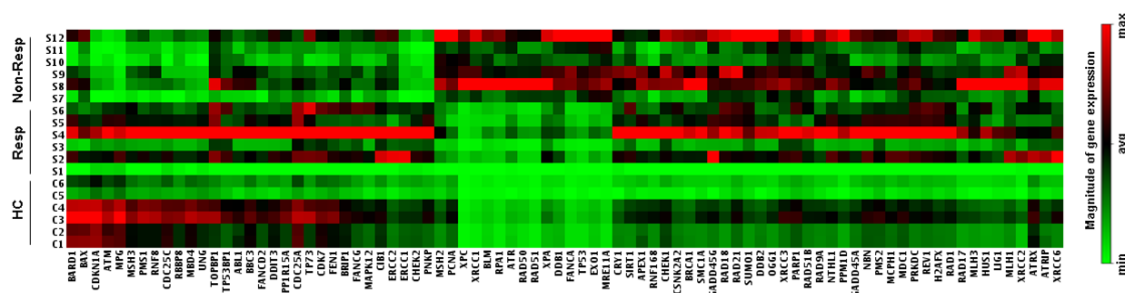


## Δελτίο Τύπου

# Διπλή τιμητική διάκριση για τη συνεργασία του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών με τη Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Χάρβαρντ

21.05.2018

Hierarchical clustergram



Στα πλαίσια του 44ου Ετήσιου Πανελλήνιου Ιατρικού Συνεδρίου που πραγματοποιήθηκε στην Αθήνα από 9 έως 12 Μαΐου 2018, η ερευνητική ομάδα του **Δρ. Βασίλη Α. Σουλιώτη**, Διευθυντή Ερευνών στο Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών σε συνεργασία με τη **Δρ. Μαρία Γκοτζαμανίδου**, MD, PhD (Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School και Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών) πέτυχαν μια διπλή τιμητική διάκριση.

Η πρώτη διάκριση αφορά την απονομή του **Α' Βραβείου Εφαρμοσμένης Έρευνας** για την εργασία τους που αφορά την ενίσχυση της κυτταροτοξικότητας κλασσικών θεραπευτικών ουσιών για την αντιμετώπιση του πολλαπλού μυελώματος, με τη συγχρόνηση άμεσων (αναστολείς της επιδιόρθωσης του DNA) ή έμμεσων (αναστολείς της αποακετυλίωσης των ιστονών) τροποποιητών της απόκρισης του κυττάρου στη βλάβη του DNA. Τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής δείχνουν ότι η **ανάπτυξη νέων συνδυαστικών πρωτοκόλλων** αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική για τη θεραπεία του πολλαπλού μυελώματος και τη βελτίωση των ήδη χρησιμοποιούμενων θεραπευτικών σχημάτων.

Η δεύτερη τιμητική διάκριση αφορά την απονομή του **Επάθλου “Σωτήρης Παπασταμάτης”** για την εργασία τους που αφορά το λειτουργικό ρόλο της αποακετυλάσης των ιστονών HDAC8 στη βιολογία του πολλαπλού μυελώματος, και για την πιθανή ανάδειξη του αναστολέα της ως ένα καινούργιο επιγενετικό στόχο για την θεραπεία της νόσου. Η ερευνητική αυτή εργασία έδειξε τη συσχέτιση των επιπέδων της

HDAC8 με τη πρόγνωση των ασθενών με πολλαπλούν μυέλωμα, αλλά και τη δυναμική μηχανιστική σύνδεση της με σημαντικές για το κύτταρο λειτουργίες όπως η κυτταρική απόκριση στη βλάβη του DNA και η συγκρότηση του κυτταροσκελετού. Τα αποτελέσματα αυτά αναδεικνύουν μία **καινούργια θεραπευτική προσέγγιση με άμεση κλινική εφαρμογή**.

1<sup>ο</sup> Βραβείο Εφαρμοσμένης Έρευνας

### **Η επίδραση του συνδυασμού παραγόντων που επάγουν βλάβες του DNA και τροποποιητών της επιδιόρθωσης του DNA στη θεραπεία του Πολλαπλού Μυελώματος**

Μαρία Γκοτζαμανίδου<sup>1,2</sup>, Ευάγγελος Τέρπος<sup>1</sup>, Nikhil C. Munshi<sup>2</sup>, Μελέτιος-Αθανάσιος Δημόπουλος<sup>1</sup>, Βασίλης Λ. Σουλιώτης<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Θεραπευτική Κλινική, Νοσοκομείο Αλεξάνδρα, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

<sup>2</sup>Department of Medical Oncology, Jerome Lipper Multiple Myeloma Center, Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, MA, USA

<sup>3</sup>Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα

Περίληψη

**Σκοπός:** Η ικανότητα επιδιόρθωσης του γενετικού υλικού των καρκινικών κυττάρων επηρεάζει την θεραπευτική ανταπόκριση και την επιβίωση των ασθενών. Στην παρούσα εργασία, προσεγγίστηκε μηχανιστικά η σύνδεση της επάρκειας των επιδιορθωτικών μηχανισμών του DNA και της ανταπόκρισης των ασθενών με Πολλαπλό Μυέλωμα (ΠΜ) στην θεραπεία.

**Υλικό:** Μελετήσαμε πλασματοκύτταρα μυελού των οστών (ΠΜΟ) και μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος (ΜΠΑ) 26 νέο-διαγνωσθέντων ασθενών με Πολλαπλό Μυέλωμα (12Γ/14Α, μέση ηλικία 60 έτη, εύρος 42-66), εκ των οποίων οι 17 (n=17) ανταποκρίθηκαν στη χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με μελφαλάνη, ενώ οι υπόλοιποι (n=9) δεν ανταποκρίθηκαν. Επιπλέον, ΜΠΑ από υγιείς δότες (n=25) μελετήθηκαν παράλληλα.

**Μέθοδος:** Τα κύτταρα εκτέθηκαν *ex vivo* σε μελφαλάνη σαν μονοθεραπεία και σε συνδυασμό με άμεσους (SCR7, αναστολέας επιδιόρθωσης του μη ομόλογου ανασυνδυασμού, NHEJ) ή έμμεσους (πανομπινοστάτη, αναστολέας της αποακετυλίωσης των ιστονών, HDACi) τροποποιητών της επιδιόρθωσης του DNA, και μελετήθηκε η επιδιορθωτική ικανότητα των κυττάρων, η απόπτωση, και η συμπύκνωση της δομής της

χρωματίνης. Επιπροσθέτως, μελετήθηκε η έκφραση 84 γονιδίων που ανήκουν στα μονοπάτια επιδιόρθωσης του DNA (σηματοδότηση της βλάβης του DNA, επιδιόρθωση, ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, απόπτωση). Για την ανάλυση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η τεχνική Western blot.

**Αποτελέσματα:** Τα ΠΜΟ και ΜΠΑ των ασθενών που ανταποκρίθηκαν σε θεραπεία με μελφαλάνη έδειξαν μεγαλύτερο βαθμό συμπύκνωσης της δομής της χρωματίνης και μικρότερο βαθμό επιδιόρθωσης του DNA ( $P < 0.0022$ ) σε σύγκριση με τους μη ανταποκριθέντες. Η κυτταρική απόπτωση των ΠΜΟ και ΜΠΑ βρέθηκε αντιστρόφως ανάλογη της ικανότητας επιδιόρθωσης του DNA, με τους κυτταρικούς πληθυσμούς των ανταποκριθέντων να εμφανίζουν μεγαλύτερη απόπτωση σε σύγκριση με εκείνη των μη ανταποκριθέντων. Τα ΜΠΑ των ασθενών με ΠΜ παρουσιάζουν μεγαλύτερο βαθμό χαλάρωσης της δομής της χρωματίνης, αυξημένη επιδιορθωτική ικανότητα του DNA, και υψηλότερο βαθμό απόπτωσης συγκρινόμενα με τα ΜΠΑ των υγιών δοτών. Η ανάλυση της έκφρασης γονιδίων με μικροσυστοιχίες (microarray analysis) σε ΜΠΑ έδειξε ότι οι ανταποκριθέντες ασθενείς με ΠΜ χαρακτηρίζονται από σημαντικά αυξημένη έκφραση των γονιδίων ATR, BLM, DDB1, EXO1, FANCA, MRE11A, MSH2, PCNA, RAD50, RAD51, RPA1, XPA, XPC, XRCC1 και TP53, και μειωμένη έκφραση των ATM, CDC25C, CDKN1A, CHEK2, ERCC1, MPG, PNKP και UNG, σε σύγκριση με τους μη ανταποκριθέντες ( $P < 0.001$ ), υποδηλώνοντας ότι οι αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης των μορίων-κλειδιών του μονοπατιού της βλάβης/επιδιόρθωσης του DNA διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην θεραπευτική ικανότητα των γονοτοξικών παραγόντων. Επιπρόσθετα, η συνδυαστική θεραπεία των κυττάρων με μελφαλάνη και SCR7 (αναστολέας της επιδιόρθωσης του DNA) οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μείωση του βαθμού επιδιόρθωσης του DNA και αύξηση της ευαισθησίας των ΠΜΟ και ΜΠΑ στη μελφαλάνη. Ακόμα, βρέθηκε ότι η συγχορήγηση της μελφαλάνης με τον HDACi πανομπινοστάτη σε ΠΜΟ είχε σαν αποτέλεσμα την υπερακετυλίωση της ιστόνης H4, την αύξηση του φορτίου βλαβών του DNA, και την αύξηση της αποπτωτικής διαδικασίας. Αντίθετα, η συνδυαστική επίδραση μελφαλάνης-πανομπινοστάτης σε ΜΠΑ δεν μετέβαλε σημαντικά το φορτίο βλαβών του DNA που επάγεται από τη μελφαλάνη καθώς και την απόπτωση στα κύτταρα αυτά. Ενδιαφέρον εύρημα είναι και η μείωση των επιπέδων στις πρωτεΐνες-κλειδιά της επιδιόρθωσης του DNA (Rad50, Mre11, Ku70, Ku86, DNA-PKcs), μετά από θεραπεία με πανομπινοστάτη σε κακοήθη πλασματοκύτταρα μυελού των οστών, ενόσω δεν επηρέασε καθόλου την πρωτεϊνική έκφραση στα ΜΠΑ. Τα ανωτέρω αποτελέσματα, εξηγούν εν μέρει, την εξειδίκευση των αναστολέων της αποακετυλίωσης των ιστονών να προκαλούν την αύξηση του φορτίου βλαβών του DNA και το κυτταρικό θάνατο σε κακοήθη πλασματοκύτταρα σε θεραπευτικές συγκεντρώσεις ενώ δεν επηρεάζουν την βιωσιμότητα των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος των ιδίων ασθενών.

**Συμπεράσματα:** Η ενίσχυση της κυτταροτοξικότητας της μελφαλάνης με τη συγχορήγηση άμεσων (αναστολείς της επιδιόρθωσης DNA) ή έμμεσων (HDACi) τροποποιητών της επιδιόρθωσης του DNA αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική για τη θεραπεία του ΠΜ και τη βελτίωση των ήδη χρησιμοποιούμενων χημειοθεραπευτικών σχημάτων.

Έπαθλο “Σωτήρης Παπασταμάτης”

### **Η HDAC8 αποτελεί νέο επιγενετικό στόχο στη θεραπεία του Πολλαπλού Μυελώματος, επιδρώντας στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA και στο μεταφραστικό δυναμικό της νόσου**

Μαρία Γκοτζαμανίδου<sup>1,2</sup>, Nikhil C. Munshi<sup>2</sup>, Μελέτιος-Αθανάσιος Δημόπουλος<sup>1</sup>, Ευάγγελος Τέρπος<sup>1</sup>, Βασίλης Λ. Σουλιώτης<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Θεραπευτική Κλινική, Νοσοκομείο Αλεξάνδρα, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

<sup>2</sup>Department of Medical Oncology, Jerome Lipper Multiple Myeloma Center, Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, MA, USA

<sup>3</sup>Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα

Περίληψη

**Σκοπός:** Σήμερα, τόσο κλινικές όσο και προκλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι το Πολλαπλούν Μυέλωμα (ΠΜ) είναι ευαίσθητο σε επιγενετικές θεραπευτικές παρεμβάσεις, με τις αποακετυλάσες των ιστονών (HDACs) να αναδύονται σαν ένας πολλά υποσχόμενος επιγενετικός στόχος. Ωστόσο, υπάρχουν λιγοστά δεδομένα για το ρόλο της HDAC8 (μέλος της κλάσης I των HDAC ισοενζύμων) στο ΠΜ. Σκοπός της παρούσας έρευνας είναι η μελέτη της λειτουργίας της HDAC8 στο ΠΜ και η ύπαρξη πιθανού ρόλου στη θεραπεία της νόσου.

**Υλικό-Μέθοδος:** Χρησιμοποιήσαμε σύστημα sh-RNA/lentiviral για να εξασφαλίσουμε την απαλοιφή της HDAC8 σε κύτταρα MM1S και OPM2. Ο αναστολέας της HDAC8, PCI-34051 χρησιμοποιήθηκε για την φαρμακευτική της αναστολή. Ένα σύνολο 15 αντισωμάτων ειδικών για το μηχανισμό της κυτταρικής απόκρισης στη βλάβη του DNA (DDR) χρησιμοποιήθηκαν σε ηλεκτροφορήσεις πρωτεϊνών και ανοσοϊστοχημικές τεχνικές κατόπιν επίδρασης γ-ακτινοβολίας / γονοτοξικών χημειοθεραπευτικών. Η μέτρηση βλαβών του DNA έγινε χρησιμοποιώντας τη τεχνική της ηλεκτροφόρησης μοναδιαίων κυττάρων (comet assay). Η ενεργότητα του ομόλογου ανασυνδυασμού (HR) και της μη-ομόλογης σύνδεσης άκρων (NHEJ) εκτιμήθηκε με πειράματα εισαγωγής

πλασμιδίων που εκφράζουν GFP+/DsRed+, χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής. Ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης μετά από απαλοιφή της HDAC8 και τεχνικές ανοσοκατακρήμνισης πρωτεϊνών/mass spectrometry χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο των λειτουργικών συμπλόκων με την HDAC8.

**Αποτελέσματα:** Βρέθηκε ότι HDAC8 υπερεκφράζεται στο ΠΜ, και ότι συσχετίζεται με τη μικρότερη επιβίωση των ασθενών αυτών. Είναι ενδιαφέρον ότι τόσο η γονιδιακή απαλοιφή της HDAC8 όσο και η φαρμακευτική της αναστολή οδήγησαν σε σημαντική μείωση του πολλαπλασιασμού και της βιωσιμότητας των κακοήθων μυελωματικών κυττάρων. Στη συνέχεια βρέθηκε ότι HDAC8 επάγει βλάβες στο DNA. Πράγματι, μετά από απαλοιφή της έκφρασης της HDAC8 (knock-down) χρησιμοποιώντας καλά χαρακτηριζόμενα HDAC8 shRNA, comet assay και ανοσοφθορισμό έναντι ευρέως χρησιμοποιούμενων μοριακών δεικτών γενετικής βλάβης όπως γH2AX, 53BP1 και RPA32, παρατηρήσαμε υψηλότερα επίπεδα δίκλωνων θραυσμάτων του DNA (DSBs) σε κύτταρα που στερούνται HDAC8, σε σύγκριση με μυελωματικά κύτταρα μάρτυρες. Ακόμα, χρησιμοποιώντας τεχνική βασιζόμενη σε πλασμίδια με ομόλογα άκρα στα σημεία της βλάβης, βρέθηκε ότι η HDAC8 αναστέλλει τον ομόλογο ανασυνδυασμό. Τέλος, βρέθηκε ότι η HDAC8 έχει επίδραση στη δομή του κυτταροσκελετού ενώ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη συγκρότηση του συμπλόκου της κοχεσίνης, το οποίο συμμετέχει σε πλήθος γενετικών διαδικασιών του κυττάρου όπως η αντιγραφή, η μεταγραφή, ο διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων και η επιδιόρθωση του DNA. Είναι ενδιαφέρον ότι τροποποιημένη έκφραση γονιδίων του συμπλόκου της κοχεσίνης ή μεταλλάξεις αυτών έχουν βρεθεί σε μεγάλο αριθμό κακοηθειών, περιλαμβανομένου του πολλαπλού μυελώματος.

**Συμπεράσματα:** Η παρούσα μελέτη καταδεικνύει τη μηχανιστική σύνδεση της HDAC8 και του DDR, διαφωτίζει τις άγνωστες ως τώρα λειτουργίες του ισοενζύμου αυτού στη δομή του κυτταροσκελετού και τη συγκρότηση της κοχεσίνης, και αναδεικνύει νέες πολλά υποσχόμενες θεραπευτικές προσεγγίσεις στο ΠΜ.

### **Επικοινωνία για το ΕΙΕ:**

Δρ. Βασίλης Α. Σουλιώτης

Email: [vls@eie.gr](mailto:vls@eie.gr)

Τηλ.: +30 210 7273734

Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας & Βιοτεχνολογίας (ΙΒΦΧΒ)

Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών (ΕΙΕ)

Λεωφόρος Βασιλέως Κωνσταντίνου 48, 11635 Αθήνα