

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ORIGINAL PAPER

Η αναστολή της αποακετυλάσης της ιστόνης 8 ως νέος θεραπευτικός στόχος στο πολλαπλό μυέλωμα*

ΣΚΟΠΟΣ Η μελέτη της λειτουργίας της HDAC8 στο πολλαπλό μυέλωμα (ΠΜ) και η ύπαρξη πιθανού ρόλου της στη θεραπεία της νόσου. ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ Χρησιμοποιήθηκε σύστημα sh-RNA/lentiviral για να εξασφαλιστεί η απαλοιφή της HDAC8 σε κύτταρα MM1S και OPM2. Ο αναστολέας της HDAC8, PCI-34051, χρησιμοποιήθηκε για τη φαρμακευτική αναστολή. Ένα σύνολο 15 αντισωμάτων ειδικών για το δίκτυο κυτταρικής απόκρισης στη βλάβη του DNA (DDR) χρησιμοποιήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών και ανοσοϊστοχημικές τεχνικές κατόπιν επίδρασης γ-ακτινοβολίας/γονοτοξικών χημειοθεραπευτικών. Ανάλυση RNA για τη γονιδιακή έκφραση μετά από απαλοιφή της HDAC8, και τεχνικές ανοσοκατακρήμνισης πρωτεϊνών/mass spectrometry εντάχθηκαν για τον έλεγχο των λειτουργικών συμπλόκων με την HDAC8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ Η HDAC8 βρέθηκε να υπερεκφράζεται στο ΠΜ και να συσχετίζεται με πτωχότερη επιβίωση των ασθενών. Τόσο η γονιδιακή απαλοιφή όσο και η φαρμακευτική αναστολή της HDAC8 οδήγησαν σε σημαντική μείωση του πολλαπλασιασμού και της βιωσιμότητας των κακοήθων μυελωματικών κυττάρων. Η HDAC8 φάνηκε να προσεγγίζει τις δίκλωνες βλάβες του DNA, ενόσω η αναστολή της οδηγεί σε αναστολή του ομόλογου ανασυνδυασμού. Η αναστολή της HDAC8 είχε επίδραση στη δομή του κυτταροσκελετού και διαδραμάτισε σημαντικό ρόλο στη συγκρότηση του συμπλόκου της κοχεσίνης. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη κατέδειξε μια μηχανιστική σύνδεση της HDAC8 και του DDR, ενώ διαφώτισε τις άγνωστες έως τώρα στη βιβλιογραφία λειτουργίες του ισοενζύμου στη δομή του κυτταροσκελετού και στη συγκρότηση της κοχεσίνης, με πολλαπλές θεραπευτικές και βιολογικές εφαρμογές στο ΠΜ.

Το πολλαπλό μυέλωμα (ΠΜ) συνιστά το 10% των αιματολογικών κακοηθειών και ευθύνεται για σημαντικό ποσοστό θνητότητας οφειλόμενης σε κακοήθειες, περίπου στο 1% του πληθυσμού ηλικιωμένων παγκοσμίως.^{1,2} Παρά την πρόοδο που έχει σημειωθεί στην κατανόηση της βιολογίας του ΠΜ και την ανάπτυξη νεότερων θεραπευτικών στρατηγικών για τη νόσο, οι μηχανισμοί ανάπτυξης αντοχής στη χημειοθεραπεία παραμένουν άγνωστοι και η νόσος ανίατη.

Η γενωμική ετερογένεια του ΠΜ με τον πολύπλοκο συνδυασμό μεταλλάξεων και την κλωνική εξέλιξη της νόσου αποτελούν τις κυριότερες δυσκολίες στην ανάπτυξη περισσότερο αποτελεσματικών θεραπειών, στην έγκαιρη διάγνωση της συμπτωματικής νόσου και στην υπερκέρα-

ση της χημειο-αντοχής. Σήμερα, ωστόσο, οι επιγενετικές αλλαγές στη μεθυλίωση του γενετικού υλικού DNA ή στη δυναμική κατάσταση των ιστονών διαδραματίζουν εξ ίσου σημαντικό ρόλο στην παθογένεια του ΠΜ.³ Η επίδραση της δομής της χρωματίνης στο μονοπάτι επιδιόρθωσης του DNA (DDR) πρωτοπεριγράφηκε από τη δεκαετία του 1990, με το μοντέλο «προσέγγισης-επιδιόρθωσης-επαναφοράς».⁴ Οι τροποποιήσεις των ιστονών συμβάλλουν ιδιαίτερα στη ρύθμιση της μεταφραστικής διαδικασίας.⁵ Οι απο-ακετυλάσες (HDACs) καταλύουν την απομάκρυνση των ακετυλο-ομάδων από τα αμινο-τελικά αποθέματα λυσίνης των ιστονών, οδηγώντας σε τοπική αναδιάταξη της χρωματίνης, αλλαγή της ηλεκτροστατικής φόρτισης του DNA και

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2020, 37(1):87-97
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2020, 37(1):87-97

Μ. Ασλάνη-Γκοτζαμανίδου,¹
Β.Λ. Σουλιώτης,²
Α.Μ. Δημόπουλος,¹
Ε. Τέρπος¹

¹Θεραπευτική Κλινική, Νοσοκομείο «Αλεξάνδρα», Ιατρική Σχολή Αθηνών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα
²Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα

Inhibition of histone deacetylase 8: A new therapeutic target for multiple myeloma

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρητηρίου

Αποακετυλίωση
Ιστόνη
Πολλαπλό μυέλωμα

Υποβλήθηκε 29.5.2019
Εγκρίθηκε 11.6.2019

* Η παρούσα εργασία έλαβε το Β' βραβείο του επάθλου «Σωτήρης Παπασταμάτης» στο πλαίσιο του 44ου Ετήσιου Πανελληνίου Ιατρικού Συνεδρίου, που έλαβε χώρα στην Αθήνα 9-12 Μαΐου 2018.

την προσβασιμότητα των στοιχείων του μεταφραστικού μηχανισμού. Η αναστολή των HDACs μπορεί να ενεργοποιήσει άμεσα τον μηχανισμό DDR χωρίς την προϋπαρξη βλαβών διπλής έλικας του DNA (DSBs).⁶ Επιπρόσθετα, σε μελέτες όπου επιτυγχάνεται απώλεια λειτουργίας γονιδίων HDACs έχει φανεί ότι μπορεί να επάγουν βλάβη του DNA σε καρκινικά κύτταρα. Η ακετυλίωση και η απο-ακετυλίωση των άκρων των ιστονών είναι αυστηρά ελεγχόμενη σε περιοχές που έχουν υποστεί βλάβες DNA, καθ' όσον πολλαπλοί HDACs προσαρτώνται και ενεργούν σε βλάβες DNA. Πλήθος μελετών έχουν δείξει ότι η «ανοικτή» δομή της χρωματίνης στις περιοχές έναρξης της μεταγραφής ή σε ενισχυτές ενεργών μεταγραφικών γονιδίων σχετίζεται με την ακετυλίωση συγκεκριμένων θέσεων των ιστονών 3 και 4.⁷

Ως εκ τούτου, η αναστολή των ενζύμων HDACs αναδεικνύεται ως μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για τη θεραπεία του καρκίνου. Πολλοί διαφορετικοί δομικά αναστολείς των HDACs χρησιμοποιούνται ήδη στην κλινική θεραπευτική αντιμετώπιση τόσο νεοπλασιών συμπαγών οργάνων όσο και αιματολογικών κακοηθειών.

Είναι πλέον δεδομένο από κλινικές και προκλινικές μελέτες ότι το ΠΜ είναι ευάλωτο σε επιγενετικές θεραπείες.⁸ Έχουμε δείξει σε πρόσφατη μελέτη ότι η δομή της χρωματίνης σχετίζεται με την επάρκεια του μηχανισμού επιδιόρθωσης του DNA και ακολούθως με την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία και στην ολική επιβίωση των ασθενών με ΠΜ.⁷

Η HDAC8 είναι μέλος της τάξης Ι των απο-ακετυλασών των ιστονών με μοναδικά χαρακτηριστικά, καθ' όσον στερείται του συντηρητικού C-τελικού τομέα.⁹ Η τροποποιημένη έκφραση της HDAC8 έχει ανευρεθεί σε πλήθος καρκίνων.¹⁰ Οι μεταλλάξεις της HDAC8 έχουν ανιχνευτεί στο σύνδρομο Cornelia de Lange, ενώ η υπερέκφραση του γονιδίου της HDAC8 παρατηρείται σε πολλαπλές νεοπλασίες αιματολογικές και συμπαγών οργάνων.¹¹⁻¹⁴ Ωστόσο, ο ρόλος της HDAC8 στο DDR και στη ρύθμιση της μετάφρασης στο ΠΜ παραμένει άγνωστος.

Η παρούσα μελέτη ανέδειξε τον μοναδικό ρόλο της HDAC8 στη βιολογία του ΠΜ αλλά και τη δυναμική στη θεραπευτική της νόσου της αναστολής της εν λόγω απο-ακετυλάσης ως νεότερου επιγενετικού παράγοντα, τόσο ως μονοθεραπεία όσο και σε συνδυασμό με ήδη χρησιμοποιούμενους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες στην αντι-μυελωματική θεραπεία.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Δείγμα της μελέτης – κυτταρικές σειρές

Στην παρούσα μελέτη συμπεριλήφθηκαν οι παρακάτω ανθρω-

πινες κυτταρικές σειρές: MM1S, RPMI8226, OPM2, U266, U2OS. Οι συνθήκες καλλιέργειας των κυττάρων περιλάμβαναν RPMI μέσο καλλιέργειας με 10% FBS και 100 μονάδες/mL πενικιλίνη και 100 μg/mL στρεπτομυκίνη για όλες τις κυτταρικές σειρές μυελώματος, και πλήρες μέσο καλλιέργειας McCoy's 5a για την κυτταρική σειρά U2OS σε 5% CO₂ και 95% O₂, σε θερμοκρασία 37 °C.

Πλασματοκύτταρα θετικά για CD138 αντιγόνο επιφανείας, απομονωμένα από μυελό των οστών νεοδιαγνωσθέντων ασθενών με ΠΜ (n=4), και μονοπύρνα κύτταρα περιφερικού αίματος (ΜΚΠΑ) χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Η απομόνωση των ΜΚΠΑ και των πλασματοκυττάρων μυελού των οστών (ΠΜΚ) ασθενών με ΠΜ και υγιών δοτών πραγματοποιήθηκε με χρήση διαλύματος φικόλης (Ficoll-Paque), ενώ η απομόνωση των CD138+ κυττάρων έγινε με χρήση μαγνητικών μικροσφαιριδίων αντι-CD138 (Miltenyi Biotec), όπως έχουμε περιγράψει προηγουμένως.⁷ Πριν από τη συλλογή οποιασδήποτε πληροφορίας οι συμμετέχοντες ενημερώθηκαν για τους σκοπούς και τη διαδικασία της μελέτης και παρέιχαν έγγραφη συναίνεση για τη συμμετοχή τους, και η παρούσα μελέτη συμμορφώθηκε πλήρως με τη διακήρυξη του Helsinki (1975).

Μέτρηση βλαβών DNA με comet assay

Η δοκιμασία comet για την εκτίμηση των βλαβών του DNA πραγματοποιήθηκε όπως έχει περιγραφεί προγενέστερα.^{15,16} Εν συντομία, κατάλληλος αριθμός κυττάρων από τις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, ΠΜΚ, ΜΚΠΑ, αραιώθηκαν σε τελικό όγκο 400 μL 0,5% χαμηλής θερμοκρασίας τήξης αγαρόζης και κατόπιν 75 μL επιστρώθηκαν σε γυάλινα πλακίδια επικαλυπτόμενα με 1% υψηλής τήξης αγαρόζη. Μετά τη λύση των κυττάρων, τα πλακίδια εναποτέθηκαν σε ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης (Trevigen Inc, Gaithersburg, MD) και επώαστηκαν με διάλυμα ηλεκτροφόρησης (αλκαλικού ή ουδέτερου pH). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στους 4 °C στα 21 V για 30 min. Στη συνέχεια, τα πλακίδια μονιμοποιήθηκαν με τη χρήση 70% αιθανόλης και κατόπιν ακολούθησε η χρώση τους με comet assay silver χρώση (Trevigen Inc). Τέσσερις πλάκες επεξεργάστηκαν για καθένα δείγμα. Οι μετρήσεις διενεργήθηκαν σε 100 κύτταρα, τυχαία επιλεγμένα σε κάθε πλακίδιο (σύνολο 400 κύτταρα/δείγμα). Οι εκτιμώμενες παράμετροι εξετάστηκαν με χρήση του προγράμματος CometScore (TriTek Corp, Sumerduck, VA).

Ανάλυση Western blot

Η λύση των κυττάρων και η απομόνωση πρωτεϊνών πυρήνα και κυτταροπλάσματος πραγματοποιήθηκε με χρήση NER buffer (ThermoScientific) και η ανάλυση Western blot έγινε όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως.¹⁵ Οι μεμβράνες επώαστηκαν με αντισώματα έναντι γH2AX (φωσφορυλίωση στη σερίνη 139), RPA, 53BP1, GAPDH (όλα Cell signaling Technology). Η ανίχνευση των παραπάνω πρωτεϊνών έγινε βάσει σήματος χημειοφωταύγειας (Thermo Fisher Scientific Inc, Rockford, IL, #34080). Η ποσοτική εκτίμηση της πρωτεϊνικής έκφρασης κατά Western blot έγινε με χρήση του προγράμματος ImageJ software (version 1.48, NIH, Bethesda, MD).

Ανοσοϊστοχημική ανάλυση

Κύτταρα ανθρώπινων κυτταρικών σειρών και κύτταρα ασθενών με ΠΜ και υγιών δοτών (5×10^4) υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρηση και επίστρωση σε πλάκες για 5 min στα 500 rpm σε ειδική φυγόκεντρο Cytospin 3. Η μονιμοποίηση των πλακών έγινε με χρήση διαλύματος 10% φορμαλδεΐδης. Η επώαση με το πρωτεΐον αντίσωμα έγινε σε διάλυμα 1% BSA για 16 ώρες στους 4 °C. Η απεικόνιση επιτεύχθηκε με χρήση ειδικού συνεστιακού μικροσκοπίου φθορισμού (Zeiss 710 NLO/laser scanning confocal and multi-photon microscope).

Μηχανισμοί επιδιόρθωσης DNA – ομόλογος ανασυνδυασμός και μη ομόλογος ανασυνδυασμός

Η ενεργότητα των δύο κυρίαρχων μηχανισμών επιδιόρθωσης DSBs του ομόλογου ανασυνδυασμού (HR) και του μη ομόλογου ανασυνδυασμού (NHEJ) εκτιμήθηκε όπως έχει περιγραφεί προγενέστερα.¹⁵ Όλα τα πειράματα εισαγωγής των πλασμιδίων διενεργήθηκαν με τη χρήση της συσκευής Amara Nucleofector II. Για την ανάλυση των κυττάρων που εξέφραζαν GFP+/DsRed+ χρησιμοποιήθηκε κυτταρόμετρο ροής FACSCalibur. Τουλάχιστον 50.000 μετρήσεις (events) εξετάστηκαν σε κάθε ξεχωριστό πείραμα. Κάθε δείγμα εξετάστηκε δύο φορές, καθώς διενεργήθηκαν δύο ανεξάρτητα πειράματα. Όλα τα δεδομένα αναλύθηκαν με το λογισμικό ανάλυσης FlowJo.

Ανοσοκατακρήμνιση συμπλόκων και μαζική φασματομετρία

Η ανοσοκατακρήμνιση συμπλόκων πρωτεϊνών (co-immunoprecipitation) και η μαζική φασματομετρία (mass spectrometry) πραγματοποιήθηκαν όπως έχουν περιγραφεί προγενέστερα.¹⁷ Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τις απομονώσεις προήλθαν από την εταιρεία Thermo Fisher Scientific, USA (Pierce Co-Immunoprecipitation Kit).

Δήλωση ενημέρωσης και συγκατάθεσης ασθενών

Όλοι οι ασθενείς και οι υγιείς δότες του δείγματος της μελέτης, κατόπιν εκτενούς ενημέρωσης, έδωσαν ενυπόγραφα τη συγκατάθεσή τους για την εκπόνηση της παρούσας μελέτης και η μελέτη διεξήχθη βάσει της διακήρυξης του Helsinki.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η HDAC8 υπερεκφράζεται στο πολλαπλό μυέλωμα

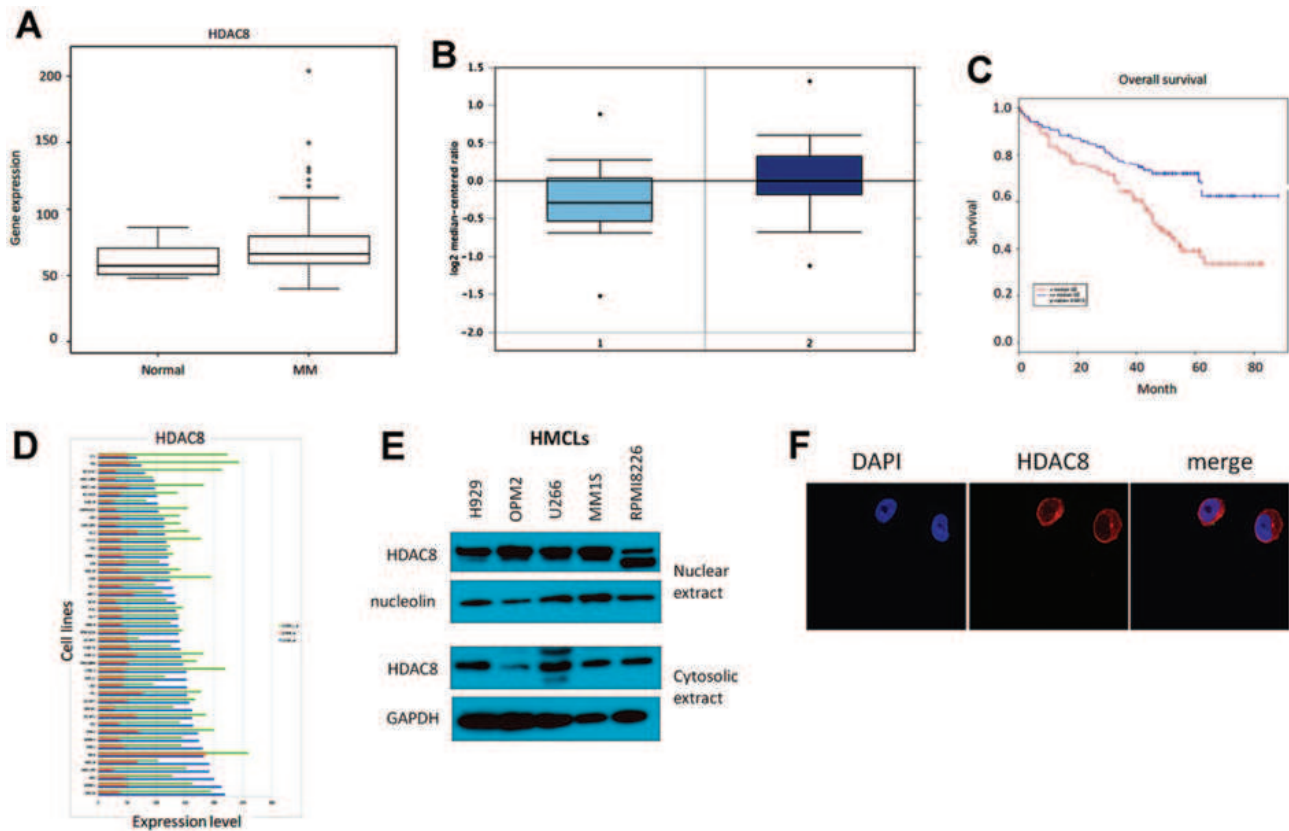
Πρόσφατα, μελέτες έχουν δείξει ότι η δομή της χρωματίνης, η μεταγραφική δραστηριότητα και η αποτελεσματικότητα του μηχανισμού επιδιόρθωσης βλαβών DNA επηρεάζουν σημαντικά την ανταπόκριση των ασθενών με ΠΜ στη χημειοθεραπεία.^{7,15} Στην παρούσα μελέτη αρχικά εκτιμήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης της HDAC8 (gene ID: 55869) σε λογαριθμικά (\log_{10}) μετατρεπόμενα δεδομένα από τη βάση δεδομένων (GSE39754) της γαλλικής ομάδας

ΠΜ Intergroupe Francophone du Myélome (IFM), που περιλάμβανε 170 νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με ΠΜ. Η ανάλυσή μας ανέδειξε στατιστικά σημαντική έκφραση της HDAC8 στους μυελωματικούς ασθενείς συγκρινόμενοι με τους υγιείς δότες ($p=0,005$). Επιπρόσθετα, η υπερέκφραση της HDAC8 παρουσίασε ισχυρή συσχέτιση με την πτωχότερη πρόγνωση των ασθενών με ΠΜ εκφραζόμενη με την ολική επιβίωση αυτών (overall survival, OS) ($p=0,0015$) (εικ. 1). Στη συνέχεια, εκτιμήθηκε η έκφραση της HDAC8 σε πλήθος 45 μυελωματικών κυτταρικών σειρών (HMCLs), όπου διαπιστώθηκε αυξημένη έκφραση (εικ. 1).

Επιβεβαιώθηκε η πυρηνική και η κυτταροπλασματική παρουσία της HDAC8 στις (HMCLs) με ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών και μέθοδο ανοσοϊστοχημείας (εικ. 1). Η έκφραση της HDAC8 ήταν στατιστικώς σημαντικά αυξημένη σε πλασματοκύτταρα μυελού των οστών μετά από απομόνωση αυτών από οστεομυελικές βιοψίες πρωτοδιαγνωσθέντων ασθενών με ΠΜ, συγκρινόμενα με μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος υγιών δοτών (PBMcs).

Επίδραση της HDAC8 στον πολλαπλασιασμό και στην επιβίωση των μυελωματικών κυττάρων

Εκτιμήθηκε η επίδραση στον πολλαπλασιασμό των μυελωματικών κυττάρων σε απουσία της HDAC8. Σε τέσσερις διαφορετικές HMCLs (NCI-H929, MM1S, OPM2, RPMI8226) η υποέκφραση της HDAC8, όπως αυτή επιτεύχθηκε με σύστημα απαλοιφής του υπεύθυνου γονιδίου με ρετροϊό (Lentivirus system), είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, όπως αναδεικνύεται στην εικόνα 2. Εντάξαμε επί πλέον στις πειραματικές μελέτες μας ένα μικρό μόριο, ειδικό αναστολέα της HDAC8, τον παράγοντα PCI-34051, με >200 φορές μεγαλύτερη ειδικότητα έναντι της HDAC8 από τις υπόλοιπες ισομορφές. Η φαρμακευτική αναστολή της HDAC8 οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μείωση του πολλαπλασιασμού των μυελωματικών κυττάρων, σε εκσεσημασμένη κυτταροτοξικότητα αυτών, αλλά και σε μείωση του δυναμικού δημιουργίας αποικιών των κυττάρων, όπως εκτιμήθηκαν με διαφορετικές τεχνικές μεθόδους που περιγράφονται στη μεθοδολογία του παρόντος πονήματος (εικ. 2). Επί πλέον, η φαρμακευτική αναστολή της HDAC8 είχε συνεργική δράση σε συνδυασμό με γονοτοξικούς παράγοντες (μεμφαλάνη, μπενταμουστίνη). Οι HMCLs επιδεικνύουν οστεοτροπισμό σε συνθήκες *in vivo*, και η αλληλεπίδραση με τα κύτταρα του στρώματος του μυελού των οστών (BMSCs) επάγει τον πολλαπλασιασμό τους και συμβάλλει στην ανάπτυξη αντοχής έναντι της χημειοθεραπείας. Σε συν-καλλιέργειες με HS-5 στρωματικά κύτταρα ή κύτταρα του στρώματος του μυελού των οστών απομονωμένα από νεοδιαγνωσθέντες



Εικόνα 1. Η HDAC8 υπερεκφράζεται στο πολλαπλό μυέλωμα (ΠΜ). Η HDAC8 υπερεκφράζεται στο ΠΜ (Α), καθώς και σε άλλες κακοήθειες, όπως τον καρκίνο του μαστού (Β), ενόσω οι καμπύλες Kaplan-Mayer (C) αναδεικνύουν τη στατιστικά σημαντική διαφορά στην ολική επιβίωση των μυελωματικών ασθενών με υπερέκφραση της HDAC8 ($p < 0,005$). Η υπερέκφραση της HDAC8 επιβεβαιώθηκε σε σύνολο 45 διαφορετικών HMCLs (D), ενώ με τεχνικές ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών (E) και ανοσοϊστοχημεία βρέθηκε η κυτταροπλασματική και η πυρηνική εντόπιση της απο-ακετυλάσης (F).

ασθενείς με ΠΜ, παρατηρήθηκε ότι ο αναστολέας HDAC8 οδήγησε σε σημαντική μείωση του πολλαπλασιασμού των μυελωματικών κυττάρων (εικ. 2).

Η HDAC8 παρουσιάζει πλήθος διαφορετικών υποστρωμάτων από τα πλέον γνωστά στη βιβλιογραφία. Η αποακετυλίωση σε διαφορετικές θέσεις των ιστονών 3 και 4, αλλά και η επίδραση της HDAC8 επί του p53 καταδεικνύει τις πολλαπλές λειτουργίες του ισοενζύμου, όπως διαφαίνεται στο Panel B της εικόνας 2. Στο gel αγαρόζης δεξιά αναδεικνύεται ότι τόσο επί απαλοιφής με shRNA της HDAC8 όσο και επί φαρμακευτικής αναστολής με τον PCI-34051 επέρχεται αλλαγή στη δομή της χρωματίνης, συμβάλλοντας σε πιο «ανοικτή» δομή, με την τεχνική της μικροκοκκικής νουκλεάσης, όπως έχει περιγραφεί προγενέστερα.¹⁶

Η HDAC8 επάγει βλάβες στο DNA

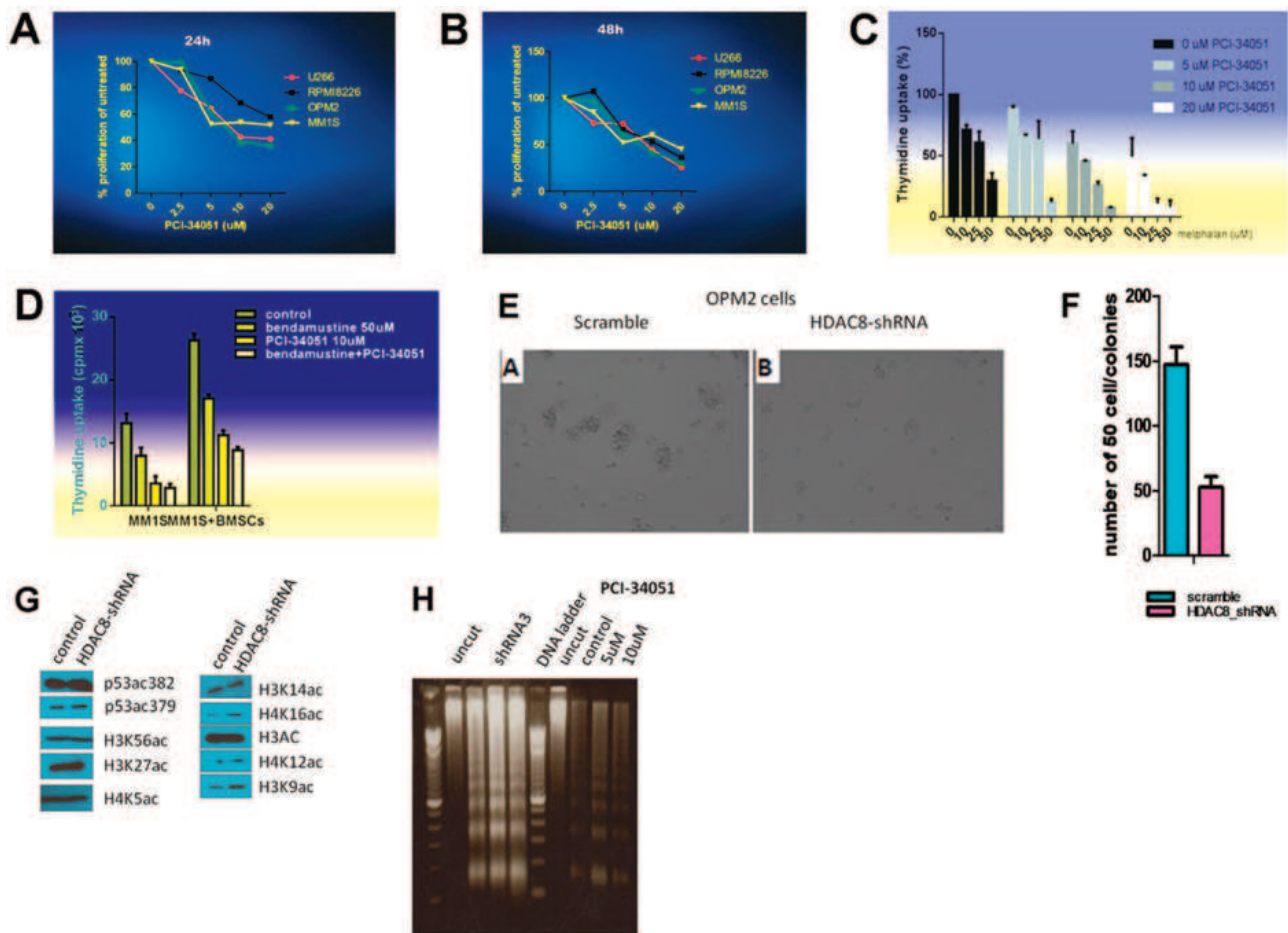
Οι επιγενετικές τροποποιήσεις συμμετέχουν σε όλες τις βασίζομενες στο γενετικό υλικό κυτταρικές διαδικασίες, περιλαμβανομένων και των μηχανισμών επιδιόρθωσης βλαβών του γενετικού υλικού.

Για να εξετάσουμε εάν η HDAC8 εμπλέκεται στο DDR, προχωρήσαμε σε απαλοιφή της έκφρασης της HDAC8 (knockdown) χρησιμοποιώντας καλά χαρακτηριζόμενα HDAC8 shRNA και εκτελέσαμε comet assay και ανοσοφθορισμό έναντι ευρέως χρησιμοποιούμενων δεικτών γενετικής βλάβης, όπως γH2Ax, 53BP1, και RPA32, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.

Τα παραπάνω ευρήματα επιβεβαιώθηκαν, χρησιμοποιώντας την κυτταρική σειρά οστεοσαρκώματος U2OS, δεδομένης της αντιπροσωπευτικότητας των εν λόγω κυττάρων ως μοντέλο για μελέτη του DDR μονοπατιού. Παρατηρήθηκαν υψηλότερα επίπεδα βλαβών διπλής έλικας του DNA (DSBs) σε κύτταρα που στερούνται HDAC8, σε σύγκριση με μυελωματικά κύτταρα μάρτυρες (εικ. 3).

Η HDAC8 αναστέλλει τον ομόλογο ανασυνδυασμό

Για να εκτιμηθεί περαιτέρω η επίδραση της HDAC8 στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης βλαβών του DNA, εκθέσαμε μυελωματικά κύτταρα σε γ-ακτινοβολία και μετρήσαμε τη γενετική βλάβη, όπως αυτή ποσοτικοποιείται με τον

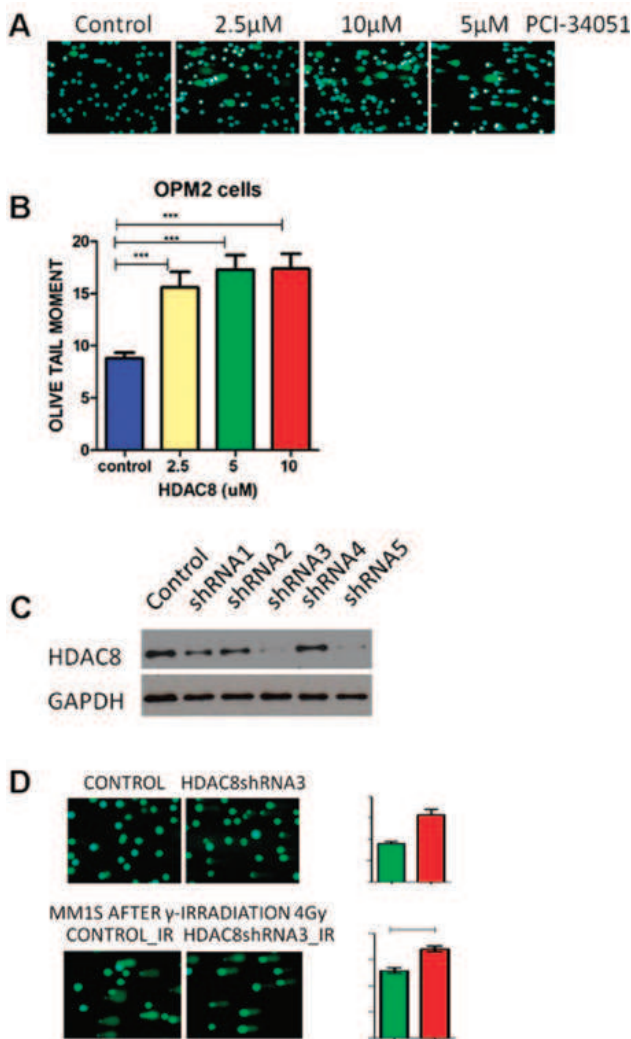


Εικόνα 2. Η αναστολή της HDAC8 έχει σημαντική επίδραση στον πολλαπλασιασμό και στη βιωσιμότητα των μυελωματικών κυττάρων, τόσο ως μονοθεραπεία όσο και σε συνδυασμό με DNA-damaging παράγοντες (Α, Β). Η ενισχυτική επίδραση του μικροπεριβάλλοντος, με παρουσία των στρωματικών κυττάρων στην κυτταροκαλλιέργεια, δεν πέτυχε να αναστρέψει την κυτταροτοξικότητα του αναστολέα της HDAC8 (C, D). Η έλλειψη HDAC8 (shRNA) οδήγησε σε σημαντική μείωση πολλαπλασιασμού των μυελωματικών κυττάρων και σχηματισμό αποικιών (E, F). Η HDAC8 παρουσιάζει πλήθος διαφορετικών υποστρωμάτων από τα πλέον γνωστά στη βιβλιογραφία. Η απο-ακετυλίωση σε διαφορετικές θέσεις των ιστονών 3 και 4, αλλά και η επίδραση της HDAC8 επί του p53 καταδεικνύει τις πολλαπλές λειτουργίες του ισοενζύμου (G). Στο gel αгарόζης δεξιά αναδεικνύεται ότι τόσο επί απαλοιφής με shRNA της HDAC8 όσο και επί φαρμακευτικής αναστολής με τον PCI-34051, επέρχεται αλλαγή στη δομή της χρωματίνης, συμβάλλοντας σε πιο «ανοικτή» δομή (H).

αριθμό των γH2Ax εστιών σε διαφορετικά χρονικά σημεία. Απαλοιφή του γονιδίου *HDAC8* (knockdown) είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της επιδιορθωτικής ικανότητας (εικ. 4). Η επάρκεια του μηχανισμού επιδιορθωσης βλαβών DNA εκτιμήθηκε σε κύτταρα μετά από απαλοιφή της HDAC8, χρησιμοποιώντας μια τεχνική βασιζόμενη σε πλασμίδια με ομόλογα άκρα στα σημεία της βλάβης. Ο ομόλογος ανασυνδυασμός (homologous recombination, HR) έδειξε σημαντικά μειωμένη αποτελεσματικότητα μετά από αναστολή της HDAC8 σε σύγκριση με κύτταρα που δεν εκτέθηκαν στον PCI-34051. Επιβεβαιώσαμε τα εν λόγω ευρήματα, εκπονώντας πειράματα ανοσοϊστοχημείας έναντι του αντιγόνου RAD51, ενός παράγοντα μείζονος σημασίας για το μονοπάτι HR (εικ. 4).

Η HDAC8 ως ρυθμιστής του συμπλόκου της κοχεσίνης

Το σύμπλοκο κοχεσίνης είναι ένα πολλαπλών μονάδων σύμπλοκο πρωτεϊνών, το οποίο συγκρατεί τις αδελφές χρωματίδες σε κάθε κυτταρικό κύκλο, από την S-φάση μέχρι την ανάφαση, επιτρέποντας τις νεοσχηματιζόμενες αδελφές χρωματίδες να προσαρτηθούν στη μιτωτική άτρακτο ως μονάδα. Το σύμπλοκο κοχεσίνης συμμετέχει σε πλήθος γενετικών διαδικασιών του κυττάρου, όπως η αντιγραφή, η μεταγραφή, ο διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων και η επιδιορθωση του DNA. Τροποποιημένη έκφραση γονιδίων του συμπλόκου κοχεσίνης ή μεταλλάξεις αυτών έχουν ανευρεθεί σε πλήθος κακοηθειών. Η ανάλυση των δεδομένων γονιδιακής έκφρασης στην παρούσα μελέτη ανέδειξε τη συμμετοχή



Εικόνα 3. Η αναστολή της HDAC8 επάγει γενετικές βλάβες. Εφαρμόζοντας comet assay σε συνθήκες φαρμακευτικής αναστολής με τον PCI-34051 (A, B), αλλά και σε κύτταρα με έλλειψη της HDAC8 έχοντας δοκιμάσει διαφορετικά shRNAs για την πλήρη εξάλειψη έκφρασης (C), μετά από επίδραση με γ-ακτινοβολία (D) παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση του αριθμού των κυττάρων με βλάβες του DNA, όπως αυτές εκτιμώνται με τον δείκτη olive tail moment. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

της HDAC8 στο σύμπλοκο κοχεσίνης. Ελέγξαμε σε συνθήκες μη έκφρασης της HDAC8 την αλλαγή στην παραγωγή των δομικών πρωτεϊνών του συμπλόκου με ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών και αναδείχθηκε η σημαντική μείωση κάποιων από αυτά (εικ. 5), ενώ με τεχνικές ανοσοκατακρήμνισης συμπλόκων (co-immunoprecipitation) διαπιστώθηκε η δημιουργία συμπλόκου μεταξύ της πρωτεΐνης SMC3, ενός κύριου μέλους της κοχεσίνης, και της HDAC8. Είναι αξιοσημείωτο ότι η εν λόγω σύνδεση ενισχύεται σε συνθήκες γονοτοξικού stress, όπως η έκθεση σε γ-ακτινοβολία (εικ. 5). Τα προαναφερθέντα ευρήματα επιβεβαιώθηκαν με εφαρμογή σε κυτταρικές σειρές μυελώματος πριν και μετά από γ-ακτινοβολία (εικ. 5).

Η αναστολή της HDAC8 έχει επίδραση στη δομή του κυτταροσκελετού

Προχωρήσαμε στην ανάλυση της έκφρασης γονιδίων σε μυελωματικά κύτταρα που εκφράζουν HDAC8 και κύτταρα τα οποία στερούνται της απο-ακετυλάσης με σύστημα shRNA. Εντάξαμε στον πειραματικό σχεδιασμό δύο μυελωματικές κυτταρικές σειρές, προκειμένου να συμπεριλάβουμε τη βιολογική ετερογένεια που χαρακτηρίζει τη νόσο. Το γονιδιακό προφίλ έκφρασης ανέδειξε τον σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει η HDAC8 στη συγκρότηση του κυτταροσκελετού, με μείωση ≥ 2 φορές σημαντικών σχετιζόμενων με τη δομή του κυτταροσκελετού γονιδίων σε απουσία της HDAC8 (εικ. 6). Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν, εκτελώντας ανοσοϊστοχημικές χρώσεις μυελωματικών κυττάρων κατόπιν απαλοιφής της HDAC8, και κυττάρων μαρτύρων των ίδιων ΗΜCΛS (εικ. 6).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

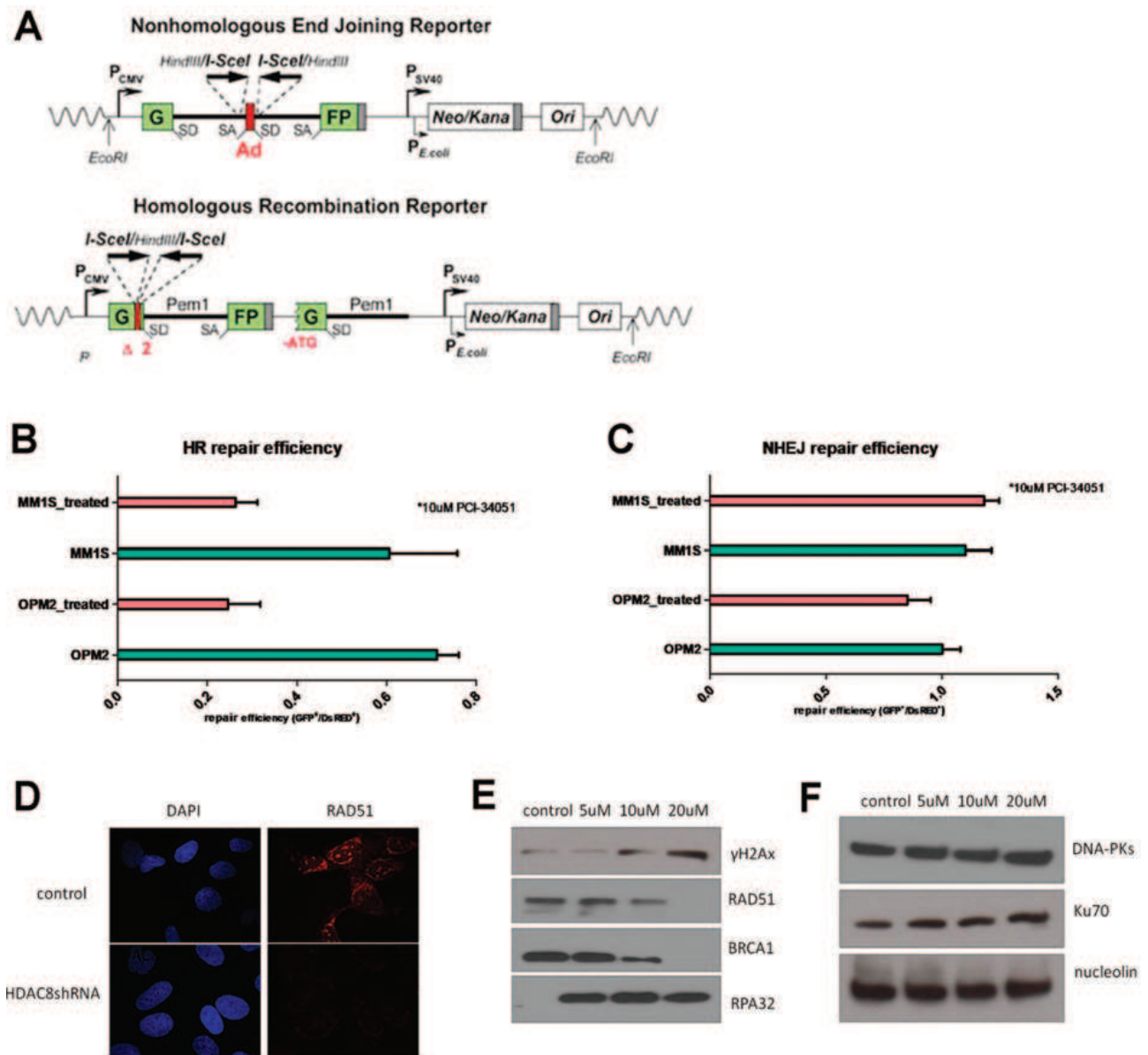
Είναι πλέον γνωστό από πλήθος σύγχρονων κλινικών και προκλινικών μελετών ότι στη θεραπεία της νόσου του ΠΜ οι επιγενετικοί παράγοντες έχουν θέση τόσο ως μονοθεραπεία όσο και συνδυαστικά με άλλους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. Σε προηγούμενη μας μελέτη έχουμε δείξει ότι η δομή της χρωματίνης έχει επίδραση στην κλινική ανταπόκριση των ασθενών με ΠΜ στη χημειοθεραπεία. Κατά το προηγούμενο έτος έλαβαν έγκριση από τον Αμερικανικό Οργανισμό Φαρμάκων (Food and Drug Administration, FDA) για τη θεραπεία του ΠΜ 7 νεότεροι παράγοντες, ανάμεσά τους 3 επιγενετικοί αναστολείς.

Λαμβάνει μεγαλύτερη σημασία ως εκ τούτου σε μια νόσο, όπου παρά τις νεότερες θεραπευτικές εξελίξεις παραμένει ανίατη και οι ασθενείς υποτροπιάζουν, με επιδείνωση της ποιότητας ζωής τους, υψηλή θνητότητα και υψηλά κόστη νοσηλείας και παροχής υπηρεσιών, η ανεύρεση πιο αποτελεσματικών συνδυαστικών θεραπευτικών στρατηγικών.

Η HDAC8, που γονιδιακά εδράζεται στο Χq13, ανήκει στην κλάση I των απο-ακετυλασών ιστονών μαζί με τις HDAC1,2,3, ενόσω η ίδια παρουσιάζει μοναδικά χαρακτηριστικά, δομικά στερούμενη το C-τελικό άκρο.

Έχει βρεθεί πλήθος μεταλλάξεων της HDAC8 στο σύνδρομο Cornelia de Lange (CdLS), μια πολυσυστηματική διαταραχή με διακριτή παραμόρφωση προσώπου, διαταραχές ανάπτυξης και νευρολογικά ελλείμματα, ανωμαλίες άκρων και συμπτώματα από το γαστρεντερικό σύστημα.

Απαλοιφή της HDAC8 (knockdown) σε νευροβλάστωμα έχει οδηγήσει σε αναστολή του πολλαπλασιασμού, μείωση

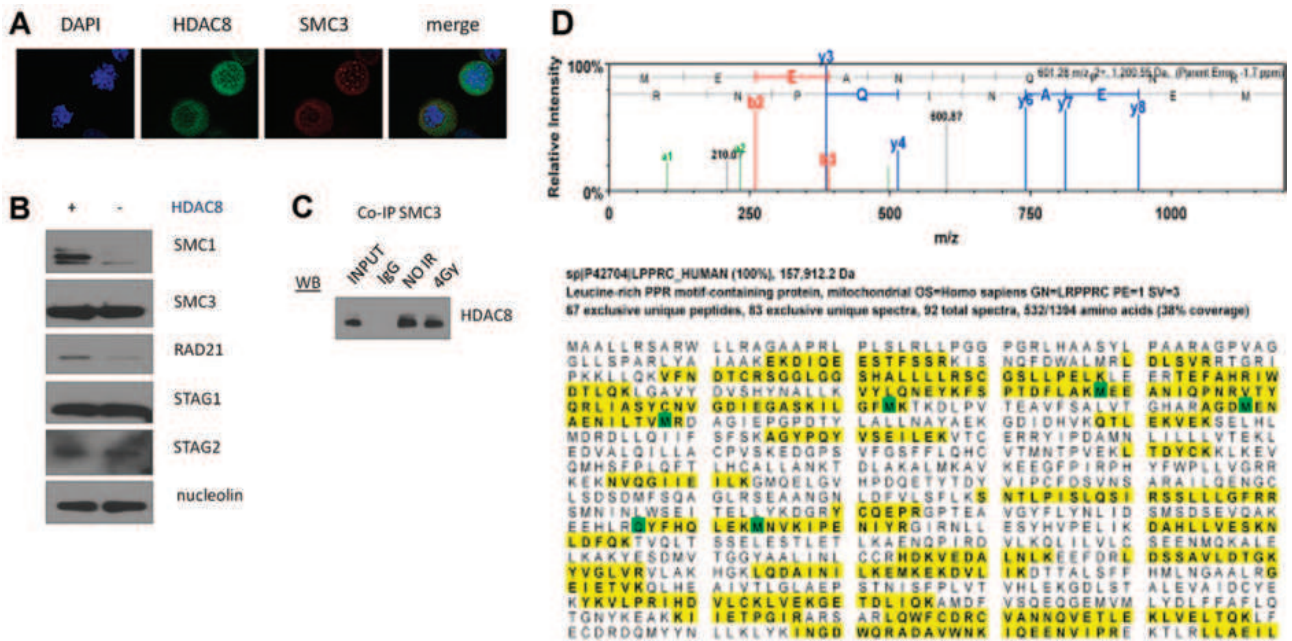


Εικόνα 4. Έχοντας την εφαρμογή βασισμένη στην ομολογία άκρων ή μη πλασμιδίου (A), η HDAC8 ρυθμίζει την ενεργότητα του ομόλογου ανασυνδυασμού (B). Ενώσω ο μη ομόλογος ανασυνδυασμός (NHEJ) δείχνει μη στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ενεργότητά του σε κύτταρα όπου αναστέλλεται η HDAC8 (C), ο ομόλογος ανασυνδυασμός (HR) επιδεικνύει σημαντική μείωση της επάρκειάς του ως επιδιορθωτικό μηχανισμού. Επιβεβαιώνονται τα αποτελέσματα με ανοσο-ηλεκτροφόρηση (D) και με Western blot (E, F), όπου κύρια μόρια του μονοπατιού HR, όπως η RAD51, φαίνεται να επηρεάζονται στατιστικώς σημαντικά σε απουσία ή φαρμακευτική αναστολή της HDAC8.

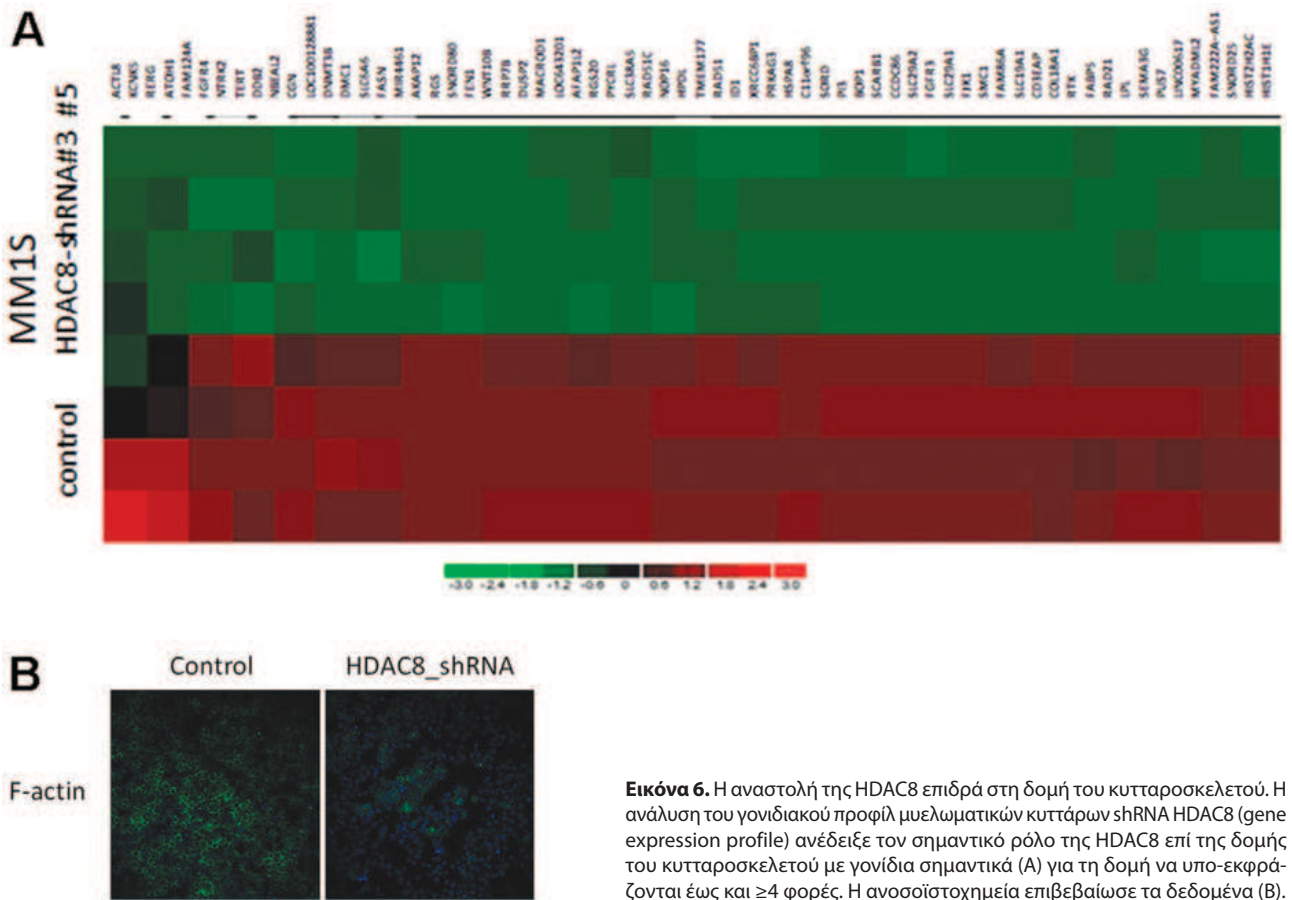
της κλωνικής ανάπτυξης των κυττάρων και αναστολή του κυτταρικού κύκλου. Ωστόσο, υπάρχει έλλειψη δεδομένων στη διεθνή ιατρική βιβλιογραφία σχετικά με τον ρόλο της HDAC8 στο ΠΜ.²⁰ Η παρούσα μελέτη χρησιμοποιώντας σύγχρονες πειραματικές τεχνικές ανέδειξε μοναδικά λειτουργικά χαρακτηριστικά που επιδεικνύει η συγκεκριμένη απο-ακετυλάση.

Η υπερέκφρασή της σε σύνολο 172 νεοδιαγνωσθέντων ασθενών και η επιβεβαίωση των δεδομένων από βάσεις

δημοσιευμένων δεδομένων χρησιμοποιώντας την πλατφόρμα <http://portals.broadinstitute.org/mmgp/home> έδωσε το έναυσμα για περαιτέρω διερεύνηση των πιθανών θεραπευτικών δυνατοτήτων με τη στόχευση της HDAC8. Περαιτέρω, λαμβάνοντας υπ' όψη τη γενετική ετερογένεια που χαρακτηρίζει το ΠΜ,^{21,22} διερευνήσαμε την έκφραση της HDAC8 στο σύνολο των ΗΜCLs (n=45) βάσει των επιπέδων mRNA, ενώσω επιβεβαιώσαμε τα σχετικά αποτελέσματα με ανοσοηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε σύνολο πέντε μυε-



Εικόνα 5. Η HDAC8 εμπλέκεται στη συγκρότηση του συμπλόκου της κοχεσίνης. Σημαντική μείωση ορισμένων μορίων-κλειδιών στη συνοχή της κοχεσίνης, όπως η SMC3, φαίνεται να παρουσιάζουν σε αναστολή της HDAC8 (Α). Η καταστολή αυτή ενισχύεται σε συνθήκες γονοτοξικού stress, όπως η γ-ακτινοβολία (Β), ενόσω η σύγχρονη ανοσοκατακρήμνιση (co-ip) ανέδειξε τη SMC3 ως βασικό υπόστρωμα της HDAC8 (C). Η mass spectrometry επιβεβαίωσε τα σχετικά αποτελέσματα, ταυτοποιώντας τις θέσεις πρόσδεσης της HDAC8 επί της SMC3 και άλλων υποστρωμάτων, μετά από ανοσοκατακρήμνιση των πρωτεϊνικών συμπλόκων της HDAC8 (D).



λωματικών κυτταρικών σειρών. Η HDAC8 εδράζεται τόσο κυτταροπλασματικά όσο και στον πυρήνα του κυττάρου, αναδεικνύοντας το μοναδικό προφίλ της, καθ' όσον τα επιγενετικά ένζυμα είναι λειτουργικά και εδράζονται ως επί το πλείστον στον πυρήνα του κυττάρου. Η HDAC8 βρέθηκε ότι έχει περισσότερες της μίας διαφορετικές ιστονικές θέσεις-υποστρώματα προς απο-ακετυλίωση, που δεν έχει περιγραφεί έως τώρα στη βιβλιογραφία.

Η διαφορετικότητα της HDAC8 όσον αφορά στα υποστρώματα έχει καταδειχθεί από άλλες ερευνητικές ομάδες, υποσημαίνοντας την πιθανή συμμετοχή της απο-ακετυλάσης σε σημαντικές DNA-σχετιζόμενες διαδικασίες του κυττάρου, όπως το DDR και ο κυτταρικός κύκλος.^{10,24}

Η συσχέτιση της HDAC8 με την ενεργότητα του ομόλογου συνδυασμού έρχεται σε πλήρη ακολουθία με τα δεδομένα μας για τον ρόλο της HDAC8 στη συγκρότηση του συμπλόκου κοχεσίνης, καθ' όσον κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, σε συγκεκριμένες φάσεις αυτού, ο ομόλογος ανασυνδυασμός αναλαμβάνει την επιδιόρθωση του γενετικού υλικού με σκοπό τη μη μεταβίβαση γενετικών λαθών, ενόσω η κοχεσίνη, υπηρετώντας τον ίδιο σκοπό, εξασφαλίζει τη μηχανιστική εγγύτητα των αδελφών χρωματίδων για την πιστότητα των αντιγράφων.

Βασιζόμενοι στα παραπάνω δεδομένα, η περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασης της φαρμακευτικής αναστολής, χρησιμοποιώντας ένα μικρό μόριο αναστολέα²⁴ της HDAC8 τόσο σε συνδυασμό με γ-ακτινοβολία όσο και με άλλους γονοτοξικούς χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, ήδη χρησιμοποιούμενους στη θεραπεία του ΠΜ, κατέδειξε πολλαπλές θεραπευτικές δυνατότητες του εν λόγω αναστολέα, που μένει να δοκιμαστούν σε κλινικές μελέτες φάσης I/II. Τα πρόσφατα δεδομένα για την αποτελεσματικότητα

του αναστολέα της HDAC6, ricolinostat, σε συνδυασμό με ανοσοτροποποιητικούς παράγοντες ή αναστολείς του πρωτεασώματος, παρέχει τη δυνατότητα πολλαπλών συνδυαστικών επιλογών για τη θεραπευτική αντιμετώπιση του ΠΜ, που χρήζουν περαιτέρω προκλινικής και κλινικής διερεύνησης.

Συνολικά, η παρούσα μελέτη παρέχει νέα, μη δημοσιευμένα προγενέστερα δεδομένα για τον λειτουργικό ρόλο της HDAC8 στη βιολογία του μυελώματος, αλλά και για την πιθανή ανάδειξη του αναστολέα της συγκεκριμένης αποακετυλάσης ως νεότερου επιγενετικού παράγοντα για τη θεραπεία της νόσου. Ιδιαίτερα, η συσχέτιση της HDAC8 με την πτωχότερη πρόγνωση των ασθενών με ΠΜ, αλλά και η δυναμική μηχανιστική σύνδεση με σημαντικές για το κύτταρο λειτουργίες όπως το DDR, η συγκρότηση του κυτταροσκελετού και του συμπλόκου της κοχεσίνης, αναδεικνύουν την HDAC8 ως ένα μοναδικό μέλος της κλάσης I της οικογένειας των HDACs, τόσο δομικά όσο και λειτουργικά.

ΠΗΓΕΣ ΠΟΥ ΕΝΙΣΧΥΣΑΝ ΤΗΝ ΥΛΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η παρούσα εργασία συγχρηματοδοτήθηκε από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του επιχειρησιακού προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της πράξης «Ενίσχυση Μεταδιδασκτών ερευνητών/ερευνητριών» (MIS-5001552) της Μαρίας Ασλάνη-Γκοτζαμανίδου, που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).



Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ABSTRACT

Inhibition of histone deacetylase 8: A new therapeutic target for multiple myeloma

M. ASLANI-GKOTZAMANIDOU,¹ V.L. SOULIOTIS,² A.M. DIMOPOULOS,¹ E. TERPOS¹

¹Department of Clinical Therapeutics, School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, Athens,

²Institute of Chemical Biology, National Hellenic Research Foundation, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2020, 37(1):87–97

OBJECTIVE To investigate the function of histone deacetylase 8 (HDAC8) in the biology of multiple myeloma (MM) and to evaluate its potential as a therapeutic target. **METHOD** The lentiviral-shRNA delivery system was used for knock-down of HDAC8 in OPM2 and U266 cells. The HDAC8 inhibitor PCI-34051 was used as a chemical inhibitor. A panel of 15 antibodies was used in immunoblot analysis, immunofluorescence staining was performed and the images were analyzed with confocal microscopy. Single cell electrophoresis under neutral conditions (comet-assay) was performed in OPM2-HDAC8 knockdown cells with or without exposure to gamma irradiation (IR), and in treated and untreated cells with HDAC8 inhibitor in combination with IR. Co-immunoprecipitation assay was performed for investigation of

interactions of HDAC8 after induction of DNA damage. DNA double-strand break (DSB) repair occurring via homologous recombination (HR) pathway was assessed using a transient direct repeat DsRED-GFP/I-SceI plasmid-based system. Expression of DNA damage and repair pathway (DDR) genes was evaluated using a high-throughput polymerase chain reaction (PCR) assay. Cellular senescence was assessed with SA- β -galactosidase staining. **RESULTS** In 172 newly-diagnosed patients with MM from the IFM myeloma dataset HDAC8 overexpression was observed, with significant correlation with poor survival outcome ($p < 0.0015$). The high expression of HDAC8 in human myeloma cell lines (HMCLs) was confirmed in its cytoplasm and nuclear localization in all five MM cell lines studied. HDAC8 depletion in two MM cells lines resulted in significant inhibition of proliferation of MM cells at one week, and decrease in colony formation ($p < 0.001$). The combination of HDAC8 inhibitor with melphalan or bendamustine enhanced the anti-MM effects of the genotoxic agents (all $p < 0.01$). U266 cells with HDAC8 depletion exhibited raised levels of markers of DNA damage. Consistent with this observation, HDAC8 knockdown led to decreased HR activity and decreased repair of DSBs after IR. Similar results were obtained with HDAC8 inhibitor. The HDAC8 protein co-localized and co-immunoprecipitated with p53 after IR, and with SCM3, a member of cohesin. Finally, depletion of HDAC8 resulted in a higher prevalence of senescence associated with β -Gal-positive cells 3 weeks post transduction. **CONCLUSIONS** These results demonstrate a mechanistic connection between HDAC8 and the DNA damage repair pathway, and provide insight into the effect of HDAC8 on the cytoskeleton, which may have therapeutic implications in MM.

Key words: Deacetylation, Histone, Multiple myeloma

Βιβλιογραφία

- ANDERSON KC, CARRASCO RD. Pathogenesis of myeloma. *Annu Rev Pathol* 2011, 6:249–274
- ANDERSON KC. The 39th David A. Karnofsky lecture: Bench-to bedside translation of targeted therapies in multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2012, 30:445–452
- DAWSON MA, KOUZARIDES T. Cancer epigenetics: From mechanism to therapy. *Cell* 2012, 150:12–27
- SMERDON MJ. DNA repair and the role of chromatin structure. *Curr Opin Cell Biol* 1991, 3:422–428
- LOVÉN J, HOKE HA, LIN CY, LAU A, ORLANDO DA, VAKOC CR ET AL. Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers. *Cell* 2013, 153:320–334
- BAKKENIST CJ, KASTAN MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 2003, 421:499–506
- GKOTZAMANIDOU M, TERPOS E, BAMIA C, KYRTOPOULOS SA, SFIKAKIS PP, DIMOPOULOS MA ET AL. Progressive changes in chromatin structure and DNA damage response signals in bone marrow and peripheral blood during myelomagenesis. *Leukemia* 2014, 28:1113–1121
- MISHIMA Y, SANTO L, EDA H, CIRSTE A, NEMANI N, YEE AJ ET AL. Ricolinostat (ACY-1215) induced inhibition of aggresome formation accelerates carfilzomib-induced multiple myeloma cell death. *Br J Haematol* 2015, 169:423–434
- SOMOZA JR, SKENE RJ, KATZ BA, MOL C, HO JD, JENNINGS AJ ET AL. Structural snapshots of human HDAC8 provide insights into the class I histone deacetylases. *Structure* 2004, 12:1325–1334
- OEHME I, DEUBZER HE, WEGENER D, PICKERT D, LINKE JP, HERO B ET AL. Histone deacetylase 8 in neuroblastoma tumorigenesis. *Clin Cancer Res* 2009, 15:91–99
- LEHMANN M, HOFFMANN MJ, KOCH A, ULRICH SM, SCHULZ WA, NIEGISCH G. Histone deacetylase 8 is deregulated in urothelial cancer but not a target for efficient treatment. *J Exp Clin Cancer Res* 2014, 33:59
- HIGUCHI T, NAKAYAMA T, ARAO T, NISHIO K, YOSHIE O. SOX4 is a direct target gene of FRA-2 and induces expression of HDAC8 in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* 2013, 121:3640–3649
- WU J, DU C, LV Z, DING C, CHENG J, XIE H ET AL. The up-regulation of histone deacetylase 8 promotes proliferation and inhibits apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci* 2013, 58:3545–3553
- HU E, CHEN Z, FREDRICKSON T, ZHU Y, KIRKPATRICK R, ZHANG GF ET AL. Cloning and characterization of a novel human class I histone deacetylase that functions as a transcription repressor. *J Biol Chem* 2000, 275:15254–15264
- GKOTZAMANIDOU M, TERPOS E, BAMIA C, MUNSHI NC, DIMOPOULOS MA, SOULIOTIS VL. DNA repair of myeloma plasma cells correlates with clinical outcome: The effect of the nonhomologous end-joining inhibitor SCR7. *Blood* 2016, 128:1214–1225
- GKOTZAMANIDOU M, SFIKAKIS PP, KYRTOPOULOS SA, BAMIA C, DIMOPOULOS MA, SOULIOTIS VL. Chromatin structure, transcriptional activity and DNA repair efficiency affect the outcome of chemotherapy in multiple myeloma. *Br J Cancer* 2014, 111:1293–1304
- STAMNAES J, IVERSEN R, DU PRÉ MF, CHEN X, SOLLID LM. Enhanced B-cell receptor recognition of the autoantigen tTransglutaminase 2 by efficient catalytic self-multimerization. *PLoS One* 2015, 10:e0134922
- BHASKARA S, CHYLA BJ, AMANN JM, KNUTSON SK, CORTEZ D, SUN ZW ET AL. Deletion of histone deacetylase 3 reveals critical roles in S phase progression and DNA damage control. *Mol Cell* 2008, 30:61–72
- SAN-MIGUEL JF, RICHARDSON PG, GÜNTHER A, SEZER O, SIEGEL D, BLADÉ J ET AL. Phase Ib study of panobinostat and bortezomib

- in relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2013, 31:3696–3703
20. MITHRAPRABHU S, KALFF A, CHOW A, KHONG T, SPENCER A. Dys-regulated class I histone deacetylases are indicators of poor prognosis in multiple myeloma. *Epigenetics* 2014, 9:1511–1520
21. CHAPMAN MA, LAWRENCE MS, KEATS JJ, CIBULSKIS K, SOUGNEZ C, SCHINZEL AC ET AL. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature* 2011, 471:467–472
22. BOLLI N, AVET-LOISEAU H, WEDGE DC, VAN LOO P, ALEXANDROV LB, MARTINCORENA I ET AL. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nat Commun* 2014, 5:2997
23. DELMORE JE, ISSA GC, LEMIEUX ME, RAHL PB, SHI J, JACOBS HM ET AL. BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell* 2011, 146:904–917
24. BALASUBRAMANIAN S, RAMOS J, LUO W, SIRISAWAD M, VERNER E, BUGGY JJ. A novel histone deacetylase 8 (HDAC8)-specific inhibitor PCI-34051 induces apoptosis in T-cell lymphomas. *Leukemia* 2008, 22:1026–1034

Corresponding author:

M. Aslani-Gkatzamanidou, 80 Vassilisis Sofias Ave., 115 28 Athens, Greece
e-mail: mgkatzamanidou@yahoo.com
