

## ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

# Στοχευμένα φάρμακα: Ενδοκυττάρωση, διακίνηση και μοριακός μηχανισμός δράσης

# «Ταυτοποίηση και Λειτουργικός Χαρακτηρισμός Ρυθμιστών της Αγγειογένεσης σε Καρκινικά Κύτταρα του Παχέος Εντέρου που Φέρουν Μεταλλάξεις στο Γονίδιο *ΡΙΚ3CA*»

## ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΚΟΥΓΙΟΥΜΤΖΗ ΒΙΟΛΟΓΟΣ

## ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

 $I\,\Omega\,A\,N\,N\,I\,N\,A~~2\,0\,1\,9$ 



## ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

# Στοχευμένα φάρμακα: Ενδοκυττάρωση, διακίνηση και μοριακός μηχανισμός δράσης

# «Ταυτοποίηση και Λειτουργικός Χαρακτηρισμός Ρυθμιστών της Αγγειογένεσης σε Καρκινικά Κύτταρα του Παχέος Εντέρου που Φέρουν Μεταλλάξεις στο Γονίδιο *ΡΙΚ3CA*»

## ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΚΟΥΓΙΟΥΜΤΖΗ ΒΙΟΛΟΓΟΣ

## ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

 $I\,\Omega\,A\,N\,N\,I\,N\,A~~2\,0\,1\,9$ 

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»

Ημερομηνία αίτησης της κ. Κουγιουμτζή Αναστασίας: 29-1-2014

#### Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 763α/10-4-2014

#### Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

<u>Επιβλέπων</u>

Φώτσης Θεόδωρος, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Σάββας Χριστοφορίδης, Επίκουρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Carol Murphy, Ερευνήτρια Β'ΙΒΕ-ΙΤΕ

#### Ημερομηνία ορισμού θέματος: 23-7-2014

«Στοχευμένα Φάρμακα: Ενδοκυττάρωση, Διακίνηση και Μοριακός Μηχανισμός Δράσης-Ταυτοποίηση και Λειτουργικός Χαρακτηρισμός Ρυθμιστών της Αγγειογένεσης σε Καρκινικά Κύτταρα του Παχέως Εντέρου που Φέρουν Μεταλλάξεις στο Γονίδιο PIK3CA»

#### ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 873α/13-11-2018

Μπατιστάτου Άννα	Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικι			
	του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων			
Παπαμαρκάκη Θωμαή	Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του			
	Πανεπιστημίου Ιωαννίνων			
Φριλίγγος Ευστάθιος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του			
	Πανεπιστημίου Ιωαννίνων			
Φώτσης Θεόδωρος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του			
	Πανεπιστημίου Ιωαννίνων			
Χριστοφορίδης Σάββας	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του			
	Πανεπιστημίου Ιωαννίνων			
Κωλέττας Ευάγγελος	Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Κυτταρικής Βιολογίας			
	του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων			
Carol Murphy	Ερευνήτρια Β΄ΙΜΒΒ-ΙΤΕ			

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 17-12-2018

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ Άννα Μπατιστάτου** Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας

Η Γραμματέας του Τμήματος ΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

Στον Δημήτρη,

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο της Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και στο Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών (IBEEA-BR) στα Ιωάννινα, κατά τη χρονική περίοδο 2014-2018, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ.Φώτση. Η διδακτορική διατριβή υλοποιήθηκε με υποτροφία του ΙΚΥ η οποία χρηματοδοτήθηκε από την Πράξη «Πρόγραμμα χορήγησης υποτροφιών για μεταπτυχικές σπουδές δευτέρου κύκλου σπουδών» από πόρους του ΕΠ «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση», 2014-2020 με τη συγχρηματοδότηση του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου (ΕΚΤ) και του Ελληνικού Δημοσίου.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή Θεόδωρο Φώτση για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω τη διατριβή μου και να εργαστώ στο εργαστήριό του καθώς και για τις γνώσεις, το τρόπο σκέψης και την έμπνευση που με ιδιαίτερη προθυμία μου μετέδωσε καθ'όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τη συνεπιβλέπουσα Ερευνήτρια Β΄ Carol Murphy για την επιστημονική καθοδήγηση κατά την εκπόνιση της διατριβής μου, όπως και τον Καθηγητή Σάββα Χριστοφορίδη για την πολύτιμη βοήθειά του. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, την Καθηγήτρια Θωμαή Παπαμαρκάκη, την Καθηγήτρια Άννα Μπατιστάτου, τον Καθηγητή Ευστάθιο Φριλίγγο και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ευάγγελο Κωλέττα στην κρίση των οποίων υποβάλλεται η διατριβή αυτή. Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω στην Καθηγήτρια Άννα Μπατιστάτου για τον πολύτιμο χρόνο της και για το ιδιαίτερο ενδιαφέρον που έδειξε να βοηθήσει στην πρόοδο της διατριβής μου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλλαν στη διεξαγωγή των πειραμάτων για την παρούσα διατριβή και ιδιαίτερα ευχαριστώ τη Δρ. Αθηνά Κύρκου για όλα όσα μου έμαθε κατά τον πρώτο χρόνο της διατριβής και για τη μεγάλη βοήθεια που μου προσέφερε καθώς και το Δρ. Άγγελο Παπαδόπουλο, το Δρ. Δημήτριο Στέλλα, τους υποψήφιους διδάκτορες Ιωάννη Βερίγο και Δημήτρη Κορδιά και την κυρία Ειρήνη Πάτρα. Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να απευθύνω σε όλα τα μέλη της ερευνητικής ομάδας του κύριου Φώτση πρώην και νυν, για τη συνεργασία τους και τη βοήθειά τους όλα αυτά τα χρόνια, καθώς και όλα τα μέλη του Ινστιτούτου Βιοϊατρικών Ερευνών. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τις Δρ. Σοφία Μπέλλου, Δρ. Ελένη Μπαγκλή και Δρ. Νικολέττα Κωστοπούλου για τη στήριξή και τις συμβουλές τους. Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ απευθύνω στους υποψήφιους διδάκτορες και φίλους Μαρία Μάρκου, Μαρία Χατζηαθανασιάδου και Βαγγέλη Δρούγκα για την κατανόηση, τη βοήθεια, τη στήριξή και την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν ο καθένας ξεχωριστά στις αμέτρητες ώρες που περάσαμε μαζί στο εργαστήριο και μοιραστήκαμε τόσο τις χαρούμενες όσο και τις δύσκολες στιγμές με γέλιο και αισιοδοξία.

Κλείνοντας, το μεγαλύτερο ευχαριστώ ανήκει στην οικογένειά μου, στους γονείς μου Ιωάννη και Βασιλική που στήριξαν όλες τις επιλογές μου με αγωνία αλλά και πίστη σε εμένα, στην αδελφή μου Μαρία για τη δύναμη που πάντα μου δίνει, στον Βαγγέλη για τις πολύτιμες συμβουλές του που βοήθησαν τη πορεία μου και τέλος στο σύντροφό μου Δημήτρη, ο οποίος αγωνίστηκε με το δικό του τρόπο, στήριξε τη προσπάθειά μου και χωρίς αυτόν θα ήταν αδύνατο να ολοκληρωθεί η διατριβή αυτή τόσο για ηθικούς όσο και για πρακτικούς λόγους.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 Ο καρκίνος του παχέος εντέρου	9
1.1.1 Γενικά και επιδημιολογικά στοιχεία	9
1.1.2 Μοριακοί μηχανισμοί της καρκινογένεσης στο παχύ έντερο	10
1.1.3 Οι θεραπευτικές προσεγγίσεις στον καρκίνο του παχέος εντέρου	13
1.2 Ο ρόλος της ΡΙ3Κ στον καρκίνο του παχέος εντέρου	15
1.2.1. Η δομή των PI3Ks	15
1.2.2 Η επαγωγή σήματος από τις PI3K κινάσες κλάσης IA	18
1.2.3 Οι ογκογόνες μεταλλάζεις του γονιδίου ΡΙ3ΚCA	21
1.2.4 Οι μηχανισμοί αύζησης της ενεργότητας της ΡΙ3Κ μέσω των μεταλλάζεων E545K και Η104 1.2.5 Οι επιπτώσεις των μεταλλάζεων E545K και Η1047R στο φαινότυπο των καρκινικών κυττά	7R 23 άρων του
παχέος εντέρου in vitro και σε in vivo μοντέλα	
1.2.6 Η κλινική σημασία των μεταλλάζεων του γονιδίου PIK3CA	
1.3 Η στόχευση της νεοπλασματικής αγγειογένεσης στον καρκίνο	
1.3.1 Η αγγειογένεση στον καρκίνο	
1.3.2 Η αντιαγγειογενετική θεραπεία	
1.3.3 Η ΡΙ3Κ ως αντι-αγγειογενετικός στόχος	
1.4 Ο ρόλος των αγγειογενετικών χημειοκινών στον καρκίνο του παχέος εντέρου	
1.4.1 Η οικογένεια των χημειοκινών	
1.4.2 Χημειοκίνες και καρκίνος	
1.4.3 Οι αγγειογενετικές χημειοκίνες ERL+ CXC στον καρκίνο του παχέος εντέρου	
1.4.4 Η ρύθμιση και η καθοδική σηματοδότηση της χημειοκίνης CXCL5 στα καρκινικά κύτταρα	
1.4.5 Οι αγγειογενετικές αποκρίσεις της χημειοκίνης CXCL5 στον καρκίνο	
2. ΤΑΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 2.1 Κυτταροκαλλιέργεια	
2.2 Απομόνωση ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων από φλέβα ομφάλιου λώρου	
2.3 Αλληλουχιση γενωμικου DNA	
2.4 Απομονώση και ελεγχος KNA	
2.5 Αλυσιοώτη αντιοράση πολυμεράσης αντιστροφής μεταγραφάσης (R1-PCR)- Επάλλη. (Nexted DCD)	λη PCR
(Inested FUR)	
2.0 Avaloi $\mu$ introductor (introduction and $\mu$ introduction (introduction) and $\mu$ introduction (interval interval in	
2.7 Πουστική αλυσιουστή αντισμασή λυλυμερασής αντιστροφής μεταγραφασής-ηκτ-τ CK	00 63
2.8 1 $H \tau_{\text{EVOLUM}(a)}$ CRISPR	03 63
2.8.2 Πλασμιδιακοί φορείς	
2.8.3 Μονόκλωνοι εκκινητές και υβοιδισμός σε δίκλωνα gRNAs (Annealing of oligos)	
2.8.4 Αντίδραση σύνδεσης άκρων τμημάτων DNA φορέα και ενθέματος (Ligation)- Βακ	τηριακός 68
μετασχηματισμός (Transformation)-Απόμονωση ππασμοιακού DIVA	00
2.0.5 Πεψη πλασμίσιακου DIVA με περιορίστικα ενζομα	09 70
2.0.0 Απομονωση ζωνής από πήκτη αγαροζής (Get extraction)	
2.0.7 Αποφωσφοροπωση των ακρων ππασμισιακου φορεα- Εκχοπιση του ππασμισιακου Είνα με (	φαινολη- 70
2.8.8 Διαμόλυνση κυστάρουν	70 71
2.0.0 Διαμολονοη κοιταρών	/l n ка <del>л</del> б
2.7 πλεκτροφορηση πρωτεινών σε πηκτώμα πολυακρυλαμιστου και ανοσοαποτοπώσ Western	ין גענע 71
7 επι μαραγωγή λεντι-ιού H2B-mCherry	/ I 77
2.10.1 Διαμόλυνση κυττάρων 293Τ	
Ξ · ···	
2.10.2 Συλλογή ιοσωματίων και απομόνωση μέσω υπερφυνοκέντρησης	72 73

2.11 Βιντεοσκοπηση κυτταρων DLD1 μεσω του συστηματος IncuCyte®	74
2.12 Τεχνική δημιουργίας καρκινικών σφαιρικών δομών (Tumorsphere Formation Assay, T	FA)75
2.13 Δοκιμασία πολλαπλασιασμού κυττάρων HUVEC με ενσωμάτωση βρωμοδεόξυ ουριδίνη	ן ג75
2.14 Δοκιμασία σχηματισμού αγγειακού δικτύου από κύτταρα HUVEC in vitro (Tube fo	ormation
assay)	76
2.15 Δοκιμασία ελέγχου αγγειογενετικού δυναμικού καρκινικών κυττάρων in vivo σε πον	τίκια με
χρήση του μοντέλου Matrigel (Matrigel plug assay)	77
2.16 Τεχνική δημιουργίας μεταστάσεων in vivo σε ποντίκια	77
2.17 Ανοσοϊστοχημεία σε τομές παραφίνης	78
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	81
3.1 Επιλογή και εγκαθίδρυση ενός ισογονιδιακού σύστηματος μελέτης των μεταλλάξ	εων του
γονιδίου ΡΙΚ3CΑ σε καρκινικές κυτταρικές σειρές του παχέος εντέρου	81
3.1.1 Επαλήθευση του γενετικού προφίλ των τροποποιημένων κυτταρικών σειρών DLD1 (WT κ και HCT116 (WT και MUT)	caι MUT) 83
3.1.2 Επαλήθευση της αυζημένης φωσφορυλίωσης της ΑΚΤ στις MUT σειρές σε σύγκριση με τις	WT με ή 87
$\chi$ ωρις την επαγωγη με Επισερμικο Αυζητικο Παραγονία ΕΟΓ	
5.2 Οι μεταλλάζεις Η104/Κ και E545K 100 γονισιου <i>ΓΙ</i> Κ5CA μουμίζουν τη γονισιακή εκφ	so pony ng
3.3 Tay zorości wowskiew oblugatów zna awajowiegana zow orości n istowarzy zoorozola	
	1101 0115 05
$3.4$ H values or $600$ m CVCL5 encodes as $600$ m $^{2}$ $6$ and $6$ and $70$ m $^{2}$ $6$ m $^{2}$	
5.4. If $\chi_{ij}$ resolution of the second of the second of the second of the second s	3η μο3χο 00
3.5 Η πρωτεϊνική κινάση σερίνης Αρερνίνης ΑΚΤΙ ουθμίζει την έκωραση της CYCL5 στα	
סו DI D1	104 NOTE
3.6 Γονιδιακή αποσιώπηση της CXCL5 στην κυτταοική σειοά DLD1 MUT με το σύστημα (	RISPR-
3.7 Μελέτη των επιπτώσεων της γονιδιακής αποσιώπησης της CXCL5 στα DLD1 MUT κύ	τταρα <i>in</i>
vitro	, 109
3.7.1 Η CXCL5 επηρεάζει την ανάπτυξη των DLD1 MUT κυττάρων, την ικανότητα εισβολής	ς τους σε
υπόστρωμα Matrigel αλλά δεν επιδρά στη μεταναστευτική τους ικανότητα	110
3.7.2 Η CXCL5 επηρεάζει τη βλαστικότητα των κυττάρων DLD1 MUT	
3.8 Μελέτη της δράσης της γημειοκίνης CXCL5 σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα in vitre	
	116 115 0 <b>116</b>
3.8.1 Η εκκρινομενή CXCLS απο τα κυτταρα DLD1 MU1 επαγεί τον πολλαπλασιασμο των ενδου κυττάρων HUVEC	115 9115 9ηλιακών 117
3.8.1 Η εκκρινομενη CXCL5 απο τα κυτταρα DLD1 MU1 επαγει τον πολλαπλασιασμο των ενδου κυττάρων HUVEC	115 9115 9ηλιακών 117 5 δικτύου
3.8.1 Η εκκρινομενη CXCLS απο τα κυτταρα DLD1 MU1 επαγει τον πολλαπλασιασμο των ενδου κυττάρων HUVEC 3.8.2 Η εκκρινόμενη CXCL5 από τα κύτταρα DLD1 MUT επάγει το σχηματισμό αγγειακού κυττάρων HUVEC σε τρισδιάστατες καλλιέργειες Matrigel	115 <b>9115</b> 9 <b>116</b> θηλιακών 
<ul> <li>3.8.1 Η εκκρινομενη CXCLS απο τα κυτταρα DLD1 MU1 επαγεί τον πολλαπλασιασμο των ενδοί κυττάρων HUVEC</li></ul>	110 115 9115 9115 9115 9117 δ δικτύου 118 9
<ul> <li>3.8.1 Η εκκρινομενη CXCLS απο τα κυτταρα DLD1 MU1 επαγεί τον πολλαπλασιασμο των ενδού κυττάρων HUVEC</li></ul>	110 115 9115 9115 9
<ul> <li>3.8.1 Η εκκρινομενη CXCLS απο τα κυτταρα DLD1 MUT επαγεί τον πολλαπλασιασμο των ενδού κυττάρων HUVEC</li> <li>3.8.2 Η εκκρινόμενη CXCL5 από τα κύτταρα DLD1 MUT επάγει το σχηματισμό αγγειακού κυττάρων HUVEC σε τρισδιάστατες καλλιέργειες Matrigel</li> <li>3.9 Μελέτη του ρόλου της CXCL5 στην αγγειογενετική και μεταστατική ικανότητα τω MUT κυττάρων in vivo σε ποντίκια</li> <li>3.9.1 Η CXCL5 επάγει το σχηματισμό αγγείων σε όνκους που πορήλθαν από DLD1 MUT κύ</li> </ul>	115 9115 9115 9115 9118 9118 9120 9120 9120
<ul> <li>3.8.1 Η εκκρινομενη CXCL5 απο τα κυτταρα DLD1 MUT επαγεί τον πολλαπλασιασμο των ενδού κυττάρων HUVEC</li></ul>	110 115 9115 9115 9116 θηλιακών 117 ό δικτύου 117 ό δικτύου 118 <b>DLD1</b> 120 δτταρα σε 121
<ul> <li>3.8.1 Η εκκρινομενη CXCLS απο τα κυτταρα DLD1 MUT επαγεί τον πολλαπλασίασμο των ενδού κυττάρων HUVEC</li></ul>	110 115 9115 9115 9116 θηλιακών 117 ό δικτύου 117 ό δικτύου 118 <b>DV DLD1</b> 120 δτταρα σε 121
<ul> <li>3.8.1 Η εκκρινομενη CXCLS απο τα κυτταρα DLD1 MUT επαγεί τον πολλαπλασίασμο των ενδού κυττάρων HUVEC</li></ul>	115 9115 9115 9115 9115 9117 5117 5117 5120 5121 
<ul> <li>3.8.1 Η εκκρινομενη CXCLS απο τα κυτταρα DLD1 MUT επαγεί τον πολλαπλασίασμο των ενδού κυττάρων HUVEC</li></ul>	115 9115 9115 9115 9117 5. δικτύου 117 5. δικτύου 117 5. δικτύου 117 5. δικτύου 120 5. δικτάρα σε 121 126 
<ul> <li>3.8.1 Η εκκρινομενη CXCLS απο τα κυτταρα DLD1 MUT επαγει τον πολλαπλασιασμο των ενοου κυττάρων HUVEC</li></ul>	110 115 9115 9 ηλιακών 117 5 δικτύου 117 5 δικτύου 117 117 5 δικτύου 117 117 5 δικτύου 117 117 5 δικτύου 117 117 5 δικτύου 118 120 120 126 126 126 126 126 126 

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AAV Adeno Associated Virus

**AKT/PKB** Protein Kinase B

- Ang1 Angiopoietin 1
- APC Adenomatous Polyposis Coli
- ASRi Age-Standardized Incidence Rate
- ATP Adenosine Triphosphate
- Bcl2 B-cell lymphoma 2

BIM Bcl-2 Interacting Mediator of cell death

**CIMP** CpG Island Methylator Phenotype

CIN Chromosomal Instability

CRC Colorectal Cancer

CRISPR Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

CSCs Cancer Stem Cells

ECM Extracellular Matrix

EGF/EGFR Epidermam Growth Factor/ EGF Receptor

EGR-1 Early Growth Response Protein 1

EMT Epithelial Mesenchymal Transition

ERK1/2 Extracellular signal–Regulated Kinases 1/2

FBS Fetal Bovine Serum

FDA Food and Drug Administration

FGF Fibroblast Growth Factor

FOXO1 Forkhead Box Protein O1

GPCR G Protein Coupled Receptor

**GSK3** $\beta$  Glycogen Synthase Kinase 3  $\beta$ 

GTP Guanosine Triphosphate

HGF Hepatocyte Growth Factor

HIF1 $\alpha$  Hypoxia Inducible Factor  $1\alpha$ 

HUVEC Human Umbilical Vein Endothelial Cell

**IFP** Interstitial Fluid Pressure

IKK IkB Kinase

- **IL8** Interleukin 8
- MAPK Mitogen-Activated Protein Kinase
- MDM2 Mouse Double Minute 2 homolog
- MDSCs Myeloid derived suppressor cells
- MMPs Matrix Metalloproteinases
- MMR Mismatch Repair
- MSI Microsatellite Instability
- mTOR Mammalian Target Of Rapamycin
- mTORC1/mTORC2 Mammalian Target Of Rapamycin Complex 1/2
- **NFκB** Nuclear Factor κB
- **OS** Overall Survival
- **PBS** Phosphate Buffered Saline
- PDGF Platelet-Derived Growth Factor
- **PDGFRβ** Platelet-Derived Growth Factor Receptor-β
- PDK1 Pyruvate Dehydrogenase lipoamide Kinase isozyme 1
- **PI3K** PhosphatIdylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase
- PIK3CA PhosphatidylInositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase Catalytic subunit Alpha
- PIP2 Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
- **PIP3** Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
- PKC Protein Kinase C
- PtdIns Phosphatidylinositols
- **PTEN** Phosphatase and Tensin Homolog
- PTP1B Protein-Tyrosine Phosphatase 1B
- qRT-PCR Quantitative Reverse Transcription PCR
- **RHEB** RAS Homologue Enriched in Brain
- **RON/MST1R** Recepteur d'Origine Nantais/Macrophage-Stimulating Protein Receptor
- **RTKs** Receptor Tyrosine Kinases
- **RT-PCR** Reverse Transcription-Polymerese Chain Reaction
- **SDF-1** Stromal cell-Derived Factor 1
- SDS Sodium Dodecyl Sulfate
- SGK Serum/Glucocorticoid Kinase
- STAT1 Signal Transducer and Activator of Transcription 1

TFA Tumorsphere Formation Assay

**TGF-\beta** Transforming Growth Factor- $\beta$ 

TNFa Tumor Necrosis Factor Alpha

TSC Tuberous Sclerosis Complex

**uPA** urokinase-type Plasminogen Activator

**VEGF/VEGFR** Vascular Endothelial Growth Factor/VEGF Receptor

## 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### **<u>1.1 Ο καρκίνος του παχέος εντέρου</u>**

#### 1.1.1 Γενικά και επιδημιολογικά στοιχεία

Η ασθένεια του καρκίνου συνεχίζει να αποτελεί μια από τις κύριες αιτίες θανάτου παγκοσμίως και παρόλη την ανάπτυξη νέων μεθόδων διάγνωσης και θεραπείας οι οποίες έχουν αυξήσει το προσδόκιμο ζωής σε άλλες ασθένειες, η θνητότητα από καρκίνο έχει αυξηθεί στο 40% τα τελευταία σαράντα χρόνια. Ο καρκίνος του παχέος εντέρου ή ορθοκολικός καρκίνος (Colorectal Cancer, CRC) αποτελεί έναν τύπο κακοήθους εξαλλαγής που εντοπίζεται στο παχύ έντερο ή το ορθό. Ενώ το 1950 ο καρκίνος του παχέος εντέρου θεωρούταν σπάνιος, πλέον αποτελεί έναν ιδιαίτερα συχνό τύπο καρκίνου στις χώρες της Δύσης και ευθύνεται για το 10% των θανάτων από καρκίνο (1). Συγκεκριμένα το 2013, 771.000 άνθρωποι πέθαναν από καρκίνο του παχέος εντέρου παγκοσμίως, καθιστώντας την ασθένεια την πιο κοινή αιτία θανάτου μετά τους καρκίνους του πνεύμονα, του ήπατος και του στομάχου (2). Αυτή η «άνοδος» του καρκίνου του παχέος εντέρου στις ανεπτυγμένες χώρες μπορεί να αποδοθεί στην όλο και μεγαλύτερη γήρανση του πληθυσμού, στις σύγχρονες διατροφικές συνήθειες και στην αύξηση παραγόντων κινδύνου όπως το κάπνισμα, η έλλειψη σωματικής άσκησης και η παχυσαρκία.

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί το δέυτερο πιο συχνό τύπο καρκίνου στις γυναίκες και τον τρίτο πιο συχνό στους άντρες. Ειδικότερα, ο αριθμός νέων περιπτώσεων ανά 100.000 άτομα, ανά έτος, για όλες τις ηλικίες (Age-Standardized Incidence Rate, ASRi) στους άνδρες (ASRi 20.6) είναι υψηλότερο σε σχέση με τις γυναίκες (ASRi 14.3). Επίσης, η συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας ποικίλλει γεωγραφικά, με τα υψηλότερα ποσοστά να εμφανίζονται στη Βόρεια Αμερική, την Αυστραλία, τη Νέα Ζηλανδία και την Ευρώπη (ASRi >40) και τα χαμηλότερα στην Αφρική και την Ασία (ASRi <5) (3). Το μεγαλύτερο ποσοστό των καρκίνων του παχέος εντέρου (περίπου στο 60%-70%) είναι σποραδικοί χωρίς οικογενειακό ιστορικό και η πλειοψηφία των ασθενών με σποραδικό καρκίνο του παχέος εντέρου είναι άνω των 50 ετών. Ένα μικρό ποσοστό (2%-5%) αποτελούν οι κληρονομικοί τύποι καρκίνου του παχέος εντέρου οι συχνότεροι από τους οποίους είναι το Σύνδρομο Lynch (Herediatry Non Polyposis Colorectal Cancer, HNPCC) και η οικογενής αδενωματώδης πολυποδίαση (Familial Adenomatous Polyposis, FAP) (3)(4).

### 1.1.2 Μοριακοί μηχανισμοί της καρκινογένεσης στο παχύ έντερο

Η απώλεια της γενετικής σταθερότητας στα φυσιολογικά κύτταρα αποτελεί ένα κρίσιμο γεγονός το οποίο μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη καρκίνου του παχέος εντέρου. Στην ασθένεια αυτή, η γενετική αστάθεια μπορεί να προκύψει από ένα συνδυασμό μηγανισμών όπως η χρωμοσωμική αστάθεια (Chromosomal instability, CIN), η μικροδορυφορική αστάθεια (Microsatellite instability, MSI) και ο φαινότυπος μεθυλίωσης των νησίδων CpG (CpG island methylator phenotype, CIMP) (5)(6). Συγκεκριμένα, η CIN προκαλεί πολλαπλές αλλαγές στον αριθμό και τη δομή των χρωμοσωμάτων (ανευπλοϊδία) (7)(8). Ελαττωματικές διαδικασίες όπως ο χρωμοσωμικός διαχωρισμός, η αποκατάσταση βλαβών στο DNA, η λειτουργία των τελομερών σε συνδυασμό με έναν μεγάλο αριθμό μεταλλάξεων μπορούν να οδηγήσουν στην CIN. Ο επόμενος μηχανισμός ο οποίος συμβάλλει στην γενετική αστάθεια είναι η MSI η οποία συμβαίνει λόγω μεταλλάξεων σε γονίδια τα οποία συμμετέχουν στους μηγανισμούς επιδιόρθωσης βλαβών κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του DNA. Τέτοια γονίδια κωδικοποιούν ένζυμα όπως για παράδειγμα οι ATPases hMSH2, hMSH6, hMSH3, hMLH1, και hMLH3 οι οποίες συμμετέχουν στο μηχανισμό επιδιόρθωσης λαθών της μιας αλυσίδας του DNA (Mismatch Repair, MMR) (9)(10). Επίσης, η ανώμαλη μεθυλίωση του DNA και η επαγόμενη γονιδιακή αποσιώπηση αποτελεί ένα κοινό επιγενετικό μηχανισμό στον καρκίνο (11). Ειδικότερα στον καρκίνο του παχέος εντέρου, η υπερμεθυλίωση στην περιοχή υποκινητών που περιέχουν νησίδες CpG (12) έχει ως αποτέλεσμα τη μεταφραστική απενεργοποίηση πολλών ογκοκατασταλτικών γονιδίων (11)(13). Για παράδειγμα η υπερμεθυλίωση υποκινητών των γονιδίων όπως τα MLH1, IGFBP7 και CDKN2A χαρακτηρίζουν καρκίνους του παχέος εντέρου με μικροδορυφορική αστάθεια (14)(15)(16).

Η γενετική και επιγενετική αστάθεια που προκύπτει από τους παραπάνω μηχανισμούς, επιταχύνει τη συσσώρευση μεταλλάξεων και επιγενετικών τροποποιήσεων σε ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια οδηγώντας στον κακοήθη μετασχηματισμό των φυσιολογικών κυττάρων και στην ανάπτυξη ενός όγκου μέσω της κλωνικής

10

επέκτασης των κυττάρων με την πιο επιθετική και κακοήθη συμπεριφορά. Το 1990 οι Fearon και Vogelstein περιέγραψαν τη μοριακή βάση ανάπτυξης του καρκίνου του παχέος εντέρου ως μια διαδικασία πολλαπλών βημάτων που μπορεί να διαρκέσει έως και 10 χρόνια κατά την οποία τα γενετικά συμβάντα προσφέρουν πλεονέκτημα ανάπτυξης στα επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου και οι μεταγενέστερες μελέτες επιβεβαίωσαν και ενίσχυσαν την υπόθεση αυτή (17). Τα τελευταία χρόνια έχει περιγραφεί η προέλευση των καρκίνων του παχέος εντέρου από ένα βλαστικό κύτταρο ή ένα κύτταρο με χαρακτηριστικά βλαστικού κυττάρου το οποίο εντοπίζεται στη βάση των κρυπτών του παχέος εντέρου χωρίς να αποκλείεται η έναρξη του κακοήθους μετασχηματισμού από ένα φυσιολογικό διαφοροποιημένο κύτταρο της κρύπτης (18). Όπως έχουν δείξει πολλές μελέτες, το επιθήλιο του παχέος εντέρου χαρακτηρίζεται από μεγάλη πλαστικότητα. Συγκεκριμένα, στη δομή των κρυπτών δεν εντοπίζεται ένας μονήρης διακριτός πληθυσμός βλαστικών κυττάρων, αλλά ακόμα και μη βλαστικά κύτταρα μπορούν να διαμορφώσουν φαινότυπο πολυδυναμίας (myltipotency) και αυτοανανέωσης με σκοπό την ανάπλαση του επιθηλίου, ενω τα κύτταρα τα οποία βρίσκονται στο κέντρο της κρύπτης φαίνεται να έχουν αυξημένη ικανότητα αυτοανανέωσης σε σχέση με αυτά της περιφέρειας (19).

Επί του παρόντος, έχουν περιγραφεί δύο πορείες εξέλιξης των κυττάρων του φυσιολογικού αδενικού επιθηλίου σε καρκίνωμα οι οποίες περιγράφονται στην Εικόνα 1. Και οι δύο πορείες περιλαμβάνουν την ανάπτυξη μιας ανώμαλης εστίας στην κρύπτη (aberrant crypt foci) σε πρώιμους ή ανεπτυγμένους πολύποδες και ακολούθως σε αρχικού ή προχωρημένου σταδίου καρκινώματα. Στην πρώτη ή αλλιώς «κλασσική» πορεία, παρατηρείται η ανάπτυξη ενός πολύποδα σε πρώιμο αδένωμα (<1cm με σωληνώδη ιστολογία) και τέλος σε ανεπτυγμένο αδένωμα (>1cm με ή χωρίς σωληνώδη ιστολογία) πρίν την κακοήθη μορφή. Στη δεύτερη περίπτωση αναπτύσσεται ένας τύπος πολύποδα (αποτελεί το 5-10% των εμφανιζόμενων πολυπόδων) με διαφορετικά μορφολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά από τα σωληνώδη αδενώματα ο οποίος ονομάστηκε επίπεδος οδοντωτός πολύποδας (sessile serated polyp or adenoma) και περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1990 (20)(21). Όπως έχει δειχθεί τα τελευταία 10 χρόνια ο επίπεδος οδοντωτός πολύποδα, του επίπεδου οδοντωτού αδενώματος και τέλος του αδενοκαρκινώματος (22).

11

Σύμφωνα με την Εικόνα 1, στις δύο πορείες που περιγράφηκαν εντοπίζονται κοινές μεταλλάξεις και επιγενετικές αλλαγές αλλά και κάποιες μοναδικές για κάθε πορεία. Πιο συγκεκριμένα, στην «κλασσική» πορεία της καρκινογένεσης του παγέος εντέρου αρχικό γεγονός αποτελεί η απενεργοποίηση του γονιδίου ΑΡC μέσω σωματικών μεταλλάξεων η οποία ακολουθείται από τη συσσώρευση μεταλλάξεων γονιδίων-ελέγχου όπως NRAS, KRAS, SMAD4, TP53 και η πορεία αυτών των γεγονότων οδηγεί σε ανάπτυξη αδενοκαρκινωμάτων με CIN. Το γονίδιο APC (Adenomatosis Polyposis Coli) αποτελεί το πιο συχνά μεταλλασσόμενο γονίδιο στον καρκίνο του παχέος εντέρου και η απενεργοποίησή του οδηγεί σε συνεχή ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt. Σωματικές μεταλλάξεις του γονιδίου APC εντοπίζονται στο 80% των σποραδικών καρκίνων του παχέος εντέρου καθώς και μεταλλάξεις βλαστικής σειράς (germline mutations) στο APC προκαλούν οικογενή αδενωματώδη πολυποδίαση. Από την άλλη πλευρά, στη πορεία σχηματισμού των οδοντωτών αδενωμάτων, αρχικά γεγονότα αποτελούν η μετάλλαξη του γονιδίου CTNNB1 αλλά και οι μεταλλάξεις του γονιδίου BRAF που ακολουθούνται από αυξημένο φαινότυπο μεθυλίωσης CIMP και αυξημένη MSI. Ομοίως, και στην πορεία αυτή εμπλέκονται μεταλλάξεις κύριων γονιδίων όπως τα KRAS, PIK3CA, TGFBR2.

Η ετερογένεια μεταξύ των μεταλλάξεων των παραπάνω γονιδίων είναι ιδιαίτερα έντονη μεταξύ των όγκων του παχέος εντέρου. Εντούτοις, τα γονίδια τα οποία παρουσιάζουν τις πιο συχνές μεταλλάξεις μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως προς τα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία εμπλέκονται. Έτσι, οι πιο κοινές μεταλλάξεις περιλαμβάνουν εκείνες των γονιδίων APC, CTNNB1, LRP5, FZD10, FAM123B τα οποία εμπλέκονται στο μονοπάτι WNT, των γονιδίων KRAS, NRAS, BRAF, ERBB2, ERBB3 τα οποία εμπλέκονται στο μονοπάτι των MAP κινασών, των γονιδίων PTEN, PIK3CA τα οποία εμπλέκονται στο μονοπάτι της PI3K κινάσης, των γονιδίων TGFBR2, SMAD4 τα οποία εμπλέκονται στο μονοπάτι του αυξητικού παράγοντα TGFβ και του γονιδίου TP53 το οποίο εμπλέκεται στην ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων-στόχων τα οποία εμπλέκονται στο καρκίνου, στην επιδιόρθωση του DNA και στην απόπτωση. Κατά τα αρχικά στάδια του καρκίνου του παχέος εντέρου εντοπίζονται μεταλλάξεις που επηρεάζουν το σηματοδοτικό μονοπατιών στα νεοπλασματικά κύτταρα.



Nature Reviews | Disease Primers

Εικόνα 1. Η πορεία της καρκινογένεσης στο παχύ έντερο. Α. Η πορεία εξέλιξης αδενώματος σε καρκίνωμα. Στην «κλασσική» πορεία της καρκινογένεσης του παχέος εντέρου αρχικό γεγονός αποτελεί η απενεργοποίηση του γονιδίου APC μέσω σωματικών μεταλλάξεων η οποία ακολουθείται από τη συσσώρευση μεταλλάξεων γονιδίων-ελέγχου όπως τα NRAS, KRAS, SMAD4, TP53 και η πορεία αυτών των γεγονότων οδηγεί σε ανάπτυξη αδενοκαρκινωμάτων με χρωμοσωμική αστάθεια (Chromosomal instability, CIN) και μικροδορυφορική αστάθεια (Microsatellite instability, MSI), όπως στην περίπτωση του συνδρόμου Lynch. **B.** Η πορεία εξέλιξης οδοντωτού πολύποδα (Serrated polyp) σε καρκίνωμα. Στην πορεία σχηματισμού των οδοντωτών αδενωμάτων, αρχικά γεγονότα αποτελούν η μετάλλαξη του γονιδίου CTNNB1 αλλά και οι μεταλλάξεις του γονιδίου BRAF που ακολουθούνται από αυξημένο φαινότυπο μεθυλίωσης CpG (CpG island methylator phenotype, CIMP) και αυξημένη MSI. Στην πορεία αυτή εμπλέκονται απορούα όπως τα KRAS, PIK3CA, TGFBR2. Στα πλαίσια απεικονίζονται τα σηματοδικά μονοπάτια (και τα μεταλλασόμενα γονίδια που εμπλέκονται στο καθένα) τα οποία απορρυθμίζονται και στις δύο πορείες και το πλάτος του βέλους αντανακλά τη σημαντικότητα του κάθε μονοπατιού στο σχηματισμό του όγκου. (Kuipers et al. 2015) (3)

## 1.1.3 Οι θεραπευτικές προσεγγίσεις στον καρκίνο του παχέος εντέρου

Η θεραπευτική προσέγγιση για την αντιμετώπιση του καρκίνου του παχέος εντέρου εξαρτάται από το κλινικό στάδιο του καρκίνου, από τα μοριακά (γενετικά) χαρακτηριστικά του καθώς και από τους πιθανούς κινδύνους της θεραπείας για τον ασθενή. Επί του παρόντος η θεραπεία του καρκίνου του παχέος εντέρου περιλαμβάνει συνδυασμό παρεμβάσεων είτε με τοπική αντιμετώπιση μέσω χειρουργικής επέμβασης ή ακτινοθεραπείας αλλά και με συστηματική αντιμετώπιση μέσω χορήγησης χημειοθεραπευτικών φαρμάκων ή και στοχευτικών παραγόντων. Τα κύρια χημειοθεραπευτικά που χρησιμοποιούνται ευρέως στον καρκίνο του παχέος εντέρου ονομάζονται φθοριοπυριμιδίνες (όπως η 5-fluorouracil, 5-FU) και είναι κατά βάση αντιμιτωτικά φάρμακα τα οποία χαρακτηρίζονται από αδυναμία στόχευσης και συνεπώς οδηγούν σε σημαντικές παρενέργειες. Η εισαγωγή της στοχευμένης θεραπείας (Targeted therapy) στη κλινική πράξη για την αντιμετώπιση του καρκίνου του παγέος εντέρου πραγματοποιήθηκε μετά την έγκριση της χρήσης μονοκλωνικών αντισωμάτων (και αναστολέων) τα οποία είναι σχεδιασμένα έναντι κύριων μορίων της σηματοδότησης των καρκινικών κυττάρων που ρυθμίζουν διαδικασίες όπως η κυτταρική ανάπτυξη και η αγγειογένεση. Για παράδειγμα κάποια από τα στοχευμένα φάρμακα που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία του καρκίνου του παχέος εντέρου είναι το αντίσωμα που στοχεύει τον αγγειογενετικό παράγοντα VEGF (Bevacizumab) και το αντίσωμα έναντι του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGFR (Cetuximab) (https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/treating/targeted-therapy.html.). Ο ρόλος της θεραπείας με αντιαγγειογενετικούς παράγοντες στον καρκίνο του παχέος εντέρου αναλύεται στο κεφάλαιο 1.3.2. Η στοχευμένη θεραπεία χρησιμοποιείται πλέον είτε ως μονοθεραπεία είτε σε συνδυασμό με τη χημειοθεραπεία. Το επόμενο βήμα στη θεραπεία του καρκίνου του παχέος εντέρου πραγματοποιήθηκε με την ανοσοθεραπεία. Η ανάπτυξη των ανοσοθεραπειών αντικατοπτρίζει μια πολλά υποσχόμενη νέα προσέγγιση στη θεραπεία του καρκίνου που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος ενάντια στον καρκίνο. Η ύπαρξη πρωτεϊνών στα Τ λεμφοκύτταρα οι οποίες λειτουργούν ως σημεία ελέγχου (immune checkpoints) αλληλεπιδρώντας με τα καρκινικά κύτταρα και οδηγώντας στη καταστολή της ανοσολογικής απόκρισης έναντι σε αυτά, αποτελεί τη βάση της ανοσοθεραπείας (23). Έτσι, υπάρχουν διαθέσιμα και χρησιμοποιούνται και για τη θεραπεία του προχωρημένου καρκίνου του παχέος εντέρου μονοκλωνικά αντισώματα που στοχεύουν τέτοιες πρωτεΐνες, δρώντας ως αναστολείς των σημείων ελέγχου (immune checkpoint inhibitors) όπως είναι οι αντι-PD1 αναστολείς (Nivolumab) και οι αντι-CTL4 αναστολείς (Ipilimumab).

### 1.2 Ο ρόλος της ΡΙ3Κ στον καρκίνο του παγέος εντέρου

#### 1.2.1. Η δομή των PI3Ks

Οι κινάσες PI3Ks αποτελούν μια οικογένεια ενζύμων τα οποία φωσφορυλιώνουν τη φωσφατίδυλοϊνοσιτόλες (PtdIns) και τα φωσφορυλιωμένα παράγωγα αυτών στη 3' περιοχή του δακτυλίου ινοσιτόλης δημιουργώντας δεύτερους αγγελιαφόρους που ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κυτταρική επιβίωση, την κινητικότητα και τη μορφολογία (24). Οι PI3Ks είναι διμερή λιπιδικά ένζυμα τα οποία αποτελούνται από μια ρυθμιστική και μια καταλυτική υπομονάδα οι οποίες κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια. Η οικογένεια των PI3Ks χωρίζεται σε τρείς κατηγορίες, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 2, οι οποίες διαφέρουν ως προς τη δομή, την ειδικότητα του υποστρώματος, την ιστική κατανομή, το μηχανισμό ενεργοποίησης και κατ'επέκταση τη λειτουργία (25)(26)(27). Η εργασία εστιάζεται στις PI3Ks της κλάσης Ι, και ειδικότερα της κλάσης ΙΑ οι οποίες έχουν μελετηθεί εκτενώς και έχει δειχθεί ο καίριος ρόλος τους στην ανάπτυξη και την πρόοδο πολλών τύπων καρκίνου συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του παχέος εντέρου. Στις PI3Ks της κλάσης Ι, σε απόκριση ανοδικών σημάτων η ρυθμιστική υπομονάδα συνδέει την καταλυτική υπομονάδα με υποδοχείς τυροσινικών κινασών (Receptor tyrosine kinases, RTKs) ή υποδοχείς που συνδέονται σε G πρωτεΐνες (G-protein coupled receptors, GPCRs) ενεργοποιώντας την κινάση, ενώ απουσία σημάτων η ρυθμιστική υπομονάδα σταθεροποιεί την καταλυτική απενεργοποιώντας την ενζυματική της δραστικότητα. Οι PI3Ks των ΙΑ και ΙΒ διαφοροποιούνται ως προς τον τρόπο ρύθμισής τους. Συγκεκριμένα, οι PI3Ks IA ενεργοποιούνται κατά κύριο λόγο από υποδοχείς τυροσινικών κινασών και πρωτεΐνες Ras, ενώ οι PI3K IB ενεργοποιούνται κυρίως από υποδοχείς που συνδέονται σε G πρωτεΐνες. Τα ετεροδιμερή της κλάσης ΙΑ αποτελούνται από την καταλυτική υπομονάδα p110 και τη ρυθμιστική υπομονάδα p85. Τα γονίδια PIK3CA, PIK3CB και PIK3CD κωδικοποιούν τις υψηλής ομολογίας καταλυτικές υπομονάδες p110a, p110β και p110δ αντίστοιγα οι οποίες αλληλεπιδρούν με οποιαδήποτε από τις πέντε ρυθμιστικές περιοχές p85a (και τις p55a, p50 οι οποίες προήλθαν από εναλλακτικό μάτισμα και κωδικοποιούνται από το γονίδιο PIK3R1), p85β (κωδικοποιείται από το γονίδιο PIK3R2) και p55γ (κωδικοποείται από το γονίδιο PIK3R3). Στην κλάση IB τα ετεροδιμερή αποτελούνται από την καταλυτική υπομονάδα p110γ (κωδικοποιείται από το γονίδιο *PIK3CG*) η οποία αλληλεπιδρά με τις ρυθμιστικές υπομονάδες p101 (κωδικοποιείται από το γονίδιο *PIK3R5*) και p87 (κωδικοποιείται από το γονίδιο *PIK3R6*) (27).

Η καταλυτική υπομονάδα p110a αποτελείται από την περιοχή πρόσδεσης της ρυθμιστικής υπομονάδας (Adaptor binding domain, ABD), την περιοχή σύνδεσης της πρωτεΐνης Ras (Ras binding domain, RBD), τη δομική περιοχή C2 (protein-kinase-C homology-2) η οποία βοηθά στην πρόσδεση της υπομονάδας στη μεμβράνη, την περιοχή έλικας (helical domain) με μη διευκρινισμένο ρόλο και την καταλυτική περιοχή με ενεργότητα κινάσης (kinase domain) (28). Από την άλλη πλευρά η ρυθμιστική περιοχή p85α αποτελείται από την περιοχή SH3 (Src Homology 3 domain) η οποία αλληλεπιδρά με προσδέτες πλούσιους σε προλίνη, την περιοχή BH (Breakpoint clustered homology) (μέσω της οποίας αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες της οικογένειας Rho όπως η Cdc42 και η Rac1), την SH2 (Src Homology 2 domain) περιοχή στο Ν τελικό άκρο (nSH2), την SH2 περιοχή στο C-τελικό άκρο (cSH2) και την iSH2 (inter SH2) περιοχή η οποία βρίσκεται μεταξύ των άλλων δύο SH2 περιοχών. Οι περιοχές nSH2 και cSH2 αναγνωρίζουν μοτίβα φωσφορυλιωμένων καταλοίπων τυροσίνης pYxxM σε ενεργοποιημένους υποδοχείς και επάγουν την ενεργοποίηση του ετεροδιμερούς συμπλόκου της PI3K. Η iSH2 είναι η κύρια περιοχή που αλληλεπιδρά με την καταλυτική υπομονάδα p110α μέσω σύνδεσης στην περιοχή ABD, αλλά η αλληλεπίδραση αυτή δεν εμπλέκεται στη ρύθμιση της δραστικότητας του ενζύμου (29). Αντίθετα, έχει βρεθεί οτι η iSH2 περιοχή αλληλεπιδρά με την C2 περιοχή της p110 υπομονάδας αναστέλλοντας την δραστικότητα του ενζύμου. Ανασταλτική δράση παρουσιάζουν επίσης και οι αλληλεπιδράσεις της nSH2 περιογής με την p110a στις περιοχές C2, έλικας και κινάσης (30).

Οι αλληλεπιδράσεις των δομικών περιοχών της καταλυτικής και ρυθμιστικής υπομονάδας είναι ιδιαίτερα πολύπλοκες και καθοριστικές για την ενεργοποίηση ή την απενεργοποίηση της ενζυματικής δραστικότητας της κινάσης. Πειράματα φασματομετρίας μάζας έχουν δείξει ότι υπάρχουν τέσσερις βασικές στερεοχημικές αλλαγές μεταξύ των p110a/p85a οι οποίες πραγματοποιούνται κατά την ενεργοποίση της PI3K. Οι αλλαγές αυτές περιλαμβάνουν τη διακοπή της αλληλεπίδρασης των περιοχών nSH2-περιοχή έλικας, των περιοχών iSH2-C2, τη μετακίνηση της περιοχής ABD της p110α προς την περιοχή ενεργότητας κινάσης και τέλος την αλληλεπίδραση της περιοχή ενεργότητας κινάσης με λιπίδιο (31).



Εικόνα 2. Ταξινόμηση και δομή των PI3Ks. Οι PI3Ks χωρίζονται σε τρείς κατηγορίες (Class I-III) ανάλογα με τα δομικά και τα λειτουργικά τους χαρακτηριστικά. Σε όλες τις κατηγορίες οι PI3Ks αποτελούνται από μια καταλυτική (Catalytic) και μια ρυθμιστική (Regulatory) υπομονάδα, εκτός από τις PI3Ks της κλάσης ΙΙ οι οποίες δεν διαθέτουν ρυθμιστικές υπομονάδες αλλά έχουν αμινο- και καρβοξυ- τελικά άκρα που θα μπορούσαν να μεσολαβούν για πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Η δομή των καταλυτικών και ρυθμιστικών υπομονάδων παρουσιάζονται στο δεξιό μέρος της εικόνας, όπου φαίνεται ότι όλες οι καταλυτικές υπομονάδες έχουν μια καταλυτική περιοχή που αποτελείται από την περιοχή C2, μια περιοχή έλικας (Helical domain) και μια καταλυτική περιοχή (Catalytic domain). Επίσης, στο αριστερό μέρος παρουσιάζονται τα υποστρώματα των PI3Ks της κάθε κατηγορίας. (*Thorpe et al.,2014*) (27)

## 1.2.2 Η επαγωγή σήματος από τις ΡΙ3Κ κινάσες κλάσης ΙΑ

Η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού άξονα των PI3Ks IA επάγεται μετά τη διέγερση των RTK υποδοχέων και του επακόλουθου σχηματισμού συμπλόκου RTK-PI3K. Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 3 (32), όταν τα κύτταρα βρίσκονται σε ηρεμία, η υπομονάδα p85 προσδένεται στην p110α απενεργοποιώντας τη δραστικότητα κινάσης, ενώ μετά την επαγωγή με αυξητικούς παράγοντες, οι περιοχές SH2 της p85 προσδένονται σε φωσφορυλιωμένες τυροσίνες στα μοτίβα ΥΧΧΜ των υποδοχέων τυροσινικών κινασών αναστέλλοντας την απενεργοποίηση της p110α η οποία μετακινείται προς την πλασματική μεμβράνη (33). Σε κάποιες περιπτώσεις, η αλληλεπίδραση της p85 υπομονάδας με τους RTKs είναι έμμεση και μεσολαβείται από φωσφοπρωτεΐνες όπως το υπόστρωμα υποδοχέων ινσουλίνης (insoulin receptor substrates) IRS1 και IRS2. Η ενζυματική δραστικότητα της PI3K αυξάνεται περαιτέρω μέσω της αλληλεπίδρασης της καταλυτικής υπομονάδας p110a με την ενεργή πρωτεΐνη Ras-GTP (34). Μετά την ενεργοποίησή της, η p110a φωσφορυλιώνει την 4,5-διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PIP2) σε 3,4,5τριφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PIP3) η οποία με τη σειρά της στρατολογεί στην πλασματική μεμβράνη πρωτεΐνες που φέρουν περιοχή ομόλογη της πλεκστρίνης (Pleckstrin Homology domain, PH) (35) όπως η κινάση PDK1 και η κινάση σερίνης θρεονίνης AKT (ή PKB). Ιδιαίτερα σημαντική είναι η ρύθμιση των επιπέδων της PIP3 από τη φωσφατάση ΡΤΕΝ η οποία αποφωσφορυλιώνει την PIP3 σε PIP2 δρώντας αντίθετα από την PI3K. Τα καθοδικά μόρια PDK1 και ΑΚΤ αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και ειδικότερα η PDK1 φωσφορυλιώνει και εν μέρει ενεργοποιεί την ΑΚΤ στο κατάλοιπο Τ308 (36). Η πλήρης ενεργοποίηση της ΑΚΤ απαιτεί μια επιπλέον φωσφορυλίωση στο κατάλοιπο S473 από μια κινάση η οποία αποτέλεσε αντικείμενο έρευνας για πολλά χρόνια (γνωστή ως "PDK2") και πλέον οι περισσότερες μελέτες υποστηρίζουν ότι η φωσφορυλίωση αυτή επιτελείται από το πρωτεϊνικό σύμπλοκο mTORC2 (αποτελείται από τις υπομονάδες mTOR, Rictor, Gβl) (37). Ειδικότερα, μετά τη φωσφορυλίωση της ΑΚΤ στο κατάλοιπο Τ308, η ΑΚΤ φωσφορυλιώνει την υπομονάδα SIN1 του συμπλόκου mTORC2, ενισχύοντας την ενζυματική του δραστικότητα και οδηγώντας στη φωσφορυλίωση του καταλοίπου S473 της AKT (38).

Η ενεργοποίηση της ΑΚΤ οδηγεί στη ρύθμιση πρωτεϊνών οι οποίες ελέγχουν τη μεταγραφή και τη μετάφραση (39)(40). Κατά τη διάρκεια της μεταγραφής, η σηματοδότηση μέσω της ΑΚΤ διεγείρει την πρωτεϊνική σύνθεση ενεργοποιώντας τη

ριβοσωμική πρωτεΐνη S6 (ribosomal protein S6) και τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης 4E (translation initiation factor 4E). Η ενεργοποίηση αυτή είναι έμμεση και περιλαμβάνει και άλλα σηματοδοτικά μόρια όπως το σύμπλοκο TSC (TSC1 και TSC2), τη πρωτεΐνη RHEB και τη κινάση σερίνης θρεονίνης mTORC1 (απαρτίζεται από τις υπομονάδες mTOR, Raptor, Gβl (41). Επιπλέον, στους καθοδικούς στόχους του mTORC1 ανήκει ο μεταγραφικός παράγοντας HIF1α, ο οποίος ρυθμίζει γονίδια που εμπλέκονται στον κυτταρικό μεταβολισμό, στην κυτταρική επιβίωση και στον πολλαπλασιασμό αλλά και αγγειογενετικά γονίδια, με την επαγωγή του γονιδίου του VEGF να είναι η πιο αξιοσημείωτη (42)(43). Επιπροσθέτως, κατά τη διάρκεια της μετάφρασης η ΑΚΤ επηρεάζει τη δράση ενός μεγάλου αριθμού μεταγραφικών παραγόντων είτε άμεσα είτε έμμεσα. Άμεσοι στόχοι της ΑΚΤ αποτελούν οι μεταγραφικοί παράγοντες FOXO1 (ή FKHR), GSK3β και ο αναστολέας κυτταρικού κύκλου MIZ οι οποίοι αναστέλλονται μέσω της ΑΚΤ-εξαρτώμενης φωσφορυλίωσης (39)(44). Σημαντικοί στόχοι του FOXO1 είναι οι αναστολείς κυκλινο- εξαρτώμενων κινασών p27 και p21, οι κυκλίνες D1 και D2 και ο προ-αποπτωτικός παράγοντας BIM (Bcl-2 like 11). Σε κύτταρα τα οποία έχουν μετασχηματιστεί από ογκογόνο σηματοδότηση της PI3K/AKT, παρατηρείται μείωση του FOXO1 και αναστολή της ικανότητάς του να ρυθμίζει την κυτταρική ανάπτυξη. Επίσης, στόχοι της κινάσης GSK3β αποτελούν οι Jun, AP1, c-Myc, β-catenin, οι οποίες έχουν συσχετιστεί με ογκογόνο μετασχηματισμό. Η ΑΚΤ επιπροσθέτως απενεργοποιεί έμμεσα διάφορους προ-αποπτωτικούς παράγοντες, όπως το BAD και η Procaspase-9, ενεργοποιεί την κινάση ΙΚΚ η οποία φωσφορυλιώνει τον ΙκΒ (αναστολέας του NF-κB) με αποτέλεσμα την αποικοδόμησή του και τον εντοπισμό του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB στον πυρήνα (45)(46). Ο NF-κB ρυθμίζει θετικά διαδικασίες όπως η επιβίωση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η αγγειογένεση και η ογκογένεση. Επίσης η ΑΚΤ ρυθμίζει την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 μέσω του μεταγραφικού παράγοντα MDM2 (47).

Οι PI3K και η PIP3 εκτός από την ΑΚΤ μπορούν να ενεργοποιήσουν και άλλα σηματοδοτικά μόρια τα οποία εμπλέκονται σε διαδικασίες κρίσιμες για την ογκογένεση. Τέτοια μόρια αποτελούν οι πρωτεΐνες που προσδένουν GTP (small GTP binding proteins) CDC42 και RAC1, η κινάση SGK και PKC οι οποίες ρυθμίζονται ανεξάρτητα από την AKT. Οι CDC42 και RAC1 είναι γνωστό ότι συμμετέχουν στην αναδιάταξη του κυτταροσκελετού και της κυτταρικής κίνησης, ενώ οι κινάσες SGK και PKC ρυθμίζουν την κυτταρική επιβίωση και την κυτταρική διαφοροποίηση (48)(49).



Εικόνα 3. Το σηματοδοτικό μονοπάτι των PI3Ks της κλάσης IA. Μετά την επαγωγή με αυξητικούς παράγοντες, οι περιοχές SH2 της p85 προσδένονται άμεσα σε φωσφορυλιωμένες τυροσίνες των υποδοχέων τυροσινικών κινασών (Receptor tyrosine kinases, RTKs), ή έμμεσα μέσω σύνδεσης σε φωσφοπρωτεΐνες όπως το υπόστρωμα υποδοχέων ινσουλίνης (insoulin receptor substrates) IRS ενεργοποιώντας την p110α η οποία μετακινείται προς την πλασματική μεμβράνη. Μετά την ενεργοποιώντας την p110α φωσφορυλιώνει την 4,5-διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (phosphatidylinositol-4,5-biphosphate, PIP2) σε 3,4,5-τριφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate, PIP3) η οποία με τη σειρά της στρατολογεί στην πλασματική μεμβράνη πρωτεΐνες που φέρουν περιοχή ομόλογη της πλεκστρίνης (Pleckstrin Homology domain, PH) (31) όπως η κινάση PDK1 και η κινάση σερίνης θρεονίνης AKT (ή PKB). Η ενεργοποιημένη ΑΚΤ μέσω φωσφορυλίωσης στα κατάλοιπα T308 και S473 από τις PDK1 και mTORC2 (PDK2) αντίστοιχα, οδηγεί στη ρύθμιση στόχων που συμμετέχουν στην μεταγραφή, μετάφραση, στην κυτταρική αύξηση, στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης. (Yap et al. 2008) (32)

### 1.2.3 Οι ογκογόνες μεταλλάξεις του γονιδίου ΡΙ3ΚCA

Η απορρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού της ΡΙ3Κ/ΑΚΤ στον καρκίνο του παχέος εντέρου όπως και σε πολλούς άλλους τύπους καρκίνου οφείλεται κατά μεγάλο ποσοστό σε σωματικές μεταλλάξεις των κύριων μορίων του μονοπατιού. Μεταλλάξεις οι οποίες οδηγούν σε μείωση της δράσης της φωσφατάσης PTEN (μετατρέπει την PIP3 σε PIP2) έχουν αναφερθεί σε ποσοστό 5-14% στον καρκίνο του παχέος εντέρου και οδηγούν σε ενίσχυση της σηματοδότησης της PI3K/AKT (https://www.mycancergenome.org/content/disease/colorectal-cancer/pten/). Επίσης, μεταλλάξεις που επηρεάζουν την ΑΚΤ και ενισχύουν τη σηματοδότηση, όπως η μετάλλαξη Ε17Κ στο γονίδιο ΑΚΤΙ έχουν αναφερθεί σε μικρό ποσοστό περίπου 1-6% (https://www.mycancergenome.org/content/disease/colorectal-cancer/akt1/23/). Ιδιαίτερη σημασία στην εξέλιξη του ορθοκολικού καρκίνου έχουν οι μεταλλάξεις που εντοπίζονται είτε στη ρυθμιστική υπομονάδα p85α είτε στην καταλυτική υπομονάδα p110α της PI3K. Πιο συγκεκριμένα, μεταλλάξεις στο γονίδιο PIK3R1 που κωδικοποιεί την p85α υπομονάδα και ειδικότερα στην περιοχή iSH2 εντοπίζονται στο 8% πρωτογενών όγκων του παχέος εντέρου και αποσταθεροποιούν το σύμπλοκο p85-p110α προωθώντας την σηματοδότηση (50). Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο PI3KCA το οποίο κωδικοποιεί την καταλυτική υπομονάδα p110α εντοπίζονται στο μεγαλύτερο ποσοστό των όγκων του παγέος εντέρου, καθιστώντας το ένα από τα πιο συχνά μεταλασσόμενα γονίδια στον καρκίνο του παχέος εντέρου μαζί με το KRAS. Οι μεταλλάξεις του PIK3CA εμφανίζονται συχνότερα σε όγκους στο εγγύς κόλον σε σχέση με το ανιόν κόλον με ποσοστά από 21-25% και 8-9% αντίστοιχα (51).

Η πρώτη μελέτη στην οποία παρουσιάστηκε μια ολοκληρωμένη ανάλυση των μεταλλάξεων του γονιδίου PI3KCA και στην οποία πραγματοποιήθηκε ανάλυση της κωδικής περιοχής του γονιδίου σε 234 όγκους του παχέος εντέρου βρέθηκε ότι η συχνότητα των μεταλλάξεων ήταν 32% (52) (Εικόνα 4). Επίσης, στην ίδια μελέτη παρατηρήθηκε ότι μεταλλάξεις του PI3KCA εμφανίζονταν σε προχωρημένο στάδιο της καρκινογένεσης κατά την μετάβαση αδενώματος σε καρκίνωμα, καθώς προκαρκινικά αδενώματα που ελέγθηκαν δεν έφεραν τέτοιες μεταλλάξεις. Το σύνολο των μελετών πλέον αναφέρουν ότι το ποσοστό των μεταλλάξεων του PI3KCA στον καρκίνο του παχέος εντέρου ανέρχεται σε 10-30% (COSMIC database). Οι σωματικές μεταλλάξεις του

*PI3KCA* είναι σημειακές, ετερόζυγες και εντοπίζονται στην περιοχή σύνδεσης του p85α, στην περιοχή C2, στην περιοχή έλικας αλλά και στην περιοχή ενεργότητας κινάσης. Οι συχνότερες μεταλλάξεις του *PI3KCA* εντοπίζονται στο εξώνιο 9 στην περιοχή έλικας (helical domain) και στο εξώνιο 20 στην περιοχή ενεργότητας κινάσης (kinase domain) όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 1. Οι μεταλλάξεις του εξωνίου 9 είναι πιο κοινές από του εξωνίου 20 και εμφανίζονται σε αναλογία 3:1 έως 5:1 ενώ μικρό ποσοστό όγκων (<5%) φέρουν μεταλλάξεις και στα δύο εξώνια (53). Η μετάλλαξη Ε545K παρουσιάζει τη μεγαλύτερη συχνότητα από τις μεταλλάξεις του εξωνίου 9 (28%), προκύπτει από την αντικατάσταση μιας αδενίνης από μια γουανίνη και έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση ενός γλουταμικού οξέος (Ε) από μια λυσίνη (Κ) στη θέση 545 του γονιδίου. Αντίστοιχα, η μετάλλαξη H1047R παρουσιάζει τη μεγαλύτερη συχνότητα από τις μεταλλάξεις του εξωνίου 20 (21%), προκύπτει από την αντικατάσταση μιας γουανίνης από μια αδενίνη και οδηγεί στην αντικατάσταση μιας ιστιδίνης (Η) από μια αργινίνη (R) στη θέση 1047 του γονιδίου.



Εικόνα 4. Οι μεταλλάξεις του γονιδίου PIK3CA στον καρκίνο. Οι σημειακές μεταλλάξεις υποδεικνύονται με τα μαύρα βέλη, τα κουτιά αναπαριστούν τις λειτουργικές περιοχές του γονιδίου (p85: p85 binding domain, RBD: Ras Binding Domain, Helical domain, Kinase domain) και τα ποσοστά των μεταλλάξεων που ανιχνεύθηκαν σε κάθε περιοχή στο σύνολο των όγκων που εξετάστηκαν παρουσιάζονται στο κάτω μέρος. Το ποσοστό των μεταλλαγμένων όγκων για κάθε τύπο καρκίνου που εξετάστηκε παρουσιάζεται στο πάνω μέρος. (Samuels et. al, 2004) (52)

Πίνακας 1. Κατάλογος σωματικών μεταλλάξεων του *PIK3CA* στα εξώνια 9 και 20 σε όγκους του παχέος εντέρου. (<u>https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic</u>)

Gene	Exon	Location	Amino Acid Position	Amino Acid Change	Nucleotide Change	Frequency Among PIK3CA-Mutated Colon Cancer ( <u>COSMIC</u> )
PIK3CA	9	Helical domain	E542	<u>p.E542K</u>	<u>c.1624G&gt;A</u>	17%
			E545	<u>p.E545K</u>	<u>c.1633G&gt;A</u>	28%
				<u>p.E545Q</u>	<u>c.1633G&gt;C</u>	0.3%
				<u>p.E545G</u>	<u>c.1634A≻G</u>	2.1%
				<u>p.E545V</u>	<u>c.1634A≻T</u>	0.2%
			Q546	<u>p.Q546K</u>	<u>c.1636C&gt;A</u>	4.2%
				<u>p.Q546E</u>	<u>c.1636C&gt;G</u>	0.3%
				<u>p.Q546P</u>	<u>c.1637A≻C</u>	0.2%
				<u>p.Q546R</u>	<u>c.1637A≻G</u>	0.5%
				<u>p.Q546L</u>	<u>c.1637A≻T</u>	0.3%
			D549	<u>p.D549N</u>	<u>c.1645G&gt;A</u>	0.4%
	20	20 <u>Kinase</u> Domain	H1047	<u>p.H1047R</u>	<u>c.3140A≻G</u>	21%
				p.H1047L	<u>c.3140A&gt;T</u>	4.0%

Τα στοιχεία προέρχονται από τη βάση δεδομένων COSMIC (Catalogue Of Specific Mutations In Cancer) και ο πίνακας από την διαδικτυακή πύλη My Cancer Genome. (https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic)

# 1.2.4 Οι μηχανισμοί αύζησης της ενεργότητας της ΡΙ3Κ μέσω των μεταλλάζεων E545K και H1047R

Οι υψηλής συχνότητας μεταλλάξεις (hot spots) E545K και H1047R στην p110α υπομονάδα προκαλούν αύξηση της ενζυμικής δραστικότητας της λιπιδικής κινάσης αλλά με διαφορετικούς μηχανισμούς. Ειδικότερα και οι δύο μεταλλαγμένες PI3Ks που προκύπτουν παρουσιάζουν 2 φορές μεγαλύτερη ενζυμική δραστικότητα σε σχέση με την ενεργοποιημένη PI3K φυσικού τύπου (54). Η ύπαρξη της κρυσταλλικής δομής της p110α υπομονάδας αλλά και της μεταλλαγμένης p110α/H1047R έχουν επιτρέψει την μελέτη του μηχανισμού με τον οποίο η H1047R μετάλλαξη αυξάνει την ενεργότητα του ενζύμου (Εικόνα 5). Πρόσφατα δεδομένα από μοντέλα προσομοίωσης αποδεικνύουν ότι η H1047R που εντοπίζεται στο καρβοξυλικό άκρο (C-) της περιοχής κινάσης, αυξάνει την ενεργότητα ΑΤΡασης τροποποιώντας τη διαμόρφωση του καταλοίπου H917 το οποίο είναι ιδιαίτερα σημαντικό για την υδρόλυση του ΑΤΡ (55). Επίσης η ύπαρξη της H1047R τροποποιεί διαμοριακές αλληλεπιδράσεις οι οποίες δεν επιτρέπουν στο καρβοζυτελικό άκρο να

αναστείλει την ενζυμική δραστικότητα (μέσω ελέγχου της πρόσβασης του μοτίβου DRH στο ενεργό κέντρο) και ενισχύει τη σύνδεση της πρωτεΐνης με τη μεμβράνη (μέσω συσσώρευσης θετικού φορτίου στις περιοχές που αλληλεπιδρούν με τη μεμβράνη) (30)(56).

Παρόλο που ακόμη δεν είναι διαθέσιμη η κρυσταλλική δομή της PI3K που φέρει την μετάλλαξη E545K στην περιοχή έλικας, πολλές μελέτες περιγράφουν ότι η E545K αυξάνει την ενζυμική δραστικότητα μέσω ενός τελείως διαφορετικού μηχανισμού από την H1047R. Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση της E545K η ενεργοποίηση επάγεται λόγω της κατάργησης της ανασταλτικής επαφής της p110a με την p85a η οποία όπως αναφέρθηκε νωρίτερα ρυθμίζει την ενεργοποίηση της PI3K. Έτσι, φαίνεται ότι οι μεταλλαγμένες PI3Ks που φέρουν την E545K δεν απαιτούν την αλληλεπίδραση με την καταλυτική υπομονάδα p85, αλλά μόνο με την πρωτεΐνη Ras με σκοπό να οδηγηθούν στην κυτταρική μεμβράνη, σε αντίθεση με τις PI3Ks που φέρουν την H1047R οι οποίες ενεργοποιούνται ανεξάρτητα από τη Ras αλλά απαιτούν την αλληλεπίδραση με την p85a (57).



Εικόνα 5. Μοντέλο του μηχανισμού ενεργοποίησης της PI3K με μετάλλαξη H1047R στην περιοχή ενεργότητας κινάσης. Βάσει του μοντέλου η PI3K με μετάλλαξη H1047R οδηγεί σε αυξημένη ενεργοποίηση της PI3K καθώς παρουσιάζει αυξημένη πρόσδεση στη μεμβράνη λόγω συσσώρευσης θετικού φορτίου στις περιοχές σύνδεσης με τη μεμβράνη, η ανασταλτική δράση του καρβοξυτελικού άκρου δεν παρατηρείται και έχει τροποποιηθεί ο προσανατολισμός του καταλοίπου His917 ως προς το ενεργό κέντρο του ενζύμου, γεγονός που διευκολύνει την υδρόλυση του ATP. (*Gkeka et al., 2014*) (56)
Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 1.2.1, η αλληλεπίδραση της nSH2 περιοχής της p85α με την περιοχή έλικας της p110α απενεργοποιεί την κινάση, ενώ η αλληλεπίδραση αυτή διακόπτεται όταν πεπτίδια πλούσια σε φωσφοτυροσίνες (pY peptides) (σε ενεργοποιημένους RTKs) προσδεθούν στην επιφάνεια επαφής (interface) nSH2-περιοχής έλικας, ενεργοποιώντας το ένζυμο. Η μετάλλαξη Ε545Κ εντοπίζεται ακριβώς σε αυτό το σημείο στο οποίο συνδέονται τα πεπτίδια pY, και όπως έχει δειχθεί οδηγεί σε διακοπή της αλληλεπίδρασης nSH2 με την περιοχής έλικας και σε ενεργοποίηση της PI3K όπως ακριβώς συμβαίνει φυσιολογικά μετά τη σύνδεση των pY πεπτιδίων (57)(58). Ειδικότερα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 6 μια αρχική μελέτη έδειξε ότι αλληλεπιδράσεις φορτίου μεταξύ των περιοχών nSH2-περιοχής έλικας επάγουν τη σταθεροποίηση του διμερούς της PI3K, ενώ παρουσία της E545K, η οποία προκαλεί αλλαγή φορτίου (charge reversal mutation) μέσω της αντικατάστασης ενός αρνητικά φορτισμένου αμινοξέος (γλουταμικό οξύ) από ένα θετικά φορτισμένο (λυσίνη), το διμερές αποσταθεροποιείται (59). Πρόσφατα έχει μελετηθεί σε μοντέλα προσομοίωσης ο μηχανισμός μέσω του οποίου η E545K μετάλλαξη επηρεάζει και αποδυναμώνει την αλληλεπίδραση της nSH2 περιοχής με την περιοχή έλικας (60). Επιπροσθέτως, μια ακόμη μελέτη υποστηρίζει ότι η Ε545Κ μετάλλαξη επάγει τις τρείς από τις τέσσερις στερεοχημικές αλλαγές μεταξύ των υπομονάδων p110α-p85α οι οποίες συμβαίνουν κατά τη φυσιολογική μετάβαση της ΡΙ3Κ από την ανενεργή στην ενεργή κατάσταση (άναφέρονται στο Κεφάλαιο 1.2.1) (31). Τα παραπάνω δεδομένα αναμένεται να διερευνηθούν περαιτέρω και πιθανά να ενισχυθούν από τα ευρήματα της μελέτης της κρυσταλλικής δομής της μετάλλαξης E545K.



Εικόνα 6. Ο μηχανισμός ενεργοποίησης της PI3K από την μετάλλαξη E545K στην περιοχή έλικας. Σε μη ενεργοποιημένη κατάσταση η PI3K σταθεροποιείται από την αλληλεπίδραση της nSH2 περιοχής της p85 ρυθμιστικής υπομονάδας με την περιοχή έλικας (Η) της καταλυτικής υπομονάδας p110 μέσω αλληλεπίδρασης φορτίου (+/-) (αριστερό μέρος). Μετά την επαγωγή σήματος από αυξητικούς παράγοντες η PI3K αλλάζει στερεοδιάταξη, οδηγείται στην κυτταρική μεμβράνη, αλληλεπιδρά με ενεργοποιημένους υποδοχείς RTKs (μέσω των περιοχών nSH2, cSH2) και ενεργοποιείται. Στην περίπτωση της PI3K που φέρει τη μετάλλαξη E545K, η ανασταλτική αλληλεπίδραση μεταξύ των nSH2-H δεν συμβαίνει καθώς έχει τροποποιηθεί το φορτίο (+/+) λόγω της μετάλλαξης και συνεπώς η PI3K κινάση βρίσκεται σε συνεχώς ενεργοποιημένη κατάσταση χωρίς να είναι απαραίτητος ο ρόλος της σύνδεσης με τους υποδοχείς. (*Lee et al., 2007*) (58)

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα, η μετάλλαξη E545K φαίνεται ότι οδηγεί την PI3K σε συνεχώς ενεργοποιημένη κατάσταση ανεξάρτητα με την επαγωγή μέσω των υποδοχέων RTKs, σε αντίθεση με την H1047R μετάλλαξη η οποία για την ενεργοποίηση απαιτεί τη σύνδεση της p85 υπομονάδας στους RTKs. Μια πρόσφατη μελέτη επιβεβαίωσε *in vitro* και *in vivo* την παραπάνω υπόθεση καθώς απέδειξε ότι σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου DLD1 η καταλυτική υπομονάδα p110α που φέρει μετάλλαξη E545K έχει την ικανότητα να προσδένεται απευθείας στην πρωτεΐνη IRS1 ανεξάρτητα από την υπομονάδα p85 και να οδηγείται στην μεμβράνη με σκοπό την μετατροπή της PIP2 σε PIP3, ενώ αυτό δεν συμβαίνει με την p110α που φέρει μετάλλαξη H1047R (61). Επίσης, ιδιαίτερη σημασία έχει το γεγονός ότι οι ερευνητές της ίδιας μελέτης κατάφεραν να συνθέσουν πεπτίδια (hydrocarbon stapled peptides) τα οποία αναστέλλουν την αλληλεπίδραση IRS1-p110α E545K, και επιβραδύνουν την ανάπτυξη όγκων που σχηματίστηκαν από τα DLD1 κύτταρα σε ποντίκια (61)(62).

## 1.2.5 Οι επιπτώσεις των μεταλλάξεων E545K και H1047R στο φαινότυπο των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου in vitro και σε in vivo μοντέλα

Οι μεταλλάξεις E545K και H1047R του γονιδίου *PIK3CA* χαρακτηρίζονται ως ογκογόνες καθώς όπως αναφέρθηκε νωρίτερα οδηγούν σε αυξημένη ενεργοποίηση της PI3K και κατ'επέκταση σε ενισχυμένη καθοδική σηματοδότηση η οποία οδηγεί στην κακοήθη εξαλλαγή των φυσιολογικών κυττάρων. Ο ρόλος των μεταλλάξεων αυτών στην αλλαγή του φαινότυπου καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου μελετήθηκε εκτενώς το 2005 από τους Samuels και Vogelstein οι οποίοι χρησιμοποίησαν τις κυτταρικές σειρές καρκίνου του παχέος εντέρου DLD1 και HCT116 που φέρουν τις ετερόζυγες μεταλλάξεις E545K και H1047R αντίστοιχα (63). Ειδικότερα κατασκεύασαν ένα ισογονιδιακό σύστημα μελέτης στο οποίο μέσω γονιδιακής τροποποίησης κατάφεραν να απαλείψουν είτε το φυσικού τύπου είτε το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο του γονιδίου *PIK3CA* με σκοπό να μελετήσουν το φαινότυπο των κυττάρων με το φυσικού τύπου αλληλόμορφο.

Τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης αποκάλυψαν ότι και οι δύο μεταλλάξεις προάγουν κυτταρικές λειτουργίες χαρακτηριστικές των νεοπλασματικών κυττάρων και οι επιδράσεις τους στα κύτταρα είναι παρόμοιες. Πιο συγκεκριμένα, παρατήρησαν ότι τα κύτταρα που εξέφραζαν το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο (E545K ή H1047R) παρουσίασαν αναπτυξιακό πλεονέκτημα σε σχέση με τα κύτταρα που εξέφραζαν το φυσικού τύπου αλληλόμορφο σε συνθήκες καλλιέργειας με μειωμένο ορό (συμπλήρωμα του θρεπτικού υλικού καλλιέργειας που περιέχει αυξητικούς παράγοντες). Στις ίδιες συνθήκες παρατηρήθηκε αυξημένη φωσφορυλίωση της ΑΚΤ και των καθοδικών στόχων της FKHRL1 και FKHRL2 στα μεταλλαγμένα κύτταρα γεγονός που πιθανά εξηγεί τις διαφορές τους στην κυτταρική ανάπτυξη. Στην προσπάθεια να διερευνήσουν περαιτέρω τις αιτίες της αναπτυξιακής διαφοράς μεταξύ των κυττάρων που εξέφραζαν μόνο το φυσικού τύπου ή μόνο το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο της PI3K, έλενξαν αν εμφάνιζαν διαφορές στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, όμως δεν εντόπισαν καμία διαφορά. Αντίθετα, σε συνθήκες μειωμένου ορού παρατήρησαν υψηλό ποσοστό απόπτωσης στα κύτταρα χωρίς μετάλλαξη σε σχέση με τα μεταλλαγμένα και όπως απέδειξαν η αντίσταση των μεταλλαγμένων κυττάρων στην απόπτωση επάγεται μέσω της ΑΚΤ και της αναστολής των μεταγραφικών

παραγόντων FKHR. Η αντίσταση των μεταλλαγμένων κυττάρων στην απόπτωση απουσία αυξητικών παραγόντων επιβεβαιώθηκε και από μια ακόμη μελέτη στην οποία παρουσιάστηκαν παρόμοια αποτελέσματα και σε καρκινικές σειρές του παχέος εντέρου που φέρουν μεταλλάξεις σε διαφορετικές περιοχές του γονιδίου *PIK3CA* (Q546P, C378R) (64).

Όσο αφορά την ενεργοποίηση της ΑΚΤ και των καθοδικών στόχων της, η μελέτη της ομάδας του Vogelstein περιγράφει ότι η ΑΚΤ1 είναι η κύρια μορφή της ΑΚΤ η οποία εκφράζεται και είναι ενεργοποιημένη στα μεταλλαγμένα κύτταρα. Επίσης, εκτός από τους μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας FOXO (FKHRL1 και FKHRL2) οι οποίοι παρουσιάσαν αυξημένα επίπεδα, και τον παράγοντας FKHR που παρουσίασε μείωση, δεν παρατηρήθηκε διαφορά σε άλλους κύριους καθοδικούς στόχους όπως οι mTOR, 4E-BP1, p70-S6K, Tuberin, GSK3β στα μεταλλαγμένα κύτταρα σε σχέση με αυτά που δεν φέρουν τις μεταλλάξεις (65).

Εκτός από τις διαφορές στην κυτταρική ανάπτυξη, στην ίδια μελέτη αποδείχθηκε η αυξημένη μεταναστευτική ικανότητα αλλά και η αυξημένη ικανότητα διείσδυσης σε υλικό Matrigel των μεταλλαγμένων κυττάρων σε σχέση με τα μη μεταλλαγμένα *in vitro*. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και σε *in vivo* πειράματα στα οποία τα μεταλλαγμένα κύτταρα όταν ενέθηκαν ενδοφλέβια σε ποντίκια οδήγησαν στο σχηματισμό μεταστάσεων στους πνεύμονες, τους νεφρούς και σε άλλους ιστούς σε αντίθεση με τα κύτταρα που δεν έφεραν μετάλλαξη και δεν κατάφεραν να δημιουργήσουν μεταστάσεις. Έτσι, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το *PIK3CA* είναι ένα από τα γονίδια που ευθύνονται για τη διείσδυση και μετάσταση των όγκων, καθώς οι μεταλλάξεις του *PIK3CA* εμφανίζονται στο στάδιο της μετάβασης από αδένωμα σε καρκίνωμα όπου ξεκινάει και η διείσδυση του όγκου (invasion).

Μεταγενέστερες μελέτες στο ίδιο ισογονιδιακό σύστημα αποκάλυψαν και άλλες αλλαγές που επάγονται από τις συγκεκριμένες μεταλλάξεις. Όπως αποδείχθηκε, η μετάλλαξη H1047R οδηγεί σε αλλαγή της μορφολογίας των κυττάρων HCT116 μέσω μείωσης του πολυμερισμού της ακτίνης, αύξησης του σχηματισμού λεπτών προεξοχών της κυτταρικής μεμβράνης (filopodia) και αύξησης της κινητικότητάς τους (66). Ειδικότερα, στα HCT116 τα οποία εξέφραζαν το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο της PI3K η έκφραση της πρωτεΐνης Bcl2 η οποία αναστέλλει την κινητικότητα των κυττάρων (μέσω αύξησης του πολυμερισμού της ακτίνης) ήταν μειωμένη σε σχέση με τα HCT116 που εξέφραζαν το φυσικού τύπου αλληλόμορφο. Μια ακόμη πιο πρόσφατη μελέτη του Hao et al., παρουσίασε ότι οι μεταλλάξεις E545K και H1047R ρυθμίζουν το μεταβολισμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου (67). Συγκεκριμένα, όπως περιέγραψαν τα μεταλλαγμένα κύτταρα μεταβολίζουν περισσότερη γλουταμίνη σε α-κετογλουταρικό για να ανανεώσουν τον κύκλο του κιτρικού οξέος και να παράγουν ATP σε σχέση με τα κύτταρα που δεν φέρουν τις μεταλλάξεις. Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν ότι ο αυξημένος μεταβολισμός της γλουταμίνης οφείλεται στην αύξηση της έκφρασης του γονιδίου *GPT2* που κωδικοποιεί ένα βασικό ένζυμο του μεταβολισμού της γλουταμίνης και η έκφραση του οποίου επάγεται από την μεταλλαγμένη PI3K μέσω μηχανισμού ανεξάρτητου της AKT. Επιπροσθέτως, σε *in vivo* πειράματα σε ποντίκια απέδειξαν ότι η αναστολή του ενζύμου GPT2 οδηγεί σε μειωμένη ανάπτυξη όγκων που δημιουργήθηκαν από τα κύτταρα με μεταλλάξεις σε σχέση με τα κύτταρα που δεν φέρουν τις μεταλλάξεις του *PIK3CA*. Τα δεδομένα αυτά δηλώνουν ότι ο μεταβολισμός της γλουταμίνης είναι απαραίτητος για την ογκογόνο δράση των μεταλλάξεων Ε545K και H1047R.

Πρόσφατες μελέτες έχουν συνδέσει την αυξημένη ενεργοποίηση της PI3K αλλά και τις μεταλλάξεις του *PIK3CA* με την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών βλαστικών κυττάρων του παχέος εντέρου (Cancer Stem Cells, CSCs)(68) (69). Τα CSCs αποτελούν έναν κυτταρικό υποπληθυσμό των όγκων τα οποία διατηρούν τα χαρακτηριστικά αυτοανανέωσης, διαφοροποίησης ως προς όλους τους τύπους των κυττάρων που απαρτίζουν έναν όγκο και είναι ογκογόνα. Τα τελευταία χρόνια πλήθος μελετών ερευνούν τη δράση τους στην καρκινισγένεση και έχει δειχθεί ο ρόλος τους στη μετάσταση, στην υποτροπή και στην αντίσταση των όγκων στα χημειοθεραπευτικά. Πειράματα *in vitro* έχουν δείζει ότι σε πρωτογενή καρκινικών βλαστικών κυττάρων) καρκινικών βλαστικών κυττάρων ήταν αυξημένο σε σχέση με αυτό των πρωτογενών κυττάρων χωρίς τη μετάλλαξη τα οποία εμφάνισαν πολύ χαμηλό ποσοστό (70). Ειδικότερα, στη μελέτη αυτή αποδείχθηκε ότι ο φαινότυπος H1047R+/LgR5+ σχετίζεται με εμφάνιση αντίστασης σε χημειοθεραπευτικά πρώτης γραμμής *in vitro* και με χαμηλή πρόγνωση σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου.

#### 1.2.6 Η κλινική σημασία των μεταλλάξεων του γονιδίου ΡΙΚ3CA

Η κλινική χρησιμότητα του ογκογονιδίου PIK3CA έχει μελετηθεί σε πολλούς τύπους καρκίνου (51). Η σημασία των μεταλλάξεων του γονιδίου PIK3CA για την επιβίωση των ασθενών έχει υπάρξει αντικείμενο κλινικών μελετών. Ωστόσο, επί του παρόντος δεν έχει εξαχθεί ένα σαφές συμπέρασμα που να καθιστά το μεταλλαγμένο PIK3CA έναν ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα (71). Αυτό συμβαίνει διότι το μεταλλαγμένο γονίδιο PIK3CA έχει συσχετιστεί και με άλλους μοριακούς δείκτες όπως οι μεταλλάξεις των γονιδίων KRAS, BRAF και η έκφραση του MGMT γονιδίου με αποτέλεσμα οι μελέτες να καταλήγουν σε αντιφατικά συμπεράσματα. Για παράδειγμα, σε μια μελέτη 450 ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου σταδίου Ι-ΙΙΙ, η ύπαρξη μεταλλάξεων στο PIK3CA συσχετίστηκε με δυσμενή πρόγνωση μόνο στην περίπτωση ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου σταδίου Ι-ΙΙΙ διοδείκτες συμπεριλαμβανομένου και του PIK3CA δεν παρατηρήθηκε καμία συσχέτιση αυτού με την ολική επιβίωση των ασθενών (73).

Ιδιαίτερης σημασίας είναι η συσχέτιση των μεταλλάξεων στο *PIK3CA* με την ανάπτυξη αντίστασης στην θεραπεία μονοκλωνικών anti-EGFR αντισωμάτων (Panitumumab και Cetuximab) στον προχωρημένο καρκίνο του παχέος εντέρου σε ασθενείς χωρίς μεταλλάξεις του γονιδίου *RAS* (74)(75). Επίσης, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η επικουρική θεραπεία (adjuvant therapy) με ασπιρίνη είναι πιο αποτελεσματική σε ασθενείς που φέρουν μεταλλάξεις στο *PIK3CA* (53).

Επιπροσθέτως, κλινικές δοκιμές αξιολογούν την αποτελεσματικότητα πολλών αναστολέων της PI3K και ειδικότερα αναστολέων της καταλυτικής υπομονάδας p110a χωρίς να έχει χρησιμοποιηθεί κάποιος ειδικός αναστολέας που να στοχεύει τις μεταλλάξεις της p110a υπομονάδας. Οι αναστολείς της PI3K (PI3K inhibitors, PI3Kis) που έχουν σχεδιαστεί κατηγοριοποιούνται σε αναστολείς που στοχεύουν όλες τις PI3K κλάσης I (Pan-PI3Kis), σε αναστολείς ειδικούς για τις ισομορφές της p110 (Isoform specific PI3Kis) και διπλούς αναστολείς των PI3K και mTOR (PI3K/mTORis) και οι βασικότεροι από αυτούς παρουσιάζονται στον Πίνακα 2 (76). Επί του παρόντος, οι αναστολείς της PI3K δεν έχουν εγκριθεί από τον Οργανισμού Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) για τη θεραπεία του καρκίνου του παχέος εντέρου. Ο μη ειδικός αναστολέας της PI3K Buparlisib, έχει παρουσιάσει κάποια θετικά αποτελέσματα όμως λόγω αυξημένων παρενεργειών σε μεγάλο ποσοστό των ασθενών, οι έρευνες έχουν στραφεί σε πιο στοχευμένους αναστολείς όπως ο Alpelisib ή BYL719 (p110α specific), η χρήση του οποίου είχε κάποια ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε ασθενείς με προχωρημένους συμπαγείς όγκους του παχέος εντέρου με μεταλλάξεις *PIK3CA* (77)(78). Σε κλινική δοκιμή η οποία βρίσκεται σε εξέλιξη ο αναστολέας Alpelisib χορηγείται συνδυαστικά με άλλα χημειοθεραπευτικά σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου (Trial Identifier: NCT01719380).

Πίνακας 2. Αναστολείς της PI3K που χρησιμοποιούνται σε κλινικές δοκιμές (Janku 2017) (76)

Inhibitor	Target	Trial phase	Company
Buparlisib (BKM120)	Pan-PI3K	ш	Novartis
Pictilisib (GDC-0941)	Pan-PI3K	II	Genentech
PX-866	Pan-PI3K	II	Cascadian Therapeutics
Pilaralisib (SAR245408; XL147)	Pan-PI3K	II	Sanofi/Exelixis
Copanlisib (BAY 80-6946)	Pan-PI3K	1/11	Bayer
BEZ235	PI3K/mTOR	Discontinued	Novartis
GSK2126458	PI3K/mTOR	I	GlaxoSmithKline
Gedatolisib (PF-05212384; PKI-587)	PI3K/mTOR	1	Pfizer
Apitolisib (GDC-0980)	PI3K/mTOR	I	Genentech
PQR309	PI3K/mTOR	1/11	PIQUR
Alpelisib (BYL719)	p110x	III	Novartis
Taselisib (GDC-0032)	p110β-sparing	III	Genentech
MLN1117	p110x	11	Takeda
GSK2636771	p110β	1/11	GlaxoSmithKline
AZD8186	p110β	1	AstraZeneca
SAR260301	p110β	I	Sanofi
IPI-549	p110y	1	Infinity

Abbreviations: mTOR = mammalian target of rapamycin, PI3K = phosphoinositide 3-kinase. <sup>a</sup> Previously Oncothyreon.

Ιδιαίτερα σημαντικές είναι και οι επιδράσεις των αναστολέων της PI3K στο αγγειακό δίκτυο των συμπαγών όγκων σε προκλινικά μοντέλα του καρκίνου (79)(80). Η σηματοδότηση της PI3K ρυθμίζει μια πληθώρα προ-αγγειακών σημάτων και συνεπώς αποτελεί κύριο ρυθμιστή της νεοπλασματικής αγγειογένεσης. Η δρασή των αναστολέων της PI3K σε σχέση με τις κλασσικές αντιαγγειογενετικές θεραπείες που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη αλλά και ο ρόλος καθοδικών στόχων της PI3K που εμπλέκονται στην αγγειογένεση των όγκων μελετώνται εκτενώς, όπως αναλύεται στο επόμενο κεφάλαιο.

#### 1.3 Η στόχευση της νεοπλασματικής αγγειογένεσης στον καρκίνο

#### 1.3.1 Η αγγειογένεση στον καρκίνο

Η αγγειογένεση αποτελεί ένα από τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα του καρκίνου (Hallmarks of cancer), όπως περιφράφηκε από τους Hanahan και Weinberg το 2011. Όταν μια κακοήθης μάζα ξεπεράσει τη διάμετρο λίγων μικρομέτρων (περίπου 2mm), η υποξία και η έλλειψη θρεπτικών συστατικών οδηγούν στην ενεργοποίηση του «αγγειακού διακόπτη» (angiogenic switch) επιτρέποντας την περαιτέρω ανάπτυξη του όγκου. Η διαδικασία της αγγειογένεσης, δηλαδή της δημιουργίας νέων αγγείων από προϋπάρχοντα, είναι συνεχώς ενεργοποιημένη στους όγκους σε αντίθεση με τους φυσιολογικούς ενήλικους ιστούς στους οποίους το αγγειακό δίκτυο βρίσκεται σε ηρεμία και διεγείρεται υπό συγκεκριμένες συνθήκες (επούλωση τραύματος, αναπαραγωγικός κύκλος της γυναίκας) (81). Τα καρκινικά κύτταρα εκκρίνουν συνεχώς αγγειογενετικούς παράγοντες όπως κυταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες με σκοπό την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων και την αναδιαμόρφωση της εξωκυτταρικής μήτρας (82). Η υποξία ή γενετικές αλλαγές των κυττάρων του όγκου επάγουν την αγγειογένεση μέσω της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1. Ο HIF-1 με τη σειρά του ενεργοποιεί τον αγγειακό ενδοθηλιακό παράγοντα VEGF ο οποίος διεγείρει τα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω των VEGFR2 εξαρτώμενων μονοπατιών. Τα αυξημένα επίπεδα του VEGF όπως και άλλων παραγόντων που εκκρίνονται από τα καρκινικά κύτταρα ή τα κύτταρα του στρώματος όπως ο FGF, ο EGF, η ιντερλευκίνη 8 (IL8) και οι αγγειοποιητίνες (Ang-1, Ang-2) επάγουν τον πολλαπλασιασμό, την μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων (83). Επίσης, αυξημένα ποσά του αυξητικού παράγοντα PDGF εκκρίνονται από τα αιμοπετάλια και τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα προσελκύοντας περικύτταρα τα οποία συμβάλλουν στην σταθερότητα και ωρίμανση του αγγειακού δικτύου. Ορισμένα από τα μόρια που εμπλέκονται στην αγγειογένεση των όγκων παρουσιάζονται στην Εικόνα 7 (84).



Εικόνα 7. Διαδικασία επαγωγής της αγγειογένεσης των όγκων. Τα καρκινικά κύτταρα αλλά και ο περιβάλλον ιστός (stroma), που αποτελείται από ινοβλάστες και κύτταρα του ανοσοποιητικού, εκκρίνουν αγγειογενετικούς παράγοντες όπως ο VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), ο bFGF (Basic Fibroblast Growth Factor), ο EGF (Epidermal Growth Factor), η IL8 (Interleukin 8), η IL17 (Interleukin 17) και ο TNFa (Tumor Necrosis Factor Alpha) οι οποίοι μέσω αλληλεπίδρασης με τους αντίστοιχους υποδοχείς στα ενδοθηλιακά κύτταρα επάγουν τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν PDGF (Platelet Derived Growth Factor) προσελκύοντας περικύτταρα. Ο SDF1 (Stromal Cell-Derived Factor 1)/CXCL12 ο οποίος εκκρίνεται κυρίως από υοβλάστες προσελκύει ενδοθηλιακά προγονικά κύταρα από το μυελό των οστών (Bone marrow Derived, BMD) μέσω μηχανισμού εξαρτώμενου από τον υποδοχέα CXCR4. Επίσης επάγεται η αποικοδόμηση της εξωκυτταρικής μήτρας (ECM degradation) μέσως της δράσης της πλασμίνης που ρυθμίζεται από το σύστημα uPA/uPAR (Urokinase Plasminogen Activator/ Urokinase Plasminogen Activator Receptor) και της δράσης των MMPs (Matrix metalloproteinases) (*Bejerano et al., 2015*)(84)

Παρόλο που η επαγωγή της αγγειογένεσης του όγκου αρχικά παρέχει οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά, οι υψηλές συγκεντρώσεις του VEGF οδηγούν στο σχηματισμό υπερβολικού αριθμού αγγείων τα οποία δεν καλύπτονται επαρκώς από περικύτταρα. Ειδικότερα, τα υψηλά επίπεδα VEGF οδηγούν σε υπερενεργοποίηση του υποδοχέα VEGFR2 αναστέλλοντας τη δραστικότητα του PDGFRβ μέσω σχηματισμού ετεροδιμερών με αποτέλεσμα τη δημιουργία νέων αγγείων χωρίς περικύτταρα. Έτσι, τα αγγεία αυτά δεν έχουν στεγανότητα με αποτέλεσμα τα εξιδρώματα να αυξάνουν την πίεση του ενδιάμεσου υγρού εμποδίζοντας τη ροή του αίματος και προκαλώντας

ανομοιόμορφη παροχή οξυγόνου και θρεπτικών ουσιών δημιουργώντας τα ελικοειδή και ανώριμα αγγεία των όγκων, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 8 (85)(86)(87)(88).



Εικόνα 8. Τα χαρακτηριστικά του αγγειακού δικτύου του όγκου. Στην αριστερή πλευρά απεικονίζεται η δομή ενός καλά οργανωμένου αγγειακού δικτύου φυσιολογικού ιστού. Στην περίπτωση αυτή τα αγγεία είναι ώριμα, αποτελούνται από στιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων η οποία περιβάλλεται από τη βασική μεμβράνη και ακολουθεί η κάλυψη με περικύτταρα. Αντίθετα, στη δεξιά πλευρά απεικονίζεται το ανώριμο αγγειακό δίκτυο του όγκου. Εδώ εντοπίζονται διαρρέοντα αγγεία με ελλιπή κάλυψη από περικύτταρα, απώλεια συνδέσεων μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων τα οποία οδηγούν σε αύξηση της πίεσης του ενδιάμεσου υγρού (Interstitial Fluid Pressure, IFP). Τα αγγεία αυτά προκαλούν στέρηση θρεπτικών ουσιών και οξυγόνου (περιοχές υποξίας παρουσιάζονται με μπλε χρώμα) Η γλυκολυτική φύση του υποξικού όγκου μειώνει το pH στο μικροπεριβάλλον. (Schaaf et al., 2018) (88)

#### 1.3.2 Η αντιαγγειογενετική θεραπεία

Η έρευνα για την κατανόηση της αγγειογένεσης στον καρκίνο έχει εξελιχθεί σημαντικά μετά την παρατήρηση του Judah Folkman το 1971 ο οποίος για πρώτη φορά παρουσίασε τη σημασία της στέρηση της παροχής αίματος για την ανάπτυξη του όγκου ο οποίος απαιτεί το σχηματισμό νέων αγγειών όταν το μέγεθος του αρχίζει να υπερβαίνει το όριο διάχυσης του οξυγόνου («diffusion limit of oxygen») (89). Ο Folkman αντιλαμβανόμενος

το κύριο ρόλο της αγγειογένεσης στην πρόοδο του καρκίνου, πρότεινε τη στόχευση αγγειογενετικών σηματοδοτικών μορίων ως μια νέα προσέγγιση για τη θεραπεία του καρκίνου (90). Έκτοτε, οι έρευνες οδήγησαν στην ανάπτυξη στοχευμένων αντιαγγειογενετικών φαρμάκων ορισμένα από τα οποία έχουν εγκριθεί από τον FDA για κλινική χρήση ενάντια σε διάφορους τύπους καρκίνου συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του παχέος εντέρου.

Οι περισσότεροι αναστολείς της αγγειογένεσης στοχεύουν κατά κύριο λόγο το σηματοδοτικό άξονα του VEGF, όπως και άλλα μόρια με αγγειογενετική δράση. Το 2004, ο FDA ενέκρινε το πρώτο αντι-αγγειογενετικό φάρμακο, το Bevacizumab (εμπορική ονομασία Avastin), ένα μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του VEGF-A, για τη θεραπεία του μεταστατικού καρκίνου του παχέος εντέρου σε συνδυασμό με τη χημειοθεραπεία (91). Εν συνεχεία, όσον αφορά τον καρκίνο του παχέος εντέρου, το 2012 εγκρίθηκε ο αναστολέας Aflibercept (εμπορική ονομασία Zaltrap) ο οποίος είναι ένας γενετικά σχεδιασμένος υποδοχέας (fusion protein) που αποτελείται από τμήματα των υποδοχέων VEGFR1 και VEGFR2 και χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τη χημειοθεραπεία σε ασθενείς με μετασταστικό καρκίνο του παχέος εντέρου (92). Επίσης, το 2015 εγκρίθηκε ένας ακόμη αναστολέας της αγγειογένεσης για τη θεραπεία του μεταστατικού καρκίνου του παχέος εντέρου, το μονοκλωνικό αντίσωμα Ramucirumab (εμπορική ονομασία Cyramza) έναντι του υποδοχέα VEGFR2. Εκτός από την στόχευση του VEGF και των υποδοχέων του, οι αναστολείς τυροσινικών κινασών (Tyrosine Kinase Inhibitors, TKIs) αποτελούν μια κατηγορία μικρών μορίων τα οποία ενέκρινε ο FDA για την αντιαγγειογενετική θεραπεία του καρκίνου (92). Ειδικότερα, το Regorafenib το οποίο έχει εγκριθεί για τη θεραπεία του προχωρημένου καρκίνου του παγέος εντέρου, έγει δειγθεί ότι αναστέλλει πάνω από πενήντα ενδοκυτταρικές τυροσινικές κινάσες σε προκλινικά μοντέλα (85). Παρόλες τις αρχικές προβλέψεις, τα κλινικά δεδομένα έχουν δείξει ότι η αντι-αγγειογενετική θεραπεία παρουσιάζει μέτρια αποτελέσματα στην συνολική επιβίωση των ασθενών και επιπλέον η κλινική έκβαση συνδέεται με ανάπτυξη αντοχής στους αντι-αγγειογενετικούς παράγοντες και αυξημένο κίνδυνο διείσδυσης και μετάστασης.



Εικόνα 9. Οι στόχοι της αντιαγγειογενετικής θεραπείας στο μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου. (Battaglin et al., 2018) (92)

Βάσει των αρχικών υποθέσεων, είχε θεωρηθεί ότι ο κύριος μηχανισμός δράσης της αντι-αγγειογενετικής θεραπείας ήταν η ομαλοποίηση των αγγείων (vessel normalization) (86)(93). Στη συνέχεια όμως, βάσει προκλινικών και κλινικών δεδομένων υπήρχαν σοβαρές ενδείξεις ότι οι όγκοι μπορεί να εκδηλώσουν διαφορετικές προσαρμοστικές αντιδράσεις κατά των αντι-αγγειογενετικών παραγόντων (Εικόνα 10). Οι αντιδράσεις αυτές εξαρτώνται από το είδος και τη χορήγηση του αντι-αγγειογενετικού παράγοντα, την ισορροπία των αγγειογενετικών παραγόντων στο μικροπεριβάλλον του όγκου και το είδος του όγκου (94). Σε πρώτη φάση, η αντι-VEGF θεραπεία μειώνει τα επίπεδα του VEGF με αποτέλεσμα τη δημιουργία μικρότερου αριθμού αγγείων που προσομοιάζουν τα φυσιολογικά. Η ομαλοποίηση επαναφέρει τη σωστή δομή και στεγανότητα των αγγείων με αποτέλεσμα να μειώνει την πίεση του ενδιάμεσου χώρου, η οποία ουσιαστικά αυξάνει την αιμάτωση του όγκου. Έτσι, η πρόσβαση των συγχορηγούμενων χημειοθεραπευτικών στον όγκο βελτιώνεται και αυξάνεται η ευαισθησία του σε αυτά. Μια δεύτερη προσαρμογή των όγκων εμφανίζεται με συνέχιση της αντι-αγγειογενετικής θεραπείας η οποία οδηγεί σε αγγεία με μειωμένες διακλαδώσεις (vascular pruning) με αποτέλεσμα την παύση της πρόσβασης του χημειοθεραπευτικού και την ανάπτυξη εστιών υποξίας, από τις οποίες επιβιώνουν κλώνοι με αντίσταση στα χημειοθεραπευτικά. Το αποτέλεσμα σε κάποιες περιπτώσεις συνοδεύεται και από φαινότυπο μετάβασης επιθηλίου προς μεσέγχυμα (EMT)

και εμφάνιση μεταστάσεων. Συγκεκριμένα, τα υψηλά επίπεδα του VEGF στον όγκο, επάγουν τη δημιουργία ετεροδιμερών του VEGFR2 με τον υποδοχέα MET του HGF, ενός μεταστατικού παράγοντα που επάγει την EMT (5). Όμως το σύμπλεγμα VEGF/VEGFR2/HGF/MET προσελκύει τη φωσφατάση PTP1B, η οποία δεν επιτρέπει τη φωσφορυλίωση του υποδοχέα MET δρώντας αντιμεταστατικά. Αντίθετα, με τη χορήγηση της αντι-VEGF θεραπείας αναστέλλεται ο ετεροδιμερισμός των υποδοχέων VEGFR2 και MET, με απελευθέρωση της φωσφατάσης PTP1B, επαναφορά της δραστικότητας του HGF και μετάσταση του όγκου (95). Αυτά παρατηρήθηκαν μετά από χορήγηση Bevacizumab σε γλοιοβλαστώματα ποντικών και σε μια υποομάδα ασθενών με γλοιοβλάστωμα που έλαβαν θεραπεία με Bevacizumab. Επιτάχυνση της μετάστασης παρατηρήθηκε επίσης σε ποντικούς που έλαβαν βραχυπρόθεσμη θεραπεία με αντι-VEGF-Ab ή Sunitinib (SU11248) (αναστολέας των VEGFR/PDGFRβ κινασών) σε μοντέλα μετάστασης σε καρκίνου του μαστού, μελανώματος, καρκινικών κυττάρων γλοιοβλαστώματος και παγκρεατικού νευροενδοκρινικού καρκινώματος (96)(97).

Η έννοια της ομαλοποίησης κατά την αντι-αγγειογενετική θεραπεία δεν αφορά μόνο τη βελτίωση της δομής των αγγείων αλλά σχετίζεται και με τη διαμόρφωση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου. Τα παραπάνω δεδομένα καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η ομαλοποίηση των πόρων (θρεπτικά συστατικά, οζυγόνο) στο μικροπεριβάλλον του όγκου μειώνουν τη τάση για μετάσταση. Επίσης, έχει δειχθεί ότι οι εναλλαγές υποξίας και νορμοζίας στον όγκο οδηγούν σε ρύθμιση του μεταβολισμού των καρκινικών κυττάρων, αλλά και σε αλλαγές του ανοσολογικού προφίλ του όγκου, με το ανοσοκατασταλτικό προφίλ να χαρακτηρίζει τους υποζικούς όγκους (94). Συνεπώς, η πρόοδος στην έρευνα των μηχανισμών απόκρισης στην αντι-αγγειογενετική θεραπεία είναι απαιραίτητη με σκοπό την επίτευξη αποτελεσματικότερου συνδυασμού θεραπειών. Η εξατομικευμένη προσέγγιση που θα λαμβάνει υπόψη τους παράγοντες που επηρεάζουν την αντίσταση μπορεί να παρατείνει τον χρόνο κατά τον οποίο οι μεταστατικοί ασθενείς επωφελούνται από τους αντιαγγειογεντικούς παράγοντες. Επιπλέον, είναι απαιραίτητη η εύρεση νέων πιθανών αντι-αγγειογενετικών στόχων οι οποίοι θα μπορούσαν να είναι εξίσου ή και πιο αποτελεσματικοί από τους ήδη μελετημένους.



Εικόνα 10. Η απόκριση των όγκων στην αντι-αγγειογενετική θεραπεία. Η χορήγηση αντιαγγειογενετικής θεραπείας μπορεί να οδηγήσει είτε στην ομαλοποίηση του αγγειακού δικτύου (vascular normalization) που συνοδεύεται από πιο αποτελεσματική οξυγόνωση του όγκου, είτε σε καταστροφή του αγγειακού δικτύου (αγγεία με μειωμένες διακλαδώσεις) (vascular pruning) η οποία οδηγεί σε ανάπτυξη εστιών υποξίας. Η απόκριση των όγκων εξαρτάται από παράγοντες όπως ο τύπος του αντι-αγγειογενετικού παράγοντα, η χρονική φάση της χορήγησης και ο τύπος το όγκου. (Bueno et al., 2017) (94)

#### 1.3.3 Η ΡΙ3Κ ως αντι-αγγειογενετικός στόχος

Η PI3K αποτελεί έναν υπο μελέτη αντι-αγγειογενετικό στόχο στον καρκίνο καθώς ο σηματοδοτικός άξονας της PI3K επηρεάζει την αγγειογένεση, άμεσα, μέσω της δράσης του στα ενδοθηλιακά κύτταρα αλλά και έμμεσα μέσω επαγωγής αγγειογενετικών παραγόντων και από άλλους κυτταρικούς τύπους όπως τα καρκινικά, τα ανοσοκύτταρα, τα περικύτταρα. Ένας από τους κύριους ρόλους της σηματοδότησης της PI3K στον καρκίνο είναι η ρύθμιση των επιπέδων του VEGF. Η ογκογόνος σηματοδότηση των Ras, p110a και ΑΚΤ αυξάνει τα επίπεδα του VEGF, ενώ η αναστολή της σηματοδότησης της PI3K προκαλεί μείωση των επιπέδων του VEGF εντός του όγκου (98)(99). Οι γενετικές αλλαγές σε κύρια μόρια της σηματοδότησης της PI3K οδηγούν σε συνεχή ενεργοποίηση του υποάξονα AKT/mTORC1/HIF-1a ο οποίος επάγει μεταγραφικά την έκφραση του VEGF στα καρκινικά κύτταρα (100). Όπως έχει δειχθεί, η ισομορφή p110a αποτελεί κύριο ρυθμιστή των επιπέδων του VEGF στα καρκινικά κύτταρα (98)(101). Επιπροσθέτως, η PI3K στα καρκινικά κύτταρα ενεργοποιεί τον NF-kB, ο οποίος διεγείρει την έκφραση των TNF, CXCL-8, IL-1 και IL-6 τα οποία επάγουν την έκφραση του VEGF μέσω HIF-1α (102)(103). Σε πολλά προκλινικά μοντέλα του καρκίνου έχουν μελετηθεί οι επιδράσεις των αναστολέων της PI3K (Κεφάλαιο 1.2.6) στην αγγειογένεση του όγκου, χωρίς ακόμη να υπάρχουν κλινικά δεδομένα που να επιβεβαιώνουν αυτές τις επιδράσεις (99)(104). Τα διαθέσιμα δεδομένα αποκαλύπτουν ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις των αναστολέων της PI3K έχουν ασθενέστερη επίδραση στην αγγειογένεση σε σχέση με τις κλασσικές αντι-VEGF στοχευτικές θεραπείες. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις οι αναστολείς της PI3K φαίνεται ότι βελτιώνουν τη λειτουργία των αγγείων, ακόμη και σε μικρής διάρκειας χορήγηση, και το γεγονός αυτό συσχετίστηκε με την πιο αποτελεσματική πρόσβαση χημειοθεραπευτικών στον όγκο. Τα παραπάνω δεδομένα επιβεβαιώνουν ότι η PI3K αποτελεί έναν κατάλληλο αντι-αγγειογενετικό στόχο, όμως είναι απαραίτητη μια πιο λεπτομερής ανάλυση των αγγειογενετικών δράσεων της PI3K στον καρκίνο μέσω της μελέτη μορίων-ρυθμιστών της αγγειογένεσης καθοδικά της PI3K η οποία θα αποκαλύψει άλλους πιθανούς στόχους της νεοπλασματικής αγγειογένεσης.

## **1.4 Ο ρόλος των αγγειογενετικών χημειοκινών στον καρκίνο του παχέος** εντέρου

#### 1.4.1 Η οικογένεια των χημειοκινών

Οι χημειοκίνες είναι μικρού μοριακού βάρους (8-10 kDa) χημειοτακτικές κυτταροκίνες, οι οποίες εκκρίνονται από πολλούς κυτταρικούς τύπους και είναι γνωστές για τον ρόλο τους στη ρύθμιση της μετανάστευσης των κυττάρων του ανοσοποιητικού στους μηχανισμούς της φυσικής και επίκτητης ανοσίας (105)(106). Οι χημειοκίνες αποτελούν τη μεγαλύτερη οικογένεια κυτταροκινών και χωρίζονται σε τέσσερις υποκατηγορίες, τις χημειοκίνες CC, CXC, C και C<sub>3</sub>XC με βάση τη θέση των δύο πρώτων καταλοίπων κυστεΐνης (C) στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεϊνικής τους αλληλουχίας. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 11, οι χημειοκίνες που έχουν αναφερθεί μέχρι στιγμής είναι αρκετές σε αριθμό και συνδέονται σε πολλούς διαφορετικούς υποδοχείς και αντίστροφα οι υποδοχείς των χημειοκινών αλληλεπιδρούν με διαφορετικές χημειοκίνες. Γενικά οι υποδοχείς των χημειοκινών ανήκουν στην κατηγορία υποδοχέων που συνδέονται σε G πρωτεΐνες (G-protein coupled receptors) και ονομάζονται CXCR, CCR, CR ή CX3CR. Οι ενεργοποιημένες υπομονάδες των G πρωτεΐνων εν συνεχεία επάγουν πολλαπλές οδούς μεταγωγής σήματος μέσω μορίων όπως η PI3K, η PLCβ και οι Src κινάσες. Οι CXC χημειοκίνες κατηγοριοποιούνται περαιτέρω βάσει της ύπαρξης ή μη του μοτίβου ERL (Glu, Leu, Arg) πριν από το πρώτο κατάλοιπο κυστεΐνης στην αλληλουχία τους. Οι CXC χημειοκίνες που φέρουν το ERL μοτίβο (ERL+) έχει δειχθεί ότι έχουν αγγειογενετικές ιδιότητες και αλληλεπιδρούν με τα ουδετερόφιλα σε αντίθεση με τις CXC χημειοκίνες που δεν φέρουν το μοτίβο ERL, χαρακτηρίζονται αγγειοστατικές και προσελκύουν κυρίως λεμφοκύτταρα (107)(108). Εξαίρεση αποτελεί η χημειοκίνη CXCL12 (SDF-1) η οποία παρόλο που δεν φέρει το ERL μοτίβο έχει χαρακτηριστεί αγγειογενετική.

Το πρότυπο έκφρασης των χημειοκινών και των υποδοχέων τους σε ένα κύτταρο εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως η προέλευση και ο βαθμός διαφοροποίησης του ίδιου του κυττάρου αλλά και από παράγοντες του μικροπεριβάλλοντος όπως η συγκέντρωση των χημειοκινών, των φλεγμονωδών κυταροκινών και η υποξία. Σε έναν ιστό, παράγονται χημειοκίνες και δημιουργείται μια βαθμίδωση συγκέντρωσης χημειοκίνης (chemokine gradient) μέσω της οποίας προσελκύονται στον ιστό άλλα κύτταρα. Στην περίπτωση μιας μόλυνσης, ο βασικός κυτταρικός πληθυσμός που παράγει χημειοκίνες και εκφράζει υποδοχείς χημειοκινών είναι τα λευκοκύτταρα. Παρ'όλα αυτά έχει βρεθεί πως και τα ενδοθηλιακά, τα στρωματικά, τα επιθηλιακά κύτταρα, όπως και τα καρκινικά, παράγουν χημειοκίνες και εκφράζουν τους αντίστοιχους υποδοχείς.



Nature Reviews | Immunology

Εικόνα 11. Οι χημειοκίνες και οι υποδοχείς τους. Στην εικόνα παρουσιάζονται οι χημειοκίνες των κατηγοριών CXC, CC, C και CX<sub>3</sub>C. Οι χημειοκίνες που παρουσιάζονται στα κόκκινα και τα μπλέ πλαίσια έχουν παρατηρηρηθεί στον άνθρωπο και το ποντίκι αντίστοιχα, ενώ οι αλληλεπιδράσεις με χημειοκίνες που δεν βρίσκονται σε πλαίσιο είναι κοινές και στα δύο είδη. Εντός των παρανθέσεων παρουσιάζονται εναλλακτικές ονομασίες των χημειοκινών ή των υποδοχέων. (Nagarsheth et al., 2017) (110)

#### 1.4.2 Χημειοκίνες και καρκίνος

Στο μικροπεριβάλλον του όγκου, οι χημειοκίνες εκκρίνονται εκτός από τα καρκινικά κύτταρα και από άλλους κυτταρικούς τύπους όπως τα κύτταρα του ανοσοποιητικού, τα κύτταρα του στρώματος και τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Αντίστοιχα οι υποδοχείς των χημειοκινών εκφράζονται σε πολλά από τα κύτταρα αυτά, καθιστώντας το ρόλο των χημειοκινών στην πρόοδο του καρκίνου ιδιαίτερα πολύπλοκο. Σε απόκριση της έκκρισης χημειοκινών, διαφορετικοί τύποι κυττάρων του ανοσοποιητικού μεταναστεύουν εντός του μικροπεριβάλλοντος του όγκου (immune cell trafficking) και ρυθμίζουν ανοσολογικές αποκρίσεις αλλά και κύριες διαδικασίες όπως η διείσδυση, η

αγγειογένεση και η μετάσταση του όγκου (Εικόνα 12) (109). Ειδικότερα, ορισμένες χημειοκίνες δρούν επάγωντας (pro-tumour roles) και άλλες καταστέλλοντας την ανάπτυξη και επιβίωση του όγκου (anti-tumour roles) (Πίνακας 2) (110). Στη διαφόρφωση του ανοσολογικού προφίλ πρωτογενών ή μετασταστικών όγκων, υπάρχουν χημειοκίνες οι οποίες προσελκύουν κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος όπως τα βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα (T helper cells, TH) T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>17, CD8<sup>+</sup>, τα NK κύτταρα (Natural killers) και τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (μακροφάγα, δενδριτικά) τα οποία επάγουν ανοσολογική απόκριση εναντίον των καρκινικών κυττάρων, οδηγώντας τα σε θάνατο. Αντίθετα, κάποιες άλλες χημειοκίνες προσελκύουν εντός του όγκου ρυθμιστικά Τ λεμφοκύτταρα (Regulatory T cells, Treg ή Tregs), κατασταλτικά κύτταρα μυελοειδούς προέλευσης (Myeloid derived suppressor cells, MDSCs) όπως και μια κατηγορία δενδριτικών κυττάρων τα pDCs (plasmacytoid dendritic cells) τα οποία καταστέλουν την ανοσολογική απόκριση και έχει δειχθεί ότι προάγουν την ανάπτυξη του όγκου. Συγκεκριμένα, τα MDSCs αποτελούν έναν ετερογενή κυτταρικό πληθυσμό ο οποίος αποτελείται κυρίως από προγονικά κύτταρα μυελοειδούς προέλευσης (monocytic MDSCs), όπως τα ανώριμα μακροφάγα, και από κοκκιώδη κύτταρα (granulocytic MDSCs) (ουδετερόφιλα σε διάφορα στάδια ωρίμανσης) και ο ανοσοκατασταλτικός ρόλος τους στον καρκίνο έχει δειχθεί σε καρκινικά μοντέλα *in* vivo αλλά και σε ασθενείς με καρκίνο (110). Επιπροσθέτως, οι χημειοκίνες στοχεύουν άμεσα τα καρκινικά κύτταρα ή τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα δρώντας αυτοκρινώς ή παρακρινώς ρυθμίζοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την αγγειογένεση, τη διείσδυση και την επακόλουθη μετάσταση του όγκου (111). Οι υποδοχείς χημειοκινών στα καρκινικά κύτταρα, τα κατευθύνουν σε συγκεκριμένες θέσεις που ευνοούν το σχηματισμό μεταστάσεων (premetastatic niche). Συγκεκριμένα, στις μεταστατικές εστίες εκκρίνονται χημειοκίνες οι οποίες προσελκύουν τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα μέσω βαθμίδωσης συγκέντρωσης (112). Όλες οι παραπάνω δράσεις των χημειοκινών οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το δίκτυο των χημειοκινών θα μπορούσε να στοχευθεί στον καρκίνο και να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με τις κλασσικές θεραπείες και την ανοσοθεραπεία. Στον Πίνακα 3 συνοψίζεται ο ρόλος ορισμένων χημειοκινών στην πρόοδο του καρκίνου.



Εικόνα 12. Ο ρόλος των χημειοκινών στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Σε απόκριση της έκκρισης χημειοκινών, διαφορετικοί τύποι κυττάρων του ανοσοποιητικού μεταναστεύουν εντός του μικροπεριβάλλοντος του όγκου (immune cell trafficking) και ρυθμίζουν ανοσολογικές αποκρίσεις. Επίσης, οι χημειοκίνες δρούν αυτοκρινώς ή παρακρινώς ελέγχοντας κύριες διαδικασίες όπως η διείσδυση, η αγγειογένεση και η μετάσταση του όγκου. (Zhu et al., 2012) (114)

## Πίνακας 3. Οι λειτουργίες ορισμένων χημειοκινών στο μικροπεριβάλλον του όγκου (Nagarsheth et al., 2017) (110)

Table 1   Chemokine functions in the tumour microenvironment				
Chemokine	Effects on immune cell trafficking into the tumour or bone marrow	Direct effects on tumour cells	Indirect effects on tumour cells	Refs
Chemokines with pro-	-tumour roles			
CCL2	Recruitment of monocytes, NKT cells and monocytic MDSCs	Promotes tumour cell proliferation, stemness and survival	Promotes tumour vascularization, and cancer extravasation and metastasis	93–97,99,100
CCL3	Recruitment of monocytes and macrophages	ND	Promotes cancer extravasation	97
CCL5	Recruitment of monocytes and macrophages	Drives metastasis	Promotes cancer invasion	76,97,103
CCL18	ND	Promotes invasion and metastasis	ND	105–109
CCL25	ND	Promotes chemoresistance, and tumour invasion and metastasis	ND	116–120,122
CXCL8	Recruitment of neutrophils and granulocytic MDSCs	Promotes stemness, invasion and migration; apoptosis; resistance to hypoxia; and premature senescence	Promotes angiogenesis	126-129,132-135
CXCL12	Recruitment of Bcells and pDCs; and recruitment of $T_{\rm reg}$ cells into the bone marrow	Promotes proliferation and survival; drives invasion and metastasis; and promotes stemness	Promotes angiogenesis	For CXCR4: 26,136,139–144,146 For CXCR7: 148,150,153,154
CXCL14	Recruitment of DCs	Promotes invasion and motility	ND	190
CXCL17	Recruitment of granulocytic MDSCs	ND	Promotes angiogenesis	163,164,216
Chemokines with antitumour roles				
CXCL8	Recruitment of neutrophils and granulocytic MDSCs	Increases the immunogenicity of the tumour	ND	166
CXCL9 and CXCL10	Recruitment of T cells and NK cells	ND	Angiogenesis inhibitors	169–171
CXCL14	Recruitment of DCs	Inhibits proliferation, invasion and metastasis; increases apoptosis	ND	158,161,174

CCL, CC-chemokine ligand; CXCL, CXC-chemokine ligand; CXCR, CXC-chemokine receptor; DC, dendritic cell; MDSC, myeloid-derived suppressor cell; ND, not defined; NK, natural killer; NKT, natural killer T; pDC, plasmacytoid DC; T<sub>res</sub> cell, regulatory T cell.

# 1.4.3 Οι αγγειογενετικές χημειοκίνες ERL+ CXC στον καρκίνο του παχέος εντέρου

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι CXC χημειοκίνες που φέρουν το μοτίβο ERL και οι υποδοχείς τους έχουν αγγειογενετική δράση, ενώ η χημειοκίνη CXCL12 (SDF-1), η οποία δεν φέρει το μοτίβο αυτό, εμφανίζει ισχυρή αγγειογόνο δράση (113). Η οικογένεια των αγγειογενετικών ERL<sup>+</sup> χημειοκινών αποτελείται από τις CXCL1, CXCL2, CXCL3 οι οποίες χαρακτηρίζονται από μεγάλη ομολογία (>80%) και τις CXCL5, CXCL6, CXCL8 (Εικόνα 11)(114). Οι CXC ERL<sup>+</sup> χημειοκίνες δρούν κυριώς μέσω των υποδοχέων CXCR1 ή CXCR2 ενώ κάποιες προσδένονται και στους δύο υποδοχείς. Οι χημειοκίνες αυτές κατά

κύριο λόγο έχουν τη δυνατότητα να προσελκύουν λευκοκύτταρα τα οποία εκκρίνουν αγγειογενετικούς παράγοντες επηρεάζοντας την αγγειογένεση. Επιπλέον, οι CXC ERL<sup>+</sup> χημειοκίνες επάγουν την αγγειογένεση μέσω σύνδεσης με τους υποδοχείς τους οι οποίοι εκφράζονται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων, οδηγώντας σε άυξηση της κυτταρικής μετανάστευσης, του πολλαπλασιασμού και σε κάποιες περιπτώσεις σε μειωμένη απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων (113). Κάποιες από τις χημειοκίνες δρούν συνεργατικά με άλλους αγγειογενετικούς παράγοντες, όπως στην περίπτωση της CXCL8, η οποία όπως έχει βρεθεί επάγει την έκφραση του VEGF ο οποίος μέσω θετικής ανατροφοδότησης (positive feedback) οδηγεί σε αυξημένη έκφραση των παραπάνω χημειοκινών (115). Η έκφραση όλων των CXC ERL+ χημειοκινών έχει αναφερθεί τόσο σε καρκινικές σειρές του παχέος εντέρου όσο και σε in vivo μοντέλα καρκίνου του παχέος εντέρου και ο ρόλος τους έχει συσχετιστεί, εκτός από την αγγειογένεση, και με άλλες διαδικασίες της καρκινογένεσης, όπως η μετάβαση επιθηλίου σε μεσέγχυμα (EMT), η διείσδυση και η μετάσταση (116). Επίσης, έχει ανιχνευθεί η αυξημένη έκφρασή τους σε όγκους του παχέος εντέρου και ειδικότερα οι CXCL1, CXCL2, CXCL5 και η CXCL8 έχουν συσχετιστεί με χαμηλά ποσοστά επιβίωσης των ασθενών. Η βιβλιογραφία που αφορά το ρόλο των CXC ERL+ χημειοκινών στον καρκίνο του παχέος εντέρου συνοψίζεται στον Πίνακα 4. Οι χημειοκίνες που έχουν μελετηθεί εκτενέστερα στον καρκίνο του παχέος εντέρου είναι οι CXCL1, CXCL5 και η CXCL8. Οι CXCL1 και CXCL5 έχει βρεθεί ότι εμφανίζουν υψηλότερη έκφραση στα καρκινώματα σε σχέση με τα αδενώματα του παχέος εντέρου, γεγονός που τις συσχετίζει με προχωρημένου βαθμού κακοήθεια (117). Πιο συγκεκριμένα, παρόλο που η ολική συγκέντρωση της CXCL1 σε όγκους του παχέος εντέρου ήταν υψηλότερη σε σχέση με τη συγκέντρωση της CXCL5, μέσω ανοσοιστοχημικής ανάλυσης παρατηρήθηκε εντονότερη έκφραση της CXCL5 στα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα σε σχέση με την έκφραση της CXCL1. Επιπλέον, σε ορό ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου σταδίου IV τα επίπεδα της CXCL5 ήταν διπλάσια σε σχέση με τα επίπεδα της CXCL5 σε ορό ασθενών σταδίου Ι, γεγονός που καθιστά η CXCL5 έναν υποψήφιο προγνωστικό δείκτη (118). Πρόσφατα, όπως θα αναλυθεί παρακάτω, έχει μελετηθεί ο ρόλος της CXCL5 στη μετάβαση επιθηλίου προς μεσέγχυμα και τη μετάσταση στον καρκίνο του παχέος εντέρου (119). Αντίθετα, ο ρόλος της CXCL5 στη νεοπλασματική αγγειογένεση δεν είναι πλήρως διευκρυνισμένος, σε αντίθεση με τις CXCL1 και CXCL8.

Chemokine	Original name	Receptors	Angiogenic role	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> studies	Clinical significance
CXCL1	GRO- $\alpha$ growth related oncogene $\alpha$	CXCR2	(120)(121)	(122)(123) (124)	(125)(126) (117)
CXCL2	GRO- $β$ growth related oncogene $β$	CXCR2	?	?	(127)
CXCL3	GRO- $\gamma$ growth related oncogene $\gamma$	CXCR2	?	(124)	(128)
CXCL5	ENA-78 Epithelial cell derived neutrophil activating factor 78	CXCR2	?	(129)(119)	(117)(129) (130)(119)
CXCL6	GCP-2 Granulocyte chemoattractant protein 2	CXCR1 CXCR2	?	(132)	(117)
CXCL8	IL-8 interleukin 8	CXCR1 CXCR2	(133)(134) (135)	(135)(136) (137)(138)	(138)(139) (140)(141)

Πίνακας 4. Οι CXC ERL<sup>+</sup> χημειοκίνες στον καρκίνο του παχέος εντέρου

## 1.4.4 Η ρύθμιση και η καθοδική σηματοδότηση της χημειοκίνης CXCL5 στα καρκινικά κύτταρα

Η χημειοκίνη CXCL5 (C-X-C motif chemokine 5) ή ENA-78 (Neutrophil-Activating Peptide 78), όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ανήκει στην οικογένεια των CXC ERL<sup>+</sup> χημειοκινών και εκκρίνεται από πολλούς κυτταρικούς τύπους, όπως τα μονοκύτταρα, τα ενδοθηλιακά, τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα, τα επιθηλιακά κύτταρα τύπου ΙΙ στις πνευμονικές κυψελίδες, τα καρδιομυοκύτταρα αλλά και τα καρκινικά κύτταρα (142)(143)(144). Η CXCL5 εκκρίνεται σε απόκριση της επαγωγής των κυττάρων από φλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως η IL1β και ο TNFa, δρά μέσω του υποδοχέα CXCR2 και ο κύριος ρόλος της είναι η προσέλκυση ουδετερόφιλων στο σημείο της φλεγμονής (145). Η έκφραση της CXCL5 έχει συνδεθεί με χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα όπως η αρθρίτιδα, η χρόνια παγκρεατίτιδα, η ελκώδης κολλίτιδα και η αθηροσκλήρωση (142)(146). Η υψηλή έκφραση της CXCL5 έχει παρατηρηθεί σε πολλές μορφές καρκίνου

και ορισμένες από αυτές είναι ο καρκίνος του ήπατος, του μαστού, του προστάτη, του παγκρέατος και του παχέος εντέρου (147). Επιπλέον, στους περισσότερους τύπους καρκίνου η έκφραση της CXCL5 έχει συνδεθεί με προχωρημένα στάδια της νόσου, δυσμενή πρόγνωση αλλά και με χαρακτηριστικά διείσδυσης και μετάστασης των όγκων (148)(149). Τα αυξημένα επίπεδα της CXCL5 έχουν συσχετιστεί με την ολική επιβίωση (Overall survival, OS) ασθενών με ηπατικό καρκίνωμα και χολαγγειοκαρκίνωμα, ενώ δεν υπάρχει αντίστοιχη συσχέτιση σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα και του παχέος εντέρου. Πρόσφατα έχει αναφερθεί ότι η CXCL5 εμπλέκεται στη μετάσταση και την διεισδυτικότητα προσελκύοντας κατασταλτικά κύτταρα μυελοειδούς προέλευσης (MDSCs) στο εσωτερικό των όγκων (150)(151). Μια πολύ πρόσφατη μελέτη αναφέρει ότι σε μεταστατικούς όγκους (από καρκινικά κύτταρα του προστάτη) στα οστά ποντικών, η επαγωγή της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων (μετά από χορήγηση φαρμάκου) στον όγκο συνδέεται με αυξημένα επίπεδα της CXCL5, διείσδυση φλεγμονοδών κυττάρων και επιτάχυνση της ανάπτυξης του όγκου (152). Σε πολλούς τύπους καρκίνου, η CXCL5 που εκκρίνεται από τα καρκινικά κύτταρα επάγει τη μετάσταση δρώντας αυτοκρινώς και επηρεάζοντας τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και τη διείσδυση των καρκινικών κυττάρων.

Τα σηματοδοτικά μονοπάτια από τα οποία μεσολαβούνται οι παραπάνω δράσεις της CXCL5 στα καρκινικά κύτταρα έχουν μελετηθεί εκτενώς. Σε καρκινικά κύτταρα του ήπατος η CXCL5 επάγει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των κυττάρων επάγοντας τις ERK 1/2, JNK και p38 MAP κινάσες αλλά και το σηματοδοτικό άζονα της PI3K/AKT (153). Παρόμοια ευρήματα παρουσιάζονται και σε καρκινικά κύτταρα της ουροδόχου κύστης στα οποία η CXCL5 αυξάνει τη μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων μέσω ενεργοποίησης της PI3K/AKT και ακολούθως σε αύξηση της έκφρασης των μεταλλοπρωτεϊνασών MMP2/MMP9 (154). Επιπλέον, στον ίδιο τύπο καρκινικών κυττάρων μέσω ρύθμισης των πρωτεϊνών Bcl2, Bax και Caspase3 (155). Τα αποτελέσματα σχετικά με τη ρύθμιση των Bcl2 και Bax επιβεβαιώθηκαν και από ακόμη μια μελέτη στην οποία παρουσιάζεται ότι η υπερέκφραση της CXCL5 οδηγεί σε αύξηση της Bcl2, μείωση της Bax αλλά οδηγεί και σε ρύθμιση άλλων κύριων ρυθμιστικών μορίων για την ανάπτυξη του καρκίνου όπως το p53 (μείωση της έκφρασης) και ο VEGF (αύξηση της έκφρασης) (156). Επιπροσθέτως, η CXCL5 προάγει την ανάπτυξη του καρκίνου μέσω αύξησης και ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα Snail ο οποίος ρυθμίζει τη μετάβαση επιθηλίου σε μεσέγχυμα (ΕΜΤ) σε πολλούς τύπους καρκίνου. Ειδικότερα, η CXCL5 που εκκρίνεται από οστεοβλάστες ενεργοποιεί τον άξονα ERK/MSK1/Elk-1/Snail και οδηγεί σε μειωμένη έκφραση της E-cadherin σε καρκινικά κύτταρα του μαστού (157). Ένα ακόμα παράδειγμα της συσγέτισης της CXCL5 με το μεταγραφικό παράγοντα Snail αποτελεί η ρύθμιση της EMT από τη CXCL5 σε καρκινικά κύτταρα του ήπατος μέσω του άξονα PI3K/AKT/GSK-3β/Snail (158). Ακόμη, η CXCL5 ενεργοποιεί το Snail μέσω της EGR-1 (Early growth response protein 1) σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη (159). Μέχρι πρόσφατα δεν είχε διευκρινιστεί η καθοδική σηματοδότηση της CXCL5 η οποία επάγει τη μετάσταση στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Μια πρόσφατη μελέτη, επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα των προηγούμενων μελετών σε άλλους τύπους καρκίνου και παρουσιάζει ότι η έκτοπη έκφραση της CXCL5 σε καρκινικά κύτταρα του παγέος εντέρου (HCT116, SW480) επάγει την ΕΜΤ μέσω του άξονα ERK/Elk-1/Snail και τη διείσδυση μέσω της σηματοδότησης AKT/GSK3β/MMP7 και τα γεγονότα αυτά είναι εξαρτώμενα από τον υποδοχέα CXCR2 (119) (Εικόνα 13). Στη μελέτη αυτή, αποδείχθηκε και ο ρόλος της σηματοδότησης των CXCL5/CXCR2 στη μετάσταση των κυττάρων του παχέος εντέρου στο ήπαρ σε in vivo μοντέλο σε ποντίκια.



Εικόνα 13. Η επαγωγή της μεταστατικότητας των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου από τη σηματοδότηση των CXCL5/CXCR2. Η CXCL5 που εκκρίνεται από τα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου προάγει την μετανάστευση των κυττάρων, επάγωντας τη μετάβαση επιθηλίου σε μεσέγχυμα (Epithelial Mesenchymal Transition, EMT) μέσω του άζονα ERK/Elk-1/Snail. Επίσης, η CXCL5 προάγει τη διείσδυση των καρκινικών κυττάρων μέσω της ενεργοποίησης της σηματοδότησης ΑΚΤ/GSK3β η οποία αναστέλλει την αποικοδόμηση της β-catenin. Η συσσωρευμένη β-catenin από το κυτταρόπλασμα οδηγείται στον πυρήνα και επάγει την έκφραση της μεταλλοπρωτεϊνάσης MMP7, η οποία είναι υπεύθυνη για τη διείσδυση. (Zhao et al., 2017) (119)

Η έκφραση της CXCL5 στα καρκινικά κύτταρα επάγεται από αυξητικούς παράγοντες και κυτταροκίνες όπως οι EGF, TNF-a, IL-1b και IL-17 (160). Ειδικότερα, σε καρκινικές σειρές ηπατοκυτταρικού καρκινώματος το μονοπάτι του EGF/EGFR καθώς και η ενεργοποίηση των καθοδικών αξόνων της PI3K και των ERK κινασών, επάγουν την έκφραση της CXCL5 (161). Σε κύτταρα νεφροκυτταρικού καρκινώματος έχει δειχθεί ότι ο άζονας PI3K/AKT/NF-kB καθοδικά του υποδοχέα ανδρογόνων (Androgen receptor, AR) οδηγεί σε αυξημένη έκφραση της CXCL5 (162). Επίσης, οι TNF-a, IL-1b και IL-17 δρώντας συνεργατικά επάγουν την έκφραση της CXCL5 μέσω ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NF-kB (160). Η ρύθμιση της έκφραση της CXCL5 έχει συνδυαστεί με το μεταγραφικό παράγοντα KLF4 αλλά και με τον υποδοχέα τυροσινικών κινασών RON σε καρκινικά κύτταρα του οισοφάγου στο ποντίκι και σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του προστάτη αντίστοιχα (163)(164). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η ιντερλευκίνη IL27 καταστέλλει την έκφραση της CXCL5 μέσω μεταγραφικού παράγοντα STAT1 σε καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα (165). Οι περισσότεροι από τους μηχανισμούς ρύθμισης της CXCL5 καθώς και από τα καθοδικά σηματοδοτικά μονοπάτια της CXCL5 που αναφέρθηκαν παραπάνω συνοψίζονται στην Εικόνα 14.



Εικόνα 14. Η ρύθμιση της έκφρασης και τα καθοδικά σηματοδοτικά μονοπάτια της CXCL5 στα καρκινικά κύτταρα. (Xia et al., 2015) (160)

#### 1.4.5 Οι αγγειογενετικές αποκρίσεις της χημειοκίνης CXCL5 στον καρκίνο

Η χημειοκίνη CXCL5 στο μικροπεριβάλλον του όγκου, εκτός από το ρόλο της στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού, της μετανάστευσης, της διείσδυσης και της ΕΜΤ των καρκινικών κυττάρων, αλλά και το ρόλο της στη φλεγμονή, επιδρά και στα ενδοθηλιακά κύτταρα επηρεάζοντας την αγγειογένεση. Λειτουργικά *in vitro* πειράματα αποδεικνύουν ότι η CXCL5 επάγει τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων ή το σχηματισμό τριχοειδών αγγειακών δομών από τα ενδοθηλιακά κύτταρα

(148)(162)(166)(167) αλλά και σε in vivo μοντέλο της αγγειογένεσης του κερατοειδούς (rat corneal micropocket assay) έχει δειχθεί ότι η αναστολή της CXCL5 μειώνει την αγγειογένεση (168). Σε μια πολύ πρόσφατη μελέτη, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε μοντέλο μελανώματος σε ποντίκι, η υπερέκφραση της CXCL5 οδηγεί σε αυξημένη λεμφαγγειογένεση των όγκων (169). Επίσης, τα αυξημένα επίπεδα της CXCL5 έχουν συσχετιστεί με την αύξηση της μικροαγγειακής πυκνότητας (microvascular density) σε όγκους μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, γαστρικού καρκίνου και παγκρεατικού καρκίνου (148)(168)(170). Παρόλο που η CXCL5 έχει αναφερθεί ως ρυθμιστής της νεοπλασματικής αγγειογένεσης στους τύπους καρκίνου που αναφέρθηκαν παραπάνω, ο ρόλος της στην πρόοδο της αγγειογένεσης στον καρκίνο του παχέος εντέρου δεν έχει μελετηθεί εκτενώς. Με βάση τα δεδομένα που αναλύθηκαν παραπάνω, η υπερέκφραση της CXCL5 φαίνεται ότι εντοπίζεται στο στάδιο των καρκινωμάτων του παχέος εντέρου το οποίο είναι ένα κρίσιμο σημείο για τη στόχευση των όγκων αυτών και συνεπώς είναι αναγκαία η αποσαφήνιση του ρόλου της CXCL5 στη αγγειογένεση τέτοιων όγκων. Τα αποτελέσματα από τους άλλους τύπους καρκίνου αποδεικνύουν ότι η CXCL5 θα μπορούσε να μελετηθεί ως ένας υποψήφιος στόχος της νεοπλασματικής αγγειογένεσης ο οποίος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί βελτιώνοντας την αποτελεσματικότητα των παραγόντων που ήδη χρησιμοποιούνται στην αντιαγγειογενετική θεραπεία.

### Σκοπος

Στο 10-30% των περιπτώσεων καρκίνου του παχέος εντέρου το ογκονίδιο *PIK3CA*, εμφανίζει ετερόζυγες μη-νοηματικές μεταλλάξεις με πιο συχνές αυτές του εξωνίου 9 (E545K) και του εξωνίου 20 (H1047R). Η ανάπτυξη αναστολέων των μεταλλαγμένων μορφών της PI3K, λόγω της κεντρικής της θέσης στη σηματοδότηση υπό φυσιολογικές συνθήκες, αναμένεται να μειώσει τις παρενέργειες της θεραπείας του καρκίνου του παχέος εντέρου. Η περαιτέρω εξειδικευμένη στόχευση στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου θα μειώσει ακόμη περισσότερο τις επιπτώσεις στα φυσιολογικά κύτταρα.

Όπως όλοι οι συμπαγείς όγκοι έτσι και αυτοί του παχέος εντέρου απαιτούν αγγειογένεση για την ανάπτυξή τους, με αποτέλεσμα οι αντιαγγειογενετικές θεραπείες να χρησιμοποιούνται πλέον στη κλινική πράξη παράλληλα με τις κλασσικές χημειοθεραπείες. Επειδή στον καρκίνο του παχέος εντέρου η αγγειογένεση ρυθμίζεται από την PI3K χωρίς να είναι γνωστοί οι μοριακοί μηχανισμοί, ο σκοπός της παρούσας διατριβής είναι:

- Η μελέτη μορίων-ρυθμιστών της αγγειογένεσης οι οποίοι ενεργοποιούνται καθοδικά των μεταλλάξεων E545K και H1047R σε ισογονιδιακές κυτταρικές σειρές τους παχέος εντέρου
- Η ταυτοποίηση του βασικού (ενός ή περισσοτέρων) PI3K (E545K)-ρυθμιζόμενου αγγειογενετικού μορίου και η γονιδιακή αποσιώπησή του με το σύστημα CRISPR-Cas9 στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου
- Ο λειτουργικός χαρακτηρισμός των επιδράσεων του αγγειογενετικού μορίου in vitro και σε δοκιμασίες μετάστασης και ογκογένεσης/αγγειογένεσης σε ποντίκια.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 2.1 Κυτταροκαλλιέργεια

Στα πειράματα της παρούσας διατριβής χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα κύτταρα προεργόμενα από αδενοκαρκίνωμα του παγέος εντέρου (Duke's type C) DLD1, ανθρώπινα κύτταρα από καρκίνωμα του παγέος εντέρου HCT116 καθώς και γονιδιακά τροποποιημένες κυτταρικές σειρές που προέκυψαν από τις παραπάνω και περιγράφονται αναλυτικά στο κεφάλαιο 4.5. Όλες οι κυτταρικές σειρές του παχέος εντέρου ήταν μια ευγενική προσφορά του καθηγητή Bert Vogelstein (The John Hopkins Medical Institutions, Baltimore, MD) και η διαδικασία κατασκευής των τροποποιημένων κυτταρικών σειρών περιγράφεται αναλυτικά στις αναφορές (63) και (171). Όλες οι κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό Mc Coy's 5A (GE Healthcare-HyClone, Chicago, Illinois, USA) εμπλουτισμένο με 10% εμβρυϊκό ορό βοός (Fetal Bovine Serum, FBS) (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) θερμικά απενεργοποιημένο και 100 units/ml πενικιλίνη και 100 μg/ml στρεπτομυκίνη. Οι γονιδιακά τροποποιημένες σειρές HCT116 WT & MUT και DLD1 WT & MUT καλλιεργήθηκαν παρουσία αντιβιοτικού 0.4 mg/ml G418 (A1720, Sigma Aldrich, MO, USA). Όταν τα κύτταρα κάλυπταν όλη την επιφάνεια του τρυβλίου, γινόταν διασπορά των κυττάρων σε αραίωση 1 προς 4, περίπου κάθε 3 ημέρες.

Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύττταρα προερχόμενα από φλέβα ομφάλιου λώρου (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC) απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν σε επιστρωμένα με κολλαγόνο αρουραίου τύπου 1 (Corning, New York, USA) τρυβλία των 10cm. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό M199 εμπλουτισμένο με 20% FBS, 0.5 mg/ml ECGS, 0.15 units ηπαρίνης/ml (H-3149, Sigma-Aldrich, MO, USA), 100 units/ml πενικιλίνη και 100 μg/ml στρεπτομυκίνη. Ο ECGS που χρησιμοποιήθηκε είναι απομονωμένος από εγκέφαλο βοός σύμφωνα με το πρωτόκολλο (3). Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα μεικτού πληθυσμού (τουλάχιστον από 5 δότριες τη φορά) από γενιά 1-4 και η διασπορά γινόταν σε αραίωση 1 προς 3, περίπου κάθε δύο ημέρες. Ανθρώπινα εμβρυϊκά κύτταρα από νεφρό ανθρώπου 293T (Human embryonic kidney cells 293T, HEK 293T) καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM High glucose εμπλουτισμένο με 10% FBS, 100 units/mL πενικιλίνη, 100 μg/mL στρεπτομυκίνη και η διασπορά τους γινόταν σε αραίωση 1 πρός 5 περίπου κάθε δύο ημέρες.

Όλα τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στις κυτταροκαλλιέργειες ήταν ελεύθερα ενδοτοξίνης. Τα θρεπτικά υλικά και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν αγοράστηκαν από την HyClone (GE Healthcare-HyClone, Chicago, Illinois, USA). Όλα τα κύτταρα ελέγχονταν τακτικά για μυκόπλασμα και τα ενδοθηλιακά επιπλέον για ενδοθηλιακούς δείκτες. Ο χειρισμός των κυττάρων γινόταν σε εστία κάθετης νηματικής ροής και τα κύτταρα αναπτύσσονταν σε επωαστικό κλίβανο, στον οποίο η θερμοκρασία διατηρούταν σταθερή στους 37 °C, επικρατούσαν συνθήκες υγρασίας και η ατμόσφαιρα ήταν εμπλουτισμένη με 5% CO<sub>2</sub>.

## **2.2 Απομόνωση ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων από φλέβα ομφάλιου** λώρου

Σε φρέσκο ομφάλιο λώρο με τη βοήθεια μιας σύριγγας εντοπίστηκε με ψηλάφηση η φλέβα του λώρου η οποία πλύθηκε με 20 ml PBS (Phosphate Buffered saline). Στη συνέχεια, το κάτω άκρο του λώρου κρατήθηκε κλειστό, με τη βοήθεια αποστειρωμένων αιμοστατών, και διαποτίστηκε η φλέβα με 0.1% κολλαγενάση διαλυμένη σε PBS. Ακολούθησε επώαση του λώρου τοποθετημένου σε PBS στο υδατόλουτρο στους 37 °C για 12 λεπτά, πλύσιμο με 10ml θρεπτικό υλικό M199 εμπλουτισμένο με 5% FBS και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 500 g. Τέλος, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και επαναιωρήθηκε το κυτταρικό ίζημα σε πλήρες θρεπτικό υλικό M199 (4).

#### 2.3 Αλληλούχιση γενωμικού DNA

Το συνολικό γενωμικό DNA των κυτταρικών σειρών HCT116 WT και MUT και DLD1 WT και MUT απομονώθηκε με τη βοήθεια του εμπορικού προϊόντος Nucleospin Tissue (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co KG) και στη συνέχεια μια ποσότητα των DNA από κάθε κυτταρική σειρά στάλθηκε στην εταιρεία Eurofins Genomics (Γερμανία) για την αλληλούχιση. Συγκεκριμένα, για την κυτταρική σειρά HCT116 πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση του DNA στο σημείο του εξωνίου 20 (όπου εντοπίζεται η μετάλλαξη H1047R) και αντίστοιχα για την κυτταρική σειρά DLD1 στο σημείο του εξωνίο 9 (όπου εντοπίζεται η μετάλλαξη E545K).

#### 2.4 Απομόνωση και έλεγχος RNA

Το συνολικό RNA των κυττάρων απομονώθηκε με τη χρήση του εμπορικού προϊόντος NucleoSpin RNA (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co KG). Η συγκέντρωση του RNA σε κάθε δείγμα μετρήθηκε με το μηχάνημα NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Επιπλέον, με το παραπάνω μηχάνημα ελέγθηκε η ποιότητα της απομόνωσης μέσω του λόγου της απορρόφησης των δειγμάτων στα 260 nm προς την απορρόφηση στα 280 nm. Δείγματα για τα οποία ο λόγος 260/280 ήταν μεταξύ 1.8-2 θεωρήθηκαν υψηλής καθαρότητας.

## 2.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης (RT-PCR)- Επάλληλη PCR (Nested PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε συνδυασμό με αντίστροφη μεταγραφάση επιτρέπει την πολλαπλή αντιγραφή αλληλουχιών RNA. Στη διαδικασία αυτή, οι RNA αλληλουχίες αρχικά μετατρέπονται σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) μέσω του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης (reverse transcriptase) και στη συνέχεια αντιγράφονται πολλαπλά με την κλασική μέθοδο της PCR. Η RT-PCR χρησιμοποιήθηκε στις εξής πειραματικές εργασίες:

Για την ενίσχυση των στοχευμένων αλληλομόρφων του *PIK3CA* στις κυτταρικές σειρές HCT116 και DLD1 πραγματοποιήθηκε επάλληλη PCR ως εξής: Κατά τον πρώτο γύρο πολλαπλής αντιγραφής (PCR1) πραγματοποιήθηκε αντίστροφη μεταγραφή σε συνδυασμό με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με τη βοήθεια της τυποποιημένης συσκευασίας δοκιμασίας (κιτ) PrimeScript One Step RT-PCR (Perfect Real time) kit (RR064A, TAKARA BIO INC.), με χρήση των εκκινητών 1 *PIK3CA* Exon 1- 9 (για τις DLD1 WT και MUT) ή 1 *PIK3CA* Exon 1-20 (για τις HCT116 WT και MUT) (Πίνακας 5). Η αντίδραση έγινε σε όγκο 40 μl που περιείχε 200 ng συνολικού RNA δείγματος (4 μl), 0.3 μΜ από κάθε ολιγονουκλεοτίδιο (forward/reverse) καθώς και 2X One Step RT-PCR

Buffer III (10 μl), TaKaRa Ex Taq HS (0.8 μl), PrimeScript RT enzyme Mix II (0.8 μl) και H<sub>2</sub>O ελεύθερο νουκλεασών ώστε να συμπληρωθεί ο όγκος των 40 μl, όπως υποδεικνύεται στις οδηγίες του κιτ. Εν συνεχεία, χρησιμοποιήθηκε το προϊόν της αντίδρασης αυτής (2 μl) και πραγματοποιήθηκε μια δεύτερη κλασική PCR (PCR 2) με τη βοήθεια του προϊόντος Thermo Scientific Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (F530S, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), σε τελικό όγκο 20 μl. Στην αντίδραση χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών **2** *PIK3CA* Exon 1-9 και (4 μM από κάθε ολιγονουκλεοτίδιο), 5X Phusion HF Buffer (4 μl), 10mM dNTPs (0.4 μl), Phusion DNA Polymerase (0.2 μl) και H<sub>2</sub>O ελεύθερο νουκλεασών ώστε να συμπληρωθεί ο όγκος των 20 μl, όπως υποδεικνύεται στις οδηγίες του κιτ. Τέλος, το προϊόν της δεύτερης PCR στάλθηκε για αλληλούχιση στην εταιρεία Eurofins Genomics (Γερμανία). Όλες οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν σε μηχάνημα Thermal Cycler και οι συνθήκες των αντιδράσεων αναγράφονται στον Πίνακα 6. Όλες οι αλληλουχίες εκκινητών αγοράστηκαν από την εταιρεία Eurofins Genomics (Γερμανία) και χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος καθαρισμού HPSF.

Κυτταρικές σειρές	Όνομα ζεύγους εκκινητών	Αλληλουχίες εκκινητών
DLD1 WT/MUT	<b>1</b> <i>PIK3CA</i> Exon 1-9	Forward: 5'-GTATCGCCGCTCCCGATT-3' Reverse: 5'-AACAGACAGAAGCAATTTGGGTAG-3'
DLD1 WT/MUT	<b>2</b> <i>PIK3CA</i> Exon 1-9	Forward: 5'-CGCAGCGCATCGCCTTCTA-3' Reverse: 5'-ACACAATAGTGTCTGTGACTC-3'
HCT116 WT/MUT	<b>1</b> <i>PIK3CA</i> Exon 1-20	Forward: 5'-GTATCGCCGCTCCCGATT-3' Reverse: 5'-CATGAAATTGCGCATTATTCTAAA-3'
HCT116 WT/MUT	<b>2</b> <i>PIK3CA</i> Exon 1-20	Forward: 5'-CGCAGCGCATCGCCTTCTA-3' Reverse: 5'- AATCGGTCTTTGCCTGCT-3'

Πίνακας 5. Αλληλουχίες εκκινητών για τα στοχευμένα αλληλόμορφα του γονιδίου *PIK3CA* 

Πίνακας 6. Συνθήκες των αντιδράσεων αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης PCR1 και PCR2

Στάδια αντίδρασης	DLD1 WT/MUT	HCT116 WT/MUT
Αντίστροφη μεταγραφή	42 °C για 5 min 95 °C για 10 sec	42 °C για 5 min 95 °C για 10 sec
PCR1 (PrimeScript One Step RT-PCR)	1° Στάδιο: 95 °C για 5 sec 2° Στάδιο: 54 °C για 30 sec 40 κύκλοι 3° Στάδιο: 68 °C για 5 min	1° Στάδιο: 95 °C για 15sec 2° Στάδιο: 51 °C για 30sec 40 κύκλοι 3° Στάδιο: 68 °C για 5 min
PCR2 (Phusion High- Fidelity DNA Polymerase)	1° Στάδιο: 98 °C για 30 sec 2° Στάδιο: 98 °C για 10 sec 53 °C για 10 sec 72 °C για 2 min 30 κύκλοι 3° Στάδιο: 72 °C για 10 min	1° Στάδιο: 98 °C για 30 sec 2° Στάδιο: 98 °C για 10 sec 55 °C για 10 sec 72 °C για 3 min 30 κύκλοι 3° Στάδιο: 72 °C για 10 min

### 2.6 Ανάλυση μικροσυστοιχιών (Microarray analysis)

Η τεχνική της ανάλυσης μικροσυστοιχιών επιτρέπει τον έλεγχο της διαφορικής γονιδιακής έκφρασης σε δείγματα RNA. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην ιδιότητα υβριδοποίησης του DNA αλλά και στην ακινητοποίηση μεγάλου αριθμού τμημάτων γονιδιωματικού DNA (probes) σε στερεό υπόστρωμα (πλακίδιο ή chip) με την βοήθεια της νανοτεχνολογίας. Τα τμήματα αυτά μπορούν να υβριδοποιηθούν με συμπληρωματικά τμήματα cDNA και αμέσως μετά την υβριδοποίησή τους, πραγματοποιείται εκπομπή φθορισμού η οποία οδηγεί σε ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του mRNA. Στην παρούσα εργασία, για την ανάλυση μικροσυστοιχιών χρησιμοποιήθηκε το σύστημα Affymetrix GeneChip Gene 1.0 ST (Affymetrix, Santa Clara, CA)(174)(175). Συνοπτικά, στο σύστημα αυτό, από το mRNA δείγμα, δημιουργούνται βιοτινυλιωμένα αντισημαίνοντα τεμάχια RNA (biotinylated anti-sense cRNA) τα οποία υβριδοποιούνται με μονόκλωνα ολιγονουκλεοτίδια μεγέθους 25 bps στο chip και τα επίπεδα του υβριδισμού μετρώνται μετά από την σήμανση με βιοτίνη-στρεπταβιδίνη συζευγμένη με φυκοερυθρίνη.

Για την μελέτη της διαφορικής γονιδιακής έκφρασης μεταξύ των κυτταρικών σειρών HCT116 WT και MUT αλλά και των DLD1 WT και MUT, τα κύτταρα καλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό Mc Coy's 5Α εμπλουτισμένο με 0.5% FBS για 19 ώρες. Μετά το χρονικό διάστημα αυτό απομονώθηκε και μετρήθηκε RNA από όλες τις περιγράφηκε εδάφιο κυτταρικές σειρές όπως στο 3.4. Oι απομονώσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν, από τρείς διαφορετικές κυτταρικές γενιές. Εν συνεχεία, με σκοπό να ελεγθεί η ποιότητα του RNA που απομονώθηκε, τα δείγματα αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης. Για επιπλέον έλεγγο της ποιότητας του RNA, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις RT-PCR (χρησιμοποιήθηκε το προϊόν PrimeScript One Step RT-PCR (Perfect Real time) kit και το πρωτόκολλο που αναφέρθηκε παραπάνω) με χρήση κατάλληλων εκκινητών (FW: 5' –GAT GGC CTC ATC TTC CCA GAC– 3'/RV: 5' –CAT CCG GTA GTC GGT GGA ACA- 3') για το γονίδιο *PRMT1*(Protein arginine N-methyltransferase 1) και τα προϊόντα αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Τέλος, τα δείγματα RNA για κάθε κυτταρική σειρά και στάλθηκαν στάλθηκαν για ανάλυση μικροσυστοιχιών στο Genomics Core Facility -EMBL Heidelberg (Γερμανία) όπου χρησιμοποιήθηκε το σύστημα Affymetrix Genechip Gene 1.0 ST.

## 2.7 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης-qRT-PCR

Η μέθοδος της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης πραγματικού χρόνου (qRT-PCR) επιτυγχάνει τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του RNA ενός συγκεκριμένου γονιδίου σε ένα δείγμα. Αρχικά, με την παρουσία ενός μίγματος ανάστροφων μεταγραφασών (Omniscript και Sensiscript) παράγεται το συμπληρωματικό DNA (cDNA) από το αγγελειοφόρο RNA (mRNA). Εν συνεχεία, πραγματοποιείται πολλαπλασιασμός του τμήματος του DNA του υπό μελέτη γονιδίου με τη χρήση της HotStarTaq DNA πολυμεράσης η οποία, έχει την ιδιότητα να παραμένει ανενεργή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ενώ η ενζυματική της δράση μπορεί να αρχίσει μετά από επώαση στους 95 °C για 15 λεπτά. Επιπλέον, στην αντίδραση είναι παρούσα και η χρωστική SYBR Green I η οποία συνδέεται στο δίκλωνο DNA και εκπέμπει φθορίζον σήμα το οποίο ανιχνεύεται από τον ειδικό κυκλοποιητή. Ο κύκλος στον οποίο παρατηρείται φθορισμός μεγαλύτερος του βασικού φθορισμού (threshold cycle, Ct)
εξαρτάται από την αρχική συγκέντρωση της αλληλουχίας στόχου (αντιστρόφως ανάλογη). Με την qRT-PCR εκτός από την ποσοτική ανάλυση του προϊόντος της PCR, γίνεται και ποιοτική ανάλυση με βάση τη μελέτη της καμπύλης τήξης (melting curve analysis) που παρέχει πληροφορίες για το σημείο τήξης (T<sub>m</sub>) των ενισχυμένων αλληλουχιών το οποίο είναι συνάρτηση του μήκους και της σύνθεσης των βάσεων του προϊόντος (177).

Η qRT-PCR πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της τυποποιημένης συσκευασίας δοκιμασίας QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) ενός σταδίου και του μηχανήματος Roche LightCycler 2.0 Instrument (Roche Diagnostics GmbH, Manheim, Germany). Όλες οι αντιδράσεις για την qRT-PCR έγιναν σε συνολικό όγκο 10 μl που περιείχε 50 ng συνολικού RNA δείγματος (2 μl), 0.3 μM από κάθε εκκινητή (forward/reverse), 1X διάλυμα SYBR Green, 0.1 μl RT mix ένζυμο και H<sub>2</sub>O ελεύθερο νουκλεασών (DNase/RNase free ddH<sub>2</sub>0) ώστε να συμπληρωθεί ο όγκος των 10 μl. Τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και η θερμοκρασία πρόσδεσης του κάθε ζεύγους εκκινητών σημειώνονται στον Πίνακα 7 και το πρωτόκολλο της αντίδρασης στον Πίνακα 8. Όλες οι αλληλουχίες εκκινητών αγοράστηκαν από την εταιρεία Eurofins Genomics (Γερμανία) και χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος καθαρισμού HPSF.

Όνομα Γονιδίου	Αλληλουχίες εκκινητών	Θερμοκρασία πρόσδεσης εκκινητών (Annealing)
BDNF	Forward: 5'-CAAACATCCGAGGACAAGGTG -3' Reverse: 5'-GCCGAACTTTCTGGTCCTCA -3'	55 °C
TMPRSS4	Forward: 5'-CACGGTGCAATGCAGACG-3' Reverse: 5'-ACACAATAGTGTCTGTGACTC-3'	57 °C
SERPINE 1	Forward: 5'-TCTGCCCTCACCAACATTCTG-3' Reverse: 5'-GACGTGGAGAGGGCTCTTGGTC-3'	57 °C
PODXL2	Forward: 5'-TGCCTTCATTCCCTCAAACC-3' Reverse: 5'-CTGCGTAGAATCCCAGGGTATC-3'	55 °C
CXCL5	Forward: 5'-CAGACCACGCAAGGAGTTCAT-3' Reverse: 5'-CGTTCTTCAGGGAGGCTACC-3'	55 °C
DPP4	Forward: 5'-AGGAAGGAATCTTTATAAAATC- 3' Reverse: 5'-GACCAGGACCGGAACATCTCAG-3'	53 °C
SEMA4A	Forward: 5'-CAACCTGAACTCCTGGAAGCA-3' Reverse: 5'-GACAGGTGGGGGGCAGGG-3'	55 °C
PXDN	Forward: 5'-GCAGCCCAGAGTCACCCC-3' Reverse: 5'-CACACTCATAGCGACCTGCG-3'	55°C
GAPDH	Forward: 5'-GGTGTGAACCATGAGAAGTATGA-3' Reverse: 5'-GAGTCCTTCCACGATACCAAAG-3'	55 °C
AKTI	Forward: 5'-AGGCTCCCCTCAACAACTTC-3' Reverse: 5'-CTCCTCCTCCTCCTGCTTCT-3'	58 °C
AKT2	Forward: 5'-GGTGCCTCCTGCATGTCC-3' Reverse: 5'-CCTCTCGGTCTTCATCAGC-3'	58 °C

Πίνακας 7. Αλληλουχίες γονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στην qRT-PCR

## Πίνακας 8. Συνθήκες της αντίδρασης qRT-PCR

Συνθήκες της αντίδρασης			
Αντίστροφη μεταγραφή	50 °C για 20 min		
Ενεργοποίηση της DNA πολυμεράσης	95 °C για 15 min		
Άνοιγμα της διπλής έλικας (Denaturation)	95 °C για 15 sec	45 κύκλοι	
Πρόσδεση των εκκινητών (Annealing)	52-60 °C για 20 sec		
Επιμήκυνση τους προϊόντος (Extension)	72 °C για 30 sec		

#### 2.8 Μέθοδος γονιδιακής αποσιώπησης CRISPR-Cas

### 2.8.1 Η τεχνολογία CRISPR

Τα τελευταία χρόνια, η τεχνολογία CRISPR έχει ενταχθεί αποτελεσματικά στον τομέα της στοχευμένης γονιδιωματικής τροποποίησης. Η τεχνολογία αυτή βασίζεται στο μηχανισμό επίκτητης ανοσίας που αναπτύσσουν ορισμένα βακτήρια και αρχαία και τους επιτρέπει να εξαλείψουν ξένο γενετικό υλικό προερχόμενο από ιό ή πλασμίδια (177) (178). Το ακρωνύμιο CRISPR δηλώνει την ύπαρξη επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών στο μικροβιακό γονιδίωμα, ανάμεσα στις οποίες παρεμβάλλονται αλληλουχίες παρόμοιου μήκους (spacers) που έχουν προέλθει από ένθεση ξένων γενετικών στοιχείων. Έχουν βρεθεί τρείς διαφορετικοί τύποι μηχανισμού CRISPR με τον τύπο ΙΙ να είναι ο περισσότερο μελετημένος (179).

Με βάση το μηγανισμό CRISPR τύπου ΙΙ, έχει επιτευχθεί γονιδιωματική τροποποίηση σε πλήθος οργανισμών και κυτταρικών τύπων in vitro και in vivo, (180), (181), (182). Για την στόχευση ανθρώπινων κυττάρων, στις περισσότερες περιπτώσεις χρησιμοποιείται ένα συνθετικό μόριο guideRNA (gRNA), (συνδυάζει τις φυσικές ιδιότητες των φυσικών μορίων crRNA και tracrRNA) το οποίο αποτελείται από περίπου 20 νουκλεοτίδια συμπληρωματικά της αλληλουχίας στόχου και η ενδονουκλεάση Cas9 η οποία καθοδηγείται από το gRNA και προκαλεί σπάσιμο στη δίκλωνη αλυσίδα του DNA (Double strand break, DSB) (183)(184). Τα DSBs επιδιορθώνονται από δύο πιθανούς μηγανισμούς, είτε της επιδιόρθωσης με μη ομόλογη σύνδεση άκρων (Non homologous end-joining, NHEJ) είτε της επιδιόρθωσης μέσω ομολογίας (Homology directed repair, HDR). Στη στόχευση των αλληλουχιών από την ενδονουκλεάση Cas9 σημαντικό ρόλο κατέγει η ύπαρξη ενός μοτίβου που ακολουθεί στην αλληλουγία στόγο και ονομάζεται μοτίβο PAM (Protospacer Adjacent motif) (180)(185). Εκτός από την φυσικού τύπου Cas9 (Εικόνα 15Α), χρησιμοποιούνται και μεταλλαγμένες μορφές της. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η μεταλλαγμένη ενδονουκλεάση Cas9D10A η οποία έχει την ικανότητα να δρα δημιουργώντας ρίξεις στη μια αλυσίδα του DNA (186). Έτσι, δεν ενεργοποιείται ο μηχανισμός επιδιόρθωσης με μη ομόλογη σύνδεση άκρων αλλά πραγματοποιείται επιδιόρθωση μέσω της ομόλογης σύνδεσης άκρων (187). Η Cas9D10A είναι ακόμα πιο αποτελεσματική όσο αφορά την εξειδίκευση του στόχου, όταν η στόχευση

πραγματοποιείται από ζεύγος συμπλόκων Cas9-gRNA που έχουν σχεδιαστεί για να δημιουργήσουν γειτονικές ρίξεις στο DNA (188) (Εικόνα 15B) και το σύστημα αυτό ονομάζεται CRISPR-Cas9 διπλής σχάσης/εγκοπής (double nick or dual nickase CRISPR system).Τα gRNA λόγω συμπληρωματικότητας, συνδέονται στην αλληλουχία στόχο ακριβώς δίπλα από το μοτίβο PAM και η σχάση/εγκοπή πραγματοποιείται ~ 3 bps ανοδικά του μοτίβου PAM.



Εικόνα 15. Γονιδιωματική στόχευση μέσω του συστήματος CRISPR-Cas9. A. Η στόχευση πραγματοποιείται μέσω του συμπλόκου του μορίου gRNA και της ενδονουκλεάσης Cas9 φυσικού τύπου που δημιουργεί ρίξεις στη δίκλωνη αλυσίδα του DNA, οι οποίες επιδιορθώνονται είτε της επιδιόρθωσης με μη ομόλογη σύνδεση άκρων (Non-homologous end-joining, NHEJ) είτε επιδιόρθωση μέσω ομολογίας (Homology directed repair, HDR). B. Η στόχευση πραγματοποιείται μέσω ενός ζεύγους συμπλόκων μορίων gRNA και μεταλλαγμένων Cas9 (Cas9D10A) που δημιουργούν γειτονικές ρίξεις στη μια αλυσίδα του DNA και η επιδιόρθωση της ομόλογης σύνδεσης άκρων (HDR). (https://international.neb.com/tools-and-resources/feature-articles/crispr-cas9-and-targeted-genome-editing-a-new-era-in-molecular-biology)

#### 2.8.2 Πλασμιδιακοί φορείς

Για την αποσιώπηση του γονιδίου CXCL5 χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pSpCas9n(BB)-2A-Puro (PX462) (#48141) (189) από την εταιρεία addgene (Εικόνα 16). Το πλασμίδιο αυτό φέρει το γονίδιο έκφρασης της μεταλλαγμένης Cas9D10A από τον οργανισμό S. Pyogenes, γονίδιο αντοχής στο αντιβιοτικό Puromycin καθώς και θέση κλωνοποίησης για ένα μόριο gRNA η μεταγραφή του οποίου ελέγχεται από υποκινητή από υποκινητή U6. Συγκεκριμένα, η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων για το gRNA 1 περιλαμβάνει ελεύθερα άκρα για σύνδεση στο σημείο μεταξύ των θέσεων κοπής του ενζύμου BpiI (245-265 bps).



Εικόνα 16. Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pSpCas9n(BB)-2A-Puro (-px462) (https://www.addgene.org/48141/). Στο χάρτη σημειώνονται οι θέσεις κοπής του ενζύμου BpiI (245-265 bps) μεταξύ των οποίων πραγματοποιήθηκε η εισαγωγή της αλληλουχίας gRNA 1. U6. Συγκεκριμένα, η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων για το gRNA 1 περιλαμβάνει ελεύθερα άκρα για σύνδεση στο σημείο μεταξύ των θέσεων κοπής του ενζύμου BpiI (245-265 bps).

Επίσης, χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pGL3-U6-sgRNA-PGK-puromycin (#51133) (190) από την εταιρεία addgene (Εικόνα 17), το οποίο περιέχει την αλληλουχία του υποκινητή U6 η οποία ακολουθείται από θέση πρόσδεσης για ένα μόριο gRNA. Με ειδικά σχεδιασμένους εκκινητές (από τη θέση 72 bp έως τη θέση 427 bp) ενισχύθηκε η περιοχή του υποκινητή U6 και η θέση πρόσδεσης του gRNA με χρήση του ενζύμου KAPA HiFi PCR kit (KK2101) (Roche Diagnostics GmbH, Manheim, Germany). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50 μl, που περιείχε 10μl HiFi Buffer 1X, 50 ng συνολικού DNA δείγματος (5 μl), 1.5 μl DNTPs (0.3 mM), 1.5 μl από τον κάθε εκκινητή FW/RV (0.3 μM), και 29.5 μl ddH<sub>2</sub>O. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι συνθήκες της αντίδρασης είναι οι εξής:

# U6-gRNA FW: 5'- TCTAGAGGTACCGAGGGCCTATTTC-3' U6-gRNA RV: 5'-TCTAGAAAAAAAGCACCGACTCG-3'

Συνθήκες της αντίδρασης			
Initial Denaturation	95 °C για 3 min		
Denaturation Annealing Extension	98 °C για 20 sec 57 °C για 15 sec 72 °C για 40 sec		
Final extension	72 °C για 1 min		



**Εικόνα 17. Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pGL3-U6-sgRNA-PGK-puromycin** (https://www.addgene.org/51133/). Στο χάρτη σημειώνεται η θέση του υποκινητή U6 η οποία ακολουθείται από θέση πρόσδεσης για ένα μόριο gRNA.

Εν συνεχεία η ενισχυμένη περιοχή που προέκυψε κλωνοποιήθηκε στο πλασμιδιακό φορέα PCR-Blunt με τη βοήθεια του προϊόντος Zero Blunt<sup>™</sup> PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) και προέκυψε ο φορέας PCR-Blunt U6 tracRNA. Για το σχεδιασμό των πλασμιδιακών χαρτών και τη μοντελοποίηση των βημάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό SnapGene.

# 2.8.3 Μονόκλωνοι εκκινητές και υβριδισμός σε δίκλωνα gRNAs (Annealing of oligos)

Με σκοπό τη δημιουργία των gRNAs για τη στόχευση του γονιδίου *CXCL5* σχεδιάστηκαν δύο ζεύγη νουκλεοτιδίων (oligos) 24 και 32 βάσεων αντίστοιχα με την βοήθεια του διαδικτιακού εργαλείου ATUM-crispr design tool και αγοράστηκαν από την εταιρεία Eurofins Genomics (Γερμανία) με τη μέθοδο καθαρισμού HPSF.

gRNA 1 CXCL5	Forward:5'-CACCGAGCTCCTTGTGCGCGCGCTGT-3'
	Reverse: 5'-AAACACAGCGCGCGCACAAG-3'
gRNA 2 CXCL5	Forward: 5'-GGGGACACGGGCCGCGCGCGCGTTTTAGAGCTA-3'
	Reverse: 5'-CTAAAACGCCGCGCGCGCGCGCGTGTCCCCACCGG-3'

Η διαδικασία υβριδοποίησης των μονόκλωνων νουκλεοτιδίων σε δίκλωνα μόρια gRNA πραγματοποιήθηκε ως εξής:

Σε σωληνάρια κάτάλληλα για PCR προστέθηκαν:	Πραγματοποιήθηκε η αντίδραση:
3 μg από κάθε ολιγονουκλεοτίδιο του κάθε	90 °C για 4 min
ζεύγους	70 °C για 10 min
5 μl Annealing buffer	37 °C για 20 min
ddH <sub>2</sub> 0	10 °C για 10 min
Συνολικός όγκος: 50 μl	

# 2.8.4 Αντίδραση σύνδεσης άκρων τμημάτων DNA φορέα και ενθέματος (Ligation)- Βακτηριακός μετασχηματισμός (Transformation)-Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Για την ένωση των πλασμιδιακών φορέων -px462 (μετά από πέψη με το ένζυμο BpiI) και -PCR-blunt U6-tracrRNA (μετά από πέψη με το ένζυμο BplI) με τα δίκλωνα gRNA 1 και gRNA 2 αντίστοιχα και για την ένωση του πλασμιδίου -px462+gRNA 1 CXCL5 με την ένθεση που προέκυψε από την πέψη του πλασμιδίου -PCR-blunt U6-tracrRNA +gRNA 2 CXCL5 με XbaI πραγματοποιήθηκε η παρακάτω αντίδραση με τη χρήση του ενζύμου T4 DNA λιγάση (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) η οποία δημιουργεί φωσφοδιεστερικούς δεσμούς μεταξύ τμημάτων DNA:

Πλασμιδιακός φορέας	1 μl (50 ng)
Ένθεμα	7 µl
T4 DNA ligase (5U/ul)	1 µl
10X Buffer T4 DNA ligase	1 µl
Συνολικός όγκος	10 µl

Ως δείγμα ελέγχου για κάθε φορέα, προετοιμάστηκε μια αντίδραση χωρίς ένθεμα, μόνο με τον πλασμιδιακό φορέα. Οι παραπάνω αντιδράσεις τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία 16 °C σε υδατόλουτρο για ολονύχτια επώαση.

Το πρωτόκολλο του βακτηριακού μετασχηματισμού πραγματοποιήθηκε ως εξής:

- Ανάμιξη ποσότητας 100 μl βακτηρίων DH10B και 5 μl πλασμιδιακού DNA σε σωληνάριο eppendorf και επώαση για 20 λεπτά σε πάγο
- Θερμικό σοκ (heat shock) με επώαση για 4 λεπτά στους 42 °C
- Προσθήκη 1 mL LB (10 g/L Τρυπτόνη, 5 g/L εκχύλισμα ζύμης, 5 g/L NaCl) και επώαση στους 37 °C υπό ανάδευση

Τέλος, πραγματοποιήθηκε επίστρωση 100 μl βακτηριακής καλλιέργειας σε τρυβλίο με LB (παρουσία αντιβιοτικού αντοχής του κάθε πλασμιδιακού φορέα) με χρήση καυτηριασμένου μικροβιολογικού κρίκου. Η επιλογή των αποικιών που αναπτύχθηκαν πραγματοποιήθηκε με χρήση αποστειρωμένου tip. Οι απομονομώνες αποικίες τοποθετήθηκαν σε 3 mL LB (παρουσία αντιβιοτικού) και επωάστηκαν ολονύχτια στους 37 °C υπό ανάδευση για ανάπτυξη μικροκαλλιέργειας. Για την εισαγωγή του προϊόντος της PCR στο πλασμίδιο pCR-Blunt ακολούθησε η διαδικασία που περιγράφεται στις οδηγίες του Zero Blunt<sup>™</sup> PCR Cloning Kit (K270020). Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μικρής κλίμακας καλλιέργεια (miniprep) πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του εμπορικού προϊόντος GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας (maxi-prep) πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του NucleoBond® Xtra Midi (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co KG).

#### 2.8.5 Πέψη πλασμιδιακού DNA με περιοριστικά ένζυμα

Για τις πέψεις των πλασμιδιακών φορέων χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα Eco31I, BpiI (Buffer G), BplI (Buffer Tango), XbaI (Buffer Tango), AgeI (Buffer O), PstI (Buffer O). Οι αντιδράσεις πέψης έγιναν σε όγκο 10 μl (4 μl DNA, 1 μl Buffer 10X, 1 μl ενζύμου και 3 μl ddH<sub>2</sub>O) και επωάστηκαν στους 37 °C για 1 ώρα. Τα περιοριστικά ένζυμα, τα αντίστοιχα Buffer για κάθε ένζυμο και ο δείκτης μοριακών βαρών Lambda DNA/HindIII Marker για την ανάλυση των πέψεων σε πηκτή αγαρόζης 1%, αγοράστηκαν από την εταιρεία Fermentas (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

### 2.8.6 Απομόνωση ζώνης από πηκτή αγαρόζης (Gel extraction)

Μετά την πέψη των πλασμιδίων -px462 και PCR-blunt U6-tracrRNA με το ένζυμο BpiI, το συνολικό προϊόν των πέψεων ηλεκτροφορήθηκε και οι επιθυμητές ζώνες 9153 bps και 3858 bps αποκόπηκαν από την πηκτή αγαρόζης με τη χρήση κοπιδιού και το DNA απομονώθηκε με τη χρήση του προϊόντος Nucleospin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel GmbH & Co.KG). Ομοίως, μετά την πέψη του πλασμιδίου -PCR-blunt U6tracrRNA +gRNA 2 CXCL5 με XbaI, το συνολικό προϊόν της πέψης ηλεκτροφορήθηκε και απομονώθηκε η επιθυμητή ζώνη των 3647 bps.

## 2.8.7 Αποφωσφορυλίωση των άκρων πλασμιδιακού φορέα- Εκχύλιση του πλασμιδιακού DNA με φαινόλη-χλωροφόρμιο (Phenol-chloroform extraction)

Η αποφωσφορυλίωση των άκρων του πλασμιδιακού φορέα πραγματοποιείται από το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η αλκαλική φωσφατάση CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase), #EF0341 (Fermentas, Thermo Fisher Scientific). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε συνολικό όγκο 60μl που περιείχε 50 μl DNA, 1 μl ένζυμο CIAP (1 U/μl), 6 μl 10X Buffer for CIAP και 3 μl ddH<sub>2</sub>0 και επωάστηκε στους 37 °C για 1 ώρα. Εν συνεχεία στην αντίδραση προστέθηκαν 2 μl EDTA 0.5M pH 8 και ακολούθησε επώαση στους 70 °C για 1 ώρα με σκοπό την απενεργοποίηση του ενζύμου.

Για την εκχύλιση του πλασμιδιακού DNA, στο δείγμα DNA με συνολικό όγκο 100 μl προστέθηκαν 50 μl φαινόλη (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O) και 50 μl χλωροφόρμιο (CHCl<sub>3</sub>), ακολούθησε έντονη ανάδευση (vortex) και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 13.000 rpm. Μετά τη φυγοκέντρηση στο δείγμα δημιουργήθηκαν δύο φάσεις (υδατική και φαινολική) και συλλέχθηκε η υδατική που είναι συγκεντρωμένη στο πάνω μέρος. Στην υδατική φάση (περίπου 100 μl) προστέθηκαν 200 μl αιθανόλης (ETOH 100%) και 10 μl οξικό νάτριο (CH<sub>3</sub>COONa) 3M pH 5.2, ακολούθησε έντονη ανάδευση και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 13.000 rpm. Μετά τη φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 100 μl ΕΤΟΗ 70% και το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στα 13.000 rpm. Τέλος, απομακρύνθηκε όλη η ποσότητα της αιθανόλης και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 40μl ddH<sub>2</sub>O. Όλα τα χημικά ήταν από την εταιρεία Sigma-Aldrich.

#### 2.8.8 Διαμόλυνση κυττάρων

Για τη διαμόλυνση με το πλασμίδιο -px462+ 2xgRNAs, κύτταρα DLD1 MUT (100.000 κύτταρα/φρεάτιο) επιστρώθηκαν σε πιάτο καλλιέργειας 6 φρεατίων και την επόμενη ημέρα τα κύτταρα επιμολύνθηκαν με χρήση του αντιδραστηρίου Lipofectamine® 2000 Reagent (Thermo Fisher Scientific) και σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στις οδηγίες του προϊόντος. Για τη διαμόλυνση χρησιμοποιήθηκαν 2.5 μg πλασμιδιακού DNA και το σύμπλοκο διαμόλυνσης DNA-λιπιδίου αραιώθηκε σε θρεπτικό υλικό Mc Coy's 5A χωρίς ορό. Ως δείγμα ελέγχου, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα στα οποία δεν πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση με το πλασμίδιο. Για την επιλογή κυττάρων που έλαβαν το πλασμίδιο, προστέθηκε στο θρεπτικό υλικό καλλιέργειας το αντιβιοτικό Puromycin (1 μg/mL) και η επιλογή των ανθεκτικών κυτταρικών κλώνων ξεκίνησε όταν όλα τα κύτταρα στο δείγμα ελέγχου ήταν νεκρά.

# 2.9 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και ανοσοαποτύπωση κατά Western

Για την απομόνωση των κυτταρικών εκχυλισμάτων, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα φωσφορικών pH 7.0 (PBS) που περιείχε 1% απορρυπαντικού SDS και 100 μM αναστολέα πρωτεασών PMSF. Εν συνεχεία, τα δείγματα υπέστησαν επεξεργασία με υπερήχους (Branson Digital Sonifier) τρείς φορές από 10 δευτερόλεπτα, βράστηκαν για 10 λεπτά και τέλος φυγοκεντρήθηκαν στα 13.000 rpm για 20 λεπτά. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και ακολούθησε μέτρησης πρωτεϊνικής συγκέντρωσης στα κυτταρικά εκχυλίσματα με τη μέθοδο BCA (Bicinchoninic acid) και με χρήση του προϊόντος Pierce<sup>TM</sup> BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Για την πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις BSA (2 μg/μl) και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 562 nm. Στην περίπτωση της απομόνωσης κυτταρικών υπερκειμένων, το υπερκείμενο θρεπτικό υλικό των κυττάρων συλλέχθηκε και φυγοκεντρήθηκε στα 5.000 rpm για 5 λεπτά.

Κυτταρικά εκχυλίσματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) 12% ή 15% και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης Amersham<sup>TM</sup> Protran<sup>TM</sup> 0.45 μM NC (GE Healthcare), σύμφωνα με τις πρότυπες διαδικασίες που

αναφέρονται στο Molecular Cloning, A Laboratory Manual (191). Για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της αποτύπωσης οι πρωτεΐνες βάφτηκαν με Ponceau S (0.1% σε οξικό οξύ 1%) για 2-4 λεπτά και ξεβάφτηκαν με νερό. Οι μεμβράνες επωάστηκαν σε 5% άπαγο γάλα σκόνη σε διάλυμα Western (1 M Tris pH 7.2, 0.1% Tween 20, 150 mM NaCl) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Οι μεμβράνες επωάστηκαν ολονυχτίως με τα πρώτα αντισώματα σε 5% άπαχο γάλα σε διάλυμα Western ή σε διάλυμα 2% Gelatin (from cold water fish skin) σε H<sub>2</sub>O. Στη συνέχεια, ακολούθησαν τρείς πλύσεις των 10 λεπτών σε διάλυμα Western. Τέλος, οι μεμβράνες επωάστηκαν με αντισώματα (antimouse, anti-rabbit) συζευγμένα με τη ραφανιδική υπεροξειδάση (Horse Raddish HRP) από την εταιρεία Jackson ImmunoResearch Europe Ltd Peroxidase, (Cambridgeshire, UK) σε 5% άπαχο γάλα σε διάλυμα Western. Η επώαση πραγματοποιήθηκε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, ακολούθησαν οι ίδιες πλύσεις και η εμφάνιση του σήματος έγινε με το εμπορικό αντιδραστήριο ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Enhanced Chemiluminescence, ECL) της εταιρείας Amersham (GE Healthcare). Τα πρωτογενή αντισώματα που γρησιμοποιήθηκαν για ανοσοαποτύπωση κατά Western είναι τα εξής: anti-CXCL5 (ab126763, Abcam), anti-actin clone C4 (#MAB1501, Merck Millipore), anti-Phospho-Akt (Ser473) (#9271, Cell Signaling), anti-Phospho-Akt (Thr308) (#4056, Cell Signalling).

#### 2.10 Παραγωγή λεντι-ιού H2B-mCherry

### 2.10.1 Διαμόλυνση κυττάρων 293Τ

Με σκοπό την παραγωγή του επιθυμητού λεντι-ιού, ΗΕΚ293Τ κύτταρα (5x10<sup>6</sup>) επιστρώθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας με επιφάνεια 148 cm<sup>2</sup>. Την επόμενη ημέρα όπου τα κύτταρα κάλυπταν περίπου το 70% της επιφάνειας του πιάτου, το θρεπτικό υλικό των κυττάρων αντικαταστάθηκε με DMEM εμπλουτισμένο μόνο με πενικιλλίνη/στρεπτομυκίνη και τα κύτταρα επωάστηκαν για 2 ώρες στους 37 °C. Για την προετοιμασία του μίγματος DNA χρησιμοποιήθηκαν τα εξής:

15 μg psPAX2 (#12260, addgene) (Trono Lab Packaging and Envelope Plasmids): πλασμίδιο το οποίο φέρει τα γονίδια pol και gag που εκφράζουν τα ιικά ένζυμα και τις πρωτεΐνες του καψιδίου και είναι υπεύθυνα για το πακετάρισμα του ιού

- 5 μg pMD2.G (VSV-G) (#12259, addgene) (Trono Lab Packaging and Envelope Plasmids): πλασμίδιο το οποίο φέρει το γονίδιο env που εκφράζει έναν ιϊκό φάκελο με ικανότητα πρόσδεσης σε κύτταρα-ξενιστές
- 25 μg PGK-H2BmCherry (#21217 addgene): ιικός φορέας που εκφράζει την πρωτεΐνη σύντηξης ιστόνη 2B συνδεδεμένη με την mCherry μέσω του υποκινητή PGK (phosphoglycerate kinase) (192)
- ➢ 186 µl CaCl₂
- Η<sub>2</sub>Ο ελεύθερο νουκλεασών μέχρι να συμπληρωθεί ο όγκος των 1.5 mL

Εν συνεχεία το μίγμα DNA προστέθηκε στάγδην (και με χρήση vortex) σε διάλυμα 1.5 mL 2X HBS pH 7.1 (10 mM D-Glucose, 40 mM HEPES, 10 mM KCl, 270 mM NaCl, 1.5 mM H<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> σε H<sub>2</sub>O) και ακολούθησε επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση, το τελικό μίγμα DNA-HBS προστέθηκε στάγδην στα κύτταρα HEK293T και ακολούθησε επώαση για 24 ώρες στους 37°C. Για κάθε πιάτο 148cm<sup>2</sup> προετοιμάστηκε ένα μίγμα DNA-HBS όπως περιγράφηκε παραπάνω. Μετά από 24 ώρες το θρεπτικό υλικό των κυττάρων αντικαταστάθηκε εκ νέου με DMEM High Glucose (με FBS και πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη). Η συλλογή του υπερκειμένου πραγματοποιήθηκε 72 ώρες μετά την επιμόλυνση.

#### 2.10.2 Συλλογή ιοσωματίων και απομόνωση μέσω υπερφυγοκέντρησης

Η υπερφυγοκέντρηση των υπερκειμένων πραγματοποιήθηκε με δημιουργία βαθμίδωσης συγκέντρωσης σουκρόζης. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένα σωληνάρια πολυπροπυλενίου (#331372, BECKMAN COULTER, USA), ειδικά για την κεφαλή SW41Ti της υπερφυγοκέντρου, στα οποία προστέθηκαν 2 mL φιλτραρισμένου (με φίλτρο πόρων 0.2 μm) διαλύματος σουκρόζης 20% σε PBS. Ακολούθως, προστέθηκαν στάγδην και χωρίς να διαταραχθεί η σουκρόζη περίπου 8mL από τα υπερκείμενα. Τα σωληνάρια αφού ζυγίστηκαν και ισοσταθμίστηκαν, τοποθετήθηκαν στην κεφαλή SW41 Ti Swinging-Bucket Rotor (BECKMAN COULTER, USA) και ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 25000 rpm για 2 ώρες στην ψυχόμενη υπερφυγόκεντρο Beckman Coulter Optima L-90K Ultracentrifuge. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης, τα υπερκείμενα απομακρύνθηκαν και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε H<sub>2</sub>O αποστειρωμένο και ελεύθερο ενδοτοξίνης. Ο ιός διατηρήθηκε στους -80 °C.

#### 2.11 Βιντεοσκόπηση κυττάρων DLD1 μέσω του συστήματος IncuCyte®

Το σύστημα απεικόνισης πραγματικού χρόνου IncuCyte® (Essen Bioscience) χρησιμοποιείται για την επίτευξη μεγάλου εύρους τεχνικών καθώς επιτρέπει την ταυτόχρονη παρακολούθηση των κυττάρων σε πραγματικό χρόνο, ενώ αυτά βρίσκονται σε επωαστικό κλίβανο αλλά και την ποσοτικοποίηση των υπό μελέτη παραμέτρων μέσω ειδικά σχεδιασμένου λογισμικού. Στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της κυτταρικής αύξησης, της μεταναστευτικής και διεισδυτικής ικανότητας των κυττάρων ως εξής:

- Ο έλεγχος κυτταρικής αύξησης πραγματοποιήθηκε μέσω της μέτρησης πυρηνικού φθορισμού ανά μονάδα χρόνου. Για το λόγο αυτό τα κύτταρα επιμολύνθηκαν με το λεντι-ιό H2B-mCherry (περιγράφηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο) που εκφράζει την ιστόνη H2B-mCherry ώστε να σημανθούν οι πυρήνες τους με κόκκινο χρώμα. Συγκεκριμένα, 1x10<sup>3</sup> μονήρη κύτταρα επιστρώθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας 24 φρεατίων (#3526 Corning Costar) εις τριπλούν για κάθε κυτταρική σειρά και συνθήκη. Την επόμενη ημέρα τοποθετήθηκαν στον κλίβανο IncuCyte και φωτογραφίες λαμβάνονταν με χρήση του φακού 10X κάθε δύο ώρες για 5 ημέρες. Τα κύτταρα διατηρήθηκαν σε θρεπτικό υλικό Mc Coy's 5A εμπλουτισμένο με 10% ή 0.5% FBS.
- Για τον έλεγχο της μεταναστευτικής και διεισδυτικής ικανότητας των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος επούλωσης τραύματος (wound healing assay). Για το σκοπό αυτό, 5x10<sup>4</sup> κύτταρα επιστρώθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας 96 φρεατίων (#3595 Corning Costar) εις τριπλούν για κάθε κυτταρική σειρά και συνθήκη. Την επόμενη ημέρα, εφόσον τα κύτταρα κάλυπταν όλη την επιφάνεια του φρεατίου σχηματίζοντας μια στοιβάδα, χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο 96 well Woundmaker (Essen Bioscience) ώστε να δημιουργηθούν τραύματα ταυτόχρονα και στα 96 φρεάτια του πιάτου. Ακολούθησαν δύο πλύσεις με PBS, ώστε να απομακρυνθούν τα αποκολημμένα κύτταρα και το πιάτο τοποθετήθηκε στον κλίβανο IncuCyte. Στην περίπτωση του ελέγχου της διεισδυτικότητας, μετά τη δημιουργία του τραύματος, στο σημείο του τραύματος προστέθηκε Matrigel 9,6 mg/mL (#354277 Corning) αραιωμένο 1 πρός 5 σε θρεπτικό υλικό Mc Coy's 5A.

# 2.12 Τεχνική δημιουργίας καρκινικών σφαιρικών δομών (Tumorsphere Formation Assay, TFA)

Η πιο αξιόπιστη *in vitro* δοκιμασία για να ελεγχθεί η βλαστικότητα των καρκινικών βλαστικών κυττάρων είναι η Τ.F.A. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ικανότητα των καρκινικών βλαστικών κυττάρων να σχηματίζουν σφαιρικές δομές (tumorspheres), όταν οι συνθήκες δεν επιτρέπουν την προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια των πιατών, ενώ υπό αυτές τις συνθήκες, τα μη καρκινικά βλαστικά κύτταρα πεθαίνουν λόγω αδυναμίας προσκόλλησης (anoikis). Για την καλλιέργεια των tumorspheres, μονήρη καρκινικά κύτταρα DLD1 WT, DLD1 MUT και DLD1 CXCL5-/- CL7 και CL8 τοποθετήθηκαν σε βακτηριακά τρυβλία επιφάνειας 21 cm<sup>2</sup> (45.000 κύτταρα/τρυβλίο) με θρεπτικό υλικό DMEM F12 (Biosera) εμπλουτισμένο με 1% γλουταμίνη (Thermo Fisher Scientific), με 0.5% διατροφικό συμπλήρωμα B27 (without vitamin A, Thermo Fisher Scientific) και με 20 ng/mL EGF και FGF (Immunotools).

# 2.13 Δοκιμασία πολλαπλασιασμού κυττάρων HUVEC με ενσωμάτωση βρωμοδεόξυ ουριδίνης

Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα HUVEC (4x10<sup>4</sup> ανά φρεάτιο) επιστρώθηκαν σε πιάτο καλλιέργειας 24 φρεατίων με καλυπτρίδες των 11 mm. Την επόμενη ημέρα, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό M199 εμπλουτισμένο με 0.15 units ηπαρίνης/ml και 5% FBS για 12 ώρες και στη συνέγεια το θρεπτικό τους υλικό αναμείχθηκε με υπερκείμενο καρκινικών κυττάρων DLD1 (Mc Coy's 5A+ 0.5% FBS για 46 ώρες) σε αναλογία 1:1 και επωάστηκαν για 24 ώρες. Τις τελευταίες 6 ώρες προστέθηκε βρωμοδεόξυ ουριδίνη (Bromodeoxyuridine, BrdU) σε τελική συγκέντρωση 100 μΜ. Στο τέλος εξάωρης επώασης τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν της σε διάλυμα παραφορμαλδεΰδης 3.7% για 20 λεπτά και ακολούθως επωάστηκαν με διάλυμα 50 mM χλωριούχου αμμωνίου (NH<sub>4</sub>Cl) σε PBS (διάλυμα σβέσης, quenching) για 15 λεπτά. Στη συνέχεια, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε διάλυμα Triton X-100 0.1% για 4 λεπτά (ώστε η κυτταρική μεμβράνη να καταστεί διαπερατή) και σε διάλυμα 1.5 Μ υδροχλωρικού οξέος (HCL) για 10 λεπτά (με σκοπό την αποδιάταξη του DNA) και ακολούθησαν τρείς πλύσεις των 10 λεπτών με PBS. Η δέσμευση των μη ειδικών θέσεων έγινε με 10% FBS για 30

λεπτά, ακολούθησε επώαση με αντίσωμα αντι-Brdu (σε αραίωση 1:100 για μια ώρα, τρείς πλύσεις των 10 λεπτών με PBS και έπειτα επώαση με αντίσωμα συζευγμένο με ισοθειοκυανική φλουερεσκεΐνη (Fluorescein isothiocyanate, FITC) (#715-095-151, Jackson ImmunoResearch Europe Ltd) σε αραίωση 1:200. Τέλος, πραγματοποιήθηκε επώαση των καλυπτρίδων με RNase 1mg/mL (με σκοπό την αποικοδόμηση του RNA) για 30 λεπτά και στη συνέχεια χρώση DNA με Propidium Iodide (PI) (Sigma-Aldrich) σε αραίωση 1:1500 σε PBS για 9 λεπτά. Οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες σε διάλυμα Mowiol (Sigma-Aldrich) που περιείχε 100 mg/mL diazabicyclo(2.2.2)octane (DAPCO) (Sigma-Aldrich) και παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο (confocal microscope) Leica TCS SP5.

# 2.14 Δοκιμασία σχηματισμού αγγειακού δικτύου από κύτταρα HUVEC *in vitro* (Tube formation assay)

Για τη δοκιμασία tube formation assay χρησιμοποιήθηκαν τα ειδικά πλακίδια μ-Slide Angiogenesis, ibiTreat (#81506, ibidi) και πραγματοποιήθηκε το πρωτόκολλο που προτείνεται από την εταιρεία. Συνοπτικά, σε κάθε φρεάτιο του πλακιδίου τοποθετήθηκαν 10μl Matrigel (#354277 Corning), και το πλακίδιο επωάστηκε στους 37 °C για 1 ώρα ώστε να πολυμεριστεί και να σχηματιστεί γέλη. Ακολούθως κύτταρα HUVEC (1x10<sup>4</sup> κύτταρα/φρεάτιο) σε θρεπτικό υλικό (εμπλουτισμένο με 0.15 units ηπαρίνης/ml και 0.5% FBS) που αναμείχθηκε με υπερκείμενο καρκινικών κυττάρων DLD1 (Mc Coy's 5A εμπλουτισμένο με 0.5% FBS για 46 ώρες) σε αναλογία 1:1 επιστρώθηκαν στη γέλη Matrigel. Ο σχηματισμός αγγειακού δικτύου παρατηρήθηκε για 8 ώρες συνολικά και φωτογραφίες ελήφθησαν με συνεστιακό μικροσκόπιο (confocal microscope) Leica TCS SP5 κάθε 2 ώρες. Για την ποσοτικοποίηση των σχηματιζόμενων δικτύων χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο Angiogenesis Analyzer της εφαρμογής Fiji-ImageJ (http://image.bio.methods.free.fr/ImageJ/?Angiogenesis-Analyzerfor-ImageJ&lang=en&artpage=6-6).

# 2.15 Δοκιμασία ελέγχου αγγειογενετικού δυναμικού καρκινικών κυττάρων in vivo σε ποντίκια με χρήση του μοντέλου Matrigel (Matrigel plug assay)

To Matrigel plug assay αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη in vivo τεχνική στην οποία μπορεί να ανιχνεύσει κανείς τη δημιουργία αγγειακού δικτύου στο υλικό Matrigel μετά από την εμφύτευση αυτού στον υποδόριο ιστό ποντικών. Πιο συγκεκριμένα, σε ανοσοκατεσταλμένα θηλυκά ποντίκια τύπου NSG (NOD/SCID) ηλικίας 6-8 εβδομάδων πραγματοποιήθηκε υποδόρια έγχυση Matrigel αναμεμειγμένου με 1x10<sup>6</sup> καρκινικά κύτταρα με συνολικό όγκο 200 μl. Ως δείγμα ελέγχου ενέθηκαν 200μl Matrigel χωρίς την προσθήκη κυττάρων και κάθε συνθήκη εμφύτευσης πραγματοποιήθηκε πέντε ανεξάρτητες φορές. Μετά από 15 ημέρες, πραγματοποιήθηκε ευθανασία στα ζώα, τα εμφυτεύματα Matrigel αφαιρέθηκαν, παρατηρήθηκαν μακροσκοπικά και τοποθετήθηκαν σε 10% φορμόλη για 3 ημέρες. Τέλος, τα εμφυτεύματα τοποθετήθηκαν σε 70% αιθανόλη, πραγματοποιήθηκε εγκλεισμός σε παραφίνη και παρασκευή τομών πάχους 5μΜ για χρήση σε ανοσοΐστοχημεία. Βάσει των διαστάσεων των εμφυτευμάτων υπολογίστηκε ο συνολικός όγκος τους σύμφωνα με την εξίσωση Tumor volume  $(mm^3) = d2x D/2$  όπου d και D είναι η μικρότερη και η μεγαλύτερη διάμετρος σε mm (Protocol Online (2005). Xenograft tumor model protocol. http://www.protocolonline.org/prot/Protocols/Xenograft-Tumor-Model-Protocol-3810.html)). Το παραπάνω πρωτόκολλο πραγματοποιήθηκε, σύμφωνα με εθνικές και διεθνείς οδηγίες και κανονισμούς, σε συνεργασία με το Δρ Δημήτριο Στέλλα.

#### 2.16 Τεχνική δημιουργίας μεταστάσεων in vivo σε ποντίκια

Για την *in vivo* δημιουργία μεταστάσεων πραγματοποιήθηκαν ενέσεις καρκινικών κυττάρων στη φλέβα ουράς ποντικών. Πιο συγκεκριμένα, σε ανοσοκατεσταλμένα θηλυκά ποντίκια τύπου NSG (NOD/SCID) ηλικίας 6-8 εβδομάδων χορηγήθηκαν ενδοφλέβια (στη φλέβα της ουράς) 1x10<sup>6</sup> καρκινικά κύτταρα σε PBS με συνολικό όγκο 200 μl, και για κάθε κυτταρική σειρά πραγματοποιήθηκαν ενέσεις εις τριπλούν. Μετά από 64 ημέρες, πραγματοποιήθηκε ευθανασία στα ζώα και χορηγήθηκαν 4 mL 10% φορμόλης ενδοτραχειακά. Ακολούθως, αφαιρέθηκαν οι πνεύμονες, παρατηρήθηκαν μακροσκοπικά, τοποθετήθηκαν σε 70% αιθανόλη, πραγματοποιήθηκε εγκλεισμός σε παραφίνη και

παρασκευή τομών πάχους 5 μΜ για χρήση σε ανοσοΐστοχημεία. Το παραπάνω πρωτόκολλο πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με εθνικές και διεθνείς οδηγίες και κανονισμούς, σε συνεργασία με το Δρ Δημήτριο Στέλλα.

#### **2.17 Ανοσοϊστοχημεία σε τομές παραφίνης**

Σε τομές παραφίνης πραγματοποιήθηκε αποπαραφίνωση, επανυδάτωση και αποκάλυψη αντιγόνου με τη βοήθεια του μηχανήματος PTα Link-Pre-Treatment Module for Tissue Specimens (Agilent DAKO, Santa Clara CA). Στη συνέχεια ακολούθησε χρώση των τομών με αντισώματα καθώς και με αιματοξυλίνη/ιωσίνη με τη βοήθεια του εμπορικού προϊόντος EnVision FLEX Mini Kit, High pH (Link) και του μηχανήματος Autostainer Link 48. Μέσω του συστήματος αυτού πραγματοποιείται χρώση με πρωτογενή αντισώματα η οποία γίνεται ορατή μέσω της αντίδρασης υπεροξειδάσης-HRP με το χρωμογόνο 3,3'-διαμινοβενζιδίνη-DAB. Τα μηχανήματα και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη χρώση των τομών ήταν από την εταιρεία Agilent DAKO (Santa Clara CA, USA). Για τη χρώση των τομών χρησιμοποιήθηκε το πρωτογενές αντίσωμα αντι-PECAM-1 (D11) (sc-46694, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) σε αραίωση 1:50. Οι ανοσοΐστοχημικές χρώσεις πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων σε συνεργασία με την κυρία Ειρήνη Πάτρα.

Κατάλογος αντισωμάτων				
Όνομα	Εταιρεία	Western Blot	Ανοσοφθορισμός	Ανοσοϊστοχημεία
anti-CXCL5	ab126763 Abcam	1:1000 σε 2% Gelatin		
anti-actin clone C4	#MAB1501 Merck Millipore	1:10000 σε 2% Gelatin		
anti-Phospho-Akt (Ser473)	#9271, Cell Signaling	1:1000 σε 2% Gelatin		
anti-Phospho-Akt (Thr308)	#4056, Cell Signaling	1:1000 σε 5% γάλα		
anti-mouse-HRP	#115-035-062 Jackson ImmunoResearch Europe Ltd	1:10000 σε 5% γάλα		
anti-rabbit HRP	#111-035-144 Jackson ImmunoResearch Europe Ltd	1:5000 σε 5% γάλα		
anti-Brdu	G3G4 (anti- BrdU, Developmental Studies Hybridoma Bank		1:100	
anti-mouse FITC	#715-095-151, Jackson ImmunoResearch Europe Ltd		1:200	
anti-PECAM-1 (D11)	#sc-46694, Santa Cruz Biotechnology, Inc			1:50
EGE	Καταλογος Αυξητ	τικων παραγ	οντων/κυτταροκινών	,
FGF	Immunotools			
CXCL5/ENA-78	Immunotools			

Πίνακας 9. Συγκεντρωτικός πίνακας αντισωμάτων και αυξητικών παραγόντων που χρησιμοποιήθηκαν

# 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

# 3.1 Επιλογή και εγκαθίδρυση ενός ισογονιδιακού σύστηματος μελέτης των μεταλλάξεων του γονιδίου *ΡΙΚ3CA* σε καρκινικές κυτταρικές σειρές του παχέος εντέρου.

Με σκοπό να διερευνηθούν τα μόρια που ενεργοποιούνται καθοδικά της μεταλλαγμένης PI3K (από μεταλλάξεις της υπομονάδας p110a), επιλέχθηκαν οι καρκινικές κυτταρικές σειρές του παχέος εντέρου HCT116 και DLD1 που φέρουν τις μεταλλάξεις H1047R (στο εξώνιο 20 εντός της καταλυτική περιοχής της p110a) και την E545K (στο εξώνιο 9 εντός της περιοχής έλικας της p110a) αντίστοιγα. Οι παραπάνω κυτταρικές σειρές είναι διπλοειδείς και ετερόζυγες ως προς τις μεταλλάξεις Η1047R και E545K. Ειδικότερα, με στόχο την επιλογή και χρήση ενός ισογονιδιακού συστήματος μελέτης των μεταλλάξεων αυτών, ελήφθησαν από τον καθηγητή Bert Vogelstein κυτταρικές σειρές τους παχέος εντέρου DLD1 WT και DLD1 MUT (PIK3CA +/- E545K) και HCT116 WT και HCT116 MUT (PIK3CA +/- H1047R) που προέκυψαν από τις ετερόζυγες ως προς τη μετάλλαξη κυτταρικές σειρές HCT116 και DLD1 μετά από την απάλειψη του μεταλλαγμένου (MUT) ή του φυσικού τύπου αλληλόμορφου (WT) αντίστοιχα, οι οποίες περιγράφοναι αναλυτικά στον Πίνακα 10. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 18, η γονιδιακή απάλειψη του PIK3CA πραγματοποιήθηκε με στοχευμένη εισαγωγή ειδικά σχεδιασμένης ιικής αλληλουχίας ΑΑV (Adeno-associated virus) (193) στο εξώνιο 1 του γονιδίου μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού (63). Το γενετικό προφίλ των παραπάνω κυτταρικών σειρών επιβεβαιώθηκε όπως περιγράφεται στη συνέγεια.

Πίνακας 10. Καρκινικές κυτταρικές σειρές του παχέος εντέρου που φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *PIK3CA* και χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή

Όνομα	Συντομογραφία	Περιγραφή
Πατρική κυτταρική σειρά HCT116/parental	HCT116 PAR	Περιέχει ένα αλληλόμορφο φυσικού τύπου του γονιδίου <i>ΡΙΚ3CΑ</i> και ένα αλληλόμορφο που φέρει τη μετάλλαξη Η1047R στο εξώνιο 20
HCT116 φυσικού τύπου/wild type	HCT116 WT	Το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο του γονιδίου <i>ΡΙΚ3CA</i> έχει στοχευθεί και εκφράζεται μόνο το φυσικού τύπου
HCT116 μεταλλαγμένη/mutated	HCT116 MUT	Το φυσικού τύπου αλληλόμορφο του γονιδίου <i>ΡΙΚ3CA</i> έχει στοχευθεί και εκφράζεται μόνο το μεταλλαγμένο
Πατρική κυτταρική σειρά DLD1/parental	DLD1 PAR	Περιέχει ένα αλληλόμορφο φυσικού τύπου του γονιδίου <i>ΡΙΚ3CΑ</i> και ένα αλληλόμορφο που φέρει τη μετάλλαξη Ε545K στο εξώνιο 9
DLD1 φυσικού τύπου/wild type	DLD1 WT	Το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο του γονιδίου <i>ΡΙΚ3CΑ</i> έχει στοχευθεί και εκφράζεται μόνο το φυσικού τύπου
DLD1 μεταλλαγμένη/mutated	DLD1 MUT	Το φυσικού τύπου αλληλόμορφο του γονιδίου <i>ΡΙΚ3CA</i> έχει στοχευθεί και εκφράζεται μόνο το μεταλλαγμένο



Εικόνα 18. Γονιδιακή στόχευση του PIK3CA στις κυτταρικές σειρές HCT116 και DLD1. Τμήμα της περιοχής του γονιδίου PIK3CA πριν και μετά την στόχευση με ειδικά σχεδιασμένες για τον ανασυνδυασμό ικές αλληλουχίες AAV (Adeno-associated virus). Η στοχευμένη εισαγωγή της αλληλουχίας πραγματοποιήθηκε στο εξώνιο 1 μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού. Τρία κωδικόνια τερματισμού προστέθηκαν στο τέλος του γονιδίου ώστε να πραγματοποιηθεί πρόωρη λήξη της μεταγραφής. p85BD (p85 binding domain, περιοχή σύνδεσης p85 υπομονάδας), AAV-Neo-PIK3CA (το στοχευμένο μετάγραφο), HA (homology arm, βραχίονας ομολογίας), P (SV40 promoter, υποκινητής SV40), Neo (Neomycin phosphotransferase gene, γονίδιο αντοχής σε αντιβιοτικό Geneticin, G418), ανάστροφες επάκριες επαναλήψεις R-ITR (right inverted terminal repeat)/L-ITR (left inverted terminal repeat), τρίγωνα (loxP αλληλουχίες), pA (polyadenylation signal, σημείο πολυαδενυλίωσης).

## 3.1.1 Επαλήθευση του γενετικού προφίλ των τροποποιημένων κυτταρικών σειρών DLD1 (WT και MUT) και HCT116 (WT και MUT).

Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, η γονιδιακή στόχευση των σειρών DLD1 και HCT116 (WT και MUT) πραγματοποιήθηκε στο εξώνιο 1 του γονιδίου *PIK3CA*, συνεπώς ο φορέας που χρησιμοποιήθηκε είχε στόχο το εξώνιο 1 και δεν τροποποίησε το σημείο της μετάλλαξης στο γενωμικό DNA. Με σκοπό να επιβεβαιωθεί η ταυτόχρονη παρουσία του φυσικού τύπου και του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου στις κυτταρικές σειρές πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση γενωμικού DNA στα σημεία των μεταλλάξεων. Όπως είναι αναμενόμενο, τα αποτελέσματα της αλληλούχισης έδειξαν ότι το γενωμικό DNA σε όλες τις κυτταρικές σειρές περιλαμβάνει και τα δύο αλληλόμορφα. Το γεγονός αυτό είναι φανερό καθώς στα χρωματογραφήματα DNA στις θέσεις των μεταλλάξεων σημειώνονται δύο κορυφές που δηλώνουν την ύπαρξη δύο διαφορετικών βάσεων και πιο συγκεκριμένα σημειώνεται με R η ύπαρξη πουρινών, δηλαδή των βάσεων αδενίνη ή γουανίνη (A ή G) οι οποίες συναντώνται και στις δύο κυτταρικές σειρές είτε στα φυσικού τύπου είτε στα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα (Εικόνα 19). Συγκεκριμένα, για τη μετάλλαξη E545 στη θέση 545 του γονιδίου έχει συμβεί αντικατάσταση της γουανίνης (G) με αδενίνη (A) και για τη μετάλλαξη H1047R στη θέση 1047 έχει συμβεί αντικατάσταση της αδενίνης (A) με γουανίνη (G). Συνεπώς, τα αποτελέσματα της αλληλούχισης επιβεβαιώνουν την ταυτόχρονη παρουσία του φυσικού τύπου και του μεταλλαγμένου αλληλίου στις γονιδιακά τροποποιημένες σειρές WT και MUT.



Εικόνα 19. Αποτελέσματα αλληλούχισης γενωμικού DNA στα μεταλλαγμένα σημεία των εξωνίων 20 (H1047R) και 9 (E545K) των κυτταρικών σειρών HCT116 (WT και MUT) και DLD1 (WT και MUT) αντίστοιχα. Ολικό DNA απομονώθηκε από τις κυτταρικές σειρές HCT116 και DLD1 (WT και MUT) και πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση. Στα χρωματογραφήματα DNA δηλώνεται με R η παρουσία πουρινών (A ή G) στο σημείο των μεταλλάξεων στα εξώνια 20 και 9.

Επιπροσθέτως, για επιπλέον έλεγχο της γονιδιακής στόχευσης μέσω του συστήματος AAV στις κυτταρικές σειρές DLD1 και HCT116 (WT και MUT), πραγματοποιήθηκε πολλαπλή αντιγραφή του στοχευμένου αλληλομόρφου σε κάθε περίπτωση με σχεδιασμό ειδικών εκκινητών ως εξής: Ο εμπρόσθιος εκκινητής (forward) σχεδιάστηκε στην αρχή της στοχευμένης αλληλουχίας (στο σημείο εισαγωγής της αλληλουχίας Neo) και ο ανάστροφος εκκινητής στα εξώνια 20 και 9 για την κάθε κυτταρική σειρά, όπως φαίνεται στη σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας που ακολουθήθηκε για την κυτταρική σειρά DLD1 MUT (Εικόνα 20). Λόγω του μεγάλου μεγέθους της προς πολλαπλή αντιγραφή αλληλουχίας πραγματοποιήθηκε επάλληλη PCR (nested PCR). Κατά την επάλληλη PCR, πραγματοποιήθηκαν δύο γύροι πολλαπλής αντιγραφής με χρήση δύο ζευγών εκκινητών. Το πρώτο ζεύγος εκκινητών (FW1/RV1) χρησιμοποιήθηκε στον πρώτο γύρο της πολλαπλής αντιγραφής και τα προϊόντα υποβλήθηκαν σε ένα δεύτερο γύρο πολλαπλής αντιγραφής με ένα δεύτερο ζεύγος εκκινητών (FW2/RV2) οι οποίοι είναι ειδικοί για μια εσωτερική αλληλουχία του προϊόντος του πρώτου γύρο (Εικόνα 20). Τέλος, ακολούθησε αλληλούχιση του προϊόντος του δεύτερου γύρου της πολλαπλής αντιγραφής και τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν ότι σε όλες τις σειρές έχει πραγματοποιηθεί ορθά η στόχευση. Για παράδειγμα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 21A, στην περίπτωση της κυτταρικής σειράς HCT116 WT, το στοχευμένο αλληλόμορφο είναι το μεταλλαγμένο, γεγονός που επιβεβαιώνεται από τα αποτελέσματα της αλληλούγισης. Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στο γρωματογράφημα στη θέση της μετάλλαξης σημειώνεται η βάση C η οποία είναι η βάση που υπάρχει στο μεταλλαγμένο αλληλόμορφο (έχει διαβαστεί η συμπληρωματική της αλυσίδα) αντί της Τ η οποία υπάρχει στο αλληλόμορφο φυσικού τύπου όπως έχει ήδη αναφερθεί. Ομοίως, για τις υπόλοιπες σειρές επαληθεύθηκε το στοχευμένο αλληλόμορφο και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην 21Β.



Εικόνα 20. Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας πολλαπλής αντιγραφής των στοχευμένων αλληλομόρφων μέσω Επάλληλης PCR. Στο σχήμα περιγράφεται η πορεία μέσω της οποίας αντιγράφηκε πολλαπλά το στοχευμένο αλληλόμορφο στην περίπτωση της κυτταρικής σειράς DLD1 MUT, το οποίο είναι το μεταλλαγμένο (E545K μετάλλαξη στο εξώνιο 9). Αρχικά, απομονώθηκε RNA από τα κύτταρα DLD1 MUT και πραγματοποιήθηκε RT-PCR με εμπρόσθιο εκκινητή (forward, FW1) σχεδιασμένο για την αρχή της στοχευμένης αλληλουχίας και ανάστροφο εκκινητή σχεδιασμένο για την αρχή του εξωνίου 10 (reverse, RV1). Στη συνέχεια το προϊόν της αντίδρασης αυτής (Προϊόν PCR1) χρησιμοποιήθηκε σε ένα δεύτερο κύκλο πολλαπλής αντιγραφής (PCR2) με εκκινητές σχεδιασμένους για αλληλουχία εσωτερική του προϊόντος της PCR 1 (FW2/RV2). Τέλος, ακολούθησε αλληλούχιση του προϊόντος της PCR 2.

#### Α. Εξώνιο 20 του γονιδίου ΡΙΚ3CA



Εικόνα 21. Αποτελέσματα της αλληλούχισης του DNA της περιοχής του στοχευμένου μετάγραφου του γονιδίου PI3KCA. Α. Στις κυτταρικές σειρές HCT116 WT και MUT και B. Στις κυτταρικές σειρές DLD1 WT και MUT. Πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA και εν συνεχεία αντίστροφη μεταγραφή σε συνδυασμό με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR) με χρήση ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών. Ο εμπρόσθιος εκκινητής (forward) σχεδιάστηκε στο 3' άκρο της αλληλουχίας στόχευσης ενω ο ανάστροφος (reverse) σχεδιάστηκε στα αντίστοιχα εξώνια 20 και 9 με σκοπό να αντιγραφεί πολλαπλά η περιοχή του στοχευμένου μετάγραφου στην κάθε κυτταρική σειρά. Ακολούθησε ένας δεύτερος γύρος πολλαπλής αντιγραφής με εκκινητές σχεδιασμένους εσωτερικά της αλληλουχίας του προϊόντος του δεύτερου γύρου.

# 3.1.2 Επαλήθευση της αυξημένης φωσφορυλίωσης της ΑΚΤ στις MUT σειρές σε σύγκριση με τις WT με ή χωρίς την επαγωγή με Επιδερμικό Αυξητικό Παράγοντα EGF

Οι υπό μελέτη μεταλλάξεις E545 και H1047R του γονιδίου *PI3KCA* είναι γνωστό βάσει βιβλιογραφίας ότι οδηγούν σε αυξημένη δραστικότητα της λιπιδικής κινάσης (194) (195), και κατ'επέκταση σε αυξημένη ενεργοποίηση των κάτωθι σηματοδοτικών μονοπατιών της PI3K. Ένα από τα βασικότερα καθοδικά σήματα του μονοπατιού της PI3K είναι οι φωσφορυλιώσεις της AKT. Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία (63) ότι τα κύτταρα DLD1 MUT εμφανίζουν αυξημένη φωσφορυλίωση της AKT στα κατάλοιπα T308 και S473 σε σύγκριση με τα κύτταρα DLD1 WT όταν αυτά καλλιεργούνται σε πλήρες θρεπτικό υλικό (με 10% ορό). Επιπλέον, η φωσφορυλίωση της ΑΚΤ στα WT κύτταρα είναι ακόμη χαμηλότερη σε σχέση με τα MUT όταν αυτά καλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό με χαμηλό ποσοστό ορού (0.5% ορό), γεγονός που υποδηλώνει ότι το υψηλό ποσοστό ορού ενεργοποιεί την ΑΚΤ στα WT κύτταρα. Συγκεκριμένα, όταν τα WT και MUT κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό με 0.5% ορό παρουσία του αυξητικού παράγοντα EGF, τα επίπεδα της φωσφορυλίωσης της ΑΚΤ (και στα δύο κατάλοιπα) στα WT αυξήθηκαν. Αντίθετα, δεν φαίνεται να ισχύει το ίδιο για τα MUT κύτταρα στα οποία η φωσφορυλίωση της ΑΚΤ είναι ανεξάρτητη της παρουσίας αυξητικών παραγόντων, όπως σημειώνεται στη δημοσίευση Samuels, Diaz et al., 2005. Στη δημοσίευση περιγράφονται ανάλογα αποτελέσματα και για τις σειρές HCT116 WT και MUT.

Με σκοπό να ελεγχθούν και να επιβεβαιωθούν τα παραπάνω αποτελέσματα, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της φωσφορυλίωσης της ΑΚΤ στα κατάλοιπα T308 και S473 στις κυτταρικές σειρές DLD1 και HCT116 PAR/WT/MUT. Τα κύτταρα καλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό με 0.5% FBS για 19 ώρες και ακολούθησε προσθήκη ή μη του EGF για 30 λεπτά. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 22, στην κυτταρική σειρά DLD1 τα βασικά επίπεδα της φωσφορυλίωσης και στα δύο κατάλοιπα είναι χαμηλά στις PAR και WT και αυξάνονται μετά την ενεργοποίηση με EGF. Τα MUT κύτταρα εμφανίζουν υψηλά βασικά επίπεδα φωσφορυλίωσης τα οποία διατηρούνται σε παρόμοια επίπεδα και μετά την προσθήκη EGF, ίσως και λίγο αυξημένα (ειδικά στο κατάλοιπο T308). Συνεπώς, τα αποτελέσματα συμφωνούν με τα ευρήματα της δημοσίευσης που περιγράφηκε παραπάνω. Στην περίπτωση της κυτταρικής σειράς HCT116 παρατηρήθηκαν ανάλογα αποτελέσματα για τις PAR και MUT σειρές, με την διαφορά ότι σε σχέση με τις DLD1 σειρές η φωσφορυλίωση της ΑΚΤ στο σύνολό της παρουσιάζεται μειωμένη. Ειδικότερα, για την σειρά HCT116 WT παρατηρείται πολύ χαμηλό επίπεδο φωσφορυλίωσης και στα δύο κατάλοιπα το οποίο δεν φαίνεται να αυξάνεται με την προσθήκη του EGF.



Εικόνα 22. Επίδραση του EGF στη φωσφορυλίωση της ΑΚΤ στα καταλοιπα T308 και S473 στα κυτταρα DLD1 και HCT116 PAR/MUT/WT. Όλες οι κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε μέσο εμπλουτισμένο με 0.5% για 19 ώρες. Στη συνέχεια προστέθηκε EGF (60 ng/mL) και λήφθησαν τα κυτταρικά εκχυλίσματα. Ακολούθησε ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης και ανοσοαποτύπωση κατά Western. Ως μάρτυρας ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η ακτίνη. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τρείς ανεξάρτητες φορές.

# 3.2 Οι μεταλλάξεις Η1047R και Ε545Κ του γονιδίου *ΡΙΚ3CA* ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση σε συνθήκες μειωμένου ορού στα κύτταρα HCT116 και <u>DLD1 αντίστοιχα</u>

Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία (63), οι σειρές WT και MUT (DLD1 και HCT116) αναπτύσσονται παρόμοια σε πλαστική επιφάνεια αλλά και σε άγαρ παρουσία 10% ορού. Αντίθετα, αν η συγκέντρωση του ορού μειωθεί στο 0.5%, ο ρυθμός ανάπτυξης των WT είναι μικρότερος από των MUT, όταν καλλιεργούνται σε πλαστική επιφάνεια. Επιπροσθέτως, όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο εδάφιο, παρουσία ορού συγκέντρωσης 0.5% το επίπεδο της φωσφορυλίωσης της AKT είναι αρκετά υψηλότερο στις MUT σε σύγκριση με τις WT σειρές. Με βάση τα ευρήματα αυτά και με σκοπό να ελεγθεί πως μεταβάλλεται η γονιδιακή έκφραση μεταξύ των WT και MUT σειρών σε συνθήκες μειωμένου ορού, πραγματοποιήθηκε ανάλυση μικροσυστοιχιών μετά από καλλιέργεια των κυττάρων σε 0.5% ορό για 19 ώρες (όπως ακριβώς περιγράφεται στην αναφορά). Ολικό RNA απομονώθηκε από τις κυτταρικές σειρές HCT116 και DLD1 WT και MUT και ο έλεγχος της ποιότητας του RNA που απομονώθηκε πραγματοποιήθηκε με ανάλυση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης και με RT-PCR με χρήση κατάλληλων εκκινητών για το γονίδιο *PRMT1*. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 23 είναι ορατές οι δύο ζώνες του ριβοσωμικού RNA (18S και 28S) και έτσι επιβεβαιώνεται ότι το RNA είναι άθικτο. Επιπλέον δεν εντοπίζεται ζώνη ανοδικά του ριβοσωμικού RNA 28S, που σημαίνει ότι τα δείγματα δεν έχουν επιμολυνθεί από γενωμικό DNA. Επιπροσθέτως, η ακεραιότητά του RNA επιβεβαιώθηκε από τα αποτελέσματα της RT-PCR για το γονίδιο *PRMT1* (επιλέχθηκε διότι το αναμενόμενο προϊόν είναι μεγάλο ~600 kb), και όπως φαίνεται στην ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης, ανιχνεύθηκε το επιθυμητό προϊόν. Εφόσον επιβεβαιώθηκε η ποιότητα των RNA δειγμάτων ακολούθησε ανάλυση μικροσυστοιχιών με χρήση του συστήματος Affymetrix GeneChip Gene 1.0 ST (Affymetrix, Santa Clara, CA).



Εικόνα 23. Έλεγχος ακεραιότητας απομονωμένου RNA. Οι κυτταρικές σειρές HCT116 και DLD1 (WT και MUT) επωάστηκαν σε θρεπτικό μέσο με 0.5% FBS για 19 ώρες και στη συνέχεια απομονώθηκε το ολικό RNA. Τα δείγματα RNA αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2% και εντοπίστηκαν οι δύο ζώνες του ριβοσωμικού RNA (28S, 18S) (Αριστερό μέρος). Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε RT-PCR για το γονίδιο *PRMT1*, και το προϊόν (~600kb) αναλύθηκε σε πηκτή αγαρόζης (Δεξιό μέρος). Οι απομονώσεις RNA πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν, από τρείς διαφορετικές κυτταρικές γενιές και τα αποτελέσματα του ελέγχου της ποιότητας του RNA παρουσιάζονται από την πρώτη απομόνωση παρουσιάζονται στην εικόνα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μικροσυστοιχιών για την κυτταρική σειρά HCT116, η έκφραση 34 γονιδίων διαφοροποιείται στην σειρά MUT μετά από καλλιέργεια σε θρεπτικό μέσο με 0.5% ορό σε σύγκριση με την WT, εκ των οποίων τα 18 ρυθμίστηκαν θετικά, παρουσιάζοντας αύξηση της έκφρασης, ενώ τα 16 ρυθμίστηκαν αρνητικά, παρουσιάζοντας μείωση της έκφρασης. Από την άλλη πλευρά, για την DLD1 αποκαλύφθηκαν συνολικά 47 γονίδια με διαφορική έκφραση εκ των οποίων τα 25 ρυθμίστηκαν θετικά και τα 22 αρνητικά (Εικόνα 24). Επίσης, εντοπίστηκαν δύο κοινά γονίδια, τα DPP4 και DDIT4, τα οποία ρυθμίστικαν θετικά και στις δύο κυτταρικές σειρές. Τα αποτελέσματα και για τις δύο κυτταρικές σειρές συνοψίζονται στους Πίνακες 11&12 όπου τα γονίδια κατηγοριοποιούνται με βάση τη ρύθμιση της έκφρασης και την στατιστική σημαντικότητα (κατά αύξουσα σειρά p-value).



Εικόνα 24. Γονίδια των οποίων η έκφραση διαφοροποιείται στις MUT σειρές μετά από καλλιέργεια σε θρεπτικό μέσο με 0.5% ορό. Κύτταρα επωάστηκαν σε θρεπτικό μέσο με 0.5% FBS για 19 ώρες. Στη συνέχεια απομονώθηκε το ολικό RNA και αναλύθηκε με την τεχνολογία των μικροσυστοιχιών Affymetrix GeneChip Gene 1.0.

Ορισμένα από τα γονίδια που αποκαλύφθηκαν για την κυτταρική σειρά HCT116 ήταν γονίδια που κωδικοποιούν αυξητικούς παράγοντες (TNFSF18, BDNF, AREG), υποδοχείς (GPR15) και μεταφορείς (FABP6, SLC1A1), μεταγραφικούς παράγοντες (EHF, ZNF26, ZNF850, NR4A2, DDIT4), ένζυμα που συμμετέχουν τόσο σε μεταβολικές αντιδράσεις (FAR2, SPTSSB), όσο και σε διαδικασίες όπως η γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών (GALNT5) και η αναδιαμόρφωση της εξωκυτταρικής μήτρας (PLAT, PXDN). Επιπλέον, εντοπίστηκαν γονίδια που κωδικοποιούν ρυθμιστικές πρωτεΐνες (RGS2, DENND5B, SERPINE 1) και πρωτεΐνες που συμετέχουν στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού (NAV3, MAP1B). Αντίστοιχα, στην περίπτωση της κυτταρικής σειράς DLD1 MUT, ορισμένα από τα γονίδια που ρυθμίζονται είτε θετικά είτε αρνητικά σε σχέση με τη σειρά DLD1 WT κωδικοποιούν μεμβρανικούς μεταφορείς (MCOLN3, SLC30A10, CTFR, ABCB1), μεταγραφικούς παράγοντες (DDIT4, NFIB, PIR, ANKRD1, HLTF, ZNF141), έναν μεγάλο αριθμό ενζύμων όπως ένζυμα που συμετέχουν σε μεταβολικές αντιδράσεις (PAH, PHKB, GLUL, ATP6VIC2, QPRT), μιτοχονδριακά ένζυμα (CKMT1A, CKMT1B, MAOB), ένζυμα του ενδοπλασματικού δικτύου (PDI6, GXYLT2) καθώς και δομικές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη δημιουργία συνδέσεων μεταξύ γειτονικών κυττάρων (DSC2, NECTIN3).

Πίνακας 11. Κατάλογος γονιδίων των οποίων η έκφραση τροποποιείται στην κυτταρική σειρά HCT116 MUT σε σύγκριση με την HCT116 WT

Σύμβολο γονιδίου	Περιγραφή	Ρύθμιση έκφρασης	Fold change	p-value	
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor	αύξηση	4,13	7,89116E-09	
DPP4	Dipeptidyl-Peptidase 4αύξηση4,271,269			1,26941E-07	
DENND5B	DENN/MADD Domain Containing 5B αύξηση 2,72 1,58/			1,58208E-07	
FABP6	Fatty Acid Binding Protein 6	αύξηση	2,63	2,50184E-07	
EHF	Ets Homologous Factor	αύξηση	4,85	4,85 3,52783E-07	
ZC4H2	Zinc Finger C4H2-Type Containing	αύξηση	2,29	3,63469E-07	
PXDN	Peroxidasin Homolog (Drosophila)	αύξηση	2,88	5,47242E-07	
IGF2BP3	Insulin-like Growth Factor 2 mRNA Binding Protein 3	αύξηση	2,48	5,95704E-07	
DDIT4	DNA-Damage-Inducible Transcript 4	αύξηση	2,08	6,2194E-07	
TENM3	Teneurin Transmembrane Protein 3	αύξηση	3,33	6,71225E-07	
NETO2	Neuropilin (NRP) and Tolloid (TLL)-Like 2	αύξηση	2,70	1,25391E-06	
MAP1B	Microtubule-Associated Protein 1B	αύξηση	2,00	2,77782E-06	
ZNF850	Zinc Finger Protein 850	αύξηση	2,19	3,02804E-06	
RGS2	Regulator of G-protein Signaling 2, 24kDa	αύξηση	2,10	6,91323E-06	
ANKRD36C	Ankyrin Repeat Domain 29	αύξηση	2,00	2,15967E-05	
SH3RF2	SH3 Domain Containing Ring Finger 2	αύξηση	2,01	3,77742E-05	
TNFSF18	Tumor Necrosis Factor (ligand) Superfamily, member 18	αύξηση	2,66	0,000170887	
FN1	Fibronectin 1	<u>αύ</u> ξηση 1,85		0,00043	
SPTSSB	Serine Palmitoyltransferase Small Subunit B	μείωση	4,51	1,57266E-09	
SCG2	Secretogranin II	μείωση	4,81	1,74744E-08	
RGCC	Regulator Of Cell Cycle μείωση		3,61	2,8425E-08	
GALNT5	Polypeptide N- Acetylgalactosaminyltransferase 5	μείωση	3,89	4,30329E-08	
SLC1A1	Solute Carrier Family 1 Member 1	μείωση	2,11	5,1122E-08	
ZNF426	Zinc Finger Protein 426	μείωση	3,05	8,88306E-08	
MAGI1	Membrane Associated Guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 1	μείωση	2,54	1,02397E-07	
NAV3	Neuron Navigator 3	μείωση	3,65	1,90894E-07	
FAR2	Fatty Acyl CoA Reductase 2	μείωση	2,41	2,41344E-07	
AREG	Amphiregulin	μείωση	2,10	3,12823E-07	
GPR15	G protein-coupled receptor 15	μείωση	5,23	4,26118E-07	
NR4A2	Nuclear Receptor Subfamily 4, Group A, Member 2	μείωση	4,26	7,13665E-07	
NT5E	5'-nucleotidase, Ecto (CD73) μείωση 2,21 7,9314		7,93146E-06		
ANKRD29	Ankyrin Repeat Domain 29 μείωση 2,18 2,159671		2,15967E-05		
SERPINE1	Serpin Family E Member 1	in Family E Member 1 μείωση 3,73 4,89109		4,89109E-05	
PLAT	Plasminogen Activator, Tissue type	μείωση	3,21	4,92584E-05	

Σύμβολο	Περιγραφή	Ρύθμιση	Fold	p-value
γονιδίου		έκφρασης	change	_
HLTF	Helicase Like Transcription Factor	αύξηση	7,45	1,60752E-08
NFIB	Nuclear Factor I/B	αύξηση	2,00	4,37995E-08
PAH	Phenylalanine Hydroxylase	αύξηση	3,73	6,57798E-08
PODXL2	Podocalyxin-Like 2	αύξηση	2,34	1,18972E-07
PIR	Pirin (iron-binding nuclear protein)	αύξηση	3,61	1,47737E-07
QPRT	Quinolinate Phosphoribosyltransferase	αύξηση	7,18	2,19511E-07
MUC13	Mucin 13, Cell Surface Associated	αύξηση	2,63	2,5014E-07
MSX2	Msh Homeobox 2	αύξηση	2,00	2,49832E-07
SH3BGRL	SH3 Domain Binding Glutamate Rich Protein Like	αύξηση	5,50	2,5135E-07
SLC30A10	Solute Carrier Family 30, Member 10	αύξηση	3,00	4,35087E-07
SRPX	Sushi Repeat Containing Protein X-Linked	αύξηση	2,18	8,01192E-07
PDIA6	Protein Disulfide Isomerase Family A Member 6	αύξηση	2,36	1,03051E-06
ATP6V1C2	ATPase H+ Transporting V1 Subunit C2	αύξηση	2,36	1,03051E-06
Clorf21	Chromosome 1 Open Reading Frame 21	αύξηση	2,27	2,48472E-06
GXYLT2	Glucoside Xylosyltransferase 2	αύξηση	2,11	5,45096E-06
EEF1A2	Eukaryotic Translation Elongation Factor 1 Alpha 2	αύξηση	2,02	7,88968E-06
DPP4	Dipeptidyl-Peptidase 4	αύξηση	2,15	2,32159E-05
SCEL	Sciellin	αύξηση	2,67	2,49218E-05
ABCB1	ATP-Binding Cassette, Sub-family B (MDR/TAP),	αύξηση	2,03	3,80485E-05
	Member 1			
CXCL5	Chemokine (C-X-C motif) Ligand 5	αύξηση	2,12	4,58226E-05
IQGAP2	IQ Motif Containing GTPase Activating Protein 22	αύξηση	2,51	9,604E-05
TNC	Tenascin C	αύξηση	2,56	0,00036234
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator	αύξηση	2,29	0,000496547
DDIT4	DNA-Damage-Inducible Transcript 4	αύξηση	2 40	0.001454587
UTS2	Urotensin 2	αύξηση	1.60	0.02
KRT20	Keratin 20	ມະໂທດກ	17.68	8 86953E-11
ATPLIC	ATPase Phospholipid Transporting 11C	μείωση	8 46	1.69367E-10
VGLLI	Vestigial Like Family Member 1	μείωση	6.60	1,09907E-10
UCAI	Urothelial Cancer Associated 1 (non-protein coding)	μείωση	2,53	4,24165E-09
РНКВ	Phosphorylase Kinase Regulatory Subunit Beta	μείωση	2,60	8,83266E-09
ZNF141	Zinc Finger Protein 141	μείωση	4,16	9,96362E-09
CKMT1B	Creatine Kinase, Mitochondrial 1B	μείωση	4,27	2,39997E-08
CKMT1A	Creatine Kinase. Mitochondrial 1A	μείωση	4.27	2,42323E-08
IGF1R	Insulin-like Growth Factor 1 Receptor	μείωση	2,44	6,96916E-08
MAOB	Monoamine Oxidase B	μείωση	3,37	1,34759E-07
ANKRD1	Ankvrin Repeat Domain 1	μείωση	3.02	8.13345E-07
NECTIN3	Nectin Cell Adhesion Molecule 3	μείωση	2.04	2,00651E-06
TMPRSS4	Transmembrane Protease, Serine 4	μείωση	2,57	4,99861E-06
RAB38	RAB38, Member RAS Oncogene Family	μείωση	2.01	5,60066E-06
GLUL	Glutamate-Ammonia Ligase	μείωση	2,12	8,53351E-06
LHFP	Lipoma HMGIC Fusion Partner	μείωση	2,20	1,56337E-05
HOXB5	Homeobox B5	μείωση	2,21	2,29205E-05
LRRN1	Leucine Rich Repeat Neuronal 1	μείωση	2,17	2,50699E-05
SEMA4A	Semaphorin 4A	μείωση	2,50	0,000027
DSC2	Desmocollin 2	μείωση	2,20	2,98281E-05
ADGRF1	Adhesion G Protein-Coupled Receptor F1	μείωση	2,01	0,000178512

Πίνακας 12. Κατάλογος γονιδίων των οποίων η έκφραση τροποποιείται στην κυτταρική σειρά DLD1 MUT σε σύγκριση με την DLD1 WT

# 3.3 Ταυτοποίση γονιδίων-ρυθμιστών της αγγειογένεσης των οποίων η έκφραση τροποποιείται στις MUT σειρές σε σγέση με τις WT

Με σκοπό τη μελέτη γονιδίων που εμπλέκονται στη ρύθμιση της αγγειογένεσης των όγκων, ελέγθηκε ανάμεσα στα αποτελέσματα των μικροσυστοιχιών η ύπαρξη γονιδίων που βάσει βιβλιογραφίας δρούν ως διεγέρτες ή αναστολείς της φυσιολογικής ή νεοπλασματικής αγγειογένεσης. Από αυτά τα γονίδια λήφθηκαν υπόψη αυτά που εμφάνιζαν διαφορά στην έκφραση κατά 2 βαθμούς με p-value > 0.05. Συγκεκριμένα, για την κυτταρική σειρά HCT116 εντοπίστηκαν τα γονίδια *BDNF*, *PXDN*, *DPP4*, *SERPINE1* ενώ για την DLD1 εντοπίστηκαν τα γονίδια *TMPRSS4*, *PODXL2*, *DPP4*, *SEMA4A*, *CXCL5* (Πίνακας 13).

# Πίνακας 13. Κατάλογος γονιδίων-ρυθμιστών της αγγειογένεσης που παρουσιάζουν διαφορική έκφραση στις MUT κυτταρικές σειρές

Κυτταρική σειρά	Όνομα γονιδίου	Φυσιολογική Λειτουργία	Βιβλιογραφία σχετική με την αγγειογένεση
HCT116 MUT	Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)	Νευροτροφίνη σημαντική για τη νευρική ανάπτυξη και πλαστικότητα, εντοπίζεται στον εγκέφαλο αλλά παρουσιάζει αύξηση σε πολλού τύπους καρκινικών κυττάρων	(196)(197) (198)(199)
	Peroxidasin Homolog (Drosophila) (PXDN)	Υπεροξειδάση αίμης, εκκρίνεται στον εξωκυτταρικό χώρο, διαμορφώνει την εξωκυτταρική μήτρα, αρχικά περιγράφηκε ως βασικό ένζυμο στα πρώιμα στάδια εμβρυογένεσης στη Drosophila	(200)(201)
	Dipeptidyl-Peptidase 4 (DPP4)	Αντιγονικό ένζυμο επιφανείας (εξωπεπτιδάση σερίνης) γνωστό και ως CD26, αναγνωρίζει πολλά υποστρώματα (αυζητικούς παράγονες, χημειοκίνες κτλ) εκφράζεται στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους, αποτελεί δείκτη για πολλούς τύπους καρκίνου (δείκτης επιφανείας, δείκτης στον ορό)	(202)(203) (204)
	Serpin Family E Member 1/Plasminogen activator inhibitor-1 (SERPINE 1)	Αναστολέας πρωτεάσης σερίνης, αναστολέας ενεργοποιητή πλασμινογόνου (tPA) και ουροκινάσης (uPA) ρυθμίζει τον ινωδολυτικό μηχανισμό, εκκρίνεται κυρίως από το ενδοθήλιο	(205) (206)(207) (208)(209) (210)(211)
DLD1 MUT	Transmembrane Protease, Serine 4 (TMPRSS4)	Διαμεμβρανική πρωτεάση σερίνης, συμμετέχει στην αναδιαμόρφωση της εξωκυτταρική μήτρας, υπερεκφράζεται στον καρκίνο	(212)
	Podocalyxin-Like 2 (PODXL2)	Διαμεμβρανική σιαλομυκίνη ή ενδογλυκάνη, προσδέτης σελεκτινών ανήκει στα αντιγόνα επιφανείας CD34 που αποτελούν δείκτες ενδοθηλίου,αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων και εκφράζονται σε πολλούς καρκίνους	(213)(214)(215)
	Semaphorin 4A (SEMA4A)	Εκκρινόμενη ή διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που συμμετέχει στην ανάπτυξη των νευρώνων. Εκφράζεται σε πολλούς κυτταρικούς τύπους και εμπλέκεται στη ρύθμιση ανοσολογικών αποκρίσεων	(216)(217) (218)
	Chemokine (C-X-C motif) Ligand 5 (CXCL5)	Χημειοτακτική κυταροκίνη, προφλεγμονώδης που εκφράζεται κυρίως σε μονοκύτταρα, ενδοθηλιακά, αιμοπετάλια με δυνατότητα έλξης ουδετερόφιλων	(148)(168) (219)(170) (146)(169) (167)(220)
	Dipeptidyl-Peptidase 4 (DPP4)		
Με σκοπό την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης μικροσυστοιχιών, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της έκφρασης των παραπάνω γονιδίων στις κυτταρικές σειρές WT και MUT με τη μέθοδο της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης (qRT-PCR). Για το λόγο αυτό, τα κύτταρα HCT116 και DLD1 WT και MUT καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο με 0.5% ορό για 19 ώρες και απομονώθηκε το ολικό RNA. Πράγματι επιβεβαιώθηκε ότι η έκφραση των γονιδίων BDNF, PXDN αυξήθηκε και του γονιδίου SERPINE1 μειώθηκε στατιστικά σημαντικά στην HCT116 MUT σειρά σε σχέση με την WT (Εικόνα 25). Επίσης, η έκφραση του γονιδίου DPP4 παρουσίασε αύξηση στην HCT116 MUT σειρά, χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντική (Εικόνα 25). Ακόμη, παρατηρήθηκε ότι το επίπεδο έκφρασης του γονιδίου SERPINE1 ήταν υψηλότερο συγκριτικά με τα υπόλοιπα γονίδια όπως φαίνεται και στις τιμές του άξονα γ. Επιπλέον, επιβεβαιώθηκε ότι η έκφραση των γονιδίων PODXL2, CXCL5 αυξήθηκε και των SEMA4A και TMPRSS4 μειώθηκε στατιστικά σημαντικά στην DLD1 MUT σειρά σε σχέση με την DLD1 WT, ενώ η έκφραση του γονιδίου DPP4 παρουσίασε αύξηση χωρίς να είναι στατιστικά σημαντική (Εικόνα 26). Το επίπεδο της έκφρασης του γονιδίου CXCL5 όπως παρατηρείται στην Εικόνα 26 είναι ιδιαίτερα υψηλό σε σχέση με τα υπόλοιπα γονίδια.



Εικόνα 25. Ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων PXDN, DPP4, SERPINE1, BDNF στις κυτταρικές σειρές HCT116 WT και MUT σε συνθήκες μειωμένου ορού. Κύτταρα HCT116 WT και MUT καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο με 0.5% FCS για 19 ώρες. Συνολικό RNA απομονώθηκε και ποσοτικοποιήθηκε. Η έκφραση των γονιδίων ελέγθηκε με qRT-PCR. Κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε βάσει των τιμών για το γονίδιο GAPDH. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τρείς ανεξάρτητες φορές. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση και με \* υποδηλώνεται p value<0.05, \*\* p value<0.01, \*\*\* p value<0.001.

#### qRT-PCR σε συνθήκες 0.5% FBS



Εικόνα 26. Ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων SEMA4A, DPP4, PODXL2, TMPRRS4, CXCL5 στις κυτταρικές σειρές DLD1 WT και MUT σε συνθήκες μειωμένου ορού. Κύτταρα DLD1 WT και MUT καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο με 0.5% FCS για 19 ώρες. Συνολικό RNA απομονώθηκε και ποσοτικοποιήθηκε. Η έκφραση των γονιδίων ελέγθηκε με qRT-PCR. Κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε βάσει των τιμών για το γονίδιο GAPDH. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τρείς ανεξάρτητες φορές. (\*P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001)

Επιπροσθέτως, ελέγθηκε η έκφραση των παραπάνω γονιδίων μετά από καλλιέργεια των κυτταρικών σειρών σε θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με 10% FBS (στις συνηθισμένες συνθήκες καλλιέργειας) με τη μέθοδο της αλυσιδωτής πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης (qRT-PCR), με σκοπό να διερευνηθεί αν διατηρείται η διαφορική έκφραση που εμφάνισαν μεταξύ των σειρών WT και MUT σε συνθήκες μειωμένου ορού. Όπως παρατηρείται στις Εικόνες 27 και 28, παρουσία 10% FBS η έκφραση των επιλεγμένων γονιδίων διαφοροποιείται ομοίως στις MUT σειρές σε σχέση με τις WT, όμως οι διαφορές δεν είναι στατιστικά σημαντικές με εξαίρεση τα γονίδια *BDNF* και *TMPRSS4*.





Εικόνα 27. Ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων PXDN, DPP4, SERPINE1, BDNF στις κυτταρικές σειρές HCT116 WT και MUT. Κύτταρα HCT116 WT και MUT καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο με 10% FCS για 19 ώρες. Συνολικό RNA απομονώθηκε και ποσοτικοποιήθηκε. Η έκφραση των γονιδίων ελέγθηκε με qRT-PCR. Κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε βάσει των τιμών για το γονίδιο GAPDH. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τρείς ανεξάρτητες φορές. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση. (\*P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001, P=pvalue)

qRT-PCR σε συνθήκες 10% FBS



Εικόνα 28. Ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων SEMA4A, DPP4, PODXL2, TMPRRS4, CXCL5 στις κυτταρικές σειρές DLD1 WT και MUT. Κύτταρα DLD1 WT και MUT καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο με 10% FCS. Συνολικό RNA απομονώθηκε και ποσοτικοποιήθηκε. Η έκφραση των γονιδίων ελέγθηκε με qRT-PCR. Κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε βάσει των τιμών για το γονίδιο GAPDH. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τρείς ανεξάρτητες φορές. (\*P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001)

### 3.4.Η χημειοκίνη CXCL5 εκκρίνεται σε υψηλό ποσοστό από τα κύτταρα DLD1 MUT σε σχέση με τα κύτταρα DLD1 WT

Όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων, το γονίδιο CXCL5 παρουσίασε την υψηλότερη έκφραση σε σχέση με τα υπόλοιπα επιλεγμένα γονίδιαρυθμιστές της αγγειογένεσης στις κυτταρικές σειρές DLD1 WT και MUT. Επιπλέον, επιβεβαιώθηκε η υπερέκφρασή του στην κυτταρική σειρά DLD1 MUT σε σχέση με την DLD1 WT. Επίσης, όπως σημειώθηκε παραπάνω, έχει αναφερθεί η υπερέκφραση της χημειοκίνης CXCL5 σε ιστούς καρκίνου του παχέος εντέρου, έχει συσχετιστεί με δυσμενή πρόγνωση των ασθενών και έχει μελετηθεί ο ρόλος της σε διαδικασίες όπως η μετάσταση των όγκων αλλά ο ακριβής ρόλος της στη νεοπλασματική αγγειογένεση δεν έχει μελετηθεί (119)(129)(221). Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα αλλά και τα βιβλιογραφικά ευρήματα η χημειοκίνη CXCL5 επιλέχθηκε για περαιτέρω μελέτη στο σύστημα των καρκινικών σειρών DLD1 WT και MUT.

Αρχικά, μελετήθηκε η έκκρισης της CXCL5 από τα κύτταρα DLD1 WT και MUT μετά από καλλιέργεια σε συνθήκες μειωμένου ορού. Για το λόγο αυτό τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 0.5% ορό για 19 και 46 ώρες και ακολούθως συλλέχθηκε το υπερκείμενο των κυττάρων. Η έκκριση της CXCL5 στα υπερκείμενα πραγματοποιήθηκε με ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κατά Western, όπου εντοπίστηκε μια ζώνη στο αναμενόμενο μοριακό βάρος για την χημειοκίνη, περίπου στα 10 kDa. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 29 τα DLD1 MUT εκκρίνουν μεγαλύτερη ποσότητα χημειοκίνης σε σχέση με τα DLD1 WT μετά από 19 και 46 ώρες επώαση με 0.5% ορό. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με την ποσοτικοποίηση των ζωνών φαίνεται ότι η έκκριση της CXCL5 είναι περίπου 3 φορές μεγαλύτερη στην κυτταρική σειρά DLD1 MUT σε σχέση με την DLD1 WT και η διαφορά αυτή παρατηρείται και στις 19 και στις 46 ώρες επώασης.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση της εκκρινόμενης CXCL5 από τα κύτταρα DLD1 WT και MUT ακολουθώντας την ίδια διαδικασία με παραπάνω συλλέχθηκαν τα υπερκείμενα και αναλύθηκαν στο ίδιο πήκτωμα με γνωστές συγκεντρώσεις (25, 50, 100 ng) ανθρώπινης ανασυνδυασμένης CXCL5 (recombinant human CXCL5, rhCXCL5), η οποία έχει ανακτηθεί από το βακτήριο E.coli και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 30 στα δείγματα της rhCXCL5 ανιχνεύθηκαν τρείς επιπλέον ζώνες, εκτός της αναμενόμενης στα 10kDa, οι οποίες όμως δεν εμφανίζονται στα δείγματα των υπερκειμένων. Οι ζώνες αυτές, οι οποίες διατηρούνται κατά την ανάλυση της rhCXCL5 παρουσία και απουσία DTT, πιθανά υποδηλώνουν την ύπαρξη διμερών ή ολιγομερών τα οποία είναι γνωστό ότι μπορούν να δημιουργηθούν από τη χημειοκίνη (222).

Εφόσον δεν ήταν βέβαιο τι αποτελούν οι ζώνες αυτές, για την ποσοτικοποίηση της CXCL5 των υπερκειμένων λήφθηκαν υπόψη είτε και οι τέσσερις ζώνες που εμφανίζονται (υπολογισμός 1) είτε μόνο η ζώνη στα 10 kDa (υπολογισμός 2). Η ποσοτικοποίηση των ζωνών έγινε με το πρόγραμμα Quantity One (Biorad) και βάσει των γνωστών συγκεντρώσεων της rhCXCL5 δημιουργήθηκε πρότυπη καμπύλη για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των υπερκειμένων. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 30 βάσει του υπολογισμού 1, στην ίδια ποσότητα υπερκειμένου (40 μL) στα DLD1 WT και DLD1 MUT ανιχνεύονται περίπου 12.75 ng CXCL5 και 34.59 ng αντίστοιχα, ενώ βάσει του υπολογισμού 2 ανιχνεύονται 27.73 ng και 89.57 ng αντίστοιχα. Συνεπώς, παρατηρήθηκε μια αύξηση της έκκρισης της CXCL5 περίπου 3 φορές κατα μέσο όρο στα DLD1 MUT κύτταρα. Επίσης, όπως φαίνεται στον πίνακα της Εικόνας 30 υπολογίστηκαν κατά μέσο όρο πόσα ng/mL περιέχονται στα υπερκείμενα.



Εικόνα 29. Ανίχνευση της χημειοκίνης CXCL5 στα υπερκείμενα των κυττάρων DLD1 WT και MUT. Κύτταρα DLD1 WT και DLD1 MUT τα οποία κάλυπταν το 80-90% της επιφάνειας πιάτων καλλιέργειας επιφάνειας 55 cm<sup>2</sup>, καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό με 0.5% FBS για 19 και 46 ώρες. Για εξασφάλιση ίσου αριθμού κυττάρων σε κάθε συνθήκη πραγματοποιήθηκε μέτρηση του αριθμού των κυττάρων στην αρχή και στο τέλος της επώασης. Ακολούθησε συλλογή του υπερκειμένου και φυγοκέντρη στα 1500 rpm για 5 λεπτά για απομάκρυση των νεκρών κυττάρων. Για την ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιήθηκαν 40 μl από κάθε υπερκείμενο. Επιπλέον, λήφθηκαν τα κυτταρικά εκχυλίσματα από κάθε πιάτο καλλιέργειας, ακολούθησε ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης και ανάλυση με χρήση του αντισώματος anti-actin (μάρτυρας ισοφόρτωσης). Η ποσοτικοποίηση της έντασης της κάθε ζώνης πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Quantity One. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τρείς ανεξάρτητες φορές. (\*P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001)



**Εικόνα 30. Ποσοτικοποίηση της εκκρινόμενης χημειοκίνης CXCL5 στα υπερκείμενα των κυττάρων DLD1 WT και DLD1 MUT.** Κύτταρα DLD1 WT και DLD1 MUT τα οποία κάλυπταν το 80-90% της επιφάνειας πιάτων καλλιέργειας επιφάνειας 55 cm<sup>2</sup>, καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό με 0.5% FBS για 46 ώρες. Για εξασφάλιση ίσου αριθμού κυττάρων σε κάθε συνθήκη πραγματοποιήθηκε μέτρηση του αριθμού των κυττάρων στην αρχή και στο τέλος της επώασης. Για την ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιήθηκαν 40μl από κάθε υπερκείμενο. Για την ποσοτικοποίηση, στο ίδιο πήκτωμα αναλύθηκαν τρείς συγκεντρώσεις (25, 50, 100 ng) ανθρώπινης ανασυνδυασμένης CXCL5 (recombinant human CXCL5, rhCXCL5). Η ποσοτικοποίηση της έντασης της κάθε ζώνης πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Quantity One, και βάσει των γνωστών συγκεντρώσεων της rhCXCL5, υπολογίστηκε η συγκέντρωση των δειγμάτων. Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η συγκέντρωση που αντιστοιχεί σε κάθε ζώνη και ο υπολογισμός 1) είτε μόνο τη τελευταία ζώνη (10 kDa) της CXCL5 (υπολογισμός 2). Στον πίνακα αναφέρεται η συγκέντρωση του κάθε δείγματος σε ng/mL. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τρείς ανεξάρτητες φορές. (\*P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001)

### 3.5 Η πρωτεϊνική κινάση σερίνης θρεονίνης ΑΚΤ1 ρυθμίζει την έκφραση της CXCL5 στα κύτταρα DLD1

Με σκοπό την περαιτέρω διερεύνηση της ρύθμισης της έκφρασης της CXCL5 από το σηματοδοτικό μονοπάτι της PI3K, μελετήθηκε ο ρόλος ενός από τα βασικά καθοδικά μόρια, της κινάσης σερίνης θρεονίνης ΑΚΤ/PKB (Protein kinase B). Στον άνθρωπο υπάρχουν τρείς πρωτεΐνες ΑΚΤ με αλληλουχίες που παρουσιάζουν πάνω από 80% ομολογία οι οποίες κωδικοποιούνται από τρία διαφορετικά γονίδια ΑΚΤ1, ΑΚΤ2, ΑΚΤ3 (223) (224). Οι ΑΚΤ1 και ΑΚΤ2 εντοπίζονται στην πλειονότητα των ιστών ενώ η έκφραση της ΑΚΤ3 εντοπίζεται κυρίως στον εγκέφαλο (225). Για να διερευνηθεί αν οι AKT1 και AKT2 επηρεάζουν την έκφραση της CXCL5 στο υπό μελέτη σύστημα, ελήφθησαν από τον καθηγητή Bert Vogelstein κυτταρικές σειρές DLD1 στις οποίες έχει πραγματοποιηθεί γονιδιακή αποσιώπηση (knockout) είτε της AKT1 (DLD1 AKT1-/-), είτε της AKT2 (DLD1 AKT2-/-) ή και των δύο (DLD1 AKT1/2-/-) με στοχευμένη εισαγωγή ειδικά σχεδιασμένων ιϊκών αλληλουχίών ΑΑV όπως περιγράφεται (226). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα βάσει του οποίου τα επιμολυσμένα κύτταρα εκφράζουν γονίδιο αντοχής σε αντιβιοτικό μόνο αν η αλληλουχία στόχευσης ενσωματωθεί στο πλαίσιο ενός ενδογενούς υποκινητή (promoter trap strategy) (227). Με τον τρόπο αυτό πραγματοποιήθηκε στοχευμένη εισαγωγή της ιϊκής αλληλουχίας στο εξώνιο 4 του ΑΚΤΙ γονιδίου και στο εξώνιο 2 του γονιδίου ΑΚΤ2.

Αρχικά, για να επιβεβαιωθεί η ορθότητα της γονιδιακής στόχευσης των παραπάνω σειρών πραγματοποιήθηκε RT-PCR με ειδικά σχεδιασμένους εκκινητές για τα γονίδια AKT1, AKT2. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην Εικόνα 31A, επιβεβαιώθηκε η αποσιώπηση των AKT1, AKT2 στις γονιδιακά τροποποιημένες κυτταρικές σειρές σε σχέση με την πατρική κυτταρική σειρά (DLD1 PAR) στην οποία εκφράζονται και τα δύο γονίδια. Στη συνέχεια, μελετήθηκε με qRT-PCR η έκφραση της CXCL5 σε αυτές τις κυτταρικές σειρές σε σχέση με την πατρική σειρά με την πατρική σειρά. Όπως παρατηρήθηκε, στην πατρική σειρά DLD1 η CXCL5 παρουσιάζει υψηλή έκφραση η οποία μειώνεται σημαντικά στην DLD1 AKT1-/- σειρά, στην οποία εκράζεται καμία από δύο (Εικόνα 31B). Αντίθετα, η υψηλή έκφραση επανεμφανίζεται στην DLD1 AKT2-/-, όπου

εκφράζεται μόνο η ΑΚΤ1. Το αποτέλεσμα αυτό δηλώνει ότι η ΑΚΤ1, και όχι η ΑΚΤ2, εμπλεκεται στην ρύθμιση του γονιδίου της CXCL5 στα κύτταρα DLD1.



**Εικόνα 31. Επίδραση της ΑΚΤ1 στην έκφραση του γονιδίου της CXCL5. Α.** Έκφραση των *AKT1* και *AKT2* στις κυτταρικές σειρές DLD1 Parental, DLD1 AKT1 -/-, DLD1 AKT1/2 -/- και DLD1 AKT2 -/-. Συνολικό RNA από τις κυτταρικές σειρές απομονώθηκε, ποσοτικοποιήθηκε και η έκφραση των γονιδίων ελέγθηκε με RT-PCR. Στην εικόνα παρουσιάζεται η ανάλυση των δειγμάτων της RT-PCR (δύο δείγματα/ανά συνθήκη) σε πηκτή αγαρόζης 2%. Ως αρνητικό δείγμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε H<sub>2</sub>O ελεύθερο νουκλεασών. **B.** Έκφραση του γονιδίου *CXCL5* στις κυτταρικές σειρές DLD1 PAR, DLD1 AKT1 -/-, DLD1 AKT1/2 -/- και DLD1 AKT2 -/-. Συνολικό RNA από τις κυτταρικές σειρές απομονώθηκε, ποσοτικοποιήθηκε και η έκφραση του γονιδίου *CXCL5* στις κυτταρικές σειρές DLD1 PAR, DLD1 AKT1 -/-, DLD1 AKT1/2 -/- και DLD1 AKT2 -/-. Συνολικό RNA από τις κυτταρικές σειρές απομονώθηκε, ποσοτικοποιήθηκε και η έκφραση των γονιδίων ελέγθηκε με qRT-PCR. Κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε βάσει των τιμών για το γονίδιο GAPDH. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τρείς ανεξάρτητες φορές. (\*P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001)

### 3.6 Γονιδιακή αποσιώπηση της CXCL5 στην κυτταρική σειρά DLD1 MUT με το σύστημα CRISPR-Cas9

Με σκοπό τη δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών στις οποίες έχει πραγματοποιηθεί γονιδιακή αποσιώπηση της CXCL5 (stable knockout cell lines) χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος CRISPR-Cas9 και συγκεκριμένα το σύστημα CRISPR- Cas9 διπλής σχάσης/εγκοπής (double nick or dual nickase CRISPR system). Στο σύστημα αυτό δύο ενδονουκλεάσες Cas910A, κατευθυνόμενες από ειδικά σχεδιασμένα gRNAs (guide RNAs) στοχεύουν και δημιουργούν σχάση/εγκοπή σε μια από τις δύο συμπληρωματικές αλυσίδες DNA και ακολουθεί επιδιόρθωση μέσω ομόλογης σύνδεσης άκρων (Homology Directed Repair, HDR) (βλ. Κεφάλαιο 3.8.1).

Στο πρώτο στάδιο της μεθόδου σχεδιάστηκαν τα gRNAs, τα οποία είναι μικρά συνθετικά RNA που αποτελούνται από μια αλληλουχία απαραίτητη για την πρόσδεση της νουκλεάσης Cas (scaffold sequence) και από μια αλληλουχία 20 περίπου νουκλεοτιδίων (spacer), η οποία καθορίζει τον γονιδιωματικό στόχο που θα τροποποιηθεί. Για τον σχεδιασμό των κατάλληλων gRNAs για το γονίδιο CXCL5 χρησιμοποιήθηκε το διαδικτυακό εργαλείο ΑΤUM και επιλέχθηκαν τα ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές τα οποία βάσει του εργαλείου εμφάνιζαν το υψηλότερο βαθμό (score) ο οποίος αντιπροσωπεύει μεγαλύτερη ειδικότητα και συνεπώς αποτελεσματικότερη σγάση/εγκοπή. Έτσι σχεδιάστηκαν gRNAs τα οποία στόχευαν εντός του εξωνίου 2 της CXCL5 (Εικόνα 33A). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε υβριδοποίηση των μονόκλωνων νουκλεοτιδίων για τα gRNA1 και gRNA2 σε δίκλωνα μόρια και εισαγωγή τους στους πλασμιδιακούς φορείς px462 (9175 bp) και PCR-Blunt U6 tracRNA (3890 bp) αντίστοιχα (Εικόνα 32A και B). Ο φορέας -px462 (189) φέρει το γονίδιο της Cas910A, γονίδιο ανθεκτικότητας σε Puromycin και υποκινητή U6 ο οποίος ακολουθείται από θέση πρόσδεσης για gRNA και ομοίως ο PCR-Blunt U6 tracRNA φέρει υποκινητή U6 ο οποίος ακολουθείται από πρόσδεσης για gRNA (βλ. Κεφάλαιο 3.8.2). Ακολούθως, με σκοπό να δημιουργηθεί ο τελικός πλασμιδιακός φορέας με τον οποίο επιμολύνθηκαν τα κύτταρα, ένθεση 366 bp από το πλασμίδιο PCR-Blunt U6 tracRNA+ gRNA2 η οποία περιείχε τον υποκινητή U6 και το gRNA2 κλωνοποιήθηκε στον φορέα -px462+ gRNA1 (Εικόνα 32Γ). Με τον τρόπο αυτό προέκυψε το πλασμίδιο -px462+ 2xgRNAs CXCL5 το οποίο, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 33B, περιλαμβάνει όλα τα στοιχεία που απαιτούνται όπως τα δύο gRNA, το γονίδιο της Cas910A και το γονίδιο αντοχής στο αντιβιοτικό Puromycin.



Εικόνα 32. Σχηματική απεικόνιση των σταδίων της κλωνοποίησης για την κατασκευή του πλασμιδιακού φορέα που χρησιμοποιήθηκε για τη γονιδιακή αποσιώπηση της CXCL5. Α. Κατασκευή του φορέα -px462+gRNA1 CXCL5. Πραγματοποιήθηκε υβριδοποίηση των μονόκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων που σχεδιάστηκαν για το gRNA1 σε δίκλωνα μόρια. Ακολούθησε κλωνοποίηση αυτών στο φορέα -px462 με αντικατάσταση 24 bp μετά από επεξεργασία και του φορέα και του ενθέματος με το ένζυμο bpil. **Β.** Κατασκευή του φορέα PCR-Blunt U6 tracRNA+gRNA1 CXCL5. Πραγματοποιήθηκε υβριδοποίηση των μονόκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων που σχεδιάστηκαν για το gRNA2 σε δίκλωνα μόρια. Ακολούθησε κλωνοποίηση αυτών στο gRNA2 σε δίκλωνα μόρια. Ακολούθησε κλωνοποίηση αυτών στο φορέα γυματοποιήθηκε υβριδοποίηση των μονόκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων που σχεδιάστηκαν για το gRNA2 σε δίκλωνα μόρια. Ακολούθησε κλωνοποίηση αυτών στο φορέα γυματοποιήθηκε υβριδοποίηση των μονόκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων που σχεδιάστηκαν για το gRNA2 σε δίκλωνα μόρια. Ακολούθησε κλωνοποίηση αυτών στο φορέα γυματοποιήθηκε υβριδοποίηση των μονόκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων που σχεδιάστηκαν για το gRNA2 σε δίκλωνα μόρια. Ακολούθησε κλωνοποίηση αυτών στο φορέα PCR-Blunt U6 tracRNA με αντικατάσταση 34 bp μετά από επεξεργασία και του ενθέματος με το ένζυμο bpll. Γ. Κατασκευή του φορέα -px462+2xgRNAs CXCL5. Πραγματοποιήθηκε πέψη του φορέα PCR-Blunt U6 tracRNA+gRNA1 CXCL5 με το ένζυμο XbaI και απομονώθηκε τεμάχιο 366 bp το οποίο κλωνοποιήθηκε στον φορέα -px462+gRNA1 CXCL5 (μετά από πέψη με XbaI). Για το σχεδιασμό χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SnapGene.



Εικόνα 33. Σχηματική απεικόνιση του CRISPR-Cas910A πλασμιδιακού φορέα που χρησιμοποιήθηκε για τη γονιδιακή αποσιώπηση της CXCL5. Α. Τα gRNAs σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του διαδικτυακού εργαλείου ATUM και στόχευαν εντός του εξωνίου 2 του γονιδίου της CXCL5. Με κόκκινο χρώμα είναι σημασμένο το μοτίβο PAM και το βέλος υποδεικνύει το σημείο της σχάσης/εγκοπής. **B.** Ο πλασμιδιακός φορέας -px462+2xgRNAs CXCL5 που χρησιμοποιήθηκε για τη διαμόλυνση των κυττάρων και την δημιουργία των σταθερών κυτταρικών σειρών φέρει σημασμένο με FLAG και NLS cDNA για την Cas910A κάτωθεν υποκινητή chicken β-actin το οποίο συνδέεται με γονίδιο για το αντιβιοτικό Puromycin μέσω ενός T2A πεπτιδίου (self -cleaving peptide). Επίσης υποκινητές U6 οδηγούν τη μεταγραφή των gRNA1 και gRNA2.

Μετά την διαμόλυνση των κυττάρων DLD1 MUT με το πλασμίδιο px462+2xgRNAs CXCL5 ακολούθησε επώαση με το αντιβιοτικό Puromycin με σκοπό την απομόνωση των ανθεκτικών κυτταρικών κλώνων. Απομονώθηκαν συνολικά οκτώ ανθεκτικοί κλώνοι στους οποίους ελέγθηκε η έκφρασης της CXCL5 με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Όπως παρατηρείται στην Εικόνα 34, οι κλώνοι 7 και 8 δεν εξέφραζαν καθόλου την CXCL5 και συνεπώς σε αυτούς έχει πραγματοποιηθεί αποτελεσματικά η γονιδιακή αποσιώπηση. Επίσης, εντοπίστηκαν και κλωνοι όπως οι 2, 3, 5 και 6 που παρουσίασαν μειωμένη έκφραση της CXCL5 σε σχέση με τα DLD1 MUT κύτταρα, πιθανά εξαιτίας της αποσιώπησης του ενός αλληλομόρφου του γονιδίου (mono-allelic knockouts), γεγονός που θα μπορούσε να εξηγήσει την μειωμένη έκφραση. Επιπροσθέτως, ελέγθηκε η ύπαρξη CXCL5 στα υπερκέιμενα των θετικών κλώνων 7 και 8, στα οποία, όπως ήταν αναμενόμενο δεν ανιχνεύθηκε η χημειοκίνη.



Εικόνα 34. Έλεγχος της έκφρασης της CXCL5 στους κυτταρικούς κλώνους που απομονώθηκαν μετά την διαμόλυνση των DLD1 MUT κυττάρων με το φορέα CRISPR-Cas. Οι κυτταρικοί κλώνοι απομονώθηκαν και αναπτύχθηκαν παρουσία αντιβιοτικού Puromycin (1 μg/mL). Λήφθηκαν κυτταρικά εκχυλίσματα από κάθε κλώνο και από DLD1 MUT κύτταρα, ακολούθησε ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης και ανοσοαποτύπωση κατά Western (επάνω μέρος). Ίσος αριθμός κυττάρων DLD1 MUT, CL7, CL8 καλλιεργήθηκε μέχρι πλήρους κάλυψης της επιφάνειας του τρυβλίου, λήφθησαν τα κυτταρικά υπερκείμενα και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western (κάτω μέρος). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα από κάθε τρυβλίο χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση με χρήση του αντισώματος anti-actin (μάρτυρας ισοφόρτωσης). Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τρείς ανεξάρτητες φορές.

### 3.7 Μελέτη των επιπτώσεων της γονιδιακής αποσιώπησης της CXCL5 στα DLD1 MUT κύτταρα *in vitro*

3.7.1 Η CXCL5 επηρεάζει την ανάπτυξη των DLD1 MUT κυττάρων, την ικανότητα εισβολής τους σε υπόστρωμα Matrigel αλλά δεν επιδρά στη μεταναστευτική τους ικανότητα

Η χημειοκίνη CXCL5 όπως είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία, δρα ως αυτοκρινής παράγοντας επηρεάζοντας λειτουργίες των καρκινικών κυττάρων από τα οποία εκκρίνεται, όπως ο πολλαπλασιασμός, η ικανότητα σχηματισμού αποικιών, η μεταναστευτική και διεισδυτική ικανότητα (156)(119). Με στόχο τη διερεύνηση της επίδρασης της αποσιώπησης της CXCL5 στα κύτταρα DLD1 MUT μελετήθηκε *in vitro* η κυτταρική ανάπτυξη, η μεταναστευτική ικανότητα αλλά και η ικανότητα εισβολής των DLD1 MUT και των CXCL5-/- κυττάρων σε υπόστρωμα Matrigel. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το σύστημα IncuCyte που επιτρέπει τη ταυτόχρονη παρακολούθηση και ποσοτικοποίηση των παραπάνω ιδιοτήτων σε πραγματικό χρόνο, ενώ δηλαδή τα κύτταρα βρίσκονται στον επωαστικό κλίβανο. Πιο συγκεκριμένα, για την ποσοτικοποίηση των κυττάρων και τη λήψη μετρήσεων μέσω του προγράμματος του IncuCyte, πραγματοποίηθηκε σήμανση του πυρήνα των κυττάρων. Έτσι, τα κύτταρα μετά την επιμόλυνση να εμφανίσουν σημασμένους πυρήνες με κόκκινο χρώμα (Εικόνα 35).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω τα DLD1 MUT κύτταρα εκφράζουν τη μεταλλαγμένη PI3K (E545K μετάλλαξη) και τη χημειοκίνη CXCL5, ενώ τα CXCL5 -/-CLONE 7 (CL7) εκφράζουν τη μεταλλαγμένη PI3K (E545K μετάλλαξη) όμως δεν εκφράζουν τη CXCL5. Για τον έλεγχο της κυτταρικής ανάπτυξης, κύτταρα DLD1 MUT και CXCL5 -/- CLONE 7 (CL7) καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό με 10% ορό και σε θρεπτικό υλικό με 0,5% ορό για πέντε ημέρες, και μέσω του συστήματος IncuCyte εικόνες λαμβάνονταν κάθε 2 ώρες καθ'όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας. Ταυτόχρονα, ελέγθηκε η ανάπτυξη των DLD1 WT κυττάρων προκειμένου να συγκριθεί με τα αποτελέσματα των υπόλοιπων κυτταρικών σειρών. Στο τέλος υπολογίστηκε ο αριθμός των κόκκινων πυρήνων/ανα μονάδα χρόνου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ανάπτυξη των DLD1 WT, DLD1 MUT και CL7 δεν παρουσιάζει διαφορές από τις 2-60 ώρες καλλιέργειας και στις δύο συνθήκες συγκέντρωσης ορού. Από τις 70 ώρες και έως το τέλος της καλλιέργειας παρατηρείται αυξημένη ανάπτυξη των DLD1 MUT σε σχέση με τα κύτταρα του CL7 παρουσία είτε 0.5% είτε και 10% ορού (Εικόνα 35).



**Εικόνα 35.** Ανάλυση της κυτταρικής αύξησης των σειρών DLD1 WT, DLD1 MUT και CXCL5 -/- CL7 με το σύστημα IncuCyte. Τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας 24 φρεατίων (1x10<sup>3</sup> κύτταρα/ φρεάτιο) και καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με 10% FBS ή 0.5% FBS για πέντε ημέρες. Για τη μέτρηση του κυτταρικού αριθμού μέσω φθορισμού τα κύτταρα είχαν επιμολυνθεί με λεντιιό ο οποίος εκφράζει την ιστόνη H2B-mCherry (κόκκινη χρώση πυρήνα). Εικόνες λήφθηκαν με φακό 10x από τέσσερα διαφορετικά πεδία κάθε φρεατίου ανά δύο ώρες. Από το πρόγραμμα IncuCyte υπολογίστηκε ο αριθμός των κόκκινων πυρήνων/ανα μονάδα χρόνου. Στα γραφήματα παρουσιάζεται ο ρυθμός της κυτταρικής αύξησης και η ομαλοποιήση πραγματοποιήθηκε ως προς τον αρχικό κυτταρικό αριθμό. Αντιπροσωπευτικές εικόνες από τα σημασμένα DLD1 MUT κύτταρα σε τρείς χρονικές στιγμές παρουσιάζονται στο κάτω μέρος της εικόνας. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τρείς ανεξάρτητες φορές. (\*P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001)

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η WT σειρά παρουσιάζει μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης και παρουσία 10% μετά από 80 ώρες καλλιέργειας.Το αποτέλεσμα αυτό δηλώνει ότι η παρουσία της CXCL5 ευνοεί την ανάπτυξη των κυττάρων DLD1 MUT. Ο μειωμένος ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων DLD1 WT σε σχέση με τα MUT κυρίως παρουσία 0.5% FBS είναι αναμενόμενος και συμφωνεί με τα βιβλιογραφικά δεδομένα.

της μεταναστευτικής διεισδυτικής Για τον έλεγχο και ικανότητας, πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία επούλωσης τραύματος (wound healing assay). Βάσει της τεχνικής αυτής, δημιουργείται ένα κενό/τραύμα σε μια κυτταρική μονοστοιβάδα και εν συνεχεία παρακολουθείται και ποσοτικοποιείται η δυνατότητα των κυττάρων να καλύψουν το κενό (κυτταρική μετανάστευση). Στην περίπτωση μελέτης της κυτταρικής διείσδυσης, στο κενό-τραύμα προστίθεται υλικό που προσομοιάζει την εξωκυτταρική θεμέλια ουσία όπως για παράδειγμα το υλικό Matrigel, το οποίο χρησιμοποιήθηκε και στο συγκεκριμένο πείραμα. Με βάση τα παραπάνω, τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε πιάτα κυτταροκαλλιέργειας 96 φρεατίων και επωάστηκαν μέχρι να καλύψουν όλη την επιφάνεια του φρεατίου. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε το κενό/τραύμα και σε κάποια φρεάτια προστέθηκε Matrigel. Εικόνες λήφθηκαν κάθε 2 ώρες για συνολικά 12 ώρες και για 18 ώρες στην περίπτωση ελέγχου της κυτταρικής διείσδυσης σε Matrigel.

Οπως ήταν αναμενόμενο από τη βιβλιογραφία (63), το χαμηλότερο ποσοστό της κάλυψης του τραύματος και συνεπώς τη βραδύτερη μετανάστευτική ικανότητα παρουσίασε η WT σειρά στην οποία παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την MUT. Επίσης, τα αποτελέσματα έδειζαν ταχύτερη μετανάστευση των DLD1 MUT κυττάρων σε σύκριση με τα κύτταρα του CL7, όμως η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική σε καμία χρονική στιγμή. Άρα, η CXCL5 πιθανά δεν επιδρά στη μετακίνηση των κυττάρων DLD1 MUT (Εικόνα 36). Από την άλλη πλευρά, η δεισδυτική ικανότητα σε υλικό Matrigel των κυττάρων του CL7 είναι μειωμένη σε σχέση με τα MUT κύτταρα και η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική κατά τα διαστήματα 14-18 ωρών (Εικόνα 37). Κατά τα χρονικά διαστήματα αυτά, όπως παρατηρήθηκε παραπάνω, η αύξηση και των δύο σειρών είναι παρόμοια, συνεπώς η διαφορά στην μετακίνηση διαμέσω του Matrigel δεν οφείλεται σε διαφορές στην κυτταρική αύξηση. Το αποτελέσμα αυτό δηλώνει την επίδραση της CXCL5 στη διευσδυτική ικανότητα των

DLD1 MUT κυττάρων. Τέλος, όπως είναι αναμενόμενο (63) και η διεισδυτική ικανότητα των WT κυττάρων εμφανίζεται στατιστικά σημαντικά μειωμένη σε σχέση με τα MUT κύτταρα από τις 2-18 ώρες.



Εικόνα 36. Έλεγχος της μεταναστευτικής ικανότητας των κυττάρων DLD1 WT, DLD1 MUT και CXCL5 -/- CL7 με το σύστημα IncuCyte. Τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας 96 φρεατίων (5x10<sup>4</sup> κύτταρα/ φρεάτιο). Την επόμενη ημέρα με τη βοήθεια του εργαλείου Woundmaker δημιουργήθηκε κενό-τραύμα σε όλα τα φρεάτια ταυτόχρονα και τα κύτταρα επωάστηκαν για 12 ώρες. Εικόνες λήφθηκαν με φακό 10x κάθε 2ώρες. Στο γράφημα παρουσιάζεται το ποσοστό της περιοχής του τραύματος που καλύφθηκε/ανά μονάδα χρόνου (hrs). Για τη μέτρηση της περιοχής του τραύματος χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Fiji ImageJ. Στην εικόνα παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες από κάθε κυτταρική σειρά στην αρχή και στο τέλος του πειράματος. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τρείς ανεξάρτητες φορές. (\*P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001)



**Εικόνα 37.** Έλεγχος της ικανότητας μετακίνησης διαμέσου Matrigel των κυττάρων DLD1 WT, DLD1 MUT και CXCL5 -/- CL7 με το σύστημα IncuCyte. Τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας 96 φρεατίων (5x10<sup>4</sup> κύτταρα/ φρεάτιο). Την επόμενη ημέρα με τη βοήθεια του εργαλείου Woundmaker δημιουργήθηκε κενό-τραύμα σε όλα τα φρεάτια ταυτόχρονα, ακολούθησε κάλυψη της περιοχής του τραύματος με Matrigel και τα κύτταρα επωάστηκαν για 18 ώρες. Εικόνες λήφθηκαν με φακό 10x κάθε 2ώρες. Στο γράφημα παρουσιάζεται το ποσοστό της περιοχής του τραύματος που καλύφθηκε/ανά μονάδα χρόνου (hrs). Για τη μέτρηση της περιοχής του τραύματος χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Fiji ImageJ. Οι διαφορές μεταξύ WT και MUT κυττάρων είναι στατιστικά σημαντικές (\*\*) κατά το διάστημα 2-18 ώρες. Στην εικόνα παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες από κάθε κυτταρική σειρά στην αρχή και στο τέλος του πειράματος. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τρείς ανεξάρτητες φορές. (\*P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001)

### 3.7.2 Η CXCL5 επηρεάζει τη βλαστικότητα των κυττάρων DLD1 MUT

Με σκοπό να μελετηθούν περαιτέρω οι επιδράσεις της αποσιώπησης της CXCL5 στα λειτουργικά χαρακτηριστικά των DLD1 MUT κυττάρων, πραγματοποιήθηκε έλεγχος του εμπλουτισμού της σειράς DLD1 MUT σε καρκινικά βλαστικά κύτταρα (Cancer Stem Cells, CSCs) σε σχέση με τους κλώνους DLD1 CXCL5-/-. Τα CSCs αποτελούν έναν μικρό υποπληθυσμό πολυδύναμων κυττάρων που χαρακτηρίζεται από την ικανότητα αυτοανανέωσης και την ικανότητα διαφοροποίησης προς ετερογενή καρκινικά κύτταρα που συνιστούν έναν όγκο (228). Για τον έλεγχο του πληθυσμού των καρκινικών βλαστικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η *in vitro* δοκιμασία ελέγχου σχηματισμού καρκινικών σφαιρών (Sphere formation assay) (229). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ικανότητα των CSCs να σχηματίζουν σφαιρικές δομές (spheres), όταν οι συνθήκες δεν επιτρέπουν την προσκόλληση των κυττάρων στο τρυβλίο καλλιέργειας. Υπό τις συνθήκες αυτές τα μη βλαστικά κύτταραν οδηγούνται σε κυτταρικό θάνατο (anoikis).

Έτσι, κύτταρα DLD1 WT, MUT και CXCL5-/- CL7 και CL8 καλλιεργήθηκαν για 5 ημέρες σε θρεπτικό μέσο DMEM F12 εμπλουτισμένο με 1% γλουταμίνη, 0.5% συμπλήρωμα B27 και 20 ng/mL FGF και EGF και παρατηρήθηκε ο σχηματισμός σφαιρών. Ειδικότερα μετρήθηκε ο αριθμός των σφαιρών σε κάθε περίπτωση και υπολογίστηκε ο παράγοντας TFE (Tumourshere Formation Efficiency) όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι. Σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην Εικόνα 38, οι σφαίρες που σχηματίστηκαν από την κυτταρική σειρά DLD1 MUT ήταν περισσότερες σε αριθμό και σε μέγεθος σε σύκριση με τις σφαίρες που σχηματίστηκαν από τα κύτταρα DLD1 WT, CXCL5-/- CL7 και CL8 και οι διαφορές ήταν μεγαλύτερες κατα την τέταρτη ημέρα της καλλιέργειας. Αρχικά, εξάγεται το συμπέρασμα ότι η ύπαρξη της μετάλλαξης της PI3K επηρεάζει την ικανότητα σχηματισμού σφαιρών καθώς στα DLD1 WT όπου δεν υπάρχει η μετάλλαξη E545K της PI3K, παρατηρήθηκε μικρότερος αριθμός και μέγεθος των σχηματιζόμενων σφαιρών. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με πρόσφατη αναφορά στη βιβλιογραφία (69). Επίσης, ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η αποσιώπηση της CXCL5 επιδρά στην ικανότητα σχηματισμού σφαιρών από τα DLD1 MUT κύτταρα, αποτέλεσμα που αναφέρεται για πρώτη φορά.



**Εικόνα 38. Επίδραση της αποσιώπησης της CXCL5 στη δημιουργία καρκινικών σφαιρών** από τα κύτταρα DLD1 MUT. Κύτταρα DLD1 WT, DLD1 MUT και CXCL5-/- CL7 και CL8 τοποθετήθηκαν σε βακτηριακά τρυβλία  $21 \text{cm}^2$  (45.000 κύτταρα/ τρυβλίο), σε θρεπτικό μέσο DMEM F12 εμπλουτισμένο με 1% γλουταμίνη, 0.5% συμπλήρωμα B27 και 20ng/mL FGF και EGF και επωάστηκαν για 5 ημέρες. Ως σφαίρες θεωρήθηκαν οι δομές μεγέθους >50μm. Για τον υπολογισμό του αριθμού των σχηματιζόμενων σφαιρών μετρήθηκαν οι σφαίρες από έξι διαφορετικά πεδία/τρυβλίο. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες των σχηματιζόμενων σφαιρών κατά την τέταρτη ημέρα καλλιέργειας και στα γραφήματα παρουσιάζεται ο αριθμός (εκφρασμένος ως Tumor Formation Efficiency, TFE) και το μέγεθος των σφαιρών. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τρείς ανεξάρτητες φορές. Στις εικόνες μικροσκοπίας η ράβδος αντιπροσωπεύει 100μm. (\*P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001)

# 3.8 Μελέτη της δράσης της χημειοκίνης CXCL5 σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα *in vitro*

# 3.8.1 Η εκκρινόμενη CXCL5 από τα κύτταρα DLD1 MUT επάγει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων HUVEC

Είναι γνωστό ότι η χημειοκίνη CXCL5 που εκκρίνεται από καρκινικά κύτταρα δρά ως παρακρινής παράγοντας και επάγει τον πολλαπλασιαμό ενδοθηλιακών κυττάρων HUVEC όπως έχει δειχθεί στον παγκρεατικό καρκίνο και στο νεφροκυτταρικό καρκίνωμα (167)(162). Προκειμένου να ερευνηθεί η δράση της εκκρινόμενης CXCL5 από τα κύτταρα DLD1 MUT στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HUVEC, πραγματοποιήθηκε επώαση των HUVEC με θρεπτικό υλικό στο οποίο είχαν καλλιεργηθεί τα κύτταρα DLD1 WT, MUT και CXCL5-/- CL7 και CL8 (Conditioned medium, CM) για 24 ώρες και ακολούθησε δοκιμασία πολλαπλασιασμού με ενσωμάτωση βρωμοδεόξυ ουριδίνης (BrdU). Για τη συλλογή του CM, τα καρκινικά κύτταρα επωάστηκαν σε θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με 0.5% FBS για 46 ώρες, καθώς όπως αναλύθηκε στο Κεφάλαιο 4.4 η έκκριση της CXCL5 υπό αυτές τις συνθήκες είναι υψηλότερη. Αργικά τα κύτταρα HUVEC καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με 5% FBS για 12ώρες. Στη συνέγεια στη συνέγεια το θρεπτικό υλικό αναμείγθηκε με CM από τα καρκινικά κύτταρα σε αναλογία 1:1 για 24 ώρες. Ως δείγμα ελέγχου (control), το θρεπτικό υλικό των HUVEC αναμείχθηκε με θρεπτικό υλικό με 0.5% ορό στο οποίο δεν είχαν επωαστεί καρκινινά κύτταρα, ομοίως σε αναλογία 1:1. Πράγματι, παρατηρήθηκε μείωση της ενσωμάτωσης της Brdu στα HUVEC που επωάστηκαν με CM από τα κύτταρα CXCL5-/- CL7 και CL8 (Εικόνα 39). Επίσης μειωμένο ποσοστό ενσωμάτωσης της Brdu παρατηρήθηκε και μετά την επώαση με το CM από τα DLD1 WT κύτταρα τα οποία εκκρίνουν μικρότερη ποσότητα CXCL5. Το μικρότερο ποσοστό της ενσωμάτωσης Brdu παρατηρήθηκε στο control στο οποίο δεν πραγματοποιήθηκε επώαση των HUVEC με CM καρκινικών κυττάρων, αποτέλεσμα που δείχνει ότι οι παράγοντες που εκκρίνοται από τις παραπάνω κυτταρικές σειρές επιδρούν στον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα παραπάνω αποτέλεσματα συμφωνούν με δεδομένα της βιβλιογραφίας και ενισχύουν την υπόθεση ότι η CXCL5 που εκκρίνεται από τα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου DLD1 MUT επάγει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων HUVEC in vitro.



**Εικόνα 39. Επίδραση της CXCL5 στον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων.** Κύτταρα HUVEC καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με 5% FBS για 12ώρες. Στη συνέχεια στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αναμείχθηκε με υπερκείμενο καρκινικών κυττάρων DLD1 WT, MUT, CXCL5-/- CL7 και CL8 (Conditioned Medium, CM) σε αναλογία 1:1 για 24 ώρες. Ως δείγμα ελέγχου (control), το θρεπτικό υλικό των HUVEC αναμείχθηκε με θρεπτικό υλικό με 0.5% ορό στο οποίο δεν είχαν επωαστεί καρκινινά κύτταρα, ομοίως σε αναλογία 1:1. Ακολούθησε δοκιμασία πολλαπλασιασμού με ενσωμάτωση BrdU σύμφωνα με τα Υλικά και Μέθοδοι. Στο γράφημα παρουσιάζεται το ποσοστό των κυττάρων που ενσωμάτωσαν BrdU και η ανίχνευση της CXCL5 στα CM φαίνεται κάτω από το γράφημα. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες από τον ανοσοφορισμό όπου φαίνεται η Brdu σημασμένη με FITC (πράσινο), η πυρηνική χρώση με Propidium Iodide (PI) (κόκκινο) καθώς και η συνθετική εικόνα. Στις εικόνες μικροσκοπίας η μπάρα αντιπροσωπεύει 20μm. (\*P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001)

# 3.8.2 Η εκκρινόμενη CXCL5 από τα κύτταρα DLD1 MUT επάγει το σχηματισμό αγγειακού δικτύου κυττάρων HUVEC σε τρισδιάστατες καλλιέργειες Matrigel

Ο επόμενος στόχος ήταν να ελεγχθεί η δράση της CXCL5 που εκκρίνεται από τα καρκινικά κύτταρα DLD1 MUT στο σχηματισμό αγγειακών δομών των ενδοθηλιακών κυττάρων HUVEC. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία ελέγχου της αγγειογένεσης *in vitro* κατά την οποία τα ενδοθηλιακά κύτταρα προσκολλώνται,

μεταναστεύουν και σχηματίζουν δομές τριχοειδών αυλών σε υπόστρωμα Matrigel (Tube formation assay). Τα κύτταρα HUVEC τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα Matrigel και επωάστηκαν σε υπερκείμενο καρκινικών κυττάρων DLD1 MUT, CXCL5-/- CL7 και CL8 σε αναλογία 1:1 με το θρεπτικό υλικό καλλιέργειας των HUVEC. Ακολούθησε η παρατήρηση του σχηματισμού δικτύων σε κάθε συνθήκη για 9 ώρες συνολικά όπου και ξεκίνησε η αποικοδόμηση των σχηματιζόμενων δικτύων. Τα δίκτυα που σχηματίστηκαν μετά την επώαση των ενδοθηλιακών κυττάρων με DLD1 MUT CM παρουσιάστηκαν σταθερότερα και καλύτερα οργανωμένα σε σύγκριση με τα δίκτυα που σχηματίστηκαν μετά την επώαση των ενδοθηλιακών κυττάρων με CXCL5-/- CL7 και CL8 CM. Πιο συγκεκριμένα, τα δίκτυα σε κάθε συνθήκη συγκρίθηκαν μεταξύ τους στις 6 ώρες από την έναρξη του πειράματος και οι εικόνες αναλύθηκαν με τη βοήθεια της εφαρμογής Angiogenesis Analyzer του προγράμματος Fiji-ImageJ. Με βάση τη συγκεκριμένη εφαρμογή πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση δομών που αποτελούν βασικές παραμέτρους σχηματισμού του δικτύου και κάποιες από αυτές είναι οι κόμβοι (nodes) από τους οποίους ξεκινούν διασταυρώσεις, οι κλειστοί βρόγχοι (meshes), οι διακλαδώσεις (branches) και τα τμήματα του δικτύου που οριοθετούνται από δυο διασταυρώσεις (master segments), όπως φαίνεται στην Εικόνα 40 (230). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν ότι παρατηρούνται διαφορές στον σχηματισμό όλων των παραπάνω δομών και ειδικότερα στατιστικά σημαντική μείωση στους κλειστούς βρόγχους (meshes) στην περίπτωση των CL7 και CL8 CM σε σχέση με το DLD1 MUT CM. Συνεπώς, παρατηρείται αδυναμία σχηματισμού οργανωμένου δικτύου απουσία της χημειοκίνης CXCL5.



Εικόνα 40. Επίδραση της CXCL5 στο σχηματισμό αγγειακού δικτύου κυττάρων HUVEC σε τρισδιάστατες καλλιέργειες Matrigel. Υπόστρωμα Matrigel τοποθετήθηκε σε ειδικά πλακίδια καλλιέργειας (μ-slide Angiogenesis) και επωάστηκε στους 37<sup>0</sup>C μέχρι να στερεοποιηθεί. Κύτταρα HUVEC (10.000 κύτταρα/φρεάτιο) επιστρώθηκαν στο Matrigel σε θρεπτικό υλικό αναμεμειγμένο με υπερκείμενο καρκινικών κυττάρων DLD1 MUT, CXCL5-/- CL7 και CL8 (Conditioned Medium, CM) σε αναλογία 1:1 και παρατηρήθηκαν για 9 ώρες. Εικόνες λήφθηκαν από έξι διαφορετικά πεδία κάθε φρεατίου και κάθε συνθήκη πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται αντιπροσωπεύουν τις 6 ώρες από την έναρξη του πειράματος. Στο γράφημα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης των δομών nodes (κόκκινο), meshes (μπλε), branches (πράσινο), master segments (κίτρινο) και η ανίχνευση των δομών από την εφαρμογή παρουσιάζεται στις εικόνες. Στις εικόνες μικροσκοπίας η μπάρα αντιπροσωπεύει 100μm. (\*P < 0.05, \*\* P < 0.01)

### 3.9 Μελέτη του ρόλου της CXCL5 στην αγγειογενετική και μεταστατική ικανότητα των DLD1 MUT κυττάρων *in vivo* σε ποντίκια

### 3.9.1 Η CXCL5 επάγει το σχηματισμό αγγείων σε όγκους που προήλθαν από DLD1 MUT κύτταρα σε εμφυτεύματα Matrigel

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μελέτη της αγγειογενετικής ικανότητας των κυτταρικών σειρών DLD1 MUT και DLD1 CXCL5 -/- CL7 και CL8 in vivo και για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το πειραματικό μοντέλο Matrigel (angiogenesis matrigel plug assay). Ειδικότερα, σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια πραγματοποιήθηκε υποδόρια έγχυση Matrigel το οποίο είχε αναμιχθεί με τα καρκινικά κύτταρα και η δημιουργία αγγείωσης στα εμφυτεύματα παρατηρήθηκε μετά από 15 ημέρες. Ως δείγμα ελέγχου (control) πραγματοποιήθηκε έγχυση Matrigel χωρίς καρκινικά κύτταρα. Μετά το τέλος του πειράματος τα εμφυτεύματα αφαιρέθηκαν από τα ζώα, και παρατηρήθηκε μακροσκοπικά το μέγεθος και η ύπαρξη αγγείωσης σε αυτά. Συγκεκριμένα, βάσει των διαστάσεων των εμφυτευμάτων υπολογίστηκε ο συνολικός όγκος τους σε mm<sup>3</sup> όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 41, τα εμφυτεύματα των κυττάρων DLD1 ΜUΤ εμφανίζονται μεγαλύτερα σε μέγεθος αλλά και πιο ερυθρά σε σχέση με αυτά των κυττάρων CXCL5 -/- CL7 και CL8. Επίσης τα εμφυτεύματα που αποτελούνταν μόνο από Matrigel είχαν το μικρότερο μέγεθος. Ειδικότερα, ο συνολικός όγκος των εμφυτευμάτων των κλώνων CL7, CL8 ήταν στατιστικά σημαντικά μικρότερος από τον όγκο των εμφυτευμάτωνν με DLD1 MUT κύτταρα.

Στη συνέχεια, προκειμένου να εντοπιστούν και να ποσοτικοποιηθούν τα αγγεία που σχηματίστηκαν πραγματοποιήθηκε εγκλεισμός των εμφυτευμάτων σε παραφίνη και ανοσοϊστοχημική χρώση με αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης PECAM-1 του ποντικού (Platelet endothelial cell adhesion molecule ή CD31). Η PECAM-1 είναι μια διαμεβρανική γλυκοπρωτεΐνη, η οποία χρησιμοποιείται ανοσοϊστοχημικά ως δείκτης των ενδοθηλιακών κυττάρων, και αποτελεί έναν ευαίσθητο μάρτυρα για την νεοπλασματική αγγειογένεση. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 42, στα εμφυτεύματα με DLD1 MUT κύτταρα εντοπίζονται περισσότερα και μεγαλύτερα αγγεία με διακριτό αυλό στην περιφέρεια του όγκου και λιγότερα στο εσωτερικό του όγκου σε σχέση με τα εμφυτεύματα με κύτταρα CXCL5 -/- CL7 και CL8.



Εικόνα 41. Έλεγχος της ογκογενετικής/αγγειογενετικής ικανότητας των κυττάρων DLD1 MUT και CXCL5-/- CL7 και CL8 με το μοντέλο Matrigel plug assay. Σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια τύπου (NOD/SCID) πραγματοποιήθηκε υποδόρια έγχυση Matrigel αναμεμειγμένου με τα καρκινικά κύτταρα. Ως δείγμα ελέγχου ενέθηκαν 200 μl Matrigel χωρίς την προσθήκη κυττάρων και κάθε συνθήκη εμφύτευσης πραγματοποιήθηκε έξι ανεξάρτητες φορές. Τα εμφυτεύματα αφαιρέθηκαν από τα ζώα μετά από 15 ημέρες. Βάσει των διαστάσεων των εμφυτευμάτων υπολογίστηκε ο συνολικός όγκος τους σύμφωνα με την εξίσωση Tumor volume (mm3) = d2x D/2 όπου d και D είναι η μικρότερη και η μεγαλύτερη διάμετρος σε mm και στο γράφημα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ανά συνθήκη. (\*P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001)

control

DLD1 MUT





CXCL5 -/-CL8





Εικόνα 42. Ανίχνευση των σχηματιζόμενων αγγείων στα εμφυτεύματα Matrigel. Σε τομές παραφίνης από τα εμφυτεύματα Matrigel με κύτταρα DLD1 MUT, CXCL5 -/- CL7 και CL8 και χωρίς (control) πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική χρώση με αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης PECAM1 (CD31, χρωμογόνο DAB) και με ιστοχημική χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες από κάθε συνθήκη σε μεγέθυνση 100Χ. Για την ποσοτικοποίηση μετρήθηκαν τα CD31-θετικά αγγεία από 6-10 τυχαία πεδία του εμφυτεύματος (σε εικόνες μεγένθυσης 200Χ), και η μέτρηση έγινε από τρία διαφορετικά εμφυτεύματα/συνθήκη. Στο γράφημα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης ανά συνθήκη. (\*P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001)

Από την άλλη πλευρά, στα εμφυτεύματα με κύτταρα των CL7 και CL8, τα οποία δεν εκκρίνουν CXCL5, σχηματίστηκαν λιγότερα αγγεία με διακριτό αυλό στην περιφέρεια των όγκων, ενώ παρατηρείται ο σχηματισμός πολλών αγγείων με στενό αυλό στο εσωτερικό του όγκου (Εικόνα 42). Επίσης εντοπίστηκαν και αθροίσεις ενδοθηλιακών κυττάρων που δεν έχουν ακόμη σχηματίσει αυλό. Παρ'όλα αυτά βάσει της ποσοτικοποίησης δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά στον συνολικό αριθμό των CD31-θετικών αγγείων παρουσία ή μη της CXCL5. Στα πλαίσια μιας πιο λεπτομερούς ανάλυσης, μετρήθηκε σε κάθε συνθήκη το ποσοστό των αγγείων με διακριτό ανοιχτό αυλό (open lumen, μαύρο βέλος) και το ποσοστό των αγγείων με πολύ στενό ή και μη διακριτό αυλό (without apparent lumen, κόκκινο βέλος) (Εικόνα 43). Τα αποτέλεσματα της ποσοτικοποίησης έδειξαν ότι απουσία της CXCL5 το ποσοστό των αγγείων με στενό ή μη διακριτό αυλό είναι ιδιαίτερα αυξημένο περίπου στο 60% σε σχέση με το 20% που παρατηρείται παρουσία της CXCL5. Αντίθετα το ποσοστό των αγγείων με διακριτό αυλό είναι μειωμένο στο 40% σε σύγκριση με το 79% παρουσία της CXCL5. Επίσης, βρέθηκε ότι το ποσοστό των αγγείων με διάμετρο αυλού >10 μm στους CL7 και CL8 μειώνεται σημαντικά. Είναι προφανές ότι ο σχηματισμός αγγείων με πολύ στενό αυλό επιτρέπει την κυκλοφορία πολύ λιγότερων ερυθρών αιμοσφαιρίων σε σύγκριση με τα μεγαλύτερα αγγεία που σχηματίστηκαν στην περίπτωση των όγκων με DLD1 MUT κύτταρα (Εικόνα 44). Σε κάποιες περιπτώσεις η διάμετρος των στενών αγγείων πιθανά επιτρέπει τη δίοδο λίγων μόνο ερυθρών κυττάρων. Επομένως, απουσία της CXCL5 παρατηρήθηκε ο σχηματισμός αγγείων με μικρότερους αυλούς.



Εικόνα 43. Η απουσία της CXCL5 οδηγεί σε μείωση του ποσοστού των αγγείων με διακριτό αυλό. Σε τομές παραφίνης από τα εμφυτεύματα Matrigel με κύτταρα DLD1 MUT, CXCL5 -/- CL7 και CL8 και χωρίς (control) πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική χρώση με αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης PECAM1 (CD31, χρωμογόνο DAB) και με ιστοχημική χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες από κάθε συνθήκη σε μεγέθυνση 200X και 400X, όπου φαίνονται αγγεία με διακριτό αυλό (μαύρο βέλος) και με πολύ στενό ή μη διακριτό αυλό (κόκκινο βέλος). Στα γραφήματα παρουσιάζονται τα ποσοστά των παραπάνω αγγείων καθώς και το ποσοστό αγγείων με διάμετρο >10 um). (\*P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001)



Εικόνα 44. Σχηματισμός αγγείων με πολύ στενό αυλό απουσία CXCL5. Σε κρυοτομές από τα εμφυτεύματα Matrigel με κύτταρα CXCL5 -/- CL7 και CL8 πραγματοποιήθηκε ιστοχημική χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες από κάθε συνθήκη σε μεγέθυνση 400X, όπου φαίνονται αγγεία με πολύ στενό αυλό (επάνω μέρος). Τα ερυθρά αιμοσφαίρια εμφανίζονται με κόκκινο χρώμα. Η ράβδος αντιπροσωπεύει τα 10 μm.

### 3.9.2 Μελέτη της μεταστατικής ικανότητας των DLD1 MUT και CXCL5-/-CL7 και CL8

Για τη μελέτη της μεταστατικής ικανότητας πραγματοποιήθηκε η τεχνική δημιουργίας μεταστάσεων κατά την οποία οι καρκινικές κυτταρικές σειρές DLD1 MUT και CXCL5 -/-CL7 και CL8 χορηγήθηκαν ενδοφλέβια σε αθυμικά ποντίκια. Μετά από δύο μήνες, τα ποντίκια θυσιάστηκαν και πραγματοποιήθηκε μακροσκοπική εξέταση αλλά και ανοσοϊστοχημική ανάλυση των πνευμόνων για εύρεση πιθανών μεταστάσεων. Η μικροσκοπική ανάλυση των πνευμόνων αποκάλυψε την ύπαρξη ενός μεταστατικού όγκου σε ποντίκι στο οποίο χορηγήθηκαν τα DLD MUT κύτταρα και ενός μεταστατικού όγκου σε ποντίκι στο οποίο χορηγήθηκαν τα CXCL5-/- CL7 κύτταρα όπως φαίνεται στην Εικόνα 45. Συνεπώς, δεν μπορεί να εξαχθεί σαφές συμπέρασμα για την μεταστατική ικανότητα των δύο κυτταρικών τύπων. Ωστόσο αξίζει να σημειωθεί ότι οι πνέυμονες των ζώων στα οποία ενέθηκαν τα DLD1 MUT κύτταρα εμφανίζονται πιο διογκωμένοι και ερυθροί σε σχέση με τους πνεύμονες των ζώων στα οποία ενέθηκαν CXCL5-/- κύτταρα. Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί και με τα ευρήματα της ανοσοϊστοχημικής ανάλυσης βάσει της οποίας στους πνεύμονες με DLD1 MUT κύτταρα εντοπίστηκαν θέσεις έντονης αιμορραγικής διήθησης.



Εικόνα 45. Μελέτη του σχηματισμού πνευμονικών μεταστάσεων σε αθυμικά ποντίκια από τα κύτταρα DLD1 MUT και CXCL5-/- CL7, CL8. Οι καρκινικές κυτταρικές σειρές χορηγήθηκαν ενδοφλέβια σε αθυμικά ποντίκια και για κάθε συνθήκη χρησιμοποιήθηκαν πέντε ζώα. Μετά από δύο μήνες, τα ποντίκια θυσιάστηκαν και πραγματοποιήθηκε οπτική εξέταση αλλά και ανοσοϊστοχημική ανάλυση των πνευμόνων για εύρεση πιθανών μεταστάσεων. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες από τους πνέυμονες που εξετάστηκαν καθώς και εικόνες ανοσοιστοχημείας με χρώση H&E στις οποίες φαίνονται οι μεταστάσεις που αναπτύχθηκαν από τα DLD1 MUT κύτταρα (αριστερό μέρος) και από τα CXCL5 -/- (δεξιό μέρος). Στο κάτω μέρος παρουσιάζονται εικόνες από πνεύμονα ζώου στο οποίο χορηγήθηκαν DLD1 MUT κύτταρα όπου εντοπίζεται αιμορραγική διήθηση.

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι ιδιαίτερα συχνοί κακοήθεις όγκοι του παχέος εντέρου, όπως συμβαίνει με τους περισσότερους τύπους καρκίνου, αποτελούν πρόκληση στο επίπεδο της κλινικής πράξης καθώς αποτελούν ασθένειες δυσλειτουργίας της κυτταρικής σηματοδότησης. Ένα από τα κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια στον καρκίνο του παγέος εντέρου τα οποία όταν απορρυθμιστούν συμβάλλουν στην καρκινογένεση είναι το μονοπάτι της PI3K κινάσης (3). Συγκεκριμένα, οι μεταλλάξεις του γονίδιου PIK3CA με τη μεγαλύτερη συχνότητα οι οποίες είναι υπεύθυνες για την ογκογόνο δράση της ΡΙ3Κ στον καρκίνο του παγέος εντέρου, είναι οι Η1047R και Ε545Κ στις περιοχές κινάσης και έλικας αντίστοιχα (53). Επιπλέον, ο σηματοδοτικός άξονας της ΡΙ3Κ αποτελεί κύριο ρυθμιστή της νεοπλασματικής αγγειογένεσης (99) ενώ ο ρόλος των μεταλλάξεων H1047R και E545K στην αγγειογένεση των όγκων δεν έχει αναλυθεί εκτενώς. Με βάση ότι το γονίδιο PIK3CA είναι καίριος υποψήφιος στόχος για αντικαρκινική θεραπεία στον καρκίνο του παγέος εντέρου, στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκαν οι επιδράσεις των μεταλλάξεων H1047R και E545K του γονιδίου PIK3CA στις λειτουργίες των καρκινικών κυττάρων αλλά και στη δράση καθοδικών μορίων-ρυθμιστών της αγγειογένεσης τα οποία συμβάλλουν στη διαδικασία της καρκινογένεσης.

### Ο χαρακτηρισμός του ισογονιδιακού συστήματος μελέτης

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε ένα ισογονιδιακό σύστημα καρκινικών σειρών του παχέος εντέρου στο οποίο από τις πατρικές ετεροζυγωτικές ως προς τις μεταλλάξεις κυτταρικές σειρές HCT116 (φέρει την H1047R μετάλλαξη) και DLD1 (φέρει την E545K μετάλλαξη) προέκυψαν οι WT και MUT κυτταρικοί κλώνοι μετά από γονιδιακή απαλοιφή του μεταλλαγμένου ή του φυσικού τύπου αλληλομόρφου αντίστοιχα (63). Το σύστημα αυτό προσφέρει το πλεονέκτημα της δυνατότητας μελέτης των λειτουργικών επιπτώσεων των μεταλλάξεων συγκριτικά με το φυσιολογικό γονίδιο σε ένα κοινό γονιδιακό υπόβαθρο. Η χρήση του συστήματος των παραπάνω κυτταρικών σειρών σε πρόσφατες μελέτες αποδεικνύει ότι αποτελεί ένα κατάλληλο εργαλείο μελέτης των συγκεκριμένων μεταλλάξεων στις κυτταρικές σειρές HCT116 WT και MUT, DLD1 WT και MUT, επιβεβαίωσε τη ταυτόχρονη παρουσία του φυσικού τύπου και του μεταλλαγμένου αλληλίου στις γονιδιακά τροποποιημένες σειρές. Το γεγονός αυτό ήταν αναμενόμενο καθώς η γονιδιακή στόχευση πραγματοποιήθηκε με εισαγωγή ιικής AAV αλληλουχίας στο εξώνιο 1 του γονιδίου *PIK3CA*, στην HCT116 και στην DLD1 κυτταρική σειρά χωρίς να επηρεάσει τα εξώνια στα οποία εντοπίζονται οι μεταλλάξεις (63). Επιπλέον, για την επιβεβαίωση της ορθής γονιδιακής στόχευσης μέσω του συστήματος AAV στις κυτταρικές σειρές DLD1 και HCT116 (WT και MUT), πραγματοποιήθηκε πολλαπλή αντιγραφή του στοχευμένου αλληλομόρφου σε κάθε περίπτωση, με τη μέθοδο της RT-PCR μέσω ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών. Λόγω μεγάλου μεγέθους της προς πολλαπλή αντιγραφή αλληλουχίας πραγματοποιήθηκε επάλληλη PCR και η αλληλούχιση των προϊόντων του δεύτερου γύρου της PCR επιβεβαίωσαν την ορθή στόχευση σε κάθε κυτταρική σειρά.

Εκτός από την επιβεβαίωση του γονιδιωματικού προφίλ των κυτταρικών σειρών, πραγματοποιήθηκε και έλεγχος της ενεργοποίησης καθοδικών μορίων του μονοπατιού της PI3K στις τροποποιημένες κυτταρικές σειρές WT και MUT. Οι φωσφορυλιώσεις της κινάσης ΑΚΤ στα κατάλοιπα Τ308 και S473 αποτελούν κύρια γεγονότα που ακολουθούν την ενεργοποίηση της ΡΙ3Κ. Η φωσφορυλίωση της ΑΚΤ και στα δύο κατάλοιπα ήταν υψηλότερη στις MUT σειρές σε σχέση με τις WT (στις DLD1 και HCT116) κατά την καλλιέργεια σε θρεπτικό υλικό με 0.5% ορό. Όταν τα DLD1 WT και DLD1 MUT κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε 0.5% ορό παρουσία του αυξητικού παράγοντα EGF, τα επίπεδα της φωσφορυλίωσης της ΑΚΤ στα WT κύτταρα, τα οποία εκφράζουν μόνο την φυσικού τύπου PI3K, αυξήθηκαν. Αντίθετα, στα MUT κύτταρα τα οποία εκφράζουν μόνο τη μεταλλαγμένη ΡΙ3Κ η φωσφορυλίωση της ΑΚΤ δεν παρουσίασε μεγάλη διαφορά απουσία ή παρουσία του EGF, αποτέλεσμα που συμφωνεί με την υπάρχουσα βιβλιογραφία (63). Από την άλλη πλευρά, στην περίπτωση της ΗCT116 κυτταρικής σειράς, παρουσία του EGF η φωσφορυλίωση της ΑΚΤ παρουσίασε αύξηση στα MUT κύτταρα (φέρουν τη μετάλλαξη H1047R). Το γεγονός ότι στα DLD1 MUT κύτταρα, τα οποία φέρουν την Ε545Κ μετάλλαξη, η ΑΚΤ μπορεί να ενεργοποιηθεί ανεξάρτητα από την παρουσία αυξητικών παραγόντων επιβεβαιώνεται και από μεταγενέστερη μελέτη στα ίδια κύτταρα βάσει της οποίας η μεταλλαγμένη PI3K-E545K και όχι η PI3K-H1047R αλληλεπιδρά με την IRS1, κατευθύνεται στην πλασματική μεμβράνη και οδηγεί σε φωσφορυλίωση της ΑΚΤ γωρίς να απαιτείται η επαγωγή με αυξητικούς παράγοντες (61).

## <u>Η εξαρτώμενη από τις μεταλλάζεις Η1047R-E545K γονιδιακή έκφραση στα καρκινικά</u> κύτταρα του παχέος εντέρου

Σε συνθήκες καλλιέργειας παρουσία 0.5% ορού εκτός της αυξημένης φωσφορυλίωσης της ΑΚΤ στις MUT κυτταρικές σειρές σε σχέση με τις WT (τόσο στην DLD1 όσο και στην HCT116), οι MUT σειρές παρουσιάζουν αναπτυξιακό πλεονέκτημα σε σχέση με τις WT όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία (63). Με βάση τις παρατηρήσεις αυτές, η καλλιέργεια των κυττάρων σε 0.5% ορό επιλέχθηκε ως συνθήκη για τον έλεγχο της διαφορικής έκφρασης μεταξύ των WT και MUT σειρών μέσω ανάλυσης μικροσυστοιχιών. Τα αποτελέσματα των μικροσυστοιχιών έδειξαν για την ΗCT116 κυτταρική σειρά 34 γονίδια με διαφορική έκφραση στη MUT σειρά εκ των οποίων τα 18 ρυθμίστηκαν θετικά, ενώ τα 16 ρυθμίστηκαν αρνητικά. Από την άλλη πλευρά, για την DLD1 αποκαλύφθηκαν συνολικά 47 γονίδια με διαφορική έκφραση εκ των οποίων τα 25 ρυθμίστηκαν θετικά και τα 22 αρνητικά. Μεταξύ των HCT116 και DLD1 σειρών παρουσιάστηκαν δύο κοινά γονίδια με αυξημένη έκφραση στους MUT κλώνους, τα DPP4 και DDIT4. Το γονίδιο DPP4 κωδικοποιεί μια μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη, γνωστή και ως CD26, η οποία εντοπίζεται και διαλυτή σε καταλυτικά ενεργή μορφή και δρά ως εξωπεπτιδάση σερίνης επιδρώντας σε πολλά υποστρώματα όπως κυταροκίνες και αυξητικοί παράγοντες, ρυθμίζοντας έτσι τη δράσης τους (231). Σε καρκινικές σειρές του παχέος εντέρου (HCT116, HCT15) έχει βρεθεί ότι η αυξημένη έκφραση του γονιδίου DPP4 σχετίζεται με καλλιέργεια των κυττάρων σε θρεπτικό μέσο με μειωμένο ορό, αποτέλεσμα που αποκαλύπτει το ρόλο των αυξητικών παραγόντων στη ρύθμιση της έκφρασης του DPP4 και συμφωνεί με το παρατηρηθέν αποτέλεσμα (232). Το δεύτερο κοινό γονίδιο με αυξημένη έκφραση στις MUT σειρές ήταν το DDIT4 γνωστό και ως REDD1 ή RTP801, το οποίο εκφράζεται ως απόκριση στρεσσογόνων συνθηκών για τα κύτταρα (233). Συγκεκριμένα η πρωτεΐνη DDIT4 κατά τη στέρηση θρεπτικών συστατικών στα κύτταρα, δρά ανασταλτικά στη σηματοδότηση του mTORC1 επάγωντας την επιβίωση των κυττάρων και την αποφυγή της απόπτωσης (233). Ο καίριος αυτός ρόλος της DDIT4 θα μπορούσε να εξηγήσει την αυξημένη έκφρασή της στις MUT σειρές μετά την καλλιέργεια σε 0.5% ορό. Επίσης, θα μπορούσε να συσχετιστεί με τον αυξημένο ρυθμό ανάπτυξης και τη μειωμένη απόπτωση των MUT σειρών σε σχέση με τα WT (63).

Στο σημείο αυτό, η μελέτη επικεντρώθηκε στα γονίδια που παρουσίασαν διαφορική έκφραση στις MUT σειρές και τα οποία με βάση τη βιβλιογραφία αποτελούν ρυθμιστές της αγγειογένεσης. Έτσι, λαμβάνοντας υπόψη γονίδια με διαφορά στην έκφραση μεγαλύτερη από 2 βαθμούς και p-value >0.05 επιλέχθηκαν για την HCT116 MUT τα γονίδια BDNF, PXDN, DPP4, SERPINE1. Ο νευροτροφικός αυξητικός παράγοντας BDNF, ο οποίος παρουσίασε αυξημένη έκφραση στην HCT116 MUT σειρά, ρυθμίζει την αγγειογένεση μέσω μηχανισμών που έχουν μελετηθεί. Για παράδειγμα έχει βρεθεί ότι προάγει την αγγειογένεση μέσω του σηματοδοτικού άξονα του υποδοχέα TrkB και των PLCy, PKCa και HIF-1a σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα (198). Επιπλέον, όπως έχει βρεθεί ο BDNF επάγει αγγειογενετικές αποκρίσεις ενεργοποιώντας τις MMPs και το σύστημα uPA/PAI-1 (ενεργοποιητής τύπου ουροκινάσης/αναστολέας ενεργοποιητή πλασμινογόνου) (196). Το γονίδιο PXDN του οποίου η έκφραση αυξάνεται στην HCT116 MUT, κωδικοποιεί την υπεροξειδάση αίμης Peroxidasin 1, ένζυμο το οποίο εκκρίνεται στον εξωκυτταρικό χώρο συμμετέχοντας στη διαμόρφωση της εξωκυτταρικής μήτρας (234). Γενικά, ο ρόλος των υπεροξειδασών αίμης στην αγγειογένεση έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία (200) και σε μια πρόσφατη μελέτη σημειώνεται ότι η Peroxidasin 1 προάγει την αγγειογένεση in vitro και in vivo μέσω του σηματοδοτικού άξονα ERK 1/2, AKT και FAK (201). Η πεπτιδάση DPP4, η οποία παρουσίασε αυξημένη έκφραση στην HCT116 MUT αλλά και στην DLD1 MUT σειρά, φαίνεται να εμπλέκεται στη διαδικασία της αγγειογένεσης μέσω διάσπασης και απενεργοποίησης της χημειοκίνης SDF-1 η οποία δρά μέσω του υποδοχέα της CXCR4, εμποδίζοντας έτσι την προσέλκυση προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων τα οποία συμβάλλουν στη διαδικασία της αγγειογένεσης (202)(203)(204). Τέλος, το γονίδιο SERPINE1 το οποίο παρουσίασε μειωμένη έκφραση στην HCT116 MUT σειρά κωδικοποιεί τον αναστολέα ενεργοποιητή πλασμινογόνου PAI-1, βασικό στοιχείο του ινωδολυτικού μηχανισμού. Η πρωτεΐνη PAI-1 δρα ως προ-αγγειογενετικός αλλά και ως αντι-αγγειογενετικός παράγοντας με τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης να διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στο τρόπο δράσης της (206)(207)(208)(209)(205)(210)(211).

Για την DLD1 MUT κυτταρική σειρά, ως γονίδια-ρυθμιστές της αγγειογένεσης, επιλέχθηκαν τα *TMPRSS4*, *PODXL2*, *DPP4*, *SEMA4A* και *CXCL5*. Η διαμεμβρανική πρωτεάση σερίνης TMPRSS4 η έκφραση της οποίας παρουσίασε αύξηση στα DLD1 MUT κύτταρα δρά ενισχύοντας την αγγειογένεση στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα και
συγκεκριμένα μειώνει την έκφραση του αναστολέα της αγγειογένεσης RECK μέσω ενεργοποίησης της ERK 1/2 (212). Ο ρόλος της διαμεμβρανικής σιαλομυκίνης PODXL2 (ή ενδογλυκάνη) η οποία υπερεκφράζεται στα DLD1 MUT στη νεοπλασματική αγγειογένεση δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως αλλά είναι γνωστό ότι συμβάλλει στη δομή και την ακεραιότητα των αγγείων (213)(235). Επιπροσθέτως, το γονίδιο SEMA4A το οποίο παρουσίασε μειωμένη έκφραση στα DLD1 MUT κύτταρα, κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη της οικογένεια των Semaphorins, οι οποίες είναι εκκρινόμενες ή διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που χαρακτηρίζονται από ένα συντηρημένο αμινοτελικό άκρο (Sema domain). Όπως έχει βρεθεί, η Sema4a εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα όπου προσδένεται στον υποδοχέα Plexin-D1 ρυθμίζοντας αρνητικά την σηματοδότηση από τον VEGF, δρώντας ως αναστολέας της αγγειογένεσης (236). Από την άλλη πλευρά έχει αναφερθεί και η προαγγειογενική δράση της Sema4a σε μοντέλο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης σε ποντίκια, όπου η Sema4a υπερεκφράζεται από μακροφάγα της περιοχής του τραύματος και συμμετέχει στην προσέλκυση ενδοθηλιακών κυττάρων (217). Τέλος, η χημειοκίνη CXCL5 η οποία όπως έδειξαν τα αποτελέσματα των μικροσυστοιχιών υπερεκφράζεται στα DLD1 MUT κύτταρα ανήκει στην οικογένεια των προαγγειογενετικών χημειοκινών CXC ERL<sup>+</sup> και έχει δειχθεί ο ρόλος της στην επαγωγή της αγγειογένεσης τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις (Πίνακας 13). Παρόλο που πολλές μελέτες αναγνωρίζουν το ρόλο της CXCL5 στην πρόοδο του καρκίνου του παχέος εντέρου (Πίνακας 4), δεν έχει μελετηθεί εκτενώς η δράση της στη νεοπλασματική αγγειογένεση στο παχύ έντερο.

# <u>Η CXCL5 φαίνεται να είναι το κύριο αγγειογενετικό μόριο που ρυθμίζεται από τη PI3K με</u> <u>Ε545K μετάλλαζη στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου</u>

Η ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων-ρυθμιστών της αγγειογένεσης που επιλέχθηκαν, επιβεβαιώθηκε με ποσοτική RT-PCR μετά από καλλιέργεια των κυττάρων παρουσία 0.5% ορού (συνθήκες όμοιες με αυτές στην ανάλυση μικροσυστοιχιών) αλλά και παρουσία 10% ορού. Σε συνθήκες 10% ορού η έκφραση των επιλεγμένων γονιδίων παρουσίασε το ίδιο μοτίβο με αυτό σε συνθήκες 0.5% ορού, αλλά οι διαφορές στην έκφραση μεταξύ WT και MUT σειρών δεν ήταν στατιστικά σημαντικές με εξαίρεση το γονίδιο *TMPRSS4*. Η ποσοτική RT-PCR έδειξε ότι το γονίδιο της CXCL5 παρουσίασε υψηλότερα επίπεδα έκφρασης (στις DLD1 WT και MUT) συγκριτικά με τα γονίδια *TMPRSS4, PODXL2*, DPP4, SEMA4A τα οποία παρουσίασαν μέτρια ή και αρκετά χαμηλή έκφραση. Η μελέτη της έκκρισης της χημειοκίνης CXCL5 στα κυτταρικά υπερκείμενα των σειρών DLD1 WT και MUT, με ανοσοαποτύπωση κατά Western, μετά από καλλιέργεια σε συνθήκες 0.5% ορού για 46 ώρες, αποκάλυψε αυξημένη έκκριση της CXCL5 στα DLD1 MUT κύτταρα σε σχέση με τα WT περίπου κατά 2.7 φορές. Η έκφραση της CXCL5 στα DLD1 κύτταρα έχει αναφερθεί προηγουμένως (119) όμως, δεν υπάρχει συσχέτιση της υπερέκκρισης της CXCL5 με τις μεταλλάξεις της PI3K και ειδικότερα με την E545K την οποία εκφράζουν τα DLD1 MUT κύτταρα. Επιπλέον, αν και έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι η CXCL5 σε άλλους τύπους καρκίνου ενεργοποιείται καθοδικά της PI3K (161)(162), δεν έχει αναφερθεί στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Φαίνεται λοιπόν, ότι η μόνη αγγειογενετική πρωτεΐνη της οποίως η έκφραση έχει αυξηθεί συγκριτικά μεταξύ MUT και WT κυττάρων από αυτές των οποίων τα γονίδια έδειξαν υπερέκφραση στη DLD1 MUT σειρά είναι η CXCL5. Έτσι, η κυτταροκίνη αυτή επιλέχτηκε για παραπέρα έλεγχο αναφορικά με την πιθανότητα να είναι η CXCL5 ο αγγειογενετικός παράγων που ρυθμίζει η E545K *PIK3CA* στον καρκίνο του παχέος εντέρου.

# <u>Η μετάλλαξη E545K ενεργοποιεί την έκφραση του γονιδίου της CXCL5 μέσω της AKT1 και</u> <u>όχι μέσω της AKT2</u>

Ο μηχανισμός επαγωγής της έκφρασης της CXCL5 από τα καρκινικά κύτταρα έχει διευκρινιστεί σε μεγάλο βαθμό και το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/AKT φαίνεται ότι επάγει την έκφραση της CXCL5. Σε καρκινικές σειρές ηπατοκυτταρικού καρκινώματος το μονοπάτι του EGF/EGFR καθώς και η ενεργοποίηση των καθοδικών αξόνων της PI3K και των ERK κινασών, επάγουν την έκφραση της CXCL5. Επίσης, σε κύτταρα νεφροκυτταρικού καρκινώματος έχει δειχθεί ότι ο άξονας PI3K/AKT/NF-kB καθοδικά του υποδοχέα ανδρογόνων (Androgen receptor, AR) οδηγεί σε αυξημένη έκφραση της CXCL5 (162). Στη παρούσα εργασία μελετήθηκε ο ρόλος ενός από τα βασικά καθοδικά μόρια της PI3K, της κινάσης σερίνης θρεονίνης AKT στην έκφραση της CXCL5. Στον άνθρωπο υπάρχουν τρείς πρωτεΐνες AKT (AKT1, AKT2, AKT3) που κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια αλλά οι αλληλουχίες τους παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία (223). Στις κυτταρικές σειρές DLD1 και HCT116 έχει δειχθεί ότι η γονιδιακή απενεργοποίηση των AKT1 και AKT2 οδηγεί σε σημαντική μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων *in*  vitro και της μεταστατικής ικανότητάς τους in vivo και ότι οι δράσεις τους επάγονται μέσω των πρωτεϊνών FOXO (171). Σε μια πρόσφατη μελέτη παρουσιάστηκε πως η απενεργοποίηση των AKT1 και AKT2 σε κύτταρα DLD1 επηρεάζει κάτωθι μόρια που ρυθμίζουν την επιβίωση, τη μετανάστευση και το μεταβολισμό των κυττάρων (237). Σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, σε πατρικά κύτταρα DLD1 στα οποία είχε πραγματοποιηθεί γονιδιακή αποσιώπηση του γονιδίου της AKT1 και σε κύτταρα στα οποία είχαν αποσιωπηθεί και τα δύο γονίδια AKT1 και AKT2, η έκφραση της CXCL5 παρουσίασε έντονη μείωση με qRT-PCR. Η μείωση αυτή δεν παρατηρήθηκε σε DLD1 κύτταρα στα οποία είχε πραγματοποιηθεί γονιδιακή αποσιώπηση του γονιδίου της AKT2. Έτσι, προκύπτει το συμπέρασμα ότι η AKT1 συμμετέχει στη ρύθμιση της έκφρασης της CXCL5 σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου που φέρουν την E545K μετάλλαξη, αποτέλεσμα που δεν έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία.

### <u>Η επίδραση της CXCL5 στο φαινότυπο των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου με</u> <u>Ε545Κ μετάλλαζη</u>

Ο επόμενος στόχος της εργασίας ήταν η μελέτη του ρόλου της CXCL5 στο φαινότυπο των καρκινικών κυττάρων DLD1 MUT αλλά και σε αγγειογενετικές αποκρίσεις. Για τη δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών στις οποίες έχει πραγματοποιηθεί γονιδιακή αποσιώπηση της CXCL5 (stable knockout cell lines) χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος CRISPR-Cas9. Τα τελευταία χρόνια, η τεχνολογία CRISPR έχει ενταχθεί αποτελεσματικά στο τομέα της στοχευμένης γονιδιωματικής τροποποίησης καθώς αποτελεί μια γρήγορη, αξιόπιστη και οικονομική μέθοδο γονιδιακής τροποποίησης. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκε το σύστημα CRISPR-Cas9 διπλής σχάσης/εγκοπής (double nick or dual nickase CRISPR system) κατά το οποίο δύο ενδονουκλεάσες Cas910A κατευθυνόμενες από ειδικά σχεδιασμένα gRNAs (guide RNAs) η καθεμία από τις οποίες στοχεύει και δημιουργεί σχάση/εγκοπή σε μια από τις δύο συμπληρωματικές αλυσίδες DNA και ακολουθεί επιδιόρθωση μέσω ομόλογης σύνδεσης άκρων (Homology Directed Repair, HDR) (βλ. Κεφάλαιο 3.8.1). Η ενδονουκλεάση Cas910A προσφέρει αυξημένη ειδικότητα στη γονιδιακή στόχευση διότι είναι μεταλλαγμένη, διατηρεί μια περιοχή με δράση νουκλεάσης και συνεπώς έχει δυνατότητα να δημιουργεί μονές σχάσεις/εγκοπές στο DNA σε αντίθεση με την φυσικού τύπου η οποία φέρει δύο περιοχές νουκλεάσης και δημιουργεί δίκλωνες

σχάσεις/εγκοπές (180). Με το σύστημα αυτο, πραγματοποιήθηκε επιτυχώς η γονιδιακή αποσιώπηση της CXCL5 στα κύτταρα DLD1 MUT και προέκυψαν κλώνοι με μειωμένη έκφραση της CXCL5, πιθανά εξαιτίας της αποσιώπησης του ενός αλληλομόρφου του γονιδίου, αλλά και δύο κλώνοι (CXCL5-/- CL7, CXCL5-/- CL8) οι οποίοι δεν εξέφραζαν καθόλου την CXCL5. Τα κύτταρα DLD1 MUT CXCL5-/-, τα οποία εκφράζουν το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο της PI3K (με μετάλλαξη E545K) και στα οποία έχει αποσιωπηθεί η CXCL5 συγκρίθηκαν με τα DLD1 MUT και DLD1 WT ως προς την κυτταρική αύξηση, τη μεταναστευτική και διεισδυτική τους ικανότητα *in vitro* με χρήση του συστήματος IncuCyte. Το σύστημα IncuCyte είναι ένα ιδιαίτερα αποτελεσματικό εργαλείο καθώς επιτρέπει τη ταυτόχρονη παρακολούθηση και ποσοτικοποίηση των παραπάνω ιδιοτήτων σε πραγματικό χρόνο, ενώ δηλαδή τα κύτταρα βρίσκονται στον επωαστικό κλίβανο.

Η CXCL5 προάγει τον πολλαπλασιασμό, τη μεταναστευτικότητα και τη διεισδυτικότητα των καρκινικών κυττάρων (119)(129)(153)(156). Ειδικότερα, η χορήγηση ανασυνδυασμένης χημειοκίνης CXCL5 σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου επάγει τον πολλάπλασιασμό τους in vitro και η δράση της εξαρτάται από τον υποδοχέα CXCR2 (129). Πράγματι, με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, τα κύτταρα DLD1 MUT, τα οποία εκκρίνουν τη CXCL5, παρουσιάζουν υψηλότερο ρυθμό αύξησης από τα DLD1 MUT CXCL5-/-, και η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική μετά από 3 ημέρες καλλιέργειας. Επίσης ο ρυθμός αύξησης των DLD1 MUT είναι υψηλότερος από αυτόν των DLD1 WT, αποτέλεσμα που συμφωνεί με τη βιβλιογραφία (63). Η έκτοπη έκφραση της CXCL5 στα HCT116, τα οποία εκφράζουν πολύ χαμηλά επίπεδα της CXCL5, επάγει τη μετανάστευση και τη διείσδυση των κυττάρων in vitro, ενώ η επίδραση αναστέλλεται μετά την αποσιώπηση της CXCL5 με shRNA (119). Επιπλέον, και στη μελέτη αυτή, η δράση της CXCL5 εξαρτάται από τον υποδοχέα CXCR2 και όπως αποδεικνύεται η ρύθμιση της κυτταρικής μετανάστευσης και της μετάβασης επιθηλίου σε μεσέγχυμα επάγεται μέσω του άξονα ERK/Elk-1, ενώ της διείσδυσης μέσω του άξονα AKT/GSK3β/β-catenin/MMP7. Ακόμη, η επαγωγή της μετάστατικής ικανότητας από την CXCL5 αποδείχθηκε και σε in vivo μοντέλο μετάστασης στο ήπαρ σε ποντίκια. Στο υπό μελέτη σύστημα, η δοκιμασία επούλωσης τραύματος έδειξε ότι τα DLD1 MUT, τα οποία εκκρίνουν υψηλή ποσότητα της CXCL5, εμφάνισαν αυξημένη διεισδυτική ικανότητα σε Matrigel σε αντίθεση με τα DLD1 MUT CXCL5-/- CL7 αλλά δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά στη μεταναστευτική ικανότητα. Θα ήταν ενδιαφέρον να ελεγθεί η δράση της εκκρινόμενης CXCL5 στα DLD1 MUT κύτταρα με ταυτόχρονη αναστολή του υποδοχέα CXCR2, όμως δεν ήταν δυνατή η αποτελεσματική αποσιώπηση του CXCR2 μέσω siRNA. Συνεπώς, η εκκρινόμενη CXCL5 στα DLD1 MUT κύτταρα επιδρά στη διαδικασία της διείσδυσης των κυττάρων η οποία αποτελεί ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων μέσω της οποίας επάγεται η μετάσταση. Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα των in vitro πειραμάτων, σε in vivo πειράματα που πραγματοποιήθηκαν δεν εξήχθει σαφές συμπέρασμα για το ρόλο της CXCL5 στη μετάσταση. Πιο συγκεκριμένα, σε αθυμικά ποντίκια στα οποία χορηγήθηκαν ενδοφλέβια οι καρκινικές σειρές DLD1 MUT, DLD1 MUT CXCL5-/- CL7 και CL8, εντοπίστηκε ένας μεταστατικός όγκος στον πνεύμονα ζώου στο οποίο χορηγήθηκαν τα DLD1 MUT και ένας σε ζώο στο οποίο χορηγήθηκαν τα DLD1 MUT CXCL5-/- CL7, ενώ κανένας μεταστατικός όγκος δεν εντοπίστηκε στα ποντίκια στα οποία χορηγήθηκαν τα κύτταρα DLD1 MUT CXCL5-/- CL8. Συνεπώς, θα ήταν θεμιτή η επιλογή ενός καταλληλότερου in vivo μοντέλου μελέτης της μετάστασης για το σύστημα των DLD1 κυτταρικών σειρών, με μεγαλύτερο αριθμό επαναλήψεων σε κάθε συνθήκη ώστε να εξαχθούν στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα.

Με σκοπό να μελετηθούν περαιτέρω οι επιδράσεις της CXCL5 στα λειτουργικά χαρακτηριστικά των DLD1 MUT κυττάρων, ελέγθηκε ο εμπλουτισμός των κυττάρων DLD1 WT, DLD1 MUT και DLD1 MUT CXCL5-/- CL7 και CL8 σε καρκινικά βλαστικά κύτταρα. Τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα (CSCs) αποτελούν έναν μικρό υποπληθυσμό πολυδύναμων κυττάρων που χαρακτηρίζεται από την ικανότητα αυτοανανέωσης και την ικανότητα διαφοροποίησης προς ετερογενή καρκινικά κύτταρα τα οποία συνιστούν έναν όγκο (238)(239). Η ύπαρξη των CSCs έχει παρατηρηθεί στους περισσότερους συμπαγείς όγκους αλλά και σε αιματολογικούς καρκίνους και έχει συσχετιστεί με την πρόοδο της καρκινογένεσης, τη μετάσταση, την επανεμφάνιση των όγκων καθώς και την αντίσταση σε θεραπείες όπως η ραδιοθεραπεία και η χημειοθεραπεία (228). Για τους παραπάνω λόγους, τα CSCs έχουν αποτελέσει έναν υποψήφιο στόχο για την θεραπεία του καρκίνου (240). Η *in vitro* δοκιμασία ελέγχου σχηματισμού καρκινικών σφαιρών (Sphere formation assay), μέσω της οποίας ελέγθηκε ο πληθυσμός των CSCs στις καρκινικές σειρές του παχέος εντέρου, στηρίζεται στην ικανότητα των CSCs να σχηματίζουν σφαιρικές δομές όταν οι συνθήκες δεν επιτρέπουν την προσκόλληση των κυττάρων στο τρυβλίο καλλιέργειας. Αρχικά από τα αποτελέσματα της δοκιμασίας αυτής εξάγεται το συμπέρασμα ότι η ύπαρξη της μετάλλαξης Ε545Κ της ΡΙ3Κ επηρεάζει την ικανότητα σχηματισμού σφαιρών καθώς στα DLD1 WT, όπου δεν υπάρχει η μετάλλαξη, οι σφαίρες που σχηματίστηκαν ήταν μικρότερες σε μέγεθος και αριθμό από τις σφαίρες που σχηματίστηκαν στα DLD1 MUT κύτταρα. Η συσγέτιση της Ε545Κ μετάλλαξης με τη βλαστικότητα των καρκινικών κυττάρων δεν είχε αναφερθεί μέχρι πρόσφατα όπου μια μελέτη ανέφερε το σχηματισμό σφαιρών από τα DLD1 WT και MUT και παρουσίασε την αποακετυλάση της ιστόνης SIRT6 ως ένα ρυθμιστή της βλαστικότητας στα DLD1 MUT κύτταρα (69). Επιπροσθέτως, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αποσιώπηση της CXCL5 επιδρά στην ικανότητα σχηματισμού σφαιρών από τα DLD1 κύτταρα, καθώς τα DLD1 MUT CXCL5-/- CL7 και CL8 σχημάτισαν μικρότερες σφαίρες σε μέγεθος και αριθμό σε σύγκριση με τα DLD1 ΜUΤ κύτταρα. Έτσι, με βάση το αποτέλεσμα αυτό, το οποίο παρατηρείται για πρώτη φορά, συμπεραίνεται ότι η CXCL5 επηρεάζει τη βλαστικότητα των κυττάρων DLD1 MUT. Μια πολύ πρόσφατη μελέτη ενισχύει το ρόλο της CXCL5 στη βλαστικότητα των καρκινικών κυττάρων καθώς αναφέρει τη CXCL5 ως ένα μόριο που σγετίζεται με την ύπαρξη καρκινικών βλαστικών κυττάρων σε όγκους προερχόμενους από καρκινικά κύτταρα ασθενών σε in vivo μοντέλο σε ποντίκια (Patient derived xenografts) (241).

#### <u>Η επίδραση της εκκρινόμενης CXCL5 στα ενδοθηλιακά κύτταρα in vitro</u>

Έχει δειχθεί ότι η CXCL5 που εκκρίνεται από καρκινικά κύτταρα δρά παρακρινώς επηρεάζοντας άλλους κυτταρικούς τύπους όπως τα ενδοθηλιακά κύτταρα και με το τρόπο αυτό πιθανά συμμετέχει στην επαγωγή της νεοπλασματικής αγγειογένεσης. Η CXCL5 που εκκρίνεται σε υπερκείμενα καρκινικών κυττάρων του παγκρέατος επάγει τον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων προερχόμενων από φλέβα ομφάλιου λώρου (HUVECs) (148), τα οποία με βάση τη βιβλιογραφία εκφράζουν τον υποδοχέα CXCR2 (167)(242). Επίσης, στην ίδια μελέτη η εκκρινόμενη CXCL5 από τα καρκινικά κύτταρα επάγει το σχηματισμό αγγειακών δικτύων από τα HUVECs σε Matrigel *in vitro* (tube formation), και η δράση της φαίνεται να οδηγεί σε ενεργοποίηση πολλών κινασών στα HUVECs, μεταξύ των οποίων είναι η ΑΚΤ, η ERK 1/2 και η FAK. Παρόμοια ευρήματα παρουσιάζονται κατά την επαγωγή των ενδοθηλιακών κυττάρων HUVEC με ανθρώπινη ανασυνδυασμένη CXCL5 (167). Στην παρούσα μελέτη, σε

συμφωνία με τα παραπάνω δεδομένα, η CXCL5 που προέργεται από τα DLD1 MUT κύτταρα φαίνεται ότι επηρεάζει τον πολλάπλασιασμό αλλά και το σχηματισμό αγγειακών δομών από τα κύτταρα HUVEC. Η μέθοδος ενσωμάτωσης BrdU έδειξε ότι όταν τα HUVEC καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό από τα κύτταρα DLD1 MUT CXCL5-/- CL7 και CL8, τα οποία δεν εκκρίνουν τη CXCL5, παρουσίασαν μειωμένο πολλαπλασιασμό σε σύγκριση με το ποσοστό πολλαπλασιαμού παρουσία θρεπτικού υλικού από τα DLD1 MUT κύτταρα. Επιπλέον, η επώαση με θρεπτικό υλικό από τα κύτταρα DLD1 WT οδήγησε σε μειωμένο πολλαπλασιασμό των HUVEC γεγονός που δείχνει ότι η ύπαρξη της μετάλλαξης Ε545Κ οδηγεί σε έκκριση παραγόντων που επηρεάζουν το πολλαπλασιαμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Επίσης, η επώαση με το θρεπτικό των DLD1 MUT οδήγησε στο σχηματισμό πιο οργανωμένων αγγειακών δομών σε Matrigel από τα κύτταρα HUVEC. Βάσει ποσοτικοποίησης, παρουσία υπερκειμένου των DLD1 MUT κυττάρων ανιχνεύθηκαν περισσότερες δομές (σε σύγκριση με αυτές που σχηματίστηκαν παρουσία υπερκειμένου των DLD1 WT, CL7, CL8 κυττάρων) όπως οι κλειστοί βρόγχοι, οι διακλαδώσεις και οι κόμβοι οι οποίες αποτελούν δείκτες της οργάνωσης των σχηματιζόμενων δικτύων. Έτσι, επιβεβαιώθηκε και στο υπό μελέτη σύστημα η αγγειογενετική δράση της CXCL5 in vitro μέσω επίδρασης στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Παρόλα αυτά, η δράση της CXCL5 στο σχηματισμό αγγείων σε όγκους in vivo δεν έχει μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό.

#### <u>Ο ρόλος της CXCL5 στο σχηματισμό αγγείων in vivo</u>

Τα αυξημένα επίπεδα της CXCL5 έχουν συσχετιστεί με την αύξηση της μικροαγγειακής πυκνότητας σε όγκους μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, γαστρικού καρκίνου και παγκρεατικού καρκίνου (168)(170)(148), αλλά δεν υπάρχουν δεδομένα για όγκους του παχέος εντέρου. Τα αποτελέσματα από το μοντέλο matrigel που πραγματοποιήθηκε σε ποντίκια απέδειξε ότι οι όγκοι που σχηματίστηκαν εντός των εμφυτευμάτων Matrigel από τα DLD1 MUT κύτταρα ήταν μεγαλύτεροι σε μέγεθος και παρουσίασαν υψηλό ποσοστό αγγείων με μεγάλη διάμετρο αυλού κυρίως στη περιφέρεια των όγκων. Στους όγκους με τα DLD1 MUT CXCL5-/- Cl7 και CL8, απουσία δηλαδή της CXCL5, οι όγκοι ήταν μικρότεροι, με υψηλό ποσοστό αγγείων με πολύ μικρή διάμετρο αυλού. Άρα, απουσία της CXCL5 δεν παρατηρείται μείωση της αγγειογένεσης αλλά διαφοροποίηση των

σχηματιζόμενων αγγείων. Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η παρουσία της CXCL5 ευνοεί την ταχύτερη αύξηση των όγκων, γεγονός που πιθανά να οφείλεται στο ρόλο της CXCL5 στην επαγωγή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων αλλά και σε πιθανές διαφορές τους στην απόπτωση, όμως απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση για τη εξαγωγή συμπεράσματος. Επιπλέον, φαίνεται ότι η απουσία της CXCL5 οδηγεί σε σχηματισμό αγγείων με μικρότερους αυλούς και συνεπώς σε όγκους με μειωμένη αιμάτωση. Θα ήταν ενδιαφέρον να μελετηθούν και άλλες παράμετροι στο παραπάνω *in vivo* μοντέλο, όπως ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση των καρκινικών κυττάρων, η υποξία και η ύπαρξη ανοσολογικών κυττάρων όπως και η διαπερατότητα των σχηματιζόμενων αγγείων ώστε να ενισχυθεί περισσότερο ο ρόλος της CXCL5 στην ανάπτυξη και την αγγειογένεση των όγκων του παχέος εντέρου που εκφράζουν τη μεταλλαγμένη PI3K.

Συμπερασματικά, στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκαν μόριαρυθμιστές της αγγειογένεσης που ενεργοποιούνται καθοδικά της PI3K που φέρει τις μεταλλάξεις H1047R ή E545K στο γονίδιο που κωδικοποιεί την καταλυτική υπομονάδα p110α (*PIK3CA*). Ανάμεσα στα μόρια αυτά βρέθηκε ότι η αγγειογενετική χημειοκίνη CXCL5 υπερεκφράζεται και υπερεκκρίνεται από τα κύτταρα DLD1 MUT που φέρουν την E545K μετάλλαξη μέσω ενεργοποίησης της AKT1. Η CXCL5 που προέρχεται από τα DLD1 MUT, όπως συνοψίζεται στο παρακάτω σχήμα (Εικόνα 46), δρώντας αυτοκρινώς επιδρά στα DLD1 MUT κύτταρα, αλλά και μέσω παρακρινούς δράσης επηρεάζει τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τις αγγειογενετικές αποκρίσεις τους. Επίσης, η CXCL5 επηρεάζει το μέγεθος όγκων που προέρχονται από τα DLD1 MUT κύτταρα σε ποντίκια, αλλά και την αγγειογένεση αυτών, οδηγώντας στο σχηματισμό αγγείων μεγάλης διαμέτρου. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής παρέχουν στοιχεία για την πρόοδο όγκων του παχέος εντέρου που φέρουν μεταλλάξεις της PI3K, και αποκαλύπτουν ότι η CXCL5 θα μπορούσε να μελετηθεί περαιτέρω και να αποτελέσει ένα στόχο της αγγειογένεσης σε όγκους του παχέος εντέρου με μετάλλαξη E545 στο γονιδίο *PIK3CA*.



Εικόνα 46. Σχηματική παρουσίαση των δράσεων της CXCL5 που παρουσιάστηκαν στη παρούσα εργασία. Η αυξημένη έκφραση της CXCL5 εντοπίστηκε στα DLD1 MUT κύτταρα τα οποία φέρουν τη μετάλλαξη E545K του γονιδίου *PIK3CA* που κωδικοποιεί τη καταλυτική υπομονάδα της PI3K. Η επαγωγή της έκφρασης της CXCL5 μεσολαβείται από την AKT1 η οποία αποτελεί καθοδικό στόχο της PI3K. Δεδομένα της βιβλιογραφίας υποστηρίζουν ότι η CXCL5 η οποία δρά μέσω του υποδοχέα της CXCR2 ενεργοποιεί το σηματοδοτικό άξονα της PI3K, συνεπώς είναι πιθανή η ύπαρξη θετικής ανατροφοδότησης μέσω της CXCL5. Η CXCL5 εκκρίνεται σε υψηλό ποσοστό από τα DLD1 MUT κύτταρα, δρά αυτοκρινώς επάγωντας την αύξηση, τη διεισδυτική τους ικανότητα και τη βλαστικότητά τους. Επίσης, η CXCL5 επιδρά στο πολλαπλασιασμό και στο σχηματισμό αγγειακών δομών από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τέλος, η έκκριση της CXCL5 οδηγεί σε σχηματισμό αγγείων σε όγκους που προήλθαν από DLD1 MUT κύτταρα σε εμφυτεύματα Matrigel σε ποντίκια.

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΑ

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί έναν από τους συχνότερους τύπους καρκίνου και ευθύνεται για το 10% των θανάτων από καρκίνο. Η απορρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού της PI3K αποτελεί ένα κρίσιμο γεγονός στην πρόοδο του καρκίνου του παχέος εντέρου. Το 10-30% των όγκων του παχέος εντέρου εμφανίζει μεταλλάξεις στο ογκογονίδιο *PIK3CA*, το οποίο κωδικοποιοεί την καταλυτική υπομονάδα της PI3K κλάσης IA, και το οποίο έχει αποτελέσει έναν υποψήφιο στόχο θεραπευτικών παρεμβάσεων στον καρκίνο. Οι πιο συχνές μεταλλάξεις του *PIK3CA* στον καρκίνο του παχέος εντέρου είναι η H1047R στην περιοχή ενεργότητας κινάσης και η E545K στην περιοχή έλικας, οι οποίες επάγουν την κακοήθη εξαλλαγή αυξάνοντας την ενζυμική δραστικότητα της PI3K. Η αυξημένη ενεργοποίηση της PI3K μέσω των μεταλλάξεων αυτών ρυθμίζει την κυτταρική ανάπτυξη, την επιβίωση και την αγγειογένεση. Η αγγειογένεση αποτελεί ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά των συμπαγών όγκων και επι του παρόντος η αντιαγγειογενετική θεραπεία χρησιμοποιείται στην αντιμετώπιση του καρκίνου του παχέος εντέρου. Παρ'όλα αυτά οι μηχανισμοί μέσω των οποίων η μεταλλαγμένη PI3K ρυθμίζει τη νεοπλασματική αγγειογένεση δεν έχουν διευκρινιστεί.

Στην παρούσα μελέτη, με στόχο τη διερεύνηση ρυθμιστών της αγγειογένεσης καθοδικά του μεταλλαγμένου *PIK3CA*, χρησιμοποιήθηκαν οι καρκινικές σειρές του παχέος εντέρου DLD1 και HCT116 στις οποίες οι μεταλλάξεις E545K και H1047R αντίστοιχα, έχουν απενεργοποιηθεί μέσω γονιδιακής στόχευσης. Έτσι προέκυψαν ισογονιδιακές κυτταρικές σειρές οι οποίες εκφράζουν είτε το φυσικού τύπου (WT) είτε το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο (MUT). Αρχικά επιβεβαιώθηκε η ορθή γονιδιακή στόχευση των σειρών αυτών μέσω γονοτυπικής ανάλυσης. Επιπλέον ελέγθηκαν και επιβεβαιώθηκαν με βάση τη βιβλιογραφία τα επίπεδα της φωσφορυλίωσης της ΑΚΤ (στα κατάλοιπα T308 και S473) στις WT και MUT. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης μικροσυστοιχιών μεταξύ των WT και MUT κυττάρων σε συνθήκες 0.5% ορού, αποκάλυψαν 34 γονίδια με διαφορική έκφραση στα HCT116 κύτταρα (18 με αυξημένη έκφραση, 16 με μειωμένη έκφραση), ενώ 2 από τα γονίδια εντοπίστηκαν και στις δύο σειρές (HCT116 και DLD1). Επιπροσθέτως, μεταξύ των γονιδίων εντοπίστηκαν και κάποια τα οποία με βάση τη βιβλιογραφία είναι μόρια-ρυθμιστές της αγγειογένεσης. Ένα από τα σημαντικότερα

γονίδια το οποίο παρουσίασε αυξημένη έκφραση στη DLD1 MUT σειρά ήταν η χημειοκίνη CXCL5. Η CXCL5 είναι μια μικρού μοριακού βάρους χημειοτακτική κυτταροκίνη, η οποία προσδένεται στον υποδογέα CXCR2, δρα ως προαγγειογενετικός παράγοντας αλλά και ως κύριος παράγοντας προσέλκυσης ουδετερόφιλων. Η έκκριση της CXCL5 από τα DLD1 MUT κύτταρα ήταν αυξημένη σε σχέση με τα DLD1 WT, όπως αποδείχθηκε μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Επίσης, ο έλεγχος της έκφρασης της CXCL5 σε κυτταρικές σειρές DLD1 στις οποίες τα γονίδια AKT1 ή AKT2 ή και τα δύο είχαν αποσιωπηθεί, έδειξε ότι η έκφραση της CXCL5 είναι εξαρτώμενη από την ΑΚΤ1 και όχι από την AKT2. Με σκοπό τη περαιτέρω διερεύνηση των επιδράσεων της CXCL5 στα DLD1 MUT κύτταρα και σε αγγειογενετικές αποκρίσεις in vitro και in vivo, πραγματοποιήθηκε γονιδιακή αποσιώπηση της CXCL5 στα κύτταρα αυτά μέσω του συστήματος CRISPR Cas9 (dual nickase) διπλής σχάσης/εγκοπής και προέκυψαν 2 θετικοί κλώνοι. Πειράματα με το σύστημα IncuCyte έδειξαν ότι τα DLD1 MUT CXCL5-/κύτταρα παρουσίασαν μειωμένο ρυθμό αύξησης και μειωμένη δεισδυτική ικανότητα σε Matrigel σε σύγκριση με τα DLD1 MUT. Επίσης, οι κυτταρικοί κλώνοι DLD1 MUT CXCL5-/εμφάνισαν μειωμένη ικανότητα σχηματισμού καρκινικών σφαιρών (tumorspheres) in vitro σε σχέση με τα DLD1 MUT, αποτέλεσμα που αναδεικνύει το ρόλο της CXCL5 στη ρύθμιση της βλαστικότητας των DLD1 MUT κυττάρων. Επιπροσθέτως, παρατηρήθηκε ότι η CXCL5 ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό και το σχηματισμό αγγειακών δομών από των ενδοθηλιακών κύττάρων HUVEC in vitro. Τέλος πραγματοποιήθηκαν in vivo πειράματα σε ποντίκια στα οποία πραγματοποιήθηκε υποδόρια έγχυση Matrigel αναμεμειγμένου με τα κύτταρα DLD1 MUT ή DLD1 MUT CXCL5-/-. Τα εμφυτεύματα Matrigel με τα DLD1 MUT CXCL5-/- σχημάτισαν μικρότερους όγκους, με CD31-θετικά αγγεία μικρότερης διαμέτρου αυλού σε σχέση με τα εμφυτεύματα των DLD1 MUT κυττάρων.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η μετάλλαξη E545K του *PIK3CA* γονιδίου οδηγεί σε αυξημένη έκφραση της χημειοκίνης CXCL5 μέσω της AKT1 σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου. Η εκκρινόμενη CXCL5 επιδρά στο φαινότυπο των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου (που φέρουν την E545K μετάλλαξη) αλλά επηρεάζει την αύξηση και την αγγειογένεση όγκων που σχηματίζονται από τα κύτταρα αυτά σε ποντίκια.

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΑΓΓΛΙΚΑ (SUMMARY)

Colorectal cancer (CRC) is the third most common malignancy worldwide, accounting for approximately 10% of cancer-related mortality. The deregulation of the PI3K signaling pathway by several mechanisms has a crucial role in CRC progression. In 10-30% of colon cancers the oncogene *PIK3CA*, which encodes the catalytic subunit of PI3Ks (p110 $\alpha$ ), is mutated and has been studied as an effective molecular target for therapeutic interventions. The most common mutations of the *PIK3CA* gene in colon cancer are H1047R, in the kinase domain, and E545K, in the helical domain, both of which lead to oncogenic transformation by increasing PI3K activity. The overactivation of PI3K by these mutations regulates growth, survival and also angiogenesis. Sustained angiogenesis is one of the major characteristics of solid tumors and antiangiogenic therapies are currently in use for the treatment of CRC. However, the mechanisms through which mutated PI3K activates angiogenesis in colon cancer are still unknown.

In the present study, in order to investigate regulators of angiogenesis downstream of PIK3CA the colorectal cancer cell lines DLD1 and HCT116 were used in which the most common mutations of PI3KCA, E545 and H1047R respectively, were inactivated by gene targeting generating isogenic cell lines harbouring either the wild type (WT) or the mutated allele (MUT). We first validated the genotype of the cell lines using a genotyping strategy designed to ensure that the cell lines are correct. We also tested whether the cell lines behave as expected regarding the phosphorylation of AKT on both T308, S473. Microarray analysis of WT and MUT clones in 0.5% serum yeilded 34 differentially regulated genes (18 upregulated, 16 downregulated) in HCT116 cells and 47 genes in DLD1 cells (25 upregulated, 22 downregulated) among which 2 genes were common. Furthermore, the microarray results yielded some candidate genes which, according to the literature, may play a role in angiogenesis. One of the most important genes upregulated in DLD1 MUT cell line is the Chemokine (C-X-C motif) ligand 5 (CXCL5). CXCL5 is a low molecular weight chemotactic chemokine, which binds the G-protein coupled receptor CXCR2 and acts as a proangiogenic agent and a powerful attractant for neutrophils. The levels of secreted CXCL5 by DLD1 MUT cells showed a 3-fold increase compared to DLD1 WT by Western Blot. Also, using a series of AKT1, AKT2 and AKT1/2 knockout DLD1 clones, we demonstrated that the expression of CXCL5 is AKT1 and not AKT2 dependent.

To further investigate the effects of CXCL5 in DLD1-MUT cells and in angiogenic responses, *in vitro* and *in vivo*, two CXCL5 knockout clones (DLD1-MUT-CXCL5-/-CL7 and DLD1-MUT-CXCL5-/-CL8) of DLD1-MUT cells were generated using the CRISPR/Cas9 Double nickase system. Live cell analysis experiments using the IncuCyte system showed that DLD1-MUT- CXCL5-/- cells exhibit reduced growth and invasion (through Matrigel) compared to DLD1-MUT cells. Also, DLD1-MUT- CXCL5-/- clones showed decreased tumorsphere forming ability *in vitro* compared to the DLD1-MUT cells, indicating a role of CXCL5 in the regulation of DLD1-MUT cell stemness. Additionally, it was observed that CXCL5 modulates proliferation and tube formation of HUVEC cells *in vitro*. *In vivo* experiments were performed by incorporating either DLD1 MUT CXCL5-/- or DLD1 MUT cells into Matrigel plugs. The plugs were injected subcutaneously in mice and tumor volume and angiogenesis was scored. DLD1-MUT-CXCL5-/- cell plugs generated smaller tumors and decreased percentage of CD31 positive vessels with apparent lumen compared to plugs containing DLD1-MUT cells.

In conclusion, in this study we show that *PIK3CA* E545K results in enhanced expression of CXCL5 in an AKT1 dependent manner in DLD1 human colon cancer cells. We also provide evidence that CXCL5 is implicated in tumor proliferation, invasion and angiogenesis.

# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Kuipers EJ, Rösch T, Bretthauer M. Colorectal cancer screening Optimizing current strategies and new directions. Vol. 10, Nature Reviews Clinical Oncology. 2013. p. 130–42.
- 2. GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional and national levels of age-specific mortality and 240 causes of death, 1990-2013 : A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. Lancet. 2015. Volume 385, Issue 9963, p.117-171
- 3. Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, Seufferlein T, Sung JJ, Boelens PG, et al. Colorectal cancer. Nat Rev Dis Prim [Internet]. 2015;1:15065. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27189416%0Ahttp://www.pubmedcentral.ni h.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4874655%0Ahttp://www.nature.com/articles/nr dp201565
- 4. Jasperson, Kory W, Thérèse M. Tuchy, Deborah W. Neklason, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. Gastroenterology. 2010. 138(6):2044-58
- 5. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular Origins of Cancer: Molecular Basis of Colorectal Cancer. N Engl J Med. 2009. 361(25):2449-60
- 6. Tariq K, Ghias K, Tariq K, Ghias K. Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. Cancer Biol Med [Internet]. 2016;13(1):120–35. Available from: http://www.cancerbiomed.org/index.php/cocr/article/view/913
- 7. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. Nature. 1998. 396(6712):643-9.
- 8. Pino MS, Chung DC. The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer. Gastroenterology. 2010;138(6):2059–72.
- 9. Kunkel TA, Erie DA. DNA MISMATCH REPAIR. Annu Rev Biochem. 2005. Volume 74, p.681-710
- 10. Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, et al. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH 1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. Nature. 1994;368(6468):258–61.
- 11. Issa J-P. Opinion: CpG island methylator phenotype in cancer. Nat Rev Cancer. 2004. (12):988-93
- 12. Bird AP. CpG-Rich islands and the function of DNA methylation. Nature. 1986. 321(6067):209-13.
- 13. Curtin K, Slattery ML, Samowitz WS. CpG Island Methylation in Colorectal Cancer: Past, Present and Future. Patholog Res Int. 2011: 902674.
- Xing X, Cai W, Shi H, Wang Y, Li M, Jiao J, et al. The prognostic value of CDKN2A hypermethylation in colorectal cancer: A meta-analysis. Br J Cancer. 2013. 108(12): 2542–2548.
- 15. Suzuki H, Igarashi S, Nojima M, Maruyama R, Yamamoto E, Kai M, et al. IGFBP7 is a p53-responsive gene specifically silenced in colorectal cancer with CpG island methylator phenotype. Carcinogenesis. 2010;31(3):342–9.
- 16. Sugai T, Yoshida M, Eizuka M, Uesugii N, Habano W, Otsuka K, et al. Analysis of the DNA methylation level of cancer-related genes in colorectal cancer and the surrounding normal mucosa. Clin Epigenetics. 2017;9(1).
- Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Vol. 61, Cell. 1990. p. 759–67.
- 18. Huels DJ, Sansom OJ. Stem vs non-stem cell origin of colorectal cancer. Vol. 113,

British Journal of Cancer. 2015. p. 1–5.

- 19. Ritsma L, Ellenbroek SIJ, Zomer A, Snippert HJ, De Sauvage FJ, Simons BD, et al. Intestinal crypt homeostasis revealed at single-stem-cell level by in vivo live imaging. Nature. 2014;507(7492):362–5.
- 20. Longacre TA, Fenoglio-Preiser CM. Mixed hyperplastic adenomatous polyps/serrated adenomas. A distinct form of colorectal neoplasia. Am J Surg Pathol. 1990;14(6):524–37.
- Obuch JC, Pigott CM, Ahnen DJ. Sessile Serrated Polyps: Detection, Eradication, and Prevention of the Evil Twin. Curr Treat Options Gastroenterol [Internet]. 2015;13(1):156–70. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s11938-015-0046-y
- Bettington M, Walker N, Clouston A, Brown I, Leggett B, Whitehall V. The serrated pathway to colorectal carcinoma: Current concepts and challenges. Vol. 62, Histopathology. 2013. p. 367–86.
- 23. Yang Y. Cancer immunotherapy: Harnessing the immune system to battle cancer. Vol. 125, Journal of Clinical Investigation. 2015. p. 3335–7.
- 24. Jean S, Kiger AA. Classes of phosphoinositide 3-kinases at a glance. J Cell Sci. 2014;
- Vanhaesebroeck B, Waterfield MD. Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. Vol. 253, Experimental Cell Research. 1999. p. 239– 54.
- 26. Bader AG, Kang S, Zhao L, Vogt PK. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. Nat Rev Cancer [Internet]. 2005 Dec [cited 2016 Feb 22];5(12):921–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16341083
- 27. Thorpe LM, Yuzugullu H, Zhao JJ. PI3K in cancer: Divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. Vol. 15, Nature Reviews Cancer. 2015. p. 7–24.
- Walker EH, Perisic O, Ried C, Stephens L, Williams RL. Structural insights into phosphoinositide 3-kinase catalysis and signalling. Nature. 1999;402(6759):313– 20.
- 29. Fu Z, Aronoff-Spencer E, Wu H, Gerfen GJ, Backer JM. The iSH2 domain of PI 3kinase is a rigid tether for p110 and not a conformational switch. Arch Biochem Biophys. 2004;432(2):244–51.
- 30. Mandelker D, Gabelli SB, Schmidt-Kittler O, Zhu J, Cheong I, Huang C-H, et al. A frequent kinase domain mutation that changes the interaction between PI3K and the membrane. Proc Natl Acad Sci [Internet]. 2009;106(40):16996–7001. Available from: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0908444106
- 31. Burke JE, Perisic O, Masson GR, Vadas O, Williams RL. Oncogenic mutations mimic and enhance dynamic events in the natural activation of phosphoinositide 3kinase p110 (PIK3CA). Proc Natl Acad Sci [Internet]. 2012;109(38):15259–64. Available from: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1205508109
- 32. Yap TA, Garrett MD, Walton MI, Raynaud F, de Bono JS, Workman P. Targeting the PI3K-AKT-mTOR pathway: progress, pitfalls, and promises. Vol. 8, Current Opinion in Pharmacology. 2008. p. 393–412.
- 33. Okkenhaug K, Vanhaesebroeck B. New Responsibilities for the PI3K Regulatory Subunit p85. Sci Signal [Internet]. 2001;2001(65):pe1-pe1. Available from: http://stke.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/stke.2001.65.pe1
- 34. Rodriguez-Viciana P, Warne PH, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD, Downward J.

Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation. EMBO J. 1996. 15(10): 2442–2451.

- Corvera S, Czech MP. Direct targets of phosphoinositide 3-kinase products in membrane traffic and signal transduction. Vol. 8, Trends in Cell Biology. 1998. p. 442–6.
- 36. Stokoe D, Stephens LR, Copeland T, Gaffney PRJ, Reese CB, Painter GF, et al. Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. Science (80-). 1997;277(5325):567–70.
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. Science (80-). 2005;307(5712):1098– 101.
- Yang G, Murashige DS, Humphrey SJ, James DE. A Positive Feedback Loop between Akt and mTORC2 via SIN1 Phosphorylation. Cell Rep. 2015;12(6):937– 43.
- 39. Bader AG, Kang S, Zhao L, Vogt PK. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. Vol. 5, Nature Reviews Cancer. 2005. p. 921–9.
- 40. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. Cell. 2007;129(7):1261–74.
- 41. Tee AR, Manning BD, Roux PP, Cantley LC, Blenis J. Tuberous Sclerosis Complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. Curr Biol. 2003.13(15):1259-68.
- 42. Pore N. Akt1 Activation Can Augment Hypoxia-Inducible Factor-1 Expression by Increasing Protein Translation through a Mammalian Target of Rapamycin-Independent Pathway. Mol Cancer Res [Internet]. 2006;4(7):471–9. Available from: http://mcr.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1541-7786.MCR-05-0234
- 43. Semenza GL. HIF-1, O2, and the 3 PHDs: How animal cells signal hypoxia to the nucleus. Vol. 107, Cell. 2001. p. 1–3.
- 44. Wanzel M, Kleine-Kohlbrecher D, Herold S, Hock A, Berns K, Park J, et al. Akt and 14-3-3η regulate Miz1 to control cell-cycle arrest after DNA damage. Nat Cell Biol. 2005;7(1):30–41.
- 45. Datta SR, Dudek H, Xu T, Masters S, Haian F, Gotoh Y, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell- intrinsic death machinery. Cell. 1997;91(2):231–41.
- Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB. NF-κB activation by tumour necrosis factor requires tie Akt serine- threonine kinase. Nature. 1999. 401(6748):82-5.
- 47. Zhou BP, Liao Y, Xia W, Zou Y, Spohn B, Hung MC. HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. Nat Cell Biol. 2001;3(11):973–82.
- 48. Di Cristofano A. SGK1: The Dark Side of PI3K Signaling. In: Current Topics in Developmental Biology. 2017. p. 49–71.
- 49. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase-AKT pathway in humancancer. Nat Rev Cancer. 2002;2(7):489–501.
- Jaiswal BS, Janakiraman V, Kljavin NM, Chaudhuri S, Stern HM, Wang W, et al. Somatic Mutations in p85α Promote Tumorigenesis through Class IA PI3K Activation. Cancer Cell. 2009. 16(6): 463–474.
- 51. Rosty C, Young JP, Walsh MD, Clendenning M, Sanderson K, Walters RJ, et al.

PIK3CA Activating Mutation in Colorectal Carcinoma: Associations with Molecular Features and Survival. PLoS One. 2013;8(6).

- 52. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, et al. Brevia: high frequency of mutations of the PIK3Ca gene in human cancers. Science (80-) [Internet]. 2004;304(5670):554. Available from: http://dx.doi.org/10.1126/science.1096502
- 53. Cathomas G. PIK3CA in Colorectal Cancer. Front Oncol [Internet]. 2014;4:35. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24624362%5Cnhttp://www.pubmedcentral.n ih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3939771
- 54. Carson JD, Van Aller G, Lehr R, Sinnamon RH, Kirkpatrick RB, Auger KR, et al. Effects of oncogenic p110α subunit mutations on the lipid kinase activity of phosphoinositide 3-kinase. Biochem J. 2008. 409(2):519-24.
- 55. Hon WC, Berndt A, Williams RL. Regulation of lipid binding underlies the activation mechanism of class IA PI3-kinases. Oncogene. 2012;31(32):3655–66.
- 56. Gkeka P, Evangelidis T, Pavlaki M, Lazani V, Christoforidis S, Agianian B, et al. Investigating the Structure and Dynamics of the PIK3CA Wild-Type and H1047R Oncogenic Mutant. PLoS Comput Biol. 2014;10(10).
- 57. Zhao L, Vogt PK. Helical domain and kinase domain mutations in p110 of phosphatidylinositol 3-kinase induce gain of function by different mechanisms. Proc Natl Acad Sci. 2008. 105(7):2652-7
- 58. Lee JY, Engelman JA, Cantley LC. PI3K charges ahead. Vol. 317, Science. 2007. p. 206–7.
- 59. Miled N, Yan Y, Hon WC, Perisic O, Zvelebil M, Inbar Y, et al. Mechanism of two classes of cancer mutations in the phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit. Science (80-). 2007;317(5835):239–42.
- 60. Leontiadou H, Galdadas I, Athanasiou C, Cournia Z. Insights into the mechanism of the PIK3CA E545K activating mutation using MD simulations. Sci Rep. 2018;8(1).
- Hao Y, Wang C, Cao B, Hirsch BM, Song J, Markowitz SD, et al. Gain of Interaction with IRS1 by p110α-Helical Domain Mutants Is Crucial for Their Oncogenic Functions. Cancer Cell. 2013;23(5):583–93.
- 62. Hu X, He Y, Wu L, Hao Y, Wang Z, Zheng W. Novel all-hydrocarbon stapled p110α[E545K] peptides as blockers of the oncogenic p110α[E545K]-IRS1 interaction. Bioorganic Med Chem Lett. 2017;27(24):5446–9.
- 63. Samuels Y, Diaz LA, Schmidt-Kittler O, Cummins JM, DeLong L, Cheong I, et al. Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. Cancer Cell. 2005. 7(6):561-73.
- 64. Wang J, Kuropatwinski K, Hauser J, Rossi MR, Zhou Y, Conway A, et al. Colon carcinoma cells harboring PIK3CA mutations display resistance to growth factor deprivation induced apoptosis. Mol Cancer Ther [Internet]. 2007;6(3):1143–50. Available from: http://mct.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1535-7163.MCT-06-0555
- 65. Samuels Y, Diaz LA, Schmidt-Kittler O, Cummins JM, DeLong L, Cheong I, et al. Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. Cancer Cell. 2005;7(6):561–73.
- 66. Wan G, Pehlke C, Pepermans R, Cannon J, Lidke D, Rajput A. The H1047R point mutation in p110 alpha changes the morphology of human colon HCT116 cancer

cells. Cell Death Discov [Internet]. 2015;1:15044. Available from: http://www.nature.com/articles/cddiscovery201544

- 67. Hao Y, Samuels Y, Li Q, Krokowski D, Guan BJ, Wang C, et al. Oncogenic PIK3CA mutations reprogram glutamine metabolism in colorectal cancer. Nat Commun. 2016. 11971
- 68. Chen J, Shao R, Li F, Monteiro M, Liu JP, Xu ZP, et al. PI3K/Akt/mTOR pathway dual inhibitor BEZ235 suppresses the stemness of colon cancer stem cells. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2015. 42(12):1317-26
- 69. Ioris RM, Galié M, Ramadori G, Anderson JG, Charollais A, Konstantinidou G, et al. SIRT6 Suppresses Cancer Stem-like Capacity in Tumors with PI3K Activation Independently of Its Deacetylase Activity. Cell Rep. 2017;18(8):1858–68.
- 70. Wang Q, Shi YL, Zhou K, Wang LL, Yan ZX, Liu YL, et al. PIK3CA mutations confer resistance to first-line chemotherapy in colorectal cancer. Cell Death Dis. 2018;9(7).
- 71. Cathomas G. PIK3CA in Colorectal Cancer. Front Oncol [Internet]. 2014.4: 35 Available from: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2014.00035/abstract
- 72. Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ, Shima K, Irahara N, Kure S, et al. PIK3CA mutation is associated with poor prognosis among patients with curatively resected colon cancer. J Clin Oncol. 2009. 27(9):1477-84
- 73. Mouradov D, Domingo E, Gibbs P, Jorissen RN, Li S, Soo PY, et al. Survival in stage II/III colorectal cancer is independently predicted by chromosomal and microsatellite instability, but not by specific driver mutations. Am J Gastroenterol. 2013;108(11):1785–93.
- 74. Sartore-Bianchi A, Martini M, Molinari F, Veronese S, Nichelatti M, Artale S, et al. PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies. Cancer Res. 2009;69(5):1851–7.
- 75. Sood A, McClain D, Maitra R, Basu-Mallick A, Seetharam R, Kaubisch A, et al. PTEN gene expression and mutations in the PIK3CA gene as predictors of clinical benefit to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapy in patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer. Clin Colorectal Cancer. 2012;11(2):143–50.
- 76. Janku F. Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway inhibitors in solid tumors: From laboratory to patients. Vol. 59, Cancer Treatment Reviews. 2017. p. 93–101.
- 77. Papadatos-Pastos D, Rabbie R, Ross P, Sarker D. The role of the PI3K pathway in colorectal cancer. Critical Reviews in Oncology/Hematology. 2015. 94(1):18-30
- 78. Juric D, Rodon J, Tabernero J, Janku F, Burris HA, Schellens JHM, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase a–selective inhibition with alpelisib (BYL719) in PIK3CA-altered solid tumors: Results from the first-in-human study. J Clin Oncol. 2018;36(13):1291–9.
- 79. Juvekar A, Burga LN, Hu H, Lunsford EP, Ibrahim YH, Balmañà J, et al. Combining a PI3K inhibitor with a PARP inhibitor provides an effective therapy for BRCA1-related breast cancer. Cancer Discov. 2012. 2(11):1048-63
- 80. Kong D, Okamura M, Yoshimi H, Yamori T. Antiangiogenic effect of ZSTK474, a novel phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor. Eur J Cancer. 2009;45(5):857–65.
- 81. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell. 1996. 86(3):353-64.
- 82. Weis SM, Cheresh DA. Tumor angiogenesis: Molecular pathways and therapeutic

targets. Vol. 17, Nature Medicine. 2011. p. 1359-70.

- 83. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. Nature. 2005. 438(7070):967-74.
- 84. Bejarano MT, Merchan JR. Targeting tumor vasculature through oncolytic virotherapy: recent advances. Oncolytic Virotherapy. 2015;4:169–81.
- 85. Bellou S, Pentheroudakis G, Murphy C, Fotsis T. Anti-angiogenesis in cancer therapy: Hercules and hydra. Vol. 338, Cancer Letters. 2013. p. 219–28.
- 86. Jain RK. Normalization of tumor vasculature: An emerging concept in antiangiogenic therapy. Science. 2005. 307(5706):58-62.
- 87. Weis SM, Cheresh DA. Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. Vol. 437, Nature. 2005. p. 497–504.
- Schaaf MB, Garg AD, Agostinis P. Defining the role of the tumor vasculature in antitumor immunity and immunotherapy article. Vol. 9, Cell Death and Disease. 2018. 9(2):115
- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N Engl J Med. 1971. 285(21):1182-6.
- 90. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? Journal of the National Cancer Institute. 1990. 82(1):4-6.
- 91. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, et al. Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer. N Engl J Med [Internet]. 2004;350(23):2335–42. Available from: http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa032691
- 92. Battaglin F, Puccini A, Intini R, Schirripa M, Ferro A, Bergamo F, et al. The role of tumor angiogenesis as a therapeutic target in colorectal cancer. Vol. 18, Expert Review of Anticancer Therapy. 2018. p. 251–66.
- 93. Jain RK. Normalizing tumor microenvironment to treat cancer: Bench to bedside to biomarkers. In: Journal of Clinical Oncology. 2013. 31(17):2205-18
- 94. Bueno MJ, Mouron S, Quintela-Fandino M. Personalising and targeting antiangiogenic resistance: A complex and multifactorial approach. Vol. 116, British Journal of Cancer. 2017. p. 1119–25.
- 95. Lu K V., Chang JP, Parachoniak CA, Pandika MM, Aghi MK, Meyronet D, et al. VEGF Inhibits Tumor Cell Invasion and Mesenchymal Transition through a MET/VEGFR2 Complex. Cancer Cell. 2012. 22(1):21-35
- 96. Ebos JML, Lee CR, Cruz-Munoz W, Bjarnason GA, Christensen JG, Kerbel RS. Accelerated Metastasis after Short-Term Treatment with a Potent Inhibitor of Tumor Angiogenesis. Cancer Cell. 2009. 15(3):232-9
- 97. Pàez-Ribes M, Allen E, Hudock J, Takeda T, Okuyama H, Viñals F, et al. Antiangiogenic Therapy Elicits Malignant Progression of Tumors to Increased Local Invasion and Distant Metastasis. Cancer Cell. 2009. 15(3):220-31
- 98. Jiang B-H, Zheng JZ, Aoki M, Vogt PK. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling mediates angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor in endothelial cells. Proc Natl Acad Sci. 2000. 97(4):1749-53.
- 99. Soler A, Angulo-Urarte A, Graupera M. PI3K at the crossroads of tumor angiogenesis signaling pathways [Internet]. Vol. 2, Molecular & Cellular Oncology. 2015. 2 (2): p. e975624. Available from: http://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/23723556.2014.975624
- 100. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. Nat Rev Cancer [Internet]. 2003;3(10):721–32. Available from:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13130303

- Xia C, Meng Q, Cao Z, Shi X, Jiang BH. Regulation of aneiogenesis and tumor growth by p110 alpha and AKT1 via VEGF expression. J Cell Physiol. 2006. 209(1):56-66.
- 102. Amiri KI, Richmond A. Role of nuclear factor-κB in melanoma. Vol. 24, Cancer and Metastasis Reviews. 2005. p. 301–13.
- 103. Sparmann A, Bar-Sagi D. Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. Cancer Cell. 2004;6(5):447–58.
- 104. Okkenhaug K, Graupera M, Vanhaesebroeck B. Targeting PI3K in cancer: Impact on tumor cells, their protective stroma, angiogenesis, and immunotherapy. Cancer Discovery. 2016. 6(10):1090-1105
- 105. Rot A, von Andrian UHUH. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells. Annu Rev Immunol. 2004. 22:891-928.
- 106. Griffith JW, Sokol CL, Luster AD. Chemokines and Chemokine Receptors: Positioning Cells for Host Defense and Immunity. Annu Rev Immunol [Internet]. 2014;32(1):659–702. Available from: http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-immunol-032713-120145
- 107. Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, et al. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. J Biol Chem. 1995. 270(45):27348-57.
- 108. Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, Addison CL, Ehlert JE, Burdick MD, et al. CXC chemokines in angiogenesis. J Leukoc Biol. 2000. 68(1):1-8.
- 109. Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. Vol. 5, Nature Reviews Cancer. 2005. p. 263–74.
- 110. Nagarsheth N, Wicha MS, Zou W. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. Vol. 17, Nature Reviews Immunology. 2017. p. 559–72.
- 111. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. Vol. 4, Nature Reviews Cancer. 2004. p. 540–50.
- 112. Zlotnik A, Burkhardt AM, Homey B. Homeostatic chemokine receptors and organspecific metastasis. Vol. 11, Nature Reviews Immunology. 2011. p. 597–606.
- 113. Chow MT, Luster AD. Chemokines in cancer. Cancer Immunol Res. 2014. 2(12): 1125–1131.
- 114. Zhu Q, Han X, Peng J, Qin H, Wang Y. The role of CXC chemokines and their receptors in the progression and treatment of tumors. Vol. 43, Journal of Molecular Histology. 2012. p. 699–713.
- 115. Martin D, Galisteo R, Gutkind JS. CXCL8/IL8 stimulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and the autocrine activation of VEGFR2 in endothelial cells by activating NFκB through the CBM (Carma3/Bcl10/Malt1) complex. J Biol Chem. 2009. 284(10):6038-42.
- 116. Verbeke H, Struyf S, Laureys G, Van Damme J. The expression and role of CXC chemokines in colorectal cancer. Vol. 22, Cytokine and Growth Factor Reviews. 2011. p. 345–58.
- 117. Rubie C, Frick V, Wagner M, Schuld J, Gräber S, Brittner B, et al. ELR+ CXC chemokine expression in benign and malignant colorectal conditions. BMC Cancer. 2008. 8:178.
- 118. Kawamura M, Toiyama Y, Tanaka K, Saigusa S, Okugawa Y, Hiro J, et al. CXCL5, a promoter of cell proliferation, migration and invasion, is a novel serum

prognostic marker in patients with colorectal cancer. Eur J Cancer. 2012. 48(14):2244-51.

- 119. Zhao J, Ou B, Han D, Wang P, Zong Y, Zhu C, et al. Tumor-derived CXCL5 promotes human colorectal cancer metastasis through activation of the ERK/Elk-1/Snail and AKT/GSK3β/β-catenin pathways. Mol Cancer. 2017;16(1).
- 120. Wang D, Wang H, Brown J, Daikoku T, Ning W, Shi Q, et al. CXCL1 induced by prostaglandin E<sub>2</sub> promotes angiogenesis in colorectal cancer. J Exp Med [Internet]. 2006;203(4):941–51. Available from: http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20052124
- Caunt M, Hu L, Tang T, Brooks PC, Ibrahim S, Karpatkin S. Growth-regulated oncogene is pivotal in thrombin-induced angiogenesis. Cancer Res. 2006;66(8):4125–32.
- 122. Wen Y, Giardina SF, Hamming D, Greenman J, Zachariah E, Bacolod MD, et al. GROα is highly expressed in adenocarcinoma of the colon and down-regulates fibulin-1. Clin Cancer Res. 2006. 12(20 Pt 1):5951-9.
- Wang D, Sun H, Wei J, Cen B, DuBois RN. CXCL1 is critical for premetastatic niche formation and metastasis in colorectal cancer. Cancer Res. 2017;77(13):3655–65.
- 124. Li A, Varney ML, Singh RK. Constitutive expression of growth regulated oncogene (gro) in human colon carcinoma cells with different metastatic potential and its role in regulating their metastatic phenotype. Clin Exp Metastasis. 2005;21(7):571–9.
- 125. Zhuo C, Wu X, Li J, Hu D, Jian J, Chen C, et al. Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 is associated with tumor progression and poor prognosis in patients with colorectal cancer. Biosci Rep. 2018. 38(4). pii: BSR20180580.
- 126. le Rolle AF, Chiu TK, Fara M, Shia J, Zeng Z, Weiser MR, et al. The prognostic significance of CXCL1 hypersecretion by human colorectal cancer epithelia and myofibroblasts. J Transl Med. 2015;13(1).
- 127. Wang G, Huang J, Zhu H, Ju S, Wang H, Wang X. Overexpression of GRO-β is associated with an unfavorable outcome in colorectal cancer. Oncol Lett. 2016;11(4):2391–7.
- 128. Cuenca RE, Azizkhan RG, Haskill S. Characterization of GRO  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  expression in human colonic tumours: potential significance of cytokine involvement. Surg Oncol. 1992;1(4):323–9.
- 129. Kawamura M, Toiyama Y, Tanaka K, Saigusa S, Okugawa Y, Hiro J, et al. CXCL5, a promoter of cell proliferation, migration and invasion, is a novel serum prognostic marker in patients with colorectal cancer. Eur J Cancer. 2012;48(14):2244–51.
- Dimberg J, Dienus O, Löfgren S, Hugander A, Wågsäter D. Expression and gene polymorphisms of the chemokine CXCL5 in colorectal cancer patients. Int J Oncol. 2007;31(1):97–102.
- 131. Ma JC, Sun XW, Su H, Chen Q, Guo TK, Li Y, et al. Fibroblast-derived CXCL12/SDF-1? Promotes CXCL6 secretion and co-operatively enhances metastatic potential through the PI3K/Akt/mTOR pathway in colon cancer. World J Gastroenterol. 2017;23(28):5167–78.
- 132. Heidemann J, Ogawa H, Dwinell MB, Rafiee P, Maaser C, Gockel HR, et al. Angiogenic effects of interleukin 8 (CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2. J Biol Chem. 2003. 278(10):8508-15.

- 133. Ning Y, Manegold PC, Hong YK, Zhang W, Pohl A, Lurje G, et al. Interleukin-8 is associated with proliferation, migration, angiogenesis and chemosensitivity in vitro and in vivo in colon cancer cell line models. Int J Cancer. 2011. 128(9):2038-49
- 134. Lee YS, Choi I, Ning Y, Kim NY, Khatchadourian V, Yang D, et al. Interleukin-8 and its receptor CXCR2 in the tumour microenvironment promote colon cancer growth, progression and metastasis. Br J Cancer. 2012;106(11):1833–41.
- 135. Sun Q, Sun F, Wang B, Liu S, Niu W, Liu E, et al. Interleukin-8 promotes cell migration through integrin  $\alpha\nu\beta6$  upregulation in colorectal cancer. Cancer Lett. 2014;354(2):245–53.
- 136. Dabkeviciene D, Jonusiene V, Zitkute V, Zalyte E, Grigaitis P, Kirveliene V, et al. The role of interleukin-8 (CXCL8) and CXCR2 in acquired chemoresistance of human colorectal carcinoma cells HCT116. Med Oncol. 2015;32(12).
- Li A, Varney ML, Singh RK. Expression of interleukin 8 and its receptors in human colon carcinoma cells with different metastatic potentials. Clin Cancer Res. 2001;7(10):3298–304.
- 138. Ueda T, Shimada E, Urakawa T. Serum levels of cytokines in patients with colorectal cancer: Possible involvement of interleukin-6 and interleukin-8 in hematogenous metastasis. J Gastroenterol. 1994. 29(4):423-9.
- Rubie C, Frick VO, Pfeil S, Wagner M, Kollmar O, Kopp B, et al. Correlation of IL-8 with induction, progression and metastatic potential of colorectal cancer. World J Gastroenterol. 2007;13(37):4996–5002.
- 140. Bondurant KL, Lundgreen A, Herrick JS, Kadlubar S, Wolff RK, Slattery ML. Interleukin genes and associations with colon and rectal cancer risk and overall survival. Int J Cancer. 2013. 132(4):905-15.
- 141. Nastase A, Paslaru L, Herlea V, Ionescu M, Tomescu D, Bacalbasa N, et al. Expression of interleukine-8 as an independent prognostic factor for sporadic colon cancer dissemination. J Med Life. 2014. 7(2):215-9.
- 142. Sepuru KM, Poluri KM, Rajarathnam K. Solution structure of CXCL5 A novel chemokine and adipokine implicated in inflammation and obesity. PLoS One. 2014;9(4).
- 143. Wang LY, Tu YF, Lin YC, Huang CC. CXCL5 signaling is a shared pathway of neuroinflammation and blood-brain barrier injury contributing to white matter injury in the immature brain. J Neuroinflammation. 2016;13(1).
- 144. Zhao Y, Zhang X, Zhao H, Wang J, Zhang Q. CXCL5 secreted from adipose tissue-derived stem cells promotes cancer cell proliferation. Oncol Lett. 2018. 15(2):1403-1410
- Chang MS, McNinch J, Basu R, Simonet S. Cloning and characterization of the human neutrophil-activating peptide (ENA-78) gene. J Biol Chem. 1994;269(41):25277–82.
- 146. Rowland KJ, Diaz-Miron J, Guo J, Erwin CR, Mei J, Worthen GS, et al. CXCL5 is required for angiogenesis, but not structural adaptation after small bowel resection. J Pediatr Surg. 2014;49(6):976–80.
- 147. Zhou SL, Dai Z, Zhou ZJ, Wang XY, Yang GH, Wang Z, et al. Overexpression of CXCL5 mediates neutrophil infiltration and indicates poor prognosis for hepatocellular carcinoma. Hepatology. 2012;56(6):2242–54.
- 148. Li A, King J, Moro A, Sugi MD, Dawson DW, Kaplan J, et al. Overexpression of CXCL5 is associated with poor survival in patients with pancreatic cancer. Am J Pathol. 2011;178(3):1340–9.

- 149. Zhou SL, Dai Z, Zhou ZJ, Wang XY, Yang GH, Wang Z, et al. Overexpression of CXCL5 mediates neutrophil infiltration and indicates poor prognosis for hepatocellular carcinoma. Hepatology [Internet]. 2012 Dec [cited 2015 Jan 9];56(6):2242–54. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22711685
- 150. Wang G, Lu X, Dey P, Deng P, Wu CC, Jiang S, et al. Targeting YAP-dependent MDSC infiltration impairs tumor progression. Cancer Discov. 2016;6(1):80–95.
- 151. Najjar YG, Rayman P, Jia X, Pavicic PG, Rini BI, Tannenbaum C, et al. Myeloidderived suppressor cell subset accumulation in renal cell carcinoma parenchyma is associated with intratumoral expression of IL1b, IL8, CXCL5, and Mip-1α. Clin Cancer Res. 2017. 23(9):2346-2355
- 152. Roca H, Jones JD, Purica MC, Weidner S, Koh AJ, Kuo R, et al. Apoptosisinduced CXCL5 accelerates inflammation and growth of prostate tumor metastases in bone. J Clin Invest. 2018;128(1):248–66.
- 153. Xu X, Huang P, Yang B, Wang X, Xia J. Roles of CXCL5 on migration and invasion of liver cancer cells. J Transl Med. 2014. 12.193
- 154. Gao Y, Guan Z, Chen J, Xie H, Yang Z, Fan J, et al. CXCL5/CXCR2 axis promotes bladder cancer cell migration and invasion by activating PI3K/AKT-induced upregulation of MMP2/MMP9. Int J Oncol. 2015;47(2):690–700.
- 155. Zheng J, Zhu X, Zhang J. CXCL5 knockdown expression inhibits human bladder cancer T24 cells proliferation and migration. Biochem Biophys Res Commun [Internet]. 2014 Mar 28 [cited 2015 Jan 9];446(1):18–24. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24583128
- 156. Yang Y, Hou J, Shao M, Zhang W, Qi Y, Shengnan E, et al. CXCL5 as an autocrine or paracrine cytokine is associated with proliferation and migration of hepatoblastoma HepG2 cells. Oncol Lett. 2017;14(6):7977–85.
- 157. Hsu Y-L, Hou M-F, Kuo P-L, Huang Y-F, Tsai E-M. Breast tumor-associated osteoblast-derived CXCL5 increases cancer progression by ERK/MSK1/Elk-1/snail signaling pathway. Oncogene [Internet]. 2013 Sep 12 [cited 2015 Apr 21];32(37):4436–47. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23045282
- 158. Zhou SL, Zhou ZJ, Hu ZQ, Li X, Huang XW, Wang Z, et al. CXCR2/CXCL5 axis contributes to epithelial-mesenchymal transition of HCC cells through activating PI3K/Akt/GSK-3β/Snail signaling. Cancer Lett. 2015;358(2):124–35.
- 159. Kuo P-L, Chen Y-H, Chen T-C, Shen K-H, Hsu Y-L. CXCL5/ENA78 increased cell migration and epithelial-to-mesenchymal transition of hormone-independent prostate cancer by early growth response-1/snail signaling pathway. J Cell Physiol [Internet]. 2011 May [cited 2015 Jan 9];226(5):1224–31. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20945384
- 160. Xia J, Xu X, Huang P, He M, Wang X. The potential of CXCL5 as a target for liver cancer what do we know so far? Expert Opin Ther Targets [Internet]. 2015;19(2):141–6. Available from: http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14728222.2014.993317
- Huang P, Xu X, Wang L, Zhu B, Wang X, Xia J. The role of EGF-EGFR signalling pathway in hepatocellular carcinoma inflammatory microenvironment. J Cell Mol Med. 2014;18(2):218–30.
- 162. Guan Z, Li C, Fan J, He D, Li L. Androgen receptor (AR) signaling promotes RCC progression via increased endothelial cell proliferation and recruitment by modulating AKT  $\rightarrow$ nF- $\kappa$  B  $\rightarrow$ cXCL5 signaling. Sci Rep. 2016;6.37085

- 163. Tetreault M, Wang M, Yang Y, Travis J, Yu Q, Kleinszanto AJ, et al. Klf4 overexpression activates epithelial cytokines and inflammation- mediated esophageal squamous cell cancer in mice. Gastroenterology. 2010;139(6).
- 164. Thobe MN, Gurusamy D, Pathrose P, Waltz SE. The Ron receptor tyrosine kinase positively regulates angiogenic chemokine production in prostate cancer cells. Oncogene. 2010.29(2):214–26.
- 165. Kachroo P, Lee MH, Zhang L, Baratelli F, Lee G, Srivastava MK, et al. IL-27 inhibits epithelial-mesenchymal transition and angiogenic factor production in a STAT1-dominant pathway in human non-small cell lung cancer. J Exp Clin Cancer Res. 2013.32:97
- 166. Takahashi H, Numasaki M, Lotze MT, Sasaki H. Interleukin-17 enhances bFGF-, HGF- and VEGF-induced growth of vascular endothelial cells. Immunol Lett. 2005.98(2):189–93.
- 167. Matsuo Y, Raimondo M, Woodward TA, Wallace MB, Gill KR, Tong Z, et al. CXC-chemokine/CXCR2 biological axis promotes angiogenesis in vitro and in vivo in pancreatic cancer. Int J Cancer. 2009.125(5):1027–37.
- 168. Arenberg DA, Keane MP, DiGiovine B, Kunkel SL, Morris SB, Xue YY, et al. Epithelial-neutrophil activating peptide (ENA-78) is an important angiogenic factor in non-small cell lung cancer. J Clin Invest. 1998.102(3):465–72.
- 169. Soler-Cardona A, Forsthuber A, Lipp K, Ebersberger S, Heinz M, Schossleitner K, et al. CXCL5 Facilitates Melanoma Cell–Neutrophil Interaction and Lymph Node Metastasis. J Invest Dermatol. 2018.138(7):1627–35.
- 170. Park JY, Park KH, Bang S, Kim MH, Lee JE, Gang J, et al. CXCL5 overexpression is associated with late stage gastric cancer. J Cancer Res Clin Oncol. 2007.133(11):835–40.
- 171. Ericson K, Gan C, Cheong I, Rago C, Samuels Y, Velculescu VE, et al. Genetic inactivation of AKT1, AKT2, and PDPK1 in human colorectal cancer cells clarifies their roles in tumor growth regulation. Proc Natl Acad Sci [Internet]. 2010;107(6):2598–603. Available from: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0914018107
- 172. Maciag T, Cerundolo J, Ilsley S, Kelley PR, Forand R. An endothelial cell growth factor from bovine hypothalamus: identification and partial characterization. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979. 76(11):5674-8.
- 173. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. J Clin Invest. 1973. 52(11):2745-56.
- 174. Dalma-Weiszhausz DD, Warrington J, Tanimoto EY, Miyada CG. [1] The Affymetrix GeneChip® Platform: An Overview. Methods in Enzymology. 2006. 410:3-28.
- 175. Miller MB, Tang YW. Basic concepts of microarrays and potential applications in clinical microbiology. Clinical Microbiology Reviews. 2009. 22(4):611-33.
- 176. Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. Exp Hematol. 2002. 30(6):503-12.
- 177. Garneau JE, Dupuis MÈ, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, et al. The CRISPR/cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. Nature. 2010;468(7320):67–71.
- 178. Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of Bacteria and Archaea. Vol. 327, Science. 2010. p. 167–70.

- 179. Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJJ, Charpentier E, Horvath P, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. Nat Rev Microbiol. 2011;9(6):467–77.
- 180. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science (80-). 2013;339(6121):819–23.
- 181. Cho SW, Kim S, Kim JM, Kim JS. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. Nat Biotechnol. 2013;31(3):230–2.
- 182. Hwang WY, Fu Y, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. Nat Biotechnol. 2013;31(3):227–9.
- 183. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science 2012. 337(6096):816-21
- 184. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. Proc Natl Acad Sci [Internet]. 2012;109(39):E2579–86. Available from: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1208507109
- 185. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science (80-). 2013;339(6121):823–6.
- Chiang TWW, Le Sage C, Larrieu D, Demir M, Jackson SP. CRISPR-Cas9D10Anickase-based genotypic and phenotypic screening to enhance genome editing. Sci Rep. 2016. 6:24356
- 187. Davis L, Maizels N. Homology-directed repair of DNA nicks via pathways distinct from canonical double-strand break repair. Proc Natl Acad Sci [Internet]. 2014;111(10):E924–32. Available from: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1400236111
- 188. Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR cas9 for enhanced genome editing specificity. Cell. 2013;154(6):1380–9.
- 189. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Nat Protoc. 2013. 8(11):2281-2308
- 190. Shen B, Zhang W, Zhang J, Zhou J, Wang J, Chen L, et al. Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. Nat Methods. 2014;11(4):399–402.
- 191. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- 192. Kita-Matsuo H, Barcova M, Prigozhina N, Salomonis N, Wei K, Jacot JG, et al. Lentiviral vectors and protocols for creation of stable hESC lines for fluorescent tracking and drug resistance selection of cardiomyocytes. PLoS One. 2009;4(4): e5046.
- 193. Hirata R, Chamberlain J, Dong R, Russell DW. Targeted transgene insertion into human chromosomes by adeno-associated virus vectors. Nat Biotechnol. 2002;20(7):735–8.
- 194. Kang S, Bader AG, Vogt PK. Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. Proc Natl Acad Sci [Internet]. 2005;102(3):802–7. Available from: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0408864102
- 195. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, et al. High Frequency of Mutations of the PIK3CA Gene in Human Cancers. Science 2004.

304(5670):554.

- 196. Sun CY, Hu Y, Wang HF, He WJ, Wang YD, Wu T. Brain-derived neurotrophic factor inducing angiogenesis through modulation of matrix-degrading proteases. Chin Med J (Engl). 2006;119(7):589–95.
- 197. Lam CT, Yang ZF, Lau CK, Tam KH, Fan ST, Poon RTP. Brain-derived neurotrophic factor promotes tumorigenesis via induction of neovascularization: Implication in hepatocellular carcinoma. Clin Cancer Res. 2011;17(10):3123–33.
- 198. Lin CY, Hung SY, Chen H Te, Tsou HK, Fong YC, Wang SW, et al. Brain-derived neurotrophic factor increases vascular endothelial growth factor expression and enhances angiogenesis in human chondrosarcoma cells. Biochem Pharmacol. 2014;91(4):522–33.
- 199. Lin CY, Wang SW, Chen YL, Chou WY, Lin TY, Chen WC, et al. Brain-derived neurotrophic factor promotes VEGF-C-dependent lymphangiogenesis by suppressing miR-624-3p in human chondrosarcoma cells. Cell Death Dis. 2017;8(8):e2964.
- 200. Panagopoulos V, Zinonos I, Leach DA, Hay SJ, Liapis V, Zysk A, et al. Uncovering a new role for peroxidase enzymes as drivers of angiogenesis. Int J Biochem Cell Biol. 2015;68:128–38.
- 201. Medfai H, Khalil A, Rousseau A, Nuyens V, Paumann-Page M, Sevcnikar B, et al. Human peroxidasin 1 promotes angiogenesis through ERK1/2, Akt, and FAK pathways. Cardiovasc Res [Internet]. 2018. 115(2):463-475. Available from: https://academic.oup.com/cardiovascres/advancearticle/doi/10.1093/cvr/cvy179/5049042
- 202. Fiordaliso F, Maggioni S, Balconi G, Schiarea S, Corbelli A, De Luigi A, et al. Effects of dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibition on angiogenesis and hypoxic injury in type 2 diabetes. Life Sci. 2016;154:87–95.
- 203. Zhong J, Rajagopalan S.et al. Dipeptidyl peptidase-4 regulation of SDF-1/CXCR4 axis: Implications for cardiovascular disease. Front Immunol. 2015 Sep 25;6:477.
- 204. Christopherson KW, Hangoc G, Broxmeyer HE. Cell Surface Peptidase CD26/Dipeptidylpeptidase IV Regulates CXCL12/Stromal Cell-Derived Factor-1 -Mediated Chemotaxis of Human Cord Blood CD34+ Progenitor Cells. J Immunol [Internet]. 2002;169(12):7000–8. Available from: http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.169.12.7000.
- 205. Stefansson S, Lawrence DA. The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin  $\alpha(v)\beta$ 3 binding to vitronectin. Nature. 1996;383(6599):441–3.
- 206. McMahon GA, Petitclerc E, Stefansson S, Smith E, Wong MKK, Westrick RJ, et al. Plasminogen Activator Inhibitor-1 Regulates Tumor Growth and Angiogenesis. J Biol Chem. 2001;276(36):33964–8.
- 207. Devy L, Blacher S, Grignet-debrus C, Bajou K, Noe S, Foidart J-M, et al. The proor antiangiogenic effect of plasminogen activator inhibitor 1 is dose dependent. FASEB J [Internet]. 2002;16(2):147–54. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11818362
- 208. Bajou K, Masson V, Gerard RD, Schmitt PM, Albert V, Praus M, et al. The plasminogen activator inhibitor PAI-1 controls in vivo tumor vascularization by interaction with proteases, not vitronectin: Implications for antiangiogenic strategies. J Cell Biol. 2001;152(4):777–84.
- 209. Isogai C, Laug WE, Shimada H, Declerck PJ, Stins MF, Durden DL, et al. Plasminogen Activator Inhibitor-1 Promotes Angiogenesis by Stimulating

Endothelial Cell Migration toward Fibronectin. Cancer Res. 2001. 61(14):5587-94.

- 210. Stefansson S, Petitclerc E, Wong MKK, McMahon GA, Brooks PC, Lawrence DA. Inhibition of Angiogenesis in Vivo by Plasminogen Activator Inhibitor-1. J Biol Chem. 2001;276(11):8135–41.
- 211. Wu J, Strawn TL, Luo M, Wang L, Li R, Ren M, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 inhibits angiogenic signaling by uncoupling vascular endothelial growth factor receptor-2-αVβ3 integrin cross talk. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2015;35(1):111–20.
- 212. Wang CH, Guo ZY, Chen ZT, Zhi XT, Li DK, Dong ZR, et al. TMPRSS4 facilitates epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma and is a predictive marker for poor prognosis of patients after curative resection. Sci Rep. 2015. 5:12366
- 213. Debruin EJ, Hughes MR, Sina C, Liu A, Cait J, Jian Z, et al. Podocalyxin regulates murine lung vascular permeability by altering endothelial cell adhesion. PLoS One. 2014. 9(10):e108881.
- 214. Fieger CB, Sassetti CM, Rosen SD. Endoglycan, a member of the CD34 family, functions as an L-selectin ligand through modification with tyrosine sulfation and sialyl Lewis x. J Biol Chem [Internet]. 2003 Jul 25 [cited 2014 Dec 27];278(30):27390–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12889478
- 215. Nielsen JS, McNagny KM. Novel functions of the CD34 family. J Cell Sci. 2008. 121(Pt 22):3683-92.
- 216. Toyofuku T, Yabuki M, Kamei J, Kamei M, Makino N, Kumanogoh A, et al. Semaphorin-4A, an activator for T-cell-mediated immunity, suppresses angiogenesis via Plexin-D1. EMBO J [Internet]. 2007 Mar 7 [cited 2015 Jan 9];26(5):1373–84. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1817636&tool=pmcent rez&rendertype=abstract
- 217. Meda C, Molla F, De Pizzol M, Regano D, Maione F, Capano S, et al. Semaphorin 4A Exerts a Proangiogenic Effect by Enhancing Vascular Endothelial Growth Factor-A Expression in Macrophages. J Immunol [Internet]. 2012;188(8):4081–92. Available from: http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1101435
- 218. Capparuccia L, Tamagnone L. Semaphorin signaling in cancer cells and in cells of the tumor microenvironment--two sides of a coin. J Cell Sci [Internet]. 2009 Jun 1 [cited 2015 Jan 7];122(Pt 11):1723–36. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19461072
- 219. Keeley EC, Mehrad B, Strieter RM. CXC chemokines in cancer angiogenesis and metastases. Advances in cancer research. 2010. 106:91-111.
- 220. Pickens SR, Chamberlain ND, Volin M V., Gonzalez M, Pope RM, Mandelin AM, et al. Anti-CXCL5 therapy ameliorates IL-17-induced arthritis by decreasing joint vascularization. Angiogenesis. 2011;14(4):443–55.
- 221. Speetjens FM, Kuppen PJK, Sandel MH, Menon AG, Burg D, van de Velde CJH, et al. Disrupted expression of CXCL5 in colorectal cancer is associated with rapid tumor formation in rats and poor prognosis in patients. Clin Cancer Res. 2008. 14(8):2276-84.
- 222. Stone MJ, Hayward JA, Huang C, Huma ZE, Sanchez J. Mechanisms of regulation of the chemokine-receptor network. Vol. 18, International Journal of Molecular Sciences. 2017. 18(2). pii: E342.

- 223. Gonzalez E, McGraw TE. The Akt kinases: Isoform specificity in metabolism and cancer. Cell Cycle. 2009. 8(16):2502-8.
- Hanada M, Feng J, Hemmings BA. Structure, regulation and function of PKB/AKT
  A major therapeutic target. In: Biochimica et Biophysica Acta Proteins and Proteomics. 2004. 1697(1-2):3-16.
- 225. Dummler B, Hemmings BA. Physiological roles of PKB/Akt isoforms in development and disease. Biochem Soc. 2007. 35(Pt 2):231-5.
- 226. Ericson K, Gan C, Cheong I, Rago C, Samuels Y, Velculescu VE, et al. Genetic inactivation of AKT1, AKT2, and PDPK1 in human colorectal cancer cells clarifies their roles in tumor growth regulation. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2010;107(6):2598–603. Available from: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1002415107
- 227. Topaloglu O, Hurley PJ, Yildirim O, Civin CI, Bunz F. Improved methods for the generation of human gene knockout and knockin cell lines. Nucleic Acids Res. 2005;33(18):1–7.
- 228. Chang JC. Cancer stem cells: Role in tumor growth, recurrence, metastasis, and treatment resistance. Medicine (United States). 2016. 95(1 Suppl 1):S20-5.
- 229. Shaw FL, Harrison H, Spence K, Ablett MP, Simoes BM, Farnie G, et al. A detailed mammosphere assay protocol for the quantification of breast stem cell activity. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2012;17(2):111–7.
- 230. Aksel H, Huang GTJ. Human and Swine Dental Pulp Stem Cells Form a Vascularlike Network after Angiogenic Differentiation in Comparison with Endothelial Cells: A Quantitative Analysis. J Endod. 2017. 43(4):588-595.
- 231. Röhrborn D, Wronkowitz N, Eckel J. DPP4 in diabetes. Frontiers in Immunology. 2015. 6:386.
- 232. Abe M, Havre PA, Urasaki Y, Ohnuma K, Morimoto C, Dang LH, et al. Mechanisms of confluence-dependent expression of CD26 in colon cancer cell lines. BMC Cancer. 2011. 11:51.
- 233. Dennis MD, McGhee NK, Jefferson LS, Kimball SR. Regulated in DNA damage and development 1 (REDD1) promotes cell survival during serum deprivation by sustaining repression of signaling through the mechanistic target of rapamycin in complex 1 (mTORC1). Cell Signal. 2013;25(12):2709–16.
- 234. Péterfi Z, Donkó Á, Orient A, Sum A, Prókai Á, Molnár B, et al. Peroxidasin is secreted and incorporated into the extracellular matrix of myofibroblasts and fibrotic kidney. Am J Pathol. 2009. 175(2):725-35.
- 235. Maltby S, Freeman S, Gold MJ, Baker JHE, Minchinton AI, Gold MR, et al. Opposing roles for CD34 in B16 melanoma tumor growth alter early stage vasculature and late stage immune cell infiltration. PLoS One. 2011. 6(4):e18160.
- 236. Toyofuku T, Yabuki M, Kamei J, Kamei M, Makino N, Kumanogoh A, et al. Semaphorin-4A, an activator for T-cell-mediated immunity, suppresses angiogenesis via Plexin-D1. EMBO J. 2007. 26(5): 1373–1384.
- 237. Häggblad Sahlberg S, Mortensen AC, Haglöf J, Engskog MKR, Arvidsson T, Pettersson C, et al. Different functions of AKT1 and AKT2 in molecular pathways, cell migration and metabolism in colon cancer cells. Int J Oncol. 2017. 50(1):5-14.
- 238. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CHM, Jones DL, et al. Cancer stem cells Perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells. In: Cancer Research. 2006. 66(19):9339-44.
- 239. Liu S, Wicha MS. Targeting breast cancer stem cells. Journal of Clinical Oncology.

2010. 28(25):4006-12.

- 240. Qiu H, Fang X, Luo Q, Ouyang G. Cancer stem cells: A potential target for cancer therapy. Cellular and Molecular Life Sciences. 2015. 72(18):3411-24.
- 241. Golan H, Shukrun R, Caspi R, Vax E, Pode-Shakked N, Goldberg S, et al. In Vivo Expansion of Cancer Stemness Affords Novel Cancer Stem Cell Targets: Malignant Rhabdoid Tumor as an Example. Stem Cell Reports. 2018;11(3):795–810.
- 242. Miyake M, Goodison S, Urquidi V, Gomes Giacoia E, Rosser CJ. Expression of CXCL1 in human endothelial cells induces angiogenesis through the CXCR2 receptor and the ERK1/2 and EGF pathways. Lab Investig. 2013;93(7):768–78.