



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΠΛΕΙΟΤΡΟΠΙΑΣ ΤΗΣ NOTCH ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ
ΣΤΟ ΜΙΚΡΟΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΤΟΥ ΟΓΚΟΥ**

Στράντζαλη Δανάη, Βιολόγος

Επιβλέπουσα: Καθηγήτρια Ανοσολογίας Δρ. Ουρανία Τσιτσιλώνη, Τμήμα
Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τομέας
Φυσιολογίας Ζώων

Συνεπιβλέπουσα: Εντεταλμένη Ερευνήτρια Δρ. Θεοδώρα Κατσίδα,
Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

Αθήνα 2022

Στράντζαλη Δανάη, Βιολόγος

Επιβλέπουσα: Καθηγήτρια Ανοσολογίας Δρ. Ουρανία Τσιτσιλώνη,
Τμήμα Βιολογίας Αθηνών, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων

Συνεπιβλέπουσα: Εντεταλμένη Ερευνήτρια Δρ. Θεοδώρα Κατσίλα,
Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

Τόπος Εκπόνησης Διπλωματικής Εργασίας:

Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας, Εργαστήριο
Ανάδειξης Βιοδεικτών & Μεταφραστικής Έρευνας

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Ουρανία Τσιτσιλώνη, Καθηγήτρια Ανοσολογίας, ΕΚΠΑ

Θεοδώρα Κατσίλα, Εντεταλμένη Ερευνήτρια Χημικής Βιολογίας, ΕΙΕ

Παναγιώτα Παπαζαφείρη, Αν.Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ζώων, ΕΚΠΑ

Δηλώνεται ρητά ότι το κείμενο της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας δεν αποτελεί προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον.

Αθήνα 2022

Περίληψη

Η Notch σηματοδότηση είναι εξελικτικά συντηρημένη μεταξύ των ειδών και συνδράμει στη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και συνολικά, την κυτταρική επιβίωση. Παράλληλα, η Notch σηματοδότηση συναντάται στην αιμοποίηση, περιλαμβάνοντας βιολογικές διαδικασίες, με συμμετοχή της φωλέας των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων ή/και της φωλέας του μυελού των οστών, με την πρώιμη αιμοποιητική ανάπτυξη να αποτελεί ενδεικτικό παράδειγμα, αλλά και σε αιματολογικές κακοήθειες σε ενήλικες. Στις αιματολογικές ασθένειες, η πλειοτροπία της Notch σηματοδότησης αφορά την έναρξη της ογκογένεσης και την εξέλιξη της νόσου (ενδεικτικά: λεμφογενής λευχαιμία, μυελογενής λευχαιμία) μέχρι την καταστολή του όγκου (ενδεικτικά: πολλαπλούν μυέλωμα, μυελοϋπερπλαστικές διαταραχές).

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση της πλειοτροπίας, που χαρακτηρίζει το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch, με έμφαση στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών ως βασικό ρυθμιστή της επιβίωσης των κυττάρων στο πολλαπλούν μυέλωμα.

Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν εργαστηριακές και υπολογιστικές προσεγγίσεις, αναφορικά με τρισδιάστατες (3D) κυτταρικές καλλιέργειες (L363 και U266B1) και συν-καλλιέργειες (L363 ή U266B1 και μεσεγχυματικά κύτταρα του μυελού των οστών από ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα), ενώ τα κύτταρα α. δε βρίσκονταν σε επαφή και β. βρίσκονταν σε επαφή, με χρήση μη στοχευμένης και στοχευμένης μεταβολομικής ανάλυσης και υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας. Προσδιορίστηκε, επίσης, η βιωσιμότητα και το πολλαπλασιαστικό δυναμικό των κυτταρικών σειρών της μελέτης στο πλαίσιο ελέγχου ποιότητας και ευεξίας, με χρήση της χρωστικής Alamar Blue.

Τα ευρήματά μας επισημαίνουν τον ρόλο της Notch σηματοδότησης υπό το πρίσμα των μεταβότων. Οι τελευταίοι υποδεικνύουν σημαντικές διαφορές, όταν υπάρχει άμεση ή όχι επαφή, με τα μεσεγχυματικά κύτταρα να παρέχουν υποστήριξη και θρέψη στα μυελωματικά κύτταρα. Οι μεταβότυποι, επίσης, είναι χαρακτηριστικοί των L363 ή U266B1 κυττάρων, δεδομένων των εγγενών ιδιοτήτων τους. Οι

κορυφαίοι-25 μεταβολίτες ανά περίπτωση αποτελούν ένα πρώτο, ολιστικό, μοριακό αποτύπωμα.

Η διερεύνηση της πλειοτροπίας της Notch σηματοδότησης στο πολλαπλούν μυέλωμα δύναται να αποσαφηνίσει περαιτέρω τους συμμετέχοντες μοριακούς μηχανισμούς στο σημαντικό ρόλο που αυτή διαδραματίζει στην υγεία και την ασθένεια, αναδεικνύοντας νέους φαρμακευτικούς στόχους ή/και μεταφραστικούς βιοδείκτες. Η στρατηγική, που περιγράφηκε στο πλαίσιο της εργασίας (3D κυτταρικές σειρές σε ζεύξη με μεταβολομικές προσεγγίσεις) αποτελεί εύχρηστο «εργαλείο», όχι μόνο διερεύνησης μοριακών μηχανισμών, αλλά και αποτίμησης καινοτόμων θεραπευτικών στρατηγικών ως μονοθεραπεία ή σε συνδυασμό, αποτελώντας δυνητική συνισταμένη της προσέγγισης των πολλαπλών -ομικών τεχνολογιών.

Λέξεις κλειδιά: Notch σηματοδότηση, πλειοτροπία, αιματολογικές κακοήθειες, 3D κυτταρικές καλλιέργειες, μεταβότυποι

Abstract

Notch signalling is evolutionary conserved among species, regulating cell development, proliferation, and survival. Furthermore, Notch signalling is a key player in haematopoiesis, not only at the haematopoietic stem cell niche, but also at the bone marrow niche (early haematopoietic development is a nice example) and adult haematopoietic malignancies. Taking into account haematological diseases, pleiotropy in Notch signalling is reported from the initiation of oncogenesis and disease progression (e.g. lymphoid leukaemia, myeloid leukaemia) to tumour suppression (e.g. multiple myeloma, myeloproliferative disorders).

Herein, we explore Notch signalling and put emphasis on the bone marrow tumour microenvironment as a regulator of multiple myeloma cell survival.

For this, wet- and dry-lab approaches took place regarding 3D cell culture systems (L363 and U266) and cocultures (L363 or U266 and bone marrow-derived mesenchymal stem cells from multiple myeloma patients) in direct and indirect settings via non-targeted and targeted metabolomics by liquid chromatography mass spectrometry. For quality control and cell well-being monitoring, cell viability and metabolic activity were observed by Alamar Blue.

Our findings suggest a prime role for Notch signalling when metabotypes are considered. Metabotypes suggest differential profiling, when direct or indirect co-cultures are tested, during which bone marrow-derived mesenchymal stem cells from multiple myeloma patients provide support to L363 and U266B1 cells. Metabotypes also exhibit the distinct features of L363 and U266B1 cell lines. Top-25 metabolites revealed per test-case are a first, holistic, molecular fingerprint.

Dissecting pleiotropy in Notch signalling in multiple myeloma, we shed light on the underlying molecular mechanisms and hence, the role of such pleiotropy in health and disease toward novel drug targets and/or translational biomarkers. Our toolbox (3D cell cultures coupled to metabolomics) is a user-friendly approach, not only for exploring molecular mechanisms, but also evaluating novel therapeutic options as monotherapy or in combination, being an asset when multi-omics is considered.

Keywords: Notch signaling, pleiotropy, hematological malignancies, 3D cell culture systems, metabotypes

Πρόλογος - Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο του Διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική», των Σχολών Βιολογίας και Ιατρικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Ε.Κ.Π.Α.). Η εκπόνησή της έλαβε χώρα στο Εργαστήριο «Ανάδειξης Βιοδεικτών και Μεταφραστικής Έρευνας» του Ινστιτούτου Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (Ε.Ι.Ε.), σε συνεργασία με τον Τομέα Φυσιολογίας Ζώων του Τμήματος Βιολογίας (ΕΚΠΑ).

Θα ήθελα να ευχαριστήσω, ιδιαιτέρως, την επιβλέπουσα και καθηγήτριά μου κα. Ουρανία Τσιτσιλώνη, που μου παρείχε στήριξη και καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Θα ήθελα, επίσης, να εκφράσω τις πιο θερμές μου ευχαριστίες στη συνεπιβλέπουσα κα. Θεοδώρα Κατσίλα, για τον τρόπο με τον οποίο με υποδέχτηκε στην ομάδα της, με ενέπνευσε να ασχοληθώ με το αντικείμενο της μελέτης μου, με ενθάρρυνε στην έρευνά μου και μου προσέφερε ουσιαστική υποστήριξη.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά τα υπόλοιπα μέλη της ερευνητικής ομάδας, Βιβή Μπαφίτη, Κωνσταντίνα Χαλικοπούλου και Σωτήρη Ουζούνη για την πολύτιμη βοήθειά τους και τη συμπαράστασή τους καθ' όλη τη διάρκεια παραμονής μου στο εργαστήριο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Κατάλογος Συντομογραφιών/ Κατάλογος Συμβόλων	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 Η Notch σηματοδότηση κατά την ανάπτυξη, την αιμοποίηση και την ογκογένεση	9
1.2 Η «κανονική» και «μη κανονική» Notch σηματοδότηση	13
1.3 Η «πλειοτροπία» της Notch σηματοδότησης	21
1.4 Ο ρόλος των κυτταροκινών στην «πλειοτροπία» της Notch σηματοδότησης	22
1.5 Ο ρόλος της Notch σηματοδότησης στο μικροπεριβάλλον του όγκου: έμφαση στο πολλαπλούν μύελωμα	29
1.6 Τα χαρακτηριστικά του μικροπεριβάλλοντος του όγκου	32
1.7 Τεχνολογίες αιχμής στο πολλαπλό μύελωμα	34
1.7.1 Τρισδιάστατες (3D) κυτταρικές συνθήκες	34
1.7.2 Μεταβολομική ανάλυση με χρήση υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας	35
2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	38
2.1 Απαραίτητος εξοπλισμός	38
2.2 Θρεπτικά Υλικά και Διαλύματα	39
2.3 Κυτταρικές σειρές	39
2.4 Χειρισμός κυτταρικών καλλιιεργειών	40
2.4.1 Απόψυξη κυτταρικών σειρών	40
2.4.2 Διαδικασία ανακαλλιέργειας κυτταρικών σειρών	40
2.5 Καταμέτρηση κυττάρων και έλεγχος βιωσιμότητας με χρήση αιμοκυτταρόμετρου	41
2.6 Τρισδιάστατη κυτταροκαλλιέργεια με τη μέθοδο της κρεμάμενης σταγόνας (Hanging drop)	43
2.7 Μεταβολικό δυναμικό 2D και 3D κυτταροκαλλιιεργειών	45
2.8 Προκατεργασία δείγματος για μεταβολομική ανάλυση	47
2.9 Μη-στοχευμένη και στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση με χρήση υγρής χρωματογραφίας φασματομετρίας μάζας	48
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	50
3.1 Μεταβολικό δυναμικό 2D και 3D κυτταροκαλλιιεργειών	50
3.2 Μεταβολομικές αναλύσεις	52
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	57
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	58

Κατάλογος Συντομογραφιών/ Κατάλογος Συμβόλων

AML, Acute Myeloid Leukemia: οξεία μυελογενής λευχαιμία

BMSCs, Bone Marrow Stromal Cells: στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών

CLL, Chronic Lymphocytic Leukemia: χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία

CSL: ακρωνύμιο για τις πρωτεΐνες CBF1, γνωστή και ως RBP-J στα θηλαστικά, Su(H) στη *Drosophila* και LAG-1 στο *C-elegance*

EGF, Epidermal Growth Factor: επιδερμικός αυξητικός παράγοντας

GSI, Gamma-Secretase Inhibitor: αναστολέας γ-σεκρετάσης

HSCs, Hematopoietic Stem Cells: αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα

ICN, Intracellular Notch:, η ενδοκυττάρια επικράτεια του υποδοχέα, ή Notch intracellular domain, **NICD**

IL-6, interleukin-6: ιντερλευκίνη 6

MM, Multiple Myeloma: πολλαπλό μύελωμα, ΠΜ

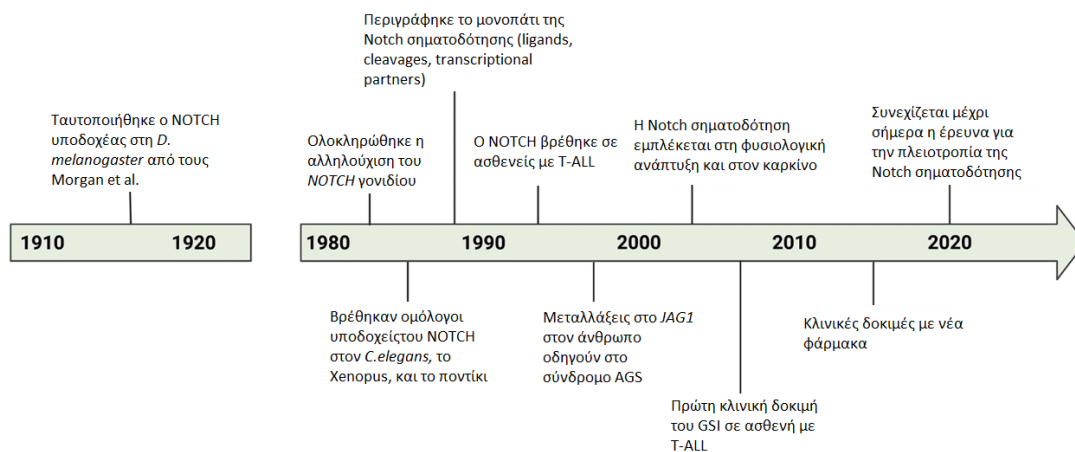
T-ALL, T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia: T-κύτταρα οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας

VEGF, vascular endothelial growth factor: αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η Notch σηματοδότηση κατά την ανάπτυξη, την αιμοποίηση και την ογκογένεση

Το γονίδιο, που κωδικοποιεί τον NOTCH υποδοχέα, απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1914 από τη *Drosophila melanogaster*. Οι μύγες εμφάνιζαν εγκοπές στα φτερά τους (notched wings), οι οποίες οφείλονταν στη μερική απώλεια της λειτουργίας του ενός αλληλόμορφου του γονιδίου (απλοανεπάρκεια, haploinsufficiency). Ωστόσο, ο ρόλος της Notch σηματοδότησης στην ανάπτυξη έγινε κατανοητός το 1930, όταν βρέθηκε ότι η απώλεια της λειτουργίας της προκαλεί θανατηφόρα υπερπλασία του νευρικού συστήματος του εμβρύου της *D. melanogaster* (Fortini, 2009, Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Αργότερα, το 1991, αποδείχθηκε ότι υπάρχει ένα γονίδιο στα Τ-κύτταρα της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας, που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 9, το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη TAN-1 (translocation-associated Notch-1, ονομάστηκε, αργότερα, NOTCH1), η οποία είναι ομόλογη της NOTCH στη *D. melanogaster* (Kushwah et al., 2014) (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Σύνοψη περιγραφή των ιστορικών γεγονότων, που αφορούν το μονοπάτι της Notch σηματοδότησης. T-ALL: T cell acute lymphoblastic leukemia, AGS: Alagille syndrome, GSI: γ-secretase inhibitor (Zhou et al., 2022).

Το μονοπάτι της Notch σηματοδότησης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κυτταρική διαφοροποίηση, τη μορφογένεση και την επιβίωση και εμπλέκεται σε σημαντικό βαθμό στη φυσιολογική ανάπτυξη του εμβρύου. Είναι σημαντικό για την επικοινωνία των γειτονικών κυττάρων κατά την αιμοποίηση μετά τη γέννηση, την ανάπτυξη του αγγειακού συστήματος και της καρδιάς, τη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος, την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, του γαστρικού και εντερικού επιθηλίου, του μαστού και του παγκρέατος (Aggarwal et al., 2021). Επιπλέον, γονίδια του μονοπατιού της Notch σηματοδότησης (π.χ. *Dll1*, *LFNG*, *Her7*, *Dll3*) ελέγχουν στάδια της σωματογένεσης, του σχηματισμού της σπονδυλικής στήλης και των σκελετικών μυών. Πράγματι, το μοριακό αυτό σηματοδοτικό μονοπάτι συμμετέχει στις περισσότερες διαδικασίες ανάπτυξης των οργάνων και των ιστών και συχνά, ενεργοποιείται επαναλαμβανόμενες φορές κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των κυττάρων. Τέλος, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών (ενδεικτικά: δέρμα, πνεύμονες, ήπαρ, έντερο, σκελετικοί μύες, αιμοποιητικό σύστημα) (Siebel and Lendahl, 2017).

Σε αντίθεση με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια, όπου η σηματοδότηση γίνεται μέσω της αλληλεπίδρασης διαλυτών παραγόντων και των υποδοχέων τους, στη Notch σηματοδότηση οι υποδοχείς και οι συνδέτες τους είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, οπότε και η ενεργοποίηση του μονοπατιού γίνεται με την άμεση επαφή των κυττάρων (cell-to-cell contact) (Lampreia and Carmelo et al., 2017). Η επαφή αυτή οδηγεί στην πλευρική επαγωγή (lateral induction) ή την πλευρική αναστολή (lateral inhibition) της γονιδιακής έκφρασης, η οποία καθορίζει το πεπρωμένο των κυττάρων του ίδιου πληθυσμού. Είναι εντυπωσιακή η ποικιλία των αποτελεσμάτων που μπορεί να επιφέρει η Notch σηματοδότηση, δεδομένου ότι το μονοπάτι, από τη μεμβράνη του κυττάρου μέχρι τον πυρήνα, είναι σχετικά σύντομο (βλ. υποενότητα 1.2) (Lomeli and Castillo-Castellanos, 2020).

Η Notch σηματοδότηση διαδραματίζει κύριο ρόλο στον πολύπλοκο μηχανισμό που ελέγχει την ανάπτυξη των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων (hematopoietic stem cells, HSCs) (Lomeli and Castillo-Castellanos, 2020). Οι κυτταρικοί τύποι του αιμοποιητικού συστήματος παράγονται από τα HSCs. Τα κύτταρα αυτά έχουν την

ικανότητα να διαφοροποιούνται σε μυελοειδή κύτταρα (ερυθροκύτταρα, μακροφάγα, μονοκύτταρα, μαστοκύτταρα κ.α.) ή λεμφοκύτταρα (T-κύτταρα, B-κύτταρα, NK-κύτταρα) και μπορούν, επίσης, να αναγεννώνται, έτσι, ώστε να διατηρούν τον πληθυσμό τους σταθερό (Kawamoto and Katsura, 2009). Παράγονται κατά την πρώιμη εμβρυική αιμοποίηση και εντοπίζονται στους αιμαγγειοβλάστες στο σπλαγχνικό μεσόδερμα στην περιοχή σχηματισμού της ραχιαίας αορτής, των αρχέγονων γονάδων και του μεσονεφρικού ιστού (aorta-gonad-mesonephros, AGM) και μετά το δεύτερο τρίμηνο της κύησης, στο ήπαρ, ενώ στους ενήλικους εντοπίζονται στο μυελό των οστών (Siebel and Lendahl, 2017). Το αίμα αποτελεί έναν ιστό που αναγεννάται σε πολύ μεγάλο βαθμό, καθώς ένα υγιές ενήλικο άτομο παράγει 10^{11} - 10^{12} νέα κύτταρα αίματος την ημέρα. Για το λόγο αυτό, απαιτείται να είναι πολύ καλά συντονισμένη η παραγωγή των κυττάρων, ώστε να διατηρείται η ομοιόσταση του αιμοποιητικού συστήματος (Lampreia and Carmelo et al., 2017).

Η Notch σηματοδότηση συμμετέχει στην ανανέωση και τη διαφοροποίηση των HSCs, δύο διαδικασίες, που διατηρούν την ομοιόστασή τους (Kushwah et al., 2014). Στα ενήλικα άτομα, οι υποδοχείς και οι συνδέτες, που μετέχουν στη Notch σηματοδότηση, εκφράζονται σε διαφορετικό βαθμό στα αιμοποιητικά κύτταρα, επηρεάζοντας, με αυτόν τον τρόπο, τον τύπο κυττάρου που θα παραχθεί. Ενδεικτικά, η Notch σηματοδότηση καθορίζει τη γενεολογική σειρά των T-κυττάρων έναντι των B-κυττάρων (Huang et al., 2021). Πιο συγκεκριμένα, ο συνδέτης DLL4 της Notch σηματοδότησης, ενεργοποιεί τη διαδικασία διαφοροποίησής των T-κυττάρων (Kushwah et al., 2014). Η υπερενεργοποίηση της σηματοδότησης, μέσω της απελευθέρωσης της ενδοκυττάριας επικράτειας του NOTCH1, έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη των T-κυττάρων, αλλά όχι των B-κυττάρων. Αντιθέτως, η απενεργοποίηση του NOTCH1 ή του CSL (ακρωνύμιο για τις πρωτεΐνες CBF1, γνωστή και ως RBP-J στα θηλαστικά, Su(H) στη *D. melanogaster* και LAG-1 στο *C. elegans*) έχει ως αποτέλεσμα τη διακοπή της παραγωγής των T-κυττάρων από το θύμο αδένα και την εμφάνιση των B-κυττάρων. Άρα, η παρεμπόδιση της μπορεί να τροποποιήσει τους τύπους αιμοποιητικών κυττάρων, που παράγονται (Láinez-González et al., 2022). Η Notch σηματοδότηση είναι, επίσης, σημαντική για την υποδιαίρεση των T-προγονικών κυττάρων σε $\alpha\beta$ -T- και $\gamma\delta$ -T-κύτταρα και για την

εξέλιξη των CD4⁺ T-κυττάρων σε T-βοηθητικά (T_H) κύτταρα. Τέλος, η διαφοροποίηση των T-ρυθμιστικών (T_{Reg}) κυττάρων ελέγχεται, εν μέρει, από τη Notch σηματοδότηση. Είναι, ακόμη, σημαντική για τη διαφοροποίηση των θυλακικών T-βοηθητικών (T-follicular helper cells, TFH), κύτταρα, τα οποία συμμετέχουν στη διαφοροποίηση των B-κυττάρων και την έκκριση αντισωμάτων (Siebel and Lendahl, 2017, Láinez-González et al., 2022). Παρόλο, που είναι αναμφίβολα σημαντική για τη διαφοροποίηση των T-κυττάρων κατά την αιμοποίηση στην ενήλικη ζωή του ανθρώπου, καθώς και για την ανάπτυξη του αιμοποιητικού συστήματος του εμβρύου, παραμένει ασαφές, εάν η Notch σηματοδότηση απαιτείται για τη ρύθμιση των HSCs, σε φυσιολογικές συνθήκες, στην ενήλικη ζωή του ανθρώπου (Bigas and Espinosa, 2012, Lampreia and Carmelo et al., 2017, Huang et al., 2021).

Δεδομένου ότι η Notch σηματοδότηση διαδραματίζει πολλούς και ποικίλους ρόλους στην ανάπτυξη, δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι η απορυθμισμένη λειτουργία της συνδέεται όλο και περισσότερο με ασθένειες και παθολογικές καταστάσεις, μεταξύ των οποίων, ο καρκίνος. Υποστηρίζεται, μάλιστα, ότι είναι από τα σημαντικότερα σηματοδοτικά μονοπάτια, που συμμετέχουν στη δημιουργία και την εξέλιξη του καρκίνου (Takebe et al., 2014). Σε κάποιες περιπτώσεις, η νόσος δημιουργείται λόγω μεταλλάξεων στα μόρια που συμμετέχουν στη Notch σηματοδότηση, ενώ σε άλλες περιπτώσεις δημιουργείται λόγω της μη φυσιολογικής ενεργοποίησης του μονοπατιού, χωρίς να έχουν συμβεί, όμως, εμφανείς μεταλλάξεις στα μόρια αυτά (Siebel and Lendahl, 2017). Μεταλλάξεις κέρδους λειτουργίας (gain of function) στους Notch υποδοχείς ή/και ενίσχυση των μορίων-μηνυτών της Notch σηματοδότησης κατά την εξέλιξη του καρκίνου οδηγούν στην απορυθμισμένη λειτουργία της Notch σηματοδότησης, που παρατηρείται σε πολλές κακοήθειες, όπως ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα, ο οισοφαγικός καρκίνος, ο καρκίνος του μαστού, των ωοθηκών, του τραχήλου, του ενδομητρίου, καθώς και στους καρκίνους του κεντρικού νευρικού συστήματος, στο γλοιοβλάστωμα, στο μελάνωμα και στις λευχαιμίες των T-κυττάρων. Η ασυνήθιστη ενεργοποίηση της Notch σηματοδότησης προωθεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την επιθηλιο-μεσεγχυματική μετατροπή (Epithelial-mesenchymal transition, EMT), τη μετανάστευση σε γειτονικούς ιστούς, τη βλαστικότητα των καρκινικών κυττάρων

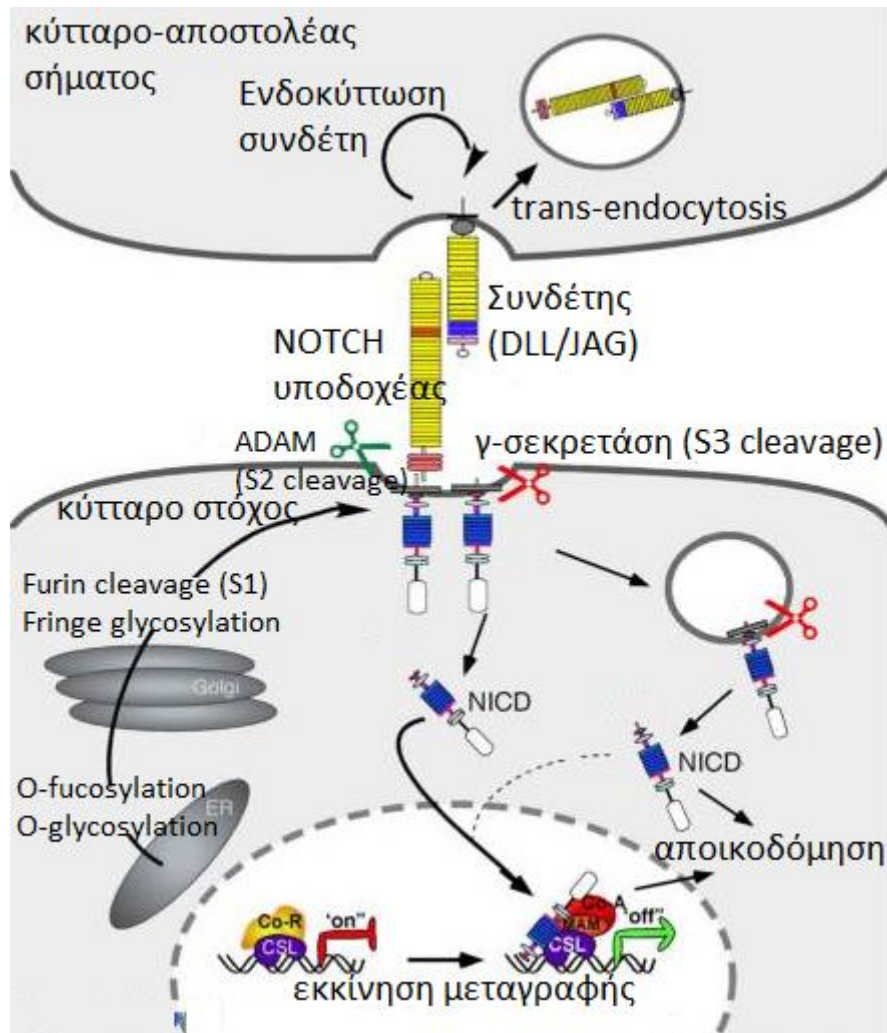
και τη δημιουργία αγγειακού δικτύου στην περιοχή του όγκου. Επιπλέον, εμπλέκεται στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας στη χημειοθεραπεία σε διάφορα κακοήγη κύτταρα (Yuan et al., 2015) και σχετίζεται με την υποτροπή και την κακή πρόγνωση πολλών κακοηθειών (Aggarwal et al., 2021). Επομένως, η καταστολή του μονοπατιού της Notch σηματοδότησης μπορεί να οδηγήσει στην αναστολή της ανάπτυξης του όγκου και στη μείωση παραγωγής νέων αιμοφόρων αγγείων στην περιοχή του όγκου και συνεπώς, αποτελεί στόχο καινοτόμων στρατηγικών αντικαρκινικής θεραπείας. Ωστόσο, η Notch σηματοδότηση, παρά τον ογκογονικό της ρόλο, λειτουργεί παραδόξως και ογκοκατασταλτικά σε πολλές κακοήθειες, όπως στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, στον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (Wang et al., 2008, Koch and Radtke, 2007), στο σάρκωμα Ewing, στις κακοήθειες των B-κυττάρων (Yuan et al., 2015) ή στον καρκίνο του δέρματος, όπου προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων (Aggarwal et al., 2020).

Ο ρόλος της Notch σηματοδότησης στις αιματολογικές ασθένειες είναι ιδιαίτερα περίπλοκος και πολυπαραγοντικός, καθώς σχετίζεται, ενδεικτικά, με την εκκίνηση της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας (T-ALL), μπορεί να οδηγήσει στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (chronic lymphocytic leukemia, CLL), αλλά και στην καταστολή κακοηθειών των B-κυττάρων. Σε αντίθεση με την T-ALL και την CLL, στη λευχαιμία των B-κυττάρων, η Notch σηματοδότηση καταστέλλει την ογκογένεση. Πιο συγκεκριμένα, η έκφραση του NOTCH1 υποδοχέα εμποδίζει την ανάπτυξη και προάγει την απόπτωση, τόσο στις ώριμες, όσο και στις ανθεκτικές στη θεραπεία κακοήθειες B-κυττάρων. Είναι γνωστό, επίσης, ότι διαδραματίζει καίριο ρόλο στην ανανέωση και τη διαφοροποίηση των HSCs, άμεσα και μέσω της ρύθμισης του μυελού των οστών. Συνεπώς, στις αιματολογικές κακοήθειες ο ρόλος της Notch σηματοδότησης είναι πολυεπίπεδος, αναφορικά με τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα και τον μυελό των οστών (Kushwah et al., 2014).

1.2 Η «κανονική» και «μη κανονική» Notch σηματοδότηση

Το μονοπάτι της Notch σηματοδότησης αποτελείται από μια «οικογένεια» διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, οι οποίες λειτουργούν, ταυτοχρόνα, ως υποδοχείς και ως μεταγραφικοί παράγοντες (Colombo et al., 2013). Η Notch σηματοδότηση

ρυθμίζεται από την άμεση επικοινωνία των διαμεμβρανικών υποδοχέων και των συνδετών τους. Στα θηλαστικά, υπάρχουν τέσσερις διαμεμβρανικοί υποδοχείς (NOTCH1-4) και δύο «οικογένειες» συνδετών, η JAG-1/2 (Jagged) και η DLL1/3/4 (Delta like ligand), μονής διέλευσης διαμεμβρανικές πρωτεΐνες. Στο αιμοποιητικό σύστημα, οι υποδοχείς και οι συνδέτες εκφράζονται στα HSCs και στα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών (bone marrow stromal cells, BMSCs). Οι υποδοχείς πρωτεολύονται από την μετατροπή όμοια με φουρίνη (furin-like convertase) στο σύμπλεγμα Golgi (S1 cleavage) κι εκεί, προστίθενται σάκχαρα στις επαναλήψεις του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (epidermal growth factor, EGF repeats) της εξωκυττάριας επικράτειας του υποδοχέα από διάφορες γλυκοζυλο-τρανσφεράσες, συμπεριλαμβανομένων αυτών της οικογένειας Fringe. Στη συνέχεια, οι τροποποιημένοι υποδοχείς εντοπίζονται ως ετεροδιμερή στην επιφάνεια του κυττάρου και μπορούν να αλληλοεπιδράσουν με τους συνδέτες των γειτονικών κυττάρων (Luxan et al., 2015). Για να ενεργοποιηθεί το μονοπάτι πρέπει να γίνει η σύνδεση του εξωτερικού μέρους του υποδοχέα του κυττάρου με τον συνδέτη γειτονικού κυττάρου (trans-activation). Όταν συμβεί αυτό, οι πρωτεάσες ADAM και γ-σεκρετάση χωρίζουν το εξωκυτταρικό μέρος του υποδοχέα από το υπόλοιπο μέρος του και το απομακρύνουν (S2 cleavage). Έτσι, απελευθερώνεται η ενδοκυττάρια επικράτεια του υποδοχέα (the active intracellular Notch, ICN ή Notch intracellular domain, NICD) και μεταφέρεται στον πυρήνα του κυττάρου (S3 cleavage). Εκεί, το ICN συνδέεται με μεταγραφικούς παράγοντες, όπως είναι η CSL και την οικογένεια των MAML (Mastermide-like) συνενεργοποιητών και ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδίων (όπως οι μεταγραφικοί παράγοντες HERS1-7 και HEY1-2L), που εμπλέκονται στη φυσιολογική ανάπτυξη, αλλά και τον καρκίνο. Επομένως, η μεταγραφή των γονιδίων σχετίζεται με την ποσότητα του ICN, που υπάρχει στον πυρήνα του κυττάρου. Η απορρύθμιση της Notch σηματοδότησης συνδέεται με την παθογένεση πολλών συμπαγών όγκων (γλοιοβλάστωμα, μελάνωμα, καρκίνος του μαστού και του παγκρέατος) και με αιματολογικές κακοήθειες (T-ALL, B-ALL, AML, B-CCL, MM) και μπορεί να συμβεί λόγω μεταλλάξεων ή επιγενετικών μηχανισμών (Kushwah et al., 2014, Colombo and Galletti et al., 2016). Τα παραπάνω συνοψίζονται ακόλουθα (Εικόνα 2).

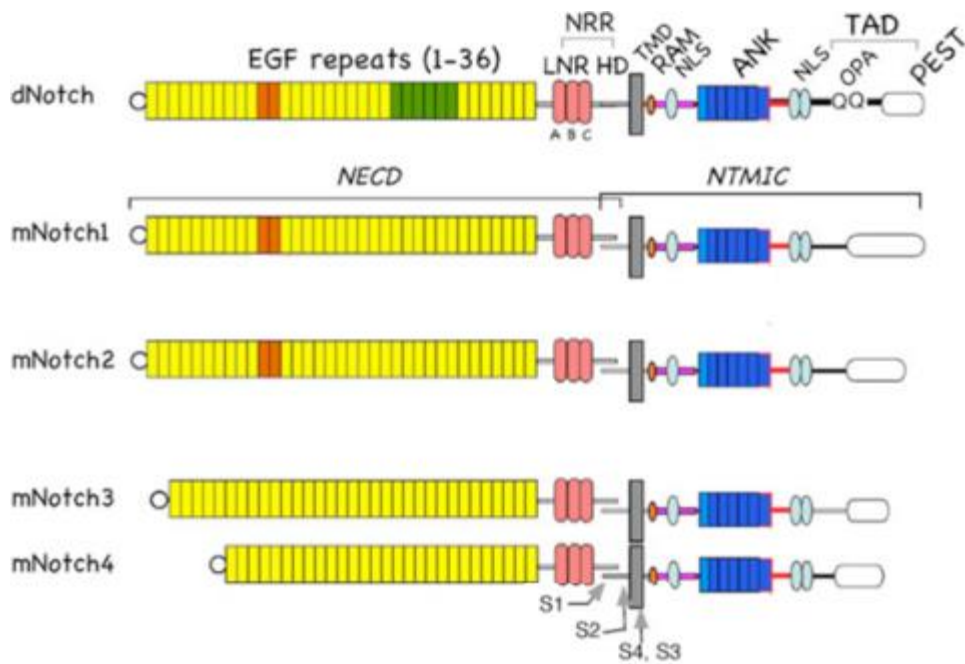


Εικόνα 2. Η «κανονική» Notch σηματοδότηση. Η πρωτεΐνη NOTCH γλυκοζυλιώνεται από τις O-fut (Pofut1 στα θηλαστικά) και Rumi, στάδιο απαραίτητο, προκειμένου να καταστεί λειτουργικός ο υποδοχέας. Ο υποδοχέας «ωριμάζει» στο σύμπλεγμα Golgi, έπειτα από τον πρωτεολυτικό διαχωρισμό στο σημείο 1 (site 1, S1). Ύστερα, παρουσιάζεται στη μεμβράνη του κυττάρου ως ετεροδιμερές. Θα ενεργοποιηθεί, όταν προσδεθεί ο συνδέτης και τότε, θα γίνει διαχωρισμός του υποδοχέα στο σημείο 2 από τις ADAM μεταλλοπρωτεάσες (S2 cleavage) και θα απελευθερωθεί η εσωκυττάρια επικράτεια NICD. Η NICD, στον πυρήνα του κυττάρου, συνδέεται με την CSL και ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων (Koran and Ilagan, 2010).

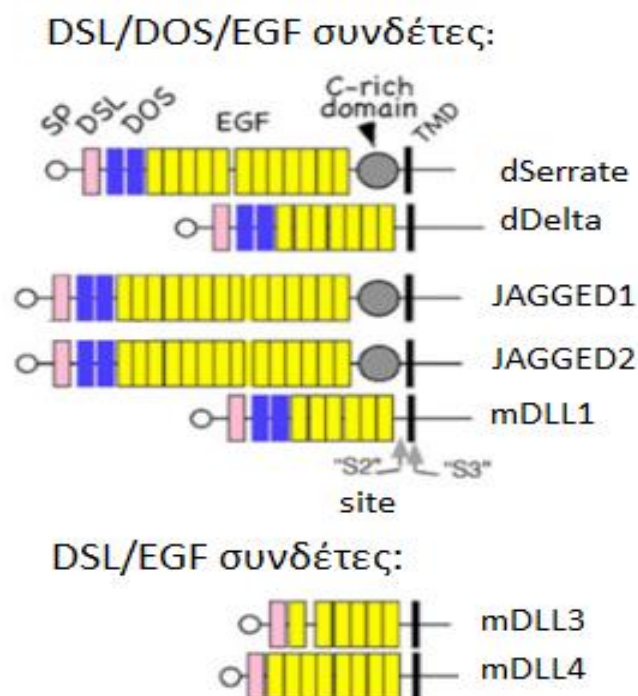
Η εξωκυττάρια επικράτεια των Notch υποδοχέων (Notch extracellular domain, NECD) αποτελείται από 29-36 EFG-επαναλήψεις, κάποιες από τις οποίες πραγματοποιούν τη σύνδεση με τους συνδέτες JAGGED και DLL. Συγκεκριμένα, οι

επαναλήψεις 11 και 12 αλληλεπιδρούν με τους συνδέτες των γειτονικών κυττάρων (trans interactions), ενώ οι επαναλήψεις 24-29 αλληλεπιδρούν με τους συνδέτες, που εκφράζει το ίδιο κύτταρο, που παρουσιάζει τον υποδοχέα (cis interactions) (Kopan and Ilagan, 2010). Έχει βρεθεί ότι οι cis αλληλεπιδράσεις εμποδίζουν την ενεργοποίηση της σηματοδότησης (Nandagopal and Santat and Elowitz, 2019). Εκτός από τις EGF επαναλήψεις, υπάρχει μια μοναδική ρυθμιστική περιοχή (negative regulatory region, NRR), αποτελούμενη από τρεις επαναλήψεις Lin12-Notch (Lin12-Notch repeats, LNR-A,B και C), πλούσιες σε κυστεΐνη και την περιοχή ετεροδιμερισμού (heterodimerization domain, HD). Το ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα (ICN) αποτελείται από επτά επαναλήψεις ankyrin (ANK repeats), σήματα πυρηνικού εντοπισμού (nuclear localization signals, NLS) και μια επικράτεια trans-ενεργοποίησης (transactivation domain, TAD) (Bigas and Epinosa, 2012) (Εικόνα 3). Περισσότερες από τις μισές μεταλλάξεις, που υπάρχουν στον NOTCH1 υποδοχέα, συμβαίνουν, είτε στο C-άκρο της περιοχής PEST (proline/glutamic acid/serine/threonine-rich motifs) και έχουν ως αποτέλεσμα την παρατεταμένη σηματοδότηση, λόγω της σταθερότητας του NICD, είτε στην εξωκυττάρια επικράτεια ετεροδιμερισμού (extracellular heterodimerization domain, HD), με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μονοπατιού, χωρίς την παρουσία κάποιου συνδέτη (Weng et al. 2004).

Η μεγαλύτερη ομάδα συνδετών του Notch αποτελείται από ένα αμινοτελικό DSL (Delta/Serrate/LAG-2) μοτίβο, το τμήμα DOS (Delta and OSM-11-like proteins) και EGF επαναλήψεις (Εικόνα 4). Τα τμήματα DSL και DOS συμμετέχουν στη σύνδεση με τον υποδοχέα. Οι συνδέτες DSL κατηγοριοποιούνται με βάση το αν περιέχουν ένα τμήμα πλούσιο σε κυστεΐνη στη δομή τους ή όχι, σε Jagged ή Delta αντίστοιχα και το τμήμα DOS (Kopan and Ilagan, 2010). Οι συνδέτες του μονοπατιού της Notch σηματοδότησης ενδοκυττάρωνονται για να επιστρέψουν, ξανά, στην επιφάνεια του κυττάρου και να ενεργοποιήσουν το μονοπάτι. Στο στάδιο αυτό συμμετέχουν δύο λιγάσες ουβικουτίνης E3 (E3, ubiquitin-ligase), οι οποίες προσθέτουν μόρια ουβικουτίνης στο καρβοξυλικό άκρο (C-άκρο) των συνδετών και η απενεργοποίησή τους έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη Notch σηματοδότηση (Siebel and Lendahl, 2017).



Εικόνα 3. Οι NOTCH υποδοχείς και τα μέρη από τα οποία αποτελούνται. Στη *D. melanogaster* υπάρχει ένας υποδοχέας NOTCH (dNOTCH), ενώ στα θηλαστικά, τέσσερις (mNOTCH1-4). Είναι τύπου-1 διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και περιέχουν πολλές EGF επαναλήψεις (EGF repeats). Οι επαναλήψεις 11-12 (κόκκινο χρώμα) και 24-29 (πράσινο) συμμετέχουν στη σύνδεση με τους συνδέτες. Μετά τις EGF επαναλήψεις, υπάρχει η μοναδική ρυθμιστική περιοχή (Negative Regulatory Region NRR). Οι mNOTCH, σε αντίθεση με τον dNOTCH, πρωτεολύονται από την μετατροπή όμοια με φουρίνη στο σημείο S1, μετατρέποντας το αρχικό NOTCH πολυπεπτίδιο σε NECD-NTMIC (NOTCH extracellular domain- NOTCH transmembrane and intracellular domain) (Kopan and Ilagan, 2010).

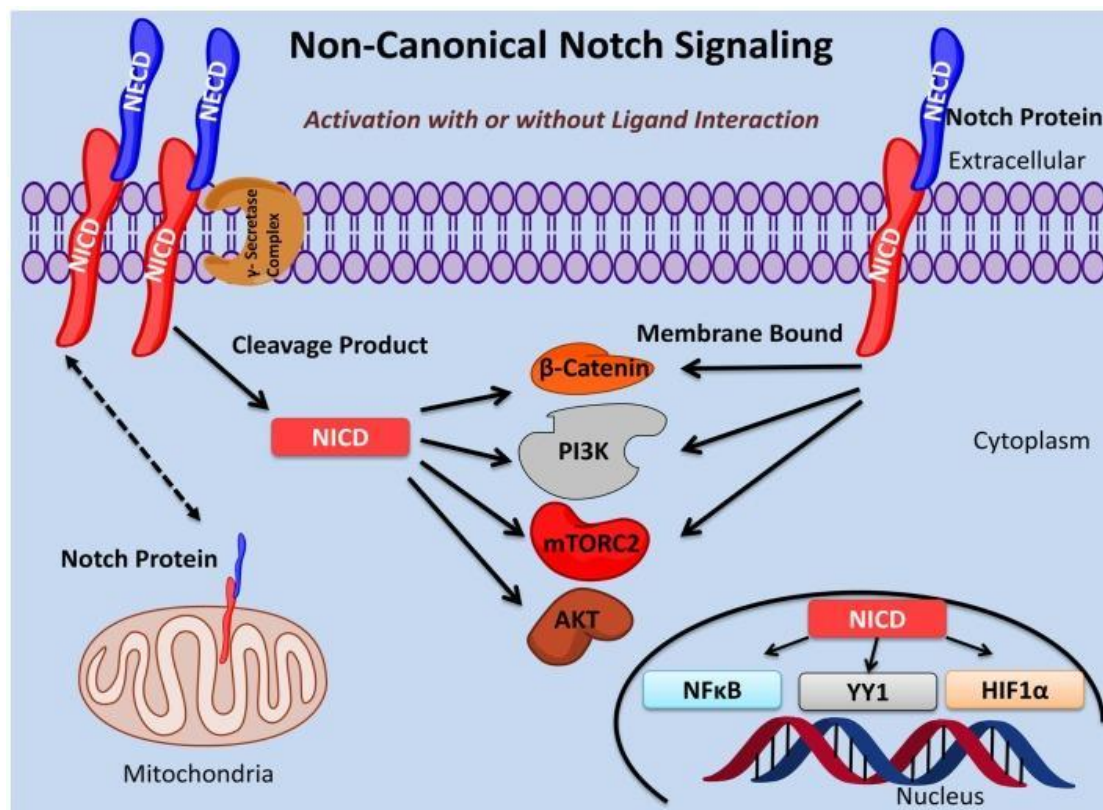


Εικόνα 4. Οι συνδέτες των NOTCH υποδοχέων. Οι συνδέτες DSL περιέχουν το μοτίβο DSL, το DOS και EGF επαναλήψεις. Στα θηλαστικά, υπάρχουν οι JAGGED1-2 και οι DLL1/3/4 συνδέτες. Υπάρχει μια υποομάδα των DSL συνδετών, που δεν περιέχουν το τμήμα DOS (DSL/EGF συνδέτες) και μπορούν να δράσουν ανεξάρτητα (π.χ. DLL4) ή σε συνδυασμό με άλλους συνδέτες, όπως ο DLL3. TMD: single transmembrane domain (Kopan and Ilagan, 2010).

Η κατανομή των Notch υποδοχέων και συνδετών μπορεί να επηρεάσει το πεπρωμένο των κυττάρων με τρεις βασικούς μηχανισμούς. Αρχικά, κατά την κυτταρική διαίρεση, τα συστατικά του μονοπατιού της Notch σηματοδότησης χωρίζονται, μη συμμετρικά, σε δυο θυγατρικά κύτταρα, με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται, τελικά, σε διαφορετικό βαθμό το μονοπάτι, οπότε τα δύο κύτταρα θα έχουν διαφορετικό πεπρωμένο. Ο επόμενος μηχανισμός συμβαίνει κατά την επαφή δύο κυττάρων. Το κύτταρο, το οποίο παρουσιάζει τον συνδέτη, θα ενεργοποιήσει τη Notch σηματοδότηση στο γειτονικό κύτταρο και τότε, το δεύτερο θα αναστείλει την έκφραση των δικών του συνδετών (πλευρική αναστολή, lateral inhibition). Έτσι, η σηματοδότηση στο κύτταρο, που παρουσίασε, αρχικά, το συνδέτη θα είναι μειωμένη και άρα, τα δύο κύτταρα θα έχουν διαφορετικό

πεπρωμένο. Ο τρίτος μηχανισμός αφορά δύο πληθυσμούς κυττάρων, όπου αυτός, που εκφράζει τους συνδέτες, ενεργοποιεί τη Notch σηματοδότηση στο γειτονικό πληθυσμό (Hall et al., 2016).

Εκτός της «κανονικής» Notch σηματοδότησης, έχει παρατηρηθεί και η «μη κανονική» Notch σηματοδότηση, η οποία μπορεί να είναι ανεξάρτητη της αλληλεπίδρασης με τον συνδέτη, είτε μπορεί η δράση του ICD να είναι ανεξάρτητη της CSL (RBP-Jk), είτε να συμβεί απουσία της γ-σεκρετάσης και σε μερικές περιπτώσεις, να είναι ταυτόχρονα ανεξάρτητη της αλληλεπίδρασης με τον συνδέτη (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Η «μη κανονική» Notch σηματοδότηση. Πραγματοποιείται, είτε παρουσία, είτε απουσία του συνδέτη. Επιπλέον, μπορεί να είναι εξαρτημένη ή ανεξάρτητη της γ-σεκρετάσης και στην περίπτωση που είναι ανεξάρτητη, τότε συμβαίνει, ενώ ο Notch είναι συνδεδεμένος στη μεμβράνη. Η «μη κανονική» Notch σηματοδότηση είναι ανεξάρτητη του CSL/RBPJk και αντ' αυτού αλληλεπιδρά με τα PI3K, mTORC2, AKT, Wnt, NFκB, YY1 ή HIF-1α μονοπάτια σε επίπεδο κυτταροπλάσματος ή/και σε πυρηνικό επίπεδο. Η «μη κανονική» Notch σηματοδότηση ρυθμίζει την κυτταρική επιβίωση, τον μεταβολισμό και τη

διαφοροποίηση μέσω αλληλεπιδράσεων με αυτά τα μονοπάτια σε πολλές σημαντικές βιολογικές διαδικασίες.

Στην περίπτωση απουσίας του συνδέτη, ξεκινάει η διαδικασία αποδόμησης του υποδοχέα NOTCH, που βρίσκεται στη μεμβράνη του κυττάρου. Αρχικά, θα προστεθεί ένα μόριο ουβικουτίνης στο κυτταροπλασματικό μέρος του υποδοχέα από την λιγάση E3 Deltex (Dx). Η πρωτεΐνη Kurtz (Krz, *D. melanogaster*) σχηματίζει ένα σύμπλοκο με την Dx και τον υποδοχέα κι έτσι, συνεχίζει η προσθήκη μορίων ουβικουτίνης στον υποδοχέα. Το ενδοσωμικό σύμπλοκο, που είναι υπεύθυνο για μεταφορά (Endosomal Complex Required for Transport, ESCRT), αναγνωρίζει πρωτεΐνες με μόρια ουβικουτίνης και συμμετέχει στη ρύθμιση πολλών μεμβρανικών υποδοχέων. Υπάρχουν τέσσερα σύμπλοκα ESCRT, τα οποία βοηθούν τον υποδοχέα να καταταχθεί στα ενδοαυλικά κυστίδια (intraluminal vesicles, ILVs) του πολυκυστιδιακού σώματος (multivesicular body, MVB). Τέλος, το περιεχόμενο του MVB μεταφέρεται στα λυσοσώματα για αποικοδόμηση. Εάν δε γίνει η διαδικασία αυτή και εντοπιστεί ο NOTCH υποδοχέας στην εξωτερική ενδοσωμική μεμβράνη, τότε μπορεί να διαχωριστεί από λάθος ο NICD από τον NECD και να ενεργοποιηθεί η σηματοδότηση (Palmer and Deng, 2015).

Η «μη κανονική» Notch σηματοδότηση μπορεί να συμβεί μέσω ενός μηχανισμού ανεξάρτητου του RBP-Jk, ο οποίος φαίνεται ότι διαδραματίζει ρόλο στη δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και την ογκογένεση. Το κυτταροπλασματικό μέρος του υποδοχέα ICN, που απελευθερώνεται, ρυθμίζει την μεταγραφή μέσω δύο πιθανών μηχανισμών: είτε αλληλεπιδρά με μεταγραφικούς παράγοντες, που δεν ανήκουν στην οικογένεια CSL/RBP-Jk, όπως είναι ο HIF (hypoxia-inducible factor) και ο MEF2 (monocyte enhancer factor-2), είτε μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα ένα διαφορετικό μέρος του ICN, το οποίο προκύπτει με τη βοήθεια της πρωτεάσης, γ-σεκρετάσης.

Η ανεξάρτητη της γ-σεκρετάσης Notch σηματοδότηση συμβαίνει, όταν οι υποδοχείς NOTCH δεν επεξεργάζονται από το σύμπλοκο της γ-σεκρετάσης. Το σύμπλοκο αυτό είναι απαραίτητο για να συμβεί η «κανονική» Notch σηματοδότηση, όμως, σε

εξαιρετικές περιπτώσεις μπορεί να λειτουργήσει το μονοπάτι, απουσία του συμπλόκου (Gratton et al., 2020).

Τέλος, αναφέρεται ότι η ενεργοποίηση των Notch υποδοχέων μπορεί να γίνει από συνδέτες, όπως ο MAGP-1 και -2 και ο YB1. Επιπλέον, ως συνδέτης μπορεί να λειτουργήσει ο Delta/Notch-like EGF related receptor (DNER), η MB3 και η contactin1 (CNTN1, επίσης, γνωστή ως F3). Η πρωτεΐνη DLK1 (protein delta homolog 1), επιπλέον, αλληλεπιδρά με τον NOTCH. Παρόλα αυτά, δεν είναι ξεκάθαρο εάν αυτοί οι συνδέτες επηρεάζουν έμμεσα τους Notch υποδοχείς (Siebel and Lendahl, 2017).

1.3 Η «πλειοτροπία» της Notch σηματοδότησης

Οι διαφορετικοί ρόλοι της Notch σηματοδότησης στην ανάπτυξη των οργανισμών, αλλά και στην εξέλιξη ή την καταστολή του όγκου σε διαφορετικούς τύπους νεοπλασίας, περιγράφουν την πλειοτροπία της Notch σηματοδότησης (Meurette and Mehlen, 2018). Το μονοπάτι αυτό εμφανίζει πλειοτροπικές λειτουργίες σε σχεδόν κάθε όργανο, μέσω μίας απλής σηματοδοτικής πορείας. Σε αντίθεση με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια, η Notch σηματοδότηση παρουσιάζει διακριτά επίπεδα στη δυναμική του σήματος για τους παρακάτω λόγους: α. από έναν υποδοχέα Notch απελευθερώνεται μόνο ένα NICD, μετά τη σύνδεση με το συνδέτη, β. δεν υπάρχουν ενδιάμεσα στάδια (όπως, ενδεικτικά, αυτά των κινασών), που ενισχύουν το αρχικό σήμα (είναι μια πορεία, ανεξάρτητη δεύτερων σημάτων) και γ. το NICD αποικοδομείται, αφού ενεργοποιήσει τη μεταγραφή γονιδίων. Επομένως, τα επίπεδα NICD που παράγονται, καθορίζουν την ένταση και διάρκεια της Notch σηματοδότησης (Shen et al., 2021).

Το αποτέλεσμα της ενεργοποίησης του μονοπατιού εξαρτάται, αυστηρά, από τον τύπο κυττάρου στο οποίο συμβαίνει. Σημειώνεται, εδώ, πως το ίδιο σήμα μπορεί να επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε έναν κυτταρικό τύπο, ενώ σε άλλον, τον κυτταρικό θάνατο (Fre et al., 2005). Παρατηρείται, ως εκ τούτου, ένα σύνολο διαφορετικών δράσεων, με τους ίδιους συνδέτες. Συνεπώς, η αλληλεπίδραση του μονοπατιού της Notch σηματοδότησης με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια έχει ως

αποτέλεσμα ακόμα περισσότερες δράσεις της Notch σηματοδότησης, εντείνοντας την παρατηρούμενη πλειοτροπία ως προς την πορεία των κυττάρων (Hori et al., 2013).

Η πλειοτροπία της Notch σηματοδότησης αντικατοπτρίζεται και στην πολυπλοκότητα του ρόλου της στις αιματολογικές ασθένειες. Στο πολλαπλούν μυέλωμα, πιο συγκεκριμένα, προκαλεί την έκκριση της IL-6 (ιντερλευκίνη-6, interleukin-6), του VEGF (αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας, vascular endothelial growth factor, VEGF) και του ινσουλινοειδούς αυξητικού παράγοντα 1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) από τα BMSCs, με αποτέλεσμα την αναστολή της απόπτωσης και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Στη CLL, τα στρωματικά κύτταρα καταστέλλουν την απόπτωση, υποστηρίζουν τη μετανάστευση και τη φαρμακολογική ανθεκτικότητα των καρκινικών κυττάρων, μέσω της Notch σηματοδότησης. Επιπλέον, η Notch σηματοδότηση μετέχει στην εκκίνηση της T-ALL, με τα στρωματικά κύτταρα να υποστηρίζουν την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, μέσω μορίων προσκόλλησης, όπως ιντεγκρίνες και ICAM-1 (intracellular adhesion molecule 1). Αντιθέτως, η ενεργοποίηση της Notch σηματοδότησης στην AML καταστέλλει την αγγειογένεση, εμποδίζοντας τη δράση του VEGF και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Έχει βρεθεί, όμως, μια μετάλλαξη στους οστεοβλάστες, που οδηγεί στην υπερέκφραση των συνδετών JAGGED1, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του Notch στα HSCs και τη δημιουργία μυελοδυσπλασίας, που εξελίσσεται σε AML σε ζωικά μοντέλα (μύες). Επομένως, η Notch σηματοδότηση είναι πιθανό να συμβάλλει στην εκκίνηση και της AML. Στο πολλαπλούν μυέλωμα, το miR-146a μπορεί να ενεργοποιήσει τον NOTCH1 στα στρωματικά κύτταρα και να εκκριθούν η CCL2 και πολλές ακόμα κυτταροκίνες (IL-8, IL-6, CXCL1, IP-10 and CCL5), που ενισχύουν τη βιωσιμότητα και τη μετανάστευση των μυελωματικών κυττάρων.

1.4 Ο ρόλος των κυτταροκινών στην «πλειοτροπία» της Notch σηματοδότησης

Η αλληλεπίδραση των καρκινικών κυττάρων και των συστατικών του TME διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της νόσου και πραγματοποιείται μέσω

μορίων προσκόλλησης και διαλυτών παραγόντων, όπως είναι οι κυτταροκίνες και οι αυξητικοί παράγοντες. Το δίκτυο των κυτταροκινών στο TME έχει την ικανότητα να καθορίζει τη διαφοροποίηση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Η Notch σηματοδότηση διεγείρει αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού-β (Transforming Growth Factor, TGF-β), η ιντελευκίνη-10 (Interleukin, IL-10), η IL-4 και η IL-6 και συμβάλει με αυτόν τον τρόπο στην ανοσοκαταστολή στο TME. Διεγείρει, επίσης, προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες (TNF-α, IL-17, IL-1, CCL2 και CCL5), οι οποίες σχετίζονται με τον καρκίνο. Το TME χαρακτηρίζεται από αντιφλεγμονώδεις, ανοσοκατασταλτικές κυτταροκίνες. Η παραγωγή των ανοσοκατασταλτικών κυτταροκινών, συχνά, απαιτεί την ενεργοποίηση της Notch σηματοδότησης (Colombo et al, 2018). Παρακάτω παρουσιάζονται κυτταροκίνες που εμπλέκονται στην παθολογική επικοινωνία του όγκου και του TME στο πολλαπλό μυέλωμα, τις οποίες ρυθμίζει το μονοπάτι της Notch σηματοδότησης, που δυσλειτουργεί.

Η IL-6 είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες, που συνδέονται με την αύξηση και την επιβίωση των κυττάρων του πολλαπλού μυελώματος. Η αυτοκρινής IL-6 προέρχεται από τα μυελωματικά κύτταρα, ενώ η παρακρινής IL-6 προέρχεται από τα φυσιολογικά κύτταρα του μυελού των οστών. Τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών παράγουν μεγάλες ποσότητες IL-6, η οποία διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών πλασματοκυττάρων. Έχει βρεθεί ότι τα υψηλά επίπεδα της IL-6 στον ορό ασθενών με πολλαπλό μυέλωμα α. σχετίζονται με την εμφάνιση όγκου και τη σοβαρότητα της ασθένειας, β. προάγουν την εξέλιξη της νόσου (μέσω κυτταρικού πολλαπλασιασμού, επιβίωσης και μετανάστευσης των κυττάρων και ανθεκτικότητας αυτών στη θεραπεία) και γ. αποτελούν αρνητικό προγνωστικό παράγοντα. Σημειώνεται, εδώ, πως η χορήγηση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι της IL-6 μπορεί να αναστρέψει, προσωρινά, τα συμπτώματα της ασθένειας (Colombo and Galletti et al, 2016).

Η IL-6 προωθεί την ογκογένεση, ρυθμίζοντας τον μεταβολισμό των καρκινικών κυττάρων, αυξάνει την ανάπτυξη και την ανανέωσή τους, καθώς, επίσης, εμποδίζει την απόπτωση, ρυθμίζει την αγγειογένεση και ενισχύει την έκφραση του RANKL (Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-b Ligand), αλλά και την οστική

απορρόφηση. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού της Notch σηματοδότησης στο πολλαπλό μυέλωμα επάγει την έκκριση IL-6 από τα καρκινικά κύτταρα, όπως, επίσης και από τα στρωματικά κύτταρα και τα μυελοειδή κύτταρα (ηωσινόφιλα, μακροφάγα, δενδριτικά, μαστοκύτταρα) του TME. Έχει βρεθεί ότι η υπερέκφραση των συνδετών Jagged1 και Jagged2 και των υποδοχέων Notch, ενεργοποιεί το μονοπάτι της Notch σηματοδότησης και την έκκριση της IL-6. Στο πολλαπλούν μυέλωμα, η IL-6 προάγει την αύξηση των καρκινικών κυττάρων, την οστεοκλαστογένεση, την ανθεκτικότητα στη θεραπεία και συμβάλει στη δημιουργία ενός ανοσοκατεσταλμένου περιβάλλοντος του μυελού των οστών.

Ο μηχανισμός δράσης της IL-6 στο πολλαπλούν μυέλωμα, ο οποίος οδηγεί σε ανοσοκαταστολή, είναι περίπλοκος και δεν έχει κατανοηθεί πλήρως. Η δράση της IL-6 στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος περιλαμβάνει την πόλωση των μακροφάγων προς τον φαινότυπο M2, την παρεμπόδιση της διαφοροποίησης των βοηθητικών Th1 κυττάρων, την διαφοροποίηση των CD4⁺ T-κυττάρων σε κύτταρα Th2, που παράγουν IL-4 και τη διαφοροποίηση των δενδριτικών κυττάρων (dendritic cells, DCs) σε ρυθμιστικά DCs, που παράγουν IL-10. Επιπλέον, η IL-6 και ο TGF- β επηρεάζουν την ισορροπία μεταξύ των T-ρυθμιστικών κυττάρων (T regulatory, Treg) και των Th17. Μειώνουν τα Treg, που καταστέλλουν τον όγκο και ενισχύουν τη διαφοροποίηση των προφλεγμονωδών Th17-κυττάρων. Τέλος, τα μακροφάγα-M2 διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μείωση της φλεγμονής και βοηθούν στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, τη μετάσταση και την αγγειογένεση, ενώ εμποδίζουν τη μεσολάβηση των T-κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος και συντηρούν την εξέλιξη του όγκου. Από τα παραπάνω μπορούμε να υποθέσουμε ότι η αναδιαμόρφωση του ανοσοποιητικού συστήματος μπορεί να είναι ο μηχανισμός, όπου συνεργάζονται η IL-6 και το μονοπάτι της Notch σηματοδότησης για να προάγουν την εξέλιξη του πολλαπλού μυελώματος (Colombo et al., 2018).

Η παραγωγή της IL-6 ρυθμίζεται σε επίπεδο μεταγραφής. Πιο συγκεκριμένα, ο μεταγραφικός πυρηνικός παράγοντας *kB* (nuclear factor, NF-*kB*) ενεργοποιείται από την ιντερλευκίνη-1 (IL-1) και τον TNF α και ρυθμίζει την έκκριση της IL-6. Επιπλέον, το μονοπάτι της Notch σηματοδότησης έχει την ικανότητα να ρυθμίζει την έκκριση

της IL-6 στα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα και στα μακροφάγα (Colombo and Galletti et al, 2016).

Η χυμοκίνη CXCL12 (C-X-C Motif Chemokin Ligand 12), επίσης, γνωστή ως SDF1 (stromal cell-derived factor 1), προσδένεται σε δύο υποδοχείς, τους CXCR4 και CXCR7. Ο CXCR4 υποδοχέας, είναι από τους πιο συχνά εκφραζόμενους υποδοχείς στα καρκινικά κύτταρα και έχει σημαντικό ρόλο στην αναδιαμόρφωση του TME στις αιματολογικές ασθένειες, όπως το πολλαπλούν μυέλωμα, η οξεία μυελοειδής λευχαιμία και η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (T-ALL), αλλά και στους συμπαγείς όγκους. Το μονοπάτι σηματοδότησης του CXCR4 ενεργοποιείται σε συνθήκες υποξίας ή λόγω στεροειδών ορμονών και συνδέεται με τον διεισδυτικό και μεταστατικό καρκίνο, λόγω της συμμετοχής του στη μετανάστευση των κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό, την ανθεκτικότητα στην απόπτωση, την αγγειογένεση και την εξέλιξη της μετάστασης. Το μονοπάτι της Notch σηματοδότησης συνεργάζεται με το σύμπλοκο CXCR4/CXCL12 στις αιματολογικές ασθένειες και τους συμπαγείς όγκους. Πιο συγκεκριμένα, η έκκριση της CXCL12 και η πρόσδεσή της στον CXCR4 στο πολλαπλούν μυέλωμα ρυθμίζεται από το μονοπάτι της Notch σηματοδότησης και μπορεί να αναστέλλεται από τους αναστολείς της γ-σεκρετάσης. Επίσης, όταν τα επίπεδα της CXCL12 στο TME είναι υψηλά, αυξάνεται ο πληθυσμός των M2-μακροφάγων. Ο αποκλεισμός του CXCR4/CXCL12 μονοπατιού έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων και σημαντικά, τα μυελωματικά κύτταρα χάνουν την ικανότητά τους *in vivo* να εγκαθίστανται στο μυελό των οστών (Colombo et al., 2018; Ullah, 2019).

Ο RANKL (Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-b Ligand) ανήκει στην οικογένεια κυτταροκινών TNF (Tumor Necrosis Factor) και η απορρύθμισή του έχει σημασία στους καρκίνους, που σχηματίζονται στα οστά, καθώς σχετίζεται με την ωρίμανση των μονοπύρηνων κυττάρων σε οστεοκλάστες (OCLs) και άρα, την οστεόλυση. Η αύξηση των επιπέδων του RANKL χαρακτηρίζει σχεδόν όλους του καρκίνους των οστών (άρα και το πολλαπλούν μυέλωμα). Όταν τα καρκινικά κύτταρα μεταναστεύουν στο μυελό των οστών, παρατηρείται μια ανισορροπία μεταξύ οστικής απορρόφησης και επαναφοράς, εξαιτίας τροποποιήσεων στη διαφοροποίηση και τη δραστηριότητα των οστεοβλαστών (OBLs) και των OCLs.

Αυτή η απορρύθμιση οφείλεται στην αυξημένη έκκριση του RANKL και των Th17, Treg και DCs και έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία οστεολυτικών αλλοιώσεων. Στο πολλαπλούν μυέλωμα τα μυελωματικά κύτταρα υπερεκφράζουν τους συνδέτες JAG και μπορούν να ενεργοποιήσουν τον υποδοχέα NOTCH2 στους οστεοκλάστες, προάγοντας τη διαφοροποίησή τους, με αποτέλεσμα την αυξημένη οστική καταστροφή. Επιπλέον, προκαλούν την απελευθέρωση του RANKL υποδοχέα. Ως εκ τούτου, στην περίπτωση της παρεμπόδισης του μονοπατιού της Notch σηματοδότησης, μέσω του αναστολέα της γ-σεκρετάσης (GSI) ή της μείωσης των JAG συνδετών, παρατηρείται μείωση της έκκρισης του RANKL, καθώς και της διαφοροποίησης και δραστηριότητας των OCL. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η Notch σηματοδότηση συνεργάζεται με τον RANKL σε πολλούς τύπους καρκίνου, ώστε να εμποδίσουν την ανοσολογική απάντηση κατά του όγκου (Colombo et al., 2018, Rajee, 2019).

Η ιντερλευκίνη-10 (IL-10) είναι μια ανοσοκατασταλτική και αντιφλεγμονώδης κυτταροκίνη, που παράγεται από διάφορα κύτταρα σε μια ανοσολογική απόκριση, όπως τα Th2, τα μονοκύτταρα, άλλους υποτύπους T-κυττάρων, τα B-κύτταρα, τα δενδριτικά κύτταρα, τα ηωσινόφιλα και τα μαστοκύτταρα. Τα καρκινικά κύτταρα παράγουν μεγάλες ποσότητες IL-10, η οποία συμβάλει στην εξέλιξη του όγκου. Στο TME, η IL-10 που εκκρίνεται από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και τα κακοήγη κύτταρα, προκαλεί την ενεργοποίηση ογκογονιδίων, όπως ο υποδοχέας της φωσφατάσης 2A (PP2A) και η MYC (Colombo et al., 2018).

Η Notch σηματοδότηση, σε συνεργασία με την IL-12 ή την IL-27, προκαλεί την έκκριση μεγάλων ποσοτήτων IL-10 από τα Th1-κύτταρα και με αυτόν τον τρόπο, εμποδίζει τη δράση των Th1-κυττάρων και τη φλεγμονώδη αντίδραση. Επίσης, οι συνδέτες Dll, που εκφράζονται από τα δενδριτικά κύτταρα, αλλά όχι οι Jagged, παραδόξως, ενεργοποιούν τους υποδοχείς, που βρίσκονται στην επιφάνεια των T-κυττάρων και παράγεται IL-10 *in vitro* και *in vivo*. Μέχρι τώρα, έχει αναφερθεί ότι η επικοινωνία της Notch σηματοδότησης με την IL-10, παρεμποδίζει τη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος, μέσω της ενεργοποίησης των Th1- και T-κυττάρων. Παράλληλα, η Notch σηματοδότησης, παρουσία της IL-10, ευθύνεται για τη μετατροπή των μακροφάγων, που σχετίζονται με τον όγκο (Tumor Associated

Macrophages, TAMs) σε μακροφάγα-M1, προωθώντας τη φλεγμονή και την ανοσολογική απάντηση. Αντιθέτως, η παρεμπόδιση της ενεργοποίησης της Notch σηματοδότησης, μέσω αναστολέων της γ-σεκρετάσης (Gamma Secretase Inhibitors, GSI), μορίων RNA (small interfering RNA), ή της διαγραφής του γονιδίου RBP-Jk, μετατρέπει τα μακροφάγα στον M2 φαινότυπο, ο οποίος χαρακτηρίζεται από την παραγωγή IL-10 και τη μειωμένη ενεργοποίηση των Th1-κυττάρων.

Είναι γνωστό ότι ο καρκίνος είναι στενά συνδεδεμένος με τη χρόνια φλεγμονή. Η Notch σηματοδότηση διεγείρει, επίσης, προ-φλεγμονώδη μόρια (TNF-α, IL-17, IL-1, CCL2 και CCL5), τα οποία σχετίζονται με την αύξηση του όγκου και την ανοσοεπιτήρηση.

Ο TNFα είναι μια προφλεγμονώδης και ανοσορυθμιστική κυτταροκίνη και ανήκει στην οικογένεια των TNF/TNF υποδοχέων. Ο TNFα είναι από τους σημαντικότερους ενεργοποιητές του μονοπατιού NF-kB. Παράγεται από τα μακροφάγα, τα λεμφοκύτταρα, τους ινοβλάστες και τα κερατινοκύτταρα, αλλά και από τα καρκινικά κύτταρα, παρουσία μόλυνσης ή φλεγμονής. Έχει παρατηρηθεί η αλληλεπίδραση του Notch μονοπατιού και του TNFα, αναφορικά με τη γονιδιακή μεταγραφή γονιδίων-στόχων της Notch σηματοδότησης, υπό τη ρύθμιση του NF-kB. Σε έρευνα των Delgado-Calle et al. (2016) για το πολλαπλούν μυέλωμα αποδεικνύεται ότι η ενεργοποίηση της Notch σηματοδότησης από τα οστεοκύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή της απόπτωσης, που ενισχύεται από τα υψηλά επίπεδα TNFα, που εκκρίνονται από τα μυελωματικά κύτταρα. Η συνεργασία των δύο μονοπατιών επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι η μονοθεραπεία με GSI-XX, έναν αναστολέα της γ-σεκρετάσης ή αντι-TNFα καταστέλλει, μερικώς, τον κυτταρικό θάνατο των οστεοκυττάρων, ενώ ο συνδυασμός και των δύο θεραπειών αποτρέπει, πλήρως, την απόπτωσή τους. Η αυξημένη απόπτωση των οστεοκυττάρων, όχι μόνο μειώνει τη δημιουργία οστών, αλλά και αυξάνει την αποδόμησή τους, καθώς συνδέεται με την αυξημένη έκκριση του παράγοντα RANKL. Επομένως, τα μυελωματικά κύτταρα «εκμεταλλεύονται» τη συνεργασία του μονοπατιού της Notch σηματοδότησης και του TNFα για να επάγουν την οστική απορρόφηση στο πολλαπλούν μυέλωμα και πιθανώς, την ανοσοκαταστολή, μέσω της ενεργοποίησης του RANKL (Colombo et al., 2018).

Στο πολλαπλούν μυέλωμα, μεταξύ άλλων, η φλεγμονώδης χυμοκίνη CCL5 και ο υποδοχέας της, CCR5, αφορούν στα στρωματικά κύτταρα του TME, τα λεμφοκύτταρα, τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα ή τους ινοβλάστες, που σχετίζονται με τον όγκο (cancer associated fibroblasts, CAFs). Αναφέρεται ότι η Notch σηματοδότηση ρυθμίζει θετικά την έκκριση του CCR5 στα στρωματικά κύτταρα στο πολλαπλό μυέλωμα, με αποτέλεσμα την ενίσχυση της βιωσιμότητας και της μετανάστευσης των μυελωματικών κυττάρων. Γενικά, η CCL5 συμμετέχει στη διαμόρφωση του TME, διεγείροντας την ενεργοποίηση των CAFs και των OCLs, αλλά και στην ανοσοκαταστολή, προωθώντας την απόπτωση των κυτταροτοξικών CD8+ T-κυττάρων, τη στρατολόγηση των TAMs, των MDSCs (myeloid-derived suppressor cells), των ηωσινόφιλων, των μαστοκυττάρων, των CD4+ T-κυττάρων και των T-ρυθμιστικών κυττάρων (Colombo et al., 2018).

Ο VEGF συμμετέχει στην εξέλιξη του όγκου, ρυθμίζοντας την αγγειογένεση, ενώ έχει και αναστολατική δράση έναντι των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, που φτάνουν στην περιοχή του όγκου, μέσω της νεοαγγειογένεσης. Σύμφωνα με έρευνα των Houde et al. (2004) και των Berenstein et al. (2016) στο πολλαπλούν μυέλωμα, τα μυελωματικά κύτταρα αξιοποιούν την επικοινωνία της Notch σηματοδότησης με τον VEGF, ώστε να ενεργοποιήσουν την αγγειογενετική δράση των γειτονικών στρωματικών κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, ο συνδέτης JAGGED2, που υπερεκφράζεται στα μυελωματικά κύτταρα, ενεργοποιεί τη Notch σηματοδότηση στα στρωματικά κύτταρα, τα οποία εκκρίνουν τον VEGF. Έτσι, ο VEGF προωθεί την αγγειογένεση και διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των μυελωματικών κυττάρων (Colombo et al., 2018, Akhtar et al, 2020).

Ο σημαντικός ρόλος της Notch σηματοδότησης στις κακοήθειες υποδηλώνει ότι οι φυσιολογικές κυτταροκίνες δύναται να αποκατασταθούν και να αποτραπεί ο επαναπρογραμματισμός του ανοσοποιητικού συστήματος, παρουσία όγκου, στοχεύοντας αυτό το μονοπάτι σηματοδότησης. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιούνται, κυρίως, οι αναστολείς γ-σεκρετάσης (GSI), οι οποίοι παρεμποδίζουν, εντελώς, το μονοπάτι της Notch σηματοδότησης. Η χρήση αυτών των αναστολέων, ωστόσο, οδηγούν σε εκδηλώσεις τοξικότητας στο γαστρεντερολογικό σύστημα των ασθενών, λόγω εντερικής μετάπλασης. Επομένως,

κρίνεται αναγκαία η μελέτη του ρόλου των υποδοχέων και συνδετών της Notch σηματοδότησης στην απορρύθμιση των κυτταροκινών, ώστε να βρεθούν βελτιωμένες θεραπείες και να αποφεύγονται οι παρενέργειες, που προκαλούν οι GSI (Colombo et al., 2018).

1.5 Ο ρόλος της Notch σηματοδότησης στο μικροπεριβάλλον του όγκου: έμφαση στο πολλαπλούν μυέλωμα

Τα καρκινικά κύτταρα επιβιώνουν και εξελίσσονται σε διεισδυτικούς όγκους, μόνο σε ένα περιβάλλον, όπου υπάρχουν επαρκή θρεπτικά συστατικά, οξυγόνο και δεν υπάρχουν κυτταροτοξικά μηνύματα (Wellenstein and Karin E. de Visser, 2018). Τα καρκινικά κύτταρα του πολλαπλού μυελώματος θεωρούνται κύτταρα με μακρά διάρκεια ζωής, που δεν έχουν την ικανότητα να δημιουργήσουν όγκο, καθώς εξαρτώνται, αυστηρά, από το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών για να επιβιώσουν και να προκαλέσουν την ασθένεια. Το TME συγκροτείται από εξωκυττάρια ουσία (extracellular matrix, ECM) και στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών (bone marrow stromal cells, BMSC), όπως είναι οι ινοβλάστες, οι OBLs και OCLs, τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα και τα λεμφοκύτταρα. Τα BMSCs περιλαμβάνουν μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα, που εκφράζουν τους NOTCH1,2,3 υποδοχείς και τους Notch συνδέτες JAG1, DLL3 και DLL4.

Η επικοινωνία των καρκινικών κυττάρων και των κυττάρων του TME πυροδοτεί δραματικές αλλαγές, όπως η οστεόλυση, η εδραίωση των καρκινικών κυττάρων, η εξάπλωση του όγκου, η παραγωγή παραγόντων επιβίωσης, η αναστολή της οστεοβλαστογένεσης, η αγγειογένεση και η ανοσοκαταστολή. Η εξέλιξη του όγκου, η ανθεκτικότητα στη θεραπεία, η διεισδυτικότητα και η μετάσταση συμβαίνουν, επίσης, μέσω των αλληλεπιδράσεων καρκινικών κυττάρων-TME. Ο διάλογος αυτός γίνεται μέσω διαφόρων μονοπατιών ενδοκρινούς και παρακρινούς σηματοδότησης, μεταξύ των οποίων, η Notch σηματοδότηση, που επιδρά, τόσο στα καρκινικά κύτταρα (είτε δρα ως ογκογονίδιο, είτε ογκοκατασταλτικά), όσο και στα κύτταρα του TME (Colombo et al, 2013). Είναι εντυπωσιακό το γεγονός ότι κάθε τύπος κυττάρου, που συγκροτεί το TME (αγγειακά κύτταρα, CAFs, κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος), εκφράζει τους υποδοχείς και συνδέτες της Notch κι

έτσι, η Notch σηματοδότηση συμμετέχει σε πολλές λειτουργίες του TME (Meurette, 2020).

Το πολλαπλούν μυέλωμα είναι η δεύτερη πιο συχνή αιματολογική κακοήθεια και χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση κακοήθων Β-κυττάρων στον μυελό των οστών (bone marrow, BM). Οι ασθενείς ταξινομούνται, κλινικά, σε τέσσερα στάδια. Η μονοκλωνική γάμμα-σφαιρινοπάθεια αδιευκρίνιστης σημασίας (Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance, MGUS) και το έρπον πολλαπλούν μυέλωμα (Smoldering multiple myeloma, SMM) είναι τα δύο πρώτα ασυμπτωματικά στάδια της ασθένειας. Ακολουθούν το πολλαπλούν μυέλωμα και η πλασματοκυτταρική λευχαιμία (PCL).

Η Notch σηματοδότηση στο πολλαπλούν μυέλωμα παρατηρείται ιδιαίτερα αυξημένη. Σε αντίθεση με άλλες κακοήθειες, που σχετίζονται με τη Notch σηματοδότηση, όπου οι περισσότεροι ασθενείς παρουσιάζουν μεταλλάξεις κέρδους λειτουργίας στα μέλη της Notch σηματοδότησης, στο πολλαπλούν μυέλωμα η ασυνήθιστη ενεργοποίησή της συμβαίνει λόγω της αυξημένης έκφρασης των NOTCH υποδοχέων και των συνδετών τους. Η αυξημένη έκφραση, πιθανώς, οφείλεται σε γενετικές μεταλλάξεις και σε *de novo* ενεργοποίηση, λόγω σημάτων από το TME (Sabol and Delgado-Calle, 2021).

Αναλυτικά, η έκφραση των υποδοχέων NOTCH1 και NOTCH2 είναι αυξημένη στα κακοήθη πλασματοκύτταρα ασθενών με πολλαπλούν μυέλωμα, σε σχέση με τα πλασματοκύτταρα ή τον μυελό των οστών υγιών ατόμων, όπως επίσης και η έκφραση των συνδετών JAG1 και JAG2 και των γονιδίων-στόχων της Notch (*Hes5*, *Hes1* και *Hey2*). Σημειώνεται ότι η εξέλιξη της MGUS σε πολλαπλούν μυέλωμα σχετίζεται με την απορυθμισμένη λειτουργία του υποδοχέα NOTCH1 και του συνδέτη JAG1. Ο συνδέτης JAG2 εμφανίζεται αυξημένος ήδη από το πρώτο στάδιο της νόσου, αυτό της MGUS (Palano et al., 2020). Η ενεργοποίηση της Notch σηματοδότησης στα κακοήθη πλασματοκύτταρα μπορεί να συμβεί με δύο τρόπους: είτε με την ταυτόχρονη έκφραση των NOTCH1-3 υποδοχέων και των JAG1 και JAG2 συνδετών τους (homotypic activation), είτε με την έκφραση των συνδετών DLL ή JAG από τα BMSCs (heterotypic activation) (Colombo et al, 2013). Τα αυξημένα επίπεδα των συνδετών και των υποδοχέων Notch στα κύτταρα του πολλαπλού μυελώματος

διευκολύνουν την επικοινωνία με τα γειτονικά κύτταρα του TME και επάγουν την αυξημένη έκφραση της κυκλίνης D1 (Cyclin D1) και την έκκριση IL-6, οι οποίες, με τη σειρά τους, διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό και στηρίζουν την επιβίωση των μυελωματικών κυττάρων (Sabol and Delgado-Calle, 2021). Κατά συνέπεια, η αναστολή της Notch σηματοδότησης στον μυελό των οστών προλαμβάνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του πολλαπλού μυελώματος και την ανθεκτικότητα των κυττάρων στην απόπτωση (Kushwah and Guezguez et al., 2014).

Η απορυθμισμένη Notch σηματοδότηση διαδραματίζει, επίσης, ρόλο στις παθήσεις των οστών, που σχετίζονται με το πολλαπλούν μύελωμα (MM-associated bone disease), καθώς συμβάλλει στην ανισορροπία, που παρατηρείται μεταξύ των OCLs και των OBLs, ευνοώντας την ανάπτυξη των OCLs. Η οστεοκλαστογένεση ρυθμίζεται μέσω της Notch σηματοδότησης με δύο μηχανισμούς: α. ρυθμίζοντας την έκφραση προ-οστεοκλαστογενετικών (pro-osteoclastogenic) κυτταροκινών από τα μυελωματικά κύτταρα και β. μέσω της αλληλεπίδρασης των μυελωματικών κυττάρων και των κυττάρων του TME (Colombo et al, 2013). Τα μυελωματικά κύτταρα εκκρίνουν κυτταροκίνες (Rankl και M-CSf), που ρυθμίζουν τη διαφοροποίηση των OCLs. Επιπλέον, η ενεργοποίηση της Notch σηματοδότησης στα μυελωματικά κύτταρα, μέσω του NOTCH3 από τα οστεοκύτταρα του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών, έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη του όγκου και την οστική επαναρρόφηση (Sabol and Delgado-Calle, 2021).

Η εξέλιξη της MGUS σε πολλαπλούν μύελωμα χαρακτηρίζεται από τον πολλαπλασιασμό των μυελωματικών κυττάρων στην περιοχή του μυελού των οστών και συνοδεύεται από την παραγωγή νέων αγγείων. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα του πολλαπλού μυελώματος (MM-associated endothelial cells, MM-ECs) έχουν μεγαλύτερη αγγειογενετική ικανότητα από τα MGUS-ECs. Η αγγειογένεση στο πολλαπλούν μύελωμα βασίζεται στην ενεργοποίηση της Notch σηματοδότησης στα MM-ECs. Σε συνεργασία με τον VEGF, η Notch σηματοδότηση εμπλέκεται στη φυσιολογική αγγειογένεση, αλλά και στην παθολογική αγγειογένεση στην περιοχή του όγκου. Η αυξημένη πυκνότητα των αγγείων στον μυελό των οστών στο πολλαπλούν μύελωμα (microvessel density, MVD) σχετίζεται με φτωχή πρόγνωση. Ο όγκος, μέσω των αγγείων, προμηθεύεται θρεπτικά συστατικά και οξυγόνο,

απαραίτητα για τον πολλαπλασιασμό των μυελωματικών κυττάρων, διευκολύνοντας τη μετανάστευσή τους σε άλλα σημεία του σώματος (Palano et al., 2020, and Mehlen, 2018).

Για την ανάπτυξη των όγκων απαιτείται η διαφυγή των καρκινικών κυττάρων από το ανοσοποιητικό σύστημα και η καταστολή του. Η Notch σηματοδότηση ρυθμίζει το ανοσοκατεσταλμένο περιβάλλον, μέσω της δράσης της στα μακροφάγα και τα MDSCs, αλλά εμπλέκεται και στην ανοσολογική απάντηση κατά του όγκου, ρυθμίζοντας τη δράση των κυτταροτοξικών CD8+ T-κυττάρων (Meurette, 2020). Υποστηρίζεται, ακόμη, ο ενεργός ρόλος της Notch σηματοδότησης στη δημιουργία μυελωματικών κυττάρων, ανθεκτικών στη θεραπεία. Οι Colombo et al. (2020) έδειξαν ότι η αναστολή της δράσης των συνδετών JAG *in vitro*, *ex vivo* και *in vivo* σε ιχθύες *Danio rerio* μειώνει την ανθεκτικότητα των μυελωματικών κυττάρων στη βορτεζομίμπη (bortezomib), τη λεναλιδομίδη (lenalidomide) και τη μελφαλάνη (melphalan), καθώς και την ανθεκτικότητα, που προέρχεται από την αλληλεπίδρασή τους με τα στρωματικά κύτταρα. Τα σήματα της Notch σηματοδότησης, που προέρχονται από τα στρωματικά κύτταρα, φαίνεται ότι βοηθούν τα μυελωματικά κύτταρα να αποκτήσουν ανθεκτικό φαινότυπο στη θεραπεία. Η ενεργοποίηση της Notch σηματοδότησης στα μυελωματικά κύτταρα από τα στρωματικά κύτταρα, μέσω του συνδέτη JAG1, έχει βρεθεί ότι είναι αρκετή για να τα προστατέψει από τη δράση της μελφαλάνης και της μιτοξαντρονης (mitoxantrone). Στη δημιουργία της ανθεκτικότητας εμπλέκονται οι χυμοκίνες CXCR4/SDF1α. Οι συνδέτες JAG, που εκφράζουν τα μυελωματικά κύτταρα, ενεργοποιούν τη Notch σηματοδότηση στα στρωματικά κύτταρα και τότε, εκκρίνονται μεγάλες ποσότητες SDF1 (stromal cell derived factor-1) στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών. Έτσι, αυξάνεται η ενεργοποίηση του CXCR4 στα μυελωματικά κύτταρα (Colombo et al., 2020).

Είναι ξεκάθαρο πλέον ότι το TME διαδραματίζει καίριο ρόλο στην εξέλιξη του όγκου και τα κύτταρα από τα οποία συγκροτείται είναι πολύ περισσότερο γενετικά και φαινοτυπικά σταθερά από τα κύτταρα του όγκου. Επομένως, το TME αποτελεί στόχο πλήθους αντικαρκινικών θεραπειών (Liao et al., 2019).

1.6 Τα χαρακτηριστικά του μικροπεριβάλλοντος του όγκου

Τα συστατικά του TME διακρίνονται σε κυτταρικά και μη κυτταρικά. Τα κυτταρικά συστατικά διακρίνονται σε αιμοποιητικά και μη αιμοποιητικά κύτταρα. Ειδικότερα, τα αιμοποιητικά κύτταρα περιλαμβάνουν τα μυελοειδή κύτταρα, τους OCLs και κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως τα T- και B-λεμφοκύτταρα και τα NK- κύτταρα. Τα μη αιμοποιητικά κύτταρα περιλαμβάνουν τα στρωματικά κύτταρα, τα μεσεγχυματικά κύτταρα, τους CAFs, τα λιποκύτταρα, τους OBLs και τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τέλος, τα μη κυτταρικά συστατικά περιλαμβάνουν την εξωκυττάρια μήτρα και κυτταροκίνες, χυμοκίνες και αυξητικούς παράγοντες (Kawano et al, 2015). Εντούτοις, η ακριβής σύνθεση του TME και το πώς καθορίζει τη δημιουργία και την εξέλιξη του όγκου, διαφέρουν ανάμεσα στους ασθενείς και τους διαφορετικούς τύπους καρκίνου (Arneth, 2019).

Η εξωκυττάρια μήτρα (extracellular matrix, ECM) αποτελείται από ένα δίκτυο μακρομορίων (γλυκοπρωτεϊνών, κολλαγόνου και ενζύμων), που υποστηρίζει ποικίλες βιοχημικές διεργασίες. Η ECM συγκροτείται από συστατικά, που επηρεάζουν την προσκόλληση των κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό και την επικοινωνία τους. Επηρεάζει, επίσης, τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων, τροποποιώντας τις φυσικές τους ιδιότητες, τη σύσταση και την τοπογραφία τους. Ο βαθμός προσκόλλησης και η συγκέντρωση της ECM καθορίζει την ταχύτητα της μετανάστευσης των κυττάρων από μια περιοχή σε μια άλλη (Arneth, 2019).

Οι CAFs συμβάλλουν στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό, την αγγειογένεση, τη διείσδυση του όγκου στους γύρω ιστούς, τη μετάσταση και την ανθεκτικότητα στη θεραπεία (Liao et al., 2019). Οι CAFs, σε σχέση με τους φυσιολογικούς ινοβλάστες, αλληλεπιδρούν με τα καρκινικά κύτταρα του TME και βρίσκονται σε μια υπερενεργοποιημένη κατάσταση, που υποστηρίζει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, μέσω διαφόρων μονοπατιών (Joshi et al. 2021). Μέσω της έκκρισης αυξητικών παραγόντων, κυτταροκινών, χυμοκινών, αλλά και την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας, οι CAFs εμφανίζουν ογκογονικό ρόλο. Η δράση του NOTCH1, τέλος, στους CAFs ρυθμίζει την ετερογένεια και την επιθετικότητα του όγκου (Du et al., 2019).

Το χαμηλό pH στο μικροπεριβάλλον του όγκου, επιπρόσθετα, βοηθά στη διαφυγή των καρκινικών κυττάρων από το ανοσοποιητικό σύστημα και την εξέλιξη του όγκου. Κύτταρα, όπως τα T- και τα NK-κύτταρα, συνήθως, χάνουν τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες και οδηγούνται στην απόπτωση, όταν εκτίθενται σε περιβάλλον με χαμηλό pH. Αντιθέτως, κύτταρα με ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες, όπως τα T-ρυθμιστικά κύτταρα, ευνοούνται από το όξινο περιβάλλον και λειτουργούν. παρεμποδίζοντας την ανοσολογική απόκριση ενάντια στον όγκο. Επομένως, το όξινο περιβάλλον του όγκου ρυθμίζει το ανοσοποιητικό σύστημα του TME και συμβάλλει στην ανοσοκαταστολή (Huber et al., 2017).

1.7 Τεχνολογίες αιχμής στο πολλαπλό μύελωμα

1.7.1 Τρισδιάστατες (3D) κυτταρικές καλλιέργειες

Μέχρι πρόσφατα, η έρευνα για το πολλαπλούν μύελωμα βασιζόταν κυρίως σε μοντέλα δύο διαστάσεων (2D), με χρήση κυττάρων από ασθενείς σε προχωρημένο στάδιο της νόσου, ικανά να καλλιεργηθούν ανεξάρτητα από την επικοινωνία τους με τον μυελό των οστών (Braham et al, 2018). Εντούτοις, οι όγκοι δημιουργούνται και αναπτύσσονται μέσα σε ένα μικροπεριβάλλον, που επηρεάζει την ανάπτυξή τους, αλλά και την ευαισθησία τους στη θεραπεία, σε τρεις διαστάσεις. Επομένως, είναι φορές στις οποίες τα μοντέλα δύο διαστάσεων δεν αντικατοπτρίζουν, επαρκώς, την απόκριση στη θεραπεία και ως εκ τούτου, παρατηρούνται αποκλίσεις μεταξύ των αποτελεσμάτων των προκλινικών μελετών και των κλινικών αποτελεσμάτων (Belloni et al., 2017). Τα περισσότερα *in vitro* 2D μοντέλα χρησιμοποιούν μονοκαλλιέργειες μυελωματικών κυτταρικών σειρών, αμελώντας το γεγονός ότι η αλληλεπίδρασή τους με τα συστατικά του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών επάγει την ανθεκτικότητα σε φάρμακα (De la Puente et al., 2015). Από τα 2D μοντέλα καλλιέργειών λείπουν χαρακτηριστικά του TME, όπως η βαθμίδωση οξυγόνου (tumor hypoxia) ή φαρμάκου (drug gradient), που επηρεάζουν σημαντικά την ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων στη θεραπεία σε διάφορες αιματολογικές ασθένειες, όπως το πολλαπλούν μύελωμα, η λευχαιμία και το λέμφωμα. Δυστυχώς, μόνο το 60% των ασθενών ανταποκρίνονται στις θεραπείες για το πολλαπλούν μύελωμα και περισσότεροι από το 90% των ασθενών που

υποτροπιάζουν, αναπτύσσουν ανθεκτικότητα στα φάρμακα (De la Puente et al., 2015). Επομένως, δημιουργείται η ανάγκη για εξατομικευμένα μοντέλα, που θα υποστηρίζουν την καλλιέργεια πρωτογενών μυελωματικών κυττάρων (Braham et al, 2018).

Τα 3D μοντέλα είναι σχεδιασμένα για να υποστηρίζουν τη δημιουργία του όγκου μέσα στο TME, την αλληλεπίδραση των κυττάρων του όγκου και των στρωματικών κυττάρων και τη σηματοδότηση (Belloni et al., 2017). Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιούνται ποικίλοι τύποι 3D κυτταρικών καλλιεργειών, απουσία ικριώματος (scaffold-free) ή παρουσία αυτού (scaffold-based). Η επιλογή, κάθε φορά, γίνεται με βάση τον κυτταρικό τύπο και το ερευνητικό ερώτημα. Οι τεχνολογίες, που βασίζονται σε ικρίωμα, διακρίνονται σε εκείνες με χρήση συνθετικής ή/και φυσικής υδρογέλης (synthetic/ natural hydrogel) και σε εκείνες με ικρίωμα πρωτεϊνικής σύστασης (matrigel) (Braham et al, 2018). Επισημαίνεται πως αν και οι υδρογέλες είναι συστήματα απλά και εύκολα αναπαράξιμα, δε βρίσκονται σε φυσιολογικές συνθήκες στο μυελό των οστών. Οι προσεγγίσεις, ελεύθερες ικριώματος, αποσκοπούν στη δημιουργία σφαιροειδών δομών και σε αυτές ανήκει η μέθοδος της κρεμάμενης σταγόνας (Hanging drop), η καλλιέργεια ιζήματος (Pellet culture), η καλλιέργεια σε υγρή επικάλυψη (Liquid overlay) και η καλλιέργεια σε φλάσκα, που φέρει στο εσωτερικό της μικρή περιστρεφόμενη φυγόκεντρο (Spinner culture).

Στην παρούσα εργασία επιλέχθηκε η μέθοδος της κρεμάμενης σταγόνας, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για την καλλιέργεια κυττάρων σε τρισδιάστατες συνθήκες και περιλαμβάνει την εναπόθεση σταγόνων καλλιεργητικού μέσου με κύτταρα ορισμένης πυκνότητας (ώστε να είναι ελεγχόμενο και καθορισμένο το μέγεθος των αναπτυσσόμενων σφαιροειδών) στο άνω μέρος ενός πιάτου-petri, το οποίο αναστρέφεται ήπια και τοποθετείται στην κορυφή του πιάτου, έχοντας προηγουμένως προσθέσει θρεπτικό υλικό στον πυθμένα του, ώστε να διατηρείται η υγρασία. Τα αιωρούμενα κύτταρα καθιζάνουν στην κορυφή της σταγόνας, σχηματίζοντας 3D δομές (Huang et al, 2020). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα σφαιροειδή μιμούνται σε ικανοποιητικό βαθμό το TME. Υπάρχει περιορισμός στη διάθεση οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών στα κύτταρα που βρίσκονται εσωτερικά, οδηγώντας, συχνά, σε νέκρωση. Επίσης, τα επιφανειακά κύτταρα

πολλαπλασιάζονται πιο γρήγορα, ενώ τα κύτταρα, που εντοπίζονται σε πιο εσωτερικές θέσεις, βρίσκονται προσωρινά στην φάση G0 του κυτταρικού κύκλου (Braham et al, 2018).

1.7.2 Μεταβολομική ανάλυση με χρήση υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας

Ο όρος «μεταβότυπος» αναφέρεται στο σύνολο των μεταβολιτών ενός κυττάρου ή ενός ιστού, δηλαδή στο σύνολο των ενδιάμεσων ή τελικών προϊόντων των κυτταρικών διεργασιών. Μελετώντας τους μεταβολίτες μπορούμε να πάρουμε πληροφορίες για τη βιοχημική δραστηριότητα του κυττάρου και την κατάσταση στην οποία βρίσκεται και για την επικοινωνία του με άλλα κύτταρα (Allegra et al., 2016). Η μεταβολομική ανάλυση πραγματοποιείται για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των μεταβολιτών και διακρίνεται σε στοχευμένη (targeted), ημι-στοχευμένη (semi-targeted) και μη-στοχευμένη (untargeted).

Η στοχευμένη ανάλυση εστιάζει στην απόλυτη ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης ή του ρυθμού μετασχηματισμού συγκεκριμένων μεταβολιτών, μέρους του συνόλου του δείγματος, που έχουν επιλεγεί βάσει της υπόθεσης που έχει προκύψει από προηγούμενο πείραμα, τη βιβλιογραφία ή/και κλινικές παρατηρήσεις (Liu & Locasale, 2017). Ενδεικτικά, η στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση μπορεί να εφαρμοστεί στην κλινική διαγνωστική για την ποσοτική μέτρηση αμινοξέων, μεταβολιτών φαρμάκων και συγκεκριμένων ενδογενών μεταβολιτών, στη μέτρηση ενζυμικών ενεργοτήτων *in vitro*, στην ταυτοποίηση ενζυμικών υποστρωμάτων και στην ανάπτυξη φαρμάκων (Lee et al., 2010). Στην ημι-στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση πραγματοποιείται ποιοτική/ποσοτική ανάλυση επιλεγμένης ομάδας μεταβολιτών (σάκχαρα, αμινοξέα, λιπίδια). Αναφορικά με τη μη-στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση, πραγματοποιείται ποιοτική/ποσοτική ανάλυση στο σύνολο των (ανιχνεύσιμων) μεταβολιτών, στοχαστικά και ολιστικά (Liu & Locasale, 2017).

Η υγρή χρωματογραφία-φασματοφωτομετρία μάζας (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) είναι ευρέως διαδεδομένη μέθοδος μεταβολομικής ανάλυσης, και χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση μεταβολιτών, ενώ χαρακτηρίζεται από εξαιρετική ακρίβεια, ευαισθησία, ειδικότητα,

αναπαραγωγιμότητα και ανιχνευσιμότητα (Saurina and Sentellas, 2019). Η LC–MS συνδυάζει τον φυσικό διαχωρισμό των συστατικών ενός δείγματος μέσω της LC (βάσει των φυσικο-χημικών ιδιοτήτων τους) και την ανάλυση των μαζών τους, μέσω της MS (Lopes et al., 2017). Συνοπτικά, στις μεταβολομικές αναλύσεις με LC-MS, κάθε αναλύτης, κατόπιν χαρακτηριστικής έκλουσης, εισέρχεται στην πηγή ιοντισμού του φασματομέτρου μάζας, όπου πραγματοποιείται ιοντισμός των μορίων. Ακολουθεί η εισαγωγή των ιόντων σε συνθήκες υπό κενό και ο χαρακτηρισμός τους, πρώτα, από τον αναλυτή μάζας (βάσει m/z) και στη συνέχεια, από τον ανιχνευτή, όπου προσδιορίζεται η αφθονία κάθε ιόντος (Pitt, 2009).

Τα παραγόμενα φάσματα συλλέγονται με τρόπο που εξαρτάται (data dependent acquisition) ή όχι από τα δεδομένα (data independent acquisition) και υφίστανται προεπεξεργασία και επεξεργασία με χρήση λογισμικών, εμπορικά ή και ελεύθερα διαθέσιμων, όπως είναι τα MetaboAnalyst, XCMS και Mass prolifer, με διαφορετικές δυνατότητες το καθένα (Liu & Locasale, 2017). Στο στάδιο αυτό, αφαιρείται ο θόρυβος του υποβάθρου, «διορθώνεται» το κατώφλι (baseline correction), ώστε να διαχωριστεί το αναλυτικό σήμα από το σήμα υποβάθρου, ενώ πραγματοποιείται κανονικοποίηση και στοίχιση των φασμάτων. Εν συνεχεία, διενεργείται ενδελεχής στατιστικός έλεγχος και μαθηματική ανάλυση (T'Kindt & Van Bocxlaer, 2010). Ακολουθεί η ταυτοποίηση των μεταβολιτών, με γνώμονα τις τιμές m/z και RT και βάσεις δεδομένων, όπως είναι οι METLIN (Metabolite and Chemical Entity Database) και HMDB (Human Metabolome Database) (Zhu et al., 2013). Τέλος, πραγματοποιείται βιοπληροφορική ανάλυση. Ενδεικτικά, αναφέρονται τα δίκτυα αλληλεπίδρασης (network analysis), η λειτουργική ανάλυση και η εύρεση των μοριακών μονοπατιών (functional & pathway analysis), με τελικό σκοπό την ανάδειξη των βιολογικών σχέσεων και την κατανόηση του μοριακού μηχανισμού, σε σχέση με την υπόθεση εργασίας (T'Kindt & Van Bocxlaer, 2010).

Στην παρούσα εργασία έλαβε χώρα στοχευμένη και μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση, με χρήση LC-MS.

2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

Περιγράφονται, αναλυτικά, τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν και ο απαραίτητος εργαστηριακός εξοπλισμός, αναφορικά με το εργαστηριακές προσεγγίσεις της παρούσας εργασίας, καθώς και οι υπολογιστικές προσεγγίσεις αυτής.

2.1 Εργαστηριακός εξοπλισμός

- Ηλεκτρική πιπέτα (Nichiryo, Japan)
- Μηχανικές μικροπιπέτες όγκου 2-20, 20-200 και 100-1000 μL (Nichiryo, Japan)
- Οπτικό μικροσκόπιο (Baush & Lomb)
- Επωαστικός κλίβανος με σταθερές συνθήκες 37°C, 5% CO₂ (Narco)
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος (Jouan)
- Υδατόλουτρο
- Πολλαπλής ανίχνευσης φασματοφωτόμετρο Safire II Tecan (Invitrogen)
- Θάλαμος νηματικής ροής (Holten)
- Αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Neubauer)
- Εργαστηριακό ψυγείο (4°C)
- Γυάλινες πιπέτες των 5 και 10 mL (SPL Life Sciences Ltd.)
- Ρύγχη (tips) μηχανικών μικροπιπετών (Kisker Biotech GmbH & Co. KG)
- Πλαστικοί σωλήνες φυγοκέντρωσης (Falcon tubes) των 15 και 50 mL (SPL Life Sciences Ltd.)
- Βάσεις στήριξης σωλήνων φυγοκέντρωσης
- Φλάσκες για δισδιάστατες κυτταρικές καλλιέργειες, T25 και T75 (SPL Life Sciences Ltd.)

- Φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας T-25 και T-75, μειωμένης προσκολλητικής ικανότητας (Corning, USA)
- Μικροπλάκες 6 και 96 βοθρίων (SPL Life Sciences Ltd.)
- Μικροπλάκες καλλιέργειας 96 φρεατίων, μειωμένης προσκολλητικής ικανότητας (Corning, USA)
- Transwells/ μικροπλάκες μειωμένης προσκολλητικής ικανότητας (Corning, USA)/ ματριγέλη 50%
- Σωληνάρια Eppendorf του 1mL (SPL Life Sciences Ltd.)
- Μεταλλική λαβίδα (μικροσκοπίας)
- Πλαστικά τρυβλία Petri (διαμέτρου 90mm)

2.2 Θρεπτικά Υλικά και Διαλύματα

- Αλατούχο φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (Phosphate buffered saline, PBS) (Biosera)
- Εμβρυικός βόειος ορός (Fetal Bovine Serum, FBS) (Gibco, USA)
- Θρεπτικό υλικό RPMI-1640 (Lonza). Προετοιμάστηκε σε σωλήνα, τύπου Falcon, όγκου 50mL, διάλυμα RPMI-1640 με 15% (v/v) FBS, 2 mM L-γλουταμίνης, 100 U/mL πενικιλίνης και 100 mg/mL στρεπτομυκίνης
- Θρεπτικό υλικό Tumorsphere medium XF & SupplementMix (Promocell)
- Κυανό του τρυπανίου (Trypan Blue) 0,4% (Sigma Co.)
- Alamar Blue (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific)

2.3 Κυτταρικές σειρές

Οι κυτταρικές σειρές, που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, είναι η U266B1 και η L363 (Καθ. Τσιτσιλώνη Ουρανία, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ). Η κυτταρική σειρά U266B1 προέρχεται από κύτταρα άντρα, 53 ετών, με πολλαπλούν μυέλωμα (1968), ενώ η L363 προέρχεται από γυναίκα, 36 ετών, με πλάσματοκυτταρική λευχαιμία, η οποία σχετίζεται με το πολλαπλό μυέλωμα (1977). Αναλυτικά, η παθολογική ανοσοσφαιρίνη, που παράγουν τα κύτταρα της U266B1 είναι η IgE, ενώ στην L366 κυτταρική σειρά, είναι η IgG. Τα κύτταρα και των δύο κυτταρικών σειρών εκφράζουν το mRNA του πρώτο-ογκογονιδίου *BCL2*. Επιπλέον, τα U266B1 κύτταρα

έχουν υπερδιπλοειδή καρυότυπο με 11% πολυπλοειδία, ενώ τα L363 κύτταρα έχουν υποδιπλοειδή καρυότυπο με 6,5% πολυπλοειδία. Τέλος, αναφορικά με τις βασικές μορφολογικές διαφορές των δύο κυτταρικών σειρών, τα U266B1 κύτταρα είναι σφαιρικά ή πολυγωνικά, ενώ τα L363 κύτταρα είναι σφαιρικά ή οβάλ και λίγο μεγαλύτερα σε μέγεθος (Quentmeier et al., 2019, Dieh et al., 1978). Αναφορικά με τις συν-καλλιέργειες της παρούσας εργασίας, χρησιμοποιήθηκαν μεσεγχυματικά κύτταρα, που προέρχονται από τον μυελό των οστών ασθενών με πολλαπλούν μυέλωμα (Καθ. Τσιτσιλώνη Ουρανία, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ).

2.4 Χειρισμός κυτταρικών καλλιιεργειών

Ο χειρισμός των κυτταρικών σειρών πραγματοποιήθηκε σε ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής για την αποφυγή επιμολύνσεων. Η εσωτερική επιφάνεια εργασίας του θαλάμου νηματικής ροής, καθώς και ό, τι εισέρχεται σε αυτόν, απολυμαίνονται εξωτερικά με αιθανόλη 70% (v/v). Η εφαρμογή UV ολοκληρώνει τη διαδικασία.

2.4.1 Απόψυξη κυτταρικών σειρών

Η διαδικασία απόψυξης των κυτταρικών σειρών U266B1 και L363 που ακολουθήθηκε, περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω:

1. Τοποθέτηση του θρεπτικού υλικού στο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 37°C
2. Μεταφορά 10mL θρεπτικού υλικού RPMI-1640 (37°C) σε σωλήνα, τύπου Falcon (15mL)
3. Το φιαλίδιο (cryovial, 2 mL) εμβαπτίζεται, με τη βοήθεια μεταλλικής λαβίδας, σε υδατόλουτρο 37°C
4. Μεταφορά των κυττάρων από το φιαλίδιο (cryovial, 2 mL) σε σωλήνα, τύπου Falcon, παρουσία 10 mL θρεπτικού υλικού
5. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 1000 rpm
6. Απόρριψη του υπερκειμένου και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος κυττάρων σε 10 mL θρεπτικού υλικού
7. Προσθήκη του εναιωρήματος κυττάρων σε φλάσκα (T25) με τελικό όγκο 10 mL
8. Παρατήρηση καλλιέργειας στο οπτικό μικροσκόπιο
9. Επώαση των κυττάρων σε συνθήκες 37°C και 5% CO₂

2.4.2 Διαδικασία ανακαλλιέργειας των κυτταρικών σειρών

Η ανακαλλιέργεια (subculturing), γνωστή και ως «passaging», είναι η αφαίρεση του θρεπτικού μέσου και η μεταφορά των κυττάρων σε φρέσκο θρεπτικό υλικό, μια διαδικασία, που επιτρέπει τον περαιτέρω πολλαπλασιασμό της κυτταρικής σειράς και τη θεμιτή διατήρησή της. Τα κύτταρα μεταβαίνουν από τη λανθάνουσα (lag phase) στην εκθετική φάση (log phase), στην οποία ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός λαμβάνει χώρα με εκθετικό ρυθμό. Για να διατηρηθεί η κυτταρική πυκνότητα στα βέλτιστα επίπεδα προς συνεχόμενη αύξηση, η καλλιέργεια πρέπει να διαιρεθεί και να μεταφερθεί σε φρέσκο θρεπτικό μέσο. Η ανάπτυξη των κυττάρων ελέγχεται, καθημερινά και όταν ο πληθυσμός τους έχει αυξηθεί σημαντικά, σε σχέση με το μέγεθος της φλάσκας (70-75% ποσοστό πληρότητας) ή/και το θρεπτικό υλικό υποδεικνύει μείωση του pH, γίνεται ανακαλλιέργεια των κυττάρων. Τα κύτταρα U266B1 και L363 βρίσκονται σε εναιώρημα και ενδεικτικά, η διαδικασία της ανακαλλιέργειάς τους έχει ως εξής:

1. Μεταφορά του περιεχομένου της φλάσκας (κύτταρα και θρεπτικό υλικό) σε σωλήνα, τύπου Falcon (15mL)
2. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 1000 rpm
3. Απόρριψη του υπερκειμένου και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος κυττάρων σε 10 mL θρεπτικού υλικού
4. Προσθήκη του εναιωρήματος κυττάρων σε φλάσκα (T25) με τελικό όγκο 10 mL
5. Παρατήρηση της καλλιέργειας στο οπτικό μικροσκόπιο
6. Επώαση των κυττάρων σε συνθήκες 37°C και 5% CO₂

Στις 3D συνθήκες, πραγματοποιήθηκε εντατικός έλεγχος του μεταβολικού δυναμικού και της βιωσιμότητας των κυττάρων προς αποφυγή υποξικού νεκρωτικού πυρήνα στις σφαιροειδείς δομές. Επιπλέον, απαιτείται η απουσία εμβρυϊκού ορού βοός.

Πραγματοποιήθηκε, επιπλέον, έλεγχος ρουτίνας για παρουσία μυκοπλάσματος με χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ανά τρίμηνο σε καλλιεργητικά μέσα και εναιωρήματα, απουσία αντιβιοτικών.

2.5 Καταμέτρηση κυττάρων και έλεγχος βιωσιμότητας με χρήση αιμοκυτταρόμετρου

Η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων, καθώς και ο έλεγχος της βιωσιμότητάς τους κρίνεται απαραίτητο βήμα της πειραματικής διαδικασίας. Προσδιορίζεται ο αριθμός των κυττάρων σε ένα μικρό δείγμα γνωστού όγκου και στη συνέχεια, υπολογίζεται ο αριθμός των κυττάρων, που εμπεριέχεται στον σωλήνα, τύπου Falcon, του δείγματος υπό μελέτη. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται το αιμοκυτταρόμετρο, μια ειδική αντικειμενοφόρος πλάκα (Neubauer), η οποία περιέχει δύο πλέγματα μέτρησης κυττάρων (Εικόνα 6).

Προτού μεταφερθούν τα κύτταρα στο αιμοκυτταρόμετρο, γίνεται χρώση αυτών, με διάλυμα κυανού του τρυπανίου (Trypan Blue) 0,4%. Η χρωστική αυτή διαπερνά την κατακερματισμένη πλασματική μεμβράνη των νεκρών κυττάρων, με αποτέλεσμα να βάφει το κυτταρόπλάσμά τους με έντονο μπλε χρώμα. Αντιθέτως, δεν έχει τη δυνατότητα να εισχωρήσει στα ζωντανά κύτταρα, λόγω της εκλεκτικής διαπερατότητας της πλασματικής τους μεμβράνης.

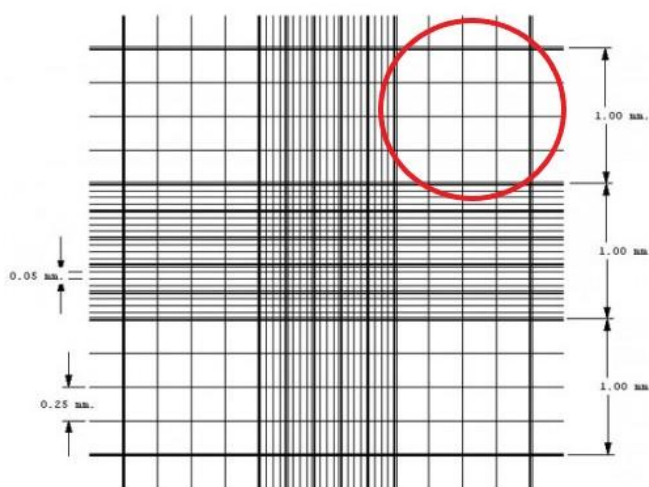
Η διαδικασία προσδιορισμού του αριθμού των κυττάρων με χρήση αιμοκυτταρόμετρου, ενδεικτικά, έχει ως εξής:

1. Μεταφορά του περιεχομένου της φλάσκας (κύτταρα και θρεπτικό υλικό) σε σωλήνα, τύπου Falcon (15mL)
2. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 1000 rpm
3. Απόρριψη του υπερκειμένου και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος κυττάρων σε 1mL θρεπτικού υλικού
4. Μεταφορά, με τη βοήθεια μικροπιπέτας, 20μL από το εναιώρημα κυττάρων σε σωληνάριο, τύπου Eppendorf και προσθήκη 20μL διαλύματος Trypan blue 0,4%
5. Μεταφορά 20μL από το σωληνάριο, τύπου Eppendorf, στο αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Neubauer) και τοποθέτηση στο οπτικό μικροσκόπιο
6. Καταμέτρηση των ζωντανών (και των νεκρών κυττάρων) στα τέσσερα ακριανά τετράγωνα και υπολογισμός της συγκέντρωσής τους (αριθμός κυττάρων/mL), σύμφωνα με τον παρακάτω μαθηματικό τύπο:

Αριθμός κυττάρων/mL = (μέσος όρος αριθμού κυττάρων) × συντελεστής αραιώσης × 10^4

7. Έλεγχος βιωσιμότητας (%), σύμφωνα με τον μαθηματικό τύπο:

Βιωσιμότητα (%) = (ολικός αριθμός ζώντων κυττάρων/ συνολικός αριθμός κυττάρων) x 100



Εικόνα 6. Απεικόνιση του αιμοκυτταρόμετρου (πλάκα Neubauer). Έχει σημειωθεί με κόκκινο κύκλο ένα εκ των τεσσάρων τετραγώνων, στο οποίο μετρώνται τα κύτταρα. (<https://laboratoryinfo.com/manual-cell-counting-neubauer-chamber/>)

2.6 Τρισδιάστατη κυτταροκαλλιέργεια με τη μέθοδο της κρεμάμενης σταγόνας (Hanging drop)

Η μέθοδος της κρεμάμενης σταγόνας χρησιμοποιείται, ευρέως, για τη δημιουργία 3D κυτταρικού μικροπεριβάλλοντος, προσομοιώνοντας τις *in vivo* συνθήκες κυτταρικής ανάπτυξης. Πιο ειδικά, εναιώρημα κυττάρων τοποθετείται υπό μορφή σταγόνων στην εσωτερική πλευρά του άνω μέρους ενός τρυβλίου petri. Τα κύτταρα συσσωρεύονται αυθόρμητα στην κορυφή της σταγόνας και με το πέρας του χρόνου πολλαπλασιάζονται και δημιουργούν σφαιροειδείς δομές. Σημειώνεται ότι η καλλιέργεια των κυττάρων με αυτή τη μέθοδο μπορεί να γίνει έως τρεις ημέρες,

καθώς δεν είναι εφικτή η αλλαγή του θρεπτικού υλικού, ενώ παράλληλα δεν μπορεί να καθοριστεί το μέγεθος και η σύσταση των σφαιροειδών. Η συγκεκριμένη μέθοδος, αναπαράγεται εύκολα και απαιτεί μικρό όγκο κυττάρων (medium to high-throughput). Επίσης, σχηματίζεται μια αποικία ανά σταγόνα, οπότε α. είναι ελεγχόμενη η ποσότητα των κυττάρων που αναπτύσσονται και β. μπορεί να απομονωθεί εύκολα η κάθε αποικία (Shri et al., 2017). Η διαδικασία ανάπτυξης τρισδιάστατων κυτταρικών καλλιιεργειών με τη μέθοδο της «κρεμάμενης σταγόνας», ενδεικτικά, έχει ως εξής:

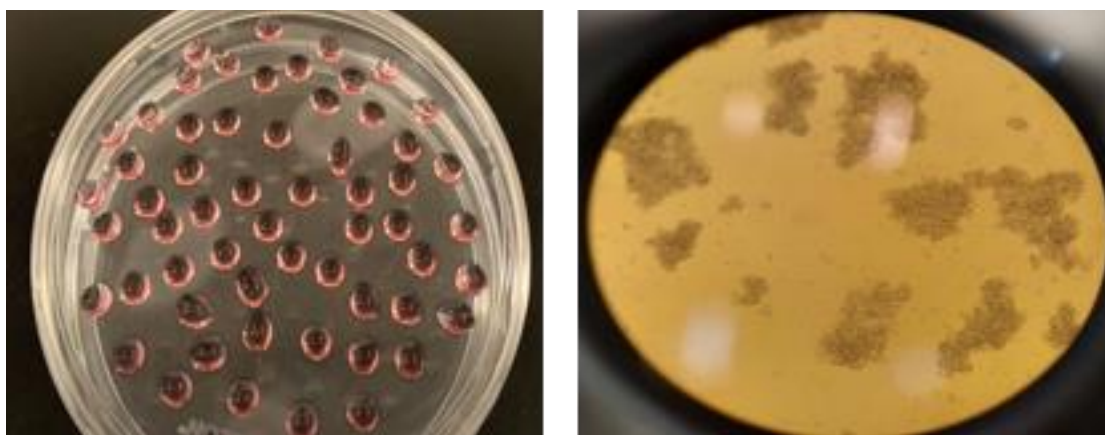
1. Προσδιορισμός του αριθμού των κυττάρων (αιμοκυτταρόμετρο)
2. Υπολογισμός της ποσότητας του εναιωρήματος των κυττάρων προς $2,5 \times 10^6$ κύτταρα/mL ή 75.000 κύτταρα/30 μ L (σταγόνα)
3. Χρήση του Tumorsphere medium XF με SupplementMix
3. Μεταφορά 5mL διαλύματος PBS σε τρυβλίο Petri για τη διατήρηση της υγρασίας των σταγόνων κατά την επώαση
4. Σχηματισμός στο άνω μέρος του τρυβλίου (non-coated lid), με τη βοήθεια μικροπιπέτας, περίπου 30 σταγόνων με το εναιώρημα κυττάρων
5. Το άνω μέρος αναποδογυρίζεται με προσοχή και τοποθετείται στη βάση του
6. Επώαση του τρυβλίου σε συνθήκες 37°C και 5% CO₂ για 3 ημέρες

Για τη συλλογή και οπτικοποίηση των σφαιροειδών δομών ακολουθήθηκαν τα εξής:

1. Με απότομη κίνηση αναποδογυρίζεται το άνω μέρος του τρυβλίου
2. Απορρίπτεται το διάλυμα PBS
3. Πραγματοποιείται ήπια και καλή έκπλυση της εσωτερικής επιφάνειας του άνω μέρους του τρυβλίου με 3ml θρεπτικού μέσου, που δεν περιέχει FBS (και δύναται να είναι ελεύθερο εξωσωμάτων, αν απαιτείται)
4. Συλλέγεται η 3D κυτταροκαλλιέργεια και μεταφέρεται σε φλάσκα T25, με μειωμένη ικανότητα κυτταρικής προσκόλλησης
5. Ακολουθεί παρατήρηση των κυτταρικών σφαιροειδών στο οπτικό μικροσκόπιο και εκτίμηση της ποιότητάς τους

Αναφορικά με την έμμεση επαφή στις συν-καλλιέργειες υπό μελέτη, έγινε χρήση Transwells/μικροπλακών, χαμηλής προσρόφησης και ματριγέλης 50%, με τον λόγο των μεσεγχυματικών κυττάρων, που προέρχονται από ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα προς τα L363 κύτταρα (ή τα U266B1) να είναι ίσος προς 4:1. Η ανανέωση

του θρεπτικού μέσου έλαβε χώρα δύο φορές την εβδομάδα. Ενδεικτική απεικόνιση αποτελεί η Εικόνα 7.



Εικόνα 7. Ενδεικτική απεικόνιση 3D κυτταρικής καλλιέργειας με τη μέθοδο της κρεμάμενης σταγόνας και των απορρεόντων σφαιροειδών δομών

2.7 Μεταβολικό δυναμικό 2D και 3D κυτταροκαλλιέργειών

Η δοκιμασία Alamar blue εφαρμόζεται για την ποσοτική εκτίμηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ενώ παράλληλα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εύρεση της σχετικής κυτταροτοξικότητας διαφόρων χημικών ουσιών, καθώς και για την πρόβλεψη της τοξικότητας νέων φαρμακευτικών παραγόντων, συγκρίνοντας δεδομένα από ουσίες με γνωστό κατώφλι τοξικής συγκέντρωσης και σημαντικά, το μεταβολικό δυναμικό. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην παρουσία ενός οξειδοαναγωγικού δείκτη της κυτταρικής αύξησης, ο οποίος ανάγεται ή οξειδώνεται, ανάλογα με τη μεταβολική ενεργότητα των κυττάρων. Πιο αναλυτικά, τα ζωντανά-μεταβολικά ενεργά κύτταρα ανάγουν το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης και ως εκ τούτου, ανάγεται ο οξειδοαναγωγικός δείκτης ρεσαζουρίνη (resazurin) σε ρεσορουφίνη (resorufin). Στην ανηγμένη του κατάσταση ο δείκτης φθορίζει και απορροφά μέγιστα στα 570nm, ενώ παράλληλα αλλάζει χρώμα (από κυανό σε κόκκινο). Ο προσδιορισμός του βαθμού της χημικής μεταβολής του δείκτη μπορεί να γίνει με τη μέτρηση, είτε του φθορισμού της ανηγμένης του μορφής (διέγερση στα 530-560nm και εκπομπή στα 590nm), είτε της απορρόφησής του στα 600nm για την οξειδωμένη του μορφή και 570nm για την ανηγμένη (Invitrogen, 2007). Η Εικόνα 8 συνοψίζει τα παραπάνω.

Ενδεικτικά, περιγράφεται ακόλουθα η εκτίμηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μονοκαλλιέργειας κυττάρων (2D και 3D συνθήκες):

1. Προσδιορισμός του αριθμού των κυττάρων (αιμοκυτταρόμετρο)
2. Υπολογισμός της ποσότητας που χρειάζεται από το εναιώρημα κυττάρων, ώστε κάθε βοθρίο της πλάκας να περιέχει 16.000 κύτταρα/ 100μL
3. Προσθήκη των αρνητικών μαρτύρων σε πλάκα με 96 βοθρία. Ο πρώτος αρνητικός μάρτυρας ήταν 100 μL PBS, ο δεύτερος, 100 μL διάλυμα RPMI και ο τρίτος, 90 μL διάλυμα RPMI, παρουσία 10 μL Alamar Blue (10%)
4. Προσθήκη της κυτταρικής σειράς υπό μελέτη σε τρία βοθρία (τρεις τεχνικές επαναλήψεις) και 10% Alamar blue
5. Επώαση της πλάκας για 72 ώρες, συνολικά και μέτρηση της απορρόφησης με χρήση του φασματοφωτομέτρου πολλαπλής ανίχνευσης Safire II Tecan (multi detection plate reader) σε τρία χρονικά σημεία (24, 48 και 72 ώρες) στα μήκη κύματος 570 nm και 600 nm
6. Υπολογισμός της % αναγωγής του Alamar blue σε τρία χρονικά σημεία (24, 48 και 72 ώρες), σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:

$$\% \text{ Αναγωγή} = \frac{CRED \text{ δείγμα}}{COX \text{ αρνητικός μάρτυρας}} = \frac{(\epsilon_{OX})\lambda_2 A \lambda_1 - (\epsilon_{OX})\lambda_1 A \lambda_2}{(\epsilon_{RED})\lambda_1 A' \lambda_2 - (\epsilon_{RED})\lambda_2 A' \lambda_1} \times 100$$

όπου:

C_{RED} =συγκέντρωση της ανηγμένης μορφής του Alamar Blue (κόκκινο χρώμα)

C_{OX} = συγκέντρωση της οξειδωμένης μορφής του Alamar Blue (μπλε χρώμα)

λ_1 = 570nm

λ_2 = 600nm

ϵ_{OX} = συντελεστής ειδικής απορρόφησης της οξειδωμένης μορφής του Alamar Blue

ϵ_{RED} = συντελεστής ειδικής απορρόφησης της ανηγμένης μορφής του Alamar Blue

A = ο μέσος όρος της απορρόφησης των δειγμάτων

A' = ο μέσος όρος της απορρόφησης των δειγμάτων αναφοράς

λ_1 : το μήκος κύματος της μέγιστης απορρόφησης της οξειδωμένης μορφής της χρωστικής Alamar blue, 570nm

λ_2 : το μήκος κύματος της μέγιστης απορρόφησης της ανηγμένης μορφής της χρωστικής Alamar blue, 600nm

Αναφορικά με τις 3D καλλιέργειες, η διαδικασία είναι παρόμοια, με μόνη διαφορά την προσθήκη μοναδιαίας σταγόνας ανά βοθρίο.

Για τον υπολογισμό της μέσης τιμής (m) και της τυπικής απόκλισης (σ), χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες εξισώσεις, αντίστοιχα:

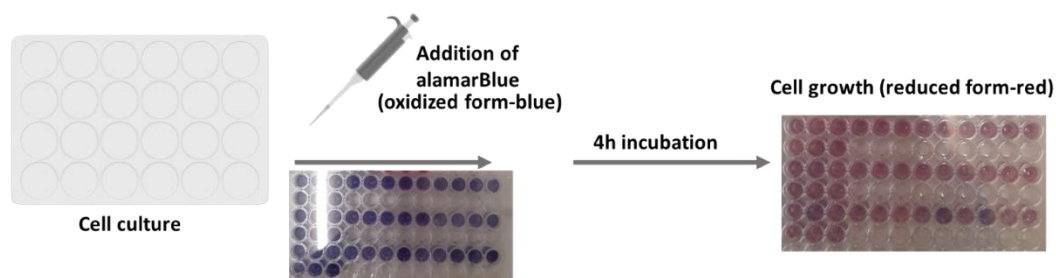
$$m = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{N} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - m)^2}{N}}$$

όπου:

x_i = κάθε τιμή αναφοράς

N = μέγεθος τιμών



Εικόνα 8. Ενδεικτική απεικόνιση της δοκιμασίας *alamar blue* για την αποτίμηση της βιωσιμότητας, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και του μεταβολικού δυναμικού των κυτταροκαλλιιεργειών υπό μελέτη (2D και 3D συνθήκες). Η απορρόφηση προσδιορίζεται στα 570nm (*reduced-red*) και 600 nm (*oxidized-blue*) (Κ. Χαλικοπούλου)

2.8 Προκατεργασία δείγματος για μεταβολομική ανάλυση

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκαν οι ακόλουθες μεταβολομικές αναλύσεις:

- α. μεταβολομική ανάλυση (μη στοχευμένη και στοχευμένη) υπερκείμενου συν-καλλιέργειας L363-μεσεγχυματικών κυττάρων, που προέρχονται από ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα, α1. σε άμεση επαφή και α2. σε έμμεση επαφή
- β. μεταβολομική ανάλυση (μη στοχευμένη και στοχευμένη) υπερκείμενου συν-καλλιέργειας U266B1-μεσεγχυματικών κυττάρων, που προέρχονται από ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα, β1. σε άμεση επαφή και β2. σε έμμεση επαφή
- γ. μεταβολομική ανάλυση (μη στοχευμένη και στοχευμένη) υπερκείμενου μονο-καλλιέργειας α. L363, β. U266B1 και γ. μεσεγχυματικών κυττάρων, που προέρχονται από ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα (έλεγχος ποιότητας)

Η διαδικασία προκατεργασίας δείγματος, που περιγράφεται, ενδεικτικά, παρακάτω, πραγματοποιήθηκε, καθώς απαιτούνται συνθήκες υψηλής επαναληψιμότητας και ακρίβειας, αλλά και απόδοσης (high throughput):

1. Συλλογή του υπερκειμένου της καλλιέργειας σε σωλήνα τύπου Falcon, κατάλληλου όγκου και χαμηλής προσρόφησης. Αν απαιτείται, αυτός ο σωλήνας αποθηκεύεται προσωρινά στους -20°C , έχοντας αναγράψει την ημερομηνία, το είδος του περιεχομένου (κυτταρικό υπερκείμενο), το όνομα της κυτταρικής σειράς, τις συνθήκες (μονο-καλλιέργεια ή συν-καλλιέργεια) και την πειραματική διαδικασία για την οποία προορίζεται. Οι κύκλοι ψύξης-απόψυξης, αλλά και οι συνθήκες κρυοσυντήρησης, είναι καίριας σημασίας.
2. Τυχαιοποίηση δειγμάτων (δείγματα υπό μελέτη, δείγματα ελέγχου ποιότητας, εσωτερικά πρότυπα)
3. Μεταφορά 400 μl κυτταρικού υπερκειμένου σε σωληνάριο τύπου Eppendorf (χαμηλής προσρόφησης), όγκου 2ml
4. Προσθήκη 1,2 mL παγωμένης (ice-cold) μεθανόλης (σταδιακή προσθήκη 400 μl σε κάθε δείγμα)
5. Ανάδευση για 15 δευτερόλεπτα
6. Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά, 15.800g, σε θερμοκρασία δωματίου για την απομάκρυνση μεγαλομορίων ως κυτταρικό ίζημα
7. Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο σωληνάριο τύπου Eppendorf, χαμηλής προσρόφησης
8. Λυοφιλοποίηση σε Speedvac για 18h

2.9 Μη-στοχευμένη και στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση με χρήση υγρής χρωματογραφίας φασματομετρίας μάζας

Στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκε αρχικά, μη-στοχευμένη και στη συνέχεια, στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση προκειμένου να εξάγουμε ολιστική πληροφορία υψηλής πιστότητας. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε, ενδεικτικά, για τη μη-στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση, παρουσιάζεται, ακόλουθα (Chalikiopoulou, Gomez-Tamayo & Katsila, 2023).

1. Τυχαιοποίηση δειγμάτων (δείγματα υπό μελέτη, δείγματα ελέγχου ποιότητας, εσωτερικά πρότυπα)
2. Βελτιστοποίηση συνθηκών υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας. Έλεγχος ποιότητας
3. Πραγματοποίηση ανάλυσης με θετικό (positive ion mode) και αρνητικό ιοντισμό (negative ion mode)
4. Συλλογή και προ-επεξεργασία παραγόμενων ακατέργαστων δεδομένων (raw data) για τον σχηματισμό πινάκων m/z έναντι RT ή έναντι έντασης σήματος και 3D πινάκων (χρωματογραφική κορυφή έναντι απόκρισης έναντι κωδικού δείγματος) με χρήση γλώσσας προγραμματισμού Python 3.6.0
5. Επεξεργασία και ανάλυση δεδομένων με θετικό (positive ion mode) και αρνητικό ιοντισμό (negative ion mode)
6. Εκτίμηση αναλυτικού θορύβου, βάσει κατανομής χαρακτηριστικών (features) και παραδοχή όσων αφορούν, τουλάχιστον, το 33% των δειγμάτων
7. Κανονικοποίηση δεδομένων
8. Μαθηματική και στατιστική ανάλυση και στη συνέχεια, ανάλυση μοριακών μονοπατιών και χρήση βιοπληροφορικής με κριτήριο $\log_2\text{fold} \geq 2$ (PCA, PLS-DA)
9. Εξαγωγή VIP (statistical significance of variables in projection) τιμών, μεγαλύτερες ή ίσες προς 1
10. Ενσωμάτωση δεδομένων με θετικό (positive ion mode) και αρνητικό ιοντισμό (negative ion mode)
11. Ανάλυση εμπλουτισμού μονοπατιών
12. Ταυτοποίηση μεταβολιτών

Ακολούθησε στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση με παρακολούθηση επιλεγμένων ή πολλαπλών μεταπτώσεων (selected reaction monitoring/ SRM ή multiple reaction monitoring/ MRM), ανά περίπτωση. Ομοίως, έγινε χρήση κατάλληλου εσωτερικού προτύπου ανά κλάσμα μεταβολιτών. Η προ-επεξεργασία, επεξεργασία και ερμηνεία των αποτελεσμάτων έγινε με χρήση του λογισμικού προγράμματος MetaboAnalyst 5.0. Η στατιστική ανάλυση αφορά σε παραμετρικές, μη παραμετρικές και πολυπαραμετρικές μεθόδους.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ακόλουθα, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των εργαστηριακών και υπολογιστικών προσεγγίσεων της παρούσας εργασίας και συγκεκριμένα, αναφορικά με:

α. μεταβολομική ανάλυση (μη στοχευμένη και στοχευμένη) υπερκείμενου συν-καλλιέργειας L363-μεσεγχυματικών κυττάρων, που προέρχονται από ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα, α1. σε άμεση επαφή και α2. σε έμμεση επαφή

β. μεταβολομική ανάλυση (μη στοχευμένη και στοχευμένη) υπερκείμενου συν-καλλιέργειας U266B1-μεσεγχυματικών κυττάρων, που προέρχονται από ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα, β1. σε άμεση επαφή και β2. σε έμμεση επαφή

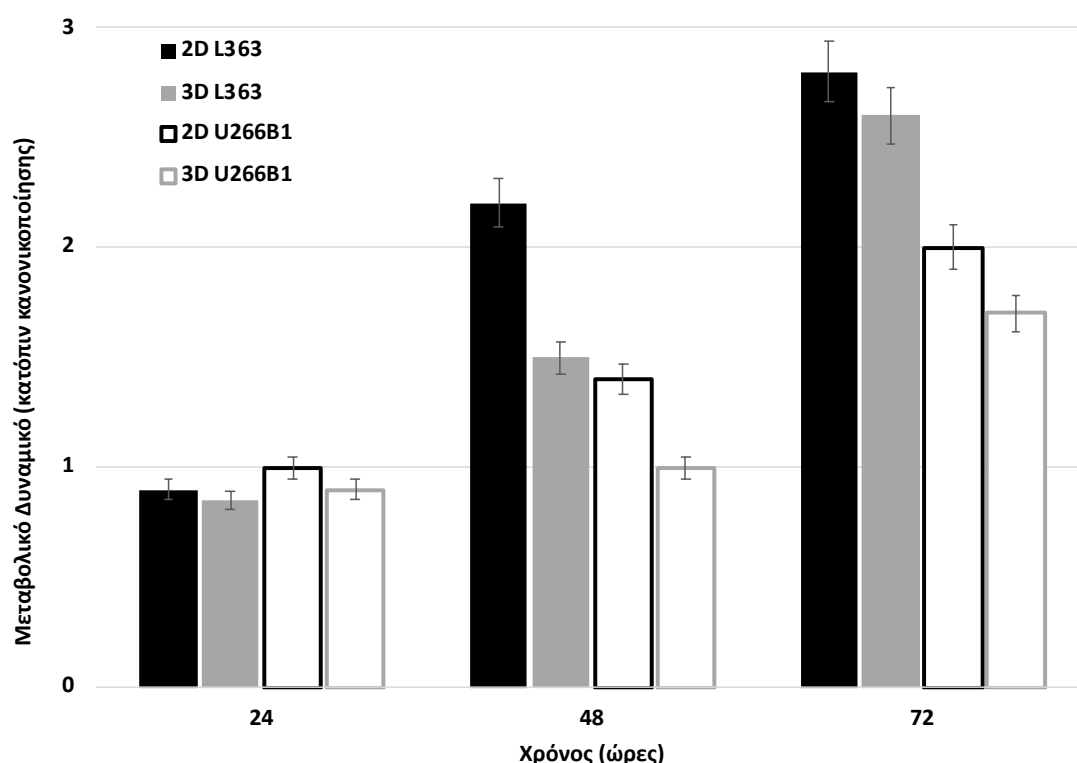
γ. μεταβολομική ανάλυση (μη στοχευμένη και στοχευμένη) υπερκείμενου μονο-καλλιέργειας α. L363, β. U266B1 και γ. μεσεγχυματικών κυττάρων, που προέρχονται από ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα (έλεγχος ποιότητας)

3.1 Μεταβολικό δυναμικό 2D και 3D κυτταροκαλλιιεργειών

Τόσο στις 2D, όσο και στις 3D κυτταροκαλλιέργειες, απαιτείται η διαρκής παρακολούθηση της ευεξίας τους. Ειδικά ως προς τις 3D κυτταροκαλλιέργειες, είναι απαραίτητη η αποφυγή υποξικού/αποπτωτικού/νεκρωτικού πυρήνα προς αποφυγή σφαλμάτων σύγχυσης, ειδικότερα, όταν εφαρμόζονται μεταβολομικές αναλύσεις. Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων αποτελούν ενδείξεις αυτών.

Στην Εικόνα 9, αποτυπώνεται το μεταβολικό δυναμικό, κατόπιν κανονικοποίησης, ενδεικτικά, για τις L363 και U266B1 κυτταρικές σειρές σε 2D και 3D συνθήκες. Τα ευρήματά μας συμφωνούν με την εμπειρία μας πως οι 2D συνθήκες αποτελούν βελτιστοποιημένα μοντέλα, που δεν αποδίδουν πλήρως τις αληθείς συνθήκες. Για τις κυτταρικές σειρές υπό μελέτη, αν και με διαφορετικό ρυθμό, η μεταβολική δραστηριότητα αυξάνει ανά χρονικό σημείο (24-48-72 ώρες), με τα U266B1 να υστερούν, συνολικά, σε σχέση με τα L363 κύτταρα. Είναι γνωστό πως η L363

κυτταρική σειρά αποτελείται από κύτταρα πλασματοκυτταρικής λευχαιμίας, η οποία είναι πιο επιθετική νόσος, σε σύγκριση με την κυτταρική σειρά U266B1, που αφορά στο πολλαπλούν μυέλωμα. Επιπλέον, τα κύτταρα της σειράς U266B1 προέρχονται από τον IgE τύπο πολλαπλού μυελώματος, σε σχέση με τον IgG τύπο, από τον οποίο προέρχονται τα L363 κύτταρα.



Εικόνα 9. Προσδιορισμός μεταβολικού δυναμικού για τις κυτταρικές σειρές L363 και U266B1 με χρήση χρωστικής alamar blue. Οι τιμές αφορούν τρία ανεξάρτητα πειράματα και $n=4$ μετρήσεις ανά χρονικό σημείο. Αποδίδονται οι μέσες τιμές $\pm$ τυπική απόκλιση.

Ειδικότερα ως προς την παρούσα εργασία, η κυτταρική σειρά U266B1 σε 3D συνθήκες εκφράζει τον υποδοχέα Notch1 και τον υποδοχέα Notch 2, καθώς και τον προσδέτη Jagged1 σε πολύ μικρές ποσότητες (Jundt et al., 2004), ενώ σε 2D συνθήκες εκφράζεται, μόνο, ο υποδοχέας Notch2 (Nefedova et al., 2004). Η κυτταρική σειρά L363 προσομοιάζει περισσότερο στα μυελωματικά κύτταρα από ασθενείς, με μεγαλύτερη ογκογονικότητα, όπως εκδηλώθηκε από την ανθεκτικότητά της, παρουσία NK-κυττάρων (Sarin et al., 2020; Leivas et al., 2021). Τέλος, η L363 κυτταρική σειρά φέρει NRAS μετάλλαξη (COSMIC: 924239), σε σχέση

με την U266B1, με BRAF μετάλλαξη (COSMIC: 753615). Αυτές οι μεταλλάξεις και στις δύο κυτταρικές σειρές οδηγούν σε «παράκαμψη» της EGFR σηματοδότησης (κυτταρικός πολλαπλασιασμός).

3.2 Μεταβολομικές αναλύσεις

Στην παρούσα εργασία, προκειμένου να διερευνηθεί η πλειοτροπία της Notch σηματοδότησης, πραγματοποιήθηκαν οι ακόλουθες μεταβολομικές αναλύσεις:

- α. μεταβολομική ανάλυση (μη στοχευμένη και στοχευμένη) υπερκείμενου συν-καλλιέργειας L363-μεσεγχυματικών κυττάρων, που προέρχονται από ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα, α1. σε άμεση επαφή και α2. σε έμμεση επαφή
- β. μεταβολομική ανάλυση (μη στοχευμένη και στοχευμένη) υπερκείμενου συν-καλλιέργειας U266B1-μεσεγχυματικών κυττάρων, που προέρχονται από ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα, β1. σε άμεση επαφή και β2. σε έμμεση επαφή
- γ. μεταβολομική ανάλυση (μη στοχευμένη και στοχευμένη) υπερκείμενου μονο-καλλιέργειας α. L363, β. U266B1 και γ. μεσεγχυματικών κυττάρων, που προέρχονται από ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα (έλεγχος ποιότητας)

Η επιλογή να αναλυθούν τα υπερκείμενα των κυτταρικών καλλιιεργειών (conditioned media) βασίζεται στη γνώση μας πως αυτά τα υλικά αποτελούν πλούσια πηγή πληροφορίας σε μελέτες ανάδειξης μεταφραστικών βιοδεικτών και διερεύνησης της διακυτταρικής επικοινωνίας, με συνάφεια ως προς τις ενδοκυτταρικές βιολογικές διαδικασίες (Dowling and Clynes, 2011). Η αποφυγή, μάλιστα, χρήσης ορού (όπως στις 3D συνθήκες) επιτρέπει την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση σε χαμηλότερο δυναμικό εύρος τιμών (dynamic range), πέντε ή έξι τάξεις μεγέθους. Ο προσδιορισμός της βιωσιμότητας και του πολλαπλασιαστικού δυναμικού των κυτταρικών σειρών της μελέτης στο πλαίσιο ελέγχου ποιότητας και ευεξίας, με χρήση της χρωστικής Alamar Blue, ενισχύει την αξιοπιστία των ευρημάτων μας. Ομοίως, οι μεταβότυποι των μονοκαλλιιεργειών σε 3D συνθήκες.

Οι Πίνακες 1-4 συνοψίζουν τα αποτελέσματα των μη στοχευμένων και στοχευμένων μεταβολομικών μας αναλύσεων. Έχει παρατηρηθεί πως τα ανθεκτικά στη χημειοθεραπεία κύτταρα στο πολλαπλούν μυέλωμα αυξάνουν την λιπογένεση, ενώ η προσθήκη πολυακόρεστων λιπαρών οξέων ενέτειναν τη χημειοθεραπευτική δράση, επάγοντας την απόπτωση σε U266B1 και L363 κυτταρικές σειρές (Maiso et

al., 2015). Τα ευρήματά μας για την U266B1 κυτταρική σειρά σε 3D συνθήκες υποστηρίζουν την αύξηση της οξειδωσης των λιπαρών οξέων. Πρόκειται για έναν μηχανισμό διατήρησης της μεταβολικής ομοιόστασης και κυτταρικής επιβίωσης σε συνθήκες μειωμένης γλυκόλυσης και αυξημένης συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος. Τα L363 κύτταρα εμφανίζουν μια έντονη εξάρτηση από τους μεταφορείς της γλυκόζης και ένζυμα, όπως η εξοκινάση, σύμφωνα με τα ευρήματά μας, συνολικά, που αφορούν στο μεταβολισμό της γλυκόζης.

Πίνακας 1. Συν-καλλιέργεια L363 και μεσεγχυματικών κυττάρων που προέρχονται από ασθενή με πολλαπλούν μυέλωμα (άμεση επαφή)

Ρύθμιση	Κορυφαίοι – 25 μεταβολίτες ($p \leq 0.05$)
↓↓	ribose-phosphate
↓↓	UDP-N-acetyl-glucosamine
↓↓	acetylphosphate
↓↓	L-arginino-succinate
↑↑	pyrophosphate
↓↓	glycerophosphocholine
↑↑	phenylalanine
↑↑	threonine
↑↑	cytosine
↑↑	UMP
↑↑	IMP
↑↑	histidine
↑↑	proline
↑↑	asparagine
↑↑	tyrosine
↑↑	purine
↓↓	uracil
↓↓	methylcysteine
↑↑	lactate
↓↓	glutathione
↓↓	methionine
↓↓	dATP
↓↓	N-carbamoyl-L-aspartate
↓↓	4-aminobutyrate
↓↓	imidazole

Πίνακας 2. Συν-καλλιέργεια U266B1 και μεσεγχυματικών κυττάρων που προέρχονται από ασθενή με πολλαπλούν μυέλωμα (άμεση επαφή)

Ρύθμιση	Κορυφαίοι – 25 μεταβολίτες ($p \leq 0.05$)
↓	ribose-phosphate
↑	UDP-N-acetyl-glucosamine
↑	acetylphosphate
↑	L-arginino-succinate
↑	pyrophosphate
↑	glycerophosphocholine
↑	phenylalanine
↑	threonine
↑	cytosine
↓	UMP
↓	IMP
↑	histidine
↑	proline
↑	asparagine
↑	tyrosine
↑	purine
↓	uracil
↑	methylcysteine
↓	lactate
↑	glutathione
↑	methionine
↑	ATP
↓	N-carbamoyl-L-aspartate
↓	4-aminobutyrate
↑	imidazole

Πίνακας 3. Συν-καλλιέργεια L363 και μεσεγχυματικών κυττάρων που προέρχονται από ασθενή με πολλαπλούν μυέλωμα (έμμεση επαφή)

Ρύθμιση	Κορυφαίοι – 25 μεταβολίτες ($p \leq 0.05$)
↑↑	fructose 6-phosphate
↑↑	2-Methyl-3-hydroxybutyric acid
↓↓	pyruvic acid
↓↓	4-hydroxyproline
↓↓	2-ketobutyric acid
↑↑	aspartic acid
↑↑	glutamine
↑↑	arginine
↑↑	alanine
↑↑	2-hydroxy-3-methylpentanoic acid
↓↓	asparagine
↓↓	glutamic acid
↓↓	oxoglutaric acid
↓↓	lactic acid
↑↑	sphingosine
↑↑	L-acetyl-carnitine
↑↑	piperidine
↓↓	glutaric acid
↓↓	succinic acid
↑↑	glycine
↑↑	lysine
↑↑	valine
↑↑	niacinamide
↑↑	proline
↑↑	tyrosine

Πίνακας 4. Συν-καλλιέργεια U266B1 και μεσεγχυματικών κυττάρων που προέρχονται από ασθενή με πολλαπλούν μυέλωμα (έμμεση επαφή)

Ρύθμιση	Κορυφαίοι – 25 μεταβολίτες (p≤0.05)
↓	nimodipine
↑	lysoPC(20:3(5Z,8Z,11Z))
↓	pantothenic acid
↑	lysoPC(20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))
↑	cysteamine
↑	PC(14:0/16:0)
↑	PC(15:0/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z))
↑	PE(15:0/18:3(6Z,9Z,12Z))
↑	glycerophosphocholine
↑	galactosylhydroxylysine
↑	palmitoyl sphingomyelin
↑	PC(14:0/18:3(6Z,9Z,12Z))
↑	PC(14:0/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z))
↓	lactic acid
↑	sphingosine
↑	L-acetyl-carnitine
↑	piperidine
↓	glutaric acid
↓	succinic acid
↑	glycine
↑	lysine
↑	valine
↑	niacinamide
↑	proline
↑	tyrosine

Τα μεσεγχυματικά κύτταρα, συνολικά, λειτουργούν ως παροχή ενέργειας και θρέψης, παρέχοντας, κυρίως, λιπαρά οξέα και αμινοξέα στα U266B1 και L363 κύτταρα. Η άμεση ή έμμεση επαφή διαφαίνεται πως οδηγεί σε διαφορετικούς κορυφαίους-25 μεταβολίτες ανά περίπτωση, ειδικότερα, όσον αφορά στα λιπίδια, αναδεικνύοντας και τη σημασία των συν-καλλιιεργειών ως *in vitro* μοντέλα.

Συνολικά και ως προς τη Notch σηματοδότηση, γνωρίζουμε πως προάγει την οξείδωση της γλουταμίνης, αλλά και την εξάρτηση από την οξειδωτική φωσφορυλίωση στις αιματολογικές κακοήθειες. Η Notch1 προάγει την γλυκόλυση, αλλά επάγει και το μεταβολικό stress, το οποίο προάγει την οξειδωτική φωσφορυλίωση (Kishton et al., 2016). Τέλος, η γλουταμινόλυση συνεισφέρει στην κυτταρική ανάπτυξη κι επιβίωση (Herranz et al. 2015). Τα ευρήματά μας έρχονται σε συμφωνία για τις U266B1 και L363 κυτταρικές σειρές.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Στην παρούσα εργασία, σε συμφωνία με την επιστημονική βιβλιογραφία, οι 3D κυτταρικές συνθήκες επιτρέπουν στα κύτταρα υπό μελέτη να αναπτυχθούν σε συνθήκες όμοιες με το TME *in vivo*, αναπτύσσοντας αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους, με παρόμοιο περιβάλλον εξωκυττάριας μήτρας, αλλά και με δυνατότητα συν-καλλιέργειας με άλλα κύτταρα. Οι χειρισμοί που περιγράφηκαν στο πλαίσιο της εργασίας, 3D κυτταροκαλλιέργειες σε ζεύξη με μεταβολομικές αναλύσεις, αποτελούν εύχρηστα «εργαλεία», όχι μόνο διερεύνησης μοριακών μηχανισμών, αλλά και αποτίμησης καινοτόμων θεραπευτικών στρατηγικών ως μονοθεραπεία ή σε συνδυασμό. Μελλοντικά, η στρατηγική αυτή μπορεί να συνδράμει περαιτέρω ως συνιστώσα στις προσεγγίσεις πολλαπλών ομικών τεχνολογιών.

Οι απορρέοντες μεταβότυποι υποδεικνύουν τη σημασία του κυτταρικού μεταβολισμού και των διαταραχών του στο πολλαπλούν μυέλωμα και ειδικότερα, όσον αφορά στη γλυκόλυση, καθώς και τη σύνθεση και αποικοδόμηση των λιπαρών οξέων. Τα μεταβολικά αυτά μονοπάτια έχουν συσχετιστεί με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την ανθεκτικότητα στη θεραπεία των νεοπλασματικών κυττάρων (Maiso et al., 2015). Η Notch σηματοδότηση παραμένει κεντρικός ρυθμιστής.

Οι μεταβότυποι είναι χαρακτηριστικοί των L363 ή U266B1 κυττάρων, δεδομένων των εγγενών ιδιοτήτων τους και παράλληλα, υποδεικνύουν σημαντικές διαφορές, όταν υπάρχει άμεση ή όχι επαφή, με τα μεσεγχυματικά κύτταρα να παρέχουν υποστήριξη και θρέψη στα μυελωματικά κύτταρα. Οι κορυφαίοι-25 μεταβολίτες ανά περίπτωση αποτελούν ένα πρώτο, ολιστικό, μοριακό αποτύπωμα.

Μελλοντικά, θα μπορούσε να εξεταστεί με μεγαλύτερη λεπτομέρεια ο ρόλος της πλειοτροπίας της Notch σηματοδότησης στην αποικοδόμηση της μήτρας των οστών, στην επακόλουθη απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων και την επίδραση αυτών στα μυελωματικά κύτταρα και το μικροπεριβάλλον, υπό το πρίσμα των μεταβοτύπων, καθώς οι τελευταίοι επιτυγχάνουν μια ολιστικού χαρακτήρα χαρτογράφηση. Θα ήταν ενδιαφέρον να προσδιοριστεί ο ενδοκυτταρικός μεταβολισμός και να συσχετιστεί με τα ευρήματα στα υπερκείμενα των συν-καλλιιεργειών σε 3D συνθήκες.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aggarwal, V., Tuli, H. S., Varol, M., Tuorkey, M., Sak, K., Parashar, N. C., Barwal, T. S., Sharma, U., Iqbal, A., Parashar, G., & Jain, A. NOTCH signaling: Journey of an evolutionarily conserved pathway in driving tumor progression and its modulation as a therapeutic target. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 164. (2021).

Akhtar, S., Ali, T. A., Faiyaz, A., Khan, O. S., Raza, S. S., Kulinski, M., Omri, H. el, Bhat, A. A., & Uddin, S. Cytokine-mediated dysregulation of signaling pathways in the pathogenesis of multiple myeloma. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14). (2020).

Allegra, A., Innao, V., Gerace, D., Bianco, O., & Musolino, C. The metabolomic signature of hematologic malignancies. *Leukemia Research*, 49. (2016).

Ayaz, F., & Osborne, B. A. Non-canonical Notch signaling in cancer and immunity. *Frontiers in Oncology*, 4. (2014).

Belloni, D., Heltai, S., Ponzoni, M., Villa, A., Vergani, B., Pecciarini, L., Marcatti, M., Girlanda, S., Tonon, G., Ciceri, F., Caligaris-Cappio, F., Ferrarini, M., & Ferrero, E. Modeling multiple myeloma-bone marrow interactions and response to drugs in a 3d surrogate microenvironment. *Haematologica*, 103(4). (2018).

Berenstein, R., Nogai, A., Waechter, M., Blau, O., Kuehnle, A., Schmidt-Hieber, M., Kunitz, A., Pezzutto, A., Dörken, B., & Blau, I. W. Multiple myeloma cells modify VEGF/IL-6 levels and osteogenic potential of bone marrow stromal cells via Notch/miR-223. *Molecular Carcinogenesis*, 55(12). (2016).

Bigas, A., & Espinosa, L. Hematopoietic stem cells: To be or Notch to be. *Blood*, 119(14). (2012).

Bissell, M. J. Thinking in three dimensions: Discovering reciprocal signaling between the extracellular matrix and nucleus and the wisdom of microenvironment and tissue architecture. In *Molecular Biology of the Cell*, 27(21). (2016).

Braham, M. V. J., Minnema, M. C., Aarts, T., Sebestyen, Z., Straetmans, T., Vyborova, A., Kuball, J., Öner, F. C., Robin, C., & Alblas, J. Cellular immunotherapy on primary multiple myeloma expanded in a 3D bone marrow niche model. *Oncotarget*, 7(6). (2018).

Colombo, M., Galletti, S., Bulfamante, G., Falleni, M., Tosi, D., Todoerti, K., Lazzari, E., Crews, L. A., Jamieson, C. H. M., Ravaoli, S., Baccianti, F., Garavelli, S., Platonova, N., Neri, A., & Chiaramonte, R. Multiple myeloma-derived Jagged ligands increases autocrine and paracrine interleukin-6 expression in bone marrow niche. *Oncotarget*, 7(35). (2016).

Colombo, M., Mirandola, L., Chiriva-Internati, M., Basile, A., Locati, M., Lesma, E., Chiaramonte, R., & Platonova, N. Cancer cells exploit notch signaling to redefine a supportive cytokine milieu. *Frontiers in Immunology*, 9. (2018).

Colombo, M., Mirandola, L., Platonova, N., Apicella, L., Basile, A., Figueroa, A. J., Cobos, E., Chiriva-Internati, M., & Chiaramonte, R. Notch-directed microenvironment reprogramming in myeloma: A single path to multiple outcomes. *Leukemia*, 27(5). (2013).

Delgado-Calle, J., Anderson, J., Cregor, M. D., Hiasa, M., Chirgwin, J. M., Carlesso, N., Yoneda, T., Mohammad, K. S., Plotkin, L. I., Roodman, G. D., & Bellido, T. Bidirectional notch signaling and osteocyte-derived factors in the bone marrow microenvironment promote tumor cell proliferation and bone destruction in multiple myeloma. *Cancer Research*, 76(5). (2016).

Dowling, P. & Clynes, M. Conditioned media from cell lines: a complementary model to clinical specimens for the discovery of disease-specific biomarkers. *Proteomics*, 11(4). (2011).

Fortini, M. E. Notch Signaling: The Core Pathway and Its Posttranslational Regulation. *Developmental Cell*, 16(5). (2009).

Fre, S., Huyghe, M., Mourikis, P., Robine, S., Louvard, D., & Artavanis-Tsakonas, S. Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature*, 435(7044). (2005).

Gratton, R., Tricarico, P. M., Moltrasio, C., de Oliveira, A. S. L. E., Brandão, L., Marzano, A. V., Zupin, L., & Crovella, S. Pleiotropic role of notch signaling in human skin diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12). (2020).

Herranz, D., Ambesi-Impiombato, A., Sudderth, J., Sánchez-Martín, M., Belver, L., Tosello, V., Xu, L., Wendorff, A.A., Castillo, M., Haydu, J.E., et al. Metabolic reprogramming induces resistance to anti-NOTCH1 therapies in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nature Medicine*, 21. (2015)

Hori, K., Sen, A., & Artavanis-Tsakonas, S. Notch signaling at a glance. *Journal of Cell Science*, 126(10). (2013).

Huang, C., Yang, D., Ye, G. W., Powell, C. A., & Guo, P. Vascular Notch Signaling in Stress Hematopoiesis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. (2021).

Houde, C., Li, Y., Song, L., Barton, K., Zhang, Q., Godwin, J., Nand, S., Toor, A., Alkan, S., Smadja, N. V., Avet-Loiseau, H., Lima, C. S., Miele, L., & Coignet, L. J. Overexpression of the NOTCH ligand JAG2 in malignant plasma cells from multiple myeloma patients and cell lines. *Blood*, 104(12). (2004).

Huang, S. W., Tzeng, S. C., Chen, J. K., Sun, J. S., & Lin, F. H. A dynamic hanging-drop system for mesenchymal stem cell culture. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12). (2020).

Huber, V., Camisaschi, C., Berzi, A., Ferro, S., Lugini, L., Triulzi, T., Tuccitto, A., Tagliabue, E., Castelli, C., & Rivoltini, L. Cancer acidity: An ultimate frontier of tumor immune escape and a novel target of immunomodulation. *Seminars in Cancer Biology*, 43. (2017).

Jensen, C., & Teng, Y. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7. (2020).

Joshi, R. S., Kanugula, S. S., Sudhir, S., Pereira, M. P., Jain, S., & Aghi, M. K. The role of cancer-associated fibroblasts in tumor progression. *Cancers*, 13(6). (2021).

Jundt, F., Schulze, Prö. K., Anagnostopoulos, I., Muehlinghaus, G., Chatterjee, M., Mathas, S., Bargou, R.C., Manz, R., Stein. H., Dorken, B. Jagged1-induced Notch signaling drives proliferation of multiple myeloma cells. *Neoplasia*, 103(9). (2004)

Kawano, Y., Moschetta, M., Manier, S., Glavey, S., Görgün, G. T., Roccaro, A. M., Anderson, K. C., & Ghobrial, I. M. Targeting the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. *Immunological Reviews*, 263(1). (2015).

Kawamoto, H., & Katsura, Y. A new paradigm for hematopoietic cell lineages: revision of the classical concept of the myeloid-lymphoid dichotomy. *Trends in Immunology*, 30(5). (2009).

Kishton, R.J., Barnes, C.E., Nichols, A.G., Cohen, S., Gerriets, V.A., Siska, P.J., Macintyre, A.N., Goraksha-Hicks, P., de Cubas, A.A., Liu, T., et al. AMPK is essential to balance glycolysis and mito- chondrial metabolism to control T-ALL cell stress and survival. *Cell Metabolism*, 23. (2016)

T'Kindt, R., & Van Bocxlaer, J. LC-MS based metabolomics. *Handbook on Mass Spectrometry: Instrumentation, Data and Analysis, and Applications*, 8(2). (2010)

Kopan, R., & Ilagan, M. X. G. The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. *Cell*, 137(2). (2009).

Kushwah, R., Guezguez, B., Lee, J. B., Hopkins, C. I., & Bhatia, M. Pleiotropic roles of Notch signaling in normal, malignant, and developmental hematopoiesis in the human. *EMBO Reports*, 15(11). (2014).

Láinez-González, D., Serrano-López, J., & Alonso-Dominguez, J. M. Understanding the Notch Signaling Pathway in Acute Myeloid Leukemia Stem Cells: From Hematopoiesis to Neoplasia. *Cancers*, 14(6). (2022).

Lampreia, F. P., Carmelo, J. G., & Anjos-Afonso, F. Notch Signaling in the Regulation of Hematopoietic Stem Cell. *Current Stem Cell Reports*, 3(3). (2017).

Lee, D. Y., Bowen, B. P., & Northen, T. R. Mass spectrometry-based metabolomics, analysis of metabolite-protein interactions, and imaging. *BioTechniques*, 49(2). (2010)

Leivas, A., Risueño, R.M., Guzmán, A., et al. Natural killer cells efficiently target multiple myeloma clonogenic tumor cells. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 70. (2021)

Liu, X., & Locasale, J. W. Metabolomics: A Primer. *Trends in Biochemical Sciences*, 42(4). (2017)

Lomelí, H., & Castillo-Castellanos, F. Notch signaling and the emergence of hematopoietic stem cells. *Developmental Dynamics*, 249(11). (2020).

Lopes, A. S., Cruz, E. C. S., Sussulini, A., & Klassen, A. Metabolomic strategies involving mass spectrometry combined with liquid and gas chromatography. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 965. (2017).

Maiso, P., Huynh, D., Moschetta, M., Sacco, A., Aljawai, Y., et al. Metabolic signature identifies novel targets for drug resistance in multiple myeloma. *Cancer Research*, 75. (2015)

Meurette, O., & Mehlen, P. Notch Signaling in the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*, 34(4). (2018).

Meurette, O. Shaping of the Tumor Microenvironment by Notch Signaling. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1223. (2020).

Nandagopal, N., Santat, L. A., & Elowitz, M. B. Cis-activation in the Notch signaling pathway. *ELife*, 8. (2019).

Nefedova Y, Cheng P, Alsina M, Dalton WS, Gabrilovich DI. Involvement of Notch-1 signaling in bone marrow stroma-mediated de novo drug resistance of myeloma and other malignant lymphoid cell lines. *Blood*, 103(9). (2004)

Palano, M. T., Giannandrea, D., Platonova, N., Gaudenzi, G., Falleni, M., Tosi, D., Lesma, E., Citro, V., Colombo, M., Saltarella, I., Ria, R., Amodio, N., Taiana, E., Neri, A., Vitale, G., & Chiaramonte, R. Jagged ligands enhance the pro-angiogenic activity of multiple myeloma cells. *Cancers*, 12(9). (2020).

Palmer, W. H., & Deng, W. M. Ligand-Independent Mechanisms of Notch Activity. *Trends in Cell Biology*, 25(11). (2015).

Pitt, J. J. Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *Clinical and Biochemical Reviews*, 30. (2009)

Sabol, H. M., & Delgado-Calle, J. The multifunctional role of Notch signaling in multiple myeloma. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*, 7. (2021).

Sarin V, Yu K, Ferguson ID, et al. ARTICLE Multiple myeloma gammopathies Evaluating the efficacy of multiple myeloma cell lines as models for patient tumors via transcriptomic correlation analysis. *Leukemia*, 34. (2020)

Saurina, J., & Sentellas, S. Liquid chromatography coupled to mass spectrometry for metabolite profiling in the field of drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 14(5). (2019).

Shen, W., Huang, J., & Wang, Y. Biological Significance of NOTCH Signaling Strength. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. (2021).

Siebel, C., & Lendahl, U. Notch signaling in development, tissue homeostasis, and disease. *Physiological Reviews*, 97(4). (2017).

Takebe, N., Nguyen, D., & Yang, S. X. Targeting Notch signaling pathway in cancer: Clinical development advances and challenges. *Pharmacology and Therapeutics*, 141(2). (2014).

Ullah, T. R. The role of CXCR4 in multiple myeloma: Cells' journey from bone marrow to beyond. *Journal of Bone Oncology*, 17. (2019).

Wellenstein, M. D., & de Visser, K. E. Cancer-Cell-Intrinsic Mechanisms Shaping the Tumor Immune Landscape. *Immunity*, 48(3). (2018).

Weng, A. P., Ferrando, A. A., Lee, W., Morris IV, J. P., Silverman, L. B., Sanchez-Irizarry, C., Blacklow, S. C., Look, A. T., & Aster, J. C. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*, 306(5694). (2004).

Yuan, X., Wu, H., Xu, H., Xiong, H., Chu, Q., Yu, S., Wu, G. S., & Wu, K. Notch signaling: An emerging therapeutic target for cancer treatment. *Cancer Letters*, 369(1). (2015).

Zhang, M., Haughey, M., Wang, N. Y., Blease, K., Kapoun, A. M., Couto, S., Belka, I., Hoey, T., Groza, M., Hartke, J., Bennett, B., Cain, J., Gurney, A., Benish, B., Castiglioni, P., Drew, C., Lachowicz, J., Carayannopoulos, L., Nathan, S. D., ... Xie, W. Targeting the Wnt signaling pathway through R-spondin 3 identifies an anti-fibrosis treatment strategy for multiple organs. *PLoS ONE*, 15(3). (2020).

Zhou, B., Lin, W., Long, Y., Yang, Y., Zhang, H., Wu, K., & Chu, Q. Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1). (2022).

Zhu, Z. J., Schultz, A. W., Wang, J., Johnson, C. H., Yannone, S. M., Patti, G. J., & Siuzdak, G. (2013). Liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry characterization of metabolites guided by the METLIN database. *Nature Protocols*, 8(3). (2013)

Πλατανιά Ν. Διερεύνηση της ογκογονικότητας και διακυτταρικής επικοινωνίας σε τρισδιάστατες κυτταρικές καλλιέργειες. Πτυχιακή Μελέτη, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών & Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών. (2021).

«Δηλώνω ρητά ότι το κείμενο της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας δεν αποτελεί προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον»

