, ενώ με κόκκινο τα γονίδια που υπερ-εκφράζονται. Η ένταση του χρώματος αντικατοπτρίζει την αλλαγή (όσο πιο έντονο, τόσο μεγαλύτερο το FC).

4.1.3. Ανάλυση εμπλουτισμού μονοπατιών (Pathway Enrichment Analysis)

Προκειμένου να διερευνηθούν τα μονοπάτια και οι βιολογικές λειτουργίες που επηρεάζονται από το KD του *STAT5B* στα κύτταρα MOLM-13 πραγματοποιήθηκε ανάλυση με την βάση δεδομένων βιολογικών μονοπατιών Reactome. Συνολικά βρέθηκαν 2.419 μονοπάτια διαφορετικώς εκφρασμένα στην περίπτωση του KD του *STAT5B* συγκριτικά με το NT control με $p\text{-value} \leq 0.05$.



Εικόνα 16. Διάγραμμα “ηφαίστειο” (volcano plot) των μονοπατιών που βρέθηκαν διαφορετικώς εκφρασμένα στην περίπτωση του KD του *STAT5B* συγκριτικά με το NT control, σε κύτταρα MOLM-13.

Κάθε σημείο είναι ένα μονοπάτι. Ο άξονας x αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή \log_2 fold-change όλων των γονιδίων εντός του μονοπατιού. Ο άξονας y αντιπροσωπεύει την τιμή p (προσαρμοσμένη και μετασχηματισμένη με $-\log_{10}$) με τις μεγαλύτερες τιμές να είναι πιο σημαντικές. Η κόκκινη γραμμή αντιπροσωπεύει $p = 0.05$ και η μπλε γραμμή $p = 0.01$.

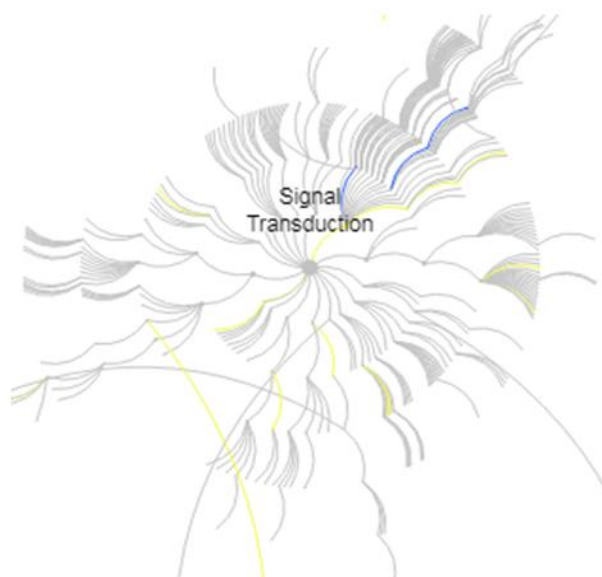
Από όλα τα μονοπάτια επιλέχθηκαν αυτά που στην ανάλυση εμπλουτισμού παρουσίασαν FDR (False Discovery Rate) μικρότερο του 0.01 και ομαδοποιήθηκαν στις βασικές κατηγορίες λειτουργιών που διαθέτει το Reactome. Στις Εικόνες και τους Πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζονται 14 βασικές κατηγορίες λειτουργιών, όπως η μεταγραφική ρύθμιση, η ομοιόσταση, ο μεταβολισμός των RNA μορίων, ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος και η μεταγωγή σήματος, στις οποίες κατηγοριοποιήθηκαν 72 μονοπάτια, που ενεργοποιούνται ή απενεργοποιούνται στην κατάσταση του KD του *STAT5B* σε σύγκριση με την κατάσταση NT control. Στις παρακάτω Εικόνες και Πίνακες με κίτρινο επισημαίνονται τα μονοπάτια που ρυθμίζονται θετικά (up-regulated) και με μπλε τα μονοπάτια που ρυθμίζονται αρνητικά (down-regulated). Ο αριθμός γονιδίων των πινάκων αναφέρεται στα διαφορετικώς εκφραζόμενα γονίδια που εμπλέκονται σε κάθε μονοπάτι.

- **Ανοσοποιητικό σύστημα**



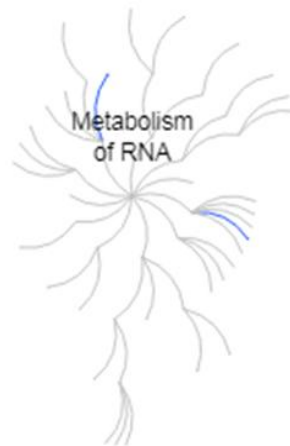
Μονοπάτι	Αριθμός γονιδίων
Μεσολαβούμενη από TRAF6 ενεργοποίηση NF-kB	24
Σηματοδότηση μέσω υποδοχέα αυξητικής ορμόνης	21
Σηματοδότηση μέσω υποδοχέα προλακτίνης	13
Ενεργοποίηση STAT5	8
Σηματοδότηση με INF	164
Σηματοδότηση με IL-4 και IL-13	90
Φαγοκυττάρωση μεσολαβούμενη από τον υποδοχέα (FCGR)	80
Σηματοδότηση με INF - γ	74
Συν-ενεργοποίηση από την οικογένεια CD28	56
Αλληλεπιδράσεις DAP12	36
Αντιμικροβιακά πεπτίδια	29
Ρόλος φωσφολιπιδίων στην φαγοκυττάρωση	25
Φωσφορυλίωση CD3	14
Σηματοδότηση με IL-18	5
Ενεργοποίηση μονοπατιού λεκτίνης του συμπληρώματος	4
Τελικό μονοπάτι συμπληρώματος	4

- **Μεταγωγή σήματος**



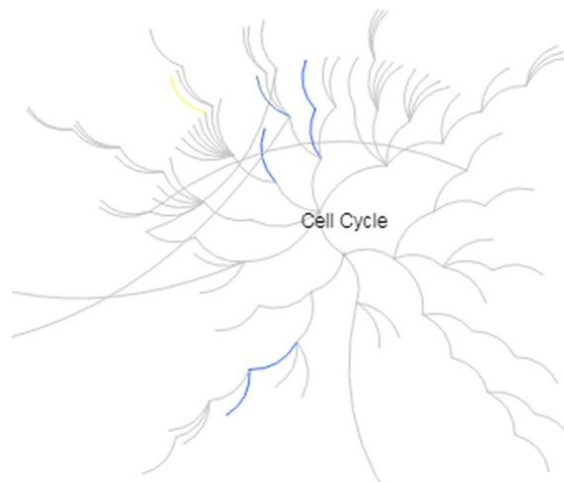
Μονοπάτι	Αριθμός γονιδίων
Σηματοδότηση με EGFR	42
Σηματοδότηση με NTRK3 (TRKC)	15
Σηματοδότηση από υποδοχείς κινασών τυροσίνης	424
Σηματοδότηση από VEGF	93
Μονοπάτι VEGFA-VEGFR2	87
Κύκλος RAC3 GTPase	87
Κύκλος RND1 GTPase	36
Σηματοδότηση με DAG και IP3	35
Ανακύκλωση υποδοχέων ινσουλίνης	21
Ενεργοποίηση MAPK1/3 μεσολαβούμενη από RAF	20
Μεσολαβούμενος από VEGFR2 κυτταρικός πολλαπλασιασμός	17
Ενεργοποίηση NF-κB και σηματοδότηση κυτταρικής επιβίωσης	12
Ενεργοποίηση STAT5 από ερυθροποιητίνη	8

- **Μεταβολισμός RNA**



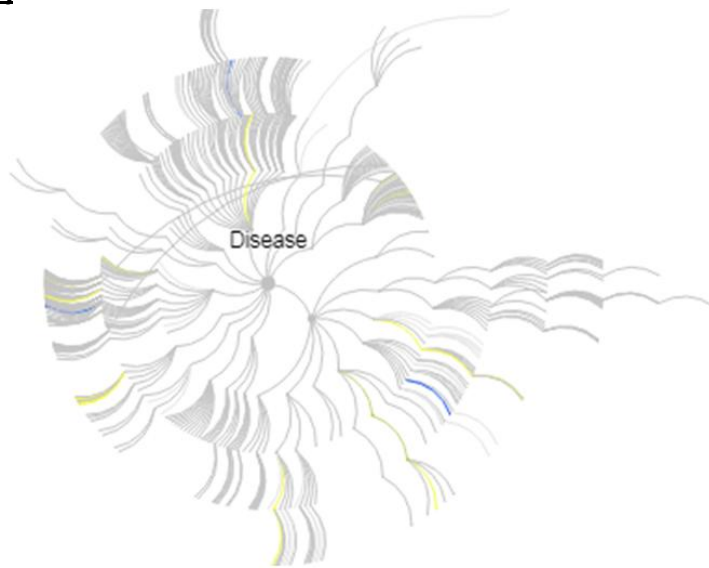
Μονοπάτι	Αριθμός γονιδίων
Δέσμευση του παράγοντα BRF1 (Butyrate Response Factor 1) στο mRNA και αποσταθεροποίησή του	17
Τροποποίηση tRNA στα μιτοχόνδρια	9

- **Κυτταρικός κύκλος**



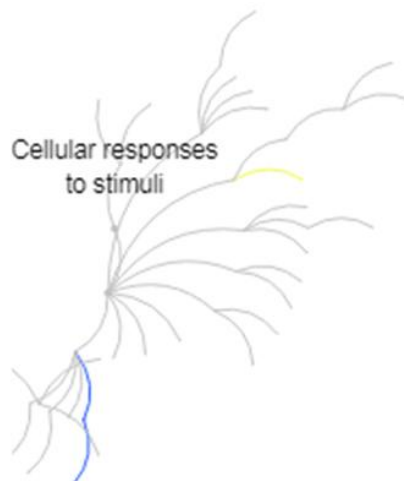
Μονοπάτι	Αριθμός γονιδίων
Επέκταση τελομερών	48
Φάση G1	44
Αναστολή έναρξης αντιγραφής DNA με βλάβες	13
Έναρξη αντιγραφής DNA	8
Φάση G2	5
Φωσφορυλίωση πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην μετάβαση G2/M από σύμπλοκα κυκλίνης A:Cdc2	3

- **Ασθένειες**



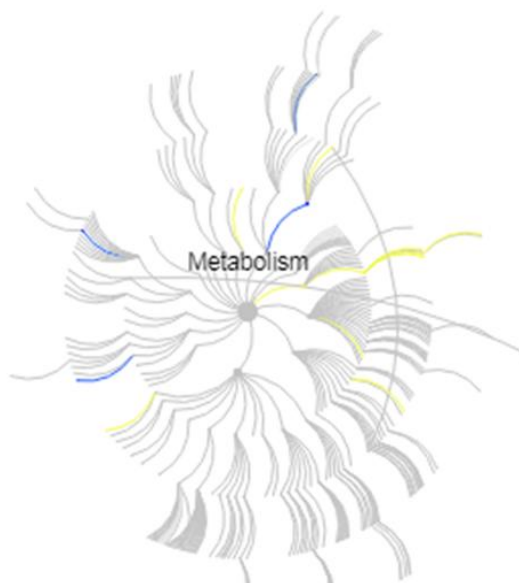
Μονοπάτι	Αριθμός γονιδίων
Αναστολή της PKR (Protein Kinase R)	1
Ενεργοποίηση μεταλλαγμένου υποδοχέα FGFR4	1
Μετάφραση δομικών πρωτεϊνών	45
Σύνθεση IL10 μεσολαβούμενη από FCGR3A	37
Σηματοδότηση KIT σε ασθένεια	19
Καταστολή ωρίμανσης φαγοσωμάτων	13
Αναστολή παραγωγής νιτρικού οξέος	3

- **Κυτταρική απόκριση σε σηματοδότηση**



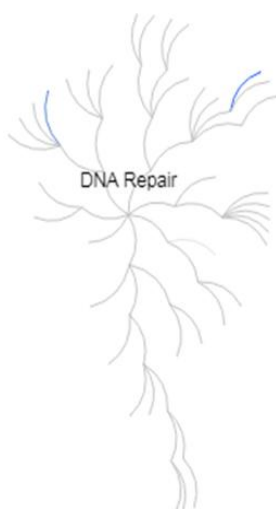
Μονοπάτι	Αριθμός γονιδίων
Ενεργοποίηση τσαπερονών από ATF6 (ATF6-alpha)	12
Απομάκρυνση ενεργών ριζών οξυγόνου	30

- **Μεταβολισμός**



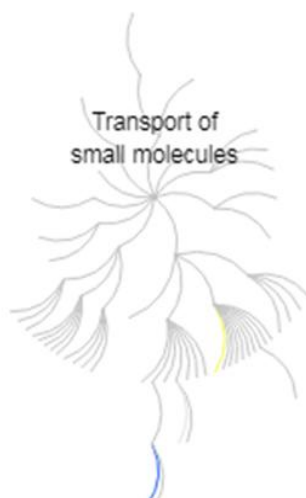
Μονοπάτι	Αριθμός γονιδίων
Μεταβολισμός νικοτίνης	23
Βιοσύνθεση πουρινικών μονοφωσφορικών ριβονουκλεοσιδίων	12
Ρύθμιση έκκρισης ινσουλίνης	63
Ρύθμιση έκκρισης ινσουλίνης από GLP1 (Glucagon-like Peptide-1)	33
Ρύθμιση έκκρισης ινσουλίνης από ακετυλοχολίνη	9
Ρύθμιση έκκρισης ινσουλίνης από ελεύθερα λιπαρά οξέα	9
Καταβολισμός θρεονίνης	4
Βιοσύνθεση φρουκτόζης	2

- **Επιδιόρθωση DNA**



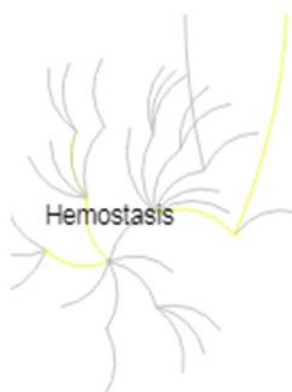
Μονοπάτι	Αριθμός γονιδίων
Επιδιόρθωση με εκτομή βάσης εξαρτώμενη από PCNA	19

- Μεταφορά μικρών μορίων



Μονοπάτι	Αριθμός γονιδίων
Μεταφορά ιόντων ασβεστίου στα μιτοχόνδρια	20
Πρόσληψη και μεταφορά σιδήρου	49
Ενδοκύττωση και ανακύκλωση τρανσφερίνης	26
Μεταφορά αμινοξέων μέσα από την πλασματική μεμβράνη	25

- Ομοιόσταση



Μονοπάτι	Αριθμός γονιδίων
Αλληλεπίδραση κυτταρικών επιφανειών στο αγγειακό τοίχωμα	102
Ομοιόσταση αιμοπεταλίων	68

- Γονιδιακή έκφραση (μεταγραφή)



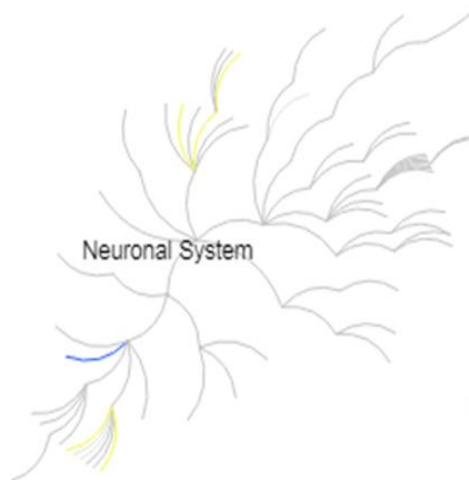
Μονοπάτι	Αριθμός γονιδίων
Ρύθμιση δράσης του TP53 μέσω φωσφορυλίωσης	84
Μεταγραφή μεσολαβούμενη από FOXO	54
Ρύθμιση μεταγραφής γονιδίων κυτταρικού κύκλου από το TP53	48
Μεταγραφή, μεσολαβούμενη από FOXO, γονιδίων που σχετίζονται με οξειδωτικό στρες και μεταβολισμό	21

- Προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος



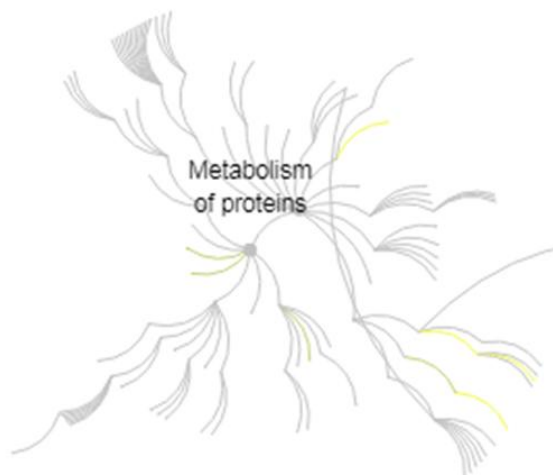
Μονοπάτι	Αριθμός γονιδίων
Ενεργοποίηση, μετατόπιση και ολιγομερισμός του BAX	2

- Νευρικό σύστημα



Μονοπάτι	Αριθμός γονιδίων
Κανάλια HCN	1
Κύκλος απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστή νορεπινεφρίνης	14
Σύνθεση, απελευθέρωση, επαναπρόσληψη και αποικοδόμηση του GABA	13

- Μεταβολισμός πρωτεϊνών



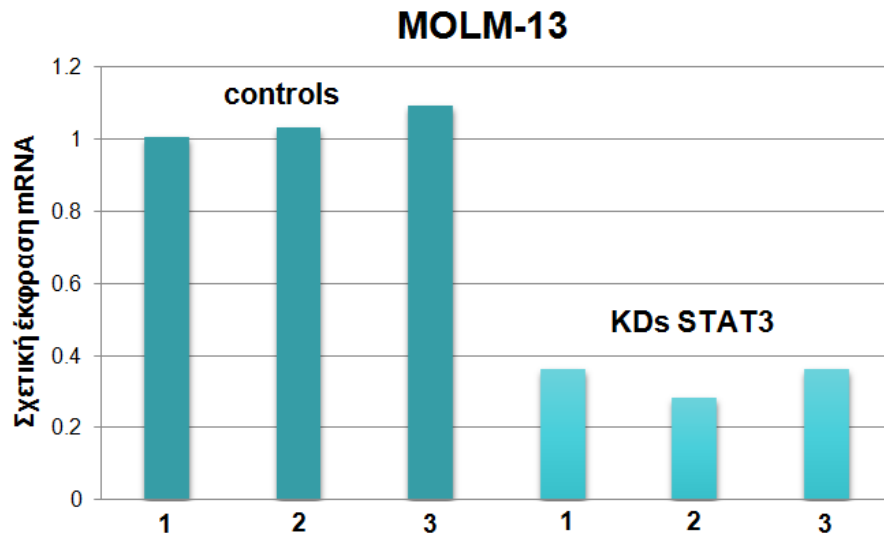
Μονοπάτι	Αριθμός γονιδίων
Ο-γλυκοζυλίωση πρωτεϊνών που φέρουν TSR επικράτεια	26
Διαμέρισμα ποιοτικού ελέγχου ER (ER Quality Control Compartment - ERQC)	20
Αντιδράσεις ειδικές για το μονοπάτι σύνθεσης του συμπλόκου N-γλυκάνης	6

Από τις παραπάνω αναλύσεις προκύπτει ότι ο παράγοντας STAT5 ρυθμίζει είτε θετικά, είτε αρνητικά την έκφραση μεγάλου αριθμού γονιδίων. Οι βιολογικές λειτουργίες που επηρεάζονται από την μείωση της έκφρασής του είναι ποικίλες και συμμετέχουν τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Ο ρόλος και η σημασία του παράγοντα αυτού υπογραμμίζεται από την συμμετοχή του σε βασικές λειτουργίες του κυτταρικού κύκλου, του ανοσοποιητικού συστήματος, της κυτταρικής απόκρισης σε σηματοδότηση κ.ά. Κάποια από τα μονοπάτια που επηρεάζονται από την μείωση της έκφρασης του *STAT5B* σε κύτταρα της σειράς MOLM-13 έχουν αποδεδειγμένη εμπλοκή στον καρκίνο, όπως η σηματοδότηση μέσω υποδοχέα αυξητικής ορμόνης, η αντιγραφή DNA με βλάβες, ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, η μεταγραφική ρύθμιση από τον μεταγραφικό παράγοντα FOXO, η επιδιόρθωση του DNA και η ρύθμιση της δράσης του TP53 μέσω φωσφορυλίωσης. Το γεγονός αυτό αποτελεί μια ένδειξη εμπλοκής του *STAT5B* στην ΟΜΛ. Περισσότερα και εγκυρότερα αποτελέσματα θα μπορούσαν να εξαχθούν με την επίτευξη δημιουργίας δειγμάτων με μεγαλύτερα ποσοστά KD.

4.2. Δημιουργία KDs του STAT3

Προκειμένου να μελετηθεί ο ρόλος του παράγοντα STAT3 και των γονιδίων στόχων του στην ΟΜΛ, όπως και στην περίπτωση του STAT5, δημιουργήθηκαν KDs μέσω μεταφοράς shRNAs με λεντιϊούς σε κύτταρα των σειρών MOLM-13 και Kasumi-1 (κυτταρικές σειρές ΟΜΛ). Τελικός στόχος ήταν τα δείγματα του KD του STAT3 και της ομάδας NT control να χρησιμοποιηθούν για RNA-seq και για αντίστοιχη μετέπειτα βιοπληροφορική ανάλυση για την εύρεση διαφορικώς εκφραζόμενων γονιδίων και ανάλυση εμπλουτισμού μονοπατιών. Τα ποσοστά KD του STAT3 που επιτεύχθηκαν προσδιορίστηκαν σε επίπεδο mRNA με RT-qPCR και σε επίπεδο πρωτεΐνης με Western Blot.

4.2.1. RT-qPCRs



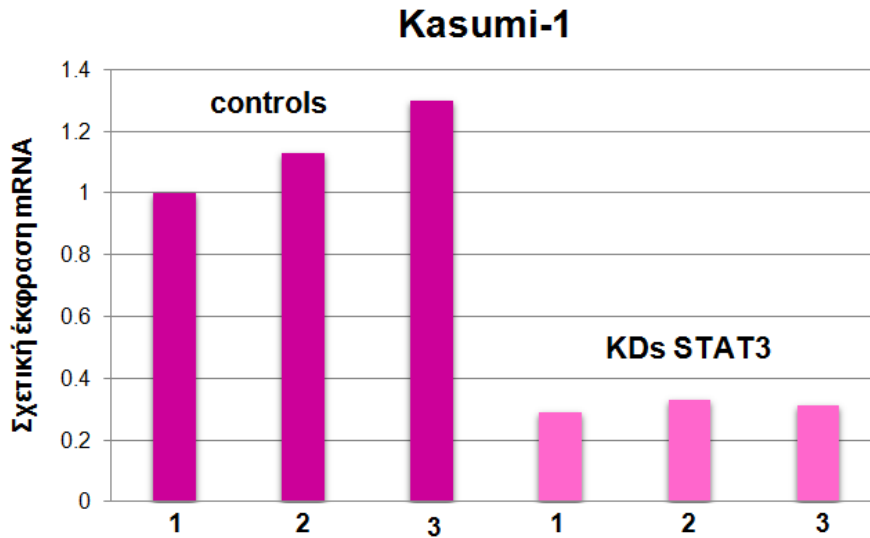
Εικόνα 17. Επίπεδα έκφρασης του STAT3 στα 3 βιολογικά αντίγραφα NT control και στα 3 βιολογικά αντίγραφα του KD στα κύτταρα MOLM-13, όπως προσδιορίστηκαν με qPCR.

Η κανονικοποίηση έχει πραγματοποιηθεί με βάση την έκφραση του γονιδίου HPRT.

Τα ποσοστά KD του STAT3 που επιτεύχθηκαν στα κύτταρα MOLM-13, όπως προσδιορίστηκαν με qPCR, παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα (Πίνακας 4).

MOLM-13		
Δείγμα	Σχετική έκφραση mRNA	% KD
Control 1	1	-
Control 2	1.03	-
Control 3	1.09	-
KD 1	0.36	64%
KD 2	0.28	72%
KD 3	0.36	64%

Πίνακας 4. Ποσοστό KD του STAT3 που επιτεύχθηκε στα 3 βιολογικά αντίγραφα στα κύτταρα MOLM-13, όπως προσδιορίστηκαν με qPCR.



Εικόνα 18. Επίπεδα έκφρασης του STAT3 στα 3 βιολογικά αντίγραφα NT control και στα 3 βιολογικά αντίγραφα του KD στα κύτταρα Kasumi-1, όπως προσδιορίστηκαν με qPCR.

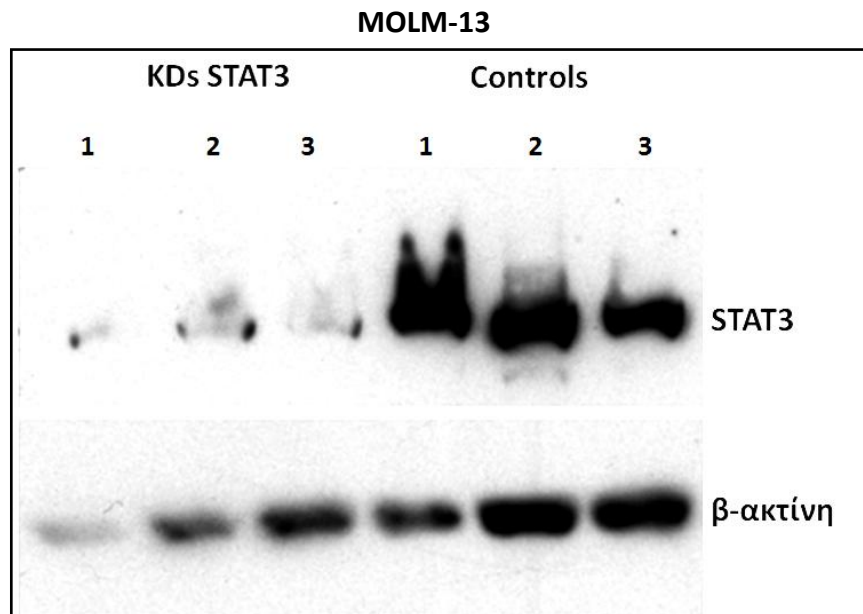
Η κανονικοποίηση έχει πραγματοποιηθεί με βάση την έκφραση του γονιδίου HPRT.

Τα ποσοστά KD του STAT3 που επιτεύχθηκαν στα κύτταρα Kasumi-1, όπως προσδιορίστηκαν με qPCR, παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα (Πίνακας 5).

Kasumi-1		
Δείγμα	Σχετική έκφραση mRNA	% KD
Control 1	1	-
Control 2	1.13	-
Control 3	1.3	-
KD 1	0.29	71%
KD 2	0.33	67%
KD 3	0.31	69%

Πίνακας 5. Ποσοστό KD του STAT3 που επιτεύχθηκε στα 3 βιολογικά αντίγραφα στα κύτταρα Kasumi-1, όπως προσδιορίστηκαν με qPCR.

4.2.2. Western Blots



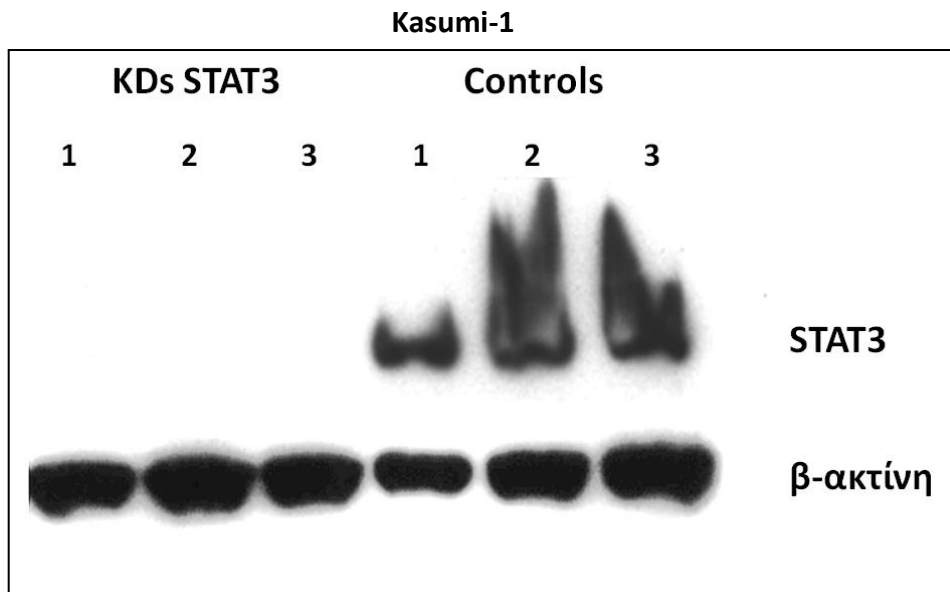
Εικόνα 19. Western Blot των 3 βιολογικών αντιγράφων του KD του STAT3 και των 3 βιολογικών αντιγράφων NT control στα κύτταρα MOLM-13.

Η κανονικοποίηση έχει πραγματοποιηθεί με βάση την έκφραση της β-ακτίνης.

Όπως φαίνεται και στην παραπάνω Εικόνα, στα KDs του STAT3 στα κύτταρα MOLM-13 η ποσότητα της πρωτεΐνης του παράγοντα είναι μειωμένη, επομένως τα KDs μπορούν να θεωρηθούν επιτυχημένα. Τα ποσοστά των KDs προσδιορίστηκαν με την βοήθεια του προγράμματος ImageJ και παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα (Πίνακας 6).

MOLM-13	
Δείγμα	% KD
Control 1	-
Control 2	-
Control 3	-
KD 1	54%
KD 2	45%
KD 3	49%

Πίνακας 6. Ποσοστό KD του STAT3 που επιτεύχθηκε στα 3 βιολογικά αντίγραφα στα κύτταρα MOLM-13, όπως προσδιορίστηκαν με το ImageJ.



Εικόνα 20. Western Blot των 3 βιολογικών αντιγράφων του KD του STAT3 και των 3 βιολογικών αντιγράφων NT control στα κύτταρα Kasumi-1.

Η κανονικοποίηση έχει πραγματοποιηθεί με βάση την έκφραση της β-ακτίνης.

Όπως φαίνεται και στην παραπάνω Εικόνα, στα KDs του STAT3 στα κύτταρα Kasumi-1 η ποσότητα της πρωτεΐνης του παράγοντα είναι μειωμένη, επομένως τα KDs μπορούν να θεωρηθούν επιτυχημένα. Τα ποσοστά των KDs προσδιορίστηκαν με την βοήθεια του προγράμματος ImageJ και παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Kasumi-1	
Δείγμα	% KD
Control 1	-
Control 2	-
Control 3	-
KD 1	100%
KD 2	100%
KD 3	100%

Πίνακας 7. Ποσοστό KD του STAT3 που επιτεύχθηκε στα 3 βιολογικά αντίγραφα στα κύτταρα Kasumi-1, όπως προσδιορίστηκαν με το ImageJ.

Με βάση τα αποτελέσματα του RT-qPCR και του Western Blot επιβεβαιώθηκε επαρκές ποσοστό KD του STAT3 στα 3 βιολογικά αντίγραφα, τα οποία μαζί με τα 3 βιολογικά αντίγραφα του NT control, για κάθε κυτταρική σειρά έχουν ήδη σταλεί για RNA-seq.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αιμοποίηση αποτελεί μια σύνθετη διαδικασία και διαταραχές σε οποιοδήποτε στάδιό της οδηγούν στην εμφάνιση ασθενειών. Μια σχετιζόμενη με το αιμοποιητικό σύστημα ασθένεια είναι και η ΟΜΛ, η οποία θεωρείται η πιο κοινή μορφή οξείας λευχαιμίας στους ενήλικες. Η εύρεση νέων θεραπευτικών στόχων της ασθένειας κρίνεται απαραίτητη, καθώς προσβάλλει έναν μεγάλο αριθμό ασθενών ετησίως. Οι παράγοντες της οικογένειας STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) εμπλέκονται σε φυσιολογικές κυτταρικές διεργασίες αλλά και σε ασθένειες. Πολλές μορφές καρκίνων, συμπεριλαμβανομένων και των αιματολογικών κακοηθειών, έχουν συσχετιστεί με τα μέλη της οικογένειας. Ανάλυση ασθενών με ΟΜΛ έδειξε συνεχή ενεργοποίηση του STAT5 στο 80% και του STAT3 στο 74% των περιπτώσεων.

Περισσότερα στοιχεία που αποδεικνύουν την συμμετοχή των παραγόντων STAT3 και STAT5 στην ΟΜΛ προσφέρουν οι έρευνες που φανερώνουν ότι σε μοντέλα ΟΜΛ, ο STAT3 είναι απαραίτητος για την καρκινογένεση που επάγεται από το γονίδιο *c-KIT*. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί έναν υποδοχέα κυτοκίνης με δράση κινάσης τυροσίνης (γνωστός και ως υποδοχέας αυξητικού παράγοντα μαστικών/βλαστικών κυττάρων, mast/stem cell growth factor receptor-SCFR), που εκφράζεται κυρίως στην επιφάνεια των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων και έχει χαρακτηριστεί ως πρώτο ογκογονίδιο. Όσον αφορά τον STAT5 φαίνεται να παίζει ρόλο στην διατήρηση των μυελοειδών λευχαιμικών βλαστικών κυττάρων. Κύτταρα CD34⁺ ΟΜΛ χαρακτηρίζονται από συνεχή ενεργοποίηση του STAT5 και αποσιώπησή του σε αυτά τα κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα μείωση της ανάπτυξής τους.

Η βιολογία των STATs δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί και η μελέτη τους είναι απαραίτητη προκειμένου να αποκαλυφθεί ο ρόλος τους τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Στην παρούσα Διπλωματική Εργασία επιχειρήθηκε μια προσπάθεια αποσαφήνισης του μηχανισμού μέσω του οποίου ο STAT5 και ο STAT3 συμμετέχουν στην παθοβιολογία της ΟΜΛ. Για τον σκοπό αυτό, μελετήθηκαν δεδομένα από RNA-seq με βιοπληροφορικές μεθόδους. Ως αποτέλεσμα, αποκαλύφθηκαν αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων στόχων των STAT5A και STAT5B, σε κύτταρα της σειράς MOLM-13 (κυτταρική σειρά ΟΜΛ). Οι αλλαγές είχαν προκληθεί από KD, μέσω shRNA μορίων, ενός εκ των δύο κάθε φορά παραγόντων, συγκριτικά με μια ομάδα ελέγχου, στην οποία δεν πραγματοποιήθηκε KD. Μετέπειτα ανάλυση εμπλουτισμού αποκάλυψε τα μονοπάτια τα οποία μεταβάλλονται στα KDs του *STAT5B* και κατ'επέκταση φαίνεται να ρυθμίζονται από τον παράγοντα αυτό, στην κυτταρική σειρά MOLM-13. Παράλληλα, δημιουργήθηκαν KDs του *STAT3* σε κύτταρα των σειρών MOLM-13 και Kasumi-1 (κυτταρικές σειρές ΟΜΛ), προκειμένου μελλοντικά να υποβληθούν σε RNA-seq και

να αποκαλύψουν την επίδραση του STAT3 στην ρύθμιση βιολογικών λειτουργιών στην ασθένεια της ΟΜΛ.

Τα βασικότερα συμπεράσματα που προέκυψαν από την βιοπληροφορική ανάλυση είναι ότι τα γονίδια των οποίων η έκφραση μεταβάλλεται στατιστικώς σημαντικά στην περίπτωση του KD του *STAT5B* συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (2.257 γονίδια) είναι πολύ περισσότερα από την περίπτωση του KD του *STAT5A* (109 γονίδια). Το γεγονός αυτό πιθανόν να φανερώνει ότι ο παράγοντας *STAT5B* έχει μεγαλύτερη επίδραση στην ΟΜΛ συγκριτικά με τον παράγοντα *STAT5A*. Στην περίπτωση του KD του *STAT5B*, τα μονοπάτια που επηρεάζονται συμμετέχουν σε σημαντικές λειτουργίες, πολλές εκ των οποίων έχουν συσχετιστεί με τον καρκίνο, ενισχύοντας την εμπλοκή του *STAT5B* στην ΟΜΛ. Λειτουργίες όπως η μεταγωγή σήματος, η κυτταρική απόκριση σε σηματοδότηση, ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, η επιδιόρθωση DNA και η γονιδιακή έκφραση επηρεάζονται από την αποσιώπηση του *STAT5B*. Χαρακτηριστικά μονοπάτια που παρουσιάζονται ενεργοποιημένα ή κατεσταλμένα συμπεριλαμβάνουν τη σηματοδότηση μέσω του υποδοχέα της αυξητικής ορμόνης και τη μεταγραφική ρύθμιση από τον μεταγραφικό παράγοντα FOXO γονιδίων που σχετίζονται με οξειδωτικό στρες και μεταβολισμό. Ως γνωστόν οι πρωτεΐνες FOXO παίζουν σημαντικό ρόλο στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου, την επιδιόρθωση του DNA και την απόπτωση, λειτουργίες που επηρεάζονται στον καρκίνο. Τέλος, η μείωση της έκφρασης του *STAT5B* έχει αντίκτυπο και στην ρύθμιση της δράσης του ογκοκαταστολέα TP53, ο οποίος παίζει ρόλο στη ρύθμιση ή την εξέλιξη μέσω του κυτταρικού κύκλου, της απόπτωσης και της γονιδιακής σταθερότητας. Σύμφωνα με τα παραπάνω, ο παράγοντας *STAT5* φαίνεται να συμμετέχει στην ρύθμιση πολύπλοκων δικτύων, επιδρώντας σε μεγάλο αριθμό βιολογικών μονοπατιών. Η αξία των *STAT3* και *STAT5* ως θεραπευτικοί στόχοι της ΟΜΛ και ως μοριακοί δείκτες του σταδίου της ασθένειας, για την έγκαιρη διάγνωση και για την παρακολούθηση της εξέλιξής της έχει αρχίσει να γίνεται αντιληπτή.

Η Διπλωματική αυτή Εργασία έδωσε κάποιες πρώτες κατευθύνσεις σχετικά με το ποια μονοπάτια επηρεάζει ο *STAT5* στην ΟΜΛ και επομένως με ποιον μηχανισμό εμπλέκεται στην ασθένεια αυτή. Όμως, ο πλήρης μηχανισμός δεν έχει διαλευκανθεί και στο μέλλον απαιτούνται επιπλέον πειράματα προς αυτή την κατεύθυνση. Τα αποτελέσματα που αναμένονται από το RNA-seq των KDs του *STAT3* θα βοηθήσουν στην διερεύνηση του τρόπου με τον οποίο συμβάλλει και ο παράγοντας αυτός στην ΟΜΛ. Περισσότερα και εγκυρότερα συμπεράσματα θα μπορούσαν να εξαχθούν με την επίτευξη μεγαλύτερων ποσοστών KDs του *STAT5A* και του *STAT5B*. Επίσης, μεγάλο ενδιαφέρον θα είχε και η μελέτη της συνδυαστικής δράσης των παραγόντων *STAT3* και *STAT5* στην πρόοδο της ασθένειας. Μελλοντικά θα μπορούσε να διερευνηθεί εάν τα μονοπάτια που αλλάζουν στις κυτταρικές σειρές ΟΜΛ εμφανίζονται αλλαγμένα και στους ασθενείς με ΟΜΛ, με μελέτη

αλλαγών στο προφίλ έκφρασης των γονιδίων στόχων των STAT3 και STAT5, που έχουν προσδιοριστεί στις κυτταρικές σειρές, σε δείγματα ασθενών.

6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι παράγοντες STAT κατέχουν σημαντικό ρόλο τόσο σε φυσιολογικές κυτταρικές λειτουργίες, όσο και σε ασθένειες, συμπεριλαμβανομένων των συμπαγών και των αιματολογικών κακοηθειών. Μεταξύ των μελών της οικογένειας, οι STAT3 και STAT5 εμπλέκονται σε λευχαιμίες και αποτελούν θεραπευτικούς στόχους μεγάλου ενδιαφέροντος.

Με στόχο τη διερεύνηση του ρόλου των STAT5 και STAT3 στην ΟΜΛ, στην παρούσα Διπλωματική Εργασία πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση δεδομένων RNA-seq του Εργαστηρίου, από κύτταρα της σειράς MOLM-13 (κυτταρική σειρά ΟΜΛ) στα οποία είχε πραγματοποιηθεί μείωση της έκφρασης (KD) του *STAT5A* ή του *STAT5B*, μέσω shRNAs. Προσδιορίστηκαν διαφορικά εκφραζόμενα γονίδια στις περιπτώσεις των KDs. Στην περίπτωση του *STAT5B* προσδιορίστηκαν και τα βιολογικά μονοπάτια που μεταβάλλονται στα ΟΜΛ κύτταρα, για την κατανόηση του μηχανισμού μέσω του οποίου ο *STAT5B* συμμετέχει στην παθοβιολογία της ΟΜΛ. Τέλος, δημιουργήθηκαν KDs του *STAT3* στις κυτταρικές σειρές MOLM-13 και Kasumi-1 (κυτταρικές σειρές ΟΜΛ), τα οποία ελέγχθηκαν με RT-qPCR και Western Blot, προκειμένου να πραγματοποιηθούν μελλοντικά πειράματα RNA-seq και βιοπληροφορικές αναλύσεις.

7. ABSTRACT

STATs (Signal Transducers and Activators of Transcription) play a significant role in normal cellular functions, as well as in diseases, including solid tumors and hematological malignancies. Among STAT family members, STAT3 and STAT5 are mainly implicated in leukemias and thus constitute interesting therapeutic targets.

In order to study the role of STAT5 and STAT3 in acute myeloid leukemia (AML), in the present study, bioinformatics analysis of RNA-seq data was performed. The data were obtained from wild type and knock-down (KD) MOLM-13 cells, which were transduced with lentiviruses encoding shRNAs to KD either *STAT5A* or *STAT5B*. Differentially expressed genes were identified in the *STAT5A* and *STAT5B* KDs, respectively. In the case of *STAT5B*, the biological pathways, that were affected, were also identified in an attempt to understand the mechanism by which *STAT5B* is involved in the pathobiology of AML. In addition, MOLM-13 and Kasumi-1 cells (AML cell lines) were also transduced with lentiviruses encoding shRNAs to KD *STAT3*. KDs were confirmed by RT-qPCR and Western Blot and will be used, in the future, for RNA-seq experiments and bioinformatics analyses.

8. ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

HSCs, Haematopoietic Stem Cells; **SCF**, Stem Cell Factor; **CXCL12**, C-X-C motif chemokine 12; **SDF1**, Stromal Cell-Derived Factor 1; **LT-HSCs**, Long-Term self-renewing HSCs; **ST-HSCs**, Short-Term self-renewing HSCs; **MPPs**, Multipotent Progenitors; **CMPs**, Common Myeloid Progenitors; **CLPs**, Common Lymphoid Progenitors; **MEPs**, Megakaryocyte / Erythrocyte Progenitors; **GMPs**, Granulocyte / Macrophage Progenitors; **LMPP**, Lymphoid-Primed Multipotential Progenitor; **NK cell**, Natural Killer cell; **AML**, Acute Myeloid Leukemia; **RBCs**, Red Blood Cells; **EPO**, Erythropoietin; **JAK2**, Janus Kinase 2; **STAT5**, Signal Transducer and Activator of Transcription 5; **IE**, Ineffective erythropoiesis; **ARCH**, Age-Related Clonal Hematopoiesis; **LSCs**, Leukaemic Stem Cells; **MPNs**, Myeloproliferative Neoplasms; **MDSs**, Myelodysplastic Syndromes; **FLT3**, Fms – Like Tyrosine kinase 3; **KRAS**, Kirsten Rat Sarcoma virus; **NRAS**, Neuroblastoma Rat Sarcoma virus; **TP53**, Tumor Protein p53; **STAT3**, Signal Transducer and Activator of Transcription 3; **IL-6**, Interleukin- 6; **NPM1**, Nucleophosmin 1; **C/EBPA**, CCAAT Enhancer Binding Protein Alpha; **DNMT3A**, DNA Methyltransferase 3 Alpha; **TET2**, Ten Eleven Translocation 2; **IDH1/2**, Isocitrate Dehydrogenase 1/2; **PPM1D**, Protein Phosphatase Mg²⁺/Mn²⁺ Dependent 1D; **TFs**, Transcription Factors; **STAT**, Signal Transducer and Activator of Transcription; **HOXA**, Homeobox A; **AP-1**, Activator Protein 1; **STAT1**, Signal Transducer and Activator of Transcription 1; **STAT4**, Signal Transducer and Activator of Transcription 4; **IFN**, Interferon; **IFN α** , Interferon alpha; **IFN β** , Interferon beta; **ISRE**, IFN-Stimulated Response Element; **IFN γ** , Interferon gamma; **GAS**, IFN γ -Activated Sequence; **ISGF3**, Interferon-Stimulated Gene Factor 3; **IRF-9**, Interferon Regulatory Factor 9; **SH2**, Src Homology 2; **TAD**, Transcriptional Activation Domain; **HATs**, Histone Acetyltransferases; **TPO**, Thrombopoietin; **JAKs**, Janus kinases; **GH**, growth hormone; **Prl**, prolactin; **ILs**, interleukins; **CSF**, Colony Stimulating Factor; **EGF**, Epidermal Growth Factor; **PDGF**, Platelet-Derived Growth Factor; **IGF**, Insulin-like Growth Factor; **DBD**, DNA-Binding Domain; **GM-CSF**, Granulocyte / Macrophage Colony-Stimulating Factor; **SFKs**, Src Family of Kinases; **ERK**, Extracellular signal Regulated Kinase; **MAPK**, Mitogen-Activated Protein Kinase; **PI3K**, Phosphoinositide 3 Kinase; **SHP-1**, SH2-containing Phosphatase- 1; **PIAS**, Protein Inhibitors of Activated STATs; **SOCS**, Suppressors Of Cytokine Signaling; **U-STATs**, Unphosphorylated STATs; **MHC**, Major Histocompatibility Complex; **IgE**, Immunoglobulin E; **Bcl – xL**, B-cell Lymphoma-Extra Large; **siRNAs**, Small Interfering RNAs; **FGF**, Fibroblast Growth Factor; **G-CSF**, Granulocyte Colony-Stimulating Factor; **CNTF**, Ciliary Neurotrophic Factor; **NTD**, NH₂-Terminal Domain; **CCD**, Coiled Coil Domain; **LD**, Linker Domain; **IgG**, Immunoglobulin G; **ATP**, Adenosine Triphosphate; **mSTAT3**, mitochondrial STAT3; **ROS**, Reactive Oxygen Species; **ChIP**, Chromatin Immunoprecipitation; **Bcl-2**, B-cell Lymphoma 2; **MMP-9**, Matrix Metalloproteinase-9; **VEGF**, Vascular Endothelial Growth Factor; **LIF**, Leukemia Inhibitory Factor; **HSPCs**, Hematopoietic Stem and

Progenitor Cells; **IL1RAP**, Interleukin 1 Receptor Accessory Protein; **MSI2**, Musashi RNA Binding Protein 2; **CXCR2**, C-X-C Motif Chemokine Receptor 2; **MCL1**, Induced myeloid leukemia cell differentiation protein; **LSD1**, Lysine Specific Demethylase 1; **HDAC3**, Histone Deacetylase 3; **PIM-1**, Proto-oncogene with serine/threonine kinase activity; **TNFR**, Tumor Necrosis Factor Receptor; **SCCHN**, Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck; **CML**, Chronic Myelogenous Leukemia; **ALL**, Acute Lymphocytic Leukemia; **CLL**, Chronic Lymphocytic Leukemia; **RNAi**, RNA interference; **shRNAs**, Short Hairpin RNAs; **NGS**, Next Generation Sequencing; **PCR**, Polymerase Chain Reaction; **SNP**, Single-Nucleotide Polymorphisms; **KDs**, knock downs; **TRC**, The RNAi Consortium; **SDS-PAGE**, Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis; **TRAF6**, TNF(Tumor Necrosis Factor) Receptor Associated Factor 6; **NF-κB**, Nuclear Factor-kappa B; **FCGR**, Fc Fragment of IgG Receptor; **DAP12**, DNAX-Activation Protein 12; **EGFR**, Epidermal Growth Factor Receptor; **NTRK3**, Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase 3; **TRKC**, Tyrosine Receptor Kinase; **VEGF**, Vascular Endothelial Growth Factor; **RAC3**, Rac Family Small GTPase 3; **RND1**, Rho Family GTPase 1; **DAG**, Dystroglycan 1; **IP3**, Inositol 1,4,5-trisphosphate; **MAPK1/3**, Mitogen-Activated Protein Kinase 1/3; **BRF1**, Butyrate Response Factor 1; **Cdc2**, Cyclin-dependent kinase 1; **PKR**, Protein Kinase R; **FGFR4**, Fibroblast Growth Factor Receptor 4; **ATF6**, Activating Transcription Factor 6; **GLP1**, Glucagon-Like Peptide-1; **PCNA**, Proliferating Cell Nuclear Antigen; **BAX**, BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator; **HCN**, Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated Channel; **GABA**, Gamma-Aminobutyric Acid; **TSR**, Thrombospondin type 1 Repeat ; **ER**, Endoplasmic Reticulum; **SCFR**, mast / stem cell growth factor receptor.

9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Barreda, D. R., and M. Belosevic. 2001. "Transcriptional regulation of hemopoiesis." *Dev Comp Immunol* 25 (8-9):763-89. doi: 10.1016/s0145-305x(01)00035-0.
- Brierley, M. M., and E. N. Fish. 2005. "Stats: multifaceted regulators of transcription." *J Interferon Cytokine Res* 25 (12):733-44. doi: 10.1089/jir.2005.25.733.
- Cazzola, M. 2020. "Myelodysplastic Syndromes." *N Engl J Med* 383 (14):1358-1374. doi: 10.1056/NEJMra1904794.
- Crane, G. M., E. Jeffery, and S. J. Morrison. 2017. "Adult haematopoietic stem cell niches." *Nat Rev Immunol* 17 (9):573-590. doi: 10.1038/nri.2017.53.
- Daniel, M. G., K. Rapp, C. Schaniel, and K. A. Moore. 2020. "Induction of developmental hematopoiesis mediated by transcription factors and the hematopoietic microenvironment." *Ann N Y Acad Sci* 1466 (1):59-72. doi: 10.1111/nyas.14246.
- De Kouchkovsky, I., and M. Abdul-Hay. 2016. "'Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update'." *Blood Cancer J* 6 (7):e441. doi: 10.1038/bcj.2016.50.
- Desai, P., D. Hassane, and G. J. Roboz. 2019. "Clonal Hematopoiesis and risk of Acute Myeloid Leukemia." *Best Pract Res Clin Haematol* 32 (2):177-185. doi: 10.1016/j.beha.2019.05.007.
- Dorritie, K. A., J. A. McCubrey, and D. E. Johnson. 2014. "STAT transcription factors in hematopoiesis and leukemogenesis: opportunities for therapeutic intervention." *Leukemia* 28 (2):248-57. doi: 10.1038/leu.2013.192.
- Dzierzak, E., and S. Philipsen. 2013. "Erythropoiesis: development and differentiation." *Cold Spring Harb Perspect Med* 3 (4):a011601. doi: 10.1101/cshperspect.a011601.
- Fasouli, E. S., and E. Katsantoni. 2021. "JAK-STAT in Early Hematopoiesis and Leukemia." *Front Cell Dev Biol* 9:669363. doi: 10.3389/fcell.2021.669363.
- Gao, S., Z. Wu, X. Feng, S. Kajigaya, X. Wang, and N. S. Young. 2020. "Comprehensive network modeling from single cell RNA sequencing of human and mouse reveals well conserved transcription regulation of hematopoiesis." *BMC Genomics* 21 (Suppl 11):849. doi: 10.1186/s12864-020-07241-2.
- Guanizo, A. C., C. D. Fernando, D. J. Garama, and D. J. Gough. 2018. "STAT3: a multifaceted oncoprotein." *Growth Factors* 36 (1-2):1-14. doi: 10.1080/08977194.2018.1473393.
- Gupta, R., K. M. Musallam, A. T. Taher, and S. Rivella. 2018. "Ineffective Erythropoiesis: Anemia and Iron Overload." *Hematol Oncol Clin North Am* 32 (2):213-221. doi: 10.1016/j.hoc.2017.11.009.
- Hedl, M., R. Sun, C. Huang, and C. Abraham. 2019. "STAT3 and STAT5 Signaling Thresholds Determine Distinct Regulation for Innate Receptor-Induced Inflammatory Cytokines, and STAT3/STAT5 Disease Variants Modulate These Outcomes." *J Immunol* 203 (12):3325-3338. doi: 10.4049/jimmunol.1900031.
- Hrdlickova, R., M. Toloue, and B. Tian. 2017. "RNA-Seq methods for transcriptome analysis." *Wiley Interdiscip Rev RNA* 8 (1). doi: 10.1002/wrna.1364.
- Ihle, J. N. 1996. "STATs: signal transducers and activators of transcription." *Cell* 84 (3):331-4. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81277-5.
- Ivashkiv, L. B., and X. Hu. 2004. "Signaling by STATs." *Arthritis Res Ther* 6 (4):159-68. doi: 10.1186/ar1197.
- Jan, M., B. L. Ebert, and S. Jaiswal. 2017. "Clonal hematopoiesis." *Semin Hematol* 54 (1):43-50. doi: 10.1053/j.seminhematol.2016.10.002.
- Katsantoni, E. 2012. "Protein complexes and target genes identification by in vivo biotinylation: the STAT5 paradigm." *Sci Signal* 5 (248):pt13. doi: 10.1126/scisignal.2003622.
- Kishore, R., and S. K. Verma. 2012. "Roles of STATs signaling in cardiovascular diseases." *Jakstat* 1 (2):118-24. doi: 10.4161/jkst.20115.

- Konieczny, J., and L. Arranz. 2018. "Updates on Old and Weary Haematopoiesis." *Int J Mol Sci* 19 (9). doi: 10.3390/ijms19092567.
- Koschmieder, S., F. Rosenbauer, U. Steidl, B. M. Owens, and D. G. Tenen. 2005. "Role of transcription factors C/EBPalpha and PU.1 in normal hematopoiesis and leukemia." *Int J Hematol* 81 (5):368-77. doi: 10.1532/ijh97.05051.
- Kunimoto, H., and H. Nakajima. 2020. "Clonal hematopoiesis: Molecular basis and clinical relevance." *Leuk Res* 98:106457. doi: 10.1016/j.leukres.2020.106457.
- Larizza, L., I. Magnani, and A. Beghini. 2005. "The Kasumi-1 cell line: a t(8;21)-kit mutant model for acute myeloid leukemia." *Leuk Lymphoma* 46 (2):247-55. doi: 10.1080/10428190400007565.
- Leonard, W. J., and J. J. O'Shea. 1998. "Jaks and STATs: biological implications." *Annu Rev Immunol* 16:293-322. doi: 10.1146/annurev.immunol.16.1.293.
- Levy, D. E., and C. K. Lee. 2002. "What does Stat3 do?" *J Clin Invest* 109 (9):1143-8. doi: 10.1172/jci15650.
- Linher-Melville, K., and G. Singh. 2017. "The complex roles of STAT3 and STAT5 in maintaining redox balance: Lessons from STAT-mediated xCT expression in cancer cells." *Mol Cell Endocrinol* 451:40-52. doi: 10.1016/j.mce.2017.02.014.
- Loh, C. Y., A. Arya, A. F. Naema, W. F. Wong, G. Sethi, and C. Y. Looi. 2019. "Signal Transducer and Activator of Transcription (STATs) Proteins in Cancer and Inflammation: Functions and Therapeutic Implication." *Front Oncol* 9:48. doi: 10.3389/fonc.2019.00048.
- Matsuo, Y., R. A. MacLeod, C. C. Uphoff, H. G. Drexler, C. Nishizaki, Y. Katayama, G. Kimura, N. Fujii, E. Omoto, M. Harada, and K. Orita. 1997. "Two acute monocytic leukemia (AML-M5a) cell lines (MOLM-13 and MOLM-14) with interclonal phenotypic heterogeneity showing MLL-AF9 fusion resulting from an occult chromosome insertion, ins(11;9)(q23;p22p23)." *Leukemia* 11 (9):1469-77. doi: 10.1038/sj.leu.2400768.
- McCombie, W. R., J. D. McPherson, and E. R. Mardis. 2019. "Next-Generation Sequencing Technologies." *Cold Spring Harb Perspect Med* 9 (11). doi: 10.1101/cshperspect.a036798.
- Moffat, J., D. A. Grueneberg, X. Yang, S. Y. Kim, A. M. Kloepfer, G. Hinkle, B. Piqani, T. M. Eisenhaure, B. Luo, J. K. Grenier, A. E. Carpenter, S. Y. Foo, S. A. Stewart, B. R. Stockwell, N. Hacohen, W. C. Hahn, E. S. Lander, D. M. Sabatini, and D. E. Root. 2006. "A lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high-content screen." *Cell* 124 (6):1283-98. doi: 10.1016/j.cell.2006.01.040.
- Murray, P. J. 2007. "The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration." *J Immunol* 178 (5):2623-9. doi: 10.4049/jimmunol.178.5.2623.
- Nangalia, J., and A. R. Green. 2017. "Myeloproliferative neoplasms: from origins to outcomes." *Blood* 130 (23):2475-2483. doi: 10.1182/blood-2017-06-782037.
- Nanou, A., C. Toumpeki, M. D. Lavigne, V. Lazou, J. Demmers, T. Paparountas, D. Thanos, and E. Katsantoni. 2017. "The dual role of LSD1 and HDAC3 in STAT5-dependent transcription is determined by protein interactions, binding affinities, motifs and genomic positions." *Nucleic Acids Res* 45 (1):142-154. doi: 10.1093/nar/gkw832.
- Oikonomidou, P. R., and S. Rivella. 2018. "What can we learn from ineffective erythropoiesis in thalassemia?" *Blood Rev* 32 (2):130-143. doi: 10.1016/j.blre.2017.10.001.
- Park, S. J., and R. Bejar. 2020. "Clonal hematopoiesis in cancer." *Exp Hematol* 83:105-112. doi: 10.1016/j.exphem.2020.02.001.
- Pelcovits, A., and R. Niroula. 2020. "Acute Myeloid Leukemia: A Review." *R I Med J (2013)* 103 (3):38-40.

- Perner, F., C. Perner, T. Ernst, and F. H. Heidel. 2019. "Roles of JAK2 in Aging, Inflammation, Hematopoiesis and Malignant Transformation." *Cells* 8 (8). doi: 10.3390/cells8080854.
- Qin, J. J., L. Yan, J. Zhang, and W. D. Zhang. 2019. "STAT3 as a potential therapeutic target in triple negative breast cancer: a systematic review." *J Exp Clin Cancer Res* 38 (1):195. doi: 10.1186/s13046-019-1206-z.
- Rane, S. G., and E. P. Reddy. 2002. "JAKs, STATs and Src kinases in hematopoiesis." *Oncogene* 21 (21):3334-58. doi: 10.1038/sj.onc.1205398.
- Rubnitz, J. E., B. Gibson, and F. O. Smith. 2010. "Acute myeloid leukemia." *Hematol Oncol Clin North Am* 24 (1):35-63. doi: 10.1016/j.hoc.2009.11.008.
- Seita, J., and I. L. Weissman. 2010. "Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation." *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2 (6):640-53. doi: 10.1002/wsbm.86.
- Shastri, A., G. Choudhary, M. Teixeira, S. Gordon-Mitchell, N. Ramachandra, L. Bernard, S. Bhattacharyya, R. Lopez, K. Pradhan, O. Giricz, G. Ravipati, L. F. Wong, S. Cole, T. D. Bhagat, J. Feld, Y. Dhar, M. Bartenstein, V. J. Thiruthuvanathan, A. Wickrema, B. H. Ye, D. A. Frank, A. Pellagatti, J. Boulwood, T. Zhou, Y. Kim, A. R. MacLeod, P. K. Epling-Burnette, M. Ye, P. McCoon, R. Woessner, U. Steidl, B. Will, and A. Verma. 2018. "Antisense STAT3 inhibitor decreases viability of myelodysplastic and leukemic stem cells." *J Clin Invest* 128 (12):5479-5488. doi: 10.1172/jci120156.
- Silva, C. M. 2004. "Role of STATs as downstream signal transducers in Src family kinase-mediated tumorigenesis." *Oncogene* 23 (48):8017-23. doi: 10.1038/sj.onc.1208159.
- Slatko, B. E., A. F. Gardner, and F. M. Ausubel. 2018. "Overview of Next-Generation Sequencing Technologies." *Curr Protoc Mol Biol* 122 (1):e59. doi: 10.1002/cpmb.59.
- Stark, G. R., H. Cheon, and Y. Wang. 2018. "Responses to Cytokines and Interferons that Depend upon JAKs and STATs." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10 (1). doi: 10.1101/cshperspect.a028555.
- Stepanenko, A. A., and V. V. Dmitrenko. 2015. "HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution." *Gene* 569 (2):182-90. doi: 10.1016/j.gene.2015.05.065.
- Subramaniam, D., P. Angulo, S. Ponnurangam, P. Dandawate, P. Ramamoorthy, P. Srinivasan, T. Iwakuma, S. J. Weir, K. Chastain, and S. Anant. 2020. "Suppressing STAT5 signaling affects osteosarcoma growth and stemness." *Cell Death Dis* 11 (2):149. doi: 10.1038/s41419-020-2335-1.
- Theodorou, M., M. Speletas, A. Mamara, G. Papachristopoulou, V. Lazou, A. Scorilas, and E. Katsantoni. 2013. "Identification of a STAT5 target gene, Dpf3, provides novel insights in chronic lymphocytic leukemia." *PLoS One* 8 (10):e76155. doi: 10.1371/journal.pone.0076155.
- Trapnell, C., A. Roberts, L. Goff, G. Pertea, D. Kim, D. R. Kelley, H. Pimentel, S. L. Salzberg, J. L. Rinn, and L. Pachter. 2012. "Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks." *Nat Protoc* 7 (3):562-78. doi: 10.1038/nprot.2012.016.
- Vainchenker, W., and S. N. Constantinescu. 2013. "JAK/STAT signaling in hematological malignancies." *Oncogene* 32 (21):2601-13. doi: 10.1038/ncr.2012.347.
- Valentino, L., and J. Pierre. 2006. "JAK/STAT signal transduction: regulators and implication in hematological malignancies." *Biochem Pharmacol* 71 (6):713-21. doi: 10.1016/j.bcp.2005.12.017.
- Veiga, C. B., E. M. Lawrence, A. J. Murphy, M. J. Herold, and D. Dragoljevic. 2021. "Myelodysplasia Syndrome, Clonal Hematopoiesis and Cardiovascular Disease." *Cancers (Basel)* 13 (8). doi: 10.3390/cancers13081968.

- Verovskaya, E. V., P. V. Dellorusso, and E. Passegué. 2019. "Losing Sense of Self and Surroundings: Hematopoietic Stem Cell Aging and Leukemic Transformation." *Trends Mol Med* 25 (6):494-515. doi: 10.1016/j.molmed.2019.04.006.
- Walker, S. R., M. Xiang, and D. A. Frank. 2014. "Distinct roles of STAT3 and STAT5 in the pathogenesis and targeted therapy of breast cancer." *Mol Cell Endocrinol* 382 (1):616-621. doi: 10.1016/j.mce.2013.03.010.
- Wingelhofer, B., H. A. Neubauer, P. Valent, X. Han, S. N. Constantinescu, P. T. Gunning, M. Müller, and R. Moriggl. 2018. "Implications of STAT3 and STAT5 signaling on gene regulation and chromatin remodeling in hematopoietic cancer." *Leukemia* 32 (8):1713-1726. doi: 10.1038/s41375-018-0117-x.
- Wu, P., D. Wu, L. Zhao, L. Huang, G. Shen, J. Huang, and Y. Chai. 2016. "Prognostic role of STAT3 in solid tumors: a systematic review and meta-analysis." *Oncotarget* 7 (15):19863-83. doi: 10.18632/oncotarget.7887.
- Yamashita, M., P. V. Dellorusso, O. C. Olson, and E. Passegué. 2020. "Dysregulated haematopoietic stem cell behaviour in myeloid leukaemogenesis." *Nat Rev Cancer* 20 (7):365-382. doi: 10.1038/s41568-020-0260-3.
- Zhang, H., L. He, and L. Cai. 2018. "Transcriptome Sequencing: RNA-Seq." *Methods Mol Biol* 1754:15-27. doi: 10.1007/978-1-4939-7717-8_2.