



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΩΝ ΠΟΡΕΙΩΝ  
ΤΟΥ NF-κΒ ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ ΚΑΙ  
ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ-ΣΤΟΧΩΝ ΤΟΥΣ**

**ΡΟΥΠΑΚΙΑ ΕΥΓΕΝΙΑ  
ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΟΣ MSc**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020**









**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΩΝ ΠΟΡΕΙΩΝ  
ΤΟΥ NF-κΒ ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ ΚΑΙ  
ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ-ΣΤΟΧΩΝ ΤΟΥΣ**

**ΡΟΥΠΑΚΙΑ ΕΥΓΕΝΙΑ  
ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΟΣ MSc**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020**



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





Ημερομηνία αίτησης της κ. Ρουπακιά Ευγενίας: 13-1-2015

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 775<sup>α</sup>/17-3-2015

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων

Κωλέττας Ευάγγελος, Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην Μοριακή Φυσιολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Κούκλης Παναγιώτης, Επίκουρος Καθηγητής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων  
Σανδαλτζόπουλος Ραφαήλ, Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης

**Ημερομηνία ορισμού θέματος:** 27-3-2015

«Μελέτη του ρόλου των σηματοδοτικών πορειών του NF-κΒ στην Καρκινογένεση του πνεύμονα και στη ρύθμιση γονιδίων-στόχων τους»

**ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 949<sup>α</sup>/30-11-2020**

Γεωργάτος Σπυρίδων	Καθηγητής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Γούσια Άννα	Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Σανδαλτζόπουλος Ραφαήλ	Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης
Σύρρου Μαρίκα	Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας-Ιατρικής Γενετικής 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
Μαραγκός Πέτρος	Αναπληρωτής Καθηγητής Αναπτυξιακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 21-12-2020

Ιωάννινα 18-1-2021

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

Άννα Μπατισιάτου

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας



Η Γραμματέας του Τμήματος

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ



## Πρόλογος

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας, του Τμήματος Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κατά το διάστημα 2015 - 2020, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Μοριακής Κυτταρικής Βιολογίας κ. Ευάγγελου Κωλέττα. Ολοκληρώνοντας αυτή τη δύσκολη διαδρομή θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους όσους συνέβαλαν για να επιτευχθεί η ολοκλήρωσή της.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα της διατριβής μου Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ευάγγελο Κωλέττα που με δέχθηκε με χαρά στο εργαστήριό του αρχικά για την εκπόνηση της Μεταπτυχιακής μου εργασίας και στη συνέχεια για την εκπόνηση της Διδακτορικής μου Διατριβής. Τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την καθοδήγηση και τη στήριξή του για την ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης, τόσο κατά την εκπόνηση των πειραμάτων όσο και κατά τη συγγραφή της.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, τον Επίκουρο Καθηγητή Γενικής Βιολογίας κ. Παναγιώτη Κούκλη και τον Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας του Δ.Π.Θ. κ. Ραφαήλ Σανδαλιζόπουλο για τις πολύτιμες συμβουλές τους όποτε τις χρειάστηκα. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, τον Καθηγητή και Διευθυντή του Εργαστηρίου Γενικής Βιολογίας κ. Σπυρίδων Γεωργάτο, τον Καθηγητή Βιολογικής Χημείας κ. Σάββα Χριστοφορίδη, την Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής κα. Άννα Γούσια, την Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας-Ιατρικής Γενετικής κα. Μαρίκα Σύρρου και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Αναπτυξιακής Βιολογίας κ. Πέτρο Μαραγκό για την μεγάλη τιμή που μου έκαναν αλλά και την ουσιαστική βοήθειά τους αυτά τα χρόνια.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στους εξωτερικούς μας συνεργάτες για την πολύτιμη βοήθειά τους στην εκπόνηση διάφορων πειραμάτων. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Ομότιμο Καθηγητή του Πανεπιστημίου Stony Brook κ. Kenneth Marcu, τον Δρ. Απόστολο Κλινάκη, Ερευνητή Α' του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών, της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ) και τη Δρ. Ευαγγελία Χαβδούλα, Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια του ΙΒΕΑΑ για την πραγματοποίηση όλων των *in vivo* πειραμάτων αλλά και την καλλιέργεια των κυττάρων σε συνθήκες υποξίας. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Αλέξανδρο Πολύζο και τον κ. Γιάννη Βατσέλα στο ΙΙΒΕΑΑ για την πραγματοποίηση της ανάλυσης RNAseq και επιπλέον τον Δρ. Αλέξανδρο Πολύζο και τον Δρ. Δημήτρη Χατζόπουλο στο ΙΙΒΕΑΑ αλλά και τον Dr. David Habiελ στο Cedars-Sinai Medical Center για τη βιοπληροφορική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω τις Καθηγήτριες Παθολογικής Ανατομικής κα. Άννα Μπαπιστάτου και κα. Άννα Γούσια και την Επικουρική Ιατρό, Παθολογοανατόμο του ΠΓΝΙ Δρ. Γεωργία Καρπαθίου για την ιδιαίτερα σημαντική συμβολή τους στην αξιολόγηση των πειραμάτων ανοσοϊστοχημείας αλλά την κα. Γεωργία Παπασπύρου και την κα. Αντιγόνη Χριστοδούλου για πραγματοποίηση των πειραμάτων ανοσοϊστοχημείας. Η συνεργασία μας ήταν άψογη και τις ευχαριστώ θερμά.

Η ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής δεν θα ήταν δυνατή χωρίς τη συνεργασία και τις εποικοδομητικές συζητήσεις με όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Γενικής Βιολογίας, παλαιά και νέα, αλλά και τα μέλη των εργαστηρίων της Βιοχημείας, της Φαρμακολογίας, της Φυσιολογίας και φυσικά του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB). Ξεχωριστά θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια Σπυριδούλα Τσιομίτα και το εργαστήριο του Καθηγητή κ. Γεωργίου Θυφρονίτη για την βοήθειά τους στα πειράματα κυτταρομετρίας ροής αλλά και τη Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια Σοφία Μπέλλου για την εκμάθηση της συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού.

Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ οφείλω στη Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια και φίλη πάνω απ' όλα Βιολέττα Μαλταμπέ η οποία με στήριξε και με βοήθησε σε θεωρητικό, πρακτικό και ψυχολογικό επίπεδο όποτε τη χρειάστηκα. Μου έμαθε πολλά και την ευχαριστώ!

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένειά μου και το σύζυγό μου Στέλιο για την υπομονή, τη στήριξη και την αμέριστη αγάπη τους όλα αυτά τα χρόνια. Μου δίνουν τεράστια δύναμη να συνεχίσω και χωρίς εκείνους δεν θα είχα φτάσει ως εδώ.

## EΙΚΟΝΕΣ

1.1. Οι επίκτητες χαρακτηριστικές ικανότητες των καρκινικών κυττάρων (Hallmarks of cancer).....	10
1.2. Ενεργοποιητικά χαρακτηριστικά (enabling characteristics) που δημιουργούν ένα ευνοϊκό περιβάλλον που οδηγούν σε νέες ικανότητες των καρκινικών κυττάρων (emerging hallmarks).....	15
1.3. Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ.....	17
1.4. Συγκαταβατική αλληλουχία κΒ στο DNA.....	18
1.5. Σχηματική απεικόνιση των πρωτεϊνών NF-κΒ, ΙκΒ και ΙΚΚ.....	19
1.6. Πορείες ενεργοποίησης των μεταγραφικών παραγόντων NF-κΒ.....	23
1.7. Η ενεργοποίηση και ο ρόλος του NF-κΒ στον καρκίνο.....	33
1.8. Εκτιμώμενη συχνότητα εμφάνισης και θνησιμότητας για τους κύριους τύπους καρκίνου το 2018.....	37
1.9. Υπότυποι και μεταλλάξεις του μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα.....	38
2.1. Σχηματική αναπαράσταση του λεντι-ϊικού φορέα έκφρασης για τη μειορρύθμιση της ΙΚΚα.....	52
3.1. Αποσιώπηση της κινάσης ΙΚΚα στις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές NSCLC.....	68
3.2. Η μειορρύθμιση της ΙΚΚα προάγει την ανάπτυξη του NSCLC <i>in vivo</i> .....	69
3.3. Επίπεδα έκφρασης της ΙΚΚα στους όγκους που αναπτύχθηκαν από τις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές NSCLC ως ξενομοσχεύματα <i>in vivo</i> .....	70
3.4. Μειορρύθμιση της υπομονάδας p52 στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα.....	71
3.5. Ο παράγοντας p52 προάγει την ανάπτυξη του NSCLC <i>in vivo</i> .....	72
3.6. Διαφορική έκφραση γονιδίων έπειτα από τη μειορρύθμιση της κινάσης ΙΚΚα.....	75
3.7. Η ΙΚΚα προάγει την σταθερότητα του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α.....	77
3.8. Επίπεδα έκφρασης των <i>HK2</i> και <i>SLC2A1</i> στους διαγονιδιακούς μύες και τους όγκους που αναπτύχθηκαν από τα κύτταρα H1437-ΙΚΚα <sup>KD</sup> .....	78
3.9. Επίπεδα έκφρασης των <i>HIF1A</i> , <i>HK2</i> και <i>SLC2A1</i> στους όγκους που αναπτύχθηκαν από τα κύτταρα A549-ΙΚΚα <sup>KD</sup> και H1299-ΙΚΚα <sup>KD</sup> .....	79
3.10. Η ΙΚΚα αναστέλλει την ανάπτυξη σφαιρών <i>in vitro</i> σε συνθήκες υποξίας.....	80
3.11. Μειορρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα p65 στις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές NSCLC.....	83
3.12. Ο μεταγραφικός παράγοντας p65 προάγει την ανάπτυξη του ανθρώπινου NSCLC <i>in vivo</i> .....	84
3.13. Αποσιώπηση του μεταγραφικού παράγοντα p65 <i>in vivo</i> .....	85
3.14. Επίδραση του μεταγραφικού παράγοντα p65 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση <i>in vitro</i> .....	87

3.15. Η αποσιώπηση του μεταγραφικού παράγοντα p65 μειώνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό <i>in vivo</i> .....	88
3.16. Διαφορική έκφραση γονιδίων έπειτα από τη μειορρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα p65.....	90
3.17. Μεταβολή των επιπέδων έκφρασης των mRNA των ROS1 και CD82 <i>in vitro</i> και <i>in vivo</i> .....	92
3.18. Η αποσιώπηση του παράγοντα p65 επάγει την έκφραση του CD82.....	93
3.19. Υποκυτταρικός εντοπισμός του αντιγόνου CD82.....	94
3.20. Δείγματα ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα και δείγματα φυσιολογικού ιστού πνεύμονα σε μορφή μικροσυτοιχίων.....	95
3.21. Ανοσοϊστοχημική έκφραση του CD82 σε δείγματα ασθενών με LUAD και LUSC και σε δείγματα φυσιολογικού ιστού πνεύμονα.....	96
3.22. Η έκφραση του αντιγόνου CD82 μειώνεται σημαντικά σε ασθενείς με NSCLC.....	97
3.23. Ο παράγοντας p65 προάγει τη μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων.....	99
3.24. Ο μεταγραφικός παράγοντας p65 προάγει την έκφραση των δεικτών της EMT <i>in vitro</i> και <i>in vivo</i> .....	100
3.25. Υπερέκφραση του CD82 <i>in vitro</i> .....	102
3.26. Το διαμεμβρανικό αντιγόνο CD82 αναστέλλει την κινητικότητα των κυττάρων.....	103
3.27. Μειορρύθμιση του CD82 στα κύτταρα p65 <sup>KD</sup> .....	104
3.28. Ρύθμιση της έκφρασης των δεικτών της EMT από το CD82.....	105
4.1. Σχηματική απεικόνιση της ρύθμισης των μεταγραφικών παραγόντων HIF-1/2.....	111
4.2. Γονίδια στόχοι του HIF-1 που εμπλέκονται στον επαναπρογραμματισμό του ενεργειακού μεταβολισμού των κυττάρων.....	113
4.3. Δομή των τετρασπανινών.....	119
4.4. Δίκτυο τετρασπανινών (tetraspanin web).....	120

## ΠΙΝΑΚΕΣ

2.1. Κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.....	50
2.2. Γενετικό υπόβαθρο ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών NSCLC.....	50
2.3. Ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.....	58
2.4. Πηκτές SDS-Πολυακρυλαμιδίου ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών.....	62
2.5. Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.....	63

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b> .....	1
<b>ΕΙΚΟΝΕΣ</b> .....	3
<b>ΠΙΝΑΚΕΣ</b> .....	4
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	9
1.1. Θεμελιώδεις αρχές της καρκινογένεσης .....	9
1.2. Ογκογόνοι μεταγραφικοί παράγοντες .....	15
1.3. Η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων NF-κΒ .....	16
1.3.1. Η οικογένεια των μεταγραφικών υπομονάδων του NF-κΒ.....	18
1.3.2. Η οικογένεια των πρωτεϊνών ΙκΒ .....	20
1.3.3. Οι σηματοδοτικές πρωτεΐνες ΙΚΚ .....	21
1.4. Πορείες ενεργοποίησης των μεταγραφικών παραγόντων NF-κΒ .....	22
1.4.1. Κανονική πορεία ενεργοποίησης του NF-κΒ .....	22
1.4.2. Μη-κανονική πορεία ενεργοποίησης του NF-κΒ .....	24
1.4.3. Άτυπες πορείες ενεργοποίησης του NF-κΒ.....	25
1.4.4. Μηχανισμοί τερματισμού της σηματοδότησης του NF-κΒ .....	26
1.5. Δράση των κινασών ΙΚΚ ανεξάρτητα από την ενεργοποίηση του NF-κΒ .....	27
1.5.1. Ρύθμιση της ενεργότητας του NF-κΒ μέσω εναλλακτικών μηχανισμών.....	27
1.5.2. Ρύθμιση ανεξάρτητων κυτταρικών σηματοδοτικών πορειών από τις ΙΚΚ....	28
1.6. Ο ρόλος του NF-κΒ στον καρκίνο .....	30
1.6.1. Ενεργοποίηση του NF-κΒ στον καρκίνο.....	31
1.6.2. Ο ρόλος του NF-κΒ στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην καταστολή της απόπτωσης.....	34
1.6.3. Ο ρόλος του NF-κΒ στην αγγειογένεση και τη μετάσταση.....	34
1.7. Ο ρόλος του NF-κΒ στον καρκίνο του πνεύμονα .....	36
1.7.1. Ο καρκίνος του πνεύμονα.....	36
1.7.2. Πειραματικά μοντέλα μυών στον καρκίνο του πνεύμονα.....	39
1.7.3. Ο ρόλος των πορειών ΙΚΚβ-RelA/p65 και ΙΚΚα-p52 στον καρκίνο του πνεύμονα .....	41
<b>1.8. Σκοπός</b> .....	46
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	47
2.1. Βακτηριακές Τεχνικές .....	47
2.1.1. Παρασκευή L-broth (Luria-Bertani; LB) και τρυβλίων με L-άγαρ (L-agar)....	47

2.1.2.	Παρασκευή βακτηρίων επιδεκτικών προς μετασχηματισμό (competent cells) .....	47
2.1.3.	Μετασχηματισμός βακτηρίων με πλασμιδιακό DNA .....	48
2.1.4.	Ανάπτυξη υγρών καλλιεργειών βακτηρίων .....	48
2.1.5.	Παρασκευή βακτηριακών αποθεμάτων γλυκερόλης .....	48
2.1.6.	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini prep).....	48
2.1.7.	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα (midi prep) .....	49
2.2.	Κυτταρική Καλλιέργεια .....	49
2.2.1.	Κυτταρικές σειρές και καλλιέργεια .....	49
2.2.2.	Ανακαλλιέργεια κυττάρων .....	51
2.2.3.	Διατήρηση των κυττάρων στο υγρό άζωτο .....	51
2.2.4.	Κατασκευή κυτταρικών σειρών.....	52
2.2.4.1.	Λεντι-ϊικοί φορείς .....	52
2.2.4.2.	Ρετρο-ϊικοί φορείς .....	53
2.2.4.3.	Πλασμιδιακοί φορείς .....	54
2.2.5.	Καλλιέργεια κυττάρων σε συνθήκες χαμηλής προσκόλλησης για τη δημιουργία σφαιρών (Tumor sphere assay).....	55
2.2.6.	Καταμέτρηση κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο.....	55
2.2.7.	Καμπύλες ανάπτυξης κυττάρων.....	55
2.2.8.	Προσδιορισμός κυτταρικής απόπτωσης.....	56
2.2.9.	Προσδιορισμός κυτταρικής μετανάστευσης (Scratch assay) .....	56
2.3.	Απομόνωση και ανάλυση RNA .....	57
2.3.1.	Απομόνωση RNA.....	57
2.3.1.1.	Απομόνωση RNA καλλιεργούμενων κυττάρων .....	57
2.3.1.2.	Απομόνωση RNA από τους όγκους των μυών .....	57
2.3.2.	Αντίστροφη μεταγραφή .....	58
2.3.3.	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qRT-PCR) .....	58
2.3.4.	Αλληλούχιση RNA (RNA-seq) .....	59
2.4.	Απομόνωση και ανάλυση πρωτεϊνών .....	59
2.4.1.	Απομόνωση ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων.....	59
2.4.1.1.	Απομόνωση ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων καλλιεργούμενων κυττάρων .....	59
2.4.1.2.	Απομόνωση ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από τους όγκους των μυών .....	60
2.4.2.	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου.....	61



2.4.3.	Ανάλυση πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωμα κατά Western (Western blot)...	62
2.4.4.	Έμμεσος ανοσοφθορισμός.....	63
2.4.5.	Ανοσοϊστοχημική χρώση .....	63
2.5.	Πειράματα <i>in vivo</i> .....	64
2.5.1.	Ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων ως ξενομοσχεύματα <i>in vivo</i> .....	64
2.5.2.	Διαγονιδιακό μοντέλο μύος για την απαλοιφή της ΙΚΚα .....	65
2.6.	Στατιστική ανάλυση .....	66
<b>3.</b>	<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>67</b>
	<b>ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ: Ο ρόλος της μη-κανονικής πορείας ενεργοποίησης του NF-κΒ στο μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα</b> .....	<b>67</b>
3.1.	Η κινάση ΙΚΚα καταστέλλει την ανάπτυξη του NSCLC <i>in vivo</i> .....	67
3.2.	Η ογκοκατασταλτική δράση της κινάσης ΙΚΚα είναι ανεξάρτητη από την ενεργοποίηση της μη κανονικής πορείας του NF-κΒ.....	70
3.3.	Ταυτοποίηση γονιδίων που ρυθμίζονται από την ΙΚΚα.....	73
3.4.	Η ΙΚΚα καταστέλλει την ανάπτυξη του NSCLC περιορίζοντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε συνθήκες υποξίας.....	76
	<b>ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ: Ο ρόλος της κανονικής πορείας ενεργοποίησης του NF-κΒ στο μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα</b> .....	<b>82</b>
3.5.	Η κανονική πορεία του NF-κΒ προάγει την ανάπτυξη του NSCLC <i>in vivo</i> .....	82
3.6.	Η επίδραση της υπομονάδας p65 στον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των κυττάρων.....	85
3.7.	Ταυτοποίηση γονιδίων που ρυθμίζονται από την κανονική σηματοδοτική πορεία ΙΚΚβ - NF-κΒ RelA/p65 .....	89
3.8.	Τα επίπεδα του CD82 μειώνονται σημαντικά σε ασθενείς με NSCLC .....	95
3.9.	Ο μεταγραφικός παράγοντας p65 προάγει τη μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων.....	98
3.10.	Η απώλεια του μεταγραφικού παράγοντα p65 αναστέλλει την κινητικότητα των κυττάρων και την EMT εν μέρει μέσω της αύξησης των επιπέδων του CD82 .....	100
<b>4.</b>	<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	<b>107</b>
4.1.	Εισαγωγή.....	107
4.2.	Η ΙΚΚα καταστέλλει την ανάπτυξη του μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα <i>in vivo</i> ανεξάρτητα από την ενεργοποίηση της μη κανονικής σηματοδοτικής πορείας του NF-κΒ.....	107
4.3.	Η ΙΚΚα δρα ανοδικά του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α καταστέλλοντας την	

ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων σε συνθήκες υποξίας .....	109
4.4. Η κανονική πορεία ενεργοποίησης IKKβ - RelA/p65 προάγει την ανάπτυξη του NSCLC <i>in vivo</i> .....	115
4.5. Πρότυπο γονιαδικής έκφρασης NF-κB RelA/p65: Η κανονική πορεία IKKβ - RelA/p65 επάγει μεταξύ άλλων την έκφραση του πρωτο-ογκογονιδίου <i>ROS1</i> και τη μείωση της έκφρασης του αντιγόνου CD82 στο NSCLC.....	116
4.6. Η έκφραση του CD82 χάνεται σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα.....	121
4.7. Η κανονική πορεία του NF-κB προάγει, την κινητικότητα των κυττάρων και την EMT εν μέρει διαμέσου της μείωσης της έκφρασης του CD82.....	122
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	126
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	127
<b>SUMMARY</b> .....	129
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	131

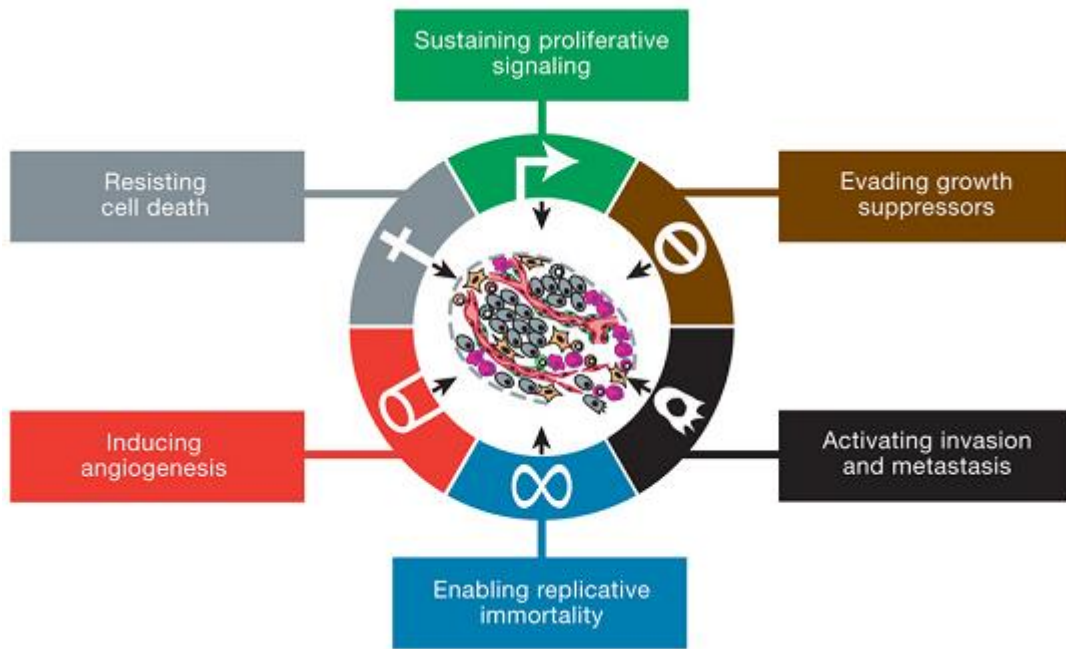
## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1. Θεμελιώδεις αρχές της καρκινογένεσης

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας ο καρκίνος αποτελεί τη δεύτερη συχνότερη αιτία θανάτου παγκοσμίως. Κύρια αίτια εμφάνισης του καρκίνου αποτελούν περιβαλλοντικοί καρκινογόνοι παράγοντες, όπως η υπεριώδης και υπέρυθη ακτινοβολία, οι χημικές καρκινογόνες ουσίες που περιέχονται στον καπνό, η συχνή έκθεση σε παράγοντες όπως ο αμιάντος και το ραδόνιο, αλλά και η μόλυνση από κάποιους τύπους ιών και βακτηρίων, όπως οι ιοί της ηπατίτιδας. Επιπλέον, παράγοντες που αυξάνουν σημαντικά τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου αποτελούν η κακή διατροφή, η έλλειψη άσκησης και η κατανάλωση αλκοόλ.

Η μεταλλαγή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό κύτταρο, γνωστή ως καρκινογένεση, είναι μια πολύπλοκη διαδικασία πολλών σταδίων και οφείλεται στη συσσώρευση γενετικών και επιγενετικών μεταβολών σε γονίδια που ελέγχουν βασικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως τις μεταβολικές πορείες, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τον κυτταρικό θάνατο, τη διαφοροποίηση, και την επιδιόρθωση του DNA. Μεταξύ αυτών των γονιδίων είναι τα πρωτο-ογκογονίδια, τα ογκοκατασταλτικά ογκογονίδια και οι επιγενετικοί ρυθμιστές (1-9).

Έχει προταθεί ότι απαιτούνται περίπου 4 έως 7 γενετικές αλλαγές για τη μετατροπή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό, και το γεγονός αυτό αποτελεί ένα λόγο που ο καρκίνος εμφανίζεται συχνότερα σε πιο προχωρημένη ηλικία (10). Τα αποτελέσματα αυτών των γενετικών και επιγενετικών μεταβολών, είναι τα καρκινικά κύτταρα να αποκτούν κάποιες ξεχωριστές ικανότητες, διακριτές από τα φυσιολογικά κύτταρα, οι οποίες πλέον είναι γνωστές ως «χαρακτηριστικά του καρκίνου» ή ως «hallmarks of cancer» και αφορούν σχεδόν όλους τους τύπους καρκίνου (Εικόνα 1.1). (1). Οι 6 χαρακτηριστικές ικανότητες των καρκινικών κυττάρων απαρτίζουν ένα θεμελιώδες πλαίσιο για την κατανόηση της αξιοσημείωτης ποικιλομορφίας των νεοπλασματικών νόσων.



**Εικόνα 1.1. Οι επίκτητες χαρακτηριστικές ικανότητες των καρκινικών κυττάρων (Hallmarks of cancer).** Οι 6 επίκτητες ικανότητες των καρκινικών κυττάρων είναι χαρακτηριστικές και συμπληρωματικές που επιτρέπουν τον πολλαπλασιασμό και τη μετάστασή τους, συμβάλλοντας στην κατανόηση της βιολογίας του καρκίνου (1).

Έχει καταδειχθεί ότι οι όγκοι δεν αποτελούν μια απλή, απομονωμένη μάζα πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων, αλλά είναι σύνθετοι ιστοί οι οποίοι αποτελούνται από πολλούς διαφορετικούς τύπους κυττάρων που αναπτύσσουν ετεροτυπικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους. Τα φυσιολογικά κύτταρα που στρατολογούνται και τα οποία σχηματίζουν το συνοδευτικό στρώμα του όγκου (tumor-associated stroma), συμμετέχουν ενεργά και όχι παθητικά στην καρκινογένεση, και επομένως συμβάλλουν στην ανάπτυξη και στην έκφραση συγκεκριμένων χαρακτηριστικών δυνατοτήτων του όγκου. Είναι πλέον φανερό ότι η βιολογία των όγκων δεν μπορεί απλά να κατανοηθεί καταγράφοντας τα χαρακτηριστικά και τις δυνατότητες των καρκινικών κυττάρων αλλά θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη και η συμβολή του «μικροπεριβάλλοντος του όγκου» στην πολυσταδιακή διαδικασία της καρκινογένεσης.

Οι 6 χαρακτηριστικές ικανότητες των καρκινικών κυττάρων περιλαμβάνουν (1, 3, 11-16):

*1. Τη διατήρηση μιτογόνων ερεθισμάτων του κυτταρικού πολλαπλασιασμού:*

Αυτό επιτυγχάνεται με τη απορρύθμιση της βιοσύνθεσης και της έκκρισης αυξητικών παραγόντων και κυτταροκινών, καθώς επίσης και της ενεργότητας των διαμεμβρανικών υποδοχέων τους που οφείλεται σε γενετικές μεταλλάξεις που συσσωρεύουν τα καρκινικά κύτταρα.

*2. Την απορρύθμιση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων:*

Τα καρκινικά κύτταρα θα πρέπει να υπερβούν τους μηχανισμούς που καταστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, όπως μηχανισμούς που εξαρτώνται από την δράση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια *RB* και *p53* παίζουν κεντρικό ρόλο σε ρυθμιστικά δίκτυα τα οποία προάγουν ή καταστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ή επάγουν την γήρανση και την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων. Ενώ η *pRb* ενσωματώνει ανασταλτικά εξωκυτταρικά σήματα, η *p53* ενσωματώνει ανασταλτικά ενδοκυτταρικά στρεσογόνα σήματα. Επίσης οι διακυτταρικές επαφές που σχηματίζονται σε πληθυσμούς κυττάρων που αναπτύσσονται σε πλήρη καλλιέργεια 2D οδηγούν στην καταστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Τέτοιες διακυτταρικές επαφές ελέγχονται επίσης από ογκοκατασταλτικά γονίδια όπως το *NF2*, που κωδικοποιεί για τη μερλίνη, μια πρωτεΐνη που εμπλέκεται στις διακυτταρικές επαφές με τη σύζευξη μορίων προσκόλλησης της κυτταρικής επιφάνειας όπως της E-καντερίνης με διαμεμβρανικούς υποδοχείς κινάσης τυροσίνης, όπως ο EGFR.

*3. Την αποφυγή της απόπτωσης, και γενικότερα αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο:*

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος με απόπτωση αποτελεί ένα φυσικό προστατευτικό μηχανισμό ενάντια στην ανάπτυξη του καρκίνου. Η απόπτωση ενεργοποιείται από διάφορα στρεσογόνα ερεθίσματα που προσλαμβάνουν τα καρκινικά κύτταρα κατά την προοδευτική διαδικασία της καρκινογένεσης ή ως απόκριση σε αντικαρκινικές θεραπείες όπως η χρήση χημειοθεραπευτικών φαρμάκων. Μεταξύ των ενδογενών στρεσογόνων ερεθισμάτων είναι η ενεργοποίηση ογκογόνων σηματοδοτικών πορειών και η επαγωγή βλαβών στο DNA. Παρόλα αυτά, η απόπτωση καταστέλλεται σε καρκινικά κύτταρα στα όψιμα στάδια της καρκινογένεσης τα οποία αποκτούν και ανθεκτικότητα στις αντικαρκινικές θεραπείες. Τα καρκινικά κύτταρα είναι ανθεκτικά στην απόπτωση είτε με την αυξορρύθμιση των επιπέδων έκφρασης των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών της υπεροικογένειας *Bcl-2* ή διαμέσου μεταλλάξεων και απώλειας του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *TP53*.

#### 4. Τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την αθανατοποίηση:

Σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα που έχουν ένα περιορισμένο δυναμικό κυτταρικών διαιρέσεων μετά το οποίο εισέρχονται σε κυτταρική γήρανση, τα καρκινικά κύτταρα θα πρέπει να έχουν ένα απεριόριστο δυναμικό κυτταρικών διαιρέσεων ώστε να μπορούν να σχηματίσουν μακροσκοπικούς όγκους. Αυτή η μετάβαση από ένα περιορισμένο σε ένα απεριόριστο δυναμικό κυτταρικών διαιρέσεων ονομάζεται αθανατοποίηση (immortalisation). Η κυτταρική γήρανση οφείλεται στη διάβρωση (ελάττωση του μεγέθους ή απώλεια) των τελομερών στα άκρα των χρωμοσωμάτων κατά την αντιγραφή του DNA λόγω της έλλειψης ενεργούς τελομεράσης (TERT), ενός ενζύμου που δύναται να αντιγράψει τα τελομερή. Σε αντίθεση, τα καρκινικά κύτταρα διατηρούν τα τελομερή με την ενεργοποίηση της TERT, η οποία φαίνεται να έχει και άλλες επιδράσεις καθώς εντοπίζεται σε πολλαπλές θέσεις στην χρωματίνη και όχι μόνον στα τελομερή.

#### 5. Την επαγωγή της αγγειογένεσης:

Όπως και οι φυσιολογικοί ιστοί, οι καρκινικοί όγκοι χρειάζονται θρεπτικά συστατικά και οξυγόνο για να μεταβολίσουν και να απομακρύνουν τα καταβολικά προϊόντα και το CO<sub>2</sub> ώστε να διατηρηθούν και να αναπτυχθούν. Η νεο-αγγειογένεση (σχηματισμός και εκβλάστηση νέων αγγείων) και αιμάτωση του όγκου που διεγείρεται από τα καρκινικά κύτταρα διασφαλίζει αυτές τις ανάγκες του όγκου (angiogenic switch). Η νεο-αγγειογένεση εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ διεγερτικών και κατασταλτικών σηματοδοτικών μορίων και παραγόντων της αγγειογένεσης, όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός παράγοντας-A (Vascular Endothelial Growth Factor-A; VEGF-A), και η θρομβοσποντίνη-1 (thrombospondin-1; TSP-1), αντίστοιχα.

#### 6. Την ενεργοποίηση της διαδικασίας διείσδυσης και μετάστασης (*invasion-metastasis cascade*):

Τα καρκινώματα που προέρχονται από επιθηλιακούς ιστούς εξελίσσονται προοδευτικά σε υψηλότερα στάδια κακοήθειας, με αποτέλεσμα να διεισδύουν στους παρακείμενους ιστούς, και διαμέσου του κυκλοφορικού και λεμφικού συστήματος να εγκαθιδρύουν μεταστάσεις σε απομακρυσμένους ιστούς/όργανα. Αυτές οι δύο ιδιότητες οφείλονται σε μεταβολές στο σχήμα των κυττάρων και της έκφρασης των μορίων προσκόλλησης που συμβάλλουν στις διακυτταρικές επαφές και στην προσκόλληση των κυττάρων στην εξωκυτταρική θεμέλια ουσία (Extracellular matrix; ECM). Η πιο καλά χαρακτηρισμένη μεταβολή είναι η μειορρύθμιση ή απώλεια της έκφρασης της E-καντερίνης (E-cadherin), ενός μορίου προσκόλλησης που συμβάλλει στις διακυτταρικές επαφές σχηματίζοντας συνδέσμους προσκόλλησης (adherens junctions) μεταξύ των παρακείμενων κυττάρων, και στη συγκρότηση επιθηλιακών στοιβάδων, διατηρώντας τα κύτταρα σε κατάσταση ηρεμίας σ'

αυτές τις επιθηλιακές στιβάδες. Αυξημένα επίπεδα έκφρασης της E-καντερίνης συμβάλλουν στην καταστολή της διεισδυτικής και μεταστατικής ικανότητας των καρκινικών κυττάρων, ενώ χαμηλά επίπεδα έκφρασής της συμβάλλουν στην ενίσχυση αυτών των ιδιοτήτων. Επομένως δεν είναι τυχαίο ότι σε ανθρώπινα καρκινώματα ανιχνεύονται μεταλλάξεις στο γονίδιο της E-καντερίνης (*CDH1*) που οδηγούν στην απενεργοποίηση της πρωτεΐνης. Σε αντίθεση, μόρια που εμπλέκονται στην κυτταρική κινητικότητα και μετανάστευση κατά την εμβρυογένεση και τη φλεγμονή συνήθως αυξορρυθμίζονται. Για παράδειγμα, η N-καντερίνη (N-cadherin) που εκφράζεται σε νευρικά και μεσεγχυματικά (π.χ., ινοβλάστες) κύτταρα, υπερεκφράζεται σε μεταστατικά καρκινικά κύτταρα. Επομένως, οι ικανότητες διείσδυσης και μετάστασης των καρκινικών κυττάρων οφείλονται στην απώλεια ή υπερέκφραση μορίων προσκόλλησης που εμπλέκονται στις διακυτταρικές επαφές και στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων και ECM. Η διείσδυση και η μετάσταση είναι πολυσταδιακές διαδικασίες που συνολικά αναφέρονται ως η διαδικασία διείσδυσης-μετάστασης (invasion-metastasis cascade).

Τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν αυτές τις ιδιότητες της διείσδυσης και μετάστασης ενεργοποιώντας τη διαδικασία της επιθηλιακής-προς-μεσεγχυματική μετατροπής (EMT). Η EMT επάγεται από μια ομάδα πλειοτροπικών μεταγραφικών παραγόντων (Transcription Factors; TFs), όπως οι Snail (SNAI1), Slug (SNAI2), Twist και Zeb1/2. Οι πλειοτροπικοί TFs διεγείρουν την EMT και την διαδικασία διείσδυσης-μετάστασης, εκτός από το τελευταίο στάδιο της αποίκησης του ιστού/οργάνου από τα μεταστατικά καρκινικά κύτταρα. Αυτοί οι TFs ρυθμίζουν ο ένας τον άλλο και γονίδια-στόχους τους που εμπλέκονται στην EMT. Μερικοί απ' αυτούς τους μεταγραφικούς ρυθμιστές καταστέλλουν άμεσα την έκφραση της E-καντερίνης η οποία καταστέλλει την κινητικότητα και την διεισδυτικότητα των καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και των παρακείμενων κυττάρων του στρώματος προάγουν τον μεταστατικό φαινότυπο που ρυθμίζεται από τους πλειοτροπικούς TFs. Αυτό υποστηρίζεται από το γεγονός ότι τα καρκινικά κύτταρα των καρκινωμάτων που εντοπίζονται στο μέτωπο διείσδυσης υπόκεινται σε ερεθίσματα του μικροπεριβάλλοντος τους και εμφανίζουν EMT σε σύγκριση με τα αντίστοιχα καρκινικά κύτταρα στον πυρήνα του όγκου. Επομένως, τα καρκινικά κύτταρα εκκρίνουν παράγοντες που συμβάλλουν στην διέγερση των κυττάρων του στρώματος του όγκου και στην στρατολόγηση και ενεργοποίηση μακροφάγων (Tumour-associated Macrophages; TAMs).

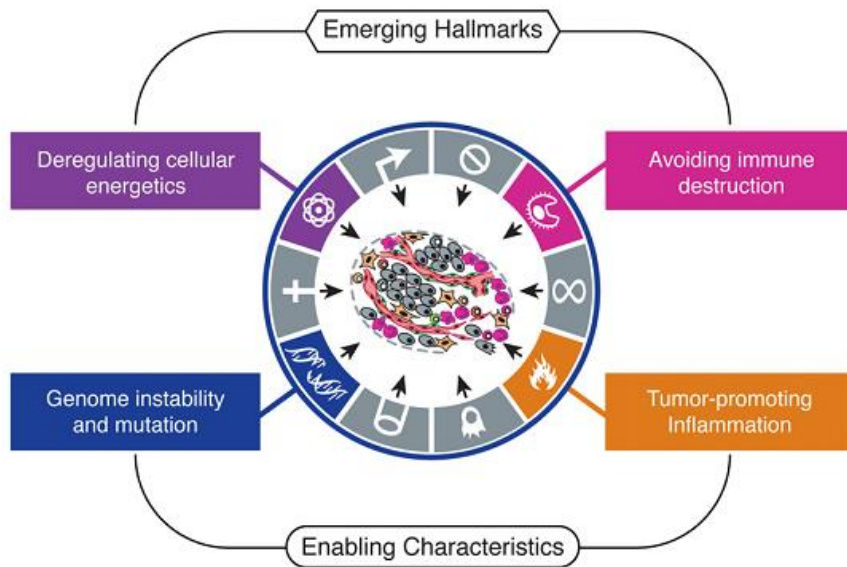
Τα καρκινικά κύτταρα τα οποία υπέστησαν EMT κατά τη διαδικασία της διείσδυσης-μετάστασης σε έναν απομακρυσμένο ιστό/όργανο μετατρέπονται πάλι σε επιθηλιακά κύτταρα με την αντίστροφη διαδικασία της μεσεγχυματικής-επιθηλιακής μετατροπής

(Mesenchymal-Epithelial Transition; MET). Αυτή η πλαστικότητα επιτρέπει στα καρκινικά κύτταρα να σχηματίσουν αποικίες επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων, με ιστοπαθολογία όμοια με εκείνη των επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων του πρωτοπαθούς όγκου πριν να υποστούν EMT. Να σημειωθεί ότι τα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα μπορεί να μην υποστούν πλήρη EMT αλλά μερική EMT αποκτώντας μερικά χαρακτηριστικά των μεσεγγυματικών κυττάρων που συμβάλλουν στην κινητικότητα και στην διεισδυτικότητα τους, διατηρώντας παράλληλα ορισμένα χαρακτηριστικά των επιθηλιακών κυττάρων του ιστού από τον οποίο προέρχονται.

Οι χαρακτηριστικές ικανότητες των καρκινικών κυττάρων θεωρούνται επίκτητες λειτουργικές ιδιότητες οι οποίες επιτρέπουν στα καρκινικά κύτταρα να επιβιώσουν, να πολλαπλασιαστούν και να μεταναστεύσουν, και αποκτώνται σε διαφορετικούς όγκους με διαφορετικούς μηχανισμούς και σε διαφορετικές περιόδους κατά την πολυσταδιακή διαδικασία της καρκινογένεσης. Αυτές οι επίκτητες χαρακτηριστικές ικανότητες οφείλονται σε επιπλέον δύο ενεργοποιητικά χαρακτηριστικά (enabling characteristics) που δημιουργούν ένα ευνοϊκό περιβάλλον: τη γενωμική αστάθεια (genomic instability) που αναπτύσσουν τα καρκινικά κύτταρα και η οποία δημιουργεί τυχαίες μεταλλάξεις συμπεριλαμβανομένων των χρωμοσωμικών αναδιατάξεων (17-19), και την προ-φλεγμονώδη κατάσταση των προ-καρκινικών και καρκινικών αλλοιώσεων η οποία οφείλεται στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και προάγεται από τα καρκινικά κύτταρα που είναι γνωστή ως ογκο-επαγόμενη φλεγμονή (Tumour-promoting inflammation) (1, 20-24) (Εικόνα 1.2).

Αυτά τα δύο ενεργοποιητικά χαρακτηριστικά δημιουργούν ένα ευνοϊκό περιβάλλον και οδηγούν στην απόκτηση νέων χαρακτηριστικών ιδιοτήτων των καρκινικών κυττάρων, όπως η απορρύθμιση και επαναπρογραμματισμός του κυτταρικού μεταβολισμού, γνωστός ως το «φαινόμενο Warburg», ώστε να υποστηριχτεί ο πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων, και η αποφυγή της καταστροφής τους από το ανοσοποιητικό σύστημα (Εικόνα 1.2) (1, 25).





**Εικόνα 1.2. Ενεργοποιητικά χαρακτηριστικά (enabling characteristics) που δημιουργούν ένα ευνοϊκό περιβάλλον που οδηγούν σε νέες ικανότητες των καρκινικών κυττάρων (emerging hallmarks).** Ένας αυξανόμενος αριθμός ερευνών υποδηλώνει ότι δύο επιπλέον χαρακτηριστικά του καρκίνου εμπλέκονται στην παθογένεση ορισμένων και ίσως όλων των μορφών καρκίνου. Το ένα περιλαμβάνει την ικανότητα τροποποίησης ή επαναπρογραμματισμού του κυτταρικού μεταβολισμού προκειμένου να υποστηρίξει αποτελεσματικότερα τον νεοπλασματικό πολλαπλασιασμό. Το δεύτερο επιτρέπει στα καρκινικά κύτταρα να αποφεύγουν την ανοσολογική καταστροφή. Επειδή καμία από αυτές τις ικανότητες δεν είναι ακόμη γενικευμένη και πλήρως βεβαιωμένη, χαρακτηρίζονται ως αναδυόμενες νέες χαρακτηριστικές ιδιότητες. Επιπλέον, δύο επακόλουθα χαρακτηριστικά της νεοπλασίας διευκολύνουν την απόκτηση τόσο των βασικών όσο και των αναδυόμενων χαρακτηριστικών. Η γενωμική αστάθεια (genomic instability) και επομένως η μεταλλαξιγένεση προσδίδουν στα καρκινικά κύτταρα γενετικές αλλοιώσεις που προάγουν την εξέλιξη του όγκου. Η φλεγμονή (inflammation) από έμφυτα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (innate immune cells) που έχει εξελιχθεί για την καταπολέμηση λοιμώξεων και για την επούλωση τραυμάτων, μπορεί αντίθετα να οδηγήσει στην ακούσια υποστήριξη πολλαπλών χαρακτηριστικών ιδιοτήτων των καρκινικών κυττάρων, εκδηλώνοντας έτσι τις ευρέως εκτιμώμενες συνέπειες των φλεγμονωδών αποκρίσεων που προάγουν τον όγκο (1).

## 1.2. Ογκογόνοι μεταγραφικοί παράγοντες

Τα πυρηνικά πρωτο-ογκογονίδια κωδικοποιούν υπομονάδες μεταγραφικών παραγόντων μεταξύ των οποίων η ογκοπρωτεΐνες *myc* (Myc-Max) (26, 27) και *fos* (AP-1: Fos/Jun) (28, 29), οι οποίες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και σχηματίζουν ομοδιμερείς και ετεροδιμερείς μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι ενεργοποιούν ή καταστέλλουν την έκφραση γονιδίων-στόχων τους. Τα πρωτο-ογκογονίδια *MYC* και *FOS* μπορούν να ενεργοποιηθούν με διάφορους μηχανισμούς μεταξύ των οποίων με μεταλλάξεις, γονιδιακή ενίσχυση και χρωμοσωμική μετατόπιση, αλλά και διά μέσου της ενεργοποίησης σηματοδοτικών πρωτεϊνών όπως οι Ras/Raf-ERK και PI3K-Akt (30).

Πρωτεϊνικά προϊόντα ογκοκατασταλτικών γονιδίων επίσης κωδικοποιούν πρωτεΐνες ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, όπως οι πρωτεΐνες p53 και pRb. Η ογκοκατασταλτική

πρωτεΐνη p53 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος ενεργοποιεί ή καταστέλλει μια πληθώρα γονιδίων που εμπλέκονται στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις G<sub>1</sub>/S και G<sub>2</sub>/M, στον κυτταρικό μεταβολισμό, και την απόπτωση. Η p53 επάγεται από σηματοδοτικές πορείες ως απόκριση σε στρεσογόνα και κατασταλτικά σήματα που λαμβάνουν τα κύτταρα ή από παράγοντες που προκαλούν βλάβες στο DNA και ιδιαίτερα από αμφίκλωνες ρήξεις. Η p53 απενεργοποιείται διά μέσου μεταλλάξεων, απαλείψεων ή απώλειας ετεροζυγωτίας με αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την ανθεκτικότητα στην απόπτωση (31-34).

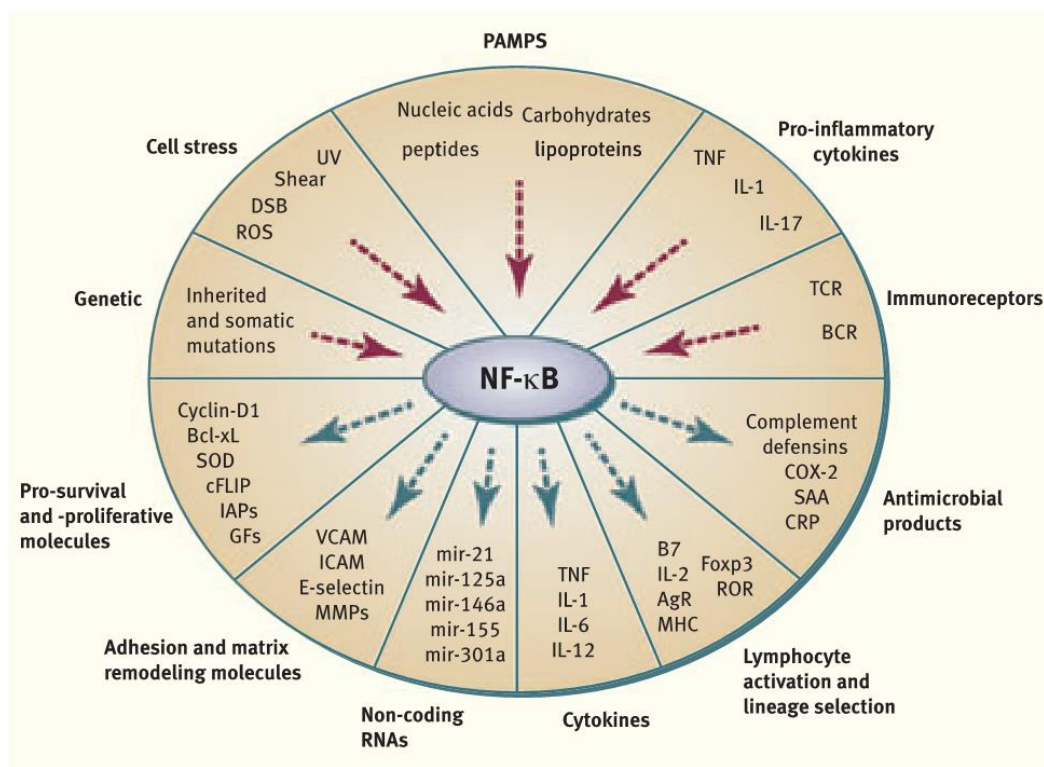
Η pRb επάγει τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις G<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>/S και S του κυτταρικού κύκλου, καθώς δεσμεύει τους ογκογόνους μεταγραφικούς παράγοντες E2F οι οποίοι απαιτούνται για την επαγωγή γονιδίων που εμπλέκονται στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Η λειτουργική αδρανοποίηση του *RB* θέτει σε κίνδυνο την ικανότητα των κυττάρων να ανταποκρίνονται στα σήματα που συνήθως καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και οδηγούν στην ιδιοστατική έκφραση των γονιδίων που οδηγούν στην κυτταρική διαίρεση (35, 36). Πολυάριθμα γονίδια εκφράζονται σε αυξημένα επίπεδα με τρόπο εξαρτώμενο από τον E2F μετά την αδρανοποίηση του *RB*. Αυτά περιλαμβάνουν αρκετά γονίδια, τα προϊόντα των οποίων εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη σύνθεση του DNA και στη μίτωση, και επομένως οι μεταγραφικοί παράγοντες E2F εμπλέκονται στην καρκινογένεση (37-40).

Όμως, υπάρχει και μια σειρά άλλων μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι λειτουργούν εκτός του κυτταρικού κύκλου και ενεργοποιούνται ως απόκριση σε στρεσογόνα και προ-φλεγμονώδη ερεθίσματα. Μία τέτοια οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων που ενεργοποιείται από στρεσογόνα ερεθίσματα που προκαλούν βλάβες στο DNA (41-44), αλλά και από προ-φλεγμονώδη ερεθίσματα (45-48), είναι η οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων NF-κB, η οποία εμπλέκεται στην καρκινογένεση (49-51) συμπεριλαμβανομένου και της καρκινογένεσης του πνεύμονα (52, 53).

### **1.3. Η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB**

Οι μεταγραφικοί παράγοντες NF-κB (Nuclear Factor-κB) συγκροτούν μια οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι συντονίζουν τη μεταγραφική ρύθμιση πληθώρας γονιδίων ως απόκριση σε διάφορα ερεθίσματα. Ο πιο γνωστός και εξελικτικά συντηρημένος ρόλος του NF-κB αφορά τη ρύθμιση των προ-φλεγμονωδών και ανοσολογικών αποκρίσεων του κυττάρου. Ωστόσο, ο NF-κB συμβάλλει στη ρύθμιση και άλλων μοριακών πορειών που μεταξύ άλλων εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, την κυτταρική προσκόλληση, τη διαφοροποίηση, την αυτοφαγία, τον καρκίνο αλλά και την κυτταρική γήρανση (48, 49, 54-56).

Η ενεργοποίηση του NF-κB μπορεί να προκληθεί από ένα μεγάλο εύρος εξωκυτταρικών και ενδοκυτταρικών ερεθισμάτων που περιλαμβάνει ιικές και βακτηριακές μολύνσεις, βλάβες στο DNA, οξειδωτικό στρες και προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Πλέον είναι γνωστό ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες NF-κB ρυθμίζουν την ενεργότητα μιας πληθώρας γονιδίων. Μερικοί από τους πιο κλασσικούς στόχους του NF-κB αποτελούν γονίδια που κωδικοποιούν προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες (TNFα, IL-1, IL-6), αυξητικούς παράγοντες, χημειοκίνες (IL-8, CXCL1, CCL3, CXCL2, CCL2, CCL5), μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMP9), πρωτεΐνες που προάγουν τον πολλαπλασιασμό (Cyclin D1, Myc), αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες (Bcl-XL, Bcl-2), προ-φλεγμονώδη ένζυμα (COX2, iNOS), αγγειογενετικούς παράγοντες (VEGF), μόρια προσκόλλησης (VCAM1, ICAM1, E-selectin), αλλά και αναστολείς της ενεργοποίησής του (IκBa, A20). (<http://www.nf-kb.org>) (Εικόνα 1.3.). Επομένως, η απορρύθμιση της λειτουργίας του NF-κB σχετίζεται με ένα μεγάλο εύρος ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, αυτοάνοσων νοσημάτων, νευροεκφυλιστικών ασθενειών, διαβήτη, αλλά και πολλών ακόμη (57-59).



**Εικόνα 1.3. Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB.** Ο παράγοντας NF-κB ενεργοποιείται από ποικιλία εξωκυτταρικών αλλά και ενδοκυτταρικών ερεθισμάτων, όπως γενετικές μεταλλάξεις, προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και διάφορες μορφές κυτταρικού στρες μεταξύ των οποίων το οξειδωτικό στρες και βλάβες στο DNA. Η ενεργοποίηση του NF-κB έχει σαν αποτέλεσμα τη μεταγραφική ρύθμιση πληθώρας γονιδίων που κωδικοποιούν μεταξύ άλλων, αυξητικούς παράγοντες, κυτταροκίνες, χημειοκίνες, παράγοντες που συμμετέχουν στην έμφυτη και επίκτητη ανοσολογική απόκριση και μικρο-RNA (microRNA, miRNA, miR). PAMPs: Pathogen-associated Molecular Pattern (60).

Η ενεργοποίηση του NF-κB πραγματοποιείται κυρίως διαμέσου δύο κεντρικών σηματοδοτικών πορειών οι οποίες αναφέρονται ως κανονική και μη-κανονική πορεία ενεργοποίησης. Εκτός από την οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων του NF-κB κεντρικό ρόλο και στις δύο πορείες διαδραματίζουν οι πρωτεΐνες IκB και IKK.

### 1.3.1. Η οικογένεια των μεταγραφικών υπομονάδων του NF-κB

Στα θηλαστικά, η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB αποτελείται από πέντε δομικά όμοια και εξελικτικά συντηρημένα μέλη, τις υπομονάδες RelA/p65, RelB, c-Rel, p105/p50 και p100/p52 που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *RELA*, *RELB*, *REL*, *NFKB1* και *NFKB2* αντίστοιχα. Οι μεταγραφικοί παράγοντες NF-κB σχηματίζουν ομοδιμερή ή ετεροδιμερή σύμπλοκα, τα οποία προσδένονται στις αλληλουχίες κB του γονιδιώματος, οι οποίες εμφανίζονται με μια συντηρημένη, αλλά ταυτόχρονα μεταβλητή, αλληλουχία 10 νουκλεοτιδίων 5'-GGGRNWYYCC-3' [N = οποιαδήποτε βάση, R = πουρίνη (A, G), Y = πυριμιδίνη (C, T), W = A ή T], στους υποκινητές και ενισχυτές των γονιδίων στόχων του NF-κB (61, 62) (Εικόνα 1.4.)

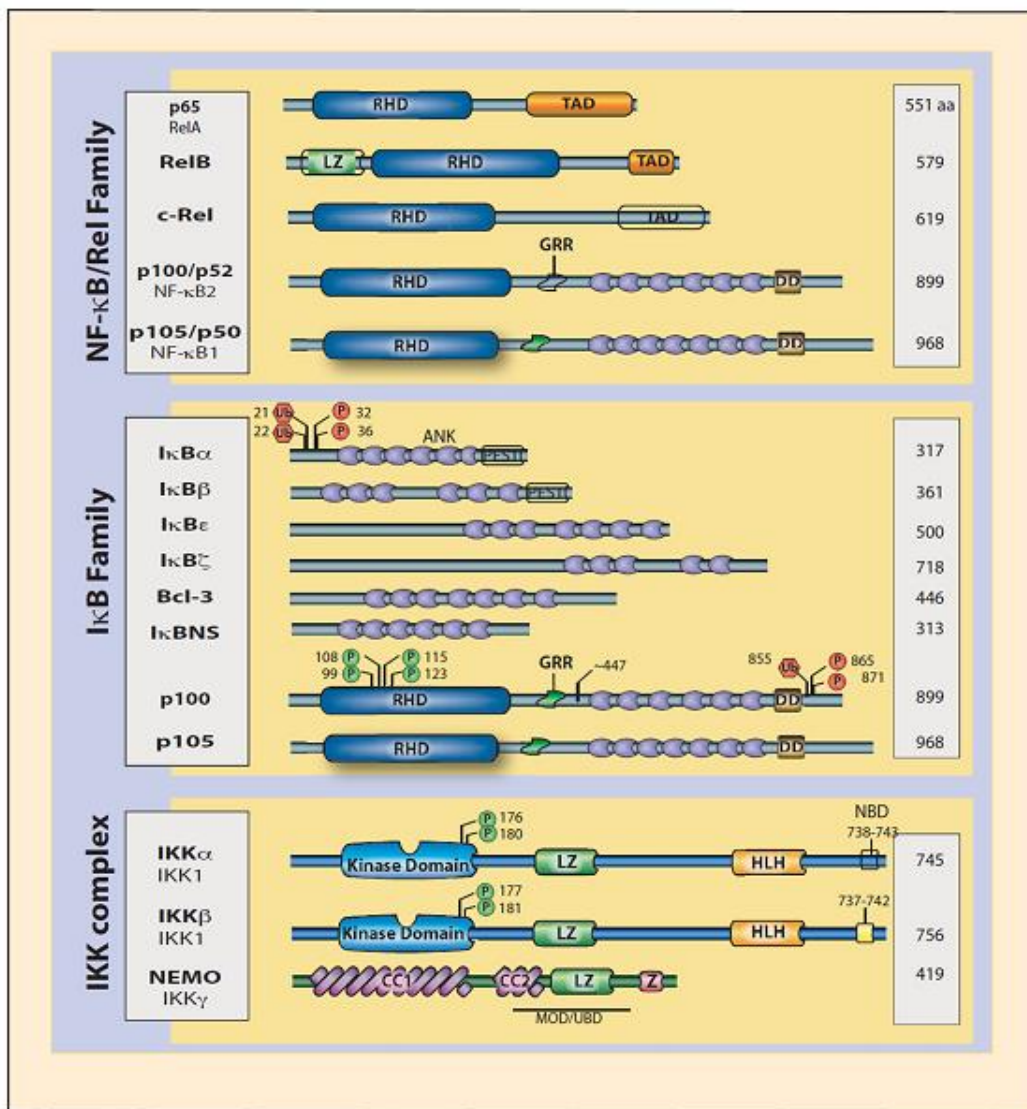
**Consensus κB sequence** 5'-<sup>-5-4-3-2-1 0 +1+2+3+4</sup>GGGRN<sup>W</sup>YYCC-3' R = Purine W = A or T  
N = Any nucleotide Y = Pyrimidine

**Εικόνα 1.4. Συγκαταβατική αλληλουχία κB στο DNA:** Οι δύο ημίσειες θέσεις κB αριθμούνται από το ± 1 ως το 4/5, και η κεντρική θέση αριθμείται ως 0 [N = οποιαδήποτε βάση, R = πουρίνη (A, G), Y = πυριμιδίνη (C, T), W = A ή T] (63).

Τα διμερή φυσιολογικά βρίσκονται ανενεργά στο κυτταρόπλασμα, ενώ υπό την επίδραση του κατάλληλου ερεθίσματος μετατοπίζονται στον πυρήνα όπου ασκούν θετική ή αρνητική ρύθμιση στη μεταγραφική ενεργότητα ενός πολύ μεγάλου αριθμού γονιδίων. Ωστόσο, στον πυρήνα η δράση και ενεργότητα των διμερών ρυθμίζεται είτε θετικά είτε αρνητικά από μια ποικιλία πρωτεϊνών (64, 65), αλλά και μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, με συχνότερη τη φωσφορυλίωση και την ακετυλίωση (66-69), που μπορούν να μεταβάλουν την ικανότητα πρόσδεσής τους στο DNA ή την αλληλεπίδρασή τους με άλλους παράγοντες αλλά και να καθορίσουν τη διάρκεια και την ένταση της σηματοδότησης.

Χαρακτηριστικό όλων των πρωτεϊνών NF-κB αποτελεί η συντηρημένη επικράτεια 300 αμινοξέων, RHD (Rel Homology Domain), η οποία βρίσκεται στο αμινο-τελικό άκρο των μορίων και ευθύνεται για την ικανότητα πρόσδεσής τους στο DNA, το διμερισμό τους με άλλα μόρια NF-κB, αλλά και την αλληλεπίδρασή τους με τις κατασταλτικές πρωτεΐνες IκB. Οι υπομονάδες RelA/p65, RelB και c-Rel, στο καρβοξυ-τελικό τους άκρο, διαθέτουν επιπλέον και μια επικράτεια ενεργοποίησης της μεταγραφής, TAD (Transactivation Domain) (Εικόνα 1.5.). Παρά το γεγονός ότι οι υπομονάδες p50 και p52, οι οποίες προέρχονται από την πρωτεολυτική επεξεργασία των μεγαλύτερων πρόδρομων μορίων p105 και p100,

αντίστοιχα, δεν διαθέτουν TAD, διατηρούν επίσης την ικανότητα επαγωγής της μεταγραφής, μέσω του σχηματισμού συμπλόκων με πρωτεΐνες που διαθέτουν επικράτεια TAD, όπως RelA/p65 (p65-p50) και RelB (RelB-p52) (55, 61, 70).



**Εικόνα 1.5. Σχηματική απεικόνιση των πρωτεϊνών NF-κB, IκB και IKK.** Απεικονίζονται τα κύρια δομικά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών που αποτελούν μέλη των υποοικογενειών NF-κB και IκB, καθώς και των IKK. Η υποοικογένεια του NF-κB αποτελείται από τις μεταγραφικές υπομονάδες (RelA/p65, RelB, c-Rel, p50 και p52), η υποοικογένεια της IκB αποτελείται από τις ανασταλτικές πρωτεΐνες του NF-κB οι οποίες δεσμεύουν τις μεταγραφικές του υπομονάδες (IκBa, IκBβ, IκBe, IκBζ, Bcl-3) ή που δρουν ανασταλτικά ως πρόδρομα μόρια (p100, p105), και η υποοικογένεια των IKK που αποτελείται από μόρια του σηματοδοτικού συμπλόκου IKK, όπως οι κινάσες σερίνης/θρεονίνης IKKα και IKKβ, και η προσαρμοστική/ρυθμιστική πρωτεΐνη NEMO/IKKγ. Επίσης, απεικονίζονται οι θέσεις ουβικιτινίωσης (Ub) και φωσφορυλίωσης (P) των πρωτεϊνών IκBa και p100 που οδηγούν στην πρωτεολυτική τους επεξεργασία. Δεξιά αναγράφεται ο αριθμός των αμινοξέων (aa) κάθε πρωτεΐνης. RHD, επικράτεια Rel; TAD, επικράτεια ενεργοποίησης της μεταγραφής; NBD, επικράτεια πρόσδεσης NEMO; LZ, φερμουάρ λευκίνης; GRR, περιοχή πλούσια σε γλυκίνη; DD, επικράτεια θανάτου; HLH, δομή έλικα-βρόγχος-έλικα; CC, σπειραμένο σπείραμα; Z, δάκτυλος ψευδαργύρου. (71).

Από τις πέντε υπομονάδες της οικογένειας του NF-κB προκύπτουν πολλά διαφορετικά σύμπλοκα τα οποία σχετίζονται με συγκεκριμένες βιολογικές λειτουργίες. Για παράδειγμα ομοδιμερή σύμπλοκα p50 και p52 εμφανίζονται ιδιοστατικά στον πυρήνα των κυττάρων καταστέλλοντας τη μεταγραφή γονιδίων. Αντίθετα, διμερή που περιέχουν τις υπομονάδες RelA (RelA/p65:p50) και c-Rel (c-Rel:p50) ενεργοποιούν τη μεταγραφή, ενώ διμερή που περιέχουν την υπομονάδα RelB (RelB:p52) μπορούν να δρουν κυρίως ως θετικοί ρυθμιστές της μεταγραφής, αλλά και ως αρνητικοί ρυθμιστές της μεταγραφής. Φυσιολογικά στα κύτταρα έχουν παρατηρηθεί οι περισσότεροι πιθανοί συνδυασμοί συμπλόκων, άλλοι συχνότερα και άλλοι σπανιότερα, με ελάχιστες εξαιρέσεις, όπως για παράδειγμα τα διμερή σύμπλοκα RelB (61, 72, 73).

### **1.3.2. Η οικογένεια των πρωτεϊνών IκB**

Απουσία κάποιου ερεθίσματος τα διμερή σύμπλοκα του NF-κB συγκρατούνται στο κυτταρόπλασμα από μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών IκB (Inhibitors of κB). Το πρώτο μέλος που ανακαλύφθηκε είναι η IκBα ενώ ακολούθησαν η IκBβ και η IκBε, οι οποίες αποτελούν και τα πρωτότυπα μέλη της οικογένειας. Εμφανίζουν σταθερή έκφραση ενώ υπό την επίδραση διάφορων ερεθισμάτων υφίστανται φωσφορυλίωση και πρωτεολυτική αποικοδόμηση με την επακόλουθη απελευθέρωση των λειτουργικά ενεργών ετεροδιμερών του NF-κB. Αργότερα προστέθηκαν στην οικογένεια τα μέλη Bcl-3, IκBζ, IκBns και IκBδ τα οποία συνολικά αναφέρονται ως άτυπα. Με εξαίρεση την IκBη, οι πρωτεΐνες αυτές εκφράζονται σε πολύ χαμηλά επίπεδα ενώ η έκφρασή τους αυξάνεται με την επίδραση των κατάλληλων ερεθισμάτων. Οι ανασταλτικές πρωτεΐνες ρυθμίζουν τη μεταγραφική ενεργότητα των διμερών του NF-κB. Για παράδειγμα, η IκBα και η IκBε παλινδρομούν μεταξύ κυτταροπλάσματος και πυρήνα (μολονότι με διαφορετική κινητική) καταστέλλοντας την πυρηνική είσοδο και προάγοντας την πυρηνική έξοδο των πρωτεϊνών Rel (RelA/p65, c-Rel). Στην οικογένεια ανήκουν επίσης τα πρόδρομα μόρια p100 και p105 καθώς έχουν επίσης την ικανότητα να συγκρατούν τα διμερή του NF-κB ανενεργά στο κυτταρόπλασμα. Σε αντίθεση με τα πρωτότυπα μέλη της οικογένειας οι πρωτεΐνες p100 και p105 δεν αποικοδομούνται πλήρως από το πρωτεάσωμα αλλά υφίστανται πρωτεολυτική επεξεργασία από την οποία προκύπτουν οι ώριμες υπομονάδες p52 και p50, αντίστοιχα. Η μερική πρωτεόλυση των πρόδρομων μορίων οφείλεται στην παρουσία μιας περιοχής πλούσιας σε κατάλοιπα γλυκίνης (glycine-rich region; GRR), η οποία λειτουργεί ως σήμα τερματισμού της πρωτεόλυσης (Εικόνα 1.5.) (61, 70, 74, 75).



Δομικό χαρακτηριστικό όλων των μελών της οικογένειας IκB αποτελούν οι πολλαπλές επαναλήψεις αγκυρίνης στο καρβοξυ-τελικό τους άκρο. Μέσω αυτών των επαναλήψεων, οι πρωτεΐνες IκB δρουν κυρίως καλύπτοντας τη συντηρημένη αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού, NLS (Nuclear Localisation Signal), η οποία βρίσκεται στις περιοχές RHD των μεταγραφικών υπομονάδων NF-κB, συγκρατώντας έτσι τα μόρια στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 1.5.). Εξαίρεση αποτελεί η IκBa καθώς η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου IκBa-r65-p50 έχει καταδείξει ότι η IκBa καλύπτει την περιοχή NLS μόνο της υπομονάδας r65 και όχι της p50, με αποτέλεσμα τα σύμπλοκα NF-κB:IκBa να παλινδρομούν μεταξύ του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος, απουσία κάποιου ερεθίσματος (74, 76).

### 1.3.3. Οι σηματοδοτικές πρωτεΐνες IKK

Το σύμπλοκο IKK αποτελεί ένα σύμπλοκο υψηλού μοριακού βάρους (700 - 900 kDa), το οποίο αποτελείται από τις καταλυτικές υπομονάδες IKKα (ή IKK1) και IKKβ (ή IKK2) και τη ρυθμιστική/προσαρμοστική υπομονάδα NEMO (IKKγ). Οι υπομονάδες IKKα και IKKβ ανήκουν στην οικογένεια κινάσων σερίνης/θρεονίνης και οι αλληλουχίες τους εμφανίζουν ιδιαίτερα υψηλή ομολογία (~50%). Δομικά φέρουν μια αμινο-τελική επικράτεια κινάσης (Kinase Domain; KD), μια επικράτεια διμερισμού και μια καρβοξυ-τελική επικράτεια πρόσδεσης με την καταλυτική υπομονάδα NEMO (NEMO binding domain; NBD) (Εικόνα 1.4.). Η ενεργότητα κινάσης καθορίζεται από το κατάλοιπο λυσίνη 44 (Lys44) και τα φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα σερίνης στον T-βρόγχο ενεργοποίησης, στις σερίνες 176 και 180 για την IKKα και στις σερίνες 177 και 181 για την IKKβ, αντίστοιχα (70, 77, 78).

Η υπομονάδα NEMO διαφέρει δομικά και είναι υπεύθυνη για τη μεταβίβαση των σημάτων από διαμεμβρανικούς υποδοχείς και σηματοδοτικά μόρια που οδηγούν στην ενεργοποίηση των κινάσων IKKα και IKKβ. Η συγκρότηση του σηματοδοτικού συμπλόκου των IKK (IKK signalsome complex) απαιτείται για την ενεργοποίηση της δράσης κινάσης και συνήθως αποτελείται από ένα ετεροδιμερές IKKα και IKKβ και δύο υπομονάδες της NEMO, καθώς επίσης και από μια σειρά πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τις IKK (IKK-associated proteins). Η ενεργοποίηση ενός επιφανειακού υποδοχέα έχει σαν αποτέλεσμα τη στρατολόγηση διαφόρων πρωτεϊνών που λειτουργούν ως πρωτεΐνες προσαρμογείς και με τη σειρά τους στρατολογούν την υπομονάδα NEMO και κατ' επέκταση το σύμπλοκο IKK. Στη συνέχεια, οι κινάσες IKKα και IKKβ ενεργοποιούνται με φωσφορυλίωση στον T-βρόγχο ενεργοποίησης είτε από άλλες κινάσες είτε μέσω αυτό-φωσφορυλίωσης. Στόχοι των κινάσων αποτελούν τα μέλη της οικογένειας IκB, και κυρίως η IκBa την οποία φωσφορυλιώνουν στα κατάλοιπα σερίνη 32 και σερίνη 36, και η IκBβ την οποία

φωσφορυλιώνουν στα κατάλοιπα σερίνη 19 και σερίνη 23. (77, 79). Οι κινάσες IKKα και IKKβ εκτός από τη δράση τους ως υπομονάδες του σηματοδοτικού συμπλόκου IKK, μπορούν να φωσφορυλιώσουν υποστρώματα ανεξάρτητα από τις πορείες ενεργοποίησης του NF-κB, αλλά και να εισέλθουν στον πυρήνα όπου ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων, όπως συζητείται σε επόμενη ενότητα (70, 77, 78).

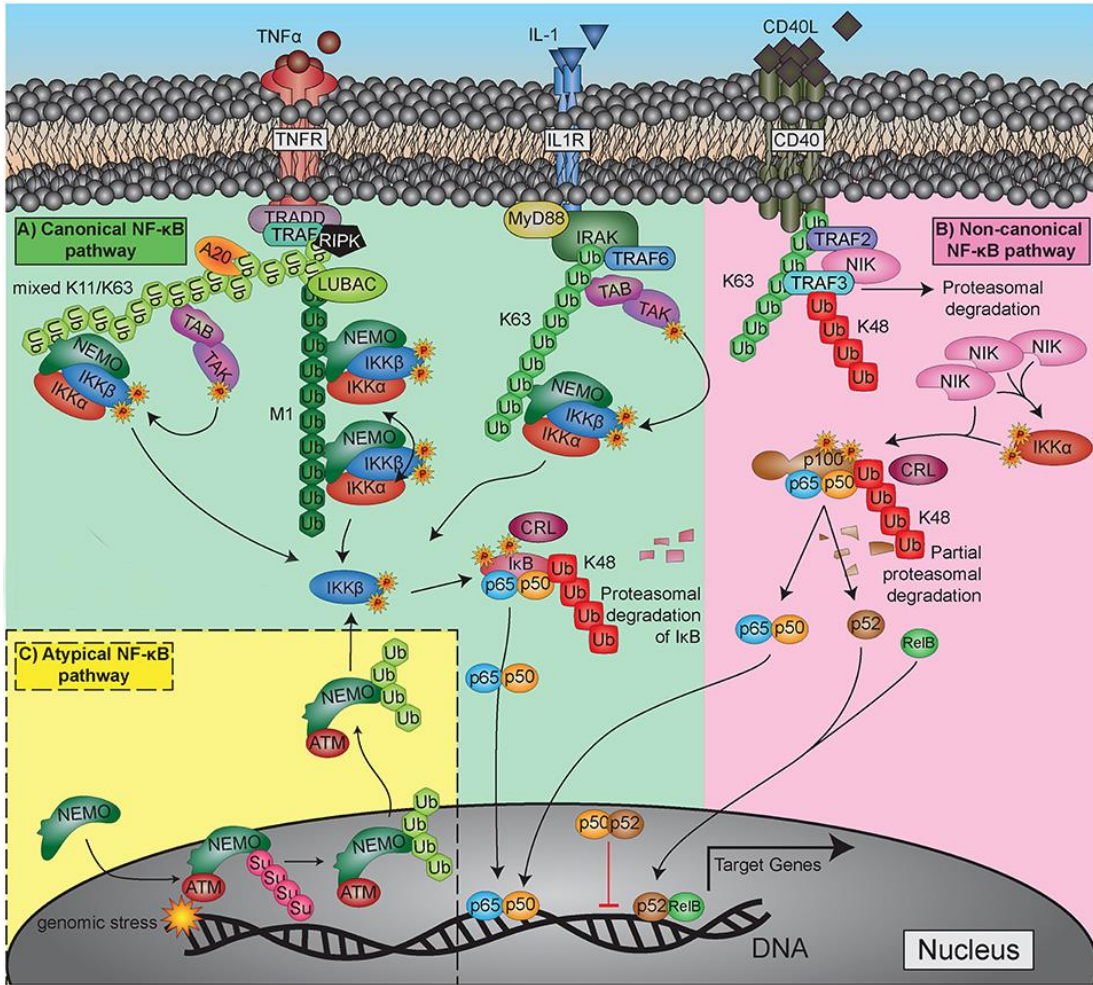
#### **1.4. Πορείες ενεργοποίησης των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB**

Δύο κεντρικές σηματοδοτικές πορείες, γνωστές ως *κανονική* ή *κλασσική* και *μη-κανονική* ή *εναλλακτική πορεία ενεργοποίησης του NF-κB*, οδηγούν στην ενεργοποίηση των ετεροδιμερών του NF-κB και τη μετατόπισή τους στον πυρήνα όπου επηρεάζουν την έκφραση γονιδίων-στόχων τους. Και οι δύο πορείες απαιτούν τη δράση τουλάχιστον μιας κινάσης IKK, η κάθε μια από τις οποίες συνηθέστερα οδηγεί στην ενεργοποίηση συγκεκριμένων ετεροδιμερών του NF-κB. Με μικρότερη συχνότητα παρατηρείται η ενεργοποίηση του NF-κB από σηματοδοτικές πορείες ανεξάρτητες από τις κινάσες IKK οι οποίες συνολικά αναφέρονται ως *άτυπες σηματοδοτικές πορείες*.

##### **1.4.1. Κανονική πορεία ενεργοποίησης του NF-κB**

Η ενεργοποίηση του NF-κB διαμέσου της κανονικής πορείας είναι ταχεία και παροδική. Επάγεται από σειρά ερεθισμάτων που περιλαμβάνουν προ-φλεγμονώδης κυτταροκίνες όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων TNF-α (Tumor necrosis Factor-α) και η ιντερλευκίνη 1 (IL-1), αλλά και σήματα που μεταβιβάζονται μέσω των υποδοχέων Toll (Toll-like receptors; TLRs) και των υποδοχέων αντιγόνων. Συνηθέστερα, η πορεία αυτή περιλαμβάνει την επαγωγή αποικοδόμησης της IκBα και την ενεργοποίηση των ετεροδιμερών RelA/p65:p50 τα οποία αναγνωρίζουν την συγκαταβατική αλληλουχία κB, συνήθως όταν η κεντρική βάση της αλληλουχίας είναι A/T (63, 71).





**Εικόνα 1.6. Πορείες ενεργοποίησης των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB. (Α)** Ερεθίσματα όπως ο TNF $\alpha$  και η IL-1, επάγουν τη κανονική πορεία ενεργοποίησης του NF-κB. Η πορεία χαρακτηρίζεται από την ταχεία φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης I $\kappa$ B $\alpha$ , κυρίως από την κινάση IKK $\beta$ , η οποία ακολούθως αποικοδομείται από το πρωτεόσωμα 26S με αποτέλεσμα την απελευθέρωση, συνηθέστερα, διμερών p65:p50, τη μετακίνησή τους στον πυρήνα και τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων. **(Β)** Ερεθίσματα όπως ο προσδέτης CD40 ενεργοποιούν τη μη κανονική πορεία ενεργοποίησης, στην οποία κεντρικό ρόλο διαδραματίζει η IKK $\alpha$ , η οποία φωσφορυλιώνεται από την ανοδική κινάση NIK. Η IKK $\alpha$  προάγει την επεξεργασία της υπομονάδας p100 από την οποία προκύπτει η ώριμη υπομονάδα p52. Τα σύμπλοκα RelB-p52 εισέρχονται στον πυρήνα όπου ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων. **(C)** Η IKK εξαρτώμενη πορεία ενεργοποίησης μπορεί να επαχθεί και από την επίδραση γονοτοξικού στρες. Κύριο ρόλο διαδραματίζει η υπομονάδα NEMO, η οποία εισέρχεται στον πυρήνα όπου συμμουλιώνεται και ακολούθως ουβικιτινιώνεται με έναν ATM εξαρτώμενο τρόπο. Η NEMO εξέρχεται από τον πυρήνα σε σύμπλοκο με την ATM όπου και πραγματοποιείται η ενεργοποίηση της IKK $\beta$ . Ub; ουβικιτινίωση, P; φωσφορυλίωση, Su; συμμουλίωση, TAD; K; λυσίνη, M; μεθειονίνη (80).

Ένα από τα καλύτερα μελετημένα ερεθίσματα που ενεργοποιεί την κανονική πορεία του NF-κΒ αποτελεί ο TNFα. Η πρόσδεση του TNFα στον υποδοχέα του, TNFR1, έχει σαν αποτέλεσμα τη διαδοχική στρατολόγηση στη μεμβράνη πρωτεϊνών προσαρμογέων όπως η TRADD (TNFR1-associated death domain protein), η RIP (receptor-interacting protein) και η TRAF2 (TNF-receptor-associated factor 2). Στη συνέχεια, η TRAF2, που εμφανίζει δράση E3 λιγάσης ουβικιτίνης σε συνεργασία και με άλλα ένζυμα σχηματίζει μια αλυσίδα ουβικιτίνης η οποία παρέχει μια θέση πρόσδεσης για επιπλέον μόρια όπως οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες NEMO και TAB και οι συνδεδεμένες με αυτές κινάσες IKK και TAK1 αντίστοιχα. Σε αυτή την πορεία η IKKβ αποτελεί την κύρια κινάση ενεργοποίησης των διμερών του NF-κΒ. Η IKKβ ενεργοποιείται είτε μέσω της κινάσης TAK1 είτε μέσω αυτοφωσφορυλίωσης και με τη σειρά της φωσφορυλιώνει την κινάση IκΒα στις σερίνες 32 και 36 γεγονός που προκαλεί την β-TRCP-εξαρτώμενη ουβικιτίνωσή της από το σύμπλοκο λιγάσης ουβικιτίνης SCF/UbcH5 (ή CRL). Η IκΒα αναγνωρίζεται και αποικοδομείται από το πρωτεόσωμα 26S αφήνοντας ελεύθερο το ετεροδιμερές σύμπλοκο RelA/p65:p50 να μετατοπισθεί στον πυρήνα και να επάγει ή να καταστείλει τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων του (Εικόνα 1.6.) (70, 71, 77, 80, 81).

#### **1.4.2. Μη-κανονική πορεία ενεργοποίησης του NF-κΒ**

Η μη κανονική πορεία ενεργοποίησης του NF-κΒ διαφέρει αρκετά και σε αντίθεση με την κανονική πορεία, είναι σημαντικά πιο αργή καθώς εξαρτάται από τη *de novo* σύνθεση της κινάσης NIK (NF-κΒ Inducing Kinase). Επίσης, είναι ανεξάρτητη τόσο από την κινάση IKKβ όσο και από την υπομονάδα NEMO. Ενεργοποιείται από ένα μικρό σύνολο κυτταροκινών που ανήκουν στην οικογένεια TNF και περιλαμβάνουν τη λεμφοτοξίνη (LT), τη RANKL (Receptor Activator of NF-κΒ Ligand), τη CD40L (CD40 Ligand) και τη BAFF (B cell Activating Factor of the TNF family), αλλά και από ιούς όπως ο ανθρώπινος T-λεμφοτρόπος ιός (HTLV-1) και ο ιός Epstein-Barr. Φυσιολογικά, η πορεία αυτή διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην ωρίμανση των Β-κυττάρων και το σχηματισμό των λεμφοειδών ιστών (82).

Σε κύτταρα που δεν υπόκεινται σε κάποιο ερέθισμα η κινάση NIK είναι δεσμευμένη από ένα σύμπλοκο TRAF-cIAP (TRAF3:TRAF2:cIAP1/2) το οποίο καταλύει την ουβικιτίνωση και την αποικοδόμηση της. Με την επίδραση του κατάλληλου ερεθίσματος το σύμπλοκο αυτό στρατολογείται στον ενεργό υποδοχέα όπου και επάγεται η αποικοδόμησή του με αποτέλεσμα την ελευθέρωση της NIK και την αύξηση των επιπέδων της. Στην υπομονάδα p100 τα κατάλοιπα σερίνης 866 και 870 λειτουργούν ως θέσεις πρόσδεσης της NIK η οποία στρατολογεί και την κινάση IKKα την οποία και φωσφορυλιώνει. Στη συνέχεια η ενεργή κινάση IKKα φωσφορυλιώνει με τη σειρά της την p100 σε πολλαπλά κατάλοιπα σερίνης γεγονός που

οδηγεί στην ουβικιτινίωση και την επεξεργασία της από το πρωτεάσωμα. Αποτέλεσμα της πρωτεολυτικής επεξεργασίας είναι ο σχηματισμός της ώριμης υπομονάδας p52, η οποία συνηθέστερα σε σύμπλοκο με τη RelB μπορεί πλέον να εισέλθει στον πυρήνα του κυττάρου για τη ρύθμιση των γονιδίων στόχων τα οποία αναγνωρίζουν την συγκαταβατική αλληλουχία κB, συνήθως όταν η κεντρική βάση της αλληλουχίας είναι G/C (Εικόνα 1.6.) (63, 67, 82, 83).

### 1.4.3. Άτυπες πορείες ενεργοποίησης του NF-κB

Όπως αναφέρθηκε εκτός από την κανονική και μη κανονική πορεία, η ενεργοποίηση του NF-κB μπορεί να είναι αποτέλεσμα της δράσης και άλλων σηματοδοτικών πορειών οι οποίες απαντώνται λιγότερο συχνά γι' αυτό αναφέρονται και ως *άτυπες σηματοδοτικές πορείες ενεργοποίησης του NF-κB*. Μια από αυτές τις πορείες περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του NF-κB υπό την επίδραση γονοτοξικού στρες. Με εξαίρεση την υπεριώδη ακτινοβολία (UV), γονοτοξικοί παράγοντες που προκαλούν αμφίκλωνες ρήξεις στο DNA (DSBs), όπως η ιονίζουσα ακτινοβολία (IR) και οι αναστολείς των τοποϊσομερασών (καμπποθεκίνη και ετοποσίδιο), οδηγούν στην ΙΚΚβ-διαμεσολαβούμενη ενεργοποίηση της κανονικής πορείας του NF-κB, μιας πορείας εξαρτώμενης από την κινάση ATM (Εικόνα 1.6.). Πιο συγκεκριμένα, η δράση δύο παράλληλων πορειών οδηγεί στην ενεργοποίηση του NF-κB έπειτα από την πρόκληση αμφίκλωνων ρήξεων στο DNA. Ένα στρεσογόνο ερέθισμα προάγει την πυρηνική εισαγωγή των πρωτεϊνών PIDD και RIP1, οι οποίες σχηματίζουν σύμπλοκο με τη NEMO και προάγουν τη σουμοϋλίωσή της. Παράλληλα, οι αμφίκλωνες ρήξεις του DNA ενεργοποιούν την κινάση ATM, η οποία αναγνωρίζει τη σουμοϋλιωμένη NEMO και τη φωσφορυλιώνει. Ακολούθως η NEMO (σε σύμπλοκο με την ATM) αποσουμοϋλιώνεται και στη συνέχεια ουβικιτινιώνεται, γεγονός που αποτελεί το σήμα πυρηνικής εξόδου του συμπλόκου. Στο κυτταρόπλασμα, το διμερές NEMO-ATM προσδένεται με τις κινάσες ΙΚΚα και ΙΚΚβ, αλλά και την πρωτεΐνη ELKS (πλούσια σε γλουταμινικό οξύ, λευκίνη, λυσίνη και σερίνη). Ο σχηματισμός του πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου προάγει την αποδόμηση της ΙκΒα και την επακόλουθη απελευθέρωση των διμερών NF-κB, τα οποία εισέρχονται στον πυρήνα για τη ρύθμιση των γονιδίων στόχων. Αυτή η άτυπη σηματοδοτική πορεία ενεργοποίησης του NF-κB διεξάγεται από μέσα (πυρήνας) προς τα έξω (κυτταρόπλασμα) ως απόκριση σε βλάβες στο DNA (41-43, 84-86).

Άλλες πορείες περιλαμβάνουν κινάσες τυροσίνης ή την κινάση καζεΐνης 2 (CK2). Μια σειρά από ερεθίσματα όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (87), ο νευρικός αυξητικός παράγοντας (Nerve Growth Factor; NGF) (88) και η υποξία (89, 90) έχουν βρεθεί ότι οδηγούν στη φωσφορυλίωση της ΙκΒα από κινάσες τυροσίνης με συνέπεια την απομάκρυνση της ΙκΒα από το σύμπλοκο με τον NF-κB και την ακόλουθη ενεργοποίησή

του. Ανεξάρτητα από το σύμπλοκο IKK η ακτινοβολία UV έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της CK2 η οποία φωσφορυλιώνει την IκΒα και, σε αντίθεση με τις κινάσες τυροσίνης, προάγει την αποδόμησή της (55, 91).

#### **1.4.4. Μηχανισμοί τερματισμού της σηματοδότησης του NF-κΒ**

Ο τερματισμός της κανονικής σηματοδοτικής πορείας του NF-κΒ μπορεί να επιτευχθεί με διάφορους μηχανισμούς. Ο κύριος και πιο καλά χαρακτηρισμένος μηχανισμός περιλαμβάνει την άμεση μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της IκΒα, από τον ίδιο τον NF-κΒ, η οποία εισέρχεται στον πυρήνα, δεσμεύει τα ετεροδιμερή του NF-κΒ και τα απομακρύνει από το DNA τερματίζοντας τη σηματοδότηση. Εκτός από την IκΒα, ο NF-κΒ προάγει την έκφραση και του παράγοντα A20, μέλος της οικογένειας πρωτεασών OTU (ovarian tumour-related), ο οποίος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον τερματισμό της σηματοδότησης του NF-κΒ που επάγεται από υποδοχείς που συμμετέχουν στην έμφυτη ανοσία όπως οι TNFR και TLR. Ο παράγοντας A20 δρα απομακρύνοντας τις αλυσίδες ουβικιτίνης από τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες TRAF, RIP και NEMO τερματίζοντας έτσι τη σηματοδότηση του NF-κΒ (92-95).

Εκτός από αυτούς τους δύο κεντρικούς μηχανισμούς ρύθμισης της σηματοδότησης του NF-κΒ, ένας άλλος μηχανισμός που φαίνεται να αφορά κυρίως την αναστολή της δράσης της υπομονάδας ρ65 περιλαμβάνει τη δράση μορίων λιγάσης ουβικιτίνης τα οποία πολυ-ουβικιτινιώνουν την υπομονάδα ρ65 και την οδηγούν προς αποικοδόμηση (96, 97). Ένα ακόμη επίπεδο ρύθμισης αποτελεί η φωσφορυλίωση της NEMO σε πολλαπλά κατάλοιπα σερίνης από την IKKβ. Η φωσφορυλίωση αυτή περιορίζει το διμερισμό της NEMO και την ικανότητα της NEMO να ενεργοποιεί τις κινάσες IKK μειώνοντας τη σηματοδότηση της κανονικής πορείας (98, 99). Τέλος, στα μακροφάγα, η κινάση IKKα μπορεί να φωσφορυλιώνει τις υπομονάδες ρ65 και c-Rel στο καρβοξυ-τελικό τους άκρο επάγοντας την αποικοδόμησή τους με αποτέλεσμα τη διακοπή της μεταγραφής των γονιδίων στόχων τους και τον τερματισμό της φλεγμονώδους απόκρισης (100).

Η μη κανονική πορεία ενεργοποίησης εξαρτάται από τη σταθερότητα της κινάσης NIK. Όπως συζητήθηκε, η κινάση NIK παράγεται συνεχώς όμως παραμένει ανενεργή καθώς το σύμπλοκο TRAF-cIAP προάγει την αποδόμησή της. Επομένως, η μη κανονική πορεία επάγεται μόνον παρουσία του κατάλληλου ερεθίσματος. Ένας δεύτερος μηχανισμός ελέγχου των επιπέδων της NIK προέρχεται από την κινάση IKKα και είναι ανεξάρτητος από τις πρωτεΐνες TRAF και cIAP. Η κινάση IKKα φωσφορυλιώνει την ενεργή κινάση NIK η οποία πολυ-ουβικιτινιώνεται, από μια άγνωστη μέχρι στιγμής λιγάση ουβικιτίνης, και αποικοδομείται από το πρωτεάσωμα (83, 95, 101, 102).

## 1.5. Δράση των κινάσων IKK ανεξάρτητα από την ενεργοποίηση του NF-κB

Οι κινάσες IKKα και IKKβ, όπως αναφέρθηκε, παρά την υψηλή ομολογία τους παρουσιάζουν διακριτές και μη επικαλυπτόμενες δράσεις. Εκτός από τον κεντρικό τους ρόλο στην ενεργοποίηση των υπομονάδων του NF-κB μέσω της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών της οικογένειας IκB, οι κινάσες αυτές συμμετέχουν στη ρύθμιση της ενεργότητας των υπομονάδων του NF-κB και με εναλλακτικούς μηχανισμούς αλλά στη ρύθμιση διαφόρων άλλων σηματοδοτικών πορειών, ανεξάρτητα από την κανονική και μη κανονική πορεία (77, 78, 103, 104).

### 1.5.1. Ρύθμιση της ενεργότητας του NF-κB μέσω εναλλακτικών μηχανισμών

Η κινάση IKKα μπορεί να μετακινείται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, ανεξάρτητα από τα σύμπλοκα ενεργοποίησης του NF-κB. Υπό την επίδραση κυτταροκινών, όπως ο TNFα, η IKKα έχει δειχθεί ότι μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου δρα ως νουκλεοσωμική κινάση ιστονών καθώς φωσφορυλιώνει τη σερίνη 10 της ιστόνης H3 προάγοντας τη μεταγραφή γονιδίων όπως η IκBa και η IL-6, διαμέσου του NF-κB (105, 106).

Η IKKα μπορεί επίσης να φωσφορυλιώσει μια σειρά από άλλα υποστρώματα μεταξύ των οποίων τον παράγοντα CBP (CREB-Binding protein), ένα μεταγραφικό ενεργοποιητή, επηρεάζοντας έτσι τη δέσμευσή του με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες. Πιο συγκεκριμένα, υπό την επίδραση του TNFα η IKKα φωσφορυλιώνει τον CBP στις σερίνες 1382 και 1386 ευνοώντας τη δέσμευση του παράγοντα με την p65 έναντι της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 με αποτέλεσμα την αναστολή της απόπτωσης και την επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (107). Ένας άλλος μηχανισμός μέσω του οποίου η IKKα προάγει τη μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων του NF-κB είναι και η φωσφορυλίωση του καταστολέα SMRT (Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid hormone receptors). Ο παράγοντας SMRT σε σύμπλοκο με την απακετυλάση των ιστονών HDAC3 και διμερή p50 του NF-κB καταστέλλουν τη μεταγραφική ενεργοποίηση. Η φωσφορυλίωση του SMRT από την IKKα έχει σαν αποτέλεσμα τη στρατολόγηση της 14-3-3ε και την απομάκρυνση του συμπλόκου από τη χρωματίνη, τη θέση του οποίου καταλαμβάνουν τα σύμπλοκα ενεργοποίησης p65:p50 (108, 109). Σε άλλες περιπτώσεις, η IKKα απαιτείται επίσης και για την πρόσδεση του παράγοντα p65 στους υποκινητές των γονιδίων όπως στα γονίδια *ICAM-1* (intercellular adhesion molecule-1) και *MCP-1* (monocyte chemoattractant protein-1), ενώ απαιτείται και για τη μεταγραφική ενεργοποίηση αυτών των γονιδίων καθώς φαίνεται ότι παράλληλα προάγει και την απομάκρυνση της απακετυλάσης των ιστονών HDAC3 από τη χρωματίνη (110). Αντίθετα, όπως αναφέρθηκε ήδη, στα μακροφάγα η IKKα φωσφορυλιώνει άμεσα τους παράγοντες p65 και c-Rel με αποτέλεσμα την αποικοδόμησή τους και τον τερματισμό της φλεγμονώδους

αντίδρασης (100). Ένας άλλος μηχανισμός διαμέσου του οποίου η IKKα συμβάλλει στη διακοπή της μεταγραφής προ-φλεγμονωδών γονιδίων είναι η φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση του καταστολέα PIAS1 (Protein Inhibitor of Activated STAT1) ο οποίος στρατολογείται στους υποκινητές των γονιδίων στόχων του NF-κB όπου και απομακρύνει τον παράγοντα p65 τερματίζοντας τη μεταγραφή τους (111).

Στην κανονική πορεία ενεργοποίησης, η ουβικιτινίωση της πρωτεΐνης TRAF2 είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του συμπλόκου IKK. Ωστόσο, το ένζυμο CYLD απομακρύνει τα μόρια ουβικιτίνης από την TRAF2 μειώνοντας τη δράση της. Υπό την επίδραση του TNFα η IKKβ φωσφορυλιώνει τη CYLD και την απενεργοποιεί ενισχύοντας έτσι τη σηματοδότηση του NF-κB (112).

### **1.5.2. Ρύθμιση ανεξάρτητων κυτταρικών σηματοδοτικών πορειών από τις IKK**

Εκτός από τις πρωτεΐνες IκB, ένα από τα πρώτα μόρια που αποδείχθηκε ότι αποτελεί υπόστρωμα των IKK είναι η β-κατενίνη. Οι δυο κινάσες φωσφορυλιώνουν τη β-κατενίνη επηρεάζοντας τα επίπεδα και κατ' επέκταση τη μεταγραφική της ενεργότητα. Ωστόσο, ενώ η IKKβ μειώνει τα επίπεδα της β-κατενίνης, η IKKα συμβάλλει στη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης και την αύξηση των επιπέδων της. Η διαφορική δράση των κινασών μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι οι δυο κινάσες φωσφορυλιώνουν τη β-κατενίνη σε διαφορετικά κατάλοιπα συνεπώς μπορεί να επηρεάζουν διαφορετικές επικράτειες της πρωτεΐνης, όμως είναι πιθανό να εμπλέκονται και επιπρόσθετα μόρια με τα οποία αλληλεπιδρούν οι κινάσες IKK για τη ρύθμιση των επιπέδων της β-κατενίνης (113-115).

Αντίθετη δράση παρουσιάζουν οι δυο κινάσες και όσον αφορά τη ρύθμιση των επιπέδων της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53. Ως απόκριση στο οξειδωτικό στρες η IKKα προάγει την έκφραση προ-αποπτωτικών γονιδίων μέσω της φωσφορυλίωσης της p53 στη σερίνη 20 και τη σταθεροποίηση των επιπέδων της (116). Αντίθετα, η IKKβ φωσφορυλιώνει την p53 στις σερίνες 362 και 366 με αποτέλεσμα την ουβικιτινίωση και αποδόμησή της (117), ενώ ένας δεύτερος μηχανισμός ρύθμισης περιλαμβάνει την αύξηση των επιπέδων του αναστολέα της p53, Mdm2 (118).

Όπως αναφέρθηκε η IKKα μπορεί να δρα ως νουκλεοσωμική κινάση ιστονών φωσφορυλιώνοντας τη σερίνη 10 της H3. Μέσω του ίδιου μηχανισμού, η IKKα είναι απαραίτητη για τη μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων που επάγονται από τη σηματοδότηση του υποδοχέα οιστρογόνων (Estrogen Receptor; ER) όπως τα γονίδια της κυκλίνης D1 (Cyclin D1) και του c-Myc (119), αλλά και του c-fos που επάγεται από τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (Epidermal Growth Factor; EGF) (120).

Η δράση της IKKα μπορεί να επηρεάσει την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Εκτός από τη ρύθμιση της κυκλίνης D1, καθοδικά της σηματοδότησης του υποδοχέα οιστρογόνων, η IKKα προάγει την ακετυλίωση του μεταγραφικού παράγοντα E2F1 από τον παράγοντα PCAF (P300/CBP-associated factor), με αποτέλεσμα την αύξηση της σταθερότητας και μεταγραφικής ενεργότητας του E2F1, η δράση του οποίου είναι απαραίτητη για την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και τη μετάβαση από τη φάση G<sub>1</sub> στη φάση S (121). Ως απόκριση σε μιτογόνα ερεθίσματα η IKKα επάγει την έκφραση της κυκλίνης D1 μέσω της ενίσχυσης της σηματοδότησης της β-κατενίνης (113), ενώ αντίθετα με την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου η IKKα μπορεί να φωσφορυλιώσει άμεσα την κυκλίνη D1 μειώνοντας τα επίπεδά της και μεταβάλλοντας τον υποκυτταρικό εντοπισμό της από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα (122). Στα κερατινοκύτταρα, η IKKα συμμετέχει στην ενεργοποίηση του σημείου ελέγχου G<sub>2</sub>/M του κυτταρικού κύκλου υπό την επίδραση βλαβών στο DNA και την προστασία του κυττάρου από την εισαγωγή λαθών στο γονιδίωμα. Συγκεκριμένα, η IKKα, ανεξάρτητα από τη δράση της ως κινάση, προάγει την έκφραση του παράγοντα 14-3-3σ που αποτελεί κύριο ρυθμιστή του σημείου ελέγχου, καθώς προσδένεται στην ιστόνη H3 παρεμποδίζοντας την πρόσδεση της μεθυλοτρανσφεράσης Suv39h1 και την υπερμεθυλίωση και απενεργοποίηση του γονιδίου της 14-3-3σ (123). Επιπλέον, η IKKα εμπλέκεται στη ρύθμιση της φάσης M του κυτταρικού κύκλου καθώς έχει βρεθεί ότι φωσφορυλιώνει τη μιτωτική κινάση Aurora A (124).

Η κινάση IKKβ μπορεί να αναστέλλει την απόπτωση και ανεξάρτητα από την ενεργοποίηση της κανονικής πορείας. Εκτός από την αρνητική ρύθμιση της p53, η IKKβ φωσφορυλιώνει και αναστέλλει τη δράση του προ-αποπτωτικού παράγοντα FOXO3a προάγοντας την αποδόμησή του (125). Επιπλέον, η IKKβ μπορεί να αναστείλει την TNFα-επαγόμενη απόπτωση μέσω φωσφορυλίωσης και απενεργοποίησης της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης BAD (126). Ωστόσο, υπό την επίδραση οξειδωτικού στρες η IKKβ προάγει το κυτταρικό θάνατο διαμέσου της ενεργοποίησης της κινάσης p83 S6K1 με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της p53 (127). Σε αντίθεση, ευρήματα του εργαστηρίου μας καταδεικνύουν ότι η IKKβ καταστέλλει την H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-διαμεσολαβούμενη απόπτωση ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων λόγω επαγωγής βλαβών στο DNA μέσω της ενεργοποίησης της κανονικής πορείας του NF-κB (128).

Στα μακροφάγα, η IKKβ συμβάλλει στην ενεργοποίηση της πορείας Trp2/MEK/Erk, η οποία σε αντίθεση με την κλασική πορεία Raf/MEK/Erk δεν αποκρίνεται σε μιτογόνα ερεθίσματα αλλά σε ανοσογόνα ερεθίσματα όπως ο LPS. Απουσία ερεθίσματος, η κινάση Trp2 δεσμεύεται από την υπομονάδα p105 της οικογένειας του NF-κB αναστέλλοντας τη σηματοδότηση. Αντίθετα, παρουσία LPS, η IKKβ φωσφορυλιώνει την p105 με αποτέλεσμα την πρωτεολυτική της αποδόμηση, την απελευθέρωση της Trp2, την ενεργοποίηση της

πορείας ERK και τη μεταγραφή προ-φλεγμονωδών γονιδίων (129, 130). Αντίθετα, η IKKβ μπορεί να φωσφορυλιώσει την πρωτεΐνη Dok1, η οποία αναστέλλει την πορεία σηματοδότησης μέσω των κινασών ERK και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (131).

Η IKKβ επίσης, μπορεί να προάγει τη γενωμική σταθερότητα. Ως απόκριση σε βλάβες του DNA, εκτός από την ενεργοποίηση της κανονικής πορείας, η IKKβ μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου φωσφορυλιώνει άμεσα την κινάση ATM προάγοντας την επιδιόρθωση του DNA (132). Η δράση της πυρηνικής IKKβ στην επιδιόρθωση βλαβών στο DNA έχει επιβεβαιωθεί και από άλλες μελέτες (133, 134). Ακόμη, εμπλέκεται στη ρύθμιση της διαδικασίας της μίτωσης αναστέλλοντας τη δράση της μιτωτικής κινάσης Aurora A η οποία ρυθμίζει το σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου. Απώλεια της IKKβ και αυξημένη ενεργότητα της Aurora A έχει σαν αποτέλεσμα το μη φυσιολογικό διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων και την εμφάνιση ανευπλοειδίας (135).

Όλες οι παραπάνω μελέτες έχουν ταυτοποιήσει μια σειρά εναλλακτικών υποστρωμάτων για της κινάσες IKKα και IKKβ ανεξάρτητα από τον κεντρικό τους ρόλο στην ενεργοποίηση του NF-κΒ. Συνολικά, η δράση τους φαίνεται να σχετίζεται με ποικίλες σηματοδοτικές πορείες και να εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το είδος του ερεθίσματος που πυροδοτεί τη δράση τους αλλά και τον κυτταρικό τύπο στον οποίο ενεργοποιούνται.

## **1.6. Ο ρόλος του NF-κΒ στον καρκίνο**

Όπως συζητήθηκε στην Ενότητα 1.1., η μετατροπή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό, μεταστατικό κύτταρο να οφείλεται σε μια πληθώρα παραγόντων και αποτελεί μια πολύπλοκη διαδικασία πολλών σταδίων κατά την οποία το κύτταρο αποκτά διακριτές ικανότητες οι οποίες είναι γνωστές ως «hallmarks of cancer» και αφορούν σχεδόν όλους τους τύπους καρκίνου (Εικόνα 1.1.). Συνοπτικά, οι ικανότητες αυτές περιλαμβάνουν τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό, την αποφυγή της απόπτωσης, την αποφυγή της κυτταρικής γήρανσης, την επαγωγή της αγγειογένεσης και τις ικανότητες της διείσδυσης και της μετάστασης, ενώ τα τελευταία χρόνια έχουν προστεθεί σε αυτά τα χαρακτηριστικά η ικανότητα αποφυγής της ανοσολογικής επιτήρησης αλλά και ο επαναπρογραμματισμός του μεταβολισμού της ενέργειας που είναι γνωστός ως το «φαινόμενο Warburg». Επιπλέον, έχει γίνει σαφές ότι για την απόκτηση κάποιων από αυτών των ικανοτήτων σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν και τα φυσιολογικά κύτταρα που αποτελούν το μικρο-περιβάλλον του όγκου, γεγονός που προσθέτει ένα ακόμη επίπεδο δυσκολίας στη μελέτη της συγκεκριμένης νόσου και τονίζει το γεγονός πως για την καλύτερη κατανόηση της βιολογίας του καρκίνου δεν επαρκεί η μελέτη των καρκινικών κυττάρων και μόνο (1).



Όπως θα συζητηθεί στη συνέχεια ο NF-κB συμβάλλει στη ρύθμιση σηματοδοτικών πορειών που εμπλέκονται σε όλες αυτές τις μοριακές διαδικασίες, γεγονός που τον καθιστά ένα σημαντικό μεταγραφικό παράγοντα για τη μελέτη της δημιουργίας και εξέλιξης του καρκίνου.

### 1.6.1. Ενεργοποίηση του NF-κB στον καρκίνο

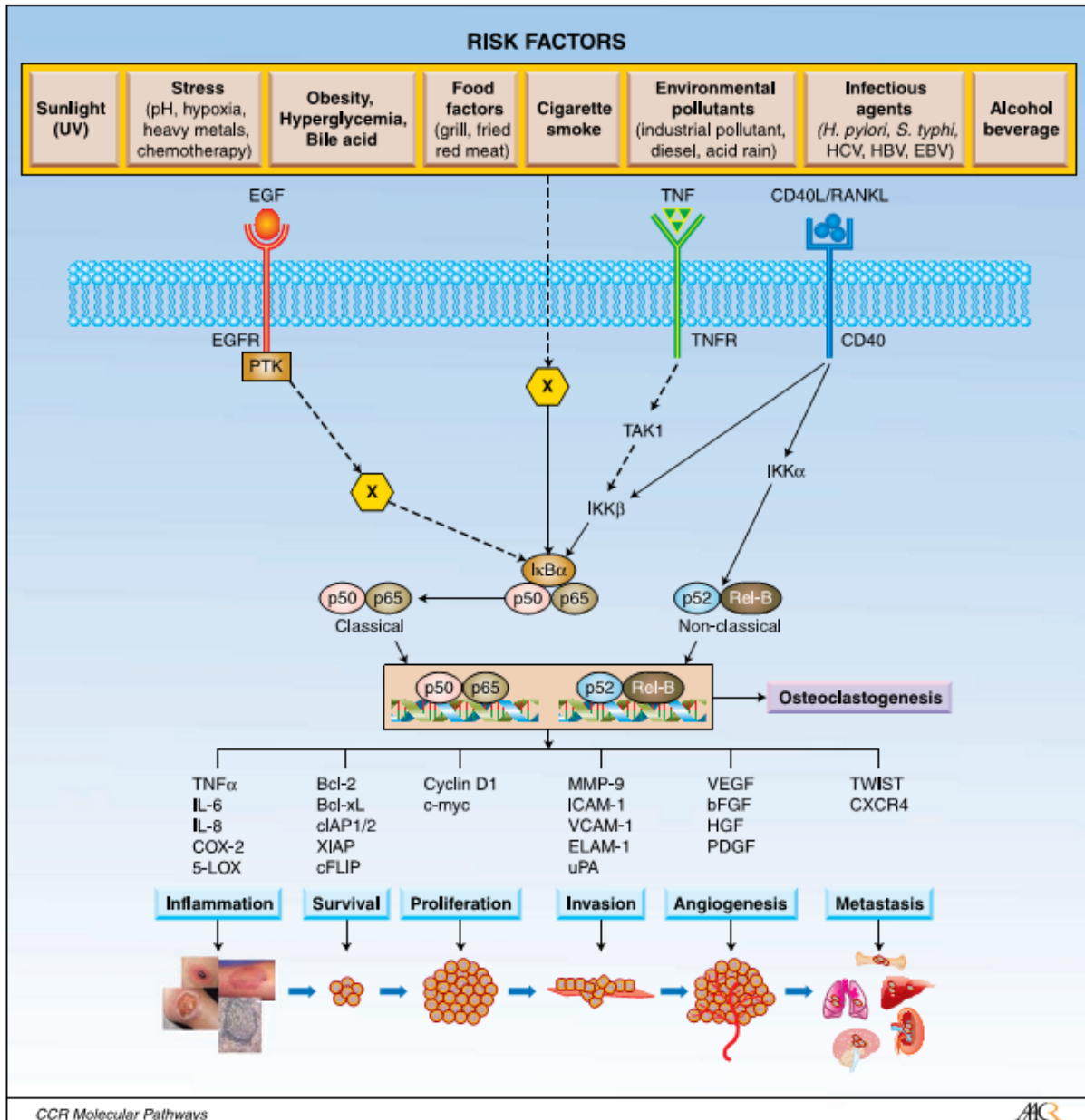
Όπως περιγράφεται στην Ενότητα 1.4, υπό φυσιολογικές συνθήκες η ενεργότητα του NF-κB υπόκειται σε αυστηρό έλεγχο καθώς παράλληλα με την ενεργοποίησή ενεργοποιούνται και βρόγχοι αρνητικής ανατροφοδότησης (negative feedback loops) που αποτρέπουν την παρατεταμένη δράση του. Ωστόσο, στον καρκίνο η πορείες αυτές απορρυθμίζονται και συχνά ο NF-κB εντοπίζεται ιδιοστατικά ενεργός. Αυξημένη ενεργότητα του NF-κB έχει παρατηρηθεί σε πολλούς τύπους καρκίνου συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του πνεύμονα (52-54, 136-138), του παχέος εντέρου (139), του προστάτη (140), του στομάχου (141), του παγκρέατος (142), του μαστού (143, 144), στο μελάνωμα (145) αλλά και σε αρκετούς τύπους λευχαιμίας (146, 147) και λεμφώματος (148).

Πολλοί καρκινογόνοι παράγοντες μεταξύ των οποίων ο καπνός, η ηλικιακή και υπεριώδης ακτινοβολία μπορεί να οδηγήσουν στην ενεργοποίηση του NF-κB, αλλά και ιοί όπως ο HIV και οι ιοί της ηπατίτιδας B και C (149) (Εικόνα 1.7.). Τα υψηλά επίπεδα σηματοδότησης διαμέσου του NF-κB είναι συχνά αποτέλεσμα γονιδιακών μεταλλάξεων. Πολλά ογκογονίδια δρουν μέσω της ενεργοποίησης του NF-κB, όπως για παράδειγμα τα γονίδια που κωδικοποιούν για τα μέλη της οικογένειας Ras (*KRAS*, *NRAS*, *HRAS*). Επιπλέον, αυξητικοί παράγοντες όπως ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (Epidermal Growth Factor; EGF) ο οποίος σχετίζεται με ένα μεγάλο εύρος καρκινικών τύπων, επίσης ενεργοποιούν τον NF-κB, ενώ αυξημένη ενεργότητα παρατηρείται και κατά την απώλεια ογκοκατασταλτικών γονιδίων όπως τα γονίδια *PTEN* και *TP53*. Ωστόσο, μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τις υπομονάδες του NF-κB, όπως τις υπομονάδες p100/p52, RelA, c-Rel αλλά και την πρωτεΐνη Bcl-3 αφορούν κυρίως τα λεμφώματα και τις λευχαιμίες, ενώ σπάνια παρατηρούνται στους επιθηλιακούς τύπους καρκίνου (49, 59, 150, 151).

Η φλεγμονή αποτελεί μέρος της ανοσολογικής απόκρισης ενάντια σε ιικές και βακτηριακές μολύνσεις, προάγει την επουλώση πληγών και συμβάλλει στη διατήρηση της ομοιόστασης του ιστού. Η οξεία φλεγμονή σχετίζεται με την έμφυτη ανοσία, έχει μικρή διάρκεια και βοηθά τον οργανισμό να καταπολεμήσει τους παθογόνους παράγοντες. Ωστόσο, η επίμονη ή αλλιώς χρόνια φλεγμονή είναι πλέον γνωστό ότι σχετίζεται με χρόνιες παθήσεις συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου (149). Κεντρικό ρόλο στις φλεγμονώδεις αποκρίσεις διαδραματίζει μεταξύ άλλων και ο NF-κB ο οποίος αποτελεί σημαντικό κρίκο μεταξύ της φλεγμονώδους αντίδρασης και της

καρκινογένεσης, όπως έχει δειχθεί σε *in vivo* μοντέλα καρκίνου του πνεύμονα, του παχέος εντέρου και του ήπατος (46, 48, 52, 56, 152). Στα μυελοειδή κύτταρα (ανοσοκύτταρα) τα οποία στρατολογούνται στο σημείο της φλεγμονής η αυξημένη ενεργότητα του NF-κΒ έχει σαν αποτέλεσμα τη συνεχή παραγωγή και έκκριση κυτταροκινών οι οποίες προάγουν την ανάπτυξη των παρακείμενων καρκινικών κυττάρων (152). Από την άλλη, αυτή η αυξημένη έκκριση κυτταροκινών από τα μυελοειδή κύτταρα, όπως του TNFα, έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του NF-κΒ στα παρακείμενα επιθηλιακά κύτταρα του ιστού, στα οποία επάγει τη μεταγραφή αντιαιματοποιητικών γονιδίων προάγοντας την καρκινογένεση (152-154). Επομένως, η δράση του NF-κΒ σχετίζεται άμεσα με τον τύπο κυττάρου στο οποίο εκφράζεται. Στην περιοχή του όγκου στρατολογείται μεγάλος αριθμός μακροφάγων κυττάρων τα οποία ονομάζονται ογκο-συσχετιζόμενα μακροφάγα (Tumor-Associated macrophages; TAMs). Τα μακροφάγα μπορεί να εμφανίζουν δύο κύριους φαινοτύπους. Τα κλασικής ενεργοποίησης μακροφάγα (M1) παράγουν μεγάλες ποσότητες προφλεγμονοδών κιτοκινών και μορίων MHC (Major Histocompatibility Complex) και προάγουν τη φαγοκυττάρωση των καρκινικών κυττάρων, ενώ αντίθετα, τα εναλλακτικής ενεργοποίησης μακροφάγα (M2) προάγουν την αποκατάσταση του εξωκυττάρου χώρου και την επούλωση, έχουν χαμηλή ικανότητα φαγοκυττάρωσης, παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη δράση (έκκριση IL-10) και προάγουν την αγγειογένεση (155). Ο NF-κΒ έχει δειχθεί ότι προάγει τη διατήρηση του φαινοτύπου M2, ενώ αναστολή της δράσης του έχει σαν αποτέλεσμα τη μετατροπή του φαινοτύπου M2 σε M1 ενισχύοντας την αντικαρκινική δράση των TAM (156, 157).

Παραδόξως, ο NF-κΒ επάγεται και από πολλούς χημειοθεραπευτικούς παράγοντες αλλά και την ακτινοβολία που χρησιμοποιούνται ως μέσο θεραπείας επηρεάζοντας σε μεγάλο βαθμό την πορεία και εξέλιξη της νόσου. Αρκετές μελέτες έχουν συνδέσει τις σηματοδοτικές πορείες αποκρίσεων σε βλάβες στο DNA με την ενεργοποίηση του NF-κΒ και τη φλεγμονή μέσω της άτυπης πορείας που ενεργοποιείται από βλάβες στο DNA (41-43, 133), που οδηγούν στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου και στην επιδιόρθωση και διατήρηση της σταθερότητας του γονιδιώματος (132, 134, 158). Η αυξημένη ενεργότητα του NF-κΒ αποτελεί κακό δείκτη πρόγνωσης και σχετίζεται με αυξημένη ανθεκτικότητα των ασθενών στη θεραπεία (159). *In vitro* αλλά και *in vivo* μελέτες έχουν δείξει ότι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες σε συνδυασμό με την αναστολή της ενεργοποίησης του NF-κΒ είχαν σαν αποτέλεσμα τη μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την αυξημένη απόπτωση μεταξύ άλλων στον καρκίνο του μαστού (160), του πνεύμονα (161) το πολλαπλό μέλωμα (162) και το μελάνωμα (163). Ωστόσο, δεδομένου του κεντρικού ρόλου του NF-κΒ στην ανοσολογική απόκριση η στοχευμένη ρύθμιση της ενεργότητας του NF-κΒ μόνο στα κύτταρα του όγκου είναι ζωτικής σημασίας.



**Εικόνα 1.7. Η ενεργοποίηση και ο ρόλος του NF-κΒ στον καρκίνο.** Η ενεργοποίηση του NF-κΒ οφείλεται σε πληθώρα ερεθισμάτων μεταξύ άλλων, στο στρες, την ακτινοβολία, χημικές καρκινογόνες ουσίες, μολυσματικούς παράγοντες αλλά και κακές διατροφικές συνήθειες. Η ενεργοποίηση του NF-κΒ στον καρκίνο έχει συσχετιστεί με την πρόκληση της φλεγμονής αλλά και με τη ρύθμιση πληθώρας γονιδίων στόχων που συμβάλλουν στην κυτταρική επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό, την κυτταρική διείσδυση, την αγγειογένεση αλλά και τη μετάσταση (149)

### **1.6.2. Ο ρόλος του NF-κB στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην καταστολή της απόπτωσης**

Η αυξημένη ικανότητα πολλαπλασιασμού και η αποφυγή της απόπτωσης αποτελούν βασικά χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων. Ο NF-κB μπορεί να προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό επάγοντας την έκφραση γονιδίων που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο όπως τα γονίδια της κυκλίνης D1 (164, 165) και του c-Myc (166). Ο NF-κB συμβάλλει σημαντικά και στην αποφυγή της απόπτωσης διαμέσου διαφόρων μηχανισμών αλλά κυρίως μέσω της ενεργοποίησης αντι-αποπτωτικών γονιδίων όπως αυτά που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες Bcl-XL, Bcl-2, c-IAP, XIAP, TRAF-2 και c-FLIP, οι οποίες προάγουν την επιβίωση και μειώνουν την ευαισθησία των κυττάρων στην απόπτωση που επάγεται μεταξύ άλλων από τους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες (152, 153, 167, 168). Εκτός από την άμεση μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων ο NF-κB ρυθμίζει τις διαδικασίες του πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης διαμέσου της ρύθμισης άλλων μεταγραφικών παραγόντων όπως η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53. Η ενεργοποίηση της πορείας IKKβ/p65 προάγει τη σταθεροποίηση της Mdm2, αναστολέα της p53, μειώνοντας έτσι σημαντικά την p53-επαγόμενη απόπτωση (117, 118). Ένας άλλος μηχανισμός αρνητικής ρύθμισης της p53 αποτελεί ο «ανταγωνισμός» των δύο μεταγραφικών παραγόντων για την πρόσδεση με τον συν-ενεργοποιητή CBP/p300. Δέσμευση του παράγοντα από την υπομονάδα p65 έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της ενεργότητας της p53 (169). Μέσω του ίδιου μηχανισμού ο NF-κB ρυθμίζει αρνητικά τη μεταγραφική ενεργοποίηση του PTEN, ενός καταστολέα της πορείας PI3K/Akt που προάγει την επιβίωση των κυττάρων (170).

### **1.6.3. Ο ρόλος του NF-κB στην αγγειογένεση και τη μετάσταση**

Η διαφορά που χαρακτηρίζει ένα κακόηθες νεόπλασμα από ένα καλόηθες είναι η ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να διηθούν τους παρακείμενους ιστούς αλλά και να εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος μέσω της οποίας μεταφέρονται σε απομακρυσμένους ιστούς όπου αναπτύσσουν νέους όγκους, διαδικασία που ονομάζεται μετάσταση. Τα κακοήθη νεοπλασμάτα χαρακτηρίζονται επίσης από εκτεταμένη αγγειογένεση, διαδικασία που επάγεται από το υποξικό περιβάλλον του όγκου, και περιλαμβάνει το σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων απαραίτητων για την κάλυψη των αναγκών των καρκινικών κυττάρων σε θρεπτικά συστατικά και οξυγόνο. Ο NF-κB ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στις ανωτέρω διαδικασίες, προάγοντας την αγγειογένεση, τη διήθηση αλλά και τη μετάσταση των κυττάρων σε διαφόρους τύπους καρκίνου.

Έναν από τους κύριους ρυθμιστές της αγγειογένεσης αποτελεί ο VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), η δράση του οποίου έχει δειχθεί ότι ρυθμίζεται θετικά από τον NF-κB μεταξύ άλλων στον καρκίνο των ωοθηκών (171, 172), του παχέος εντέρου (173, 174), του μαστού (175) και στο γλοιοβλάστωμα (176). Άλλοι ρυθμιστές της αγγειογένεσης οι οποίοι ρυθμίζονται από τον NF-κB αποτελούν μεταγραφικοί παράγοντες και κυτταροκίνες όπως ο bFGF (basic Fibroblast-like Growth Factor), η αγγειοποιητίνη 2 (Ang2), η ιντερλευκίνη-8 (IL-8) και η ιντερλευκίνη-1β (IL-1β) αλλά και ο TGFβ (Transforming Growth Factor beta), η δράση των οποίων προάγει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Επιπλέον, την έκφραση πολλών από αυτούς τους αυξητικούς παράγοντες ρυθμίζει και ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1α (Hypoxia-Inducible factor) προάγοντας την αγγειογένεση σε συνθήκες υποξίας, ο οποίος αποτελεί επίσης μεταγραφικό στόχο του NF-κB (177-179).

Μια διαδικασία η οποία αποτελεί πρώιμο στάδιο της μετάστασης είναι η επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετατροπή (Epithelial to Mesenchymal Transition, EMT), κατά την οποία τα επιθηλιακά κύτταρα αποκτούν μεσεγχυματικό φαινότυπο. Κεντρικοί ρυθμιστές της EMT αποτελούν μεταξύ άλλων οι παράγοντες Twist1, Snail και Slug, η έκφραση των οποίων ρυθμίζεται από τον NF-κB (3, 180-182). Ο NF-κB έχει δειχθεί ότι προάγει την EMT και τη μετάσταση μεταξύ άλλων στον καρκίνο του μαστού (181, 183, 184), του πνεύμονα (185) και του παχέος εντέρου (186, 187). Για την μετάσταση των κυττάρων απαιτείται επίσης η έκφραση διαφόρων μορίων προσκόλλησης συμπεριλαμβανομένων των ICAM-1, VCAM-1 και ELAM-1, αλλά και μορίων που προάγουν τη διηθητική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων, όπως οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (Matrix Metalloproteinases, MMPs), το uPA (urokinase type of Plasminogen Activator), η ηπαράνη, και η IL-8, η έκφραση των οποίων ρυθμίζεται από τον NF-κB (188-190). Ακόμη, ο NF-κB συμβάλλει στη μεταγραφική ρύθμιση χημειοκινών, όπως η CXCL1, αλλά και σε υποδοχείς χημειοκινών, όπως οι υποδοχείς CXCR4 και CCR7, που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην κινητικότητα, την εγκατάσταση και την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων στο νέο ιστό (191-193).

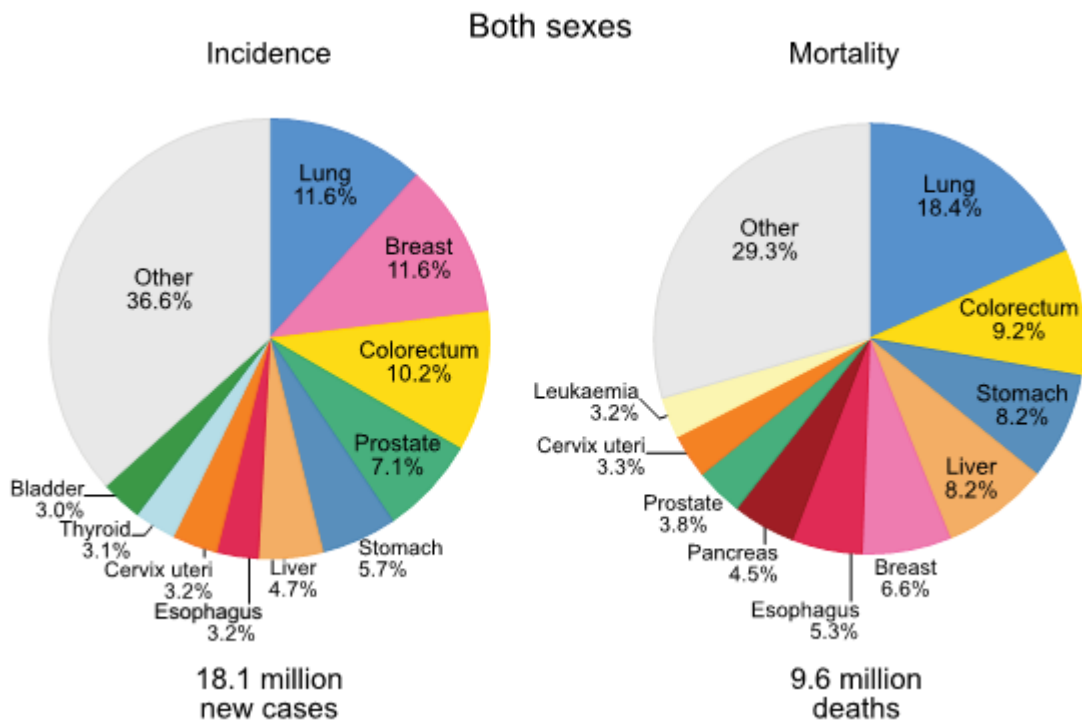
Συνολικά, η δράση του NF-κB επηρεάζει μια ποικιλία μοριακών διαδικασιών οι οποίες απαιτούνται για τη δημιουργία και την ανάπτυξη ενός όγκου. Στα αρχικά στάδια ο ρόλος του NF-κB είναι σημαντικός για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, ενώ σε μετέπειτα στάδια προάγει την ικανότητα των κυττάρων να διηθούν παρακείμενους αλλά και απομακρισμένους ιστούς. Επίσης συμβάλλει σημαντικά στην ανθεκτικότητα των κυττάρων στην ακτινο- και χημειοθεραπεία.

## 1.7. Ο ρόλος του NF-κB στον καρκίνο του πνεύμονα

### 1.7.1. Ο καρκίνος του πνεύμονα

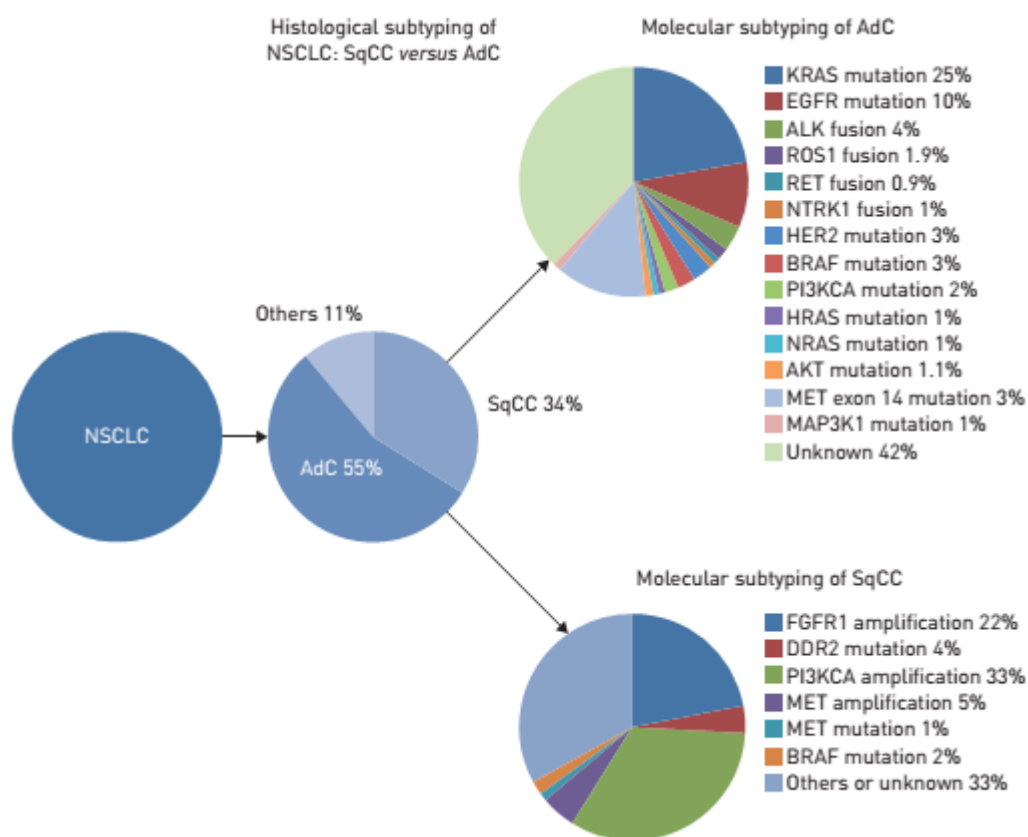
Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί την πρώτη αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως (194) (Εικόνα 1.8.). Κύριο αίτιο αποτελεί το κάπνισμα (80-90% των περιπτώσεων) και σε μικρότερο ποσοστό η έκθεση σε βλαβερές ουσίες όπως ο αμίαντος και το ραδόνιο. Η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια έχει επίσης συσχετιστεί με την εμφάνιση του καρκίνου του πνεύμονα, ενώ σημαντικό ρόλο παίζει και η κληρονομικότητα. Το γεγονός ότι τα αρχικά στάδια της νόσου συνήθως δεν εμφανίζουν συμπτώματα και η διάγνωση συχνά γίνεται σε αρκετά προχωρημένο στάδιο σε συνδυασμό με τη μεγάλη ετερογένεια της νόσου και την υψηλή ανθεκτικότητα στη θεραπεία έχει σαν αποτέλεσμα το ποσοστό πενταετούς επιβίωσης των ασθενών να βρίσκεται μόλις στο 15%. Επομένως, η ανάγκη για την ταχύτερη διάγνωση και αποτελεσματικότερη θεραπεία είναι επιτακτική και αυτό θα μπορούσε να επιτευχθεί με την καλύτερη κατανόηση των μοριακών διαδικασιών που διέπουν τη νόσο.

Κλινικά, ο καρκίνος του πνεύμονα διακρίνεται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, το μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (Non-Small Cell Lung Cancer; NSCLC) και το μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (Small Cell Lung Cancer; SCLC) που αντιπροσωπεύουν περίπου το 85% και 15% όλων των περιπτώσεων συνολικά. Ιστολογικά, ο NSCLC χωρίζεται σε δύο κύριους υποτύπους που αποτελούν το αδenoκαρκίνωμα (Lung Adenocarcinoma; LUAD, ~55%) και το καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων (Lung Squamous Cell Carcinoma; LUSC, ~35%), ενώ σε μικρότερο ποσοστό παρατηρείται και το καρκίνωμα των μεγαλοκυττάρων (Large Cell Carcinoma; LCC, ~10%) (195, 196) (Εικόνα 1.9.).



**Εικόνα 1.8. Εκτιμώμενη συχνότητα εμφάνισης και θνησιμότητα για τους κύριους τύπους καρκίνου το 2018.** Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί τη συχνότερη μορφή καρκίνου και αποτελεί κύρια αιτία θνησιμότητας από καρκίνο και στα δύο φύλα παγκοσμίως (194).

Η σταδιακή ανάπτυξη των αδενοκαρκινωμάτων, στα οποία και θα εστιάσουμε στην παρούσα μελέτη, οφείλεται στη συσσώρευση επιγενετικών και γενετικών μεταβολών. Με μεγαλύτερη συχνότητα παρατηρούνται αμοιβαία αποκλειόμενες μεταλλάξεις στα ογκογονίδια *KRAS* (~30%) και *EGFR* (10-15%), ενώ στο ~50% των περιπτώσεων παρατηρείται μετάλλαξη και απώλεια λειτουργίας στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο *TP53* (195, 197-201). Σε μικρότερο ποσοστό ακολουθούν μεταλλάξεις μεταξύ άλλων στα γονίδια *BRAF*, *ERBB2*, *MET*, *FGFR1* και *FGFR2* (Fibroblast Growth Factor Receptor). Ακόμη, παρατηρούνται χρωμοσωμικές μετατοπίσεις στα γονίδια *ALK* (Anaplastic Lymphoma Kinase) και *ROS1* (Receptor Tyrosine Kinase) ενώ σε ένα μεγάλο ποσοστό των περιπτώσεων οι αρχικές μεταλλάξεις δεν είναι γνωστές. Μεταλλάξεις παρατηρούνται και σε ογκοκατασταλτικά γονίδια, εκτός του *TP53*, όπως *LKB1* (*STK11*), *NF1* and *PTEN* (195, 196, 198, 199, 202, 203) (Εικόνα 1.8).



**Εικόνα 1.9. Υπότυποι και μεταλλάξεις του μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα.** Παρουσιάζονται οι δύο κύριοι υπότυποι του NSCLC που αποτελούν το αδενοκαρκίνωμα (AdC) και το καρκίνωμα των πλακωδών κυττάρων (SqCC) καθώς και οι κύριες γονιδιακές μεταλλάξεις που παρατηρούνται συχνότερα στους δύο υποτύπους (204)

Σε αντίθεση με το ADC, τα δεδομένα για το SCC είναι λιγότερα και σε αυτό τον τύπο καρκίνου πιο συχνά παρατηρούνται μεταλλάξεις στα γονίδια *TP53*, *MLL2*, *PIK3CA*, *CDKN2A*, *KEAP1*, *PTEN* και *RB1*, αλλά και στα γονίδια *DDR2* (discoidin domain-containing receptor 2) και *FGFR1-3* (205).

Μελέτες αλληλούχισης νέας γενιάς (Next Generation Sequencing; NGS) έχουν αποκαλύψει την πολυπλοκότητα των σωματικών μεταλλάξεων που παρατηρούνται στο NSCLC και περιλαμβάνουν επιπλέον μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν μόρια επιγενετικής τροποποίησης, παράγοντες ματίσματος, μεταγραφικούς παράγοντες αλλά και μόρια που συμμετέχουν στην κυτταρική ανοσία (196, 202).



### 1.7.2. Πειραματικά μοντέλα μυών στον καρκίνο του πνεύμονα

Οι αυθόρμητοι όγκοι που παρατηρούνται στους πνεύμονες μυών προσομοιάζουν μορφολογικά, ιστοπαθολογικά αλλά και σε μοριακό επίπεδο το ανθρώπινο αδenoκαρκίνωμα. Επομένως, τα μοντέλα μυών αποτελούν ένα πολύτιμο εργαλείο για τη μελέτη της καρκινογένεσης στον πνεύμονα, την απόκριση στη θεραπεία αλλά και την ταυτοποίηση βιοδεικτών με σκοπό την έγκαιρη διάγνωση της νόσου. Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί διάφορα πειραματικά μοντέλα μυός για τη μελέτη του καρκίνου του πνεύμονα και περιλαμβάνουν μοντέλα τα οποία αναπτύσσουν αυθόρμητα όγκους στον πνεύμονα, μοντέλα στα οποία οι όγκοι επάγονται μέσω της χορήγησης κάποιας καρκινογόνου ουσίας αλλά και διαγονιδιακά μοντέλα (206-208).

Η ευαισθησία και η συχνότητα τυχαίας εμφάνισης όγκων στον πνεύμονα διαφέρει μεταξύ των διάφορων στελεχών μυών. Στελέχη τα οποία παρουσιάζουν μεγάλη πιθανότητα εμφάνισης τυχαίων όγκων αποκρίνονται πολύ καλά στην ανάπτυξη όγκων που επάγεται από χημικούς παράγοντες. Τα στελέχη A/J και SWR ανήκουν στα πιο ευαίσθητα στελέχη ενώ άλλα στελέχη κυμαίνονται από ενδιάμεση ανθεκτικότητα (O20 και BALB/c), μεγάλη ανθεκτικότητα (CBA και C3H) έως και σχεδόν πλήρη ανθεκτικότητα (C57BL/6 και DBA) στην εμφάνιση όγκων (208, 209). Η επαγωγή όγκων με τη χρήση χημικών καρκινογόνων αποτελεί κλασική μέθοδο η οποία σχεδόν πάντα έχει σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη αδενώματος και αδenoκαρκινώματος στον πνεύμονα. Από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα χημικά καρκινογόνα για την ογκογένεση στον πνεύμονα είναι ο καπνός και ο καρβαμικός αιθυλεστερας ή πιο συχνά αναφερόμενος ως ουρεθάνιο (ή ουρεθάνη). Μετά τη χορήγηση του καρκινογόνου παράγοντα αρχικά παρατηρούνται πολλαπλές υπερπλαστικές εστίες (hyperplastic foci) στα βρογχιόλια και τις κυψελίδες, πολλές από τις οποίες αναπτύσσονται σε αδένωμα και τελικά μετά από κάποιους μήνες σε αδenoκαρκίνωμα. (206-209).

Για την αποφυγή της τυχαίας μεταλλαξιγένεσης ιδιαίτερα διαδεδομένη είναι και η χρήση των διαγονιδιακών μοντέλων μυών στα οποία η έκφραση ενός συγκεκριμένου ογκογονιδίου καθιστά δυνατή τη μελέτη του ρόλου του στην ογκογένεση και ανάπτυξη του καρκίνου του πνεύμονα. Το *KRAS* αποτελεί το κύριο ογκογονίδιο σε ένα μεγάλο ποσοστό περιπτώσεων NSCLC ωστόσο, σε αντίθεση με τον EGFR, η θεραπευτική στόχευσή του μέχρι σήμερα δεν έχει καταστεί δυνατή (210-212) με αποτέλεσμα τα διαγονιδιακά μοντέλα *KRAS* να αποτελούν τα πιο συχνά μοντέλα μελέτης της καρκινογένεσης στον πνεύμονα. Το πρωτο-ογκογονίδιο *KRAS* κωδικοποιεί μια GTPάση η οποία ενεργοποιεί σηματοδοτικές πορείες που προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση, όπως η πορεία των MAP κινασών, Ras/Raf/MAPK(ERK), και η πορεία PI3K/Akt. Η υδρόλυση του GTP σε

GDP αναστέλλει τη σηματοδότηση μέσω των πρωτεϊνών Ras, ωστόσο ογκογόνες μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο παρεμποδίζουν την υδρόλυση του GTP με αποτέλεσμα την ιδιοστατική ενεργοποίηση και σηματοδότηση διαμέσου των πρωτεϊνών Ras. Οι περισσότερες σημειακές μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο αφορούν μετατροπές G→T και εντοπίζονται συχνότερα στο κωδικόνιο 12, ενώ ακολουθούν μεταλλάξεις στα κωδικόνια 13 και 61 (213).

Διάφορα μοντέλα έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της *KRAS*-επαγόμενης ογκογένεσης του πνεύμονα. Το αρχικό διαγονιδιακό μοντέλο υπερέκφρασης του γονιδίου Ras σε όλα τα κύτταρα ενός ιστού ακολούθησε το μοντέλο *Kras*<sup>LA2</sup>, στο οποίο το ενδογενές αλληλόμορφο του *Kras* έχει αντικατασταθεί από ένα αλληλόμορφο που φέρει μια λανθάνουσα μετάλλαξη. Η ενεργοποίηση του μεταλλαγμένου γονιδίου συμβαίνει τυχαία σε οποιονδήποτε ιστό κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του ποντικού προσομοιάζοντας την ενεργοποίηση του μεταλλαγμένου Ras στον άνθρωπο. Τα ζώα αυτά αναπτύσσουν όγκους στον πνεύμονα οι οποίοι εξελίσσονται από υπερπλαστικές αλλοιώσεις σε κυψελιδικά αδενώματα και τέλος αδenoκαρκινώματα τα οποία προσομοιάζουν σε μεγάλο βαθμό τα ανθρώπινα αδenoκαρκινώματα πνεύμονα (207, 214). Σε ένα άλλο μοντέλο, το *Kras*<sup>LSL</sup>, η έκφραση του μεταλλαγμένου *Kras* μπορεί να επαχθεί στον πνεύμονα οποιαδήποτε στιγμή κατά την ανάπτυξη του ποντικού με τη χορήγηση ενός ανασυνδυασμένου ιού που παράγει τη ρεκομπινάση Cre. Σε αυτό το μοντέλο πριν από το μεταλλαγμένο γονίδιο *Kras* βρίσκεται μια αλληλουχία τερματισμού της μεταγραφής ενδιάμεσα από δύο αλληλουχίες LoxP. Η χορήγηση του ιού έχει σαν αποτέλεσμα την αναγνώριση των στοιχείων LoxP από τη ρεκομπινάση Cre η οποία και αποκόπτει το στοιχείο τερματισμού, με αποτέλεσμα την έκφραση του μεταλλαγμένου γονιδίου (215). Σε ένα άλλο μοντέλο, η έκφραση του μεταλλαγμένου K-Ras μπορεί να είναι επαγωγίμη και αναστρέψιμη. Σε αυτό το μοντέλο, χρησιμοποιείται το σύστημα tet-on στο οποίο το διαγονίδιο βρίσκεται υπό τον έλεγχο ενός υποκινητή που απαιτεί για την επαγωγή του την ταυτόχρονη παρουσία μιας τετρακυκλίνης (π.χ. δοξοκυκλίνης; Dox) και την πρωτεΐνη rtTA (reverse tetracycline transactivator protein). Οι μύες αυτοί διασταυρώνονται με ένα δεύτερο διαγονιδιακό μοντέλο στο οποίο η έκφραση της πρωτεΐνης rtTA βρίσκεται υπό τον έλεγχο ενός υποκινητή ειδικό για ένα συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο, όπως για παράδειγμα τα κύτταρα των αεραγωγών Clara ή τα πνευμονοκύτταρα τύπου II (Alveolar Type II; AT II) τα οποία θεωρούνται τα κύτταρα προέλευσης του αδenoκαρκινώματος (216, 217). Επομένως, τα ζώα που προκύπτουν θα εκφράζουν το μεταλλαγμένο *KRAS* μόνο υπό την παρουσία τετρακυκλίνης και μόνο στον επιθυμητό τύπο κυττάρων (218).

Δεδομένου ότι τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από μια πληθώρα μεταλλάξεων, η χρήση αυτών των μοντέλων με την ταυτόχρονη γενετική τροποποίηση και άλλων γονιδίων έχουν βοηθήσει να κατανοήσουμε το ρόλο διαφόρων πορειών στην ογκογένεση του πνεύμονα. Έχουν περιγραφεί πολλά μοντέλα στα οποία η υπερέκφραση του *KRAS* παράλληλα συνοδεύεται και από μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια όπως το *TP53* και το *CDKN2A*. Επίσης βασισμένα στις ίδιες μοριακές τεχνικές έχουν κατασκευαστεί διαγονιδιακά μοντέλα με μεταλλάξεις στα γονίδια *EGFR* και *PIK3CA*, αλλά και χρωμοσωμικές μετατοπίσεις στα γονίδια *EML4-ALK* και *ROS1* (206, 207). Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι τα μοντέλα αυτά ενέχουν και κάποιους περιορισμούς. Ένα μεγάλο μειονέκτημα των διαγονιδιακών μοντέλων αποτελεί η μικρή γενετική πολυπλοκότητα και ο μικρός αριθμός μεταλλάξεων σε σύγκριση με τον ανθρώπινο καρκίνο, γεγονός αναμενόμενο αν αναλογιστεί κανείς ότι ο μέσος όρος ζωής των μυών είναι τα δύο χρόνια ενώ ο καρκίνος στον άνθρωπο αναπτύσσεται σε δεκαετίες. Επιπλέον, στα μοντέλα αυτά δεν παρατηρούνται συχνές μεταστάσεις σε αντίθεση με την υψηλή μεταστατικότητα του καρκίνου του πνεύμονα στον άνθρωπο. Μια ακόμη διαφορά αποτελεί η συνήθης ύπαρξη παράλληλων παθήσεων καθώς σε μεγάλο ποσοστό ο καρκίνος στον άνθρωπο εμφανίζεται σε προχωρημένη ηλικία, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει την απόκριση στη θεραπεία. Παρά τα όποια μειονεκτήματα, αναμφίβολα τα μοντέλα αυτά αποτελούν πολύτιμα εργαλεία για τη μελέτη της κυτταρικής προέλευσης και της σταδιακής εξέλιξης του καρκίνου του πνεύμονα, της εξάρτησης από τα ογκογονίδια, της απόκρισης στη θεραπεία, αλλά και την ταυτοποίηση νέων βιοδεικτών (206, 207).

### **1.7.3. Ο ρόλος των πορειών IKKβ-RelA/p65 και IKKα-p52 στον καρκίνο του πνεύμονα**

Όπως συζητήθηκε στην Ενότητα 1.6.1, ο NF-κB συχνά εμφανίζεται ιδιόστατικά ενεργός σε διάφορους τύπους καρκίνου συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του πνεύμονα. Δείγματα από ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα εμφανίζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης του NF-κB τόσο στο SCLC όσο και στο NSCLC γεγονός που σχετίζεται σημαντικά με την εξέλιξη της νόσου και αποτελεί δείκτη κακής πρόγνωσης (136-138, 219-221). Όπως θα συζητηθεί, στον καρκίνο του πνεύμονα ο NF-κB έχει συσχετιστεί με την κυτταρική επιβίωση, την αγγειογένεση, τη μετάσταση αλλά και τη φλεγμονή. Επιπλέον, μοριακές μελέτες έχουν δείξει ότι η στόχευση του NF-κB αναστέλλει την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων αλλά και την ανάπτυξη των όγκων σε ζωικά μοντέλα και επομένως θα μπορούσε να αποτελέσει πιθανό στόχο θεραπευτικής προσέγγισης (52, 53, 222-224).

Η δράση ογκογονιδίων έχει συσχετιστεί άμεσα με την ενεργοποίηση του NF-κΒ στον καρκίνο του πνεύμονα. Το ογκογονίδιο *KRAS*, το οποίο βρίσκεται μεταλλαγμένο σε μεγάλο ποσοστό των περιπτώσεων NSCLC, έχει δειχθεί ότι προάγει την καρκινογένεση του πνεύμονα μέσω της ενεργοποίησης του NF-κΒ τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Μελέτες με διαγονιδιακούς μύες αλλά και κυτταρικές σειρές έχουν δείξει την εξάρτηση της K-Ras-επαγόμενης ογκογένεσης από την ενεργοποίηση του NF-κΒ ενώ η μείωση της έκφρασης του NF-κΒ στα ίδια μοντέλα συμβάλλει στη σημαντική μείωση των όγκων *in vivo* και ενισχύει την K-Ras-επαγόμενη απόπτωση των κυττάρων *in vitro* (225, 226). Σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζει και η πρωτεΐνη p53 καθώς ταυτόχρονη απώλεια της δράσης της έχει δειχθεί ότι ενισχύει τη δράση του NF-κΒ και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων *in vitro* και *in vivo* (225, 227).

Το K-Ras ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κΒ διαμέσου της ενεργοποίησης της IKKβ ωστόσο ο μοριακός μηχανισμός που συνδέει το Ras με την ενεργοποίηση των IKK δεν είναι πλήρως κατανοητός. Μια μελέτη έχει καταδείξει ως πιθανά σημαντικό κρίκο την πρωτεΐνη p62, δεδομένου ότι η αναστολή της έκφρασής της αναστέλλει την ενεργοποίηση του NF-κΒ και τον K-Ras-επαγόμενο μετασχηματισμό των κυττάρων. Ο μοριακός μηχανισμός περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της έκφρασης της p62 από το K-Ras διαμέσου των πορειών ERK και Akt, η οποία με τη σειρά της προάγει την TRAF6-διαμεσολαβούμενη ενεργοποίηση των IKK (228). Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύει και μια δεύτερη μελέτη στην οποία η πρωτεΐνη TRAF6 φαίνεται να είναι απαραίτητη για την K-Ras-επαγόμενη ογκογένεση διαμέσου της ενεργοποίησης του NF-κΒ τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (229). Και καθοδικά της ενεργοποίησης του NF-κΒ, λίγα είναι γνωστά για τους μοριακούς μηχανισμούς που προάγουν την K-Ras-επαγόμενη ογκογένεση στον πνεύμονα. Μια πρόσφατη έρευνα ταυτοποίησε την Timp-1 (Tissue inhibitor of metalloproteinases-1) η οποία φαίνεται να προάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την ανάπτυξη των όγκων ανεξάρτητα από τη δράση της ως αναστολέας των μεταλλοπρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, η Timp-1 ενεργοποιείται διαμέσου της πορείας K-Ras/Erk/NF-κΒ και με τη σειρά της ενισχύει την ενεργοποίηση της πορείας Erk σχηματίζοντας ένα βρόγχο θετικής ανατροφοδότησης (230). Εκτός από την κλασική πορεία ενεργοποίησης του NF-κΒ διαμέσου της κινάσης IKKβ, το K-Ras έχει δειχθεί ότι μπορεί να επάγει την ενεργοποίηση του NF-κΒ με εναλλακτικούς μηχανισμούς. Μελέτη σάρωσης RNAi σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές αδενοκαρκινώματος ταυτοποίησε την κινάση TBK1, η οποία δρα καθοδικά της πρωτεΐνης Ras και ενεργοποιεί την υπομονάδα c-Rel που με τη σειρά της επάγει την αντιαποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-XL (231).

Σε μεγάλο ποσοστό η εμφάνιση του καρκίνου του πνεύμονα σχετίζεται με την ύπαρξη χρόνιας φλεγμονής. Μελέτες έχουν καταδείξει ότι η ενεργοποίηση του NF-κB προάγει τη δημιουργία φλεγμονής στον πνεύμονα (232-234), γεγονός που ενισχύει σημαντικά την ογκογένεση που επάγεται από διάφορα ερεθίσματα (235, 236). Για παράδειγμα, η χορήγηση ουρεθανίου έχει σαν αποτέλεσμα την ταχεία ενεργοποίηση του NF-κB και τη δημιουργία φλεγμονής, με τον NF-κB να εντοπίζεται ενεργός στα επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα αλλά και τα μακροφάγα. Η αναστολή της ενεργοποίησης του NF-κB στα επιθηλιακά κύτταρα, αποτρέπει τη δημιουργία φλεγμονής έπειτα από τη χορήγηση ουρεθανίου και μειώνει σε πολύ μεγάλο ποσοστό την εμφάνιση όγκων καθώς παρατηρείται αυξημένη απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων και μείωση της έκφρασης της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 (235). Κυριότερο αίτιο της χρόνιας φλεγμονής στον πνεύμονα αποτελεί το κάπνισμα (237-239). Η χορήγηση συστατικών του καπνού σε επιθηλιακά κύτταρα πνεύμονα επάγει βλάβες στο DNA και παύση του κυτταρικού κύκλου, ωστόσο δεν προκαλεί απόπτωση αλλά αντίθετα, προάγει την επιβίωση των κυττάρων και τον αυξημένο πολλαπλασιασμό διαμέσου της ενεργοποίησης του NF-κB και την ακόλουθη έκφραση αντι-αποπτωτικών γονιδίων όπως το Bcl-XL (240), αλλά και γονιδίων που προάγουν τον κυτταρικό κύκλο όπως η κυκλίνη D1 (164). Επιπλέον, *in vivo*, ο καπνός έχει δειχθεί ότι προάγει την ανάπτυξη του όγκου διαμέσου της ενεργοποίησης της πορείας IKKβ, την παραγωγή κυτταροκινών και τη δημιουργία φλεγμονής (241).

Εκτός από τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα, σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση που επάγεται από τη φλεγμονή διαδραματίζουν και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Η ενεργοποίηση του NF-κB στα μυελοειδή κύτταρα και κυρίως στα ογκο-συσχετιζόμενα μακροφάγα (Rumor Associated macrophages; TAMs) συνοδεύεται από αυξημένη έκφραση και έκκριση κυτταροκινών που συμβάλλουν σημαντικά στην ανάπτυξη του όγκου (242). Αναστολή της δράσης του NF-κB στα μυελοειδή κύτταρα έχει σαν αποτέλεσμα τη μειωμένη έκφραση κυτταροκινών και χημειοκινών όπως ο TNFα, οι CCL2 και CCL3 (C-C Motif Chemokine Ligand) και η IL-6, με αποτέλεσμα τη μείωση της διήθησης των φλεγμονοδών κυττάρων και τον περιορισμό της ανάπτυξη του όγκου (225, 241). Σε μια άλλη μελέτη, η χορήγηση ουρεθανίου και η ενεργοποίηση του NF-κB στο αναπνευστικό επιθήλιο ποντικών είχε σαν αποτέλεσμα τη στρατολόγηση μακροφάγων και λεμφοκυττάρων συμπεριλαμβανομένων και ενεργών ρυθμιστικών T λεμφοκυττάρων (regulatory T lymphocytes; Tregs), ο ρόλος των οποίων είναι ο περιορισμός της δράσης των κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων. Παρεμπόδιση της δράσης των κυττάρων Treg είχε σαν αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση σχηματισμού όγκων στα ποντίκια, καταδεικνύοντας το σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει ο NF-κB στη διαμόρφωση του ανοσολογικού περιβάλλοντος στον πνεύμονα και την προαγωγή της ογκογένεσης (243).

Όπως και σε άλλους τύπους καρκίνου έτσι και στον καρκίνο του πνεύμονα, εκτός από την ανάπτυξη του όγκου, ο NF-κΒ συμβάλλει σημαντικά και στις διαδικασίες της αγγειογένεσης και της μετάστασης. Φυσιολογικά, ο NF-κΒ συμβάλλει στην αγγειογένεση του αναπτυσσόμενου πνεύμονα μέσω της ρύθμισης του *VEGFR2* (244), ενώ στον καρκίνο, το γονίδιο *RAS* έχει συσχετιστεί με την επαγωγή της διαδικασίας της αγγειογένεσης διαμέσου πορειών που τελικά οδηγούν στην αύξηση των επιπέδων μεταξύ άλλων του VEGF και της IL-8 (245-247). Μια πρόσφατη μελέτη κατέδειξε ότι ο NF-κΒ συμβάλλει στη αγγειογένεση που επάγεται από μεταλλάξεις στο *KRAS* διαμέσου της ρύθμισης αυτών των γονιδίων. Η στόχευση του NF-κΒ σε κυτταρικές σειρές πνεύμονα μείωσε σημαντικά την έκφραση και έκκριση των VEGF και IL-8, ενώ σε ξενομοσχεύματα *in vivo* είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση του μεγέθους και της αγγείωσης του όγκου (248).

Αναστολή της ενεργότητας του NF-κΒ σε καρκινικές σειρές πνεύμονα μειώνει τη μεταστατική ικανότητα των κυττάρων *in vitro* και *in vivo* (249). Αντίθετα, αυξημένη έκφραση του NF-κΒ στα επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα με τη χρήση ενός αδενοϊού που εκφράζει το p65 έχει δειχθεί ότι προάγει τη δημιουργία φλεγμονής, την ογκογένεση στον πνεύμονα και τη μετάσταση. Σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της μετάστασης, σε αυτό το μοντέλο, φαίνεται να παίζουν τα μακροφάγα τα οποία στρατολογούνται στην περιοχή του όγκου ως αποτέλεσμα της φλεγμονής, ωστόσο ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο προάγουν τη μετάσταση δεν έχει μελετηθεί (250). Σε μια άλλη μελέτη, ο NF-κΒ έχει δειχθεί ότι προάγει τη μετάσταση στον πνεύμονα διαμέσου της αύξησης της έκφρασης της MMP9, του uPA και της ηπαράνωσης και την ταυτόχρονη μείωση των MMP1 και MMP2 και του αναστολέα του PA 2 (190). Επιπλέον, μόρια τα οποία προάγουν τη μετάσταση έχουν δειχθεί ότι δρουν διαμέσου του NF-κΒ και την έκφραση ιντεγκρινών. Σε καρκινικές σειρές πνεύμονα, η χημειοκίνη SDF-1α (stromal-derived factor-1α) δρα διαμέσου του υποδοχέα CXCR4 και ενεργοποιεί την πορεία ERK/NF-κΒ. Ο NF-κΒ με τη σειρά του προάγει την έκφραση των ιντεγκρινών β1 και β3 που αποτελούν διαμεμβρανικούς υποδοχείς αλληλεπίδρασης με μόρια της εξωκυτταρικής θεμέλιας ουσίας και οι οποίες προάγουν τη μεταστατική ικανότητα των κυττάρων (251). Η ίδια ερευνητική ομάδα κατέδειξε ένα παρόμοιο μηχανισμό για τη δράση της κυτταροκίνης CCL5, η οποία σχετίζεται με καταστάσεις χρόνιας φλεγμονής. Η CCL5, προάγει τη μετάσταση μέσω της ενεργοποίησης της πορείας PI3K/Akt και ακολούθως του NF-κΒ, που με τη σειρά του επάγει τη μεταγραφή της ιντεγκρίνης ανβ3 (252). Μια άλλη μελέτη κατέδειξε ότι και η ιντεγκρίνη ανβ3 μπορεί να επάγει την ενεργοποίηση του NF-κΒ διαμέσου της πορείας FAK (Focal Adhesion Kinase)/Akt, υποδηλώνοντας την ύπαρξη ενός θετικού μηχανισμού ανατροφοδότησης μεταξύ του NF-κΒ και της ανβ3 που προάγει τη μεταστατική ικανότητα των κυττάρων τουλάχιστον *in vitro* (253).

Σε αντίθεση με την κανονική πορεία ενεργοποίησης του NF-κΒ, ο ρόλος της μη-κανονικής πορείας στον καρκίνο του πνεύμονα παραμένει σε μεγάλο βαθμό ανεξερεύνητος. Σε ένα από τα λίγα *in vivo* μοντέλα που έχουν περιγραφεί για τη μη-κανονική πορεία, η υπερέκφραση της υπομονάδας p52 στο αναπνευστικό επιθήλιο μυών προάγει την ανάπτυξη περισσότερων και μεγαλύτερων όγκων σε σύγκριση με τους μύες αγρίου τύπου έπειτα από χορήγηση ουρεθανίου (254). Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν δεδομένα από δείγματα ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα, όπου παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα έκφρασης και ενεργότητας των υπομονάδων p52 και RelB στα καρκινικά κύτταρα σε σύγκριση με το φυσιολογικό παρέγχυμα (254, 255). Παραδόξως, δύο πρόσφατες μελέτες παρουσιάζουν αντικρουόμενα αποτελέσματα για το ρόλο της IKKα στην καρκινογένεση του πνεύμονα *in vivo*. Ενώ η μελέτη των Vreka et. al. υποστηρίζει ότι η IKKα δρα προάγοντας το σχηματισμό αδενοκαρκινωμάτων στους πνεύμονες ποντικών είτε μεμονωμένα είτε συνεργικά με το ογκογονίδιο  $KRAS^{G12D}$  (256), η μελέτη των Song et. al. παρουσιάζει έναν ογκοκατασταλτικό ρόλο στην  $KRAS^{G12D}$ -επαγόμενη ογκογένεση. Επιπλέον, στη δεύτερη μελέτη η IKKα φαίνεται να περιορίζει το σχηματισμό όγκων μέσω της ρύθμισης γονιδίων των υπομονάδων του συμπλόκου NOX (NADPH oxidase) που εμπλέκονται στη δημιουργία δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species; ROS) (257). Σε συμφωνία με την ομάδα των Song et. al. η IKKα φαίνεται να δρα ογκοκατασταλτικά και σε ένα *in vivo* μοντέλο SCC (258). Αντίθετα, η έκφραση της IKKα σε μια ανθρώπινη κυτταρική σειρά του καρκίνου του πνεύμονα βρέθηκε να προάγει την πολλαπλασιαστική και μεταστατική ικανότητα των κυττάρων αλλά και την ανάπτυξη των όγκων σε ξενομοσχεύματα *in vivo*, ενώ ο μηχανισμός δράσης της φαίνεται να διαφέρει ανάλογα με τον υποκυτταρικό εντοπισμό της. Πιο συγκεκριμένα, ενώ στο κυτταρόπλασμα η IKKα προάγει την αύξηση των επιπέδων του EGFR και του NF-κΒ, όταν βρίσκεται στον πυρήνα προάγει την ενεργοποίηση του c-Myc, των Smad2/3 και του παράγοντα Snail που εμπλέκεται στη μετάσταση (259).

Συνολικά, η συμβολή του NF-κΒ στην ανάπτυξη του καρκίνου του πνεύμονα ενέχει πολύπλοκους μηχανισμούς, και ενώ αρκετές μελέτες έχουν καταδείξει το σημαντικό ρόλο του NF-κΒ στην ανάπτυξη και πρόοδο του καρκίνου του πνεύμονα οι μοριακές πορείες που συμβάλλουν σε αυτό το φαινόμενο δεν είναι πλήρως κατανοητές. Ακόμη, δεδομένου ότι οι περισσότερες μελέτες έχουν εστιάσει στο ρόλο της κανονικής πορείας του NF-κΒ, ο ρόλος της μη κανονικής πορείας στην καρκινογένεση του πνεύμονα επίσης παραμένει σε μεγάλο βαθμό ανεξερεύνητος.

## 1.8. Σκοπός

Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί την κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως. Αυτό οφείλεται στην αδυναμία έγκαιρης διάγνωσης λόγω έλλειψης εμφανών συμπτωμάτων με αποτέλεσμα το πενταετές προσδόκιμο ζωής των ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του πνεύμονα να μην ξεπερνά το 5%, γεγονός που καθιστά επιτακτική την ανάγκη ταυτοποίησης νέων μοριακών δεικτών και πιθανών θεραπειών. Κλινικά, διακρίνεται στο μικροκυτταρικό (SCC) και στο μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC) ο οποίος αποτελεί και το συχνότερο υπότυπο καθώς αφορά περίπου το 85% όλων των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα. Η ανάπτυξη του NSCLC οφείλεται στην προοδευτική συσσώρευση γενετικών και επιγενετικών μεταβολών κυρίως στα ογκογονίδια *KRAS* και *EGFR* αλλά και στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο *TP53*. Οι μεταλλάξεις αυτές έχουν συσχετιστεί με την ενεργοποίηση του NF-κΒ ο οποίος συχνά παρατηρείται ιδιοστατικά ενεργοποιημένος. Αρκετές μελέτες έχουν καταδείξει τον ογκογόνο ρόλο της κανονικής πορείας IKKβ-RelA/p65 στην καρκινογένεση του πνεύμονα, ωστόσο οι ακριβείς μηχανισμοί που διέπουν τη δράση της δεν είναι πλήρως μελετημένοι και σαφής. Ομοίως, ενώ η δράση της μη-κανονικής πορείας IKKα-p52 προάγει την καρκινογένεση του πνεύμονα, ο μοριακός μηχανισμός που χαρακτηρίζει τη δράση της είναι ελάχιστα μελετημένος. Επιπρόσθετα, η κινάση ενεργοποίησης της μη-κανονικής πορείας IKKα στον καρκίνο του πνεύμονα είναι ασαφής.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση του ρόλου των δύο κεντρικών σηματοδοτικών πορειών του NF-κΒ και των ανοδικών κινασών ενεργοποίησής του, IKKα και IKKβ στην καρκινογένεση του πνεύμονα, με στόχο την ταυτοποίηση νέων πιθανών γονιδίων στόχων που διέπουν τη δράση αυτών των πορειών, καθώς επίσης και οι λειτουργικοί ρόλοι αυτών των γονιδίων-στόχων, τα οποία θα μπορούσαν να αποτελέσουν πιθανούς νέους βιοδείκτες διάγνωσης του καρκίνου του πνεύμονα ή παράγοντες στόχευσης για το μελλοντικό σχεδιασμό νέων θεραπειών.

Για την επίτευξη αυτού του στόχου χρησιμοποιήθηκαν νέα διαγονιδιακά μοντέλα μυών και μοντέλα καρκίνου του πνεύμονα ανθρώπου.



## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1. Βακτηριακές Τεχνικές

#### 2.1.1. Παρασκευή L-broth (Luria-Bertani; LB) και τρυβλίων με L-άγαρ (L-agar)

Η παρασκευή των τρυβλίων L-άγαρ έγινε παράλληλα με την παρασκευή διαλύματος L-Broth. 10 g θρυπτόνης (Bacteriological thryptone), 5 g εκχυλίσματος ζύμης (yeast extract powder) και 10 g χλωριούχου νατρίου (LAB M), διαλύθηκαν με ανάδευση σε 1 lt δις απεσταγμένου νερού και το διάλυμα μεταβιβάστηκε σε 2 φιάλες των 500 ml. Στη μια φιάλη προστέθηκαν 7.5 g άγαρ (LAB M) και αφού έγινε αποστείρωση σε αυτόκαυστο, η φιάλη αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για να κατέβει η θερμοκρασία στους 55°C, προστέθηκε το κατάλληλο αντιβιοτικό, αμπικιλίνη (100 µg/ml) ή καναμυκίνη (50µg/ml), το υλικό μοιράστηκε σε τρυβλία και αφέθηκε να πολυμεριστεί σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια τα τρυβλία αποθηκεύτηκαν στους 4°C για περαιτέρω χρήση (260).

#### 2.1.2. Παρασκευή βακτηρίων επιδεκτικών προς μετασχηματισμό (competent cells)

Η δημιουργία επιδεκτικών προς μετασχηματισμό βακτηρίων, απαιτεί την κατεργασία τους με παράγοντες που σχηματίζουν πόρους στο κυτταρικό τους τοίχωμα, επιτρέποντας την εισαγωγή με παθητική διάχυση, εξωγενώς προστιθέμενου DNA. Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή επιδεκτικών βακτηρίων ικανών προς μετασχηματισμό με πλασμίδια (competent cells) ήταν τα στελέχη *E. Coli* Stable 3 και TOP10F.

Αρχικά, μη επιδεκτικά βακτήρια τοποθετήθηκαν σε 4 ml L-Broth και επωάστηκαν σε θερμαινόμενο τροχιακό αναδευτήρα στους 37°C ολονύκτια ώστε να αναπτυχθούν. Την επόμενη ημέρα, 0.2 ml της ολονύχτιας υγρής βακτηριακής καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό 20 ml L-broth (αραίωση 1/100) σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη 25 cm<sup>2</sup>, όπου επωάστηκαν για 2-3 ώρες στους 37°C, μέχρι η OD<sub>600</sub> να φτάσει 0.5. Έπειτα, η καλλιέργεια μοιράστηκε σε 2 σωλήνες των 15 ml και φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά σε 3000g στους 4°C. Το βακτηριακό ίζημα επανεωρήθηκε σε 4 ml διαλύματος χλωριούχου ασβεστίου (CaCl<sub>2</sub>) και φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στις 2000Xg στους 4°C. Το ίζημα επανεωρήθηκε με άλλα 4 ml CaCl<sub>2</sub> και επωάστηκε για 30 λεπτά στον πάγο. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 7 λεπτά στις 2500 στροφές και τους 4°C. Το ίζημα επανεωρήθηκε σε 1,5 ml CaCl<sub>2</sub> και δείγματα των 100 µl βακτηρίων τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένους σωλήνες erpendorff και αποθηκεύτηκαν στους -80°C για μελλοντική χρήση (260).

Διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου (CaCl<sub>2</sub>): 60 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% γλυκερόλη, 10 mM PIPES pH 7.0.

### **2.1.3. Μετασχηματισμός βακτηρίων με πλασμιδιακό DNA**

100 µl επιδεκτικών βακτηριακών στελεχών *E. Coli* Stable 3 αναμίχθηκαν με ~50 ng πλασμιδιακού DNA σε σωλήνες erpendorff και επωάστηκαν στον πάγο για 10 λεπτά έτσι ώστε να γίνει η εισαγωγή του πλασμιδίου στα βακτηριακά κύτταρα. Στη συνέχεια τα βακτήρια επιστρώθηκαν σε τρυβλία L-άγαρ που περιείχαν 100 µg/ml αμπικιλίνη ή 50µg/ml καναμυκίνη με τη βοήθεια μιας γυάλινης ράβδου. Τα τρυβλία αφέθηκαν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για να απορροφηθεί το εμβολίασμα και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C ολονύκτια, προς σχηματισμό ανθεκτικών στο αντιβιοτικό αποικιών βακτηρίων (260).

### **2.1.4. Ανάπτυξη υγρών καλλιεργείων βακτηρίων**

Για απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρούς όγκους (mini prep) ήταν απαραίτητη η ανάπτυξη υγρών καλλιεργείων βακτηρίων. 4 ml L-Broth που περιείχε κατάλληλη ποσότητα αντιβιοτικού εμβολιάστηκαν με αποικίες ή αποθέματα γλυκερόλης βακτηρίων, με τη χρήση κρικοφόρου στυλεού και επωάστηκαν σε θερμαινόμενο τροχιακό αναδευτήρα στους 37°C για όλη τη νύχτα (>16 ώρες).

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλους όγκους (maxi prep), η ανάπτυξη υγρών καλλιεργείων βακτηρίων πραγματοποιήθηκε με ανάμιξη 0.5 ml ανεπτυγμένης καλλιέργειας βακτηρίων σε 4 ml L-Broth παρουσία αντιβιοτικού σε θερμαινόμενο τροχιακό αναδευτήρα στους 37°C για όλη τη νύχτα (>16 ώρες) και στη συνέχεια με τον εμβολιασμό 200 ml L-Broth παρουσία αντιβιοτικού με 5 ml της ολονύχτιας αναπτυγμένης βακτηριακής καλλιέργειας και επώαση σε θερμαινόμενο τροχιακό αναδευτήρα στους 37°C για όλη τη νύχτα.

### **2.1.5. Παρασκευή βακτηριακών αποθεμάτων γλυκερόλης**

Τα αποθέματα βακτηρίων παρασκευάστηκαν αναμιγνύοντας μέρος της αναπτυγμένης υγρής καλλιέργειας βακτηρίων με γλυκερόλη (10% τελική συγκέντρωση γλυκερόλης), και διατηρήθηκαν στους -80°C για περαιτέρω χρήση.

### **2.1.6. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (mini prep)**

1.5 ml υγρής καλλιέργειας βακτηρίων, προερχόμενες από αποικίες (§ 2.1.4.), τοποθετήθηκαν σε έναν αποστειρωμένο σωλήνα erpendorff και φυγοκεντρήθηκαν στις 6500 στροφές για 2 λεπτά στους 4°C. Στη συνέχεια, το βακτηριακό ίζημα εναιωρήθηκε με δίνη (vortexing) σε 70

μl ρυθμιστικού διαλύματος STET και 25 μl λυσοζύμης (10 mg/ml). Μετά από 5 λεπτά επώασης σε θερμοκρασία δωματίου, τα δείγματα θερμάνθηκαν στους 100°C για 45 δευτερόλεπτα και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά στις 13000 στροφές. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε προσεκτικά και μεταφέρθηκε σε καθαρό σωλήνα errendorff, όπου προστέθηκαν 100 μl ισοπροπανόλης. Το πλασμιδιακό DNA αφέθηκε να κατακρημνιστεί για 5 λεπτά στους -70°C και συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση για 7 λεπτά στις 13000 στροφές. Το ίζημα επανεωρήθηκε σε 25 μl διαλύματος 1X TE και αποθηκεύτηκε στους -20°C για περαιτέρω χρήση (260).

Ρυθμιστικό διάλυμα STET: 8% σουκρόζη (σακχαρόζη), 5% Triton X-100, 50 mM EDTA pH8.0, 50 mM Tris-HCl pH8.0

1xTE pH 8.0: 10 mM Tris pH8.0, 1 mM EDTA pH8.0

### **2.1.7. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα (midi prep)**

Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA έγινε με τη χρήση του Nucleobond kit Xtra Midi EF/Maxi EF (Macherey-Nagel) από 100ml βακτηριακής καλλιέργειας, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Μετά την απομόνωση, το DNA αποθηκεύτηκε στους -20°C για περαιτέρω χρήση. Η συγκέντρωση του απομονωμένου DNA υπολογίστηκε στο φασματοφωτόμετρο Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

## **2.2. Κυτταρική Καλλιέργεια**

### **2.2.1. Κυτταρικές σειρές και καλλιέργεια**

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη αναφέρονται στον Πίνακα 2.1. και λεπτομέρειες για το γενετικό υπόβαθρό των κυτταρικών σειρών μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.2. Οι κυτταρικές σειρές NSCLC διαφέρουν ως προς τα γονίδια *KRAS*, *P16*, *ARF* και *P53* ενώ όλες φέρουν την αγρίου τύπου μορφή του γονιδίου EGFR. (wild type; wt).

Πίνακας 2.1. Κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

Κυτταρική σειρά	Περιγραφή	Πηγή
A549	Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα (κακοήθη επιθηλιακά)	ATCC
H1299	Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα (κακοήθη επιθηλιακά)	ATCC
H1437	Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα (κακοήθη επιθηλιακά)	ATCC
Phoenix	Ανθρώπινα κύτταρα από νεφρό εμβρύου	ATCC
HEK293T	Ανθρώπινα κύτταρα από νεφρό εμβρύου	ATCC
<b>Κυτταρικό στέλεχος</b>		
HFL-1	Φυσιολογικές ανθρώπινες εμβρυϊκές ινοβλάστες πνεύμονα	ATCC
MRC-5	Φυσιολογικές ανθρώπινες εμβρυϊκές ινοβλάστες πνεύμονα	NIBSC, UK

Πίνακας 2.2. Γενετικό υπόβαθρο ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών NSCLC

Κυτταρική σειρά	<i>KRAS</i>	<i>EGFR</i>	<i>P16</i>	<i>ARF</i>	<i>P53</i>
A549	<i>KRAS</i> <sup>G12S</sup>	wt	-/- (del)	-/- (del)	wt
H1299	wt	wt	wt	wt	null
H1437	wt	wt	mut	mut	<i>p53</i> <sup>R267</sup>

Οι κυτταρικές σειρές A549 και H1299 και τα κυτταρικά στελέχη HFL-1 και MRC-5 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) με χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης (DMEM-low glucose, 1000 mg/L) (Sigma), οι σειρές Phoenix και HEK293T σε DMEM με υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης (DMEM-high glucose, 4500mg/L) (Sigma) και η σειρά H1437 σε θρεπτικό υλικό RPMI-1640 (Sigma). Τα θρεπτικά υλικά εμπλουτίστηκαν με 10% εμβρυϊκό ορό μόσχου (Foetal Calf Serum; FCS) (Gibco), 100 IU/ml πενικιλίνη, 100 μg/ml στρεπτομυκίνη (Biowest) και 1.4 mM L-γλουταμίνη (Biowest). Οι κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

### 2.2.2. Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Καλλιεργούμενα κύτταρα σε πλήρες ταπήτιο (confluent) εκπλύθηκαν δύο φορές με 10 ml PBS και ύστερα προστέθηκε 1 ml διάλυμα θρυψίνης-EDTA (Gibco). Τα κύτταρα αφέθηκαν στον επωαστικό κλίβανο στους 37°C, 5%CO<sub>2</sub> για περίπου 2-5 λεπτά, ώστε να αποκολληθούν από το τρυβλίο. Μετά την επώαση, προστέθηκε πλήρες θρεπτικό υλικό και το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρθηκε σε νέα τρυβλία, σε επιθυμητές αραιώσεις, σε αναλογίες 1:2, 1:4 ή 1:8 και συμπληρώθηκε θρεπτικό υλικό μέχρι τα 10 ml. Τέλος, τα τρυβλία τοποθετήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο στους 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, ώστε να αναπτυχθούν τα κύτταρα εκ νέου.

Ρυθμιστικό διάλυμα φυσιολογικού ορού - φωσφορικού άλατος (Phosphate Buffered Saline; PBS): Μία ταμπλέτα PBS (Gibco) διαλύθηκε με ανάδευση σε 500ml δις-απεσταγμένου νερού και προέκυψαν οι εξής συγκεντρώσεις: 0.01 M ρυθμιστικού φωσφορικού άλατος, 0.0027 M χλωριούχου καλίου και χλωριούχου νατρίου σε pH 7.4. Το PBS αποστειρώθηκε στο αυτόκαυστο.

### 2.2.3. Διατήρηση των κυττάρων στο υγρό άζωτο

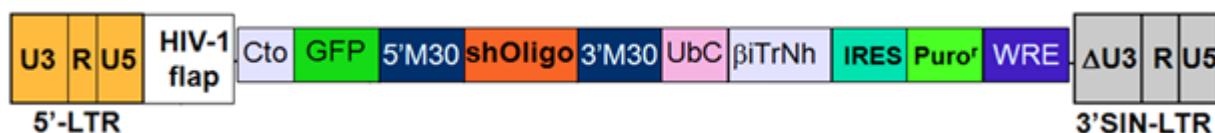
Για τη διατήρηση και τη βαθιά κατάψυξη των κυττάρων, επιλέχθηκαν τρυβλία με κύτταρα σε ημι-πλήρες ταπήτιο (semi-confluent) και αποκολλήθηκαν με θρυψίνη - EDTA (§ 2.2.2.). Στη συνέχεια προστέθηκε διάλυμα PBS και τα εναιωρήματα των κυττάρων μεταβιβάστηκαν σε αποστειρωμένους σωλήνες Falcon των 15 ml. Έγινε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 1500 στροφές και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε διάλυμα FCS που περιείχε 10% διμέθυλο-σουλφοξείδιο (DMSO) και στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε ειδικές αμπούλες (cryovials) των 2 ml. Οι αμπούλες τοποθετήθηκαν σε ισοθερμικό δοχείο που περιείχε ισοπροπανόλη και μεταφέρθηκαν στους -80°C ώστε να παγώσουν σταδιακά (1°C/λεπτό). Την επόμενη ημέρα μεταφέρθηκαν στο υγρό άζωτο (-196°C) για μακροπρόθεσμη διατήρηση.

Για την ανασύστασή τους, οι αμπούλες από το υγρό άζωτο τοποθετήθηκαν για περίπου 1-2 λεπτά σε υδατόλουτρο στους 37°C ώστε να ξεπαγώσουν τα κύτταρα και το περιεχόμενο μεταβιβάστηκε σε τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας διαμέτρου 100 mm όπου προστέθηκε πλήρες θρεπτικό υλικό. Τα κύτταρα διατηρήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο στους 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

## 2.2.4. Κατασκευή κυτταρικών σειρών

### 2.2.4.1. Λεντι-ϊικοί φορείς

Για την κατασκευή σταθερών κυτταρικών σειρών A549, H1299 και H1437 που μειορρυθμίζουν την κινάση IKKα χρησιμοποιήθηκε ένας λεντι-ϊικός φορέας έκφρασης ο οποίος ήταν ευγενική προσφορά του Καθηγητή K. Marcu (261). Ο φορέας έφερε ένα shRNA, καθώς και το γονίδιο που κωδικοποιεί για την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP (Green Fluorescent Protein), υπό τον έλεγχο του υποκινητή του κυτταρομεγαλοϊού CMV (Cto), ο οποίος επάγεται από τη δράση τετρακυκλίνης. Το sh-ολιγονουκλεοτίδιο είχε ως στόχο τη λουσιφεράση (control), είτε την κινάση ενεργοποίησης του NF-κΒ, IKKα. Για την επιλογή των κυττάρων, ο φορέας έφερε και το γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην πουρομυκίνη (Εικόνα 2.1.).



**Εικόνα 2.1. Σχηματική αναπαράσταση του λεντι-ϊικού φορέα έκφρασης για τη μειορρύθμιση της IKKα.** Ο φορέας φέρει τον υποκινητή του κυτταρομεγαλοϊού, CMV (Cto), ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση μιας πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP και ενός sh-ολιγονουκλεοτιδίου το οποίο στοχεύει τη λουσιφεράση (control) ή την IKKα. Επίσης, φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην πουρομυκίνη.

Για την παραγωγή λεντι-ϊικών σωματιδίων χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά HEK293T, η οποία διαμολύνθηκε με τους επιθυμητούς λεντι-ϊικούς φορείς με τη χρήση λιπιδίων PEI. 4.5 μg του επιθυμητού πλασμιδίου, 2.2 μg του πλασμιδίου VSV-G (κωδικοποιεί για τις G γλυκοπρωτεΐνες του ιού VSV) και 3.3 μl του πλασμιδίου ρBR8.91 (κωδικοποιεί για τις κύριες δομικές πρωτεΐνες του ιοσωματίου) αναμείχθηκαν με 125 μl θρεπτικού υλικού (χωρίς προσθήκη ορού) και 30 μg PEI (polyethylenimine, Polysciences Inc. #23966), για κάθε διαμόλυνση, και αφέθηκαν για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Σε καλλιεργούμενα κύτταρα HEK293T πραγματοποιήθηκε μία πλύση με PBS και ακολούθησε προσθήκη 10 ml πλήρους θρεπτικού υλικού στο οποίο προστέθηκε στάγδην το διάλυμα των πλασμιδίων. Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

Έπειτα από 24 ώρες στα κύτταρα HEK293T πραγματοποιήθηκε αλλαγή του θρεπτικού υλικού και έπειτα από άλλες 24 ώρες η συλλογή των ιικών σωματίων. Το θρεπτικό υλικό συλλέχθηκε, φυγοκεντρήθηκε στις 1500 στροφές για 3 λεπτά και φιλτραρίστηκε μέσω ενός αποστειρωμένου μικροφίλτρου 0.45 μm. Στη συνέχεια προστέθηκε πολυβρίνη (8 μl ανά 10 ml ιού) και το διάλυμα χρησιμοποιήθηκε για την επιμόλυνση καλλιεργούμενων κυττάρων A549, H1299 και H1437.

Η επιλογή των επιμολυσμένων κυττάρων έγινε με χορήγηση πουρομυκίνης σε συγκέντρωση 5  $\mu\text{g/ml}$  για 8 ημέρες. Το θρεπτικό υλικό με το αντιβιοτικό επιλογής ανανεώνονταν κάθε 2 - 3 ημέρες καθ' όλη τη διάρκεια της επιλογής των επιμολυσμένων κυττάρων. Πριν την απομόνωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από τα κύτταρα, χορηγήθηκε 1  $\mu\text{g/ml}$  δοξουκυκλίνης (Dox) (Clontech, 631311) για 24 ώρες, και παράλληλα παρατηρήθηκε η έκφραση της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP σε μικροσκόπιο φθορισμού.

#### 2.2.4.2. Ρετρο-ϊικοί φορείς

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο ρετρο-ϊικοί φορείς, για την αποσιώπηση της τετρασπανίνης CD82 και του μεταγραφικού παράγοντα p52. Πιο συγκεκριμένα, για την αποσιώπηση του CD82 χρησιμοποιήθηκε ο φορέας ελέγχου pSIREN–RetroQ–ZsGreen και ο φορέας pSIREN–RetroQ–ZsGreen-shCD82 για την αποσιώπηση του CD82 ο οποίος εκφράζει ένα sh-ολιγονουκλεοτίδιο (GAGCAGCTTCATTTCCGTC) ενάντια στο CD82. Επιπλέον ο φορέας εκφράζει τη φθορίζουσα πρωτεΐνη ZsGreen. Οι φορείς ήταν ευγενική προσφορά του Καθηγητή J.E. Goldman (262). Για την αποσιώπηση του p52 χρησιμοποιήθηκε ο ρετρο-ϊικός φορέας ελέγχου pSuper.retro-puro και ο φορέας pSuper.retro-puro-shp52 ο οποίος έφερε ένα sh-ολιγονουκλεοτίδιο ενάντια στο μεταγραφικό παράγοντα p52 και γονίδιο ανθεκτικότητας στην πουρομυκίνη. Οι φορείς ήταν ευγενική προσφορά του Καθηγητή K. Marcu, Τμήμα Βιοχημείας και Κυτταρικής Βιολογίας, Πανεπιστήμιο του Stony Brook, Νέα Υόρκη (261, 263).

Για την παραγωγή των ρετρο-ϊικών σωματιδίων χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά Phoenix, η οποία διαμολύνθηκε με τους επιθυμητούς ρετροϊικούς φορείς με τη χρήση λιπιδίων PEI. 6  $\mu\text{g}$  του επιθυμητού πλασμιδίου αναμείχθηκαν με 125  $\mu\text{l}$  θρεπτικού υλικού (χωρίς προσθήκη ορού) και 30  $\mu\text{g}$  PEI, για κάθε διαμόλυνση, και αφέθηκαν για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Σε καλλιεργούμενα κύτταρα Phoenix πραγματοποιήθηκε μία πλύση με PBS και ακολούθησε προσθήκη 10 ml πλήρους θρεπτικού υλικού στο οποίο προστέθηκε στάγδην το διάλυμα των πλασμιδίων. Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

Έπειτα από 24 ώρες στα κύτταρα Phoenix πραγματοποιήθηκε αλλαγή του θρεπτικού υλικού και έπειτα από άλλες 24 ώρες η συλλογή των ιικών σωματίων. Το θρεπτικό υλικό συλλέχθηκε, φυγοκεντρήθηκε στις 1500 στροφές για 3 λεπτά και φιλτραρίστηκε μέσω ενός αποστειρωμένου μικροφίλτρου 0.45  $\mu\text{m}$ . Στη συνέχεια προστέθηκε πολυβρίνη (8  $\mu\text{l}$  ανά 10ml ιού) και το διάλυμα χρησιμοποιήθηκε για την επιμόλυνση καλλιεργούμενων κυττάρων A549, H1299 και H1437.

Η επιλογή των επιμολυσμένων κυττάρων με τους φορείς pSuper.retro και pSuper.retro-shr έγινε με χορήγηση πουρομυκίνης σε συγκέντρωση 5 µg/ml για 8 ημέρες. Το θρεπτικό υλικό με το αντιβιοτικό επιλογής ανανεώνονταν κάθε 2 - 3 ημέρες καθ' όλη τη διάρκεια της επιλογής των επιμολυσμένων κυττάρων. Η επιτυχής επιμόλυνση των κυττάρων με τους φορείς pSIREN-RetroQ-ZsGreen και pSIREN-RetroQ-ZsGreen-shCD82 επιβεβαιώθηκε με την παρατήρηση της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης ZsGreen σε μικροσκόπιο φθορισμού.

#### 2.2.4.3. Πλασμιδιακοί φορείς

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο πλασμιδιακοί φορείς, για την αποσιώπηση του μεταγραφικού παράγοντα ρ65 και την υπερέκφραση της τετρασπανίνης CD82. Η επιμόλυνση των κυττάρων με τους πλασμιδιακούς φορείς πραγματοποιήθηκε με τη χρήση λιπιδίων PEI. Σε σωλήνα erpendorff προστέθηκαν σε 100 µl θρεπτικού υλικού DMEM απουσία ορού και αντιβιοτικών, 4 µg του επιθυμητού πλασμιδίου και 30 µg PEI. Το διάλυμα αφέθηκε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Παράλληλα, σε καλλιεργούμενα κύτταρα σε τρυβλία διαμέτρου 60mm και πληρότητας 60-70% πραγματοποιήθηκε μία πλύση με PBS και ακολούθησε προσθήκη 4 ml πλήρους θρεπτικού υλικού στο οποίο προστέθηκε στάγδην το διάλυμα των πλασμιδίων. Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Έπειτα από 24 ώρες στα κύτταρα πραγματοποιήθηκε αλλαγή του θρεπτικού υλικού και έπειτα από άλλες 24 ώρες ξεκίνησε η επιλογή με το κατάλληλο αντιβιοτικό.

Για την αποσιώπηση του μεταγραφικού παράγοντα ρ65 οι κυτταρικές σειρές A549 και H1437 επιμολύνθηκαν είτε με το φορέα ελέγχου pSuper-ρuro, είτε με τον φορέα pSuper-ρuro-shρ65 ο οποίος φέρει ένα shRNA-ολιγονουκλεοτίδιο ενάντια στο ρ65 και ήταν ευγενική προσφορά του Καθηγητή M. Kracht, Ινστιτούτο Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, πανεπιστήμιο Justus Liebig Giessen, Γερμανία (264). Για την κατασκευή των σταθερών κυτταρικών σειρών τα επιμολυσμένα κύτταρα επιλέχθηκαν για δέκα μέρες σε 5 µg/ml πουρομυκίνη.

Για την υπερέκφραση της τετρασπανίνης CD82 οι κυτταρικές σειρές A549 και H1437 επιμολύνθηκαν είτε με το φορέα ελέγχου mCherry-C1, είτε με τον φορέα mCherry-CD82 ο οποίος ήταν ευγενική προσφορά της Καθηγήτριας J.M. Gillette, Τμήμα Παθολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο του New Mexico, ΗΠΑ (265). Για την κατασκευή των σταθερών κυτταρικών σειρών τα επιμολυσμένα κύτταρα επιλέχθηκαν για δύο εβδομάδες σε 500 µg/ml νεομυκίνη (G418). Επιπρόσθετα, τα φθορίζοντα κύτταρα συλλέχθηκαν με κυτταρομερία ροής (FACS sorting).



### **2.2.5. Καλλιέργεια κυττάρων σε συνθήκες χαμηλής προσκόλλησης για τη δημιουργία σφαιρών (Tumor sphere assay)**

Κύτταρα ελέγχου και κύτταρα H1437-IKCa<sup>KD</sup> καλλιεργήθηκαν κάτω από συνθήκες φυσιολογικού οξυγόνου (normoxia) και υπό συνθήκες ήπιας υποξίας (mild hypoxia, 3% οξυγόνο). Σε πολυτρυβλία χαμηλής συγγένειας 96 θέσεων (3474; Corning Incorporated) καλλιεργήθηκαν 1000 κύτταρα/θέση σε θρεπτικό υλικό DMEM/F12 medium (D8437; SigmaAldrich) απουσία προσθήκης ορού. Το θρεπτικό υλικό εμπλουτίστηκε με 20 ng/ml του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF; epidermal growth factor) (E5036; Sigma-Aldrich), 10 ng/ml του βασικού αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (b-FGF, basic fibroblast growth factor) (F0291; Sigma-Aldrich), 5 µg/ml ινσουλίνης (A114291J; Invitrogen), 1XB27 συμπλήρωμα (17504-044, Invitrogen), και 0.4% αλβουμίνη βόειου ορού (BSA; bovine serum albumin) (A9576; Sigma-Aldrich). Στο θρεπτικό υλικό προστέθηκαν επίσης 2 µg/ml Dox. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες φυσιολογικού οξυγόνου, 5% CO<sub>2</sub> at 37°C (normoxia) ή σε συνθήκες ήπιας υποξίας (mild hypoxia) σε υποξικό θάλαμο όπου τα επίπεδα του οξυγόνου διατηρήθηκαν στο 3% για επτά ημέρες. Μετά το πέρας των επτά ημερών η σφαίρες μετρήθηκαν και φωτογραφήθηκαν.

### **2.2.6. Καταμέτρηση κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο**

Καλλιεργούμενα κύτταρα αποκολλήθηκαν από το τρυβλίο με διάλυμα θρυψίνης (§ 2.2.2.). Μετά την αποκόλληση των κυττάρων προστέθηκε πλήρες θρεπτικό υλικό και 10µl από το εναιώρημα των κυττάρων τοποθετήθηκαν στο αιμοκυτταρόμετρο (Neubauer Chamber), όπου μετρήθηκαν τα κύτταρα στα 4 μεγάλα γωνιακά εξωτερικά τετράγωνα μήκους 1mm, το κάθε ένα από τα οποία υποδιαιρείται σε 16 μικρότερα τετράγωνα. Ο μέσος όρος των κυττάρων των τεσσάρων τετραγώνων πολλαπλασιάστηκε  $\times 10^4$  δίνοντας έτσι τον αριθμό των κυττάρων ανά 1ml του αρχικού εναιωρήματος. Η κάθε μέτρηση επαναλήφθηκε 2 φορές.

### **2.2.7. Καμπύλες ανάπτυξης κυττάρων**

Για την εκτίμηση του ρυθμού του κυτταρικού πολλαπλασιασμού,  $2 \times 10^4$  κύτταρα επιστρώθηκαν σε πολυτρυβλία 24 θέσεων τα οποία καλλιεργήθηκαν και παρατηρήθηκαν με τη χρήση του συστήματος απεικόνισης πραγματικού χρόνου IncuCyte ZOOM (Essen BioScience). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 92 ώρες κατά τη διάρκεια των οποίων λαμβάνονταν φωτογραφίες των καλλιεργούμενων κυττάρων κάθε 4 ώρες από 9 διαφορετικά πεδία κάθε δείγματος με τη χρήση αντικειμενικού φακού 10X. Οι καμπύλες

ανάπτυξης δημιουργήθηκαν στο excel από τα δεδομένα που συλλέχθηκαν με τη χρήση του λογισμικού IncuCyte ZOOM αναφορικά με το ποσοστό πληρότητας των κυττάρων (% confluence) σε κάθε θέση. Τα δεδομένα είναι αποτέλεσμα τριών επαναλήψεων.

### **2.2.8. Προσδιορισμός κυτταρικής απόπτωσης**

Για την εκτίμηση της απόπτωσης των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το Annexin V-FITC/PI staining kit (Biolegend #640914) και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Εν συντομία, καλλιεργούμενα κύτταρα θρυψινοποιήθηκαν, εκπλύθηκαν 2 X με PBS και επανεωρήθηκαν σε διάλυμα πρόσδεσης σε αναλογία  $1 \times 10^6$  κύτταρα/100 μl διαλύματος. Ακολούθησε προσθήκη 5 μl ανεξίνης V (Annexin V-FITC) και 10 μl ιωδιούχου προπιδίου (PI). Τα δείγματα επώαστηκαν για 15 λεπτά στο σκοτάδι και αναλύθηκαν αμέσως με κυτταρομετρία ροής (BD FACSAria III, BD Biosciences, US). Τα κύτταρα τα οποία ανιχνεύονται θετικά για την ανεξίνη V αντιστοιχούν στα πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα (Annexin V+), τα διπλά θετικά για ανεξίνη V και PI στα όψιμα αποπτωτικά και νεκρά κύτταρα (Annexin V+/PI+) και τα διπλά αρνητικά στα ζωντανά κύτταρα.

Τα ποσοστά των πρώιμων και όψιμων αποπτωτικών A549-p65<sup>KD</sup> και H1437-p65<sup>KD</sup> κυττάρων υπολογίστηκαν και παρουσιάστηκαν με τη μορφή γραφήματος σε σύγκριση με τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου.

### **2.2.9. Προσδιορισμός κυτταρικής μετανάστευσης (Scratch assay)**

Ο προσδιορισμός της κυτταρικής μετανάστευσης *in vitro* μελετήθηκε με τη μέθοδο scratch assay κατά την οποία πραγματοποιείται μια αμυχή σε κύτταρα που έχουν σχηματίσει μια πλήρη στοιβάδα και εν συνεχεία παρακολουθείται ο ρυθμός με τον οποίο τα κύτταρα καλύπτουν την αμυχή που έχει δημιουργηθεί.

Για τη μέθοδο πρόκλησης αμυχής (scratch assay) επιστρώθηκαν  $2 \times 10^5$  κύτταρα σε πολυτρυβλία 24 θέσεων και έπειτα από 24 ώρες το θρεπτικό υλικό των κυττάρων αντικαταστάθηκε με θρεπτικό υλικό απουσία ορού με σκοπό τον περιορισμό του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Έπειτα από 24 ώρες καλλιέργειας σε συνθήκες στέρησης ορού, με τη χρήση αποστειρωμένου πλαστικού ρύγχους δημιουργήθηκε μια κάθετη αμυχή στην πλήρη κυτταρική στοιβάδα. Τα κύτταρα εκπλύθηκαν 2X με PBS για την απομάκρυνση των αποκολλημένων κυττάρων και καλλιεργήθηκαν με θρεπτικό υλικό απουσία ορού για 24 ώρες.

Για κάθε αμυχή φωτογραφήθηκαν 2 οπτικά πεδία στις 0 και 24 ώρες μετά τη δημιουργία της αμυχής, σε οπτικό μικροσκόπιο με τη χρήση φωτογραφικής κάμερας nikon. Το ποσοστό κάλυψης της αμυχής υπολογίστηκε με το πρόγραμμα ImageJ.

## **2.3. Απομόνωση και ανάλυση RNA**

### **2.3.1. Απομόνωση RNA**

#### *2.3.1.1. Απομόνωση RNA καλλιιεργούμενων κυττάρων*

Ολικό RNA από καλλιιεργούμενα κύτταρα απομονώθηκε με τη χρήση του NucleoSpin-miRNA kit της εταιρείας Macherey-Nagel σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η συγκέντρωση και καθαρότητα του RNA υπολογίστηκε με τη χρήση του Nanodrop 2000. Το RNA διατηρήθηκε στους -80°C μέχρι την περεταίρω χρήση.

#### *2.3.1.2. Απομόνωση RNA από τους όγκους των μυών*

Η απομόνωση ολικού RNA από τους όγκους των ποντικών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του TRIzol™ (Invitrogen, #15596018) και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Περιληπτικά, 50-100mg ιστού ομογενοποιήθηκαν σε 1 ml TRIzol και αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 5' για τη λύση των κυττάρων. Ακολούθησε προσθήκη 200 μl χλωροφορμίου και επώαση για 3'. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε 12000Xg για 15'. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης στα δείγματα δημιουργήθηκαν τρεις διακριτές φάσεις. Η ανώτερη υδατινή, διάφανη φάση χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του RNA και η κατώτερη οργανική φάση για την απομόνωση των πρωτεϊνών. Η ανώτερη υδατινή φάση μεταφέρθηκε προσεκτικά σε νέο eppendorf, προστέθηκε 0.5 ml ισοπροπανόλης για την κατακρήμνιση του RNA και αφέθηκε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στα 12000Xg στους 4°C. Το ίζημα επανεωρήθηκε σε 1 ml 75% αιθανόλης, αναδεύθηκε με δίνη και φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στα 7500 x g στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και αφέθηκε να στεγνώσει πλήρως από την αιθανόλη για 5-10 λεπτά. Τέλος το ίζημα επανεωρήθηκε σε 30-60 μl νερού ελεύθερου RNAσών (RNase-free water). Η συγκέντρωση του RNA υπολογίστηκε με τη χρήση του Nanodrop 2000. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80°C για περεταίρω χρήση.

### 2.3.2. Αντίστροφη μεταγραφή

Η αντίστροφη μεταγραφή του RNA (0.5 µg) σε cDNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του PrimeScript™ RT reagent Kit (Takara, #RR037A) και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το cDNA διατηρήθηκε στους -20°C μέχρι την περαιτέρω χρήση.

### 2.3.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qRT-PCR)

Για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης τα δείγματα cDNA ενισχύθηκαν για τους επιθυμητούς στόχους με τη χρήση του KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (Kapa Biosystems) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και τη χρήση κατάλληλων εκκινητών οι οποίοι σχεδιάστηκαν με το πρόγραμμα Primer BLAST και παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.3. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στο θερμοκυκλοποιητή StepOne Real-Time PCR system (Applied Biosystems) Η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο ΔΔCT και την έκφραση του *PRII* ή 18sRNA ως εσωτερικούς μάρτυρες.

**Πίνακας 2.3. Ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη**

Εκκινητής	Αλληλουχία
<b>CD82</b>	F: 5'- GCTCATTTCGAGACTACAACAGC-3' R: 5'-GTGACCTCAGGGCGATTCA-3'
<b>ROS1</b>	F: 5'-TGTCTGCTGAATGAACCCCAA-3' R: 5'-TGCCAGATCCCTGTGAATGAAA-3'
<b>Human HIF-1α</b>	F: 5'-CATAAAGTCTGCAACATGGAAGGT-3' R: 5'-ATTTGATGGGTGAGGAATGGGTT-3'
<b>Mouse HIF-1α</b>	F: 5'-ACAGAAATGGCCCAGTGAGAAA-3' R: 5'-AAATCAGCACCAAGCACGTC-3'
<b>Human HK2</b>	F: 5'-AGTACATGGGCATGAAGGGC-3' R: 5'-CAGGTCAAACCTCCTCTCGCC-3'
<b>Mouse HK2</b>	F: 5'- TGATCGCCTGCTTATTACCG-3' R: 5'- AACCGCCTAGAAATCTCCAGA-3'
<b>Human Slc2a1</b>	F: 5'-TCTGGCATCAACGTGTCTTC-3' R: 5'-CGATACCGGAGCCAATGGT-3'
<b>Mouse Slc2a1</b>	F: 5'- CAGTTCGGCTATAACACTGGTG-3' R: 5'- GCCCCCGACAGAGAAGATG-3'
<b>RPII</b>	F: 5'-TCAATGCTGGTTTTGGTGACG-3' R: 5'-GCATGTTGGACTCGATGCAG-3'
<b>Human 18sRNA</b>	F: 5'- CTACCACATCCAAGGAAGCA-3' R: 5'- TTTTTCGTCACTACCTCCCCG-3'
<b>Mouse 18sRNA</b>	F: 5'- GTAACCCGTTGAACCCATT-3' R: 5'- CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'

### 2.3.4. Αλληλούχιση RNA (RNA-seq)

Τα πειράματα RNA-Seq πραγματοποιήθηκαν στο Ελληνικό Κέντρο Γονιδιωματικής του ΙΙΒΕΑΑ. Η ποσότητα του συνολικού RNA όλων των δειγμάτων μετρήθηκε με Nanodrop, ενώ η ποιότητα τους πιστοποιήθηκε με το Agilent bioanalyzer RNA 6000 nano kit. Οι βιβλιοθήκες RNA-Seq παρασκευάστηκαν με το TruSeq RNA v2 kit της Illumina, χρησιμοποιώντας 1 μg συνολικού RNA σαν αρχικό υλικό. Η ποιότητα των βιβλιοθηκών πιστοποιήθηκε με το Agilent bioanalyzer DNA1000 kit και η ποσότητα τους μετρήθηκε με το φασματοφωτόμετρο Qubit και το Qubit HS kit. Η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε με το NextSeq500 sequencer της Illumina και για κάθε δείγμα παρήχθησαν περίπου 25 εκατομμύρια single-end reads μήκους 75 bp. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση RNA-seq, χρησιμοποιώντας πρώτα απ' όλα το πρόγραμμα ποιοτικού ελέγχου, FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). Το quality score σε όλες τις βάσεις και σε όλα τα δείγματα ήταν καλές. Αφού ελέγχθηκε η ποιότητα, χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο tophat2 με τυπικές παραμέτρους για ευθυγράμμιση. Χρησιμοποιήθηκε το γονιδίωμα αναφοράς hg19. Έπειτα χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο Samtools για την ταξινόμηση και φιλτράρισμα των παραπάνω, προκειμένου να επιτευχθούν σημαντικά αποτελέσματα. Το τελευταίο βήμα για να αποκτήσουμε τη διαφορική έκφραση ήταν να χρησιμοποιηθεί το cuffdiff με τυπικές παραμέτρους. Οι χάρτες θερμότητας (heatmaps) δημιουργήθηκαν στο R studio με τη χρήση του heatmap, ενώ τα διαγράμματα Venn δημιουργήθηκαν από το διαδικτυακό εργαλείο Meta-Chart (<https://www.meta-chart.com/venn#>). Τα αποτελέσματα προέκυψαν από τρεις βιολογικές επαναλήψεις για τα ξενομοσχεύματα *in vivo* ενώ για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης στους όγκους του διαγονιδιακού μοντέλου μύς αναλύθηκαν 9 όγκοι από τους μύες αγρίου τύπου (IKKα<sup>WT</sup>) και 9 μεγάλοι όγκοι από τους μύες IKKα<sup>KO</sup>.

## 2.4. Απομόνωση και ανάλυση πρωτεϊνών

### 2.4.1. Απομόνωση ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων

#### 2.4.1.1. Απομόνωση ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων καλλιεργούμενων κυττάρων

Τρυβλία διαμέτρου 100mm εκπλύθηκαν αρχικά δύο φορές με 5ml ψυχρής PBS-1 mM EDTA pH8.0 και στη συνέχεια προστέθηκε 1.0 ml ψυχρής PBS-1mM EDTA pH 8.0 και τα κύτταρα συλλέχθηκαν με ειδικό σιλικονούχο υλικό σε σωλήνα erpendorf. Το εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε στις 6500 στροφές για 1.5 λεπτό στους 4°C και το υπερκείμενο απομακρύνθηκε. Κατόπιν, προστέθηκαν 60-200 μl διαλύματος RIPA αναλογικά με το μέγεθος του ιζήματος, το ίζημα επαναιωρήθηκε με δίνη (vortex) και το μίγμα παρέμεινε στον πάγο για 20 λεπτά. Ακολούθησε ανάδευση με δίνη για περίπου 1 λεπτό και φυγοκέντρηση στις 13000

στροφές για 20 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καθαρό, αποστειρωμένο σωλήνα erpendorf και μικρή ποσότητα των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη χρήση του Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fischer Scientific, #23225) και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης πρωτεΐνης των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Nanodrop 2000. Τέλος, τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80°C για περαιτέρω χρήση.

Διάλυμα RIPA: 150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1% NP-40, 0,5% Triton X-100, 1 mM EDTA pH8.0, 0.5% δεοξυχολικό άλας του νατρίου (Sodium Deoxycholate), 1mM Dithiothreitol (DTT), 1 mM PMSF, 1 mM ορθοβαναδικό άλας του νατρίου (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) και 1X αναστολείς πρωτεασών (Sigma, S8820).

#### *2.4.1.2. Απομόνωση ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από τους όγκους των μυών*

Ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των όγκων που απομονώθηκαν από τους διαγονιδιακούς ή ανοσοκατεσταλμένους μύες απομονώθηκαν με τη χρήση του TRIzol™ (Invitrogen, #15596018) και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Περιληπτικά, εν συνεχεία της απομόνωσης του RNA, στην κατώτερη στοιβάδα προστέθηκαν 300 μl 100% αιθανόλης για την κατακρήμνιση και απομάκρυνση του DNA. Τα δείγματα αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 λεπτά και ακολούθως φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στα 2000Xg στους 4°C. Το υπερκείμενο που περιείχε τις πρωτεΐνες μεταφέρθηκε σε νέο erpendorf και ακολούθως προστέθηκε 1.5 ml ισοπροπανόλης για την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών. Ακολούθησε επώαση για 10 λεπτά και φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στα 12000Xg στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα εκπλύθηκε τρεις φορές με διάλυμα 0.3 M υδροχλωρικής γουανιδίνης σε 95% αιθανόλη. Σε κάθε πλύση το ίζημα των πρωτεϊνών επώαστηκε για 20 λεπτά με το διάλυμα πλύσης με ακόλουθη φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στα 7500Xg στους 4°C. Μετά την τελευταία πλύση το ίζημα επανεωρήθηκε σε 100% αιθανόλη. Ακολούθησε επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στα 7500 x g στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει για 5-10 λεπτά. Τέλος, το ίζημα επανεωρήθηκε σε 200-400 μl 2% SDS και 8 M ουρίας σε αναλογία 1:1. Ακολούθησε φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στα 10000Xg στους 4°C. Το υπερκείμενο που περιείχε τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα μεταφέρθηκε σε νέο erpendorf.

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών υπολογίστηκε με τη χρήση του Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fischer Scientific, #23225) και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης πρωτεΐνης των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Nanodrop 2000. Τέλος, τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80°C για περαιτέρω χρήση.

### 2.4.2. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

Με την ηλεκτροφόρηση πηκτής SDS-πολυακρυλαμιδίου επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε σύστημα κάθετων γυάλινων πλακών. Η πηκτή αποτελείται από δύο μέρη: Από την πηκτή επιστοίβαξης με μεγάλο μέγεθος πόρων και την πηκτή διαχωρισμού με μικρότερο μέγεθος πόρων. Τα πρωτεϊνικά μόρια διαπερνούν γρήγορα την πρώτη συσσωρεύονται σε μια λεπτή στιβάδα και εισέρχονται ταυτόχρονα στη δεύτερη πηκτή όπου και γίνεται ο διαχωρισμός. Η αναλογία όγκων πηκτής διαχωρισμού:πηκτική επιστοίβαξης είναι ~5:1 και η σύστασή τους περιγράφεται στον Πίνακα 2.4.

Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE), που πραγματοποιήθηκε σε μικρή διπλή συσκευή Mini-Protean gel electrophoresis tank (Bio-Rad), παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν πηκτές διαχωρισμού συγκέντρωσης ακρυλαμιδίου 10% (Πίνακας 2.4.), σύμφωνα με προηγούμενες μεθόδους. Το μίγμα αφέθηκε να πολυμεριστεί σε θερμοκρασία δωματίου. Στα πρωτεϊνικά δείγματα (40-60 μg πρωτεΐνης) προστέθηκε 1X διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών (loading buffer) και αφού θερμάνθηκαν για 10 λεπτά στους 100°C, φορτώθηκαν στην πηκτή. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 100 V σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης για ~2 ώρες. Ως δείκτης του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε ο πρότυπος έγχρωμος μάρτυρας πρωτεϊνών BlueStar Plus Prestained Protein Marker (Nippon Genetics, MWP04)

4X ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών: 250 mM Tris-Cl pH6.8, 40% γλυκερόλη, 8% SDS, 2.8 M β-μερκαπτοαιθανόλη, 0.2% κυανού της βρωμοφαινόλης

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών (1X Tris – γλυκίνη/SDS): 25 mM Tris, 250 mM γλυκίνη, 0.1% SDS

**Πίνακας 2.4. Πηκτές SDS-Πολυακρυλαμιδίου ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών**

<b>Πηκτή επιστίβαξης 5%</b>		
<b>Διάλυμα</b>	<b>Όγκος (ml)</b>	<b>Τελική συγκέντρωση</b>
Αποστειρωμένο ddH <sub>2</sub> O	1.4	
30% μίγμα ακρυλαμιδίου	0.33	5% w/v
1.0 M Tris pH 6.8	0.25	0.125 M
10% SDS	0.02	0.1%
10% υπερθειϊκό αμμώνιο	0.02	0.1%
TEMED	0.002	
<b>Τελικός όγκος (ml)</b>	<b>2</b>	
<b>Πηκτή διαχωρισμού 10%</b>		
<b>Διάλυμα</b>	<b>Όγκος (ml)</b>	<b>Τελική συγκέντρωση</b>
Αποστειρωμένο ddH <sub>2</sub> O	4	
30% μίγμα ακρυλαμιδίου	3.3	10% w/v
1.5 M Tris pH 8.8	2.5	0.375 M
10% SDS	0.1	0.1%
10% υπερθειϊκό αμμώνιο	0.1	0.1%
TEMED	0.004	
<b>Τελικός όγκος (ml)</b>	<b>10</b>	

**2.4.3. Ανάλυση πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωμα κατά Western (Western blot)**

Μετά την ηλεκτροφόρηση σε 1X ρυθμιστικό διάλυμα Tris-γλυκίνης που περιείχε SDS, οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης (Macherey-Nagel, #741280) σε 1X ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών για όλη τη νύχτα (>16 ώρες) στους 4°C και τάση 35V.

Μετά την μεταφορά των πρωτεϊνών, οι μεμβράνες επώαστηκαν για 1 ώρα σε 5% άπαχο γάλα σε σκόνη ελεύθερο λιπιδίων διαλυμένο σε PBS (5% blocking solution). Στην συνέχεια, οι μεμβράνες επώαστηκαν με το κατάλληλο πρωτογενές αντίσωμα (Πίνακας 2.5.) σε 3.5% blocking solution ολονύκτια στους 4°C υπό ανάδευση. Οι μεμβράνες εκπλύθηκαν 3 φορές για 10' με PBS και επώαστηκαν με κατάλληλο δευτερογενές αντίσωμα (Jackson Immunoresearch) σε 3.5% blocking solution για 1.5 ώρα, υπό ανάδευση. Οι μεμβράνες εκπλύθηκαν 3 φορές για 10' με PBS και στη συνέχεια αναπτύχθηκαν σε σκοτεινό θάλαμο με τη χρήση του Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad). Η έκθεση των μεμβρανών πραγματοποιήθηκε στο Molecular Imager® Chemi Doc™ XRS της εταιρίας Bio-Rad και η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού Chemi Doc™ XRS.

1X Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών (Transfer blotting buffer):

0.0025 M Tris, 0.192 M γλυκίνη, 20% μεθανόλη



**Πίνακας 2.5. Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη**

Αντίσωμα	Κωδικός	Εταιρεία	Αραίωση
p65	sc-372	Santa Cruz	1/1500
phospho-p65 (Ser536)	sc-136548	Santa Cruz	1/1000
IKKα	sc-87606	Santa Cruz	1/1500
p52	sc-298	Santa Cruz	1/1000
Hif-1α	#3716	Cell Signaling	1/1000
E-cadherin	sc-8426	Santa Cruz	1/1000
N-cadherin	sc-59987	Santa Cruz	1/1500
Vimentin	sc-6260	Santa Cruz	1/1500
CD82	sc-1087	Santa Cruz	1/300
mCherry	AB0040-200	OriGene	1/1000
GAPDH	#2118	Cell Signaling	1/3000
β-actin	A5441	Sigma	1/5000

#### 2.4.4. Έμμεσος ανοσοφθορισμός

Για τη μελέτη πρωτεϊνών με έμμεσο ανοσοφθορισμό τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε καλυπτρίδες διαμέτρου 10mm σε πλήρες θρεπτικό υλικό για 24 ώρες. Έπειτα από 24 ώρες, τα κύτταρα εκπλύθηκαν 3X με PBS και μονιμοποιήθηκαν σε 3,5% φορμαλδεΰδη για 20'. Στη συνέχεια, τα κύτταρα εκπλύθηκαν 3X με PBS και φράχτηκαν γενετικά με 10% FCS/PBS για 45'. Έπειτα, προστέθηκε το πρωτογενές αντίσωμα anti-CD82 (11-559-100, Exbio) σε αναλογία 1:50 για 1.5 ώρα. Ακολούθως, τα κύτταρα εκπλύθηκαν με 3X PBS και προστέθηκε το δευτερογενές αντίσωμα Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse (Jackson ImmunoResearch labs, UK) σε αναλογία 1:200 για 45' στο σκοτάδι.

Για την οπτικοποίηση των πυρήνων, τα κύτταρα επώαστηκαν με τη χρωστική DRAQ5 (Biostatus, DR50050) σε αναλογία 1:5000 σε PBS για 5' στο σκοτάδι. Τα κύτταρα εκπλύθηκαν 3X με PBS και οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Οι εικόνες συλλέχθηκαν με το μικροσκόπιο Leica TCS-SP scanning confocal microscope και με τη χρήση του λογισμικού Leica TCS.

#### 2.4.5. Ανοσοϊστοχημική χρώση

Η ανοσοϊστοχημική χρώση των δειγμάτων έγινε σε συνεργασία με τις κυρίες Γεωργία Παπασπύρου και Αντιγόνη Χριστοδούλου, ΕΤΕΠ του Εργαστηρίου της Παθολογικής-Ανατομικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και η εκτίμηση των αποτελεσμάτων έγινε σε συνεργασία με την Καθηγήτρια κα. Άννα Γούσια και την κα. Γεωργία Καρπαθίου, Ιατρούς Παθολογοανατόμους του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων.

Τομές ιστών πάχους 2 μm μονιμοποιημένων σε παραφίνη αναλύθηκαν για την έκφραση των αντιγόνων CD82 και Ki67 με ανοσοϊστοχημική χρώση. Πριν τη χρώση των τομών πραγματοποιήθηκε αυτοματοποιημένη αποπαραφίνωση, ενυδάτωση και παρουσίαση των αντιγόνων με τη χρήση του συστήματος PT Link pre-treatment system (Dako) και του διαλύματος EnVision FLEX Target Retrieval Solution (#K8004, Dako) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ακολούθησε η αυτοματοποιημένη ανοσοϊστοχημική χρώση των τομών με τη χρήση του Autostainer Link automated immunohistochemistry system (Dako) και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για τη χρώση του αντιγόνου CD82 χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα anti-CD82 (11-559-C100, Exbio) για 20 λεπτά σε αραιώση 1:200 και για το αντιγόνο Ki67 το αντίσωμα anti-Ki67 (Clone MIB-1, Zeta Corporation) για 30 λεπτά σε αραιώση 1:200. Μετά την ανοσοϊστοχημική χρώση οι τομές επωάστηκαν με αιματοξυλίνη για 5 λεπτά, ξεπλύθηκαν σε νερό και αφυδατώθηκαν με διαδοχικές εμβαπτίσεις σε 95% και 100% αιθανόλη και τέλος καλύφθηκαν με καλυπτρίδα για την παρατήρηση στο μικροσκόπιο.

## 2.5. Πειράματα *in vivo*

### 2.5.1. Ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων ως ξενομοσχεύματα *in vivo*

Η ανάπτυξη των καρκινικών κυτταρικών σειρών ως ξενομοσχεύματα *in vivo* πραγματοποιήθηκε στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (IIBEΑ), σε συνεργασία με τον Δρ. Απόστολο Κλινάκη, Ερευνητή Α' και τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Ευαγγελία Χαβδούλα και σύμφωνα με τους Ευρωπαϊκούς κανονισμούς χειρισμών πειραματοζώων (Federation of Laboratory Animal Science Associations), την κείμενη Ελληνική Νομοθεσία και τους κανονισμούς της Μονάδας Ζωικών Προτύπων του IIBEΑΑ. Η φροντίδα των ζώων και όλοι οι πειραματικοί χειρισμοί είναι εγκεκριμένοι από το Τμήμα Προστασίας Παραγωγικών Ζώων και Ζώων Εργαστηρίων, Διεύθυνση Προστασίας των Ζώων, Φαρμάκων και Κτηνιατρικών Εφαρμογών, Γενική Διεύθυνση Κτηνιατρικής, Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων (ΥΑΑΤ).

Για την ανάπτυξη των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων ως ξενομοσχεύματα *in vivo*,  $2 \times 10^6$  κύτταρα σε 200 μl PBS εμβολιάστηκαν υποδόρια σε ανοσοκατεσταλμένους μύες NSG (NOD-SCID-IL2Rgamma) ηλικίας 5 εβδομάδων. Κάθε ζώο εμβολιάστηκε αμφίπλευρα και συγκεκριμένα στη δεξιά πλευρά εμβολιάστηκαν τα τροποποιημένα κύτταρα (IKKα<sup>KD</sup>, p52<sup>KD</sup> ή p65<sup>KD</sup>) και στην αριστερή πλευρά εμβολιάστηκαν τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου. Στην περίπτωση εμβολιασμού των κυττάρων IKKα<sup>KD</sup> στο νερό των μυών προστέθηκαν 2 mg/ml δοξουκυκλίνης για την επαγωγή της αποσιώπησης της IKKα.

Τα ζώα θυσιάστηκαν με τη μέθοδο της αυχενικής μετατόπισης 3-4 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό των κυττάρων για την απομόνωση των όγκων. Οι όγκοι που απομονώθηκαν ζυγίστηκαν και τμήματα αυτών (50-100 mg) εμβαπτίστηκαν άμεσα σε υγρό άζωτο (snap freeze) και διατηρήθηκαν στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για την απομόνωση RNA και πρωτεϊνών. Άλλα τμήματα αυτών επεξεργάστηκαν κατάλληλα για ανοσοϊστοχημική χρώση και πιο συγκεκριμένα, μονιμοποιήθηκαν ολονύκτια σε 10% φορμαλίνη, στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε διάλυμα 70% αιθανόλης και τέλος, πραγματοποιήθηκε εγκλεισμός αυτών σε παραφίνη (Formalin-fixed paraffin embedded-tissues; FFPE).

### 2.5.2. Διαγονιδιακό μοντέλο μυός για την απαλοιφή της IKKa

Η κατασκευή του δυ-διαγονιδιακού μοντέλου μυός Spc-CreER<sup>T2</sup>:IKKa<sup>fl/fl</sup> προέκυψε από τη διασταύρωση διαγονιδιακών μυών Spc-CreER<sup>T2</sup> (ευγενική παραχώρηση της Καθηγήτριας Brigid Hogan, FRS, του Τμήματος Κυτταρικής Βιολογίας του Πανεπιστημίου Duke, ΗΠΑ στον κ. Ε. Κωλέττα), και διαγονιδιακών μυών IKKa<sup>fl/fl</sup> (παραχώρηση του συνεργάτη Καθηγητή Κ. Marcu). Η κατασκευή του δυ-διαγονιδιακού μοντέλου μυός Spc-CreER<sup>T2</sup>:IKKa<sup>fl/fl</sup> εγκρίθηκε από την επιτροπή IACUC (Institutional Animal Care & Use Committee) του Πανεπιστημίου Stony Brook σύμφωνα με τις οδηγίες του Αμερικανικού NIH (Stony Brook University's IACUC committee in accordance with the USA NIH grant guidelines). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (IIBEA), από τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Ευαγγελία Χαβδούλα και υπό την επίβλεψη του Δρ. Απόστολου Κλινάκη, Ερευνητή Α', και σύμφωνα με τις οδηγίες της Ομοσπονδίας Ενώσεων Εργαστηριακών Επιστημών Ζώων (Federation of Laboratory Animal Science Associations). Η φροντίδα των ζώων και όλοι οι πειραματικοί χειρισμοί είναι εγκεκριμένοι από τη Γενική Διεύθυνση Κτηνιατρικής, του ΥΑΑΤ, όπως αναφέρθηκε παραπάνω.

Για την κατασκευή του δυ-διαγονιδιακού μοντέλου μυός Spc-CreER<sup>T2</sup>:IKKa<sup>fl/fl</sup> διασταυρώθηκαν μύες που φέρουν αλληλόμορφα του γονιδίου της IKKa (*CHUK*) που περιέχουν θέσεις ανασυνδυασμού LoxP (266) με μύες Spc-CreER<sup>T2</sup> (267) οι οποίοι εκφράζουν την επαγόμενη από ταμοξιφένη ρεκομπινάση CreER<sup>T2</sup> υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *SFTPC* (Surfactant protein C) που εκφράζεται αποκλειστικά στα πνευμονοκύτταρα τύπου II (Alveolar type II; AT-II). Για την απαλοιφή της IKKa στα κύτταρα AT-II, σε δυ-διαγονιδιακούς μύες ηλικίας περίπου έξι εβδομάδων χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά 2 mg ταμοξιφένης (Sigma-Aldrich) καθημερινά για πέντε συνεχόμενες ημέρες. Για την επαγωγή της καρκινογένεσης του πνεύμονα, μια εβδομάδα μετά τη χορήγηση της ταμοξιφένης χορηγήθηκαν εβδομαδιαία ενδοπεριτοναϊκές ενέσεις

ουρεθανίου (1 g/kg) (Sigma-Aldrich) διαλυμένου σε PBS για 12 συνεχόμενες εβδομάδες. Οι μύες θυσιάστηκαν με τη μέθοδο της αυχενικής μετατόπισης 6 μήνες μετά την πρώτη ένεση ουρεθάνης για την απομόνωση και ανάλυση των όγκων (261).

## **2.6. Στατιστική ανάλυση**

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού GraphPad Prism 5 Software. Η ανάλυση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του CD82 στα δείγματα των ασθενών με NSCLC και στα δείγματα φυσιολογικού ιστού πνεύμονα πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Fisher's exact test (Εικόνα 3.22). Όλες οι υπόλοιπες αναλύσεις της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο two-tailed Student's *t* test. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων  $\pm$  τη μέση διακύμανση (SD). Η τιμή  $p$  value  $< 0.05$  θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

##### ***Ο ρόλος της μη-κανονικής πορείας ενεργοποίησης του NF-κB στο μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα***

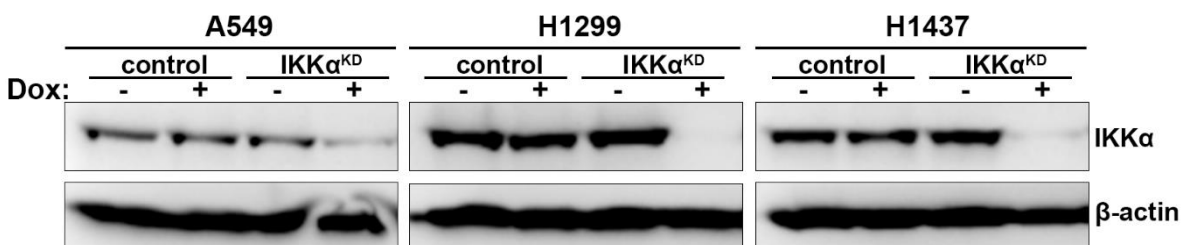
#### **3.1. Η κινάση IKKα καταστέλλει την ανάπτυξη του NSCLC *in vivo***

Όπως συζητήθηκε στην Πρώτη Ενότητα της παρούσας μελέτης, ο ρόλος της μη-κανονικής πορείας ενεργοποίησης του NF-κB στην ανάπτυξη του καρκίνου του πνεύμονα παραμένει σε μεγάλο βαθμό ασαφής και ανεξερεύνητος. Σκοπός του πρώτου μέρους της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση του ρόλου της μη-κανονικής πορείας του NF-κB και της ανοδικής κινάσης που την ενεργοποιεί, της κινάσης σερίνης/θρεονίνης IKKα, στην ανάπτυξη του μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (Non-small cell lung cancer; NSCLC).

Αρχικά πειράματα του εργαστηρίου μας, σε συνεργασία με το Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (IIBEA) και με το Τμήμα Βιοχημείας και Κυτταρικής Βιολογίας του Πανεπιστημίου Stony Brook της Νέας Υόρκης, κατέδειξαν την ογκοκατασταλτική δράση της κινάσης IKKα στο NSCLC σε ένα διαγονιδιακό μοντέλο μυός έπειτα από τη χορήγηση ουρεθανίου (urethane) (261), μιας καρκινογόνου ουσίας που χρησιμοποιείται ευρέως για την επαγωγή της καρκινογένεσης του πνεύμονα σε πειραματικά μοντέλα *in vivo* (235, 268). Πιο συγκεκριμένα, κατασκευάστηκε ένα νέο δυ-διαγονιδιακό μοντέλο μυός (Src-CreER<sup>T2</sup>:IKKα<sup>fl/fl</sup>), στο οποίο η απαλοιφή της IKKα επάγεται μετά από τη χορήγηση ταμοξιφένης, αποκλειστικά στα επιθηλιακά πνευμονοκύτταρα τύπου II (alveolar type II; AT-II). Η απαλοιφή της IKKα είχε σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση σημαντικά περισσότερων αλλά και μεγαλύτερου μεγέθους όγκων στους πνεύμονες των διαγονιδιακών ζώων (IKKα<sup>fl/fl</sup>), 6 μήνες μετά τη χορήγηση της πρώτης δόσης ουρεθανίου, σε σύγκριση με τα ζώα ελέγχου που έφεραν την αγρίου τύπου IKKα (IKKα<sup>WT</sup>) καταδεικνύοντας τον ογκοκατασταλτικό ρόλο της IKKα στην εμφάνιση και ανάπτυξη του NSCLC *in vivo* (261).

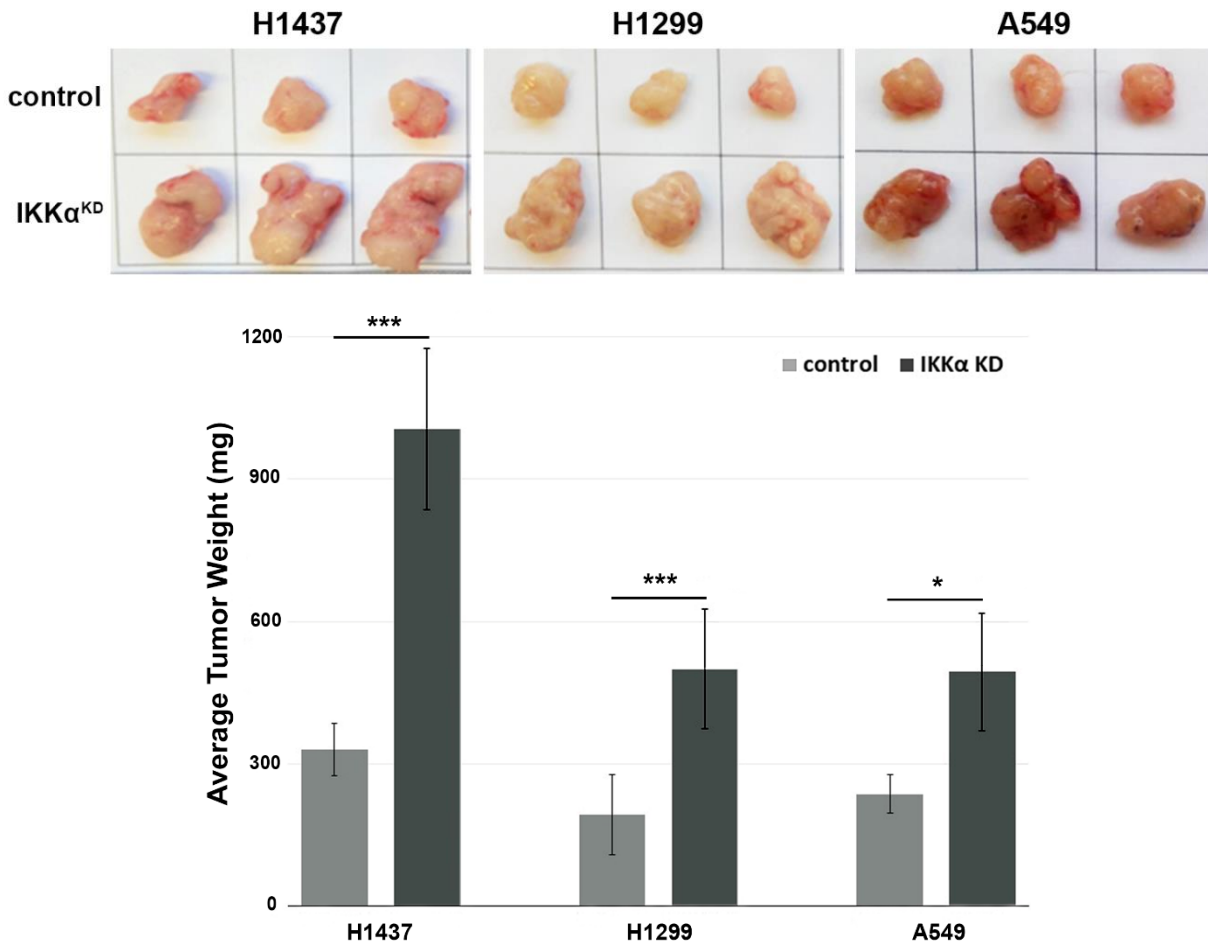
Εν συνεχεία αυτών των αποτελεσμάτων, για τη μελέτη του ρόλου της μη-κανονικής σηματοδοτικής πορείας του NF-κB στην ανάπτυξη του ανθρώπινου NSCLC, χρησιμοποιήθηκαν τρεις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές NSCLC, οι A549, H1437 και H1299, στις οποίες μειορρυθμίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης της κινάσης IKKα. Για τη μειορρύθμιση της IKKα, κύτταρα A549, H1437 και H1299 επιμολύνθηκαν με έναν επαγόμενο από δοξουκυκλίνη (Dox) λεντιικό φορέα ο οποίος κωδικοποιεί ένα sh-RNA ολιγονουκλεοτίδιο ενάντια στην IKKα (IKKα<sup>KD</sup>) (Εικόνα 2.1.), είτε με τον αντίστοιχο φορέα ελέγχου (control). Έπειτα από τη δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών με τη

χρήση πουρομυκίνης, χορηγήθηκε στα κύτταρα 1  $\mu\text{g/ml}$  δοξυκυκλίνη (Dox) για 24 ώρες για την επαγωγή της αποσιώπησης της IKK $\alpha$ . Η επιτυχής και επαγόμενη μειορρύθμιση της IKK $\alpha$  επιβεβαιώθηκε με ανοσοαποτύπωμα κατά Western σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα (Εικόνα 3.1.).



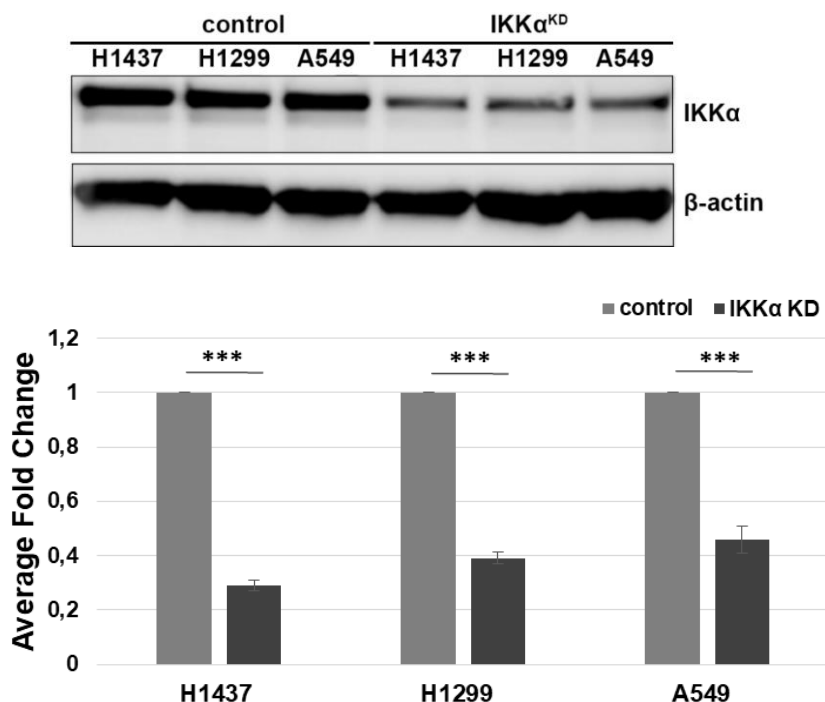
**Εικόνα 3.1. Αποσιώπηση της κινάσης IKK $\alpha$  στις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές NSCLC.** Οι κυτταρικές σειρές A549, H1437 και H1299 επιμολύνθηκαν είτε με τον πρότυπο λεντιφορέα είτε με ένα λεντιφορέα που έφερε ένα sh (small hairpin)-ολιγονουκλεοτίδιο ενάντια στην IKK $\alpha$  (IKK $\alpha^{\text{KD}}$ ) επαγόμενο από δοξυκυκλίνη (Dox). Τα κύτταρα επιλέχθηκαν σε πουρομυκίνη για την κατασκευή σταθερών κυτταρικών σειρών και τα επίπεδα έκφρασης της IKK $\alpha$  αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα κατά Western με ή χωρίς τη χορήγηση 1  $\mu\text{g/ml}$  Dox για 24 ώρες. Η  $\beta$ -ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ελέγχου.

Στη συνέχεια, για τη μελέτη του ρόλου της κινάσης IKK $\alpha$  στην ανάπτυξη του NSCLC *in vivo*, κύτταρα A549-IKK $\alpha^{\text{KD}}$ , H1437-IKK $\alpha^{\text{KD}}$  και H1299-IKK $\alpha^{\text{KD}}$  καθώς και τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου εμβολιάστηκαν υποδόρια αμφίπλευρα σε αθυμικούς μύες NSG για την ανάπτυξη όγκων. Έπειτα από τρεις εβδομάδες, οι μύες θυσιάστηκαν για την απομόνωση και ανάλυση των όγκων. Και στις τρεις περιπτώσεις, η απώλεια της IKK $\alpha$  είχε σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερων όγκων σε σύγκριση με τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου. Πιο συγκεκριμένα, η κυτταρική σειρά H1437 παρουσίασε τη μεγαλύτερη διαφορά στο μέγεθος των όγκων καθώς η αποσιώπηση της IKK $\alpha$  είχε σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη όγκων με βάρος περίπου 3.5 φορές μεγαλύτερο από τα κύτταρα ελέγχου. Ακολούθησε η κυτταρική σειρά H1299 με το βάρος των όγκων να εμφανίζεται περίπου 2.5 φορές μεγαλύτερο και τέλος η κυτταρική σειρά A549 όπου οι όγκοι που αναπτύχθηκαν ήταν περίπου 2 φορές μεγαλύτεροι σε σύγκριση με αυτούς που αναπτύχθηκαν από τα κύτταρα ελέγχου (Εικόνα 3.2.). Επομένως, τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν τον ογκοκατασταλτικό ρόλο της κινάσης IKK $\alpha$  και στην ανάπτυξη του ανθρώπινου NSCLC.



**Εικόνα 3.2.** Η μειορρύθμιση της ΙΚΚα προάγει την ανάπτυξη του NSCLC *in vivo*. Τα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα A549-IKKα<sup>KD</sup>, H1437-IKKα<sup>KD</sup> και H1299-IKKα<sup>KD</sup> καθώς και τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου εμβολιάστηκαν υποδόρια αμφίπλευρα σε αθυμικούς μύες NSG για την ανάπτυξη όγκων. Έπειτα από 3 εβδομάδες, οι μύες θυσιάστηκαν για την απομόνωση και ανάλυση των όγκων. Αντιπροσωπευτικοί όγκοι των κυττάρων που αναπτύχθηκαν ως ξενομοσχεύματα *in vivo* (A549 n=5, H1437 n=6, H1299 n=7). Η μειορρύθμιση της ΙΚΚα έχει σαν αποτέλεσμα τη στατιστικά σημαντική αύξηση του μεγέθους των όγκων (\*p<0.05, \*\*\*p<0.0001).

Για να επιβεβαιωθεί ότι η διαφορά στο μέγεθος των όγκων που αναπτύχθηκαν οφείλεται στην απώλεια της έκφρασης της ΙΚΚα, απομονώθηκαν ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από τους όγκους που αναπτύχθηκαν από τα κύτταρα ΙΚΚα<sup>KD</sup> και τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου, τα οποία αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα κατά Western για την έκφραση της ΙΚΚα (Εικόνα 3.3.). Και στις τρεις περιπτώσεις η ΙΚΚα παρουσίασε στατιστικά σημαντική μειωμένη έκφραση.



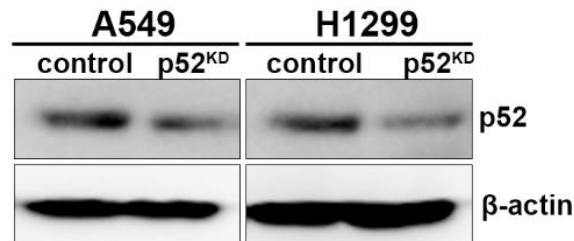
**Εικόνα 3.3.** Επίπεδα έκφρασης της IKKα στους όγκους που αναπτύχθηκαν από τις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές NSCLC ως ξενομοσχεύματα *in vivo*. Ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που απομονώθηκαν από τους όγκους που αναπτύχθηκαν μετά τον υποδόριο ενοφθαλμισμό κυττάρων ελέγχου και A549-IKKα<sup>KD</sup>, H1437-IKKα<sup>KD</sup> και H1299-IKKα<sup>KD</sup> σε αθυμικούς μύες NSG, αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα κατά Western για την έκφραση της IKKα και της β-ακτίνης που χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας αναφοράς (n=3, \*\*\*p<0.001).

### 3.2. Η ογκοκατασταλτική δράση της κινάσης IKKα είναι ανεξάρτητη από την ενεργοποίηση της μη κανονικής πορείας του NF-κΒ

Όπως συζητήθηκε στην Ενότητα 1.5., οι κινάσες IKKα και IKKβ μπορούν να φωσφορυλιώσουν και άλλα υποστρώματα ανεξάρτητα από την ενεργοποίηση των μεταγραφικών υπομονάδων του NF-κΒ, ρυθμίζοντας έτσι ποικίλες κυτταρικές διαδικασίες. Επομένως, στη συνέχεια, για να μελετηθεί εάν η ογκοκατασταλτική δράση της κινάσης IKKα, όπως προέκυψε από τα αποτελέσματά μας, σχετίζεται με την ενεργοποίηση του NF-κΒ, κατασκευάστηκαν κυτταρικές σειρές με μειωμένη έκφραση της υπομονάδας p52, της κύριας υπομονάδας της μη-κανονικής πορείας που ενεργοποιείται από την IKKα, και σχηματίζει λειτουργικά, ενεργά ετεροδιμερή RelB/p52 τα οποία δεσμεύονται σε υποκινητές γονιδίων-στόχων τους και επάγουν την έκφρασή τους. Για τη μειορρύθμιση των επιπέδων του p52, οι κυτταρικές σειρές A549 και H1299 επιμολύνθηκαν με τον ρετροϊκό φορέα pSuper.retro-shp52 (p52<sup>KD</sup>) ή με τον πρότυπο ρετροϊκό φορέα ελέγχου pSuper.retro-vector (control). Μετά την επιλογή των επιμολυσμένων κυττάρων με τη χρήση πουρομυκίνης για



την κατασκευή σταθερών κυτταρικών σειρών, απομονώθηκαν ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα τα οποία αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα κατά Western για τα επίπεδα έκφρασης του p52, όπου και επιβεβαιώθηκε η επιτυχής μείωση της πρωτεϊνικής του έκφρασης (Εικόνα 3.4.).

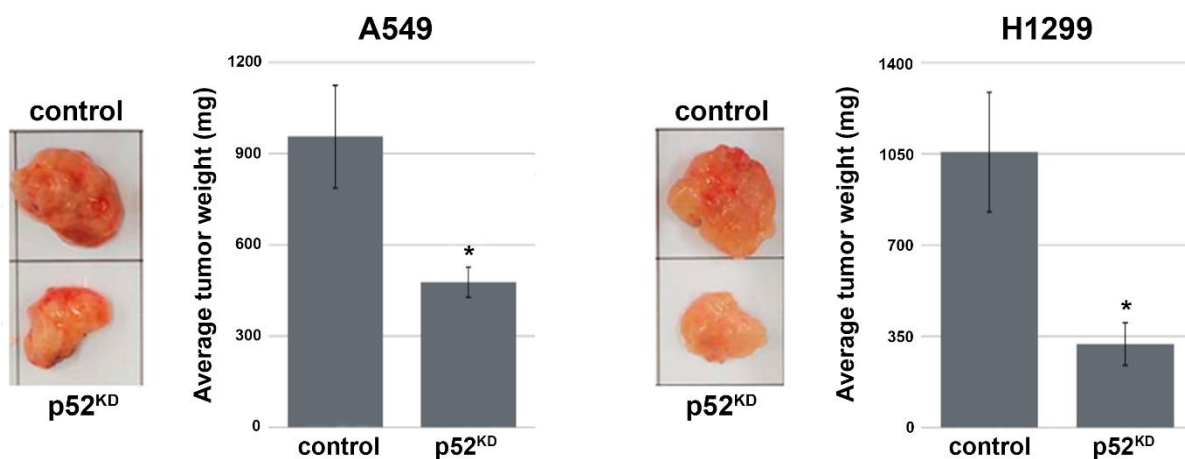


**Εικόνα 3.4. Μειορρύθμιση της υπομονάδας p52 στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα.** Οι κυτταρικές σειρές A549 και H1299 επιμολύνθηκαν με τον ρετροϊκό φορέα pSuper.retro-shp52 (p52<sup>KD</sup>) ή τον αντίστοιχο ρετροϊκό φορέα ελέγχου pSuper.retro-vector (control). Τα κύτταρα επιλέχθηκαν σε πουρομυκίνη για την κατασκευή σταθερών κυτταρικών σειρών και τα επίπεδα έκφρασης της p52 αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα κατά Western. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας αναφοράς.

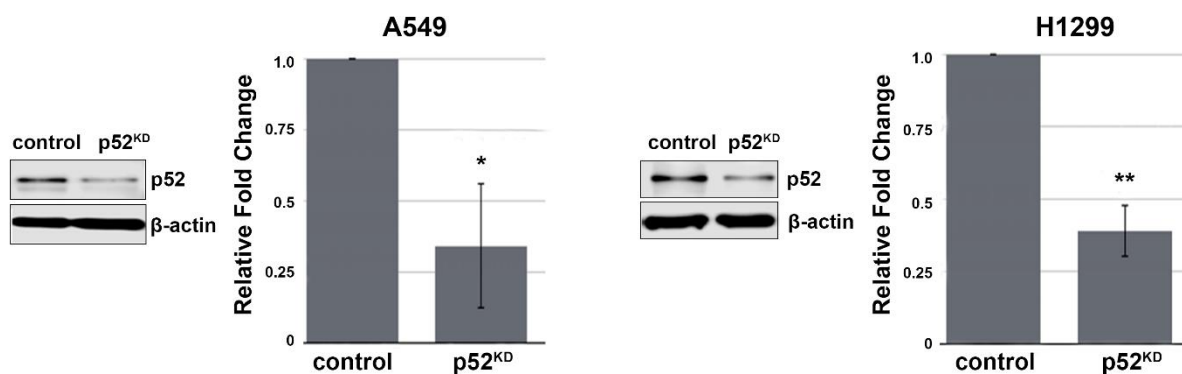
Στη συνέχεια, για τη μελέτη του ρόλου της υπομονάδας p52 στην ανάπτυξη του NSCLC *in vivo*, τα κύτταρα p52<sup>KD</sup> καθώς και τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου εμβολιάστηκαν υποδόρια αμφίπλευρα σε αθυμικούς μύες NSG για την ανάπτυξη όγκων. Μετά το πέρας τεσσάρων εβδομάδων οι μύες θυσιάστηκαν για την απομόνωση των όγκων. Και στις δύο περιπτώσεις η μειορρύθμιση της υπομονάδας p52 είχε σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη στατιστικά σημαντικά μικρότερων όγκων σε σύγκριση με τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου (Εικόνα 3.5.A.).

Για να επιβεβαιωθεί η μειορρύθμιση του p52 στους όγκους των μυών, απομονώθηκαν ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από τους όγκους που προέκυψαν από τα p52<sup>KD</sup> κύτταρα και τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου, τα οποία αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα κατά Western για την έκφραση του p52. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν την επιτυχή μειορρύθμιση της υπομονάδας p52 κατά τη διάρκεια ανάπτυξης των όγκων *in vivo* (Εικόνα 3.5.B.).

A



B



**Εικόνα 3.5. Ο παράγοντας p52 προάγει την ανάπτυξη του NSCLC *in vivo*.** Μετά τον υποδόριο ενοφθαλμισμό κυττάρων ελέγχου και A549-p52<sup>KD</sup> ή H1299-p52<sup>KD</sup> σε αθυμικούς μύες NSG, τα ζώα διατηρήθηκαν για ένα διάστημα 4 εβδομάδων κατά το οποίο ανέπτυξαν όγκους. (A) Αντιπροσωπευτικές εικόνες των όγκων που απομονώθηκαν από τους αθυμικούς μύες. Στα διαγράμματα απεικονίζεται το μέσο βάρος των όγκων σε χιλιογραμμάρια (A549 n=6, H1299 n=5, \*p<0.05). (B) Ανάλυση ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων που απομονώθηκαν από τους όγκους με ανοσοαποτύπωμα κατά Western για την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα p52 και της β-ακτίνης ως μάρτυρα αναφοράς (n=3, \*\*\*p<0.001).

Τα αποτελέσματα αυτά παρουσίασαν ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς η κινάση IKKα φαίνεται να αναστέλλει την ανάπτυξη του NSCLC *in vivo*, ενώ αντίθετα η κύρια υπομονάδα του NF-κB που ενεργοποιείται διαμέσου της μη-κανονικής πορείας, η p52, παρουσιάζει αντίθετη δράση, προάγοντας την ανάπτυξη του NSCLC. Επομένως, τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν ότι η ογκοκατασταλτική δράση της κινάσης IKKα στην ανάπτυξη του NSCLC είναι ανεξάρτητη από την ενεργοποίηση της υπομονάδας p52 του NF-κB, και κατ' επέκταση της μη-κανονικής πορείας ενεργοποίησης του NF-κB.

Δεδομένου των αντικρουόμενων αποτελεσμάτων που υπάρχουν μέχρι σήμερα για το ρόλο και τη δράση της κινάσης IKKα στον καρκίνο του πνεύμονα, στη συνέχεια της παρούσας μελέτης αποφασίσαμε να εστιάσουμε το ενδιαφέρον μας στη διερεύνηση του πιθανού μοριακού μηχανισμού δράσης της κινάσης IKKα διαμέσου του οποίου αναστέλλει την ανάπτυξη του NSCLC σε αυτά τα δύο διαφορετικά μοντέλα μυός.

### 3.3. Ταυτοποίηση γονιδίων που ρυθμίζονται από την IKKα

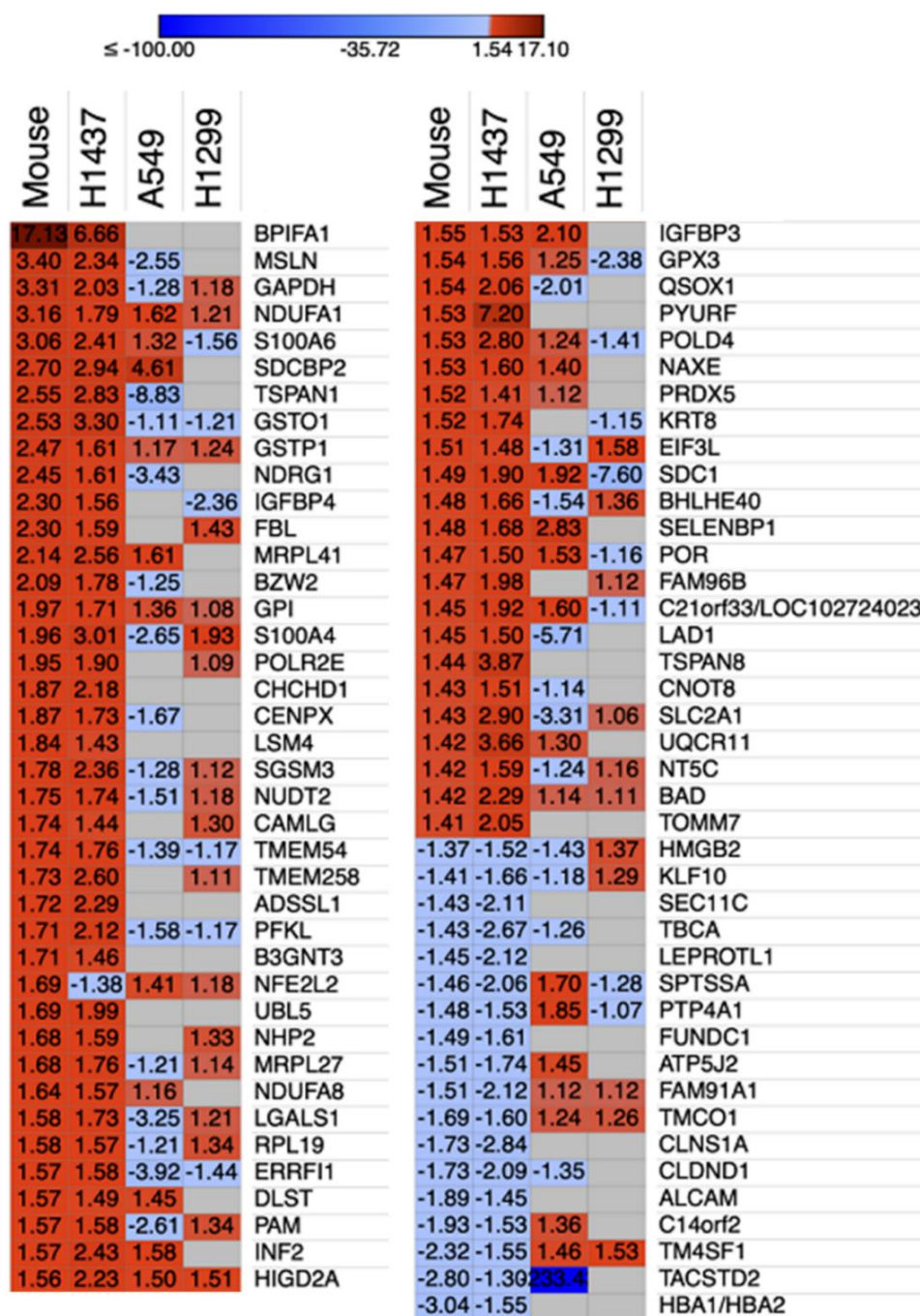
Στην προσπάθεια ταυτοποίησης ενός εξελικτικά συντηρημένου μηχανισμού δράσης της κινάσης IKKα στην ανάπτυξη του NSCLC μεταξύ του μυός και του ανθρώπου, απομονώθηκαν δείγματα RNA από τους μεγάλους όγκους που αναπτύχθηκαν στους πνεύμονες των διαγονιδιακών μυών μετά τη χορήγηση ουρεθανίου ως αποτέλεσμα της αποσιώπησης της κινάσης IKKα (IKKα<sup>ff</sup>), αλλά και από τους μικρούς όγκους που αναπτύχθηκαν στους πνεύμονες των διαγονιδιακών ζώων ελέγχου (IKKα<sup>WT</sup>). Επίσης, απομονώθηκαν δείγματα RNA από τους όγκους που αναπτύχθηκαν στους αθυμικούς μύες μετά τον εμβολιασμό τους με τις ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές A549-IKKα<sup>KD</sup>, H1299-IKKα<sup>KD</sup> και H1437-IKKα<sup>KD</sup> αλλά και τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου. Τα δείγματα αυτά υποβλήθηκαν σε ανάλυση αλληλούχισης RNA (RNA-seq) στο Ελληνικό Κέντρο Γονιδιωματικής Έρευνας (Μονάδα Μεταφραστικής Έρευνας του Καρκίνου) του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (IIBEAA), και ακόλουθη βιοπληροφορική ανάλυση για την ταυτοποίηση κοινών διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων κατά την αποσιώπηση της κινάσης IKKα.

Η εκτενής βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων της αλληλούχισης του RNA με το πρόγραμμα Ingenuity pathway βασισμένη στο λογισμικό Morpheus του Broad Institute of MIT and Harvard Universities (<https://software.broadinstitute.org/morpheus>) (πραγματοποιήθηκε από τον Dr. David Habiels, Cedars-Sinai Medical Center, LA, CA, USA) κατέδειξε αρκετά κοινά μεταβαλλόμενα γονίδια μεταξύ του διαγονιδιακού μοντέλου μυός και της κυτταρικής σειράς H1437. Ενδιαφέρον παρουσίασαν αρκετά γονίδια τα οποία αποτελούν στόχους του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α και συμμετέχουν στη γλυκολυτική πορεία, όπως είναι τα γονίδια *GAPDH* (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; Αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεύδης), *GPI* (Glucose-6-Phosphate Isomerase; Ισομεράση της 6-φωσφορικής γλυκόζης), *PFKL* (6-Phosphofructokinase; 6-Φωσφοφρουκτοκινάση), και *SLC2A1* (Glucose Transporter Type 1 ή GLUT1; Μεταφοράς της γλυκόζης GLUT1) (269, 270) (Εικόνα 3.6).

Επίσης η βιοπληροφορική ανάλυση κατέδειξε μια αύξηση της τάξης του 1.5-2.0 φορές της έκφρασης του γονιδίου *HIGD2A* (Hypoxia-inducible domain family member 2A) τόσο στο διαγονιδιακό μοντέλο μύος όσο και στις τρεις ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές NSCLC μετά την αποσιώπηση της IKKα (Εικόνα 3.6.). Το *HIGD2A* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη HIGD2A, που αποτελεί έναν παράγοντα συναρμολόγησης/συγκρότησης (assembly factor) του συμπλόκου IV ή αλλιώς της οξειδάσης του κυτοχρώματος c, του τελικού ενζύμου της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων της αναπνευστικής πορείας στα μιτοχόνδρια. Ελάχιστες παλαιότερες αλλά και μεταγενέστερες μελέτες κατέδειξαν ότι η πρωτεΐνη HIGD2A ρυθμίζεται από τον μεταγραφικό παράγοντα HIF-1α και προάγει την επιβίωση των κυττάρων σε συνθήκες υποξίας (271-273). Να σημειωθεί ότι κάτω από συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης τα κύτταρα προσαρμόζουν ένα γλυκολυτικό (αναερόβιο) φαινότυπο (παράγουν 2 μόρια ATP), ενώ σε συνθήκες φυσιολογικής ή χαμηλής συγκέντρωσης γλυκόζης τα κύτταρα μεταβολίζουν αερόβια και παράγουν 36 μόρια ATP μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Μια πρόσφατη μελέτη κατέδειξε ότι η έκφραση της πρωτεΐνης HIGD2A επάγεται σε συνθήκες υποξίας υπό την παρουσία υψηλής αλλά όχι χαμηλής συγκέντρωσης γλυκόζης, υποδηλώνοντας ένα ρόλο της HIGD2A στη μιτοχονδριακή λειτουργία κάτω από συνθήκες υποξίας (272).

Σε αυτό το πλαίσιο, έχει καταδειχθεί ότι ο HIF-1α διαμορφώνει επίσης τη λειτουργία της αλυσίδας μεταφοράς των ηλεκτρονίων κατά την υποξία μέσω της ανακατάταξης των υπομονάδων του συμπλοκου IV/οξειδάσης του κυτοχρώματος c. Αυτή η μεταβολή πιθανά συμβάλλει στην αποτελεσματικότητα του συμπλόκου IV υπό μειωμένες συνθήκες οξυγόνου και στο να αποτρέψει μια αναποτελεσματική μεταφορά ηλεκτρονίων καθώς επίσης και την πιθανή παραγωγή ROS από τα μιτοχόνδρια κατά την υποξία (274). Συνολικά φαίνεται ότι ο HIF-1α αυξάνει τη γλυκολυτική πορεία αλλά διατηρεί και τη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας υπό συνθήκες υποξίας.

Επομένως, με βάση τα παραπάνω και το γεγονός ότι αρκετά γονίδια που ταυτοποιήθηκαν με βιοπληροφορική ανάλυση αποτελούν στόχους του HIF-1α, μελετήθηκε στη συνέχεια κατά πόσο η IKKα μπορεί να επηρεάζει την ενεργοποίηση του παράγοντα HIF-1α και την ανάπτυξη των κυττάρων σε συνθήκες υποξίας.

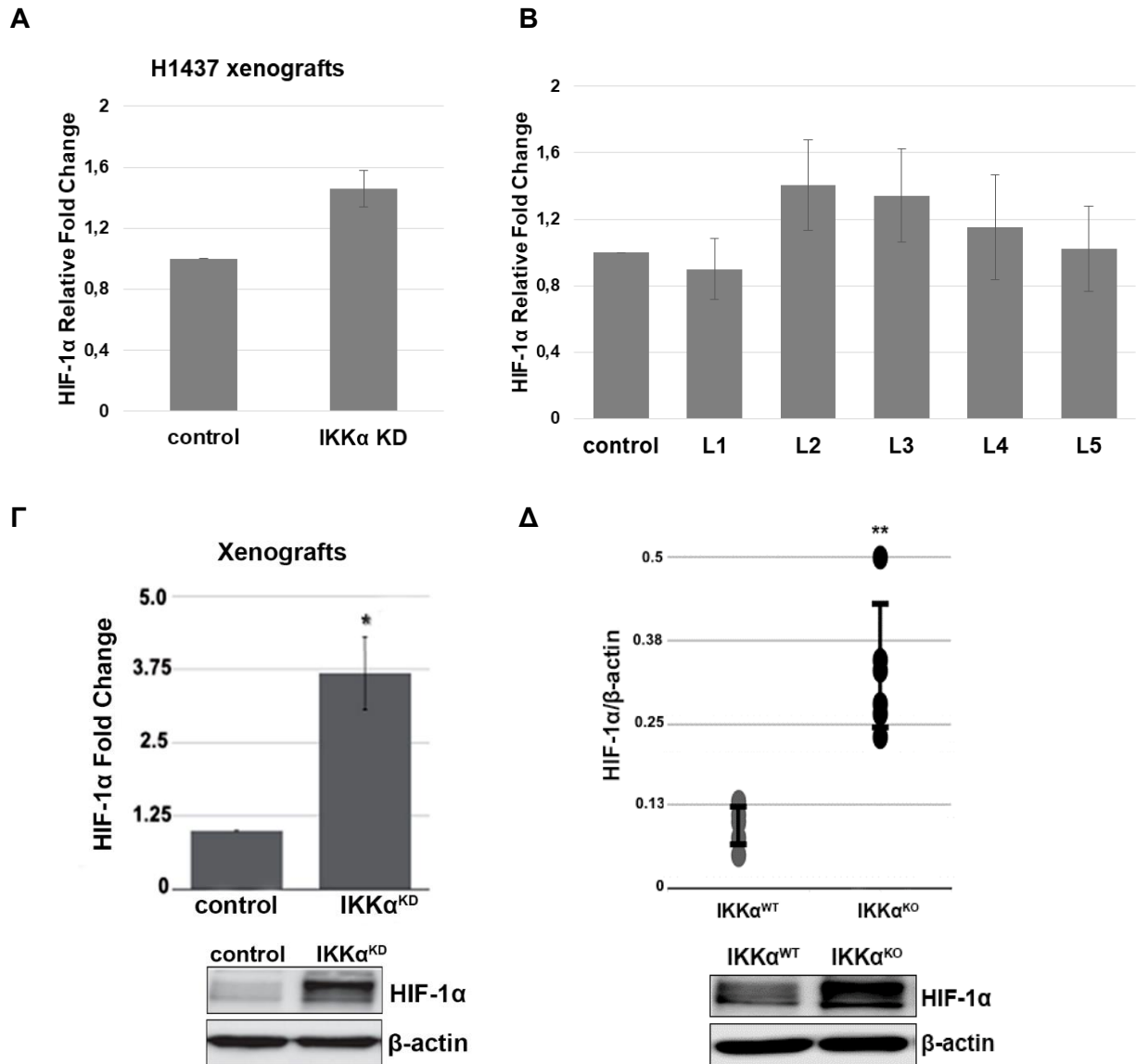


**Εικόνα 3.6. Διαφορική έκφραση γονιδίων έπειτα από τη μειορρύθμιση της κινάσης IKKα.** Χάρτης θερμότητας (Heat map) για τη διαφορική έκφραση γονιδίων έπειτα από την απαλοιφή της IKKα στους διαγονιδιακούς μύες (mouse) αλλά και την αποσιώπηση της IKKα στις 3 ανθρώπινες κυτταρικές σειρές πνεύμονα H1437, A549 και H1299, οι οποίες εμβολιάστηκαν σε αθυμικούς μύες NSG, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα δείγματα ελέγχου σε κάθε περίπτωση. Η ανάλυση προέκυψε μετά από βιοπληροφορική ανάλυση με βάση το πρόγραμμα Ingenuity pathway. Η κλίμακα αντιστοιχεί στον πολλαπλάσιο βαθμό διαφορικής έκφρασης των γονιδίων σε σύγκριση με τα αντίστοιχα δείγματα ελέγχου.

### 3.4. Η IKKα καταστέλλει την ανάπτυξη του NSCLC περιορίζοντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε συνθήκες υποξίας

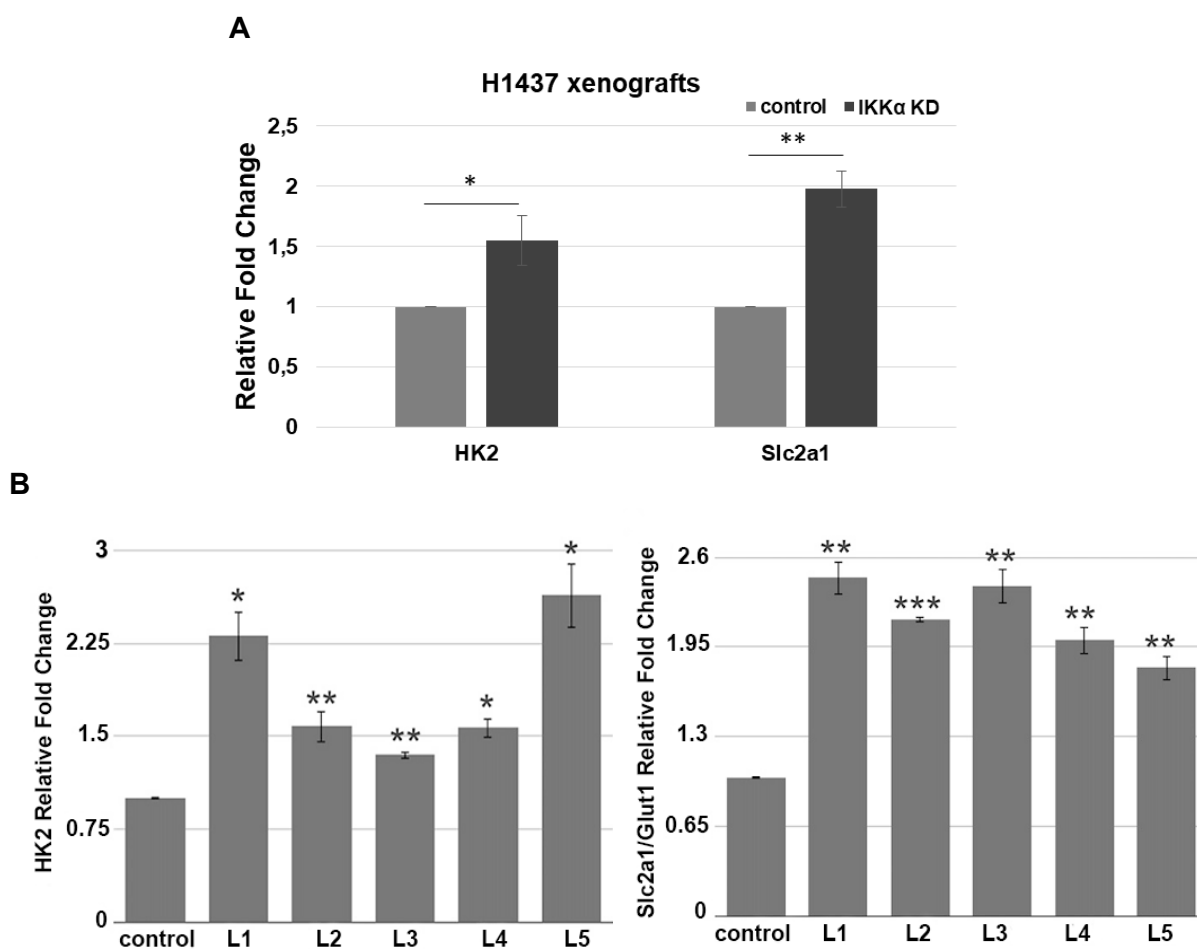
Για να διερευνηθεί κατά πόσο η IKKα μπορεί να καταστέλλει την ανάπτυξη του NSCLC διαμέσου της ρύθμισης του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α και των πορειών που ενεργοποιούνται σε συνθήκες υποξίας, μελετήθηκε, αρχικά, με qPCR η έκφραση του HIF-1α σε δείγματα ολικού RNA που απομονώθηκαν από τους μεγάλους όγκους που αναπτύχθηκαν στους διαγονιδιακούς μύες έπειτα από την αποσιώπηση της IKKα (IKKα<sup>KO</sup>) σε σύγκριση με τους μικρότερους όγκους που αναπτύχθηκαν στα διαγονιδιακά ζώα ελέγχου (IKKα<sup>WT</sup>) και σε δείγματα από τους όγκους που αναπτύχθηκαν από τα κύτταρα ελέγχου και τα H1437-IKKα<sup>KD</sup> ως ξενομοσχεύματα *in vivo*. Τα αποτελέσματα δεν κατέδειξαν καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης του HIF-1α, τόσο στους διαγονιδιακούς μύες (Εικόνα 3.7.B.) όσο και στους όγκους που αναπτύχθηκαν από τα κύτταρα H1437 (Εικόνα 3.7.A.), έπειτα από την αποσιώπηση της IKKα, γεγονός που καταδεικνύει ότι η IKKα δεν ρυθμίζει τα επίπεδα του HIF-1α σε μεταγραφικό επίπεδο.

Επομένως, στη συνέχεια μελετήθηκαν τα επίπεδα του HIF-1α σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Για το σκοπό αυτό απομονώθηκαν ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από κύτταρα H1437-IKKα<sup>KD</sup> και κύτταρα ελέγχου που αναπτύχθηκαν ως ξενομοσχεύματα *in vivo*, αλλά και από τους μεγάλους IKKα<sup>KO</sup> και τους μικρούς IKKα<sup>WT</sup> όγκους των διαγονιδιακών ζώων. Τα δείγματα αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα κατά Western όπου παρατηρήθηκε η στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης του HIF-1α κατά την απώλεια της IKKα και στις δύο περιπτώσεις κατά περίπου τρεις με τέσσερις φορές (Εικόνα 3.7. Γ,Δ). Επομένως, η απώλεια της IKKα φαίνεται να προάγει την σταθερότητα και ενεργοποίηση του παράγοντα HIF-1α.



**Εικόνα 3.7. Η IKKα προάγει την σταθερότητα του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α.** (A) Έκφραση του παράγοντα HIF-1α σε ολικά δείγματα RNA που απομονώθηκαν από τους όγκους που αναπτύχθηκαν από τα κύτταρα ελέγχου και τα κύτταρα H1437-IKKα<sup>KD</sup> (n=3) και (B) από τους μεγάλους όγκους (n=5, L1-L5) που απομονώθηκαν από τους διαγονιδιακούς μύες IKKα<sup>KO</sup> σε σύγκριση με τους μικρούς όγκους (n=3) που αναπτύχθηκαν στα διαγονιδιακά ζώα ελέγχου (IKKα<sup>WT</sup>) (control). Η έκφραση του HIF-1α δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές. Ως γονίδιο ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η έκφραση του 18S rRNA. (Γ) Ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που απομονώθηκαν από κύτταρα H1437-IKKα<sup>KD</sup> που αναπτύχθηκαν ως ξενομοσχεύματα *in vivo* (n=3), αλλά και (Δ) από τους μεγάλους όγκους που αναπτύχθηκαν στα διαγονιδιακά ζώα IKKα<sup>KO</sup> (n=6), αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα κατά Western για τα επίπεδα έκφρασης του παράγοντα HIF-1α σε σύγκριση με τα αντίστοιχα δείγματα ελέγχου (\*p<0.05, \*\*p<0.01).

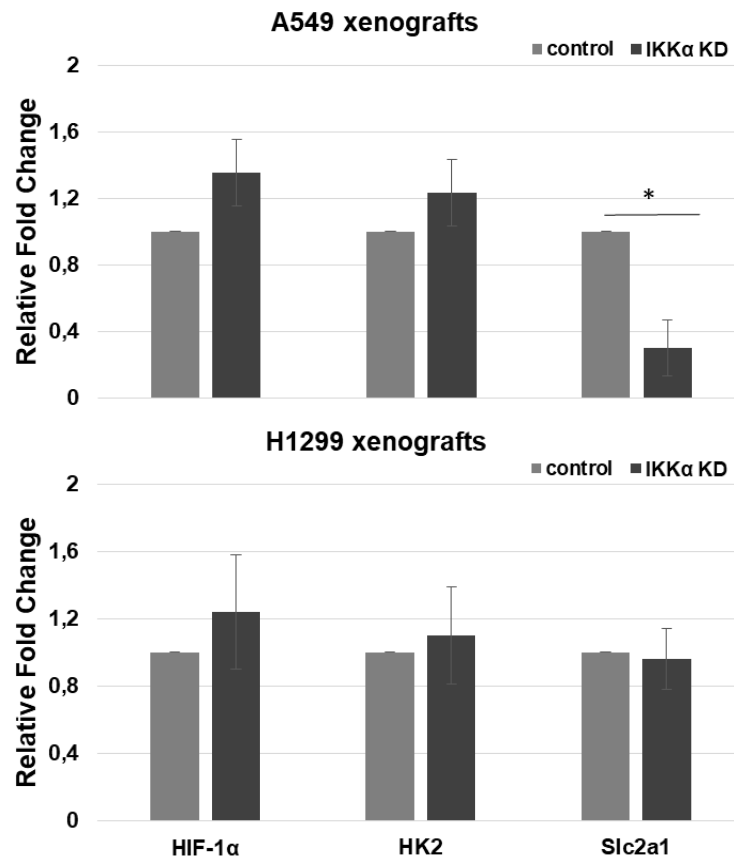
Στη συνέχεια, μελετήθηκε με qPCR η έκφραση δύο επιλεγμένων στόχων του HIF-1α, των *SLC2A1* και *HK2* που κωδικοποιούν το μεταφορέα της γλυκόζης 1 (Glut1) και την εξοκινάση 2, αντίστοιχα, μόρια τα οποία αποτελούν σημαντικούς ρυθμιστές της γλυκολυτικής πορείας. Η έκφραση των *SLC2A1* και *HK2* μελετήθηκε σε δείγματα RNA των μεγάλων όγκων των διαγονιδιακών ζώων σε σύγκριση με τους μικρούς όγκους από ζώα ελέγχου και των όγκων που αναπτύχθηκαν από τα κύτταρα H1437-IKKα<sup>KD</sup> και τα κύτταρα ελέγχου. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν τη στατιστικά σημαντική αύξηση και των δύο γονιδίων στόχων του HIF-1α και στις δύο περιπτώσεις, και ιδιαίτερα του *SLC2A1* (Εικόνα 3.8).



**Εικόνα 3.8. Επίπεδα έκφρασης των *HK2* και *SLC2A1* στους διαγονιδιακούς μύες και τους όγκους που αναπτύχθηκαν από τα κύτταρα H1437-IKKα<sup>KD</sup>.** Έκφραση των *HK2* και *SLC2A1* σε ολικά δείγματα RNA που απομονώθηκαν από τους όγκους που αναπτύχθηκαν από τα κύτταρα ελέγχου και τα H1437-IKKα<sup>KD</sup> (n=3), ως ξενομοσχεύματα *in vivo* (A), και από τους μεγάλους όγκους (n=5, L1-L5) που απομονώθηκαν από τους διαγονιδιακούς μύες IKKα<sup>KO</sup> σε σύγκριση με τους μικρούς όγκους (n=3) που αναπτύχθηκαν στα διαγονιδιακά ζώα ελέγχου (IKKα<sup>WT</sup>) (control) (B). Ως γονίδιο ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η έκφραση του 18S rRNA (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).



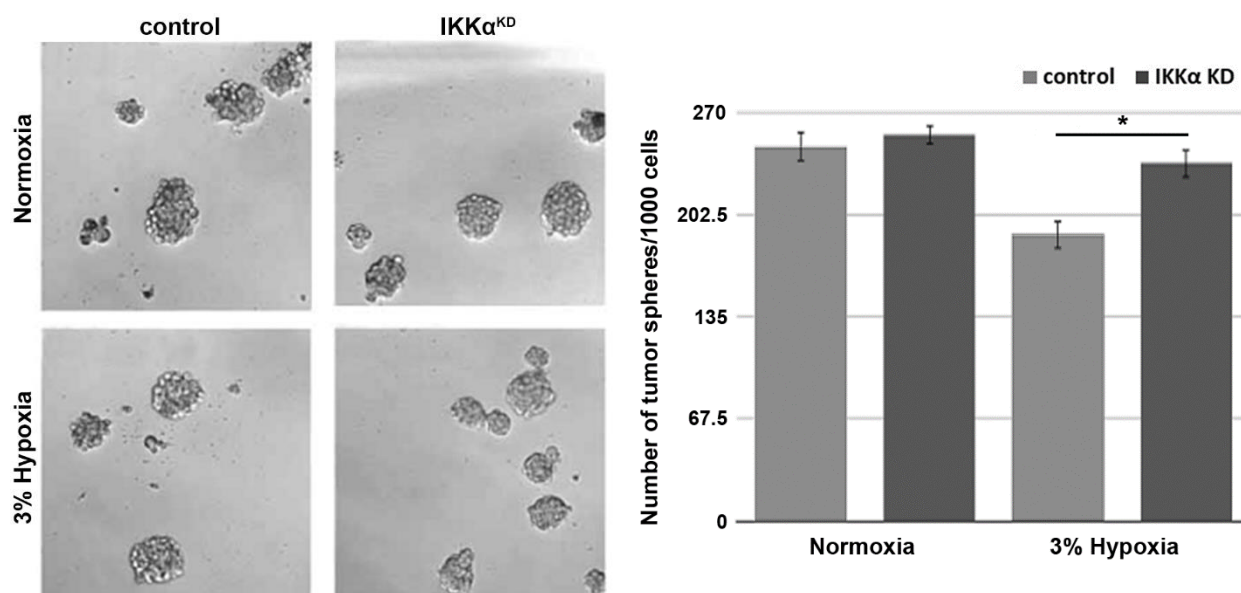
Η έκφραση των *HIF1A*, *HK2* και *SLC2A1* μελετήθηκε με qPCR και σε δείγματα RNA των όγκων που αναπτύχθηκαν από τις κυτταρικές σειρές A549-IKKα<sup>KD</sup> και H1299-IKKα<sup>KD</sup> όπου σύμφωνα και με τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές (Εικόνα 3.9.). Μάλιστα, στα κύτταρα A549-IKKα<sup>KD</sup> η έκφραση του *SLC2A1* φαίνεται να μειώνεται κατά την αποσιώπηση της IKKα, καταδεικνύοντας την ύπαρξη ενός διαφορετικού μηχανισμού ρύθμισης σε αυτά τα κύτταρα.



**Εικόνα 3.9.** Επίπεδα έκφρασης των *HIF1A*, *HK2* και *SLC2A1* στους τους όγκους που αναπτύχθηκαν από τα κύτταρα A549-IKKα<sup>KD</sup> και H1299-IKKα<sup>KD</sup>. Έκφραση των *HIF1A*, *HK2* και *SLC2A1* σε ολικά δείγματα RNA που απομονώθηκαν από τους όγκους που αναπτύχθηκαν από τα κύτταρα A549-IKKα<sup>KD</sup> και H1299-IKKα<sup>KD</sup> και τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου (n=3). Ως γονίδιο ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η έκφραση του 18S rRNA (\*p<0.05).

Μολονότι η απώλεια της IKKα φαίνεται να προάγει την σταθερότητα και ενεργοποίηση του HIF-1α, για να επιβεβαιωθεί ότι η αύξηση της ανάπτυξης των όγκων που παρατηρείται κατά την απώλεια της IKKα, οφείλεται, τουλάχιστον εν μέρει, στη δράση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α και στην ικανότητα των κυττάρων να αναπτύσσονται καλύτερα σε συνθήκες υποξίας, καλλιεργήθηκαν κύτταρα ελέγχου και κύτταρα H1437-IKKα<sup>KD</sup> σε

πολυτροβλία χαμηλής συγγένειας ως εναιώρημα για το σχηματισμό σφαιρών (tumor sphere formation assay) τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες όσο και σε συνθήκες ήπιας υποξίας (3%). Τα αποτελέσματα κατέδειξαν ότι ενώ σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου τα κύτταρα σχηματίζουν σφαίρες με τον ίδιο ρυθμό ανεξάρτητα από την έκφραση της ΙΚΚα, σε συνθήκες υποξίας η ΙΚΚα φαίνεται να καταστέλλει τη δημιουργία σφαιρών σε σύγκριση με τα κύτταρα ΙΚΚα<sup>KD</sup> τα οποία αναπτύσσονται καλύτερα σε συνθήκες υποξίας (Εικόνα 3.10.)



**Εικόνα 3.10.** Η ΙΚΚα αναστέλλει την ανάπτυξη σφαιρών *in vitro* σε συνθήκες υποξίας. Κύτταρα ελέγχου και κύτταρα H1437-ΙΚΚα<sup>KD</sup> καλλιεργήθηκαν *in vitro* ως εναιωρήματα για το σχηματισμό τρισδιάστατων σφαιρών σε συνθήκες φυσιολογικού οξυγόνου και σε συνθήκες ήπιας υποξίας (3%) για επτά ημέρες (\* $p < 0,05$ ), και παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες των κυττάρων.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα του πρώτου μέρους της παρούσας μελέτης κατέδειξαν τον ογκοκατασταλτικό ρόλο της κινάσης ΙΚΚα στην ανάπτυξη και εξέλιξη του NSCLC, τόσο σε ένα νέο διαγονιδιακό μοντέλο μυός στο οποίο η ΙΚΚα στοχεύεται στα πνευμονοκύτταρα τύπου II, τον κύριο κυτταρικό τύπο αδενοκαρκινωμάτων NSCLC (201, 216, 217, 275), όσο και σε τρεις ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές οι οποίες αναπτύχθηκαν ως ξενομοσχεύματα *in vivo*. Η δράση αυτή, ωστόσο, της ΙΚΚα φαίνεται να είναι ανεξάρτητη από την ενεργοποίηση της μη κανονικής πορείας ενεργοποίησης του NF-κΒ, καθώς η κύρια υπομονάδα που ενεργοποιείται διαμέσου αυτής της πορείας, η υπομονάδα p52, παρουσίασε αντίθετη δράση και προήγαγε την ανάπτυξη του NSCLC *in vivo*.

Επιπλέον, η ογκοκατασταλτική δράση της κινάσης ΙΚΚα τόσο στο μοντέλο μυός όσο και στον ανθρώπινο NSCLC φαίνεται να βασίζεται, τουλάχιστον εν μέρει, στην παρεμβολή της δράσης του μεταγραφικού παράγοντα HIF1-α, ο οποίος επάγεται σε συνθήκες υποξίας, και την ακόλουθη ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων του, όπως τα γονίδια *SLC2A1* και *HK2*.

Συνολικά, το πρώτο μέρος της παρούσας μελέτης κατέδειξε έναν πιθανό, νέο, εξελικτικά συντηρημένο μηχανισμό δράσης της κινάσης ΙΚΚα στο NSCLC διαμέσου του οποίου η ΙΚΚα καταστέλλει την ανάπτυξη του NSCLC μέσω της αρνητικής ρύθμισης του HIF-1α και των γονιδίων στόχων του. Ο μηχανισμός αποσταθεροποίησης του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α από την ΙΚΚα παραμένει άγνωστος και αποτελεί αντικείμενο περαιτέρω διερεύνησης.

## ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

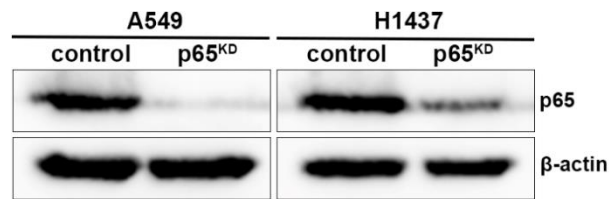
### Ο ρόλος της κανονικής πορείας ενεργοποίησης του NF-κΒ στο μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα

#### 3.5. Η κανονική πορεία του NF-κΒ προάγει την ανάπτυξη του NSCLC *in vivo*

Η κανονική πορεία ενεργοποίησης του NF-κΒ είναι γνωστό ότι στην πλειοψηφία των περιπτώσεων προάγει την ανάπτυξη διαφόρων τύπων καρκίνου συμπεριλαμβανομένου και του NSCLC. Ωστόσο, ο μοριακός μηχανισμός δράσης της κανονικής πορείας του NF-κΒ στον καρκίνο του πνεύμονα δεν έχει διευκρινιστεί, καθώς ελάχιστες μελέτες εστιάστηκαν στην ταυτοποίηση γονιδίων-στόχων της που προάγουν την ανάπτυξη του NSCLC.

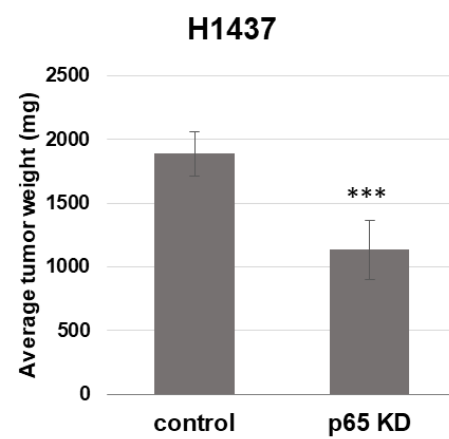
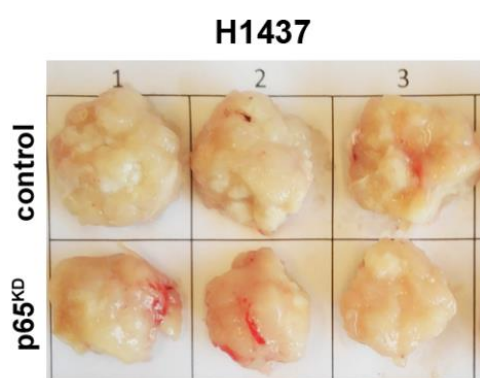
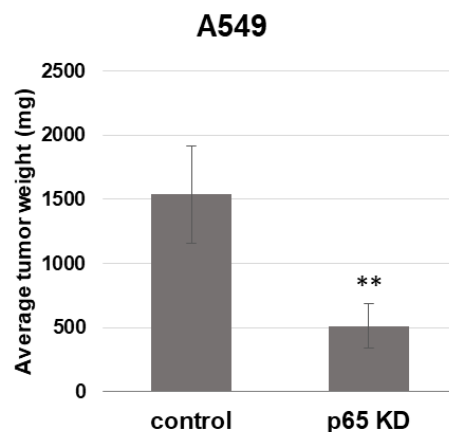
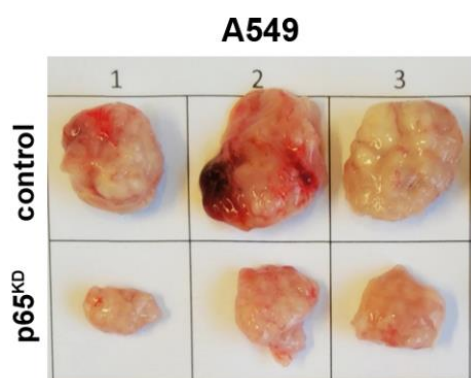
Σκοπός του δεύτερου μέρους της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση του ρόλου της κανονικής σηματοδοτικής πορείας του NF-κΒ στην ανάπτυξη του NSCLC, η ταυτοποίηση νέων πιθανών στόχων του NF-κΒ p65, αλλά και η διερεύνηση του πιθανού μηχανισμού δράσης τους στον NSCLC. Όπως και στην περίπτωση της μη-κανονικής πορείας, έτσι και για τη μελέτη του ρόλου της κανονικής πορείας ενεργοποίησης του NF-κΒ στο NSCLC, σε συνεργασία με το IBEA, κατασκευάστηκε ένα διαγονιδιακό μοντέλο μύος (Src-CreER<sup>T2</sup>:IKKβ<sup>fl/fl</sup>), στο οποίο η απαλοιφή της IKKβ επάγεται μετά τη χορήγηση ταμοξιφένης, αποκλειστικά στα επιθηλιακά πνευμονοκύτταρα AT-II. Στους μύες χορηγήθηκε η καρκινογόνος ουσία ουρεθάνιο για το σχηματισμό όγκων και οι μύες θυσιάστηκαν μετά από έξι μήνες για την ανάλυση των όγκων. Η απαλοιφή της IKKβ είχε σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση στατιστικά σημαντικά λιγότερων αλλά και μικρότερου μεγέθους όγκων στους πνεύμονες των διαγονιδιακών ζώων σε σύγκριση με τα ζώα ελέγχου καταδεικνύοντας τον ρόλο της IKKβ ως προαγωγέα της ανάπτυξης του NSCLC *in vivo* (261).

Στη συνέχεια, για τη μελέτη του ρόλου της κανονικής σηματοδοτικής πορείας του NF-κΒ στον ανθρώπινο NSCLC, χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές A549 και H1437, στις οποίες με τη χρήση κατάλληλου πλασμιδιακού φορέα μειορρυθμίστηκε η έκφραση της υπομονάδας p65, της κύριας υπομονάδας που ενεργοποιείται διαμέσου της κανονικής πορείας του NF-κΒ. Τα κύτταρα επιμολύνθηκαν είτε με τον πλασμιδιακό φορέα ελέγχου pSuper-Puro (control), είτε με τον φορέα pSuper-Puro-shp65 (p65<sup>KD</sup>) (264) για τη μειορρύθμιση του p65. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πουρομυκίνη για τη δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών και η επιτυχής μειορρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα p65 ελέγχθηκε με ανοσοαποτύπωμα κατά western σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα (Εικόνα 3.11.).



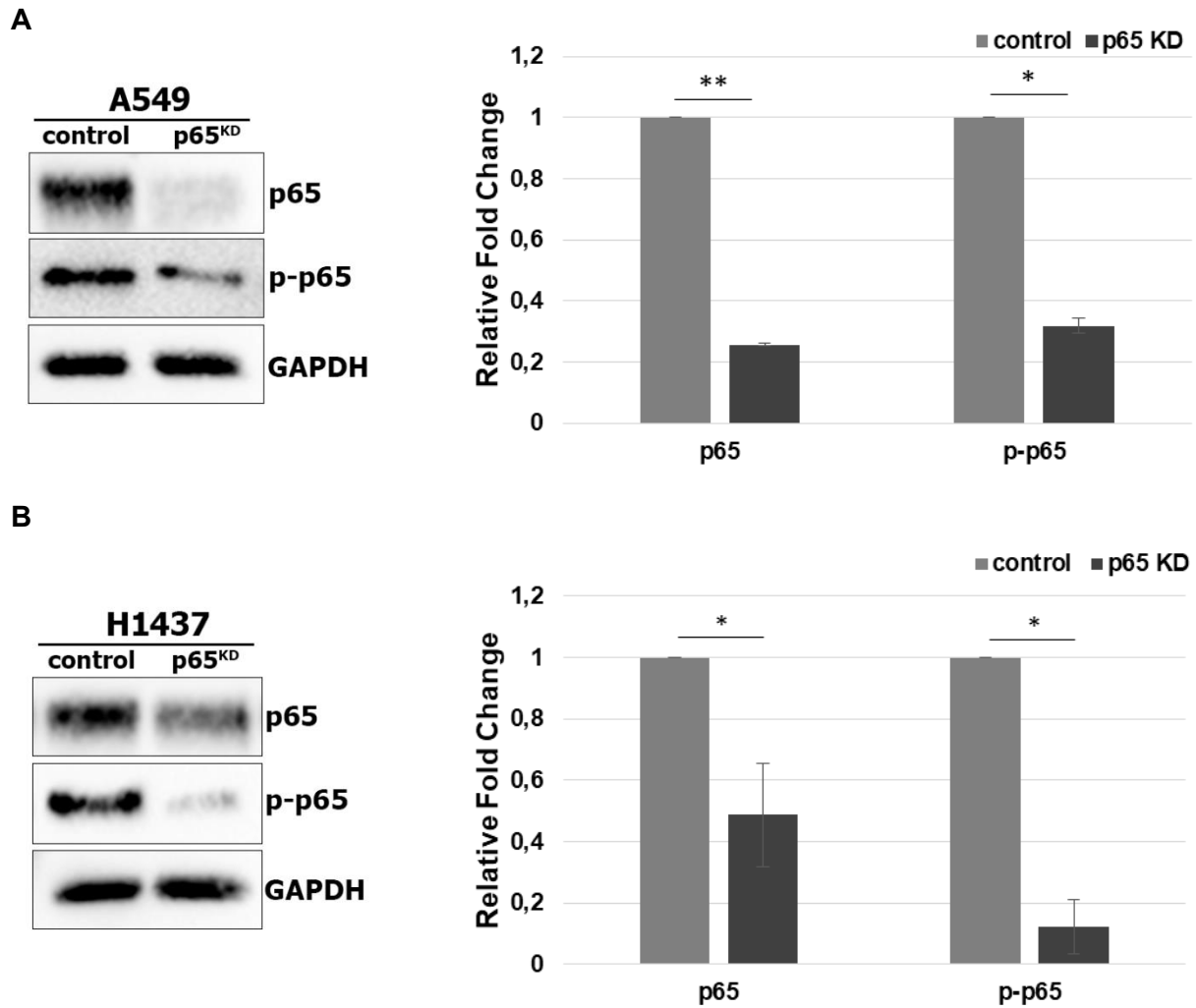
**Εικόνα 3.11. Μειορρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα p65 στις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές NSCLC.** Οι κυτταρικές σειρές A549 και H1437 διαμολύνθηκαν με τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pSuper-Puro-shp65 (p65<sup>KD</sup>) ή τον αντίστοιχο πρότυπο φορέα ελέγχου pSuper-Puro (control). Τα κύτταρα επιλέχθηκαν σε πουρομυκίνη για τη δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών και ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα απομονώθηκαν και αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα κατά Western για την έκφραση της υπομονάδας p65, και την έκφραση της β-ακτίνης ως μάρτυρα αναφοράς.

Για τη μελέτη του ρόλου της κανονικής πορείας του NF-κB στον ανθρώπινο NSCLC, οι p65-τροποποιημένες κυτταρικές σειρές και οι κυτταρικές σειρές ελέγχου A549 και H1437 αναπτύχθηκαν ως ξενομοσχεύματα *in vivo*. Τα κύτταρα A549-p65<sup>KD</sup> και H1437-p65<sup>KD</sup> καθώς και τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου εμβολιάσθηκαν υποδόρια αμφίπλευρα σε αθυμικά ποντίκια NSG, τα οποία και θυσιάστηκαν έπειτα από τέσσερις εβδομάδες για την απομόνωση και ανάλυση των όγκων. Η μειορρύθμιση της έκφρασης της πρωτεΐνης p65 είχε σαν αποτέλεσμα τη στατιστικά σημαντική μείωση του μεγέθους των όγκων και στις δύο κυτταρικές σειρές και ιδιαίτερα στα A549 (Εικόνα 3.12.). Πιο συγκεκριμένα, στα κύτταρα A549, απουσία της p65, οι όγκοι που σχηματίζονται είναι κατά μέσο όρο 3 φορές μικρότεροι σε σύγκριση με τους όγκους που αναπτύχθηκαν από τα κύτταρα ελέγχου, ενώ στην κυτταρική σειρά H1437 οι όγκοι ήταν περίπου 1.5 φορά μικρότεροι (Εικόνα 3.12.). Η διαφορά στο μέγεθος των όγκων που αναπτύχθηκαν πιθανά οφείλεται στο διαφορετικό βαθμό μειορρύθμισης του p65 που επετεύχθη στις δύο κυτταρικές σειρές (Εικόνα 3.11.) ή πιθανά στο γεγονός ότι τα κύτταρα H1437 φέρουν μια μεταλλαγμένη μορφή της p53, ενώ τα A549 φέρουν αγρίου-τύπου p53 η οποία ανταγωνίζεται τη δράση του NF-κB (49, 225, 276, 277).



**Εικόνα 3.12.** Ο μεταγραφικός παράγοντας p65 προάγει την ανάπτυξη του ανθρώπινου NSCLC *in vivo*. Αντιπροσωπευτικές εικόνες των όγκων που απομονώθηκαν από τους αθυμικούς μύες NSG, που προέρχονται από τον εμβολιασμό των κυττάρων A549-p65<sup>KD</sup> και H1437-p65<sup>KD</sup> καθώς και τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου (n=5, \*\*p<0.001, \*\*\*p<0.0001).

Τμήματα των όγκων που αφαιρέθηκαν χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση RNA και πρωτεϊνών. Για την επιβεβαίωση της επιτυχούς μειορρύθμισης της πρωτεΐνης p65 στους όγκους, ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των όγκων αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα κατά Western για την έκφραση της πρωτεΐνης p65, αλλά και για την ενεργή, φωσφορυλιωμένη, μορφή της, στη σερίνη 536 (p-p65) (Εικόνα 3.13.).



**Εικόνα 3.13. Αποσιώπηση του μεταγραφικού παράγοντα p65 *in vivo*.** Για την επιβεβαίωση της μειορρύθμισης του p65 στους όγκους που αναπτύχθηκαν μετά τον εμβολιασμό των κυτταρικών σειρών (A) A549-p65<sup>KD</sup> και (B) H1437-p65<sup>KD</sup> και των αντίστοιχων κυττάρων ελέγχου, απομονώθηκαν ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα τα οποία αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα κατά Western για την έκφραση του p65 και της φωσφορυλιωμένης, ενεργής, μορφής του στη σερίνη 536 (p-p65). Ως μάρτυρας αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η έκφραση της GAPDH. (n=3, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

### 3.6. Η επίδραση της υπομονάδας p65 στον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των κυττάρων

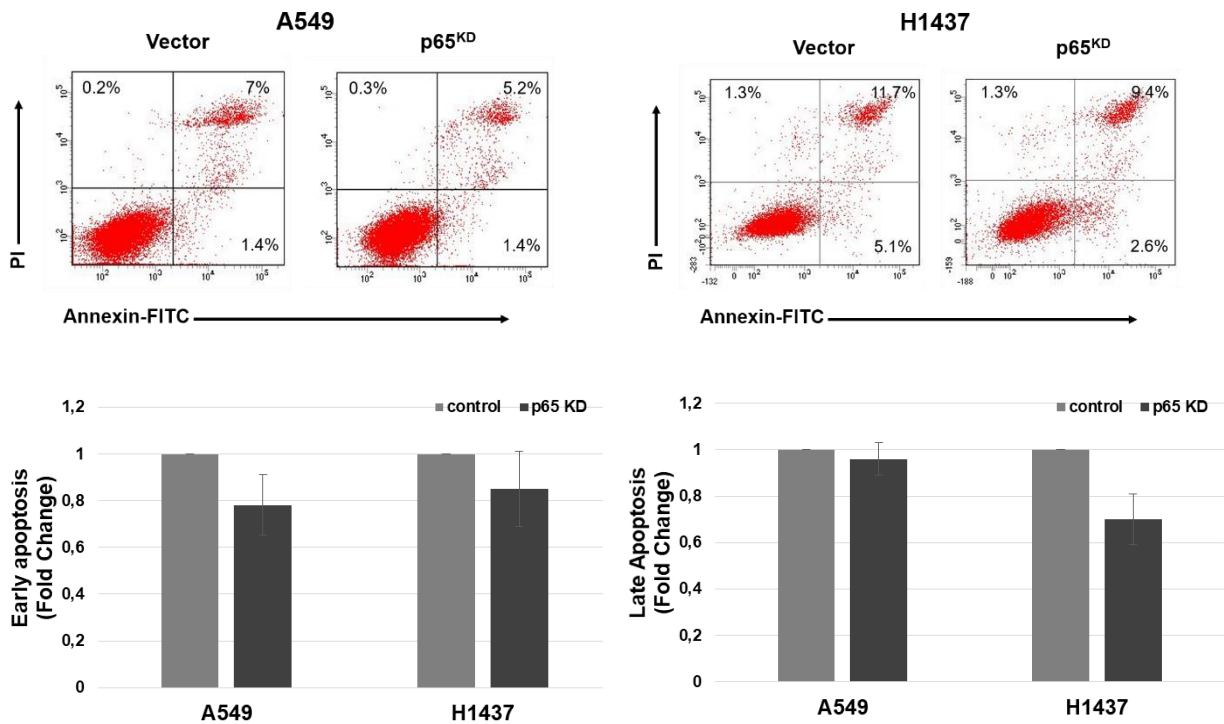
Καθώς η μειορρύθμιση της υπομονάδας p65 είχε σαν αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της ανάπτυξης των όγκων *in vivo*, μελετήθηκε κατά πόσο ο μεταγραφικός παράγοντας p65 μπορεί να επηρεάζει την απόπτωση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων.

Για τη μελέτη της απόπτωσης κύτταρα A549-p65<sup>KD</sup> και H1437-p65<sup>KD</sup> και τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου επωάστηκαν με αννεξίνη V (Annexin V-FITC) και ιωδιούχο προπίδιο (Propidium Iodide, PI) ώστε να καταστεί δυνατή η ανίχνευση των αποπτωτικών και νεκρών κυττάρων, αντίστοιχα, με κυτταρομετρία ροής. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τη διάκριση μεταξύ των κυττάρων που βρίσκονται στα πρώιμα στάδια της απόπτωσης (αννεξίνη V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>), κυττάρων που βρίσκονται στο τελικό στάδιο της απόπτωσης ή είναι νεκρά (αννεξίνη V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>) και υγιών κυττάρων (αννεξίνη V<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>). Η μειορρύθμιση της p65 δεν είχε καμία σημαντική επίδραση στην απόπτωση των κυττάρων σε καμία από τις δύο κυτταρικές σειρές (Εικόνα 3.14.A.).

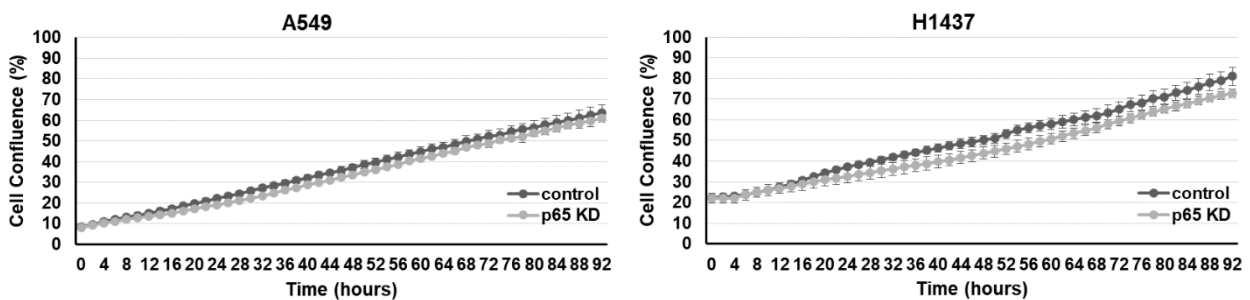
Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της p65 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Για το σκοπό αυτό κύτταρα ελέγχου και κύτταρα A549-p65<sup>KD</sup> και H1437-p65<sup>KD</sup> καλλιεργήθηκαν για 92 ώρες στο σύστημα IncuCyte ZOOM το οποίο επιτρέπει την παρακολούθηση της ανάπτυξης των κυττάρων σε πραγματικό χρόνο. Στο διάστημα των 92 ωρών ελήφθησαν φωτογραφίες των κυττάρων κάθε τέσσερις ώρες, και στη συνέχεια υπολογίστηκε το ποσοστό πληρότητας με τη χρήση του λογισμικού IncuCyte ZOOM. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν ότι η μειορρύθμιση της p65 δεν επηρέασε στατιστικά σημαντικά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων στην καλλιέργεια. Πιο συγκεκριμένα, η μειορρύθμιση της p65 είχε σαν αποτέλεσμα την επιβράδυνση του ρυθμού του πολλαπλασιασμού των κυττάρων κατά περίπου 2% και 8% στα A549 και H1437 αντίστοιχα (Εικόνα 3.14.B.).



A



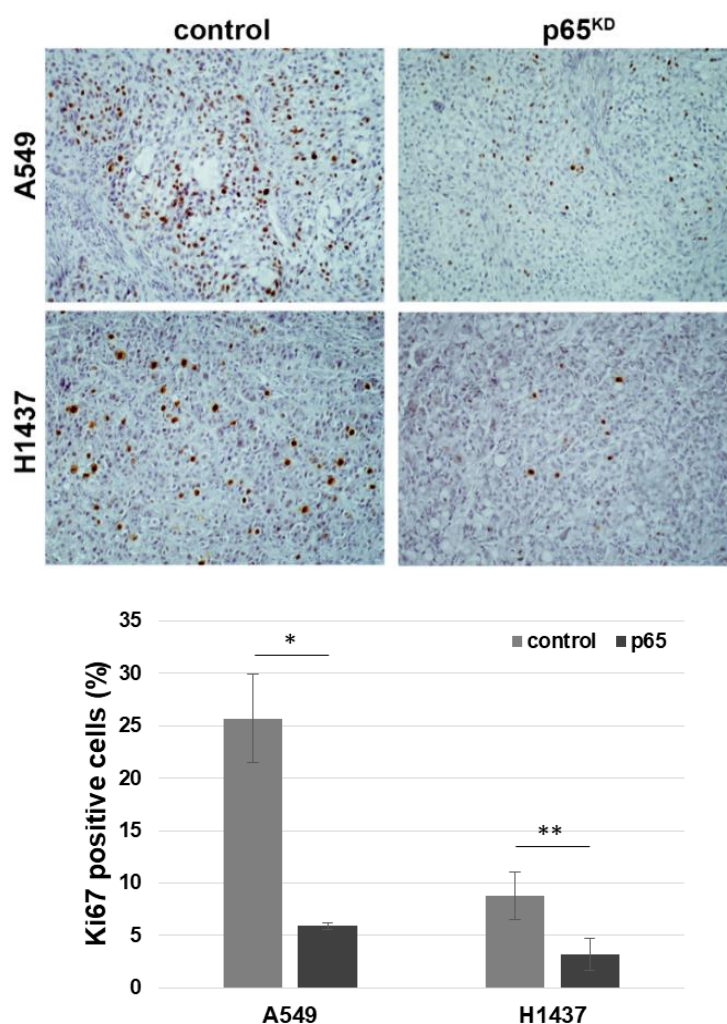
B



**Εικόνα 3.14. Επίδραση του μεταγραφικού παράγοντα p65 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση *in vitro*.** (A) Μεταβολή της απόπτωσης των κυττάρων A549 και H1437 έπειτα από την αποσιώπηση του p65 σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου, μέσω της σήμανσης με αννεξίνη V (Annexin V-FITC) και ιωδιούχο προπίδιο (PI) και την ανάλυση με κυτταρομετρία ροής. (B) Καμπύλες αύξησης των κυττάρων A549-p65<sup>KD</sup> και H1437-p65<sup>KD</sup> σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου όπως υπολογίστηκε από το σύστημα IncuCyte ZOOM σε ποσοστό κάλυψης της επιφάνειας του τρυβλίου.

Για να μελετηθεί η επίδραση του p65 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό *in vivo*, τομές παραφίνης από τους όγκους που αναπτύχθηκαν μετά τον εμβολιασμό των κυττάρων ελέγχου και των κυττάρων A549-p65<sup>KD</sup> και H1437-p65<sup>KD</sup>, αναλύθηκαν ανοσοϊστοχημικά, σε συνεργασία με την Καθηγήτρια κα Α. Γούσια του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την έκφραση του αντιγόνου Ki67, ενός δείκτη του

κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ο οποίος απουσιάζει από τα κύτταρα που βρίσκονται στη φάση ηρεμίας. Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν *in vitro*, *in vivo* η αποσιώπηση του p65 μείωσε σημαντικά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και ιδιαίτερα των κυττάρων A549 όπου παρατηρήθηκε μια μείωση των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων στο 6% του συνόλου των κυττάρων από το 25% που παρατηρήθηκε στα δείγματα ελέγχου. Εξίσου σημαντική μείωση παρατηρήθηκε και στην κυτταρική σειρά H1437 όπου κατά την αποσιώπηση του p65 μόνον το 3% του συνόλου των κυττάρων βρέθηκε θετικό για το δείκτη Ki67 σε σύγκριση με τα δείγματα ελέγχου όπου θετικό βρέθηκε το 9% των κυττάρων (Εικόνα 3.15.).

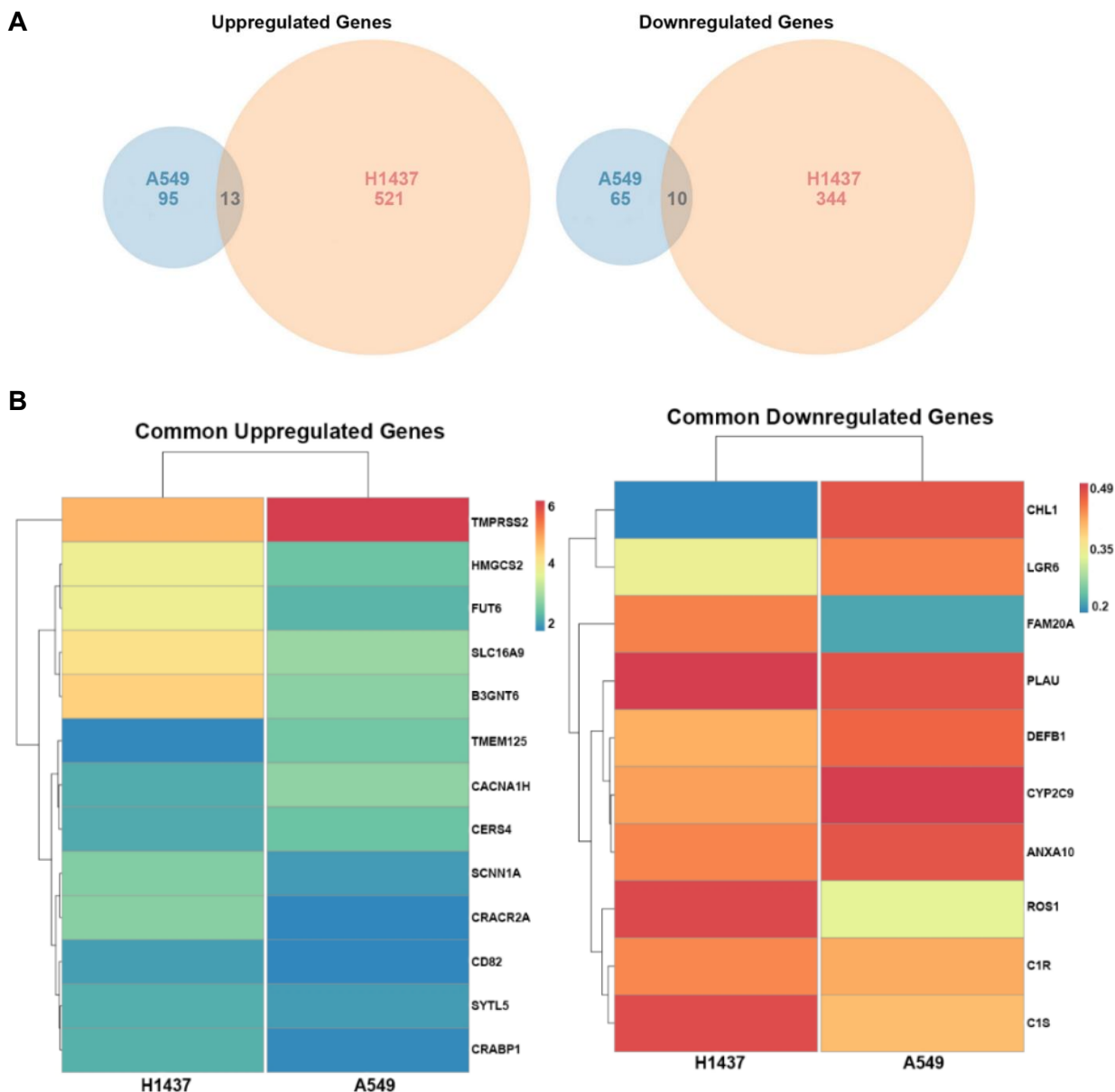


**Εικόνα 3.15.** Η αποσιώπηση του μεταγραφικού παράγοντα p65 μειώνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό *in vivo*. Ανοσοϊστοχημική χρώση για την έκφραση του αντιγόνου Ki67, ως δείκτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, σε τομές παραφίνης των όγκων που αναπτύχθηκαν σε αθυμικούς μύες NSG μετά τον εμβολιασμό των κυττάρων A549-p65<sup>KD</sup> και H1437-p65<sup>KD</sup> και των κυττάρων ελέγχου (μεγέθυνση 200X).

### 3.7. Ταυτοποίηση γονιδίων που ρυθμίζονται από την κανονική σηματοδοτική πορεία IKKβ - NF-κB RelA/p65

Για να διερευνηθεί ο μηχανισμός με τον οποίο ο μεταγραφικός παράγοντας p65 επηρεάζει την ανάπτυξη του NSCLC, απομονώθηκε RNA από τους όγκους που αναπτύχθηκαν από τα κύτταρα A549 p65<sup>KD</sup> και H1437 p65<sup>KD</sup> και τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου που εμβολιάστηκαν ως ξενομοσχεύματα *in vivo*, το οποίο αναλύθηκε με την τεχνολογία RNA-seq για την ταυτοποίηση γονιδίων που ρυθμίζονται από την κανονική σηματοδοτική πορεία IKKβ-RelA/p65. Η ανάλυση ταυτοποίησε 10 κοινά γονίδια με μειωμένη έκφραση και 13 κοινά γονίδια με αυξημένη έκφραση στους όγκους που προήλθαν από τα κύτταρα A549-p65<sup>KD</sup> και H1437-p65<sup>KD</sup>, σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου (Εικόνα 3.16.).

Ειδικότερα, παρουσιάζονται οι χάρτες θερμότητας (heat maps) των γονιδίων που παρουσίασαν διαφορετική έκφραση (Differentially Expressed Genes; DEGs) στους όγκους που αναπτύχθηκαν στα αθυμικά ποντίκια NSG οι οποίοι προήρθαν από τα ξενομοσχεύματα *in vivo* των ανθρώπινων κυττάρων ελέγχου A549 και H1437 σε σύγκριση με των αντίστοιχων κυττάρων p65<sup>KD</sup>. Η ανάλυση ταυτοποίησε ένα μικρό αριθμό κοινών γονιδίων η έκφραση των οποίων αυξάνεται ή μειώνεται. Όπως φαίνεται στους χάρτες θερμότητας, τα 13 κοινά γονίδια των οποίων η έκφραση παρατηρήθηκε αυξημένη στα κύτταρα A549-p65<sup>KD</sup> και H1437-p65<sup>KD</sup> σε σύγκριση με την έκφρασή τους στα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου ήταν τα: *TMPRSS2*, *HMGSB2*, *FUT8*, *SLC16A9*, *B3GNT6*, *TMEM125*, *CACNA1H*, *CERS4*, *SCNN1A*, *CRACR2A*, *CD82*, *SYTL5* και *CRABP1*, ενώ τα 10 γονίδια που είχαν μειωμένη έκφραση ήταν τα: *CHL1*, *LGR6*, *FAM20A*, *PLAU*, *DEFB1*, *CYP2C9*, *ANXA10*, *ROS1*, *C1R* και *C1S* (Εικόνα 3.16.).



**Εικόνα 3.16. Διαφορική έκφραση γονιδίων έπειτα από τη μειορύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα p65.** (A) Διαγράμματα Venn που προέκυψαν από την ανάλυση RNA-seq των γονιδίων που εκφράζονται διαφορεικά στους όγκους των κυττάρων A549 p65<sup>KD</sup> και H1437 p65<sup>KD</sup>, σε σχέση με τους όγκους των κυττάρων ελέγχου. Μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών ταυτοποιήθηκαν 13 κοινά γονίδια που παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση και 10 κοινά γονίδια με μειωμένη έκφραση, έπειτα από την αποσιώπηση της p65. (B) Χάρτες θερμότητας (Heat maps) που απεικονίζουν τα κοινά γονίδια που παρουσιάζουν διαφορεική έκφραση. *Αριστερά* παρουσιάζονται τα κοινά γονίδια που εμφανίζουν αυξημένη έκφραση στα κύτταρα ΙΚΚα<sup>KD</sup> μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών, ενώ *δεξιά* απεικονίζονται τα κοινά γονίδια που εμφανίζουν μειωμένη έκφραση. Τα χρώματα αντιπροσωπεύουν το βαθμό της διαφορικής έκφρασης σε σύγκριση με τα δείγματα ελέγχου (fold change).

Μερικά από τα γονίδια που παρουσίασαν αυξημένη έκφραση κωδικοποιούν μεταβολικά ένζυμα όπως το *HMGCS2* που κωδικοποιεί το μιτοχονδριακό ένζυμο *συνθετάση 2 του 3-*

*υδροξυ-3-μεθυλογλουταρυλ-CoA*, το οποίο καταλύει την πρώτη αντίδραση της κετογένεσης και το *CERS4* που κωδικοποιεί το ένζυμο *συνθετάση 4 του κεραμιδίου* που καταλύει τον σχηματισμό του κεραμιδίου από σφιγγανίνη και άκυλο-CoA.

Επίσης ταυτοποιήθηκαν γονίδια που κωδικοποιούν μεμβρανικές πρωτεΐνες συμπεριλαμβανομένων των *TMEM125*, *CACNA1H*, *SCNN1A* και *CRACR2A*. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε το γεγονός ότι δύο από τα γονίδια που ταυτοποιήθηκαν, τα *TMPRSS2* και *SLC16A9 (B<sup>o</sup>AT1)*, εμπλέκονται στην είσοδο του ιού SARS-CoV-2 στα επιθηλιακά πνευμονοκύτταρα των αεραγωγών. Ειδικότερα, το *TMPRSS2* κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική πρωτεάση σερίνης 2 που απαιτείται για την είσοδο του ιού SARS-CoV-2 στα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών, και το *SLC16A9 (B<sup>o</sup>AT1)* κωδικοποιεί έναν εξαρτώμενο από νάτριο μεταφορέα ουδέτερου αμινοξέος που αλληλεπιδρά με τον κυτταρικό υποδοχέα-ένζυμο μετατροπής της αγγειοτενσίνης ACE2, τον υποδοχέα χρησιμοποιείται από τον ιό SARS-CoV-2 για την είσοδό του στα κύτταρα.

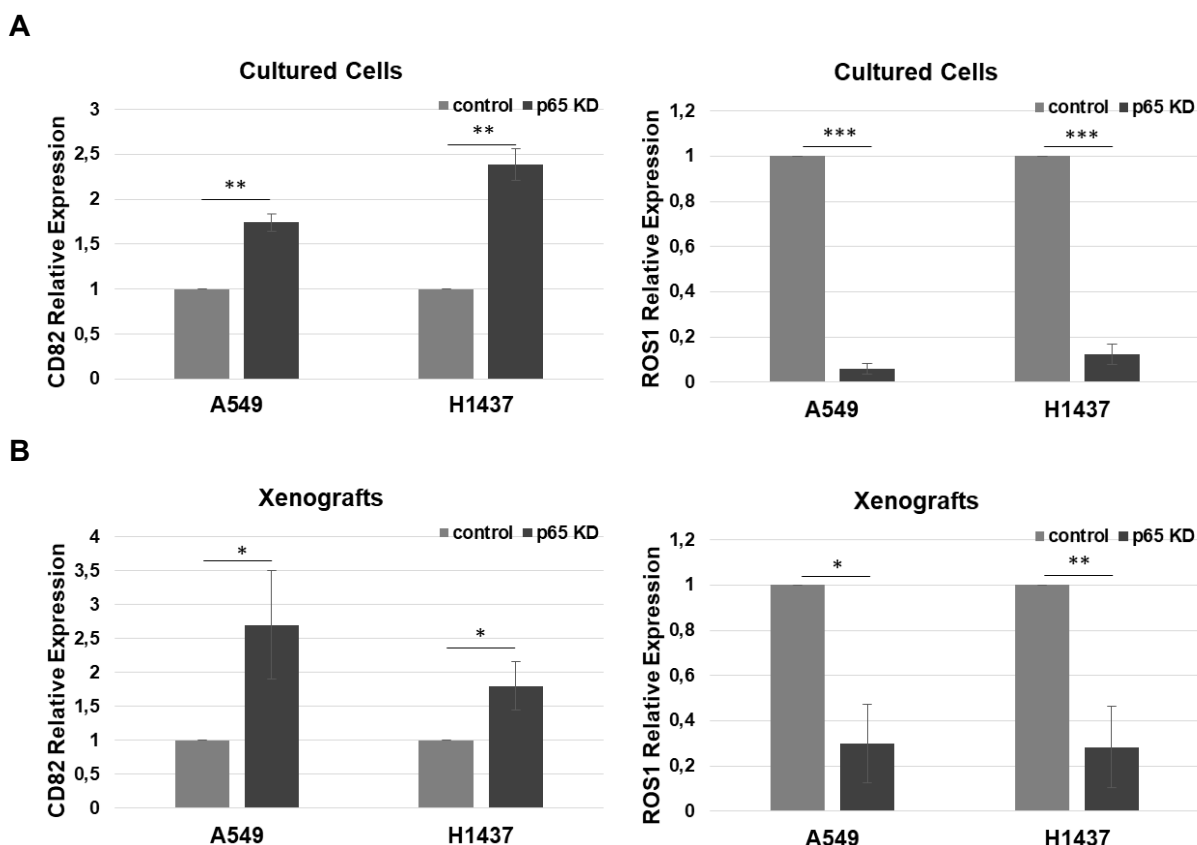
Μερικά από τα κοινά γονίδια που βρέθηκαν να έχουν μειωμένη έκφραση στα κύτταρα A549-p65<sup>KD</sup> και H1437-p65<sup>KD</sup> σε σχέση με την έκφραση τους στα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου περιλαμβάνουν το *CHL1* που κωδικοποιεί το μόριο προσκόλλησης κυττάρων L1-like (L1CAM2) που εμπλέκεται στην κυτταρική πρόσφυση, το *CYP2C9* που κωδικοποιεί το μέλος 9 της υπο-οικογένειας C της οικογένειας 2 του κυτοχρώματος P450 (Cytochrome P450 family 2 subfamily C member 9), το οποίο εμπλέκεται στον μεταβολισμό φαρμάκων, και τα γονίδια *C1R* και *C1S* που κωδικοποιούν συστατικά του του πρωτεϊνικού συμπλόκου του συστήματος συμπληρώματος C1.

Επίσης, μειωμένη έκφραση παρουσίασε και το γονίδιο *LGR6* [Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor (GPCR) 6], το οποίο κωδικοποιεί ένα μεμβρανικό υποδοχέα ο οποίος αναφέρεται ως βιοδείκτης βλαστικών επιθηλιακών πνευμονοκυττάρων ενήλικα πνεύμονα και εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της σηματοδοτικής πορείας Wnt/ $\beta$ -catenin. Συγκεκριμένα, ο *LGR6* συμβάλει στη συνάθροιση των μεμβρανικών υποδοχέων Frizzled (Fzd) και σταθεροποιεί το σύμπλοκο υποδοχέα Wnt/Fzd στην κυτταρική επιφάνεια οδηγώντας στη στρατολόγηση της  $\beta$ -κατενίνης και στην ενεργοποίηση της κανονικής σηματοδοτικής πορείας του Wnt που εξαρτάται από τη  $\beta$ -κατενίνη, μια πορεία που διεγείρει την παραγωγή και τη διατήρηση καρκινικών βλαστικών κυττάρων και προάγει τη μετάσταση (278-280).

Μεταξύ των γονιδίων που ταυτοποιήθηκαν, το ενδιαφέρον μας κέντρισε το πρωτο-ογκογονίδιο *ROS1* το οποίο εμφανίζει μειωμένη έκφραση, και το γονίδιο *CD82* το οποίο εμφανίζει αυξημένη έκφραση κατά την αποσιώπηση του p65, καθώς έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη και πρόοδο του καρκίνου. Πιο συγκεκριμένα, το πρωτο-ογκογονίδιο *ROS1*, που κωδικοποιεί τον ορφανό υποδοχέα κινάσης τυροσίνης *ROS1*, έχει ενοχοποιηθεί για την ανάπτυξη του NSCLC, καθώς τα τελευταία χρόνια χρωμοσωμικές αναδιατάξεις (fusions) του γονιδίου *ROS1* έχουν προστεθεί στις

ογκογόνες μεταλλάξεις (driver mutations) που ευθύνονται για 1-2% των περιπτώσεων του NSCLC (281-283). Αντίθετα, το γονίδιο *CD82/KAI1* κωδικοποιεί την TSPAN27 μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου III πολλαπλής διέλευσης με 4 διαμεμβρανικούς α-έλικες, η οποία ανήκει στην υπερικογένεια των τετρασπανινών (tetraspanins; TSPANs) και έχει χαρακτηριστεί ως αναστολέας της μετάστασης σε αρκετούς τύπους καρκίνου (284, 285)

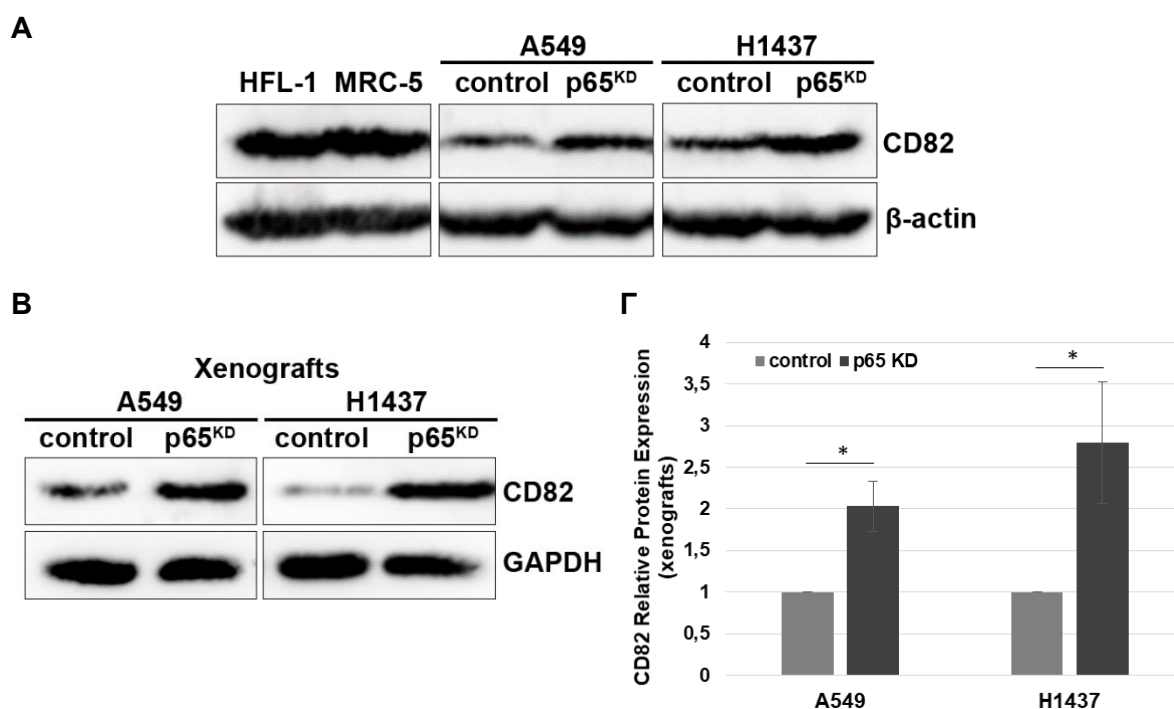
Το επόμενο βήμα ήταν η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης RNA-seq για τα επίπεδα έκφρασης των *ROS1* και *CD82* με qPCR σε δείγματα ολικού RNA από τις κυτταρικές σειρές *in vitro*, αλλά και από του όγκους που αναπτύχθηκαν ως ξενομοσχεύματα *in vivo*. Τα αποτελέσματα επαλήθευσαν τη στατιστικά σημαντική μείωση της έκφρασης του *ROS1* mRNA και την αύξηση του *CD82* mRNA σε όλες τις περιπτώσεις (Εικόνα 3.17.A,B).



**Εικόνα 3.17. Μεταβολή των επιπέδων έκφρασης των mRNA των *ROS1* και *CD82* *in vitro* και *in vivo*.** Ολικά δείγματα RNA απομονώθηκαν από (A) καλλιεργούμενα κύτταρα ελέγχου και κύτταρα A549-p65<sup>KD</sup> και H1437-p65<sup>KD</sup>, και (B) τους αντίστοιχους όγκους των κυττάρων που αναπτύχθηκαν ως ξενομοσχεύματα *in vivo*, και αναλύθηκαν για την έκφραση των *ROS1* και *CD82* με qPCR. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η έκφραση της RPII (RNA πολυμεράση II) (n=3, \*p<0.05, \*\*p<0.01).

Από τους δύο αυτούς σημαντικούς στόχους επιλέχθηκε για περαιτέρω μελέτη η τετρασπανίνη *CD82*, καθώς σύμφωνα με δημοσιευμένες μελέτες, στα κύτταρα A549 δεν ανιχνεύονται πρωτεϊνικά επίπεδα της πρωτεΐνης *ROS1* (286, 287)

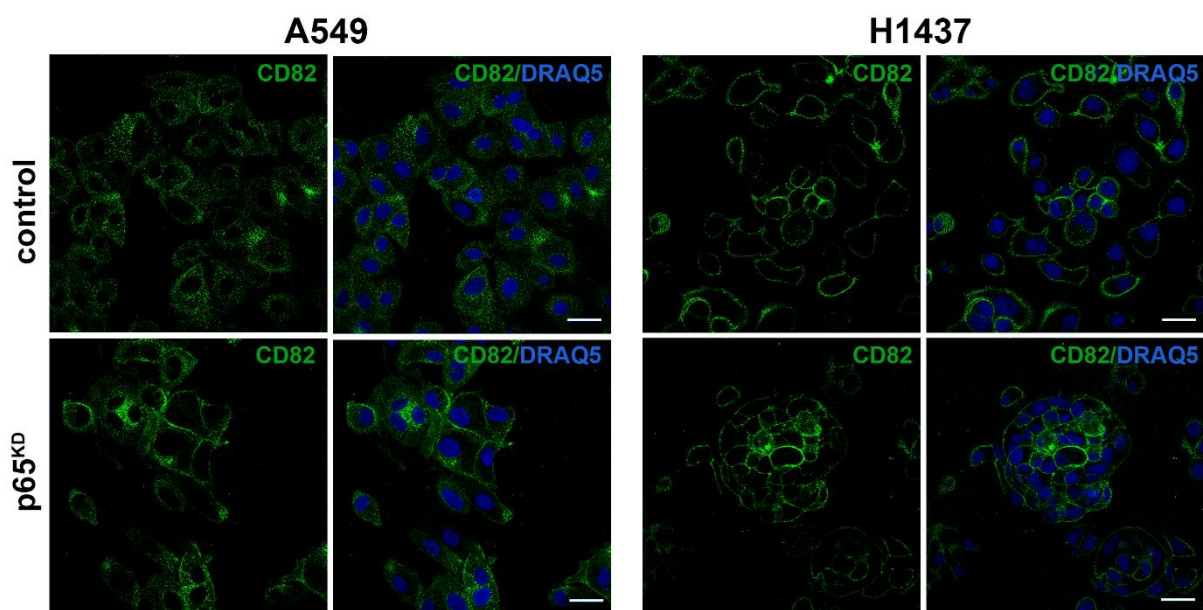
Αρχικά μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του CD82 σε πρωτεϊνικό επίπεδο με ανοσοαποτύπωμα κατά Western, σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των καλλιεργούμενων κυττάρων αλλά και των όγκων που απομονώθηκαν και προέρχονταν από τα κύτταρα ελέγχου και τα κύτταρα A549-p65<sup>KD</sup> και H1437-p65<sup>KD</sup>. Ως θετικά δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν φυσιολογικές ανθρώπινες ινοβλάστες πνεύμονα, και συγκεκριμένα τα κυτταρικά στελέχη HFL-1 και MRC-5, καθώς το CD82 εκφράζεται σε αρκετούς φυσιολογικούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένου και του πνεύμονα, ενώ, αντίθετα σύμφωνα με μελέτες η έκφρασή του φαίνεται να μειώνεται σημαντικά στα καρκινικά κύτταρα (288). Πράγματι, τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την αυξημένη έκφραση του επιφανειακού αντιγόνου CD82 στα φυσιολογικά κύτταρα, η οποία εμφανίζεται σημαντικά μειωμένη στις καρκινικές κυτταρικές σειρές πνεύμονα, ενώ τα επίπεδα αυξάνονται και πάλι κατά την απώλεια έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα p65 (Εικόνα 3.18.A). Ομοίως, και στα δείγματα που απομονώθηκαν από τους όγκους των μυών η έκφραση της πρωτεΐνης CD82 αυξάνεται σημαντικά κατά τη μειορρύθμιση του p65 (Εικόνα 3.18.B,Γ). Επομένως, η απώλεια του μεταγραφικού παράγοντα p65 οδηγεί στην αύξηση των μεταγραφικών (mRNA) και πρωτεϊνικών επιπέδων του CD82 τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*.



**Εικόνα 3.18. Η αποσιώπηση του παράγοντα p65 επάγει την έκφραση του CD82.** (Α) Ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από καλλιεργούμενα κύτταρα A549-p65<sup>KD</sup> και H1437-p65<sup>KD</sup> και τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα κατά Western για την έκφραση του CD82. Ως θετικά δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινες φυσιολογικές ινοβλάστες πνεύμονα, τα κυτταρικά στελέχη HFL-1 και MRC-5, και η έκφραση της β-ακτίνης ως μάρτυρας ελέγχου. (B, Γ) Ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα απομονώθηκαν από τα ίδια κύτταρα, που αναπτύχθηκαν ως ξενομοσχεύματα *in vivo* και αναλύθηκαν για την έκφραση του αντιγόνου CD82 αλλά και της GAPDH ως μάρτυρα ελέγχου. (n=3, \*p<0.05, \*\*p<0.01).



Το αντιγόνο CD82 είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη η οποία εντοπίζεται κυρίως στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, ωστόσο εντοπίζεται επίσης σε ενδοκυτταρικά οργανίδια όπως τα ενδοσώματα και τα λυσοσώματα (289). Επομένως στη συνέχεια μελετήθηκε με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού ο κυτταρικός εντοπισμός του αντιγόνου CD82 στις κυτταρικές σειρές A549-p65<sup>KD</sup> και H1437-p65<sup>KD</sup> και στα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου. Στα κύτταρα H1437 η πρωτεΐνη CD82 εντοπίζεται σχεδόν αποκλειστικά στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των κυττάρων, ενώ αντίθετα στα A549 η έκφραση του CD82 εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα ενώ παρατηρείται μια πιο έντονη μεμβρανική χρώση κατά την αποσιώπηση του p65 (Εικόνα 3.19.).

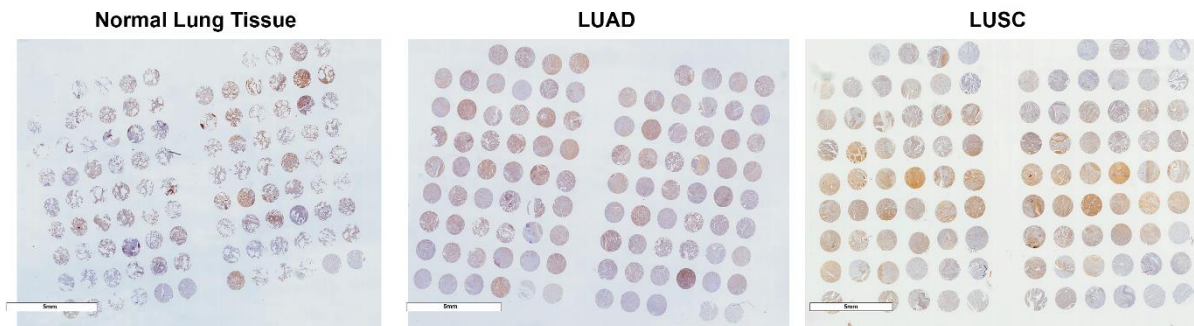


**Εικόνα 3.19. Υποκυτταρικός εντοπισμός του αντιγόνου CD82.** Ο κυτταρικός εντοπισμός του CD82 αναλύθηκε με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού με λέιζερ στα κύτταρα A549-p65<sup>KD</sup>, H1437-p65<sup>KD</sup> και τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου. Στα κύτταρα H1437 το CD82 εντοπίζεται κυρίως στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, ενώ αντίθετα στα κύτταρα A549 το CD82 εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων ενώ παρατηρείται μια αύξηση του εντοπισμού του στην κυτταροπλασματική μεμβράνη κατά την αποσιώπηση του p65. Για την απεικόνιση των πυρήνων των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η χρωστική DRAQ5 (κλίμακα 30  $\mu\text{m}$ ).



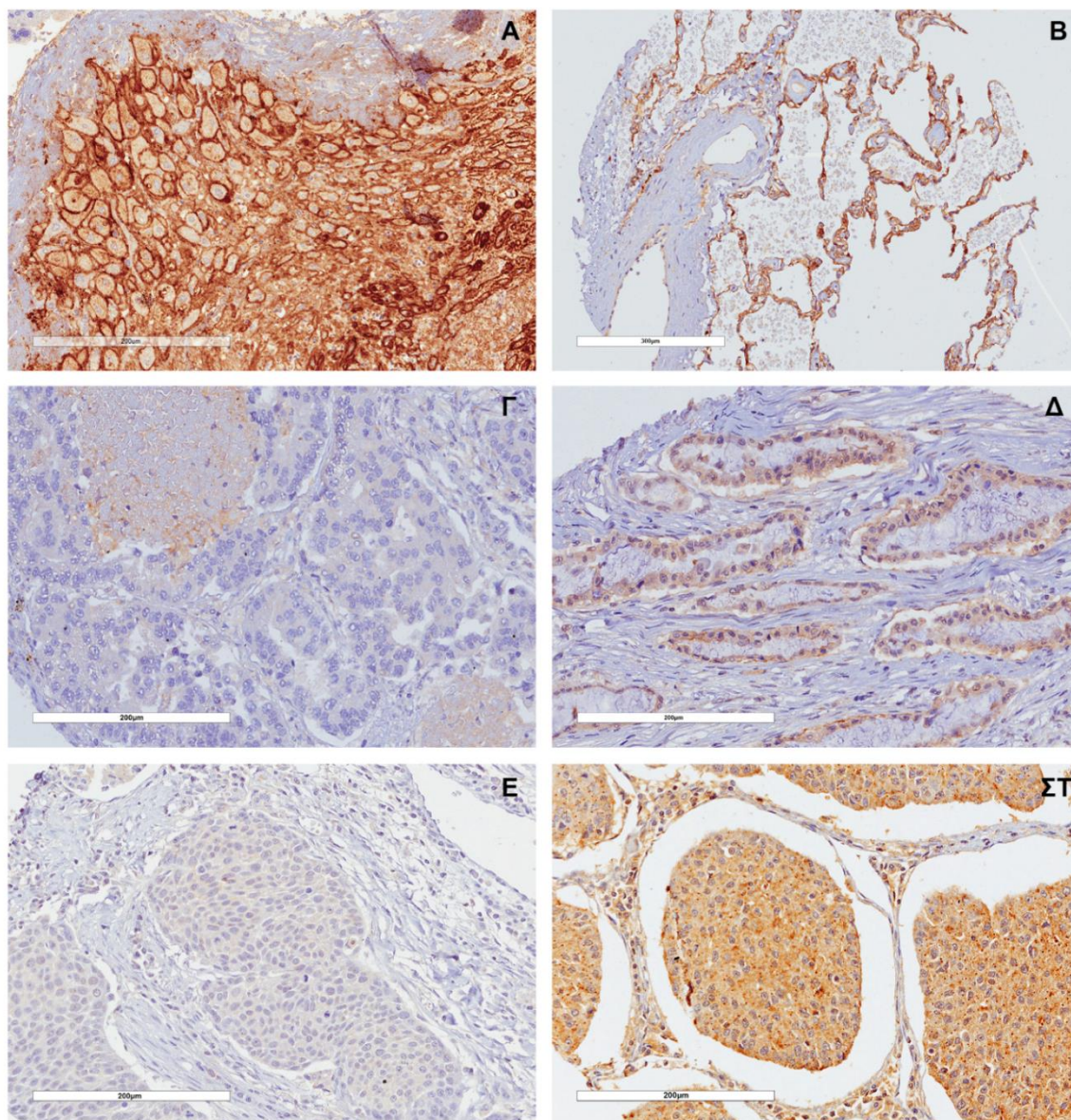
### 3.8. Τα επίπεδα του CD82 μειώνονται σημαντικά σε ασθενείς με NSCLC

Η έκφραση του CD82 μελετήθηκε ανοσοϊστοχημικά σε δείγματα ασθενών με NSCLC. Σε συνεργασία με το Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και το Παθολογοανατομικό Εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων μελετήθηκε ένα σύνολο 150 δειγμάτων υπό τη μορφή μικροσυστοιχιών (Tissue Microarrays, TMA), ευγενική προσφορά των Δρ. Mark και Katharina Kriegsmann του Παθολογοανατομικού Ινστιτούτου του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Χαϊδελεβέργης, για την έκφραση του CD82 με ανοσοϊστοχημεία. Τα δείγματα αποτελούνταν από 50 δείγματα φυσιολογικού ιστού πνεύμονα, 50 δείγματα ασθενών με αδενοκαρκίνωμα NSCLC, (Lung adenocarcinoma; LUAD) και 50 δείγματα ασθενών με καρκίνωμα του πλακώδους επιθηλίου του NSCLC, (Lung Squamous carcinoma; LUSC) (Εικόνα 3.20.).



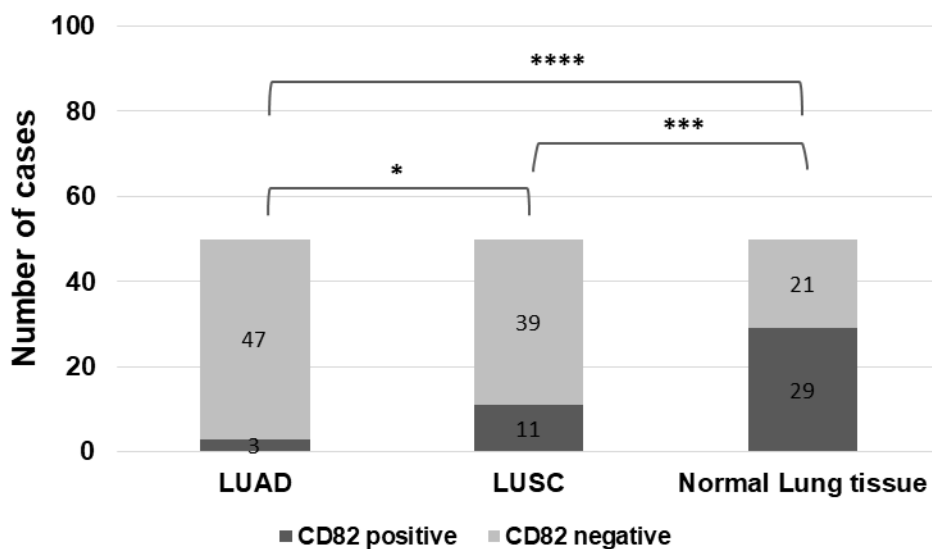
**Εικόνα 3.20.** Δείγματα ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα και δείγματα φυσιολογικού ιστού πνεύμονα σε μορφή μικροσυστοιχιών. (κλίμακα: φυσιολογικός ιστός πνεύμονα και LUAD 5 mm, LUSC 4 mm).

Η ανοσοϊστοχημική ανάλυση κατέδειξε τη στατιστικά σημαντική απώλεια της έκφρασης του αντιγόνου CD82 στους ασθενείς που πάσχουν από LUAD και LUSC σε σύγκριση με τα δείγματα του φυσιολογικού ιστού ( $p < 0.0001$ ), ενώ σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε και μεταξύ του ιστολογικού τύπου της νόσου ( $p < 0.04$ ). Αντίθετα, καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε στην έκφραση του CD82 αναφορικά με το φύλο ( $p = 0.8$ ), την ηλικία ( $p > 0.9$ ) ή το στάδιο της νόσου ( $p = 0.2$ ) (Εικόνες 3.21 και 3.22).



**Εικόνα 3.21. Ανοσοϊστοχημική έκφραση του CD82 σε δείγματα ασθενών με LUAD και LUSC και σε δείγματα φυσιολογικού ιστού πνεύμονα.** (A) Δείγμα πλήρους ιστού από πλακούντα που χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας ελέγχου για τη χρώση του CD82. (B) Θετικό δείγμα TMA φυσιολογικού ιστού όπου το CD82 εντοπίζεται στη μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων. (Γ, Δ) Αρνητικό και θετικό δείγμα αντίστοιχα TMA ασθενών με LUAD όπου το CD82 παρουσιάζει κυτταροπλασματική χρώση. (E, ΣΤ) Αρνητικό και θετικό δείγμα αντίστοιχα TMA ασθενών με LUSC. (κλίμακα A, Γ, Δ, E, ΣΤ 200 μm, B, 300 μm).

Κλινικο- παθολογικές παράμετροι	Αριθμός δειγμάτων	CD82		p-value
		Θετικά	Αρνητικά	
<b>Ιστολογικός Τύπος</b>				<b>&lt;0.0001****</b>
LUAD	50	3	47	
LUSC	50	11	39	
NLT	50	29	21	
<b>Στάδιο</b>				0.2
I	31	2	29	
II	30	6	24	
III	39	6	33	
<b>Ηλικία</b>				>0.9
<60	30	4	26	
≥60	70	10	60	
<b>Φύλο</b>				0.8
Άρρεν	90	20	70	
Θήλυ	60	23	37	

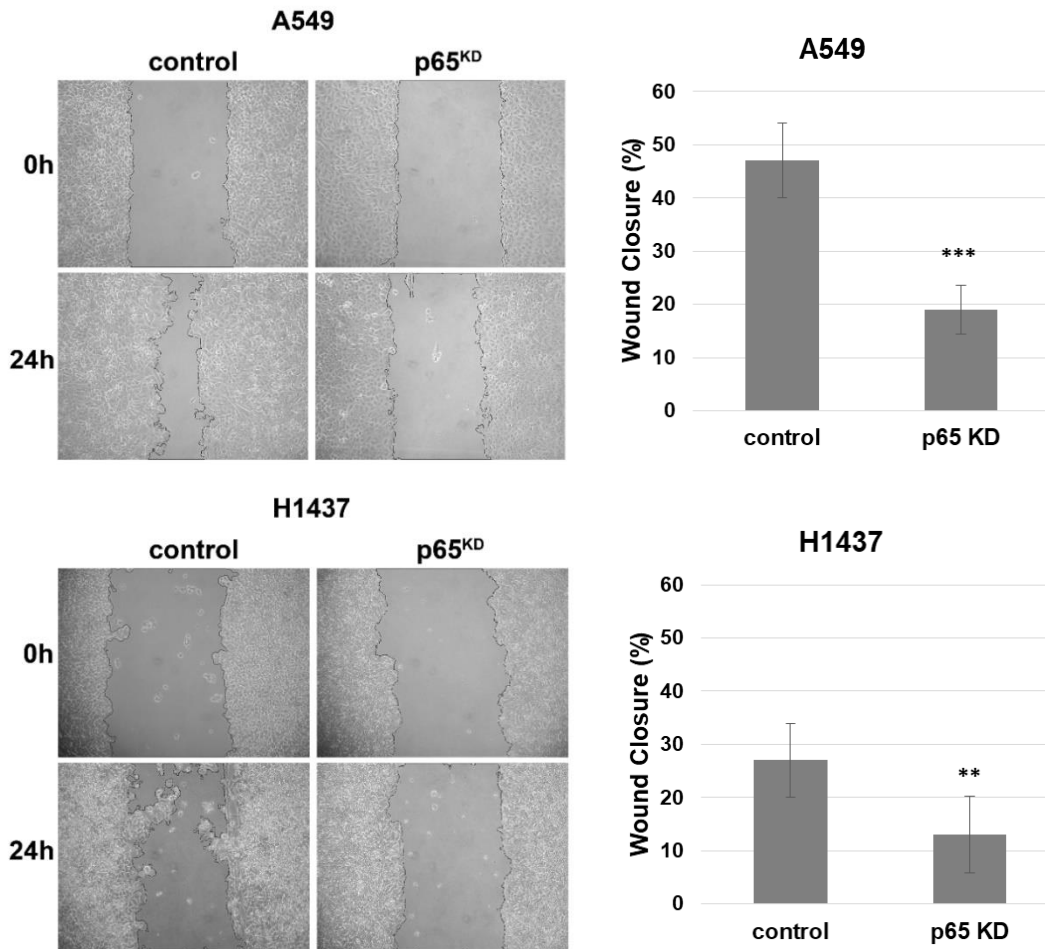


**Εικόνα 3.22.** Η έκφραση του αντιγόνου CD82 μειώνεται σημαντικά σε ασθενείς με NSCLC. Συσχέτιση μεταξύ των κλινικο-παθολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών NSCLC που μελετήθηκαν με την ανοσοϊστοχημική έκφραση του CD82. Το CD82 μειώνεται σημαντικά στους ασθενείς με ADC και SCC σε σύγκριση με τον φυσιολογικό ιστό και ιδιαίτερα σε ασθενείς με ADC. Αντίθετα, η έκφρασή του είναι ανεξάρτητη με το στάδιο της νόσου, την ηλικία ή το φύλο των ασθενών (\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

### **3.9. Ο μεταγραφικός παράγοντας p65 προάγει τη μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων**

Αρκετές μελέτες έχουν καταδείξει το σημαντικό ογκοκατασταλτικό ρόλο του CD82 σε διάφορους τύπους καρκίνου καθώς ρυθμίζει ποικίλες μοριακές διαδικασίες συμπεριλαμβανομένου της κυτταρικής προσκόλλησης, της κινητικότητας και της επιβίωσης των κυττάρων, αλλά και της κυτταρικής γήρανσης, ωστόσο μια από τις σημαντικότερες δράσης της CD82 αφορά την καταστολή της κυτταρικής διείσδυσης και της μετάστασης (284, 290). Επομένως, στη συνέχεια μελετήθηκε κατά πόσο η απώλεια του παράγοντα p65, και η ακόλουθη αύξηση των επιπέδων του CD82, επηρεάζουν τη μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων.

Για το σκοπό αυτό, μελετήθηκε τη μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων με την κλασική δοκιμασία πρόκλησης αμυχής (scratch assay), κατά την οποία πραγματοποιείται μια αμυχή σε καλλιέργεια κυττάρων σε πλήρες ταπήτιο και κατόπιν παρακολουθείται ο ρυθμός κάλυψης της αμυχής. Αρχικά, μελετήθηκε η μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων A549-p65<sup>KD</sup> και H1437-p65<sup>KD</sup>. Και στις δύο περιπτώσεις και ιδιαίτερα στα κύτταρα A549, η απώλεια του p65 είχε σαν αποτέλεσμα τη μειωμένη κινητικότητα των κυττάρων σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου (Εικόνα 3.23.).



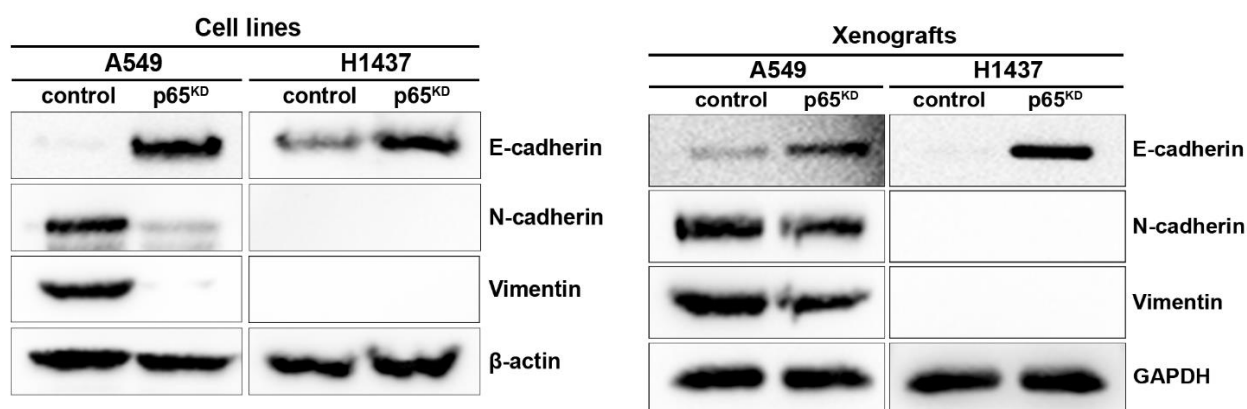
**Εικόνα 3.23. Ο παράγοντας p65 προάγει τη μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων.** Σε καλλιεργούμενα κύτταρα ελέγχου και A549-p65<sup>KD</sup> και H1437-p65<sup>KD</sup> σε πλήρες ταπήτσιο πραγματοποιήθηκε μια αμυχή με τη χρήση πλαστικού ρύγχους και στη συνέχεια παρατηρήθηκε η κάλυψη ή «επούλωση» της αμυχής για 24 ώρες. (n=3 \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

Ένα απαραίτητο στάδιο για τη μετάσταση των κυττάρων είναι η επιθηλιακή-προσμεσεγχυματική μετατροπή (EMT), κατά την οποία τα κύτταρα μεταβάλλουν τον επιθηλιακό τους φαινότυπο και αποκτούν έναν πιο μεσεγχυματικό φαινότυπο που χαρακτηρίζεται από την έκφραση συγκεκριμένων δεικτών αλλά και την ενεργοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων (12, 291, 292). Επειδή ο NF-κB διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της EMT (3, 180), μελετήθηκε στη συνέχεια η έκφραση επιθηλιακών και μεσεγχυματικών δεικτών κατά την αποσιώπηση του παράγοντα p65. Πιο συγκεκριμένα, αναλύθηκε με ανοσοαποτύπωμα κατά Western σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα η έκφραση του επιθηλιακού δείκτη E-καντερίνη (E-cadherin) και των μεσεγχυματικών δεικτών N-καντερίνη (N-cadherin) και βιμεντίνη (vimentin). Στα κύτταρα A549, η απώλεια του p65 είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της E-καντερίνης και μείωση



των επιπέδων των N-καντερίνης και βιμεντίνης, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Ομοίως, στα κύτταρα H1437 παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων της E-καντερίνης, ωστόσο τα κύτταρα αυτά δεν εκφράζουν τους μεσεγγυματικούς δείκτες N-καντερίνη και βιμεντίνη (293, 294) επομένως δεν παρατηρήθηκε η έκφρασή τους (Εικόνα 3.24.).

Από τα αποτελέσματα αυτά συνολικά προέκυψε το συμπέρασμα ότι ο μεταγραφικός παράγοντας p65 προάγει την μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*, προάγοντας τη διαδικασία της EMT.



**Εικόνα 3.24. Ο μεταγραφικός παράγοντας p65 προάγει την έκφραση των δεικτών της EMT *in vitro* και *in vivo*.** Ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από καλλιεργούμενα κύτταρα ελέγχου και p65<sup>KD</sup> A549 και H1437, καθώς επίσης και τα αντίστοιχα κύτταρα που αναπτύχθηκαν ως ξενομοσχεύματα *in vivo*, αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα κατά Western για την έκφραση του επιθηλιακού δείκτη E-καντερίνη και των μεσεγγυματικών δεικτών N-καντερίνη και βιμεντίνη. Ως μάρτυρας αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η έκφραση της β-ακτίνης και της GAPDH.

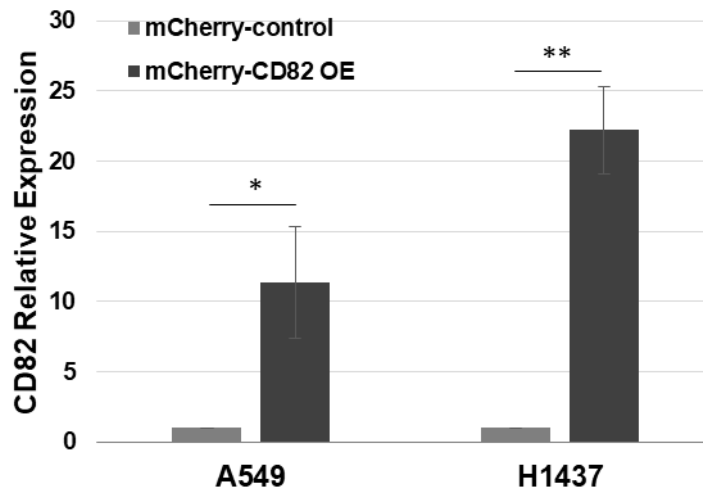
### 3.10. Η απώλεια του μεταγραφικού παράγοντα p65 αναστέλλει την κινητικότητα των κυττάρων και την EMT εν μέρει μέσω της αύξησης των επιπέδων του CD82

Δεδομένου ότι ο NF-κB έχει συσχετιστεί με την άμεση ρύθμιση εκατοντάδων γονιδίων συμπεριλαμβανομένων και γονιδίων που συμμετέχουν στην EMT (3, 180), στη συνέχεια μελετήθηκε εάν οι αλλαγές που παρατηρήθηκαν στα κύτταρα κατά την αποσιώπηση του μεταγραφικού παράγοντα p65 οφείλονται στην αύξηση της έκφρασης του διαμεμβρανικού αντιγόνου CD82. Για το σκοπό αυτό, το CD82 υπερεκφράστηκε στα κύτταρα A549 και H1437 με τη χρήση κατάλληλων πλασμιδιακών φορέων. Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα επιμολύνθηκαν είτε με τον πρότυπο πλασμιδιακό φορέα ελέγχου mCherry (control), ο οποίος εκφράζει την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη mCherry, είτε με τον πλασμιδιακό

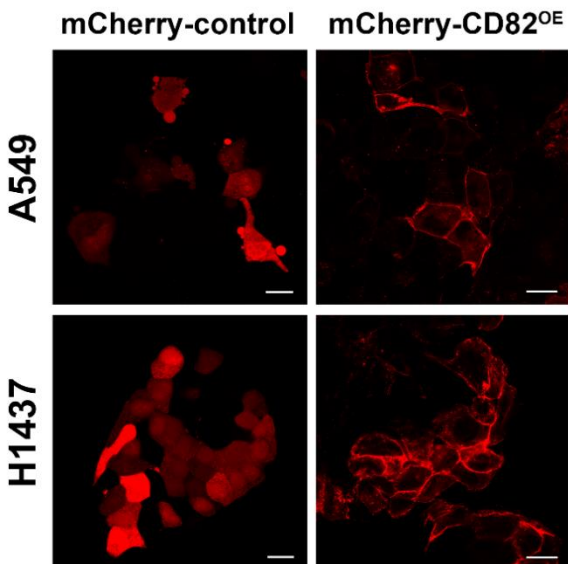
φορέα έκφρασης του CD82, mCherry-CD82 (CD82<sup>OE</sup>), όπου τα κύτταρα εκφράζουν το CD82 συντηγμένο με την πρωτεΐνη mCherry (265). Τα επιμολυσμένα κύτταρα επιλέχθηκαν σε νεομυκίνη (G418) και ακολούθως τα φθορίζοντα κύτταρα συλλέχθηκαν με κυτταρομετρία ροής (FACS sorting).

Η επιτυχής έκφραση του CD82 επιβεβαιώθηκε με ανάλυση της έκφρασης του CD82 με qPCR σε ολικά δείγματα RNA των κυττάρων που κατασκευάστηκαν, όπου επιβεβαιώθηκε αρχικά η επιτυχής αύξηση των επιπέδων του CD82 σε μεταγραφικό επίπεδο (Εικόνα 3.25.A). Επιπλέον, η επιτυχής υπερέκφραση του CD82 επιβεβαιώθηκε και σε πρωτεϊνικό επίπεδο με την παρατήρηση της φθορίζουσας πρωτεΐνης mCherry. Αρχικά, τα επιμολυσμένα κύτταρα παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού, όπου η πρωτεΐνη mCherry στα κύτταρα υπερέκφρασης του CD82 εντοπίστηκε στη μεμβράνη των κυττάρων, καθώς βρίσκεται συντηγμένη με το CD82, σε αντίθεση με τα κύτταρα ελέγχου όπου το mCherry εντοπίστηκε στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 3.25.B.). Επιπλέον, η έκφραση της πρωτεΐνης mCherry αναλύθηκε και σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των κυττάρων H1437-CD82<sup>OE</sup> και των κυττάρων ελέγχου με ανοσοαποτύπωμα κατά Western. Η πρωτεΐνη mCherry διαθέτει μοριακό βάρος ~30 kDa όπως και εντοπίστηκε στο δείγμα ελέγχου, ενώ αντίθετα κατά την υπερέκφραση του CD82 το mCherry εντοπίστηκε στα ~70 kDa καθώς εκφράζεται σε σύντηξη με την πρωτεΐνη CD82, καταδεικνύοντας και με αυτή τη μέθοδο την επιτυχή υπερέκφραση του CD82 (Εικόνα 3.25.Γ.).

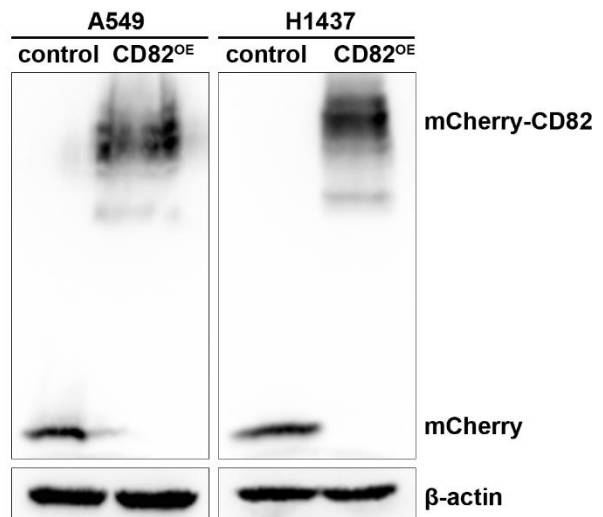
A



B



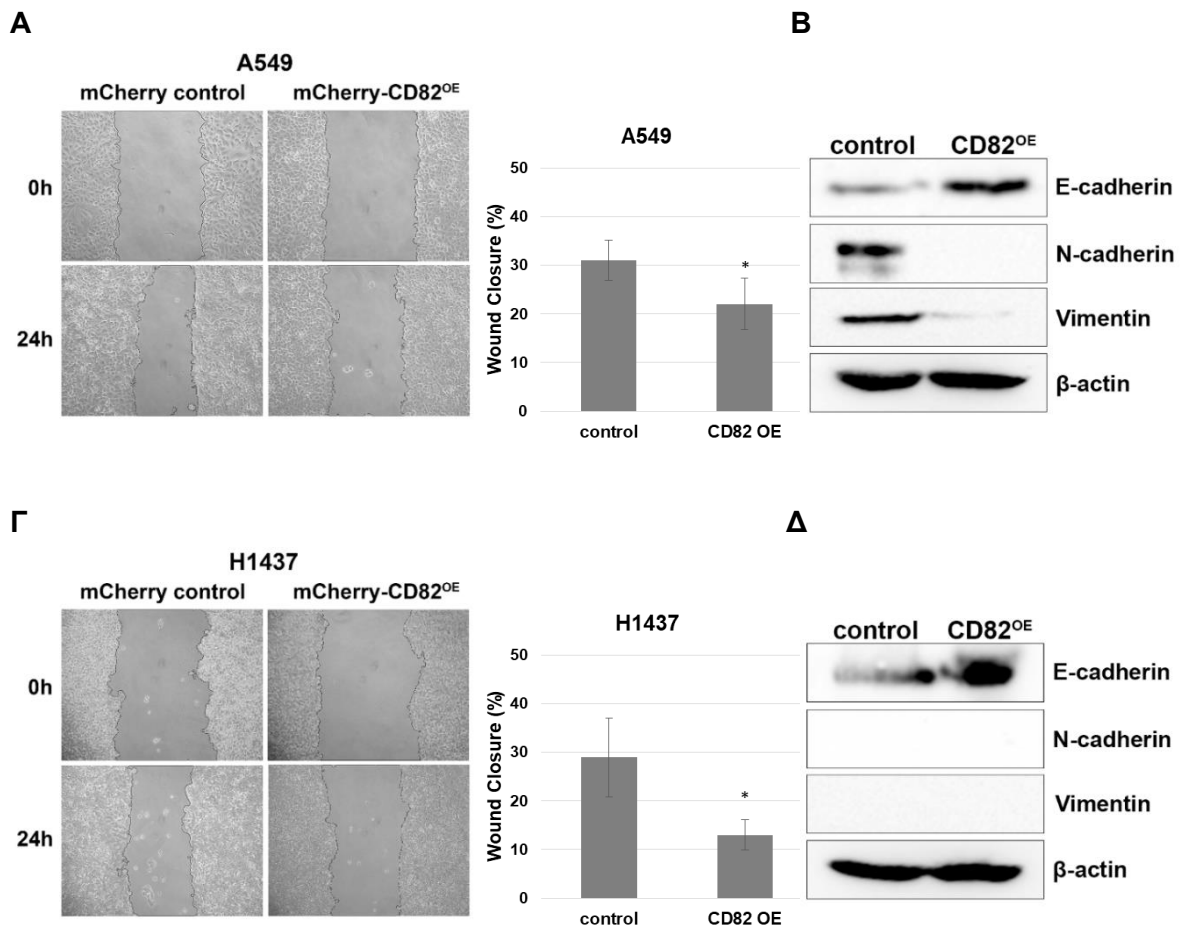
Γ



**Εικόνα 3.25. Υπερέκφραση του CD82 *in vitro*.** Καλλιεργούμενα κύτταρα A549 και H1437 επιμολύνθηκαν με τον πρότυπο πλασμιδιακό φορέα mCherry (control), ο οποίος εκφράζει τη φθορίζουσα πρωτεΐνη mCherry, είτε με τον πλασμιδιακό φορέα mCherry-CD82 (CD82<sup>OE</sup>), όπου τα κύτταρα εκφράζουν την πρωτεΐνη CD82 συντηγμένη με την πρωτεΐνη mCherry. Η επιτυχής υπερέκφραση του CD82 επιβεβαιώθηκε σε μεταγραφικό επίπεδο με qPCR (A), αλλά και σε πρωτεϊνικό επίπεδο με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού με λέιζερ, όπου το mCherry εντοπίστηκε στη μεμβράνη των κυττάρων CD<sup>OE</sup> σε αντίθεση με τον κυτταροπλασματικό εντοπισμό του στα κύτταρα ελέγχου (κλίμακα 20 μm) (B), και με ανοσοαποτύπωμα κατά Western σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα, όπου στα κύτταρα ελέγχου η πρωτεΐνη mCherry ανιχνεύθηκε στο φυσιολογικό μοριακό της βάρος (~30 kDa), ενώ στα κύτταρα CD82<sup>OE</sup> ανιχνεύθηκε υψηλότερα (~70 kDa) καθώς εκφράζεται συντηγμένη με το CD82 (Γ). Ως μάρτυρας ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η έκφραση της β-ακτίνης.

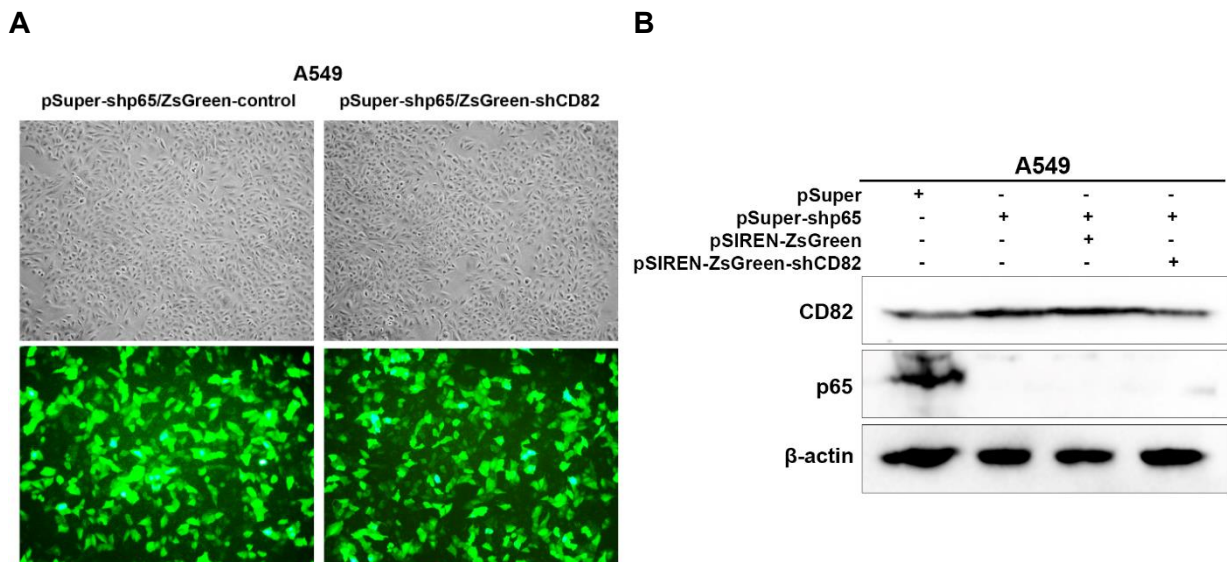


Μετά την κατασκευή των κυττάρων που υπερεκφράζουν το CD82, μελετήθηκε κατά πόσο τα κύτταρα αυτά παρουσιάζουν μειωμένη κινητικότητα καθώς και η ικανότητα του CD82 να επηρεάζει την έκφραση των δεικτών της EMT. Όπως και προηγουμένως, η μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων μελετήθηκε με τη δοκιμασία πρόκλησης αμυχής (scratch assay). Τα αποτελέσματα κατέδειξαν στατιστικά σημαντική μείωση της κινητικότητας των κυττάρων κατά την υπερέκφραση του CD82 και στις δύο κυτταρικές σειρές, A549 και H1437 (Εικόνα 3.26 Α,Γ). Επιπλέον, η ανάλυση ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων των κυττάρων mCherry-CD82<sup>OE</sup> και των αντίστοιχων κυττάρων ελέγχου για την έκφραση των μεσεγχυματικών και επιθηλιακών δεικτών κατέδειξαν τη σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης της E-καντερίνης και στις δύο κυτταρικές σειρές και τη μείωση των επιπέδων της N-καντερίνης και της βιμεντίνης στα κύτταρα A549, λόγω της υπερέκφρασης του CD82 (Εικόνα 3.26 Β,Δ).



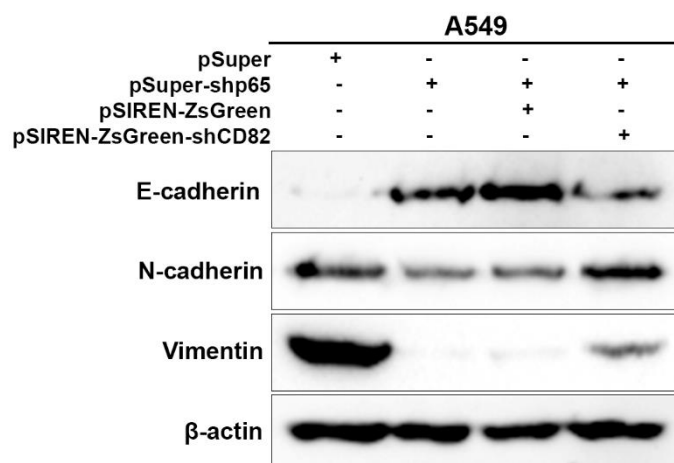
**Εικόνα 3.26.** Το διαμεμβρανικό αντιγόνο CD82 αναστέλλει την κινητικότητα των κυττάρων. Η κινητικότητα των κυττάρων μελετήθηκε με τη δοκιμασία πρόκλησης αμυχής (scratch assay) στα κύτταρα A549-mCherry-CD82<sup>OE</sup> (A) και H1437-mCherry-CD82<sup>OE</sup> (B) σε σύγκριση με τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου. Ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των ίδιων κυττάρων αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα κατά Western για την έκφραση της E-καντερίνης, της N-καντερίνης και της βιμεντίνης (Γ,Δ). Ως μάρτυρας ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η έκφραση της β-ακτίνης. (\* $p < 0.05$ ).

Για την περαιτέρω επιβεβαίωση ότι το CD82 συμβάλλει στο μηχανισμό δράσης του παράγοντα p65, τα επίπεδα έκφρασης του CD82 μειορρυθμίστηκαν στα κύτταρα A549-p65<sup>KD</sup>. Για το σκοπό αυτό, κύτταρα A549-p65<sup>KD</sup> επιμολύνθηκαν με το ρετροϊκό φορέα ελέγχου pSIREN-RetroQ-ZsGreen ή τον pSIREN-RetroQ-ZsGreen-shCD82 (262) οι οποίοι εκφράζουν την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη ZsGreen. Η επιτυχής επιμόλυνση των κυττάρων επιβεβαιώθηκε με παρατήρηση της φθορίζουσας πράσινης πρωτεΐνης ZsGreen με μικροσκοπία φθορισμού (Εικόνα 3.27.A), ενώ ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για την έκφραση του CD82 με ανοσοαποτύπωμα κατά Western. Επιπλέον, στα κύτταρα αυτά επιβεβαιώθηκε και η αποσιώπηση του p65 με ανοσοαποτύπωμα κατά Western (Εικόνα 3.27.B.).



**Εικόνα 3.27. Μειορρύθμιση του CD82 στα κύτταρα p65<sup>KD</sup>.** (A) Μικροσκοπία φθορισμού για τα κύτταρα A549-p65<sup>KD</sup> που επιμολύνθηκαν με τον ρετροϊκό φορέα ελέγχου pSIREN-RetroQ-ZsGreen (pSuper-shp65/ZsGreen-control) ή τον pSIREN-RetroQ-ZsGreen-shCD82 (pSuper-shp65/ZsGreen-shCD82) για την αποσιώπηση του CD82. (B) Ανάλυση ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων με ανοσοαποτύπωμα κατά Western για την έκφραση των CD82 και p65. Η έκφραση της β-ακτίνης χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ελέγχου.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η έκφραση των δεικτών E-καντερίνης, N-καντερίνης και βιμεντίνης με ανοσοαποτύπωμα κατά Western σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν ότι η αποσιώπηση του CD82 επαναφέρει τα επίπεδα έκφρασης της N-καντερίνης και σε μικρότερο βαθμό τα επίπεδα της E-καντερίνης και της βιμεντίνης (Εικόνα 3.28.), επιβεβαιώνοντας την υπόθεση ότι η δράση της υπομονάδας p65 στο NSCLC βασίζεται, τουλάχιστον εν μέρει, στη ρύθμιση των επιπέδων της τετρασπανίνης CD82.



**Εικόνα 3.28. Ρύθμιση της έκφρασης των δεικτών της EMT από το CD82.** Ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των κυττάρων A549-p65<sup>KD</sup> (pSuper-shp65<sup>+</sup>), των κυττάρων A549-p65<sup>KD</sup>/CD82<sup>OE</sup> (pSuper-shp65<sup>+</sup>/pSIREN-ZsGreen-shCD82<sup>+</sup>) αλλά και των κυττάρων ελέγχου A549 (pSuper<sup>+</sup>) και A549 (pSuper-shp65<sup>+</sup>/Ppsiren-ZsGreen<sup>+</sup>) αντίστοιχα, αναλύθηκαν για την έκφραση των πρωτεϊνών E-καντερίνης, N-καντερίνης και βιμεντίνης. Ως μάρτυρας ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η έκφραση της β-ακτίνης.

Τα αποτελέσματα του δεύτερου μέρους της παρούσας μελέτης κατέδειξαν ότι η δράση του μεταγραφικού παράγοντα p65 προάγει την ανάπτυξη του NSCLC *in vivo*. Η δράση αυτή χαρακτηρίζεται από τη μεταβολή μιας σειράς γονιδίων, μεταξύ των οποίων και η τετρασπανίνη CD82 η έκφραση της οποίας μειορρυθμίζεται σημαντικά ή σχεδόν χάνεται σε ασθενείς με NSCLC. Η τετρασπανίνη CD82 χαρακτηρίζεται ως καταστολέας της μετάστασης ενώ και ο NF-κB αποτελεί ρυθμιστή της EMT και της μετάστασης και γι' αυτό μελετήθηκε η επίδραση του p65 και του αντιγόνου CD82 στην μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων και στη ρύθμιση δεικτών της EMT. Τόσο η αποσιώπηση του p65 όσο και η υπερέκφραση του CD82 κατέστειλαν την κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων *in vitro* διαμέσου της μεταβολής στην έκφραση του επιθηλιακού δείκτη E-καντερίνη και των μεσεγχυματικών δεικτών N-καντερίνη και βιμεντίνη, Τέλος, η παράλληλη αποσιώπηση του p65 και του CD82 είχε σαν αποτέλεσμα την επαναφορά στην έκφραση των δεικτών της EMT ως ένα βαθμό, καταδεικνύοντας ότι ο μεταγραφικός παράγοντας p65 προάγει την ανάπτυξη του NSCLC εν μέρει μέσω της μείωσης των επιπέδων του CD82. Συνολικά, τα δεδομένα αυτά παρέχουν ένα νέο μηχανισμό δράσης του NF-κB στον καρκίνο του πνεύμονα.



## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 4.1. Εισαγωγή

Ο μη-μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (NSCLC) είναι ο συχνότερος καρκίνος με την υψηλότερη θνησιμότητα παγκοσμίως (194). Το αδενοκαρκίνωμα του NSCLC (Lung Adenocarcinoma; LUAD), που αποτελεί τον κύριο ιστοπαθολογικό υπότυπο, οφείλεται στη συσσώρευση κυρίως ογκογόνων μεταλλάξεων (195) οι οποίες οδηγούν στην ενεργοποίηση της ΙΚΚβ-εξαρτώμενης κανονικής σηματοδοτικής πορείας του NF-κΒ (225, 226, 241). Η πορεία αυτή, που φυσιολογικά εμπλέκεται στη ρύθμιση των προ-φλεγμονωδών (48) και στρεσογόνων κυτταρικών αποκρίσεων (42, 43), εμφανίζεται ιδιοστατικά ενεργή σε πολλούς τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του NSCLC, προάγοντας την ανάπτυξη του όγκου (52-54). Ωστόσο, οι μοριακοί μηχανισμοί δράσης της δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως. Αντίθετα, ο ρόλος της μη κανονικής πορείας ενεργοποίησης του NF-κΒ που επάγεται διαμέσου της κινάσης ΙΚΚα εμφανίζεται ογκοκατασταλτικός σε ορισμένους τύπους καρκίνου και ογκογόνος σε κάποιους άλλους, ενώ στον καρκίνο του πνεύμονα ο ρόλος της παραμένει ασαφής (256-258). Η διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα συχνά σε ήδη προχωρημένα στάδια της νόσου έχει σαν αποτέλεσμα το προσδόκιμο ζωής των ασθενών να είναι αρκετά μικρό γεγονός που καθιστά επιτακτική τη διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν τη νόσο με σκοπό την ταχύτερη διάγνωση και την αποτελεσματικότερη αντιμετώπισή του.

### 4.2. Η ΙΚΚα καταστέλλει την ανάπτυξη του μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα *in vivo* ανεξάρτητα από την ενεργοποίηση της μη κανονικής σηματοδοτικής πορείας του NF-κΒ

Στο πρώτο μέρος της παρούσας διατριβής, μελετήθηκε ο ρόλος της μη κανονικής πορείας του NF-κΒ στην ανάπτυξη του NSCLC. Για το σκοπό αυτό, σε συνεργασία με Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ) και με το Τμήμα Βιοχημείας και Κυτταρικής Βιολογίας του Πανεπιστημίου Stony Brook της Νέας Υόρκης, κατασκευάστηκαν δυ-διαγονιδιακοί μύες στους οποίους η υπό συνθήκη απαλοιφή της ΙΚΚα επιτυγχάνεται ειδικά στα πνευμονοκύτταρα τύπου ΙΙ (alveolar type ΙΙ; ΑΤ-ΙΙ) μόνο μετά τη χορήγηση ταμοξιφένης. Στους μύες χορηγήθηκε η καρκινογόνος ουσία ουρεθάνιο, η οποία επάγει την ανάπτυξη όγκων κυρίως μέσω μεταλλάξεων του γονιδίου *KRAS* (295, 296). Έξι μήνες μετά τη χορήγηση ουρεθανίου οι μύες θυσιάστηκαν για την απομόνωση των όγκων. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν πως η απαλοιφή της ΙΚΚα είχε σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη

στατιστικά σημαντικά περισσότερων, αλλά και μεγαλύτερων όγκων στους πνεύμονες των διαγονιδιακών μυών σε σύγκριση με τα ζώα ελέγχου (261), καταδεικνύοντας την IKKα ως καταστολέα της ανάπτυξης του NSCLC *in vivo*.

Εν συνεχεία αυτών των αποτελεσμάτων που κατέδειξαν τον ογκοκατασταλτικό ρόλο της IKKα στην καρκινογένεση του πνεύμονα μυών, για να μελετηθεί ο ρόλος της μη κανονικής πορείας του NF-κΒ και στον ανθρώπινο NSCLC *in vivo*, κατασκευάστηκαν τρεις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές NSCLC, οι A549, H1437 και H1299, στις οποίες μειορρυθμίστηκαν τα επίπεδα της κινάσης IKKα (Εικόνα 3.1.). Τα κύτταρα αυτά καθώς και τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου εμβολιάστηκαν υποδόρια σε αθυμικούς μύες NSG για τη μελέτη της ανάπτυξης του ανθρώπινου NSCLC *in vivo*. Τα αποτελέσματα, κατέδειξαν πως η απώλεια της IKKα προάγει και την ανάπτυξη του ανθρώπινου NSCLC, καθώς οι όγκοι που αναπτύχθηκαν από τα IKKα<sup>KD</sup> κύτταρα ήταν σημαντικά μεγαλύτεροι σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου (Εικόνα 3.2.). Μάλιστα, δεδομένου ότι οι τρεις κυτταρικές σειρές NSCLC διαθέτουν διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο (Πίνακας 2.2.) φαίνεται ότι η IKKα δρα ογκοκατασταλτικά στην ανάπτυξη του NSCLC ανεξάρτητα από δράση του ογκογονιδίου KRAS ή της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53.

Όπως συζητήθηκε στην ενότητα 1.5. οι ανοδικές κινάσες ενεργοποίησης των υπομονάδων του NF-κΒ μπορούν να εμφανίζουν και άλλες δράσεις ανεξάρτητες από τις υπομονάδες του NF-κΒ. Επομένως, στο επόμενο βήμα μελετήθηκε εάν η ογκοκατασταλτική δράση της IKKα στο NSCLC εξαρτάται από την ενεργοποίηση της μη κανονικής πορείας ενεργοποίησης του NF-κΒ που οδηγεί στη συγκρότηση των ετεροδιμερών RelB-p52 (48, 49, 70). Για το σκοπό αυτό, κατασκευάστηκαν κύτταρα A549 και H1299 στα οποία μειορρυθμίστηκε η υπομονάδα p52 (p52<sup>KD</sup>) (Εικόνα 3.4.), η κύρια υπομονάδα που ενεργοποιείται διαμέσου της μη κανονικής πορείας. Στη συνέχεια, τα p52-τροποποιημένα κύτταρα καθώς και τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου εμβολιάστηκαν υποδόρια σε αθυμικούς μύες NSG για την ανάπτυξη των όγκων. Σε αντίθεση με την IKKα, η απώλεια της υπομονάδας p52 είχε σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη μικρότερων όγκων (Εικόνα 3.5), γεγονός που υποδηλώνει ότι η υπομονάδα p52 προάγει την ανάπτυξη του NSCLC. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη όπου η υπερέκφραση του p52 ενισχύει την ανάπτυξη καρκίνου του πνεύμονα σε μύες έπειτα από τη χορήγηση ουρεθανίου, ενώ παράλληλα η υψηλή του έκφραση σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα φαίνεται να αποτελεί δείκτη κακής πρόγνωσης (138, 254). Ωστόσο, ο μηχανισμός με τον οποίο ενεργοποιείται η υπομονάδα p52 αλλά και ο μηχανισμός με το οποίο προάγει την ανάπτυξη του καρκίνου του πνεύμονα δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητά.

Επομένως, η IKKα φαίνεται να δρα ανεξάρτητα από την ενεργοποίηση του NF-κΒ στην ανάπτυξη του NSCLC και ο ογκοκατασταλτικός της ρόλος και στα δύο *in vivo* μοντέλα

καρκίνου μυός και ανθρώπου παρουσίασε ιδιαίτερο ενδιαφέρον, δεδομένου ότι τα μέχρι σήμερα ευρήματα εμφανίζονται αντιφατικά. Πιο συγκεκριμένα, σε μια προηγούμενη μελέτη στην οποία η ενδογενής κινάση IKKα αντικαταστάθηκε με μια ανενεργή κινάση IKKα σε διαγονιδιακούς μύες (kinase-dead IKKα knockin mice), τα ζώα ανέπτυξαν αυθόρμητα καρκίνο του πλακώδους επιθηλίου του πνεύμονα (Lung squamous cell carcinoma; LUSC) και πνευμονική φλεγμονή, καταδεικνύοντας τον ογκοκατασταλτικό ρόλο της IKKα στην καρκινογένεση του πνεύμονα (258). Επιπλέον, δύο πολύ πρόσφατες μελέτες παρουσίασαν αντίθετα αποτελέσματα όσον αφορά το ρόλο της IKKα στην *KRAS*-επαγόμενη καρκινογένεση του πνεύμονα *in vivo* και την ανάπτυξη αδενοκαρκινώματος. Και οι δύο μελέτες χρησιμοποίησαν παρόμοια πειραματική προσέγγιση, που περιλαμβάνει την απαλοιφή του γονιδίου της IKKα (*CHUK*) στα επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα των διαγονιδιακών ζώων με το σύστημα της ρεκομπινάσης Cre (Cre-LoxP), παράλληλα με την ενεργοποίηση του ογκογονιδίου *KRAS*<sup>G12D</sup>. Ωστόσο, τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν ήταν αντίθετα καθώς στη μία περίπτωση η απώλεια της IKKα προήγαγε (257), ενώ στην άλλη περίπτωση κατέστειλε (256) την *KRAS*-επαγόμενη ανάπτυξη του καρκίνου του πνεύμονα. Τα αίτια αυτών των αντιφατικών παρατηρήσεων δεν είναι γνωστά και γι' αυτό το λόγο κατέστησαν επιτακτική την ανάγκη για περεταίρω διερεύνηση του ρόλου της IKKα στο NSCLC. Επομένως, στη συνέχεια της παρούσας μελέτης εστιάσαμε το ενδιαφέρον μας στη διερεύνηση του πιθανού μοριακού μηχανισμού δράσης της κινάσης IKKα.

#### **4.3. Η IKKα δρα ανοδικά του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α καταστέλλοντας την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων σε συνθήκες υποξίας**

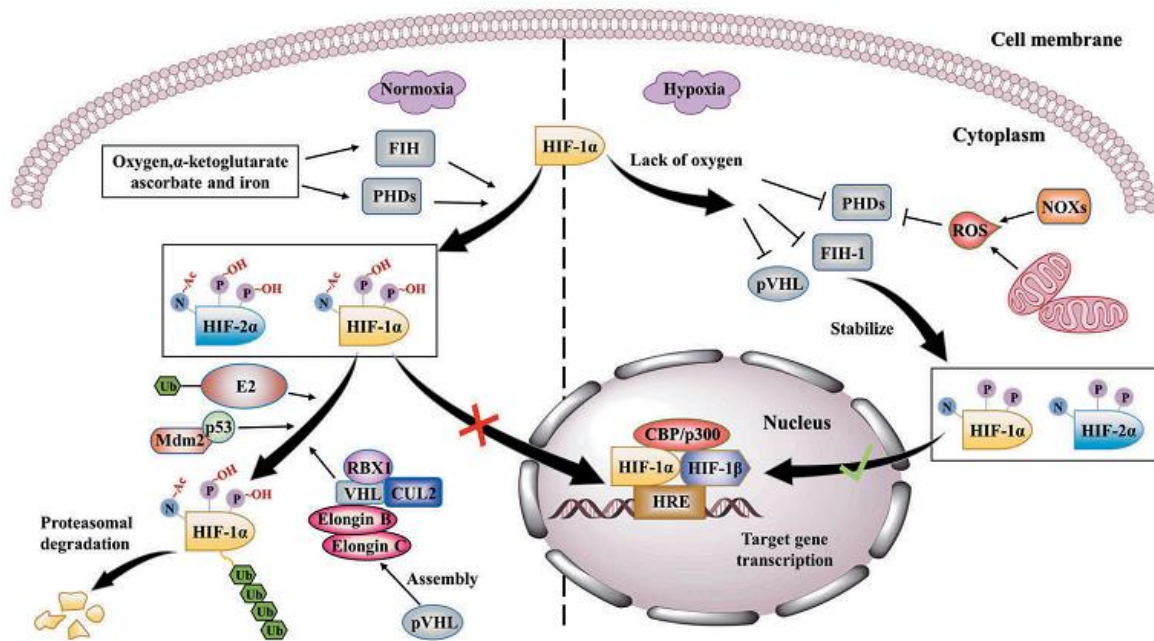
Για να μελετηθεί ο μηχανισμός με τον οποίο η IKKα καταστέλλει την ανάπτυξη του NSCLC συλλέχθηκαν δείγματα ολικού RNA από τους όγκους που αναπτύχθηκαν τόσο στους διαγονιδιακούς μύες όσο και στους μύες NSG που προήλθαν από την ανάπτυξη των ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών πνεύμονα (A549, H1437 και H1299) ως ξενομοσχεύματα *in vivo*, τα οποία υποβλήθηκαν σε αλληλούχιση RNA (RNA-seq). Στη συνέχεια ακολούθησε βιοπληροφορική ανάλυση των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης για την ταυτοποίηση πιθανά κοινά μεταβαλλόμενων γονιδίων μεταξύ του διαγονιδιακού μοντέλου μυός και των ανθρώπινων κυτταρικών σειρών. Η ανάλυση κατέδειξε ένα κοινό πρότυπο μεταβαλλόμενων γονιδίων μεταξύ του διαγονιδιακού μοντέλου μυός και των κυττάρων H1437, κατά την απαλοιφή ή μειορρύθμιση της IKKα (Εικόνα 3.6). Μεταξύ αυτών των γονιδίων παρατηρήθηκαν αρκετά γονίδια τα οποία αποτελούν μεταγραφικούς στόχους

του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1 τα οποία συμμετέχουν στη γλυκολυτική πορεία όπως είναι τα γονίδια *GAPDH* (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; Αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεύδης), *GPI* (Glucose-6-Phosphate Isomerase; Ισομεράση της 6-φωσφορικής γλυκόζης), *PFKL* (6-Phosphofructokinase; 6-Φωσφοφρουκτοκινάση) και *SLC2A1* (Glucose Transporter Type 1 ή GLUT1; Μεταφοράς της γλυκόζης GLUT1) και τα οποία μας κέντρισαν το ενδιαφέρον. Ακόμη παρατηρήθηκε μια αύξηση του γονιδίου *HIGD2A* (Hypoxia Inducible Domain Family Member 2A) σε όλες τις κυτταρικές σειρές και στους διαγονιδιακούς μύες, το οποίο κωδικοποιεί ένα παράγοντα συγκρότησης του συμπλόκου της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (Σύμπλοκο IV) που είναι το τελικό ένζυμο της μιτοχondριακής αναπνευστικής αλυσίδας, και ρυθμίζεται από το μεταγραφικό παράγοντα HIF-1α.

Επομένως στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της IKKα στην έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α και επιλεγμένων γονιδίων στόχων του.

Η υποξία αποτελεί χαρακτηριστικό των συμπαγών όγκων και διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξή τους, ενώ συχνά ευθύνεται για την ανθεκτικότητα των ασθενών στη θεραπεία (270, 297, 298). Κύριοι παράγοντες που ενεργοποιούνται σε συνθήκες υποξίας είναι οι ετεροδιμερείς μεταγραφικοί παράγοντες HIF (Hypoxia-Inducible Factors): HIF-1, HIF-2 και HIF-3, οι οποίοι αποτελούνται από μια εξαρτώμενη από την παρουσία οξυγόνου υπομονάδα α (HIF-1α, HIF-2α ή HIF-3α) και μια σταθερή υπομονάδα HIF-1β (299, 300). Ο παράγοντας HIF-1 αποτελεί τον κύριο και πιο καλά χαρακτηρισμένο ρυθμιστικό παράγοντα στην υποξία. Σε συνθήκες φυσιολογικού οξυγόνου, υδροξυλάσες προλίνης (prolyl hydroxylase; PHD), υδροξυλιώνουν δύο κατάλοιπα προλίνης της υπομονάδας HIF-1α (pro-402, pro-564) με αποτέλεσμα την ουβικιτινίωση του HIF-1α από την πρωτεΐνη pVHL (von-Hippel-Lindau) και την ακόλουθη πρωτεολυτική του αποικοδόμηση. Αντίθετα, σε συνθήκες χαμηλού οξυγόνου οι PHD δεν μπορούν να υδροξυλιώσουν τα κατάλοιπα προλίνης του HIF-1α και ακολούθως η pVHL δεν την ουβικιτινιώνει με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση του HIF-1α. Στη συνέχεια, ο HIF-1α εισέρχεται στον πυρήνα όπου προσδένεται στην υπομονάδα HIF-1β με συνέπεια τη δημιουργία του ενεργού παράγοντα HIF-1 ο οποίος θα προσδεθεί στα στοιχεία απόκρισης στην υποξία (Hypoxia-responsive elements; HRE) των γονιδίων στόχων του ρυθμίζοντας έτσι την έκφρασή τους (Εικόνα 4.1.) (270, 299, 301, 302).





**Εικόνα 4.1. Σχηματική απεικόνιση της ρύθμισης των μεταγραφικών παραγόντων HIF-1/2.** Αριστερά Σε συνθήκες φυσιολογικού οξυγόνου (Normoxia) οι PHD και FIH υδροξυλιώνουν τους παράγοντες HIF-1/2α σε κατάλοιπα προλίνης και ασπαραγίνης. Παράλληλα, η pVHL επάγει τη συγκρότηση ενός συμπλόκου που περιλαμβάνει τα μόρια VHL, Elongin B, Elongin C, CUL2 και RBX1, το οποίο προσδένεται με τη συζευγμένη με ουβικιτίνη λιγάση E2 με σκοπό την ουβικιτινίωση των πρωτεϊνών HIF-1/2α. Επίσης, η p53 στρατολογεί την E3 λιγάση ουβικιτίνης, Mdm2, ώστε να συμβάλει στην πρωτεολυτική αποικοδόμηση του HIF-1α. Δεξιά Σε συνθήκες υποξίας (Hypoxia) η δράση των pVHL, PHD και FIH αναστέλλονται από την περιορισμένη διαθεσιμότητα οξυγόνου και τη δημιουργία ROS στα μιτοχόνδρια αλλά και μέσω άλλων μηχανισμών όπως οι οξειδάσες NADPH (NOX), με αποτέλεσμα την διαφυγή των HIF-1/2α από την πρωτεολυτική αποικοδόμηση. Ακολούθως το διμερές HIF σε σύμπλοκο και με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες προσδένεται στοιχεία HRE (Hypoxia response elements) στο DNA των γονιδίων στόχων του με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της μεταγραφής τους (299)

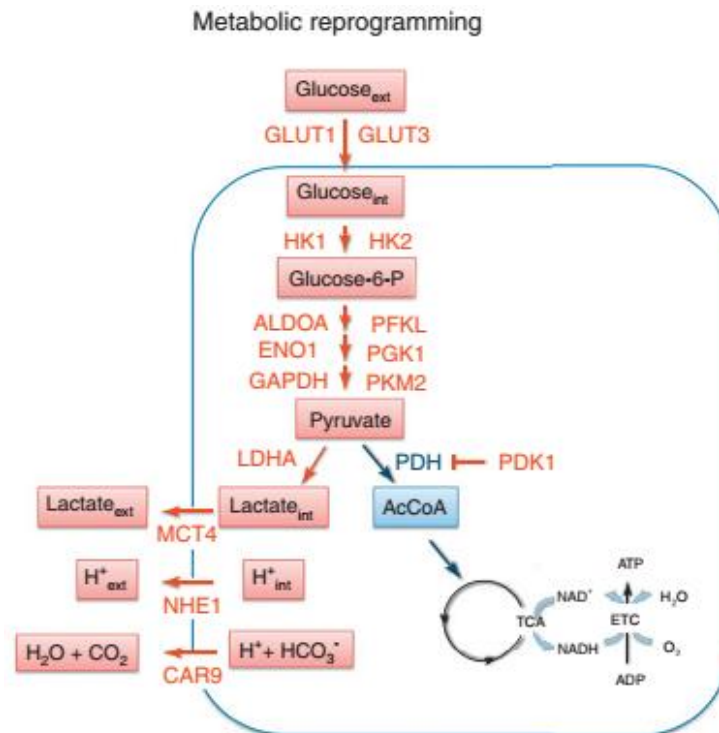
Η αποσιώπηση της IKKα δεν επέφερε μεταβολές στα μεταγραφικά επίπεδα του HIF-1α (Εικόνα 3.7.A.). Αντίθετα, η αποσιώπηση της IKKα οδήγησε στη σημαντική αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του HIF-1α τόσο στο διαγονιδιακό μοντέλο μύος όσο και στα κύτταρα H1437 που αναπτύχθηκαν ως ξενομοσχεύματα *in vivo* (Εικόνα 3.7.B.), καταδεικνύοντας ότι η απουσία έκφρασης IKKα προάγει τη σταθερότητα και συσσώρευση των επιπέδων του HIF-1α, διαμέσου ενός άγνωστου μηχανισμού. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και *in vitro* με την καλλιέργεια κυττάρων H1437-IKKα<sup>KD</sup> και κυττάρων ελέγχου σε συνθήκες χαμηλής προσκόλλησης για τη δημιουργία σφαιρών. Ενώ σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου η απώλεια της IKKα δεν είχε καμία επίδραση στην ανάπτυξη των σφαιρών κυττάρων ως εναιωρήματα, σε συνθήκες 3% υποξίας

παρατηρήθηκε ο σχηματισμός περισσότερων κυτταρικών σφαιρών σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου παράλληλα με την αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του HIF-1α (Εικόνα 3.10.).

Τα γονίδια στόχοι του HIF-1 και κατ' επέκταση ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1 διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη βιολογία του καρκίνου ρυθμίζοντας μεταξύ άλλων τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την αγγειογένεση, τη διαδικασία της EMT αλλά και την τροποποίηση του μεταβολισμού των κυττάρων (269, 270, 298, 301, 303). Φυσιολογικά, η ενέργεια των κυττάρων προέρχεται από την οξειδωτική φωσφορυλίωση, ωστόσο οι συνθήκες υποξίας προκαλούν μια μεταβολική αλλαγή (metabolic switch) από την οξειδωτική φωσφορυλίωση στη γλυκόλυση, διαδικασία που χαρακτηρίζεται από την υψηλή πρόσληψη γλυκόζης και την παραγωγή γαλακτικού. Ο παράγοντας HIF-1 προάγει τη διαδικασία της γλυκόλυσης επάγοντας την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν μεταφορείς της γλυκόζης (glucose transporters; GLUT1, GLUT3), αλλά και ενζύμων που συμμετέχουν στη διαδικασία της γλυκόλυσης, όπως οι εξοκινάσες *HK1*, *HK2*, η αλδολάση *ALDOA*, η ενολάση *ENO1*, *GAPDH*, *PFKL*, η κινάση-1 του φωσφογλυκερικού (*PGK1*), η πυροσταφυλική κινάση M2 (*PKM2*), και η γαλακτική αφυδρογονάση (*LDHA*), τα οποία στα καρκινικά κύτταρα μετατρέπουν τη γλυκόζη σε γαλακτικό, μια μεταβολική διαδικασία που ονομάζεται «φαινόμενο Warburg» (Εικόνα 4.2.) (269, 270, 298, 301).

Επομένως, στη συνέχεια μελετήθηκε η έκφραση δύο από αυτούς τους στόχους, του γονιδίου *HK2* που κωδικοποιεί την εξοκινάση 2 και του γονιδίου *SLC2A1* το οποίο κωδικοποιεί το μεταφορέα GLUT1 τα επίπεδα του οποίου παρατηρούνται αυξημένα σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα (304), ενώ σχετίζονται και θετικά και με μεταλλάξεις του ογκογονιδίου *K-RAS* (305). Τα αποτελέσματα κατέδειξαν τη στατιστικά σημαντική αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων και των δύο στόχων τόσο στο διαγονιδιακό μοντέλο μυός, όσο και στα κύτταρα H1437 που αναπτύχθηκαν ως ξενομοσχεύματα *in vivo* έπειτα από την αποσιώπηση της IKKα (Εικόνα 3.8.), γεγονός που επιβεβαιώνει την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α.

Σε αντίθεση με το γονιδιακό μοντέλο μυός και τα κύτταρα H1437, τα επίπεδα έκφρασης τόσο του HIF-1α όσο και των γονιδίων στόχων του, *SLC2A1* και *HK2*, δεν φαίνεται να μεταβάλλονται στις άλλες δύο κυτταρικές σειρές, A549 και H1299 (Εικόνα 3.9.). Επίσης, το γεγονός αυτό υποδεικνύει την ύπαρξη ενός εναλλακτικού μηχανισμού ρύθμισης σε αυτές τις κυτταρικές σειρές από την IKKα το οποίο χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.



**Εικόνα 4.2. Γονίδια στόχοι του HIF-1 που εμπλέκονται στον επαναπρογραμματισμό του ενεργειακού μεταβολισμού των κυττάρων.** Τα γονίδια-στόχοι του HIF-1 που εμπλέκονται στον επαναπρογραμματισμό του ενεργειακού μεταβολισμού των κυττάρων περιλαμβάνουν τους μεταφορείς γλυκόζης 1 και 3 (glucose transporter 1 and 3; GLUT1, GLUT3), τις εξοκινάσες 1 και 2 (hexokinase 1 and 2; HK1, HK2), τα γλυκολυτικά ένζυμα αλδολάση A (aldolase A; ALDOA), ενολάση 1 (enolase 1; ENO1), αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GAPDH), φωσφοφρουκτοκινάση L (phosphofruktokinase L; PFKL), κινάση του φωσφογλυκερικού 1 (phosphoglycerate kinase 1; PGK1), κινάση του πυροσταφυλικού M2 (pyruvate kinase M2; PKM2) και αφυδρογονάση του γαλακτικού A (lactate dehydrogenase A; LDHA). Η ενζυματική δράση της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού (pyruvate dehydrogenase; PDH) αναστέλλεται από την κινάση PDH (PDH kinase 1; PDK1), με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της μετατροπής του πυροσταφυλικού σε ακετυλο-CoA (AcCoA) για την είσοδό του στον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος (tricarboxylic acid (TCA) cycle). Το γαλακτικό και το ιόν υδρογόνου (H<sup>+</sup>) που παράγονται από τη γλυκόλυση εκρέουν από το κύτταρο διαμέσου του μονοκαρβοξυλικού μεταφορέα 4 (monocarboxylate transporter 4; MCT4), του εναλλάκτη χλωρίου-υδρογόνου 1 (sodium–hydrogen exchanger 1; NHE1) και της καρβονικής ανυδράσης 9 (carbonic anhydrase 9; CAR9) [τροποποιημένο από (269)]

Τα αποτελέσματα του πρώτου μέρους της παρούσας μελέτης καταδεικνύουν τον ογκοκατασταλτικό ρόλο της κινάσης IKKα στην ανάπτυξη του NSCLC ο οποίος ωστόσο είναι ανεξάρτητος από την ενεργοποίηση των υπομονάδων του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB. Επιπλέον, ταυτοποιήθηκε ένας εξελικτικά συντηρημένος μηχανισμός δράσης της IKKα στο NSCLC η οποία αναστέλλει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων σε συνθήκες υποξίας μέσω της αρνητικής ρύθμισης των πρωτεϊνικών επιπέδων του

μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α και της ακόλουθης ρύθμισης των γονιδίων στόχων του, όπως τα γονίδια *SLC2A1* και *HK2*. Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν τα αποτελέσματα της πρόσφατης μελέτης των Song et al. όπου η απαλοιφή της IKKα προάγει την K-Ras-επαγόμενη καρκινογένεση του πνεύμονα μέσω της αύξησης των επιπέδων του NOX2 που κωδικοποιεί μια υπομονάδα του ενζυμικού συμπλόκου της οξειδάσης NADPH/NOX που εμπλέκεται στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species; ROS), και παράλληλα της καταστολής της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα NRF2 ο οποίος ρυθμίζει αρνητικά την παραγωγή ROS, με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων ROS, τον αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την αποφυγή της γήρανσης (257).

Να σημειωθεί ότι η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης (RNA-seq) ταυτοποίησε επίσης και το γονίδιο *NRF2/NFE2L2* ως ένα από εκείνα των οποίων η έκφραση μεταβάλλεται με τη μειορρύθμιση της IKKα τόσο σε όγκους NSCLC μύς όσο και ανθρώπου. Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα μας κατέδειξαν ότι το γονίδιο *NRF2/NFE2L2* ήταν μεταξύ των γονιδίων που αυξορρυθμίστηκαν σε μεγάλους όγκους του πνεύμονα στους μύες IKKα<sup>KO</sup> που προκλήθηκαν από το ουρεθάνιο και επίσης και σε ξενομοσχεύματα όγκου των κυττάρων A549 IKKα<sup>KD</sup> που φέρουν μεταλλαγμένο ογκογονίδιο K-Ras<sup>G12C</sup>. Σε αντίθεση, η έκφραση του *NRF2/NFE2L2* ήταν μειωμένη στους όγκους των ξενομοσχευμάτων των κυττάρων H1437 IKKα<sup>KD</sup>, και δε υπήρχε καμιά μεταβολή στην έκφραση του στους όγκους των ξενομοσχευμάτων των κυττάρων H1299 IKKα<sup>KD</sup>, σε δύο κυτταρικές σειρές που δεν φέρουν μεταλλάξεις στο ογκογονίδιο K-Ras (Εικόνα 3.7). παρόμοια αποτελέσματα που αφορούν τη διαφορική έκφραση του NRF2 εξαρτώμενη από τη κατάσταση του ογκογονιδίου K-Ras, έχουν αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες (Tao et al 2014 Cancer Res).

Συμπερασματικά, τα ευρήματά μας παρέχουν στοιχεία για πρώτη φορά ότι η ογκοκτασταλτική δράση της IKKα στην ανάπτυξη του NSCLC σε επιθηλιακά κύτταρα πνεύμονα μπορεί να συσχετιστεί με την ικανότητά της να λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής ανοδικά της πρωτεΐνης HIF-1α, και επομένως να συνδέεται με τη ρύθμιση της ικανότητας των καρκινικών κυττάρων να μεγαλώνουν σε υποξικό περιβάλλον. Ωστόσο, περαιτέρω διερεύνηση απαιτείται για την ταυτοποίηση του ακριβούς μοριακού μηχανισμού που συνδέει την έκφραση της IKKα με την αποσταθεροποίηση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α.

#### 4.4. Η κανονική πορεία ενεργοποίησης ΙΚΚβ - RelA/p65 προάγει την ανάπτυξη του NSCLC *in vivo*

Στο δεύτερο μέρος της παρούσας μελέτης διερευνήθηκε ο μηχανισμός δράσης της κανονικής πορείας ΙΚΚβ-RelA/p65 στην ανάπτυξη του ανθρώπινου NSCLC. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές NSCLC A549 και H1437 στις οποίες μειορρυθμίστηκε η κύρια μεταγραφική υπομονάδα του NF-κΒ που ενεργοποιείται διαμέσου αυτής της πορείας, η υπομονάδα RelA/p65 (p65<sup>KD</sup>) (Εικόνα 3.11). Τα κύτταρα ελέγχου καθώς επίσης και τα κύτταρα p65<sup>KD</sup> εμβολιάστηκαν υποδόρια αμφίπλευρα σε αθυμικούς μύες NSG και διατηρήθηκαν ως ξενομοσχεύματα *in vivo* για την ανάπτυξη όγκων, με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης του μεταγραφικού παράγοντα RelA/p65 στον ανθρώπινο NSCLC *in vivo*.

Τα αποτελέσματα κατέδειξαν ότι η μειορρύθμιση του p65 οδηγεί στην ανάπτυξη σημαντικά μικρότερων όγκων σε σύγκριση με τα δείγματα ελέγχου καταδεικνύοντας τον ογκογόνο ρόλο του p65 στην ανάπτυξη του NSCLC (Εικόνα 3.12.). Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν και προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας σε συνεργασία με το ΙΙΒΕΑ και το Πανεπιστήμιο Stony Brook, NY, ΗΠΑ, όπου η απαλοιφή της κινάσης ΙΚΚβ, που ενεργοποιεί την κανονική πορεία του NF-κΒ, στα κύτταρα A11, είχε σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση λιγότερων και μικρότερων όγκων στους πνεύμονες των διαγονιδιακών ζώων μετά τη χορήγηση ουρεθανίου (261). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και από άλλες ερευνητικές ομάδες όπου η ενεργοποίηση της πορείας ΙΚΚβ και/ή p65 προάγει την K-Ras-επαγόμενη (225, 226, 230), αλλά και τη χημειο-επαγόμενη (235, 241, 243) καρκινογένεση του πνεύμονα.

Δεδομένου ότι η μειορρύθμιση του p65 οδήγησε στην ανάπτυξη σημαντικά μικρότερων όγκων σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου, στη συνέχεια μελετήθηκε κατά πόσο το p65 μπορεί να επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των κυττάρων. Έτσι σε καλλιεργούμενα κύτταρα A549-p65<sup>KD</sup> και H1437-p65<sup>KD</sup> μελετήθηκε ο ρυθμός πολλαπλασιασμού και το ποσοστό απόπτωσης των κυττάρων σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου (Εικόνα 3.15.). Η μειορρύθμιση του p65 δεν επέφερε στατιστικά σημαντικές διαφορές στον πολλαπλασιασμό, αλλά ούτε και στην απόπτωση των κυττάρων *in vitro*. Ωστόσο, η ανοσοϊστοχημική ανάλυση δειγμάτων των όγκων που απομονώθηκαν από τους αθυμικούς μύες που προκλήθηκαν από την αύξηση των κυττάρων A549-p65<sup>KD</sup> και H1437-p65<sup>KD</sup> ως ξενομοσχεύματα *in vivo*, για την έκφραση του αντιγόνου Ki67 ως δείκτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού κατέδειξε τη στατιστικά σημαντική μείωση των ενεργά πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων κατά τη μειορρύθμιση του p65 *in vivo* (Εικόνα 3.16.). Παρόμοια, αδημοσίευτα αποτελέσματα του εργαστηρίου μας καταδεικνύουν ότι και η

απαλοιφή της κινάσης IKKβ στους διαγονιδιακούς μύες *in vivo* αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, όπως παρατηρήθηκε σε τομές των πνευμόνων που απομονώθηκαν και αναλύθηκαν για την έκφραση του αντιγόνου Kι67. Η παρατηρούμενη διαφορά πιθανά οφείλεται στο διαφορετικό σύστημα που μελετήθηκε ο πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων (δισδιάστατη καλλιέργεια των κυττάρων σε τρυβλίο σε αντίθεση με την ανάπτυξη των κυττάρων σε ένα ζωντανό οργανισμό), καθώς και στον χρονικό διάστημα στο οποίο παρατηρήθηκαν αυτές οι αλλαγές (92 ώρες για τα καλλιεργούμενα κύτταρα σε αντίθεση με τις τέσσερις εβδομάδες ανάπτυξης στους αθυμικούς μύες). Θεωρούμε όμως ότι το σύστημα *in vivo* είναι πιο φυσιολογικό για τη μελέτη του ρόλου και των επιδράσεων ενός γονιδίου στην ανάπτυξη καρκίνου, καθώς τα καρκινικά κύτταρα αλληλεπιδρούν με μια σειρά άλλων κυτταρικών τύπων *in vivo* όπως τα κύτταρα του συνδετικού ιστού, άλλα κύτταρα του στρώματος, και πιθανά ενδοθηλιακά κύτταρα (1).

#### **4.5. Πρότυπο γονιαδιακής έκφρασης NF-κB RelA/p65: Η κανονική πορεία IKKβ - RelA/p65 επάγει μεταξύ άλλων την έκφραση του πρωτο-ογκογονιδίου ROS1 και τη μείωση της έκφρασης του αντιγόνου CD82 στο NSCLC**

Παρά το γεγονός ότι αρκετές μελέτες έχουν καταδείξει το σημαντικό ρόλο της κανονικής πορείας IKKβ/NF-κB-p65 στην ανάπτυξη του καρκίνου του πνεύμονα και του NSCLC ειδικότερα, οι γνώσεις μας για τους μηχανισμούς δράσης καθοδικά της κανονικής πορείας ενεργοποίησης του NF-κB είναι περιορισμένες.

Με σκοπό τη μελέτη του μοριακού μηχανισμού που διέπει την ογκογόνο δράση του παράγοντα p65, στοχεύσαμε στην ταυτοποίηση νέων πιθανών γονιδίων στόχων της κανονικής πορείας του NF-κB στο NSCLC. Για το σκοπό αυτό απομονώθηκαν δείγματα ολικού RNA από τους όγκους που αναπτύχθηκαν ως ξενομοσχεύματα *in vivo* μετά τον ενοφθαλμισμό των κυττάρων A549-p65<sup>KD</sup> και H1437-p65<sup>KD</sup> και των κυττάρων ελέγχου, τα οποία υποβλήθηκαν σε ανάλυση RNA-seq. Ακολούθησε βιοπληροφορική ανάλυση των αποτελεσμάτων, η οποία ταυτοποίησε 13 κοινά γονίδια με αυξημένη έκφραση και 10 κοινά γονίδια με μειωμένη έκφραση έπειτα από την αποσιώπηση του p65 και στις δύο κυτταρικές σειρές, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα δείγματα ελέγχου (Εικόνα 3.15.).

Μεταξύ των γονιδίων ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασαν τα γονίδια, *ROS1* και *CD82* των οποίων η έκφραση παρατηρήθηκε μειωμένη και αυξημένη αντίστοιχα, κατά τη μειορύθμιση του p65, καθώς έχουν συσχετιστεί με διάφορες μορφές καρκίνου συμπεριλαμβανομένου του NSCLC.

Το γονίδιο *ROS1* κωδικοποιεί έναν ορφανό διαμεμβρανικό υποδοχέα που ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων της ινσουλίνης, και εμφανίζει ενεργότητα κινάσης τυροσίνης, ωστόσο ελάχιστα είναι γνωστά για το φυσιολογικό ρόλο της αγρίου τύπου πρωτεΐνης (306, 307). Αντίθετα, χρωμοσωμικές αναδιατάξεις του γονιδίου *ROS1* ευθύνονται για το 1-2% των περιπτώσεων του NSCLC, ενώ έχουν ανιχνευθεί και σε άλλους τύπους καρκίνου όπως ο καρκίνος των ωθηκών και του στομάχου αλλά και στο γλοιοβλάστωμα όπου και ανιχνεύθηκαν για πρώτη φορά. Χρωμοσωμικές αναδιατάξεις παρατηρούνται μεταξύ του γονιδίου *ROS1* και γονιδίων που εδράζονται σε άλλα χρωμοσώματα, όπως τα γονίδια *CD74*, *CDC6*, *LRIG3*, *SDC4*, *SLC34A2* και *TPM3*, αλλά και γονιδίων που εδράζονται στο ίδιο χρωμόσωμα όπως τα *EZR* και *FIG1*. Όλες οι αναδιατάξεις κωδικοποιούν συντηγμένες πρωτεΐνες που αποτελούνται από την επικράτεια κινάσης του υποδοχέα *ROS1* και την εξωκυτάρια επικράτεια του γονιδίου σύντηξης (306-310). Στο NSCLC, οι πιο κοινές αναδιατάξεις εμφανίζονται στο αδενοκαρκίνωμα και περιλαμβάνουν το γονίδιο *SLC34A2* (Solute Carrier Family 34 Member 2) που κωδικοποιεί ένα μεταφορέα φωσφορικού, και το γονίδιο *CD74* που κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου II η οποία δρα ως υποδοχέας για τον ανασταλτικό παράγοντα μετανάστευσης των μακροφάγων αλλά και ως μοριακός συνοδός για τα μόρια τάξης II του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC II) (282, 311). Με άγνωστο μέχρι σήμερα μηχανισμό, οι συντηγμένες πρωτεΐνες που προκύπτουν από αυτές τις χρωμοσωμικές αναδιατάξεις εμφανίζουν ιδιοστατική ενεργότητα της επικράτειας κινάσης του *ROS1*, με συνέπεια τη σηματοδότηση πορειών που προάγουν τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων όπως είναι οι πορείες των κινασών MAP αλλά και οι πορείες PI3K/mTOR και JAK/STAT (307, 308, 312, 313). Μέχρι σήμερα στο NSCLC έχουν αναπτυχθεί θεραπείες στόχευσης του *ROS1* με τη χρήση αναστολέων (Tyrosine Kinase Inhibitors; TKIs), ωστόσο μεγάλο ποσοστό των ασθενών αποκτά τελικά ανθεκτικότητα σε αυτές τις θεραπείες και επομένως είναι ιδιαίτερα σημαντικό να μελετηθούν οι μηχανισμοί που διέπουν τη δράση του ογκογονιδίου *ROS1* (283, 314-318).

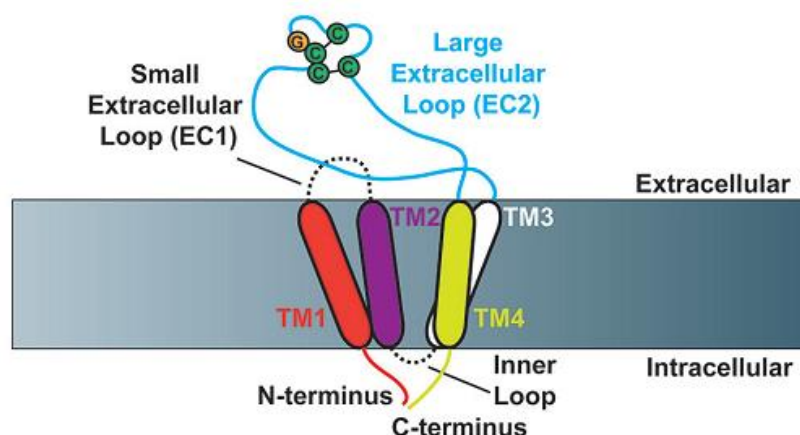
Τα δεδομένα που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη καταδεικνύουν για πρώτη φορά την ικανότητα του NF-κB RelA/p65 να ρυθμίζει τα μεταγραφικά επίπεδα του *ROS1*. Τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης επιβεβαιώθηκαν με qPCR όπου παρατηρήθηκε η στατιστικά σημαντική μειωμένη έκφραση του *ROS1* τόσο στα καλλιεργούμενα κύτταρα *in vitro*, όσο και σε αυτά που αναπτύχθηκαν ως ξενοσμοσχέυματα *in vivo*, έπειτα από την αποσιώπηση του p65 (Εικόνα 3.16.). Ωστόσο, σύμφωνα με δημοσιευμένες μελέτες, στα κύτταρα A549 δεν ανιχνεύονται πρωτεϊνικά επίπεδα της πρωτεΐνης *ROS1* (286, 287). Περαιτέρω πειράματα εκτεταμένης αλληλούχισης (deep sequencing) DNA θα μπορούσαν να παρέχουν περισσότερες πληροφορίες για την ύπαρξη πιθανών συντήξεων του γονιδίου *ROS1* με άλλα γονίδια σε αυτά τα κύτταρα, ενώ η πιθανή

ρύθμιση της έκφρασης του *ROS1* διαμέσου του μεταγραφικού παράγοντα p65 θα μπορούσε να μελετηθεί σε ένα διαφορετικό κυτταρικό σύστημα όπως για παράδειγμα τα κύτταρα HCC78 τα οποία είναι γνωστό ότι εκφράζουν τη συντηγμένη πρωτεΐνη SLC34A2-ROS1.

Ο δεύτερος στόχος που κέντρισε το ενδιαφέρον ήταν το γονίδιο *KAI/CD82*. Σε μια πρόσφατη μελέτη σε καρκινικά κύτταρα παγκρέατος το αντιγόνο CD82 έχειδειχθεί ότι προσδένεται άμεσα με την πρωτεΐνη Timp-1 (Tissue inhibitor of metalloproteinases-1) στην επιφάνεια των κυττάρων, προάγοντας την ενδοκυττάρωσή της (319). Στον καρκίνο του πνεύμονα, η πρωτεΐνη Timp-1 επάγεται από την IKKβ σε ένα μοντέλο μυός K-Ras<sup>G12D</sup>-επαγόμενης ογκογένεσης, προάγοντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την ανάπτυξη των όγκων ανεξάρτητα από τη δράση της ως αναστολέας των μεταλλοπρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, η Timp-1 ενεργοποιείται διαμέσου της πορείας K-Ras/ERK/NF-κB και με τη σειρά της ενισχύει την ενεργοποίηση της πορείας Erk σχηματίζοντας ένα βρόγχο θετικής ανατροφοδότησης. Επιπλέον, η μελέτη κατέδειξε ότι η δράση της Timp-1 εξαρτάται από την πρόσδεσή της με την τετρασπανίνη CD63 (230).

Το *CD82* κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου III η οποία ανήκει στην οικογένεια των τετρασπανινών (tetraspanins) ή αλλιώς TM4SF (Transmembrane 4 Superfamily), και συγκεκριμένα την τετρασπανίνη TSPAN27. Οι τετρασπανίνες αποτελούν μικρές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, που όπως υποδηλώνει και το όνομά τους διαπερνούν τη μεμβράνη τέσσερις φορές. Δομικά, χαρακτηρίζονται από τις τέσσερις διαμεμβρανικές επικράτειες, έναν μικρό (EC1) και ένα μεγάλο (EC2) εξωκυτταρικό βρόγχο, ένα μικρό κυτταροπλασματικό βρόγχο (IL) και 2 μικρές κυτταροπλασματικές επικράτειες που αποτελούν το καρβοξυ-τελικό (C-terminal) και αμινο-τελικό άκρο (N-terminal) (Εικόνα 4.3.) (320, 321). Στον άνθρωπο, η οικογένεια αποτελείται από 33 μέλη. Τα περισσότερα μέλη της οικογένειας απαντώνται σχεδόν σε όλους τους ιστούς και τους κυτταρικούς τύπους (π.χ. CD9, CD63, CD81, CD82, CD151), ενώ άλλα μέλη περιορίζονται στα αιμοποιητικά κύτταρα (π.χ. CD37, CD53). Η δράση των τετρασπανινών έχει συσχετιστεί με διάφορες βιολογικές λειτουργίες όπως η ανοσολογική απόκριση, η διακυτταρική επικοινωνία, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η κυτταρική διαφοροποίηση ωστόσο κάποια μέλη έχουν κεντρίσει ιδιαίτερα το ενδιαφέρον των επιστημόνων καθώς έχουν συσχετιστεί με την πρόοδο διαφόρων μορφών καρκίνου κυρίως εξ' αιτίας της συμβολής τους στη διαδικασία της κυτταρικής προσκόλλησης (cell adhesion), της κυτταρικής διείσδυσης (cell invasion) αλλά και της μετάστασης (322-327).



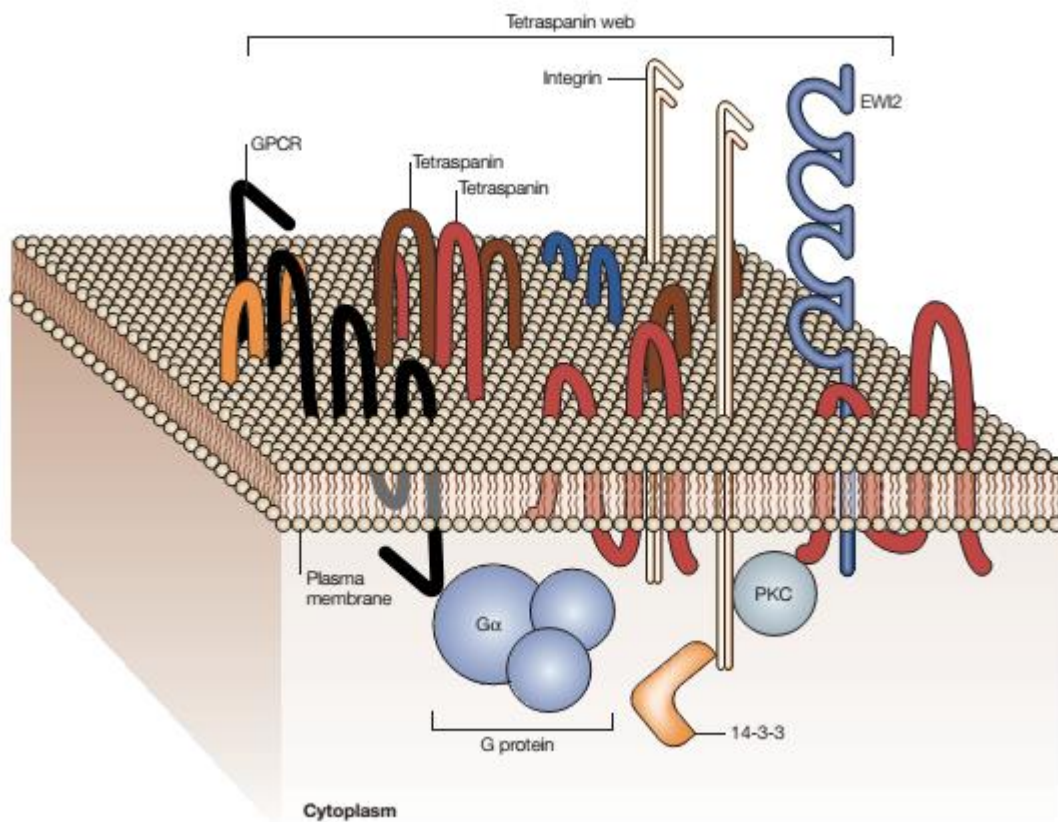


**Εικόνα 4.3. Δομή των τετρασπανινών.** Χαρακτηριστική δομή των τετρασπανινών οι οποίες διαθέτουν τέσσερις διαμεμβρανικές επικράτειες (TM1-TM4) οι οποίες σχηματίζουν ένα μικρό (EC1) και ένα μεγάλο (EC2) εξωκυττάριο βρόγχο καθώς και ένα μικρό ενδοκυττάριο βρόγχο. Το αμινο- και καρβοξυ-τελικό άκρο των τετρασπανινών βρίσκεται στην ενδοκυττάρια πλευρά της μεμβράνης. Απεικονίζονται επίσης το πρότυπο αμινοξέων Cys-Cys-Gly καθώς και οι δύο χαρακτηριστικοί δισουλφιδικοί δεσμοί που σχηματίζονται στον EC2 (320).

Οι τετρασπανίνες, δεν διαθέτουν εγγενή δράση χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να συγκροτούν οργανωμένα πολυμερή σύμπλοκα, τόσο με μέλη της οικογένειας των τετρασπανινών όσο και με άλλες πρωτεΐνες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, σχηματίζοντας μεμβρανικές μικρο-επικράτειες πλούσιες σε τετρασπανίνες (Tetraspanin-enriched microdomains; TEMs) ή, όπως αλλιώς αναφέρεται, ένα δίκτυο τετρασπανινών (Tetraspanin web) (Εικόνα 4.4.) (328). Μελέτες έχουν καταδείξει την αλληλεπίδραση των τετρασπανινών, συμπεριλαμβανομένου και του CD82, με διάφορους τύπους ιντεγκρινών, με υποδοχείς των B κυττάρων (CD4, CD8, CD19), με άλλες τετρασπανίνες (CD81, CD63 και CD9), με μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC I, MHC II), με κυτταροπλασματικά σηματοδοτικά μόρια (κινάση σερίνης/θρεονίνης PKC $\alpha$ ) αλλά και μεμβρανικούς υποδοχείς (EGFR, ErbB2) (320, 323, 327, 329). Βασικός ρόλος των τετρασπανινών αποτελεί η οργάνωση των ανωτέρω μορίων σε λειτουργικά σηματοδοτικά σύμπλοκα στη μεμβράνη του κυττάρου. Η δράση τους μπορεί να είναι άμεση ή να πραγματοποιείται διαμέσου άλλων πρωτεϊνών που βρίσκονται στην TEM. Επιπλέον, σε κάθε κυτταρικό τύπο, οι TEM αποτελούνται από διαφορετικούς τύπους τετρασπανινών και πρωτεϊνών που σχετίζονται με αυτές, και επομένως οι τετρασπανίνες συμμετέχουν σε μοριακές διαδικασίες που μπορεί να αφορούν συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους (320, 330).

Παρά την πρόοδο των τελευταίων ετών, οι μοριακοί μηχανισμοί που διέπουν τις δράσεις των τετρασπανινών στον καρκίνο παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άγνωστοι, επομένως, στη συνέχεια της παρούσας μελέτης εστίασαμε στη διερεύνηση του πιθανού μηχανισμού δράσης

του μεταγραφικού παράγοντα p65 στο NSCLC διαμέσου της ρύθμισης της τετρασπανίνης CD82. Αρχικά, τα αποτελέσματα της ανάλυσης RNA-seq τα οποία ταυτοποίησαν την αύξηση του CD82 κατά την αποσιώπηση του p65 επιβεβαιώθηκαν σε μεταγραφικό και πρωτεϊνικό επίπεδο με qRT-PCR (Εικόνα 3.16.) και ανοσοαπώττωμα κατά Western (Εικόνα 3.17.) αντίστοιχα, τόσο στα καλλιεργούμενα κύτταρα *in vitro*, όσο και στα αντίστοιχα κύτταρα που αναπτύχθηκαν ως ξενομοσχεύματα *in vivo*. Η αποσιώπηση του p65 είχε σαν αποτέλεσμα τη στατιστικά σημαντική αύξηση των μεταγραφικών και πρωτεϊνικών επιπέδων του CD82 *in vitro* αλλά και *in vivo*, γεγονός που καταδεικνύεται για πρώτη φορά μέσα από την παρούσα μελέτη.



**Εικόνα 4.4. Δίκτυο τετρασπανινών (tetraspanin web).** Το δίκτυο τετρασπανινών σχηματίζει παροδικά συμπλέγματα που περιλαμβάνουν διαμεμβρανικά αλλά και κυτταροπλασματικά σηματοδοτικά μόρια, προάγοντας τη σηματοδότηση από εξωκυτταρικά ερεθίσματα. Για παράδειγμα, οι χημειοκίνες που προσδέονται στους υποδοχείς GPCR (G-protein-coupled receptors) ενισχύουν την κυτταρική προσκόλληση διαμέσου των ιντεγκρινών. Οι τετρασπανίνες συνδέονται με τις ιντεγκρίνες προάγοντας τη μεταγωγή σήματος μεταξύ των υποδοχέων GPCR και των ιντεγκρινών. Επιπλέον, οι τετρασπανίνες έχουν την ικανότητα να στρατολογούν ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά ένζυμα, όπως η πρωτεϊνική κινάση C (PKC) η οποία εμπλέκεται στη φωσφορύλιωση των ιντεγκρινών αλλά και των υπομονάδων των πρωτεϊνών G, που αποτελούν μέλη του ενδοκυτταρικού συμπλόκου GPCR. Άλλες αλληλεπιδράσεις μπορεί να αφορούν την οικογένεια πρωτεϊνών 14-3-3 η οποία εμπλέκεται στη ρύθμιση διάφορων ενδοκυτταρίων σηματοδοτικών πορειών αλλά και μέλη της υπερ-οικογένειας των ανοσοσφαιρινών όπως η EWI-2. Συνολικά, η ικανότητα των τετρασπανινών να συνδέονται ταυτόχρονα με άλλες τετρασπανίνες αλλά και με ποικίλα σηματοδοτικά μόρια επιτρέπει τη μεταγωγή σημάτων και διευκολύνει το συντονισμό των ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών πορειών (331).

Ωστόσο, δεν είναι η πρώτη φορά που μέλη της οικογένειας του NF-κΒ συσχετίζονται με την έκφραση του CD82. Ο TNFα έχει δειχθεί ότι μπορεί να επάγει την έκφραση του CD82 διαμέσου του NF-κΒ χωρίς ωστόσο να έχει μελετηθεί σε βάθος ο μοριακός μηχανισμός (332). Αντίθετα, η IL-1β έχει δειχθεί ότι μπορεί να επάγει την έκφραση του CD82 διαμέσου ομοδιμερών συμπλόκων p50/p50 που βρίσκονται δεσμευμένα στον υποκινητή του *KAI1/CD82*. Πιο συγκεκριμένα, σε κύτταρα που βρίσκονται σε φάση ηρεμίας τα ομοδιμερή p50/p50 δεσμεύονται από το κατασταλτικό σύμπλοκο N-CoR/TAB2/HDAC3 το οποίο μετά τη χορήγηση IL-1β αντικαθίσταται από συν-ενεργοποιητικά σύμπλοκα που περιλαμβάνουν τον παράγοντα Tip60, προάγοντας τη μεταγραφή του *KAI1/CD82* (333). Με ένα παρόμοιο μηχανισμό ρυθμίζεται η έκφραση του CD82 σε μεταστατικά και μη καρκινικά κύτταρα προστάτη. Στα μη μεταστατικά κύτταρα το ενεργοποιητικό σύμπλοκο Tip60/pontin δεσμεύεται στο διμερές p50/p50 προάγοντας την έκφραση του CD82, ενώ αντίθετα στα μεταστατικά κύτταρα το σύμπλοκο Tip60/pontin αντικαθίσταται από το κατασταλτικό σύμπλοκο β-κατενίνη/gerpin (334). Ακόμη, σε μια πιο πρόσφατη μελέτη ο μεταγραφικός παράγοντας ATF3 δρα είτε ως καταστολέας, όντας σε σύμπλοκο με τον μεταγραφικό παράγοντα p50, είτε ως ενεργοποιητής, όντας σε σύμπλοκο με το μεταγραφικό παράγοντα JunB, του γονιδίου *KAI1/CD82* σε καρκινικά κύτταρα προστάτη (335).

Το CD82 εκτός από τον εντοπισμό του στην κυτταροπλασματική μεμβράνη μπορεί να εντοπιστεί και σε άλλα κυτταρικά οργάνδια όπως τα ενδοσώματα και τα λυσοσώματα μέσω της διαδικασίας της ενδοκυττάρωσης. Μάλιστα η ενδοκυττάρωση του CD82 έχει αναφερθεί ότι μειώνει σημαντικά την ικανότητά του CD82 να καταστέλλει τη μετάσταση (289). Με σκοπό τη μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού του CD82 αναλύθηκε με ανοσοφθορισμό και συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού η έκφραση του CD82 στα κύτταρα A549-p65<sup>KD</sup> και H1437-p65<sup>KD</sup> και τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου (Εικόνα 3.18.). Στα κύτταρα H1437 το CD82 εντοπίζεται σχεδόν αποκλειστικά στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του κυττάρου, ενώ στα κύτταρα A546 εντοπίζεται τόσο στην κυτταροπλασματική μεμβράνη όσο και στο κυτταρόπλασμα γεγονός που μπορεί να υποδηλώνει την μειωμένη ενεργότητα του CD82 σε αυτά τα κύτταρα.

#### **4.6. Η έκφραση του CD82 χάνεται σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα**

Μελέτες σε δείγματα ασθενών με καρκίνο έχουν καταδείξει ότι το CD82 θα μπορούσε να αποτελέσει ένα χρήσιμο προγνωστικό βιοδείκτη καθώς η έκφρασή του αποτελεί ένδειξη καλής πρόγνωσης, ενώ αντίθετα η απώλεια έκφρασής του έχει συσχετιστεί με προχωρημένα στάδια της νόσου και μειωμένη επιβίωση των ασθενών σε αρκετούς τύπους καρκίνου (285, 290, 336).

Επομένως, στη συνέχεια μελετήθηκε ανοσοϊστοχημικά η έκφραση του CD82 σε ένα σύνολο 100 δειγμάτων ασθενών με NSCLC, 50 ασθενών με αδenoκαρκίνωμα (LUAD) και 50 με καρκίνωμα του π्लाκώδους επιθηλίου (LUSC), αλλά και σε 50 δείγματα φυσιολογικού ιστού πνεύμονα, με τη μορφή μικροσυστοιχιών ιστού (Tissue microarray, TMA) (Εικόνα 3.19). Τα αποτελέσματα κατέδειξαν τη στατιστικά σημαντική μείωση στην έκφραση του CD82 στα δείγματα ασθενών με NSCLC σε σύγκριση με τα δείγματα φυσιολογικού ιστού πνεύμονα. Επιπλέον, η απώλεια έκφρασης του CD82 είναι εντονότερη σε ασθενείς με LUAD σε σύγκριση με τους ασθενείς που πάσχουν από LUSC όπως φάνηκε από τα αποτελέσματά μας (Εικόνες 3.20. και 3.21.) Ωστόσο, δεν υπήρξε καμία συσχέτιση της έκφρασης του CD82 με την ηλικία, το φύλο ή το στάδιο της νόσου.

Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν προηγούμενες μελέτες που υποστηρίζουν ότι η έκφραση του CD82 χάνεται σε ασθενείς με NSCLC ενώ αποτελεί κακό δείκτη πρόγνωσης καθώς σχετίζεται με τη μειωμένη επιβίωση των ασθενών. Επιπλέον, σε αρκετές περιπτώσεις η απώλεια έκφρασης του CD82 έχει επίσης συσχετιστεί με την εξέλιξη της νόσου αλλά και με το αυξημένο μεταστατικό δυναμικό των ασθενών (337-340).

#### **4.7. Η κανονική πορεία του NF-κΒ προάγει, την κινητικότητα των κυττάρων και την EMT εν μέρει διαμέσου της μείωσης της έκφρασης του CD82**

Μια από τις κυριότερες αιτίες θνησιμότητας των ασθενών με καρκίνο αποτελεί η μετάσταση καθώς ευθύνεται για το 90% των θανάτων που σχετίζονται με καρκίνο. Η εξέλιξη των καρκινικών κυττάρων σε διεισδυτικά, μεταστατικά κύτταρα πραγματοποιείται μέσω του «καταρράκτη διείσδυσης-μετάστασης» που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της διαδικασίας της επιθηλιακής-προς-μεσεγχυματικής μετατροπής ή EMT, η οποία σχετίζεται με την απώλεια του επιθηλιακού και την απόκτηση ενός μεσεγχυματικού κυτταρικού φαινοτύπου (1, 15).

Η μεταστατική διαδικασία τροφοδοτείται από τη φλεγμονή, ένα χαρακτηριστικό του καρκίνου, που οδηγεί στην ενεργοποίηση της κανονικής σηματοδοτικής πορείας του NF-κΒ, κύριου ρυθμιστή των πλειοτροπικών μεταγραφικών παραγόντων που προάγουν την EMT (EMT-TFs) (3, 341). Η αναστολή της ενεργότητας του NF-κΒ σε καρκινικές σειρές πνεύμονα έχει δείχθει ότι μειώνει τη μεταστατική ικανότητα των κυττάρων *in vitro* και *in vivo* (190, 249, 342). Αντίθετα, αυξημένη έκφραση του NF-κΒ στα επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα προάγει τη δημιουργία φλεγμονής, την ογκογένεση στον πνεύμονα και τη μετάσταση. (250).

*In vitro*, σε καρκινικές κυτταρικές σειρές πνεύμονα, ο NF-κB προάγει τη διεισδυτικότητα των κυττάρων και τη μετάσταση στον πνεύμονα διαμέσου της ρύθμισης της έκφρασης μεταλλοπρωτεϊνών όπως η MMP9 (190) και η MMP2 (343). Επιπλέον, μόρια τα οποία προάγουν τη μετάσταση έχουν δείχθει ότι δρουν διαμέσου του NF-κB και την έκφραση ιντεγκρινών. Σε καρκινικές σειρές πνεύμονα, ο NF-κB προάγει την έκφραση ιντεγκρινών που αποτελούν διαμεμβρανικούς υποδοχείς αλληλεπίδρασης με μόρια της εξωκυτταρικής θεμέλιας ουσίας και οι οποίες προάγουν τη μεταστατική ικανότητα των κυττάρων (251, 252) ενώ αντίστοιχα και οι ιντεγκρίνες μπορούν να επάγουν την ενεργοποίηση του NF-κB υποδηλώνοντας την ύπαρξη ενός θετικού μηχανισμού ανατροφοδότησης που προάγει τη μεταστατική ικανότητα των κυττάρων τουλάχιστον *in vitro* (253). Τέλος, ένας διαφορετικός μηχανισμός περιλαμβάνει την πρωτεΐνη ικρίωμα CARMA3 (CARD-recruited membrane-associated protein 3) η οποία ενεργοποιεί τον NF-κB που με τη σειρά του μέσω της αύξησης των επιπέδων του miR-182 αναστέλλει τη δράση του αναστολέα της μετάστασης NME2 προάγοντας τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων *in vitro* αλλά και *in vivo* (344).

Αρκετά μέλη της οικογένειας των τετρασπανινών διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική μετανάστευση, τη διείσδυση και τη μετάσταση, μεταξύ αυτών και το CD82 (323, 325). Το 1995 η δράση του συσχετίστηκε για πρώτη φορά με την αναστολή της μετάστασης στον καρκίνο του προστάτη (345) και έκτοτε έχει χαρακτηριστεί ως αναστολέας της μετάστασης σε αρκετούς τύπους καρκίνου συμπεριλαμβανομένου του μαστού, του πνεύμονα, του παχέος εντέρου, του στόματος και του παγκρέατος (284).

Η μειωμένη έκφραση του CD82 δεν σχετίζεται με γενετικές μεταλλάξεις ή απώλεια ετεροζυγωτίας (346), αλλά όπως συζητήθηκε και στην Παράγραφο 4.5. η ρύθμισή του γίνεται κυρίως σε μεταγραφικό επίπεδο. Στον καρκίνο του πνεύμονα, μειωμένα επίπεδα του CD82 έχουν συσχετιστεί με μεταλλάξεις του γονιδίου *EGFR* *in vitro* και *in vivo* (347). Αντίστοιχα, το CD82 μπορεί να αλληλεπιδρά άμεσα με τον EGFR και να αναστέλλει τη δράση του και κατ' επέκταση τη μετανάστευση των κυττάρων (348, 349). Δύο πρόσφατες μελέτες έχουν καταδείξει την αρνητική ρύθμιση του CD82 από τον TGF-β (350, 351).

Μελέτες έχουν αναδείξει πιθανούς μηχανισμούς δράσης του CD82 στην αναστολή της μετάστασης. Ένας από αυτούς περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση του CD82 των καρκινικών κυττάρων με την πρωτεΐνη DARC (Duffy antigen receptor for chemokines) των ενδοθηλιακών κυττάρων, αντίδραση που λαμβάνει χώρα κατά την προσπάθεια των καρκινικών κυττάρων να διεισδύσουν στην κυκλοφορία μέσω των αγγείων. Η αλληλεπίδραση αυτή επάγει τη γήρανση των καρκινικών κυττάρων διαμέσου της μείωσης της έκφρασης του γονιδίου *TBX2* και ακόλουθη αύξηση του *CDKN1A* που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p21 (352, 353). Το CD82 σχηματίζει σύμπλοκα με διάφορες πρωτεΐνες στην κυτταροπλασματική μεμβράνη μεταβάλλοντας τη δράση τους, μεταξύ των οποίων και ο

υποδοχέας του αυξητικού παράγοντα c-Met. Αρκετές μελέτες έχουν καταδείξει ότι το CD82 καταστέλλει τη μεταναστευτική και διεισδυτική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων μέσω της αναστολής της σηματοδότησης διαμέσου του c-Met (354-356), μεταξύ άλλων και στον καρκίνο του πνεύμονα όπου το CD82 αλληλεπιδρά άμεσα με τον υποδοχέα c-Met παρεμποδίζοντας τη c-Met-εξαρτώμενη ενεργοποίηση των πορειών Ras/Rac-Cdc42 και PI3K/Rac/Cdc42 που συμβάλουν στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού (357, 358). Το CD82 αναστέλλει επίσης την ενεργοποίηση της κινάσης Src μέσω των ιντεγκρινών (354, 355) αλλά και μέσω της CDCP1 (CUB-domain-containing protein 1) μιας πρωτεΐνης που αλληλεπιδρά με τις τετρασπανίνες στις TEM. Σε αυτή την περίπτωση, η απενεργοποίηση της κινάσης Src είχε σαν αποτέλεσμα την αποικοδόμηση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α και τη μειωμένη έκφραση του VEGF (359).

Σύμφωνα με τις παραπάνω μελέτες, τόσο ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ, όσο και η τετρασπανίνη CD82, ρυθμίζουν τη διαδικασία της μετάστασης. Επομένως, στη συνέχεια μελετήθηκε κατά πόσο ο NF-κΒ προάγει τη μεταστατική ικανότητα των κυττάρων διαμέσου της ρύθμισης του CD82. Για το σκοπό αυτό, εκτός από την αποσιώπηση του p65 κατασκευάστηκαν κύτταρα A549 και H1437 τα οποία υπερεκφράζουν την τετρασπανίνη CD82 ώστε να μελετηθεί κατά πόσο οι αλλαγές που παρατηρούνται κατά την αποσιώπηση του παράγοντα p65 οφείλονται στην αύξηση της έκφρασης του CD82 (Εικόνα 3.24.). Αρχικά, μελετήθηκε η επίπτωση της αποσιώπησης του p65 ή της υπερέκφρασης του CD82 στη μεταναστευτική ικανότητα (κινητικότητα) των κυττάρων με τη μέθοδο της πρόκλησης αμυχής (scratch assay). Τα αποτελέσματα κατέδειξαν ότι η απώλεια του παράγοντα p65 ή η υπερέκφραση του CD82 μείωσε σημαντικά την κινητικότητα των κυττάρων *in vitro* και στις δύο κυτταρικές σειρές πνεύμονα (Εικόνες 3.22. και 3.25.).

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η έκφραση δεικτών που σχετίζονται με τη διαδικασία της EMT, και συγκεκριμένα ο επιθηλιακός δείκτης E-καντερίνη και οι μεσεγχυματικοί δείκτες N-καντερίνη και βιμεντίνη σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των καλλιεργούμενων κυττάρων ελέγχου και p65<sup>KD</sup> και των αντίστοιχων κυττάρων που αναπτύχθηκαν ως ξενομοσχεύματα *in vivo*, αλλά και σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των κυττάρων που υπερεκφράζουν το CD82. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν ότι τόσο η απώλεια του παράγοντα p65 όσο και η υπερέκφραση του CD82 είχαν σαν αποτέλεσμα την αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της E-καντερίνης και τη μείωση των μεσεγχυματικών δεικτών N-καντερίνη και βιμεντίνη (Εικόνες 3.23 και 3.25.), καταδεικνύοντας ότι η απώλεια του p65 ή η υπερέκφραση του CD82 σχετίζονται με την καταστολή της EMT.

Για να επιβεβαιωθεί το γεγονός ότι η απώλεια του p65 αναστέλλει τη διαδικασία της EMT διαμέσου της αύξησης των επιπέδων του CD82, μειορρυθμίστηκε η έκφραση του CD82 στα κύτταρα A549-p65<sup>KD</sup> (Εικόνα 3.26.). Από τα διπλά επιμολυσμένα κύτταρα απομονώθηκαν

ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα τα οποία αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα κατά Western για την έκφραση των δεικτών της EMT. Η αποσιώπηση του CD82 είχε σαν αποτέλεσμα τη μερική επαναφορά των πρωτεϊνικών επιπέδων των μεσεγχυματικών δεικτών N-καντερίνη και βιμεντίνη και τη μερική απώλεια της E-καντερίνης (Εικόνα 3.27.), γεγονός που καταδεικνύει ότι η ο παράγοντας p65 προάγει την EMT και πιθανά τη μεταστατική ικανότητα των κυττάρων εν μέρει διά μέσου της μείωσης των επιπέδων του CD82.

Πρόσφατες μελέτες επιβεβαιώνουν τη ρύθμιση της EMT σε καρκινικές κυτταρικές σειρές πνεύμονα από το μεταγραφικό παράγοντα NF-κB. Πιο συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση του NF-κB αυξάνει την γονιδιακή έκφραση κύριων μεταγραφικών παραγόντων που ρυθμίζουν την EMT όπως οι Twist1, Zeb2 και Snai2, και την έκφραση των μεσεγχυματικών δεικτών βιμεντίνη, N-καντερίνη και φιμπρονεκτίνη, ενώ παράλληλα μειώνει τα επίπεδα της E-καντερίνης (342, 360). Αντίθετα το CD82 προάγει την έκφραση της E-καντερίνης ενώ αναστέλλει την έκφραση του Snai1 και σχετίζεται αντίστροφα με τους μεσεγχυματικούς δείκτες N-καντερίνη και βιμεντίνη σε καρκινικά κύτταρα προστάτη, παγκρέατος και ήπατος (351, 361). Επιπλέον, η έκφραση του CD82 έχει συσχετιστεί με τη ρύθμιση της EMT και τη μετάσταση ασθενών με NSCLC (339, 362, 363).

Συνολικά, τα αποτελέσματα του δεύτερου μέρους της παρούσας μελέτης κατέδειξαν τον ογκογόνο ρόλο της κανονικής πορείας του NF-κB στο NSCLC *in vivo*, ενώ ανέδειξαν νέους πιθανούς στόχους της κανονικής πορείας του NF-κB μεταξύ αυτών το ογκογονίδιο ROS1, και την τετρασπανίνη CD82 (TSPAN287). Τόσο η αποσιώπηση του μεταγραφικού παράγοντα p65 *in vitro* αλλά και *in vivo* όσο και η υπερέκφραση του CD82 κατέστειλαν την κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων NSCLC διαμέσου της ρύθμισης της έκφρασης των της EMT όπως είναι η E-καντερίνη, η N-καντερίνη και η βιμεντίνη. Τέλος, καταδείχθηκε ότι η δράση αυτή του μεταγραφικού παράγοντα εξαρτάται, τουλάχιστον εν μέρη, από τη ρύθμιση των επιπέδων της τετρασπανίνης CD82.

Η παρούσα μελέτη ταυτοποίησε ένα πιθανό νέο μηχανισμό δράσης της κανονικής πορείας του NF-κB στην ανάπτυξη του ανθρώπινου NSCLC *in vivo* και *in vitro*. Ωστόσο, κάποια ερωτήματα παραμένουν αναπάντητα όπως το εάν η ρύθμιση της τετρασπανίνης CD82 από το p65 είναι άμεση ή έμμεση, οι μηχανισμοί δράσης του CD82 καθοδικά της ενεργοποίησής του αλλά και η δράση της τετρασπανίνης CD82 *in vivo*.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης προέκυψαν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

- Η ΙΚΚα καταστέλλει την ανάπτυξη του NSCLC *in vivo* τόσο σε ένα διαγονιδιακό μοντέλο μύς όσο και στον ανθρώπινο NSCLC
- Η ΙΚΚα καταστέλλει την ανάπτυξη του NSCLC ανεξάρτητα από την ενεργοποίηση της μη-κανονικής πορείας του NF-κΒ.
- Η απώλεια της ΙΚΚα προάγει την ανάπτυξη του NSCLC *in vitro* και *in vivo* διαμέσου της αύξησης των πρωτεϊνικών επιπέδων του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α και της ακόλουθης μεταγραφικής ενεργοποίησης των γονιδίων στόχων του *SLC2A1* και *HK2*
- Η πορεία ΙΚΚβ-RelA/p65 προάγει την ανάπτυξη του NSCLC *in vivo*.
- Ο μεταγραφικός παράγοντας p65 προάγει την έκφραση του ογκογονιδίου *ROS1*, ενώ αντίθετα καταστέλλει την έκφραση της τετρασπανίνης CD82
- Ο μεταγραφικός παράγοντας p65 προάγει την ανάπτυξη του NSCLC *in vitro* και *in vivo*, εν μέρει, διαμέσου της καταστολής της έκφρασης του καταστολέα της μετάστασης CD82
- Η αποσιώπηση του μεταγραφικού παράγοντα p65 ή η υπερέκφραση του CD82 καταστέλλουν την κινητικότητα των κυττάρων αλλά και τη διαδικασία της EMT
- Η έκφραση του CD82 χάνεται σε δείγματα ασθενών με LUAD και LUSC σε σύγκριση με φυσιολογικά δείγματα πνεύμονα



## Περίληψη

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι η συχνότερη μορφή καρκίνου με την υψηλότερη θνησιμότητα παγκοσμίως. Κλινικά διακρίνεται στο μη-μικροκυτταρικό (NSCLC) και στο μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (SCLC) που αντιπροσωπεύουν το ~85% και ~15% όλων των περιπτώσεων, αντίστοιχα. Το αδενοκαρκίνωμα του NSCLC, που αποτελεί τον κύριο ιστοπαθολογικό υπότυπο (~55%), οφείλεται στη συσσώρευση ογκογόνων μεταλλάξεων οι οποίες οδηγούν στην ενεργοποίηση της κανονικής σηματοδοτικής πορείας του NF-κB, IKKβ-p65/p50. Η πορεία αυτή, που φυσιολογικά εμπλέκεται στη ρύθμιση των προ-φλεγμονωδών και στρεσογόνων κυτταρικών αποκρίσεων, εμφανίζεται ιδιοστατικά ενεργή σε πολλούς τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του NSCLC, προάγοντας την ανάπτυξη του όγκου. Ωστόσο, στο NSCLC οι μοριακοί μηχανισμοί δράσης της δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως. Ομοίως, ενώ η δράση της μη κανονικής πορείας ενεργοποίησης του NF-κB που επάγεται διαμέσου της κινάσης IKKα, IKKα-RelB/p52 γενικά προάγει την καρκινογένεση, στο NSCLC είναι ελάχιστα μελετημένα. Επιπλέον, οι κινάσες, IKKα και IKKβ, εμφανίζουν και ανεξάρτητες δράσεις από την ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB. Ενώ η κινάση IKKβ προάγει την ανάπτυξη NSCLC, αντίθετα, ο ρόλος της κινάσης IKKα εμφανίζεται ογκοκατασταλτικός σε ορισμένους τύπους καρκίνου και ογκογόνος σε κάποιους άλλους, ενώ στον καρκίνο του πνεύμονα ο ρόλος της παραμένει ασαφής.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση του ρόλου της κανονικής και μη-κανονικής πορείας ενεργοποίησης του NF-κB στην ανάπτυξη του NSCLC αλλά και η ταυτοποίηση νέων γονιδίων στόχων που διέπουν τη δράση τους.

Για τη μελέτη του ρόλου της μη-κανονικής πορείας στην καρκινογένεση του πνεύμονα χρησιμοποιήθηκαν καρκινικές κυτταρικές σειρές NSCLC στις οποίες μειορρυθμίστηκε η κινάση IKKα, ή η υπομονάδα NF-κB p52 και οι οποίες εμβολιάστηκαν υποδόρια αμφίπλευρα σε αθυμικούς μύες ως ξενομοσχεύματα *in vivo*. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν ότι ενώ η κινάση IKKα καταστέλλει την ανάπτυξη του NSCLC, η υπομονάδα p52 προάγει την ανάπτυξή του, και επομένως ο ογκοκατασταλτικός ρόλος της IKKα είναι ανεξάρτητος από την ενεργοποίηση του NF-κB. Αυτά τα ευρήματα επιβεβαιώθηκαν και σε ένα δυ-διαγονιδιακό μοντέλο μύος *in vivo* όπου η απάλειψη της IKKα στα πνευμονοκύτταρα τύπου-II είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού και του μεγέθους των όγκων στους πνεύμονες των διαγονιδιακών μυών μετά τη χορήγηση του χημικού καρκινογόνου ουρεθανίου. Για τη μελέτη του μηχανισμού δράσης της IKKα στην καρκινογένεση του πνεύμονα, πραγματοποιήθηκε ανάλυση RNA-seq σε δείγματα RNA από τους όγκους που απομονώθηκαν από τα ξενομοσχεύματα και τους όγκους που αναπτύχθηκαν στους

διαγονιδιακούς μύες για την ταυτοποίηση γονιδίων-στόχων της ΙΚΚα. Η δράση της κινάσης ΙΚΚα είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση της έκφρασης γονιδίων-στόχων του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α, όπως είναι τα γονίδια *GAPDH*, *GPI*, *PFKL*, *SLC2A1* και *HIGD2A*. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν έναν εξελικτικά συντηρημένο, ογκοκατασταλτικό μηχανισμό δράσης της ΙΚΚα στο NSCLC κατά τον οποίο η ΙΚΚα μειώνει τη σταθερότητα και την ενεργότητα του HIF-1α και τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του *SLC2A1* και *HK2 in vivo*, μειώνοντας την ικανότητα ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων σε συνθήκες υποξίας.

Για τη μελέτη του ρόλου της κανονικής πορείας στην καρκινογένεση του πνεύμονα χρησιμοποιήθηκαν καρκινικές κυτταρικές σειρές NSCLC στις οποίες μειορρυθμίστηκε η υπομονάδα του NF-κΒ, RelA/p65 που ενεργοποιείται από την κινάση ΙΚΚβ και οι οποίες αναπτύχθηκαν ως ξενομοσχεύματα *in vivo*. Η αποσιώπηση του p65 είχε σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη σημαντικά μικρότερων όγκων. Για την ταυτοποίηση γονιδίων-στόχων που μεταβάλλονται με τη δράση της κανονικής σηματοδοτικής πορείας του NF-κΒ πραγματοποιήθηκε ανάλυση RNA-seq σε δείγματα RNA από τους όγκους που απομονώθηκαν. Μεταξύ των γονιδίων που ταυτοποιήθηκαν ήταν το πρωτο-ογκογονίδιο *ROS1* και το γονίδιο του υποδοχέα LGR6 η έκφραση των οποίων παρατηρήθηκε μειωμένη απουσία της υπομονάδας RelA/p65, ενώ αντίθετα αυξημένη παρατηρήθηκε η έκφραση του γονιδίου *CD82/KAI1*, το οποίο κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική τετρασπανίνη που δρα ως καταστολέας της μετάστασης. Η αποσιώπηση του RelA/p65 ή η υπερέκφραση του CD82 είχε σαν αποτέλεσμα την καταστολή της διαδικασίας της επιθηλιακής-προς-μεσεγχυματικής μετατροπής (EMT) διαμέσου της αύξησης των επιπέδων έκφρασης της E-καντερίνης που αποτελεί κύριο δείκτη του επιθηλιακού φαινοτύπου. Συνολικά, τα αποτελέσματα κατέδειξαν ότι η δράση του μεταγραφικού παράγοντα RelA/p65 στην ανάπτυξη του NSCLC προάγει τη μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων και τη διαδικασία της EMT, εν μέρει, διαμέσου της μειορρύθμισης του CD82.

Συμπερασματικά, ενώ η ΙΚΚα καταστέλλει την ανάπτυξη του NSCLC καταστέλλοντας την ενεργοποίηση του HIF-1α και των γονιδίων-στόχων του, η κανονική πορεία του NF-κΒ ΙΚΚβ - RelA/p65 προάγει την ανάπτυξη των όγκων *in vivo*, διαμέσου, μεταξύ άλλων, της μείωσης της έκφρασης του καταστολέα της μετάστασης CD82.

## Summary

### Investigation of the role of NF- $\kappa$ B signaling pathways in lung carcinogenesis and the regulation of their target genes

Roupakia Eugenia

Lung cancer is the most common type of cancer and the leading cause of cancer related deaths worldwide. It is clinically divided into non small cell lung cancer (NSCLC) and small cell lung cancer (SCLC) that account for ~85% and ~15% of all cases respectively. Lung adenocarcinoma (LUAD), the main histopathological subtype of NSCLC (~55%), develops in distinct steps involving oncogenic mutations that activate the canonical IKK $\beta$ -p65/p50 pathway. The canonical NF- $\kappa$ B pathway is normally involved in the regulation of pro-inflammatory and stress cellular responses, however it is found aberrantly activated in many cancer types, including NSCLC, promoting tumor growth. However, the molecular mechanisms that govern its role in lung cancer progression are not fully understood. On the contrary, the role of the non canonical NF- $\kappa$ B activation pathway, mediated through IKK $\alpha$  kinase, IKK $\alpha$ -RelB/p52 seems to either promote or inhibit tumor progression in different types of cancers while its role in lung cancer remains understudied. Importantly, both IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  kinases can have independent functions of NF- $\kappa$ B activation. While IKK $\beta$  promotes NSCLC progression, the role of IKK $\alpha$  seems to be tumor suppressive in some types of cancer and tumor promoting in others, while its role in lung cancer progression is still unclear.

The aim of the present study was the investigation of the role of both canonical and non-canonical NF- $\kappa$ B activation pathways in NSCLC progression and the identification of novel target genes and possible molecular pathways through which they mediate their effects.

To study the role of non canonical NF- $\kappa$ B activation pathway in NSCLC we used human NSCLC cancer cell lines where we stably knocked-down either IKK $\alpha$  kinase or the p52 NF- $\kappa$ B subunit. The generated cell lines were subcutaneously inoculated in immune-compromised NSG mice to grow as *in vivo* xenografts. The results showed that while IKK $\alpha$  acts to suppress NSCLC growth, p52 subunits enhances tumor formation, and therefore IKK $\alpha$  in NSCLC acts as a tumor suppressor independently of NF- $\kappa$ B activation. These findings were also verified in a bi-transgenic *in vivo* mouse model where IKK $\alpha$  ablation in alveolar type II cells resulted in the formation of more tumors and of greater size in the mice lungs upon administration of the chemical carcinogen urethane. In order to study the molecular mechanism through which IKK $\alpha$  suppresses lung cancer development we

performed RNA-seq analysis in RNA samples from the dissected tumors from both the bi-transgenic mice and the *in vivo* xenografts, so as to identify novel IKK $\alpha$  target genes. IKK $\alpha$  led to the downregulation of HIF-1 $\alpha$  target genes including *GAPDH*, *GPI*, *PFKL*, *SLC2A1* and *HIGD2A*. Our results identified an evolutionary conserved, tumor suppressive mechanism through which IKK $\alpha$  prevents stabilization and activation of HIF-1 $\alpha$  transcription factor and subsequent activation of its target genes *SLC2A1* και *HK2* *in vivo*, therefore preventing cancer cell proliferation under hypoxia.

To study the role of canonical NF- $\kappa$ B activation pathway in NSCLC, we knocked-down the NF- $\kappa$ B subunit RelA/p65 in NSCLC cell lines, which were then inoculated in immune-compromised mice and allowed to grow as *in vivo* xenografts. Downregulation of the RelA/p65 transcription factor resulted in significantly reduced tumor growth. Total RNA isolated from the tumors that developed, was subjected to RNA-seq analysis. Among the differentially expressed genes identified was the *ROS1* proto-oncogene and the LGR6 receptor gene, whose expression was downregulated upon p65 knock-down, while the expression of the cell surface antigen CD82 that acts as a metastasis suppressor was found upregulated. RelA/p65 knock-down or CD82 overexpression was shown to suppress the epithelial-to-mesenchymal cell transition (EMT) by increasing the expression of E-cadherin, the critical marker of the epithelial cell phenotype. Our results showed that RelA/p65 acts to promote NSCLC development through promoting cancer cell migration and epithelial-to-mesenchymal-transition (EMT), at least in part, through downregulation of CD82 expression.

Collectively, while IKK $\alpha$  suppresses NSCLC progression through inhibition of HIF-1 $\alpha$  transcription factor activation and subsequent regulation of its target genes, the canonical NF- $\kappa$ B activation pathway IKK $\beta$ -RelA/p65 promotes tumor formation *in vivo*, in part through downregulation of the CD82 metastasis suppressor.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
2. Weinberg RA. Mechanisms of malignant progression. *Carcinogenesis*. 2008;29(6):1092-5.
3. Markopoulos GS, Roupakia E, Marcu KB, et al. Epigenetic Regulation of Inflammatory Cytokine-Induced Epithelial-To-Mesenchymal Cell Transition and Cancer Stem Cell Generation. *Cells*. 2019;8(10).
4. Markopoulos GS, Roupakia E, Tokamani M, et al. A step-by-step microRNA guide to cancer development and metastasis. *Cellular oncology*. 2017;40(4):303-39.
5. Liu F, Wang L, Perna F, et al. Beyond transcription factors: how oncogenic signalling reshapes the epigenetic landscape. *Nature reviews Cancer*. 2016;16(6):359-72.
6. Garraway LA, Lander ES. Lessons from the cancer genome. *Cell*. 2013;153(1):17-37.
7. Shen H, Laird PW. Interplay between the cancer genome and epigenome. *Cell*. 2013;153(1):38-55.
8. Sarkies P, Sale JE. Cellular epigenetic stability and cancer. *Trends in genetics: TIG*. 2012;28(3):118-27.
9. You JS, Jones PA. Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? *Cancer cell*. 2012;22(1):9-20.
10. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, et al. Cancer genome landscapes. *Science*. 2013;339(6127):1546-58.
11. Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nature reviews Cancer*. 2009;9(4):265-73.
12. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(6):1420-8.
13. Brabletz T. To differentiate or not--routes towards metastasis. *Nature reviews Cancer*. 2012;12(6):425-36.
14. Brabletz T. EMT and MET in metastasis: where are the cancer stem cells? *Cancer cell*. 2012;22(6):699-701.
15. Tam WL, Weinberg RA. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nature medicine*. 2013;19(11):1438-49.
16. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*. 2011;30:87.
17. Halazonetis TD, Gorgoulis VG, Bartek J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science*. 2008;319(5868):1352-5.

18. Lukas J, Lukas C, Bartek J. More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. *Nature cell biology*. 2011;13(10):1161-9.
19. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2010;11(3):220-8.
20. Suarez-Carmona M, Lesage J, Cataldo D, et al. EMT and inflammation: inseparable actors of cancer progression. *Molecular oncology*. 2017;11(7):805-23.
21. Balkwill FR, Mantovani A. Cancer-related inflammation: common themes and therapeutic opportunities. *Seminars in cancer biology*. 2012;22(1):33-40.
22. Mantovani A. Molecular pathways linking inflammation and cancer. *Curr Mol Med*. 2010;10(4):369-73.
23. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. 2010;141(1):39-51.
24. Solinas G, Marchesi F, Garlanda C, et al. Inflammation-mediated promotion of invasion and metastasis. *Cancer metastasis reviews*. 2010;29(2):243-8.
25. San-Millan I, Brooks GA. Reexamining cancer metabolism: lactate production for carcinogenesis could be the purpose and explanation of the Warburg Effect. *Carcinogenesis*. 2017;38(2):119-33.
26. Adhikary S, Eilers M. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2005;6(8):635-45.
27. Dang CV. MYC on the path to cancer. *Cell*. 2012;149(1):22-35.
28. Madrigal P, Alasoo K. AP-1 Takes Centre Stage in Enhancer Chromatin Dynamics. *Trends in cell biology*. 2018;28(7):509-11.
29. Bejjani F, Evanno E, Zibara K, et al. The AP-1 transcriptional complex: Local switch or remote command? *Biochimica et biophysica acta Reviews on cancer*. 2019;1872(1):11-23.
30. Sever R, Brugge JS. Signal transduction in cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2015;5(4).
31. Meek DW. Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? *Nature reviews Cancer*. 2009;9(10):714-23.
32. Biegging KT, Mello SS, Attardi LD. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nature reviews Cancer*. 2014;14(5):359-70.
33. Muller PA, Vousden KH. Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Cancer cell*. 2014;25(3):304-17.

34. Kruiswijk F, Labuschagne CF, Vousden KH. p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2015;16(7):393-405.
35. Dyson NJ. RB1: a prototype tumor suppressor and an enigma. *Genes & development*. 2016;30(13):1492-502.
36. Dick FA, Goodrich DW, Sage J, et al. Non-canonical functions of the RB protein in cancer. *Nature reviews Cancer*. 2018;18(7):442-51.
37. Rowland BD, Bernards R. Re-evaluating cell-cycle regulation by E2Fs. *Cell*. 2006;127(5):871-4.
38. Chen HZ, Tsai SY, Leone G. Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nature reviews Cancer*. 2009;9(11):785-97.
39. Engelmann D, Putzer BM. The dark side of E2F1: in transit beyond apoptosis. *Cancer research*. 2012;72(3):571-5.
40. Bertoli C, Herlihy AE, Pennycook BR, et al. Sustained E2F-Dependent Transcription Is a Key Mechanism to Prevent Replication-Stress-Induced DNA Damage. *Cell reports*. 2016;15(7):1412-22.
41. Janssens S, Tschopp J. Signals from within: the DNA-damage-induced NF-kappaB response. *Cell Death Differ*. 2006;13(5):773-84.
42. McCool KW, Miyamoto S. DNA damage-dependent NF-kappaB activation: NEMO turns nuclear signaling inside out. *Immunological reviews*. 2012;246(1):311-26.
43. Miyamoto S. Nuclear initiated NF-kappaB signaling: NEMO and ATM take center stage. *Cell Res*. 2011;21(1):116-30.
44. Wu ZH, Miyamoto S. Induction of a pro-apoptotic ATM-NF-kappaB pathway and its repression by ATR in response to replication stress. *The EMBO journal*. 2008;27(14):1963-73.
45. Ben-Neriah Y, Karin M. Inflammation meets cancer, with NF-kappaB as the matchmaker. *Nature immunology*. 2011;12(8):715-23.
46. DiDonato JA, Mercurio F, Karin M. NF-kappaB and the link between inflammation and cancer. *Immunological reviews*. 2012;246(1):379-400.
47. Natoli G, Ghisletti S, Barozzi I. The genomic landscapes of inflammation. *Genes & development*. 2011;25(2):101-6.
48. Taniguchi K, Karin M. NF-kappaB, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(5):309-24.
49. Perkins ND. The diverse and complex roles of NF-kappaB subunits in cancer. *Nature reviews Cancer*. 2012;12(2):121-32.

50. Aggarwal BB, Sung B. NF-kappaB in cancer: a matter of life and death. *Cancer discovery*. 2011;1(6):469-71.
51. Basseres DS, Baldwin AS. Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene*. 2006;25(51):6817-30.
52. Batra S, Balamayooran G, Sahoo MK. Nuclear factor-kappaB: a key regulator in health and disease of lungs. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*. 2011;59(5):335-51.
53. Chen W, Li Z, Bai L, et al. NF-kappaB in lung cancer, a carcinogenesis mediator and a prevention and therapy target. *Frontiers in bioscience*. 2011;16:1172-85.
54. Dimitrakopoulos FD, Kottorou AE, Kalofonou M, et al. The Fire Within: NF-kappaB Involvement in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer research*. 2020;80(19):4025-36.
55. Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(1):49-62.
56. Karin M. NF-kappaB as a critical link between inflammation and cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2009;1(5):a000141.
57. Tilstra JS, Clauson CL, Niedernhofer LJ, et al. NF-kappaB in Aging and Disease. *Aging and disease*. 2011;2(6):449-65.
58. Sarkar FH, Li Y, Wang Z, et al. NF-kappaB signaling pathway and its therapeutic implications in human diseases. *International reviews of immunology*. 2008;27(5):293-319.
59. Courtois G, Gilmore TD. Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene*. 2006;25(51):6831-43.
60. Ghosh S, Hayden MS. Celebrating 25 years of NF-kappaB research. *Immunological reviews*. 2012;246(1):5-13.
61. Ghosh G, Wang VY, Huang DB, et al. NF-kappaB regulation: lessons from structures. *Immunological reviews*. 2012;246(1):36-58.
62. Siggers T, Chang AB, Teixeira A, et al. Principles of dimer-specific gene regulation revealed by a comprehensive characterization of NF-kappaB family DNA binding. *Nature immunology*. 2011;13(1):95-102.
63. Wang VY, Huang W, Asagiri M, et al. The transcriptional specificity of NF-kappaB dimers is coded within the kappaB DNA response elements. *Cell reports*. 2012;2(4):824-39.
64. Wan F, Lenardo MJ. The nuclear signaling of NF-kappaB: current knowledge, new insights, and future perspectives. *Cell Res*. 2010;20(1):24-33.
65. Sun SC, Ley SC. New insights into NF-kappaB regulation and function. *Trends in immunology*. 2008;29(10):469-78.



66. Chen LF, Greene WC. Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2004;5(5):392-401.
67. Christian F, Smith EL, Carmody RJ. The Regulation of NF-kappaB Subunits by Phosphorylation. *Cells*. 2016;5(1).
68. Huang B, Yang XD, Lamb A, et al. Posttranslational modifications of NF-kappaB: another layer of regulation for NF-kappaB signaling pathway. *Cellular signalling*. 2010;22(9):1282-90.
69. Perkins ND. Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene*. 2006;25(51):6717-30.
70. Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*. 2008;132(3):344-62.
71. Hayden MS, Ghosh S. Regulation of NF-kappaB by TNF family cytokines. *Seminars in immunology*. 2014;26(3):253-66.
72. Smale ST. Dimer-specific regulatory mechanisms within the NF-kappaB family of transcription factors. *Immunological reviews*. 2012;246(1):193-204.
73. O'Dea E, Hoffmann A. The regulatory logic of the NF-kappaB signaling system. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2010;2(1):a000216.
74. Hinz M, Arslan SC, Scheidereit C. It takes two to tango: IkappaBs, the multifunctional partners of NF-kappaB. *Immunological reviews*. 2012;246(1):59-76.
75. Lee SH, Hannink M. Characterization of the nuclear import and export functions of Ikappa B(epsilon). *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(26):23358-66.
76. Birbach A, Gold P, Binder BR, et al. Signaling molecules of the NF-kappa B pathway shuttle constitutively between cytoplasm and nucleus. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(13):10842-51.
77. Hinz M, Scheidereit C. The IkappaB kinase complex in NF-kappaB regulation and beyond. *EMBO reports*. 2014;15(1):46-61.
78. Liu F, Xia Y, Parker AS, et al. IKK biology. *Immunological reviews*. 2012;246(1): 239-53.
79. Napetschnig J, Wu H. Molecular basis of NF-kappaB signaling. *Annual review of biophysics*. 2013;42:443-68.
80. Mussbacher M, Salzmann M, Brostjan C, et al. Cell Type-Specific Roles of NF-kappaB Linking Inflammation and Thrombosis. *Frontiers in immunology*. 2019;10:85.
81. Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NFkappaB system. *Wiley interdisciplinary reviews Systems biology and medicine*. 2016;8(3):227-41.
82. Sun SC. Non-canonical NF-kappaB signaling pathway. *Cell Res*. 2011;21(1):71-85.

83. Sun SC. Controlling the fate of NIK: a central stage in noncanonical NF-kappaB signaling. *Science signaling*. 2010;3(123):pe18.
84. Habraken Y, Piette J. NF-kappaB activation by double-strand breaks. *Biochem Pharmacol*. 2006;72(9):1132-41.
85. Huang TT, Wuerzberger-Davis SM, Wu ZH, et al. Sequential modification of NEMO/IKKgamma by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF-kappaB activation by genotoxic stress. *Cell*. 2003;115(5):565-76.
86. Janssens S, Tinel A, Lippens S, et al. PIDD mediates NF-kappaB activation in response to DNA damage. *Cell*. 2005;123(6):1079-92.
87. Takada Y, Mukhopadhyay A, Kundu GC, et al. Hydrogen peroxide activates NF-kappa B through tyrosine phosphorylation of I kappa B alpha and serine phosphorylation of p65: evidence for the involvement of I kappa B alpha kinase and Syk protein-tyrosine kinase. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(26):24233-41.
88. Bui NT, Livolsi A, Peyron JF, et al. Activation of nuclear factor kappaB and Bcl-x survival gene expression by nerve growth factor requires tyrosine phosphorylation of IkappaBalpha. *The Journal of cell biology*. 2001;152(4):753-64.
89. Koong AC, Chen EY, Giaccia AJ. Hypoxia causes the activation of nuclear factor kappa B through the phosphorylation of I kappa B alpha on tyrosine residues. *Cancer research*. 1994;54(6):1425-30.
90. Digicaylioglu M, Lipton SA. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature*. 2001;412(6847):641-7.
91. Kato T, Jr., Delhase M, Hoffmann A, et al. CK2 Is a C-Terminal IkappaB Kinase Responsible for NF-kappaB Activation during the UV Response. *Molecular cell*. 2003;12(4):829-39.
92. Boone DL, Turer EE, Lee EG, et al. The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nature immunology*. 2004;5(10):1052-60.
93. Wertz IE, O'Rourke KM, Zhou H, et al. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature*. 2004;430(7000):694-9.
94. Evans PC, Ovaa H, Hamon M, et al. Zinc-finger protein A20, a regulator of inflammation and cell survival, has de-ubiquitinating activity. *The Biochemical journal*. 2004;378(Pt 3):727-34.
95. Ruland J. Return to homeostasis: downregulation of NF-kappaB responses. *Nature immunology*. 2011;12(8):709-14.

96. Tanaka T, Grusby MJ, Kaisho T. PDLIM2-mediated termination of transcription factor NF-kappaB activation by intranuclear sequestration and degradation of the p65 subunit. *Nature immunology*. 2007;8(6):584-91.
97. Ryo A, Suizu F, Yoshida Y, et al. Regulation of NF-kappaB signaling by Pin1-dependent prolyl isomerization and ubiquitin-mediated proteolysis of p65/RelA. *Molecular cell*. 2003;12(6):1413-26.
98. Prajapati S, Gaynor RB. Regulation of Ikappa B kinase (IKK)gamma /NEMO function by IKKbeta -mediated phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(27):24331-9.
99. Palkowitsch L, Leidner J, Ghosh S, et al. Phosphorylation of serine 68 in the IkappaB kinase (IKK)-binding domain of NEMO interferes with the structure of the IKK complex and tumor necrosis factor-alpha-induced NF-kappaB activity. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(1):76-86.
100. Lawrence T, Bebien M, Liu GY, et al. IKKalpha limits macrophage NF-kappaB activation and contributes to the resolution of inflammation. *Nature*. 2005;434(7037):1138-43.
101. Gray CM, McCorkell KA, Chunduru SK, et al. Negative feedback regulation of NF-kappaB-inducing kinase is proteasome-dependent but does not require cellular inhibitors of apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications*. 2014;450(1):341-6.
102. Razani B, Zarnegar B, Ytterberg AJ, et al. Negative feedback in noncanonical NF-kappaB signaling modulates NIK stability through IKKalpha-mediated phosphorylation. *Science signaling*. 2010;3(123):ra41.
103. Espinosa L, Bigas A, Mulero MC. Alternative nuclear functions for NF-kappaB family members. *American journal of cancer research*. 2011;1(4):446-59.
104. Paul A, Edwards J, Pepper C, et al. Inhibitory-kappaB Kinase (IKK) alpha and Nuclear Factor-kappaB (NFkappaB)-Inducing Kinase (NIK) as Anti-Cancer Drug Targets. *Cells*. 2018;7(10).
105. Anest V, Hanson JL, Cogswell PC, et al. A nucleosomal function for IkappaB kinase-alpha in NF-kappaB-dependent gene expression. *Nature*. 2003;423(6940):659-63.
106. Yamamoto Y, Verma UN, Prajapati S, et al. Histone H3 phosphorylation by IKK-alpha is critical for cytokine-induced gene expression. *Nature*. 2003;423(6940):655-9.
107. Huang WC, Ju TK, Hung MC, et al. Phosphorylation of CBP by IKKalpha promotes cell growth by switching the binding preference of CBP from p53 to NF-kappaB. *Molecular cell*. 2007;26(1):75-87.

108. Hoberg JE, Yeung F, Mayo MW. SMRT derepression by the I $\kappa$ B kinase alpha: a prerequisite to NF- $\kappa$ B transcription and survival. *Molecular cell*. 2004; 16(2):245-55.
109. Hoberg JE, Popko AE, Ramsey CS, et al. I $\kappa$ B kinase alpha-mediated derepression of SMRT potentiates acetylation of RelA/p65 by p300. *Mol Cell Biol*. 2006;26(2):457-71.
110. Gloire G, Horion J, El Mjiyad N, et al. Promoter-dependent effect of IKKalpha on NF- $\kappa$ B/p65 DNA binding. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(29): 21308-18.
111. Liu B, Yang Y, Chernishof V, et al. Proinflammatory stimuli induce IKKalpha-mediated phosphorylation of PIAS1 to restrict inflammation and immunity. *Cell*. 2007;129(5): 903-14.
112. Reiley W, Zhang M, Wu X, et al. Regulation of the deubiquitinating enzyme CYLD by I $\kappa$ B kinase gamma-dependent phosphorylation. *Mol Cell Biol*. 2005;25(10): 3886-95.
113. Albanese C, Wu K, D'Amico M, et al. IKKalpha regulates mitogenic signaling through transcriptional induction of cyclin D1 via Tcf. *Molecular biology of the cell*. 2003;14(2):585-99.
114. Lamberti C, Lin KM, Yamamoto Y, et al. Regulation of beta-catenin function by the I $\kappa$ B kinases. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(45):42276-86.
115. Carayol N, Wang CY. IKKalpha stabilizes cytosolic beta-catenin by inhibiting both canonical and non-canonical degradation pathways. *Cellular signalling*. 2006;18(11):1941-6.
116. Yamaguchi T, Miki Y, Yoshida K. Protein kinase C delta activates I $\kappa$ B-kinase alpha to induce the p53 tumor suppressor in response to oxidative stress. *Cellular signalling*. 2007;19(10):2088-97.
117. Xia Y, Padre RC, De Mendoza TH, et al. Phosphorylation of p53 by I $\kappa$ B kinase 2 promotes its degradation by beta-TrCP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(8):2629-34.
118. Tergaonkar V, Pando M, Vafa O, et al. p53 stabilization is decreased upon NF $\kappa$ B activation: a role for NF $\kappa$ B in acquisition of resistance to chemotherapy. *Cancer cell*. 2002;1(5):493-503.
119. Park KJ, Krishnan V, O'Malley BW, et al. Formation of an IKKalpha-dependent transcription complex is required for estrogen receptor-mediated gene activation. *Molecular cell*. 2005;18(1):71-82.

120. Anest V, Cogswell PC, Baldwin AS, Jr. I $\kappa$ B kinase alpha and p65/RelA contribute to optimal epidermal growth factor-induced c-fos gene expression independent of I $\kappa$ B $\alpha$  degradation. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(30):31183-9.
121. Tu Z, Prajapati S, Park KJ, et al. IKK alpha regulates estrogen-induced cell cycle progression by modulating E2F1 expression. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(10):6699-706.
122. Kwak YT, Li R, Becerra CR, et al. I $\kappa$ B kinase alpha regulates subcellular distribution and turnover of cyclin D1 by phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(40):33945-52.
123. Zhu F, Xia X, Liu B, et al. IKK $\alpha$  shields 14-3-3 $\sigma$ , a G(2)/M cell cycle checkpoint gene, from hypermethylation, preventing its silencing. *Molecular cell*. 2007;27(2):214-27.
124. Prajapati S, Tu Z, Yamamoto Y, et al. IKK $\alpha$  regulates the mitotic phase of the cell cycle by modulating Aurora A phosphorylation. *Cell cycle*. 2006;5(20):2371-80.
125. Hu MC, Lee DF, Xia W, et al. I $\kappa$ B kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. *Cell*. 2004;117(2):225-37.
126. Yan J, Xiang J, Lin Y, et al. Inactivation of BAD by IKK inhibits TNF $\alpha$ -induced apoptosis independently of NF- $\kappa$ B activation. *Cell*. 2013;152(1-2):304-15.
127. Jia CH, Li M, Liu J, et al. IKK- $\beta$  mediates hydrogen peroxide induced cell death through p85 S6K1. *Cell Death Differ*. 2013;20(2):248-58.
128. Sfikas A, Batsi C, Tselikou E, et al. The canonical NF- $\kappa$ B pathway differentially protects normal and human tumor cells from ROS-induced DNA damage. *Cellular signalling*. 2012;24(11):2007-23.
129. Waterfield M, Jin W, Reiley W, et al. I $\kappa$ B kinase is an essential component of the Tpl2 signaling pathway. *Mol Cell Biol*. 2004;24(13):6040-8.
130. Beinke S, Robinson MJ, Hugunin M, et al. Lipopolysaccharide activation of the TPL-2/MEK/extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase cascade is regulated by I $\kappa$ B kinase-induced proteolysis of NF- $\kappa$ B1 p105. *Mol Cell Biol*. 2004;24(21):9658-67.
131. Lee S, Andrieu C, Saltel F, et al. I $\kappa$ B kinase beta phosphorylates Dok1 serines in response to TNF, IL-1, or gamma radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(50):17416-21.
132. Sakamoto K, Hikiba Y, Nakagawa H, et al. Promotion of DNA repair by nuclear IKK $\beta$  phosphorylation of ATM in response to genotoxic stimuli. *Oncogene*. 2013;32(14):1854-62.

133. Wu L, Shao L, An N, et al. IKKbeta regulates the repair of DNA double-strand breaks induced by ionizing radiation in MCF-7 breast cancer cells. *PloS one*. 2011;6(4):e18447.
134. Tsuchiya Y, Asano T, Nakayama K, et al. Nuclear IKKbeta is an adaptor protein for I kappa B alpha ubiquitination and degradation in UV-induced NF-kappaB activation. *Molecular cell*. 2010;39(4):570-82.
135. Irelan JT, Murphy TJ, DeJesus PD, et al. A role for I kappa B kinase 2 in bipolar spindle assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(43):16940-5.
136. Zhang Z, Ma J, Li N, et al. Expression of nuclear factor-kappaB and its clinical significance in nonsmall-cell lung cancer. *The Annals of thoracic surgery*. 2006;82(1):243-8.
137. Zhang D, Jin X, Wang F, et al. Combined prognostic value of both RelA and I kappa B-alpha expression in human non-small cell lung cancer. *Annals of surgical oncology*. 2007;14(12):3581-92.
138. Giopanou I, Lilis I, Papaleonidopoulos V, et al. Comprehensive Evaluation of Nuclear Factor-kappaBeta Expression Patterns in Non-Small Cell Lung Cancer. *PloS one*. 2015;10(7):e0132527.
139. Lind DS, Hochwald SN, Malaty J, et al. Nuclear factor-kappa B is upregulated in colorectal cancer. *Surgery*. 2001;130(2):363-9.
140. Ross JS, Kallakury BV, Sheehan CE, et al. Expression of nuclear factor-kappa B and I kappa B alpha proteins in prostatic adenocarcinomas: correlation of nuclear factor-kappa B immunoreactivity with disease recurrence. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004;10(7):2466-72.
141. Sasaki N, Morisaki T, Hashizume K, et al. Nuclear factor-kappaB p65 (RelA) transcription factor is constitutively activated in human gastric carcinoma tissue. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2001;7(12):4136-42.
142. Liptay S, Weber CK, Ludwig L, et al. Mitogenic and antiapoptotic role of constitutive NF-kappaB/Rel activity in pancreatic cancer. *International journal of cancer*. 2003;105(6):735-46.
143. Sovak MA, Bellas RE, Kim DW, et al. Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. *The Journal of clinical investigation*. 1997;100(12):2952-60.

144. Nakshatri H, Bhat-Nakshatri P, Martin DA, et al. Constitutive activation of NF-kappaB during progression of breast cancer to hormone-independent growth. *Mol Cell Biol.* 1997;17(7):3629-39.
145. Yang J, Richmond A. Constitutive IkappaB kinase activity correlates with nuclear factor-kappaB activation in human melanoma cells. *Cancer research.* 2001;61(12):4901-9.
146. Guzman ML, Neering SJ, Upchurch D, et al. Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. *Blood.* 2001;98(8):2301-7.
147. Pepper C, Hewamana S, Brennan P, et al. NF-kappaB as a prognostic marker and therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Future oncology.* 2009;5(7):1027-37.
148. Bargou RC, Emmerich F, Krappmann D, et al. Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *The Journal of clinical investigation.* 1997;100(12):2961-9.
149. Aggarwal BB, Vijayalekshmi RV, Sung B. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2009;15(2):425-30.
150. Staudt LM. Oncogenic activation of NF-kappaB. *Cold Spring Harbor perspectives in biology.* 2010;2(6):a000109.
151. Chaturvedi MM, Sung B, Yadav VR, et al. NF-kappaB addiction and its role in cancer: 'one size does not fit all'. *Oncogene.* 2011;30(14):1615-30.
152. Greten FR, Eckmann L, Greten TF, et al. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell.* 2004;118(3):285-96.
153. Luo JL, Maeda S, Hsu LC, et al. Inhibition of NF-kappaB in cancer cells converts inflammation-induced tumor growth mediated by TNFalpha to TRAIL-mediated tumor regression. *Cancer cell.* 2004;6(3):297-305.
154. Pikarsky E, Porat RM, Stein I, et al. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature.* 2004;431(7007):461-6.
155. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, et al. Macrophage activation and polarization. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library.* 2008;13:453-61.
156. Porta C, Rimoldi M, Raes G, et al. Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 nuclear factor kappaB. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2009;106(35):14978-83.

157. Hagemann T, Lawrence T, McNeish I, et al. "Re-educating" tumor-associated macrophages by targeting NF-kappaB. *The Journal of experimental medicine*. 2008;205(6):1261-8.
158. Volcic M, Karl S, Baumann B, et al. NF-kappaB regulates DNA double-strand break repair in conjunction with BRCA1-CtIP complexes. *Nucleic acids research*. 2012;40(1):181-95.
159. Wang CY, Guttridge DC, Mayo MW, et al. NF-kappaB induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*. 1999;19(9):5923-9.
160. Rahman KM, Ali S, Aboukameel A, et al. Inactivation of NF-kappaB by 3,3'-diindolylmethane contributes to increased apoptosis induced by chemotherapeutic agent in breast cancer cells. *Molecular cancer therapeutics*. 2007;6(10):2757-65.
161. Jones DR, Broad RM, Madrid LV, et al. Inhibition of NF-kappaB sensitizes non-small cell lung cancer cells to chemotherapy-induced apoptosis. *The Annals of thoracic surgery*. 2000;70(3):930-6; discussion 6-7.
162. Jourdan M, Moreaux J, Vos JD, et al. Targeting NF-kappaB pathway with an IKK2 inhibitor induces inhibition of multiple myeloma cell growth. *British journal of haematology*. 2007;138(2):160-8.
163. Enzler T, Sano Y, Choo MK, et al. Cell-selective inhibition of NF-kappaB signaling improves therapeutic index in a melanoma chemotherapy model. *Cancer discovery*. 2011;1(6):496-507.
164. Ho YS, Chen CH, Wang YJ, et al. Tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) induces cell proliferation in normal human bronchial epithelial cells through NFkappaB activation and cyclin D1 up-regulation. *Toxicology and applied pharmacology*. 2005;205(2):133-48.
165. Hinz M, Krappmann D, Eichten A, et al. NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol Cell Biol*. 1999;19(4):2690-8.
166. Duyao MP, Kessler DJ, Spicer DB, et al. Transactivation of the c-myc promoter by human T cell leukemia virus type 1 tax is mediated by NF kappa B. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(23):16288-91.
167. Kucharczak J, Simmons MJ, Fan Y, et al. To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene*. 2003;22(56):8961-82.
168. Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nature immunology*. 2002;3(3):221-7.



169. Wadgaonkar R, Phelps KM, Haque Z, et al. CREB-binding protein is a nuclear integrator of nuclear factor-kappaB and p53 signaling. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(4):1879-82.
170. Vasudevan KM, Gurumurthy S, Rangnekar VM. Suppression of PTEN expression by NF-kappa B prevents apoptosis. *Mol Cell Biol*. 2004;24(3):1007-21.
171. Huang S, Robinson JB, Deguzman A, et al. Blockade of nuclear factor-kappaB signaling inhibits angiogenesis and tumorigenicity of human ovarian cancer cells by suppressing expression of vascular endothelial growth factor and interleukin 8. *Cancer research*. 2000;60(19):5334-9.
172. Dai L, Gu L, Ding C, et al. TWEAK promotes ovarian cancer cell metastasis via NF-kappaB pathway activation and VEGF expression. *Cancer Lett*. 2009;283(2):159-67.
173. Wang G, Chen C, Yang R, et al. p55PIK-PI3K stimulates angiogenesis in colorectal cancer cell by activating NF-kappaB pathway. *Angiogenesis*. 2013;16(3):561-73.
174. Zhu CC, Chen C, Xu ZQ, et al. CCR6 promotes tumor angiogenesis via the AKT/NF-kappaB/VEGF pathway in colorectal cancer. *Biochimica et biophysica acta Molecular basis of disease*. 2018;1864(2):387-97.
175. Shibata A, Nagaya T, Imai T, et al. Inhibition of NF-kappaB activity decreases the VEGF mRNA expression in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment*. 2002;73(3):237-43.
176. Xie TX, Xia Z, Zhang N, et al. Constitutive NF-kappaB activity regulates the expression of VEGF and IL-8 and tumor angiogenesis of human glioblastoma. *Oncology reports*. 2010;23(3):725-32.
177. Szade A, Grochot-Przeczek A, Florczyk U, et al. Cellular and molecular mechanisms of inflammation-induced angiogenesis. *IUBMB life*. 2015;67(3):145-59.
178. Takenaga K. Angiogenic signaling aberrantly induced by tumor hypoxia. *Frontiers in bioscience*. 2011;16:31-48.
179. D'Ignazio L, Batie M, Rocha S. Hypoxia and Inflammation in Cancer, Focus on HIF and NF-kappaB. *Biomedicines*. 2017;5(2).
180. Min C, Eddy SF, Sherr DH, et al. NF-kappaB and epithelial to mesenchymal transition of cancer. *Journal of cellular biochemistry*. 2008;104(3):733-44.
181. Wu Y, Deng J, Rychahou PG, et al. Stabilization of snail by NF-kappaB is required for inflammation-induced cell migration and invasion. *Cancer Cell*. 2009;15(5):416-28.
182. Storci G, Sansone P, Mari S, et al. TNFalpha up-regulates SLUG via the NF-kappaB/HIF1alpha axis, which imparts breast cancer cells with a stem cell-like phenotype. *J Cell Physiol*. 2010;225(3):682-91.

183. Pires BR, Mencilha AL, Ferreira GM, et al. NF-kappaB Is Involved in the Regulation of EMT Genes in Breast Cancer Cells. *PloS one*. 2017;12(1):e0169622.
184. Li CW, Xia W, Huo L, et al. Epithelial-mesenchymal transition induced by TNF-alpha requires NF-kappaB-mediated transcriptional upregulation of Twist1. *Cancer research*. 2012;72(5):1290-300.
185. Li L, Gu X, Yue J, et al. Acquisition of EGFR TKI resistance and EMT phenotype is linked with activation of IGF1R/NF-kappaB pathway in EGFR-mutant NSCLC. *Oncotarget*. 2017;8(54):92240-53.
186. El-Ashmawy NE, El-Zamarany EA, Khedr EG, et al. Activation of EMT in colorectal cancer by MTDH/NF-kappaB p65 pathway. *Molecular and cellular biochemistry*. 2019;457(1-2):83-91.
187. Liu W, Wang S, Sun Q, et al. DCLK1 promotes epithelial-mesenchymal transition via the PI3K/Akt/NF-kappaB pathway in colorectal cancer. *International journal of cancer*. 2018;142(10):2068-79.
188. Collins T, Read MA, Neish AS, et al. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1995;9(10):899-909.
189. Naugler WE, Karin M. NF-kappaB and cancer-identifying targets and mechanisms. *Current opinion in genetics & development*. 2008;18(1):19-26.
190. Andela VB, Schwarz EM, Puzas JE, et al. Tumor metastasis and the reciprocal regulation of prometastatic and antimetastatic factors by nuclear factor kappaB. *Cancer research*. 2000;60(23):6557-62.
191. Helbig G, Christopherson KW, 2nd, Bhat-Nakshatri P, et al. NF-kappaB promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(24):21631-8.
192. Mburu YK, Wang J, Wood MA, et al. CCR7 mediates inflammation-associated tumor progression. *Immunologic research*. 2006;36(1-3):61-72.
193. Amiri KI, Richmond A. Fine tuning the transcriptional regulation of the CXCL1 chemokine. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*. 2003;74:1-36.
194. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2018;68(6):394-424.
195. Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Lung cancer. *N Engl J Med*. 2008;359(13):1367-80.

196. Chen Z, Fillmore CM, Hammerman PS, et al. Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. *Nature reviews Cancer*. 2014;14(8):535-46.
197. Salehi-Rad R, Li R, Paul MK, et al. The Biology of Lung Cancer: Development of More Effective Methods for Prevention, Diagnosis, and Treatment. *Clin Chest Med*. 2020;41(1):25-38.
198. Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature*. 2018;553(7689):446-54.
199. Greulich H. The genomics of lung adenocarcinoma: opportunities for targeted therapies. *Genes & cancer*. 2010;1(12):1200-10.
200. Heist RS, Engelman JA. SnapShot: non-small cell lung cancer. *Cancer Cell*. 2012;21(3):448 e2.
201. LaFave LM, Kartha VK, Ma S, et al. Epigenomic State Transitions Characterize Tumor Progression in Mouse Lung Adenocarcinoma. *Cancer Cell*. 2020;38(2):212-28 e13.
202. Imielinski M, Berger AH, Hammerman PS, et al. Mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing. *Cell*. 2012;150(6):1107-20.
203. Devarakonda S, Morgensztern D, Govindan R. Genomic alterations in lung adenocarcinoma. *The Lancet Oncology*. 2015;16(7):e342-51.
204. Bubendorf L, Lantuejoul S, de Langen AJ, et al. Nonsmall cell lung carcinoma: diagnostic difficulties in small biopsies and cytological specimens: Number 2 in the Series "Pathology for the clinician" Edited by Peter Dorfmueller and Alberto Cavazza. *European respiratory review: an official journal of the European Respiratory Society*. 2017;26(144).
205. Choi M, Kadara H, Zhang J, et al. Mutation profiles in early-stage lung squamous cell carcinoma with clinical follow-up and correlation with markers of immune function. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2017;28(1):83-9.
206. Hayes SA, Hudson AL, Clarke SJ, et al. From mice to men: GEMMs as trial patients for new NSCLC therapies. *Seminars in cell & developmental biology*. 2014;27:118-27.
207. Sheridan C, Downward J. Overview of KRAS-Driven Genetically Engineered Mouse Models of Non-Small Cell Lung Cancer. *Current protocols in pharmacology*. 2015;70:14 35 1-16.
208. de Seranno S, Meuwissen R. Progress and applications of mouse models for human lung cancer. *The European respiratory journal*. 2010;35(2):426-43.
209. Meuwissen R, Berns A. Mouse models for human lung cancer. *Genes & development*. 2005;19(6):643-64.

210. Berge EM, Doebele RC. Targeted therapies in non-small cell lung cancer: emerging oncogene targets following the success of epidermal growth factor receptor. *Seminars in oncology*. 2014;41(1):110-25.
211. Friday BB, Adjei AA. K-ras as a target for cancer therapy. *Biochimica et biophysica acta*. 2005;1756(2):127-44.
212. Thein KZ, Biter AB, Hong DS. Therapeutics Targeting Mutant KRAS. *Annual review of medicine*. 2020.
213. Adderley H, Blackhall FH, Lindsay CR. KRAS-mutant non-small cell lung cancer: Converging small molecules and immune checkpoint inhibition. *EBioMedicine*. 2019;41:711-6.
214. Johnson L, Mercer K, Greenbaum D, et al. Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice. *Nature*. 2001;410(6832):1111-6.
215. Jackson EL, Willis N, Mercer K, et al. Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes & development*. 2001;15(24):3243-8.
216. Sutherland KD, Song JY, Kwon MC, et al. Multiple cells-of-origin of mutant K-Ras-induced mouse lung adenocarcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(13):4952-7.
217. Xu X, Rock JR, Lu Y, et al. Evidence for type II cells as cells of origin of K-Ras-induced distal lung adenocarcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(13):4910-5.
218. Floyd HS, Farnsworth CL, Kock ND, et al. Conditional expression of the mutant K-rasG12C allele results in formation of benign lung adenomas: development of a novel mouse lung tumor model. *Carcinogenesis*. 2005;26(12):2196-206.
219. Jin X, Wang Z, Qiu L, et al. Potential biomarkers involving IKK/RelA signal in early stage non-small cell lung cancer. *Cancer science*. 2008;99(3):582-9.
220. Tang X, Liu D, Shishodia S, et al. Nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) is frequently expressed in lung cancer and preneoplastic lesions. *Cancer*. 2006;107(11):2637-46.
221. Gu L, Wang Z, Zuo J, et al. Prognostic significance of NF-kappaB expression in non-small cell lung cancer: A meta-analysis. *PloS one*. 2018;13(5):e0198223.
222. Cai Z, Tchou-Wong KM, Rom WN. NF-kappaB in lung tumorigenesis. *Cancers*. 2011;3(4):4258-68.
223. Qu Y, Qu B, Wang X, et al. Knockdown of NF-kappaB p65 subunit expression suppresses growth of nude mouse lung tumour cell xenografts by inhibition of Bcl-2 apoptotic pathway. *Cell biochemistry and function*. 2015;33(5):320-5.

224. Tsolou A, Liousia M, Kalamida D, et al. Inhibition of IKK-NF-kappaB pathway sensitizes lung cancer cell lines to radiation. *Cancer biology & medicine*. 2017;14(3):293-301.
225. Meylan E, Dooley AL, Feldser DM, et al. Requirement for NF-kappaB signalling in a mouse model of lung adenocarcinoma. *Nature*. 2009;462(7269):104-7.
226. Basseres DS, Ebbs A, Levantini E, et al. Requirement of the NF-kappaB subunit p65/RelA for K-Ras-induced lung tumorigenesis. *Cancer Res*. 2010;70(9):3537-46.
227. Basseres DS, Ebbs A, Cogswell PC, et al. IKK is a therapeutic target in KRAS-Induced lung cancer with disrupted p53 activity. *Genes Cancer*. 2014;5(1-2):41-55.
228. Duran A, Linares JF, Galvez AS, et al. The signaling adaptor p62 is an important NF-kappaB mediator in tumorigenesis. *Cancer cell*. 2008;13(4):343-54.
229. Starczynowski DT, Lockwood WW, Delehouzee S, et al. TRAF6 is an amplified oncogene bridging the RAS and NF-kappaB pathways in human lung cancer. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(10):4095-105.
230. Xia Y, Yeddula N, Leblanc M, et al. Reduced cell proliferation by IKK2 depletion in a mouse lung-cancer model. *Nat Cell Biol*. 2012;14(3):257-65.
231. Barbie DA, Tamayo P, Boehm JS, et al. Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS-driven cancers require TBK1. *Nature*. 2009;462(7269):108-12.
232. Pantano C, Ather JL, Alcorn JF, et al. Nuclear factor-kappaB activation in airway epithelium induces inflammation and hyperresponsiveness. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2008;177(9):959-69.
233. Cheng DS, Han W, Chen SM, et al. Airway epithelium controls lung inflammation and injury through the NF-kappa B pathway. *Journal of immunology*. 2007;178(10):6504-13.
234. Sadikot RT, Han W, Everhart MB, et al. Selective I kappa B kinase expression in airway epithelium generates neutrophilic lung inflammation. *Journal of immunology*. 2003;170(2):1091-8.
235. Stathopoulos GT, Sherrill TP, Cheng DS, et al. Epithelial NF-kappaB activation promotes urethane-induced lung carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(47):18514-9.
236. Deng J, Fujimoto J, Ye XF, et al. Knockout of the tumor suppressor gene Gprc5a in mice leads to NF-kappaB activation in airway epithelium and promotes lung inflammation and tumorigenesis. *Cancer prevention research*. 2010;3(4):424-37.
237. Walser T, Cui X, Yanagawa J, et al. Smoking and lung cancer: the role of inflammation. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2008;5(8):811-5.

238. Shen S, Callaghan D, Juzwik C, et al. ABCG2 reduces ROS-mediated toxicity and inflammation: a potential role in Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*. 2010;114(6):1590-604.
239. Smith CJ, Perfetti TA, King JA. Perspectives on pulmonary inflammation and lung cancer risk in cigarette smokers. *Inhalation toxicology*. 2006;18(9):667-77.
240. Liu X, Togo S, Al-Mugotir M, et al. NF-kappaB mediates the survival of human bronchial epithelial cells exposed to cigarette smoke extract. *Respiratory research*. 2008;9:66.
241. Takahashi H, Ogata H, Nishigaki R, et al. Tobacco smoke promotes lung tumorigenesis by triggering IKKbeta- and JNK1-dependent inflammation. *Cancer Cell*. 2010;17(1):89-97.
242. Wong KK, Jacks T, Dranoff G. NF-kappaB fans the flames of lung carcinogenesis. *Cancer prevention research*. 2010;3(4):403-5.
243. Zaynagetdinov R, Stathopoulos GT, Sherrill TP, et al. Epithelial nuclear factor-kappaB signaling promotes lung carcinogenesis via recruitment of regulatory T lymphocytes. *Oncogene*. 2012;31(26):3164-76.
244. Iosef C, Alastalo TP, Hou Y, et al. Inhibiting NF-kappaB in the developing lung disrupts angiogenesis and alveolarization. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2012;302(10):L1023-36.
245. Kranenburg O, Gebbink MF, Voest EE. Stimulation of angiogenesis by Ras proteins. *Biochimica et biophysica acta*. 2004;1654(1):23-37.
246. 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.
247. Sunaga N, Imai H, Shimizu K, et al. Oncogenic KRAS-induced interleukin-8 overexpression promotes cell growth and migration and contributes to aggressive phenotypes of non-small cell lung cancer. *International journal of cancer*. 2012;130(8):1733-44.
248. Carneiro-Lobo TC, Scalabrini LC, Magalhaes LDS, et al. IKKbeta targeting reduces KRAS-induced lung cancer angiogenesis in vitro and in vivo: A potential anti-angiogenic therapeutic target. *Lung cancer*. 2019;130:169-78.
249. Jiang Y, Cui L, Yie TA, et al. Inhibition of anchorage-independent growth and lung metastasis of A549 lung carcinoma cells by IkappaBbeta. *Oncogene*. 2001;20(18):2254-63.
250. Stathopoulos GT, Sherrill TP, Han W, et al. Host nuclear factor-kappaB activation potentiates lung cancer metastasis. *Molecular cancer research: MCR*. 2008;6(3):364-71.

251. Huang YC, Hsiao YC, Chen YJ, et al. Stromal cell-derived factor-1 enhances motility and integrin up-regulation through CXCR4, ERK and NF-kappaB-dependent pathway in human lung cancer cells. *Biochem Pharmacol.* 2007;74(12):1702-12.
252. Huang CY, Fong YC, Lee CY, et al. CCL5 increases lung cancer migration via PI3K, Akt and NF-kappaB pathways. *Biochem Pharmacol.* 2009;77(5):794-803.
253. Fong YC, Liu SC, Huang CY, et al. Osteopontin increases lung cancer cells migration via activation of the alphavbeta3 integrin/FAK/Akt and NF-kappaB-dependent pathway. *Lung cancer.* 2009;64(3):263-70.
254. Saxon JA, Yu H, Polosukhin VV, et al. p52 expression enhances lung cancer progression. *Scientific reports.* 2018;8(1):6078.
255. Dimitrakopoulos FI, Antonacopoulou AG, Kottorou A, et al. NSCLC and the alternative pathway of NF-kappaB: uncovering an unknown relation. *Virchows Archiv: an international journal of pathology.* 2012;460(5):515-23.
256. Vreka M, Lilis I, Papageorgopoulou M, et al. IkappaB Kinase alpha Is Required for Development and Progression of KRAS-Mutant Lung Adenocarcinoma. *Cancer research.* 2018;78(11):2939-51.
257. Song NY, Zhu F, Wang Z, et al. IKKalpha inactivation promotes Kras-initiated lung adenocarcinoma development through disrupting major redox regulatory pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2018;115(4):E812-E21.
258. Xiao Z, Jiang Q, Willette-Brown J, et al. The pivotal role of IKKalpha in the development of spontaneous lung squamous cell carcinomas. *Cancer cell.* 2013;23(4):527-40.
259. Page A, Ortega A, Alameda JP, et al. IKKalpha Promotes the Progression and Metastasis of Non-Small Cell Lung Cancer Independently of its Subcellular Localization. *Computational and structural biotechnology journal.* 2019;17:251-62.
260. Sambrook J. *Molecular Cloning: A laboratory manual.* Second ed. NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
261. Chavdoula E, Habel DM, Roupakia E, et al. CHUK/IKK-alpha loss in lung epithelial cells enhances NSCLC growth associated with HIF up-regulation. *Life Sci Alliance.* 2019;2(6).
262. Mela A, Goldman JE. CD82 blocks cMet activation and overcomes hepatocyte growth factor effects on oligodendrocyte precursor differentiation. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience.* 2013;33(18):7952-60.

263. Bernal-Mizrachi L, Lovly CM, Ratner L. The role of NF- $\kappa$ B-1 and NF- $\kappa$ B-2-mediated resistance to apoptosis in lymphomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(24):9220-5.
264. Handschick K, Beuerlein K, Jurida L, et al. Cyclin-dependent kinase 6 is a chromatin-bound cofactor for NF- $\kappa$ B-dependent gene expression. *Molecular cell*. 2014;53(2):193-208.
265. Termini CM, Cotter ML, Marjon KD, et al. The membrane scaffold CD82 regulates cell adhesion by altering  $\alpha$ 4 integrin stability and molecular density. *Molecular biology of the cell*. 2014;25(10):1560-73.
266. Penzo M, Molteni R, Suda T, et al. Inhibitor of NF- $\kappa$ B kinases  $\alpha$  and  $\beta$  are both essential for high mobility group box 1-mediated chemotaxis [corrected]. *Journal of immunology*. 2010;184(8):4497-509.
267. Rock JR, Barkauskas CE, Cronic MJ, et al. Multiple stromal populations contribute to pulmonary fibrosis without evidence for epithelial to mesenchymal transition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(52):E1475-83.
268. Kelly-Spratt KS, Philipp-Staheli J, Gurley KE, et al. Inhibition of PI-3K restores nuclear p27Kip1 expression in a mouse model of Kras-driven lung cancer. *Oncogene*. 2009;28(41):3652-62.
269. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends in pharmacological sciences*. 2012;33(4):207-14.
270. Tirpe AA, Gulei D, Ciortea SM, et al. Hypoxia: Overview on Hypoxia-Mediated Mechanisms with a Focus on the Role of HIF Genes. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(24).
271. Hock DH, Reljic B, Ang CS, et al. HIGD2A is Required for Assembly of the COX3 Module of Human Mitochondrial Complex IV. *Molecular & cellular proteomics: MCP*. 2020;19(7):1145-60.
272. Salazar C, Elorza AA, Cofre G, et al. The OXPHOS supercomplex assembly factor HIG2A responds to changes in energetic metabolism and cell cycle. *Journal of cellular physiology*. 2019;234(10):17405-19.
273. An HJ, Shin H, Jo SG, et al. The survival effect of mitochondrial Higd-1a is associated with suppression of cytochrome C release and prevention of caspase activation. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1813(12):2088-98.
274. Tennant DA, Duran RV, Boulahbel H, et al. Metabolic transformation in cancer. *Carcinogenesis*. 2009;30(8):1269-80.



275. Marjanovic ND, Hofree M, Chan JE, et al. Emergence of a High-Plasticity Cell State during Lung Cancer Evolution. *Cancer cell*. 2020;38(2):229-46 e13.
276. Cooks T, Pateras IS, Tarcic O, et al. Mutant p53 prolongs NF-kappaB activation and promotes chronic inflammation and inflammation-associated colorectal cancer. *Cancer cell*. 2013;23(5):634-46.
277. Schneider G, Henrich A, Greiner G, et al. Cross talk between stimulated NF-kappaB and the tumor suppressor p53. *Oncogene*. 2010;29(19):2795-806.
278. Schwitalla S, Fingerle AA, Cammareri P, et al. Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell*. 2013;152(1-2):25-38.
279. Lee JH, Tammela T, Hofree M, et al. Anatomically and Functionally Distinct Lung Mesenchymal Populations Marked by Lgr5 and Lgr6. *Cell*. 2017;170(6):1149-63 e12.
280. Zhan T, Rindtorff N, Boutros M. Wnt signaling in cancer. *Oncogene*. 2017;36(11):1461-73.
281. Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nature medicine*. 2012;18(3):378-81.
282. Rikova K, Guo A, Zeng Q, et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell*. 2007;131(6):1190-203.
283. Gainor JF, Shaw AT. Novel targets in non-small cell lung cancer: ROS1 and RET fusions. *The oncologist*. 2013;18(7):865-75.
284. Liu WM, Zhang XA. KAI1/CD82, a tumor metastasis suppressor. *Cancer Lett*. 2006;240(2):183-94.
285. Feng J, Huang C, Wren JD, et al. Tetraspanin CD82: a suppressor of solid tumors and a modulator of membrane heterogeneity. *Cancer metastasis reviews*. 2015;34(4):619-33.
286. Lira ME, Choi YL, Lim SM, et al. A single-tube multiplexed assay for detecting ALK, ROS1, and RET fusions in lung cancer. *J Mol Diagn*. 2014;16(2):229-43.
287. Yasuda H, de Figueiredo-Pontes LL, Kobayashi S, et al. Preclinical rationale for use of the clinically available multitargeted tyrosine kinase inhibitor crizotinib in ROS1-translocated lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2012;7(7):1086-90.
288. White A, Lamb PW, Barrett JC. Frequent downregulation of the KAI1(CD82) metastasis suppressor protein in human cancer cell lines. *Oncogene*. 1998;16(24):3143-9.
289. Xu C, Zhang YH, Thangavel M, et al. CD82 endocytosis and cholesterol-dependent reorganization of tetraspanin webs and lipid rafts. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2009;23(10):3273-88.

290. Tonoli H, Barrett JC. CD82 metastasis suppressor gene: a potential target for new therapeutics? *Trends in molecular medicine*. 2005;11(12):563-70.
291. Gonzalez DM, Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Science signaling*. 2014;7(344):re8.
292. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2014;15(3):178-96.
293. Jia D, Jolly MK, Tripathi SC, et al. Distinguishing mechanisms underlying EMT tristability. *Cancer convergence*. 2017;1(1):2.
294. Schliekelman MJ, Taguchi A, Zhu J, et al. Molecular portraits of epithelial, mesenchymal, and hybrid States in lung adenocarcinoma and their relevance to survival. *Cancer research*. 2015;75(9):1789-800.
295. Horio Y, Chen A, Rice P, et al. Ki-ras and p53 mutations are early and late events, respectively, in urethane-induced pulmonary carcinogenesis in A/J mice. *Molecular carcinogenesis*. 1996;17(4):217-23.
296. You M, Candrian U, Maronpot RR, et al. Activation of the Ki-ras protooncogene in spontaneously occurring and chemically induced lung tumors of the strain A mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86(9):3070-4.
297. Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer metastasis reviews*. 2007;26(2):225-39.
298. Zhang T, Suo C, Zheng C, et al. Hypoxia and Metabolism in Metastasis. *Advances in experimental medicine and biology*. 2019;1136:87-95.
299. Albadari N, Deng S, Li W. The transcriptional factors HIF-1 and HIF-2 and their novel inhibitors in cancer therapy. *Expert opinion on drug discovery*. 2019;14(7):667-82.
300. Batie M, Rocha S. Gene transcription and chromatin regulation in hypoxia. *Biochemical Society transactions*. 2020;48(3):1121-8.
301. Soni S, Padwad YS. HIF-1 in cancer therapy: two decade long story of a transcription factor. *Acta oncologica*. 2017;56(4):503-15.
302. Ruas JL, Poellinger L. Hypoxia-dependent activation of HIF into a transcriptional regulator. *Seminars in cell & developmental biology*. 2005;16(4-5):514-22.
303. Tam SY, Wu VWC, Law HKW. Hypoxia-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancers: HIF-1 $\alpha$  and Beyond. *Frontiers in oncology*. 2020;10:486.
304. Kurata T, Oguri T, Isobe T, et al. Differential expression of facilitative glucose transporter (GLUT) genes in primary lung cancers and their liver metastases. *Japanese journal of cancer research: Gann*. 1999;90(11):1238-43.

305. Sasaki H, Shitara M, Yokota K, et al. Overexpression of GLUT1 correlates with Kras mutations in lung carcinomas. *Molecular medicine reports*. 2012;5(3):599-602.
306. El-Deeb IM, Yoo KH, Lee SH. ROS receptor tyrosine kinase: a new potential target for anticancer drugs. *Medicinal research reviews*. 2011;31(5):794-818.
307. Drilon A, Jenkins C, Iyer S, et al. ROS1-dependent cancers - biology, diagnostics and therapeutics. *Nat Rev Clin Oncol*. 2020.
308. Pal P, Khan Z. ROS1 [corrected]. *Journal of clinical pathology*. 2017;70(12):1001-9.
309. Rossi G, Jocolle G, Conti A, et al. Detection of ROS1 rearrangement in non-small cell lung cancer: current and future perspectives. *Lung Cancer (Auckl)*. 2017;8:45-55.
310. Kohno T, Nakaoku T, Tsuta K, et al. Beyond ALK-RET, ROS1 and other oncogene fusions in lung cancer. *Translational lung cancer research*. 2015;4(2):156-64.
311. Bergethon K, Shaw AT, Ou SH, et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(8):863-70.
312. Davies KD, Doebele RC. Molecular pathways: ROS1 fusion proteins in cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2013;19(15):4040-5.
313. Ou SH, Tan J, Yen Y, et al. ROS1 as a 'druggable' receptor tyrosine kinase: lessons learned from inhibiting the ALK pathway. *Expert review of anticancer therapy*. 2012;12(4):447-56.
314. Giustini NP, Bazhenova L. ROS1-rearranged Non-small Cell Lung Cancer. *Thoracic surgery clinics*. 2020;30(2):147-56.
315. Awad MM, Engelman JA, Shaw AT. Acquired resistance to crizotinib from a mutation in CD74-ROS1. *The New England journal of medicine*. 2013;369(12):1173.
316. Davies KD, Mahale S, Astling DP, et al. Resistance to ROS1 inhibition mediated by EGFR pathway activation in non-small cell lung cancer. *PloS one*. 2013;8(12):e82236.
317. Vecchiarelli S, Bennati C. Oncogene addicted non-small-cell lung cancer: current standard and hot topics. *Future oncology*. 2018;14(13s):3-17.
318. Lin JJ, Shaw AT. Recent Advances in Targeting ROS1 in Lung Cancer. *Journal of thoracic oncology: official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2017;12(11):1611-25.
319. Zhang J, Wu T, Zhan S, et al. TIMP-1 and CD82, a promising combined evaluation marker for PDAC. *Oncotarget*. 2017;8(4):6496-512.
320. Termini CM, Gillette JM. Tetraspanins Function as Regulators of Cellular Signaling. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2017;5:34.

321. Stipp CS, Kolesnikova TV, Hemler ME. Functional domains in tetraspanin proteins. *Trends in biochemical sciences*. 2003;28(2):106-12.
322. Veenbergen S, van Spruel AB. Tetraspanins in the immune response against cancer. *Immunology letters*. 2011;138(2):129-36.
323. Detchokul S, Williams ED, Parker MW, et al. Tetraspanins as regulators of the tumour microenvironment: implications for metastasis and therapeutic strategies. *British journal of pharmacology*. 2014;171(24):5462-90.
324. Hemler ME. Tetraspanin proteins promote multiple cancer stages. *Nature reviews Cancer*. 2014;14(1):49-60.
325. Jiang X, Zhang J, Huang Y. Tetraspanins in cell migration. *Cell adhesion & migration*. 2015;9(5):406-15.
326. Richardson MM, Jennings LK, Zhang XA. Tetraspanins and tumor progression. *Clinical & experimental metastasis*. 2011;28(3):261-70.
327. Zoller M. Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(1):40-55.
328. Yanez-Mo M, Barreiro O, Gordon-Alonso M, et al. Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes. *Trends Cell Biol*. 2009;19(9):434-46.
329. Lazo PA. Functional implications of tetraspanin proteins in cancer biology. *Cancer science*. 2007;98(11):1666-77.
330. Yunta M, Lazo PA. Tetraspanin proteins as organisers of membrane microdomains and signalling complexes. *Cellular signalling*. 2003;15(6):559-64.
331. Levy S, Shoham T. The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(2):136-48.
332. Shinohara T, Miki T, Nishimura N, et al. Nuclear factor-kappaB-dependent expression of metastasis suppressor KAI1/CD82 gene in lung cancer cell lines expressing mutant p53. *Cancer research*. 2001;61(2):673-8.
333. Baek SH, Ohgi KA, Rose DW, et al. Exchange of N-CoR corepressor and Tip60 coactivator complexes links gene expression by NF-kappaB and beta-amyloid precursor protein. *Cell*. 2002;110(1):55-67.
334. Kim JH, Kim B, Cai L, et al. Transcriptional regulation of a metastasis suppressor gene by Tip60 and beta-catenin complexes. *Nature*. 2005;434(7035):921-6.
335. Liu W, Iizumi-Gairani M, Okuda H, et al. KAI1 gene is engaged in NDRG1 gene-mediated metastasis suppression through the ATF3-NFkappaB complex in human prostate cancer. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(21):18949-59.

336. Zhu J, Miao C, Liu S, et al. Prognostic role of CD82/KAI1 in multiple human malignant neoplasms: a meta-analysis of 31 studies. *OncoTargets and therapy*. 2017;10: 5805-16.
337. Higashiyama M, Kodama K, Yokouchi H, et al. KAI1/CD82 expression in nonsmall cell lung carcinoma is a novel, favorable prognostic factor: an immunohistochemical analysis. *Cancer*. 1998;83(3):466-74.
338. Goncharuk VN, del-Rosario A, Kren L, et al. Co-downregulation of PTEN, KAI-1, and nm23-H1 tumor/metastasis suppressor proteins in non-small cell lung cancer. *Annals of diagnostic pathology*. 2004;8(1):6-16.
339. Shiwu WU, Lan Y, Wenqing S, et al. Expression and clinical significance of CD82/KAI1 and E-cadherin in non-small cell lung cancer. *Archives of Iranian medicine*. 2012;15(11):707-12.
340. Adachi M, Taki T, Ieki Y, et al. Correlation of KAI1/CD82 gene expression with good prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer research*. 1996;56(8):1751-5.
341. De Craene B, Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nature reviews Cancer*. 2013;13(2):97-110.
342. Kumar M, Allison DF, Baranova NN, et al. NF-kappaB regulates mesenchymal transition for the induction of non-small cell lung cancer initiating cells. *PLoS One*. 2013;8(7):e68597.
343. Yang CJ, Liu YP, Dai HY, et al. Nuclear HDAC6 inhibits invasion by suppressing NF-kappaB/MMP2 and is inversely correlated with metastasis of non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2015;6(30):30263-76.
344. Chang YW, Chiu CF, Lee KY, et al. CARMA3 Represses Metastasis Suppressor NME2 to Promote Lung Cancer Stemness and Metastasis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2015;192(1):64-75.
345. Dong JT, Lamb PW, Rinker-Schaeffer CW, et al. KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2. *Science*. 1995;268(5212): 884-6.
346. Tagawa K, Arihiro K, Takeshima Y, et al. Down-regulation of KAI1 messenger RNA expression is not associated with loss of heterozygosity of the KAI1 gene region in lung adenocarcinoma. *Japanese journal of cancer research: Gann*. 1999;90(9): 970-6.
347. Yang CH, Chou HC, Fu YN, et al. EGFR over-expression in non-small cell lung cancers harboring EGFR mutations is associated with marked down-regulation of CD82. *Biochimica et biophysica acta*. 2015;1852(7):1540-9.

348. Odintsova E, Sugiura T, Berditchevski F. Attenuation of EGF receptor signaling by a metastasis suppressor, the tetraspanin CD82/KAI-1. *Curr Biol.* 2000;10(16):1009-12.
349. Odintsova E, van Niel G, Conjeaud H, et al. Metastasis suppressor tetraspanin CD82/KAI1 regulates ubiquitylation of epidermal growth factor receptor. *The Journal of biological chemistry.* 2013;288(36):26323-34.
350. Zeng TD, Zheng B, Zheng W, et al. CD82/KAI1 inhibits invasion and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma via TGF-beta1. *European review for medical and pharmacological sciences.* 2018;22(18):5928-37.
351. Zhang Q, Huang F, Yao Y, et al. Interaction of transforming growth factor-beta-Smads/microRNA-362-3p/CD82 mediated by M2 macrophages promotes the process of epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer science.* 2019;110(8):2507-19.
352. Bandyopadhyay S, Zhan R, Chaudhuri A, et al. Interaction of KAI1 on tumor cells with DARC on vascular endothelium leads to metastasis suppression. *Nat Med.* 2006;12(8):933-8.
353. Khanna P, Chung CY, Neves RI, et al. CD82/KAI expression prevents IL-8-mediated endothelial gap formation in late-stage melanomas. *Oncogene.* 2014;33(22):2898-908.
354. Todeschini AR, Dos Santos JN, Handa K, et al. Ganglioside GM2-tetraspanin CD82 complex inhibits met and its cross-talk with integrins, providing a basis for control of cell motility through glycosynapse. *The Journal of biological chemistry.* 2007;282(11):8123-33.
355. Sridhar SC, Miranti CK. Tetraspanin KAI1/CD82 suppresses invasion by inhibiting integrin-dependent crosstalk with c-Met receptor and Src kinases. *Oncogene.* 2006;25(16):2367-78.
356. Li W, Hu M, Wang C, et al. A viral microRNA downregulates metastasis suppressor CD82 and induces cell invasion and angiogenesis by activating the c-Met signaling. *Oncogene.* 2017;36(38):5407-20.
357. Choi UJ, Jee BK, Lim Y, et al. KAI1/CD82 decreases Rac1 expression and cell proliferation through PI3K/Akt/mTOR pathway in H1299 lung carcinoma cells. *Cell biochemistry and function.* 2009;27(1):40-7.
358. Takahashi M, Sugiura T, Abe M, et al. Regulation of c-Met signaling by the tetraspanin KAI-1/CD82 affects cancer cell migration. *International journal of cancer.* 2007;121(9):1919-29.

359. Park JJ, Jin YB, Lee YJ, et al. KAI1 suppresses HIF-1alpha and VEGF expression by blocking CDCP1-enhanced Src activation in prostate cancer. *BMC cancer*. 2012;12:81.
360. Zhao Y, Xu Y, Li Y, et al. NF-kappaB-mediated inflammation leading to EMT via miR-200c is involved in cell transformation induced by cigarette smoke extract. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*. 2013;135(2):265-76.
361. Liu X, Guo XZ, Li HY, et al. KAI1 reverses the epithelial-mesenchymal transition in human pancreatic cancer cells. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international: HBPD INT*. 2019;18(5):471-7.
362. Zhou L, Yu L, Wu S, et al. Clinicopathological significance of KAI1 expression and epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer. *World journal of surgical oncology*. 2015;13:234.
363. Ci H, Xu Z, Xu J, et al. Expressions of KAI1 and E-cadherin in nonsmall cell lung cancer and their correlation with vasculogenic mimicry. *Medicine*. 2018;97(40):e12293.