



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ-
ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΑΣ, ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ
ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΜΟΡΙΩΝ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ
ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΟΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ
(CD) ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΚΑΙ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ
ΚΑΝΟΝΙΚΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΤΟΥ NF-κΒ ΣΤΗΝ
ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ CD**

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΝΤΕΛΛΑΣ

ΠΑΘΟΛΟΓΟΣ ΟΓΚΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2022



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ-
ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΑΣ, ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ
ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΜΟΡΙΩΝ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ
ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΟΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ
(CD) ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΚΑΙ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ
ΚΑΝΟΝΙΚΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΤΟΥ NF-κΒ ΣΤΗΝ
ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ CD**

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΝΤΕΛΛΑΣ

ΠΑΘΟΛΟΓΟΣ ΟΓΚΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2022

«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 του κ. Ντέλλα Παναγιώτη: 11-10-2018

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Γ.Σ. αριθμ. 876α/18-12-2018

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπουσα:

Μπατιστάτου Άννα, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας

Μέλη:

Πενθερουδάκης Γεώργιος, Καθηγητής Ογκολογίας

Κωλέττας Ευάγγελος, Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Κυτταρικής Βιολογίας

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 01-02-2019

«Μελέτη του ρόλου μορίων της κυτταρικής επιφάνειας του συμπλέγματος διαφοροποίησης (CD) στην ανάπτυξη του καρκίνου: Ρόλος της κανονικής σηματοδοτικής πορείας του NF-Kb στη ρύθμιση των μορίων CD»

Ημερομηνία ανασυγκρότησης Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Γ.Σ. αριθμ. 1001α/29-03-2022

Επιβλέπουσα:

Μπατιστάτου Άννα, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας

Μέλη:

Μάουρι Ντάβιντε, Επίκουρος Καθηγητής Ογκολογίας

Κωλέττας Ευάγγελος, Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Κυτταρικής Βιολογίας

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 1019^α/12-07-2022

1. Μπατιστάτου Άννα, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Κωλέττας Ευάγγελος, Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Κυτταρικής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Μάουρι Ντάβιντε, Επίκουρος Καθηγητής Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. Λάμπρη Ευαγγελή, Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Κούκλης Παναγιώτης, Επίκουρος Καθηγητής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Κατσάνος Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής Γαστρεντερολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
7. Μπαλή Χριστίνα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Χειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 13-12-2022

Ιωάννινα 06-06-2023

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Σπυρίδων Κοντσιώτης

Καθηγητής Νευρολογίας



Η Γραμματέας του Τμήματος

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

Ευχαριστίες

Η διατριβή αυτή αποτελεί το αποτέλεσμα συνεργασίας του Τμήματος Παθολογικής Ανατομίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων με την Ογκολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων και το Εργαστήριο Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες προς τα μέλη της τριμελούς επιτροπής και τους διευθυντές των τμημάτων για την τιμή που μου προσέφεραν. Κατ' αρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα της διδακτορικής μου διατριβής, την Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας κα Άννα Μπατιστάτου για την αφοσίωση και την συνεχή καθοδήγηση της κατά τη διάρκεια της διατριβής. Επιπλέον, θέλω να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Μοριακής Κυτταρικής Βιολογίας κ. Ευάγγελο Κωλέττα για τη βοήθεια και την καθοδήγηση του στο εργαστήριο βιολογίας, καθώς επίσης και τους διευθυντές της Ογκολογικής Κλινικής, τον Καθηγητή Γεώργιο Πενθερουδάκη και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Νταβιντε Μάουρι, για τη έμπρακτη στήριξή τους. Θέλω επίσης να ευχαριστήσω τα μέλη της εφταμελούς επιτροπής κα Λάμπρη Ευαγγέλη, Επίκουρη καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής, τον κ Κούκλη Παναγιώτη, Επίκουρο καθηγητή Βιολογίας, τον κ Κατσάνο Κωνσταντίνο, Αναπληρωτή Καθηγητή Γαστρεντερολογίας, και την κα Μπαλή Χριστίνα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Χειρουργικής για την τιμή που μου έκαναν να αξιολογήσουν τη διατριβή μου.

Θέλω να εκφράσω τη μεγάλη μου ευγνωμοσύνη προς τη Δρ. Γεωργία Καρπαθίου, Παθολογοανατόμο, για τη στήριξη και την επιστημονική κατάρτιση που μου προσέφερε στην ανοσοϊστοχημική ανάλυση. Επίσης, εκφράζω τις ευχαριστίες μου προς την Άντα από το εργαστήριο Παθολογοανατομίας για την τεχνική κατάρτιση που μου προσέφερε. Παρομοίως οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στη Δρ. Ευγενία Ρουπακιά, Μοριακή Βιολόγο και Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια του Εργαστηρίου Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για τη γνώση που μοιράστηκε μαζί μου σε θεωρητικό επίπεδο και σε επίπεδο εργαστηριακών τεχνικών, καθώς και την Ευριδίκη Πανιοπούλου, μεταπτυχιακή φοιτήτρια, για τη συνεργασία της.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω την Ελληνική Συνεργαζόμενη Ογκολογική Ομάδα (ΕΣΟΟ) και τον κ. Φούτζηλα για την επιστημονική τους βοήθεια και παροχή δειγμάτων, όπως επίσης Εταιρεία Ογκολόγων Παθολόγων Ελλάδας (ΕΟΠΕ) για την παροχή υποτροφίας με την οποία κατέστη δυνατή η χρηματοδότηση της διατριβής αυτής.

Ευχαριστώ, επίσης, όλα τα μέλη του τμήματος Παθολογικής Ανατομίας, του τμήματος Παθολογικής Ογκολογίας και του Εργαστηρίου Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την άψογη συνεργασία που είχαμε καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου αυτής.

Τέλος, δεν μπορώ παρά να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου προς την οικογένειά μου και τους αγαπημένους μου ανθρώπους, οι οποίοι με στήριξαν καθ' όλη τη διάρκεια της πορείας μου. Ευχαριστώ τους γονείς μου, Μαρία και Βασίλη, για τις θυσίες και τη στήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια. Επίσης, δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω τη σύντροφο μου, Κατερίνα, για την ανεκτίμητη κατανόηση και την αγάπη που μου προσφέρει, καθώς είναι πάντα δίπλα μου, στηρίζοντας κάθε βήμα μου.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	13
1.1 Καρκινογένεση	13
1.2 Φλεγμονή και Ανοσία.....	16
1.3 Ο ρόλος των σηματοδοτικών μονοπατιών του NF-Κβ στον καρκίνο.....	18
1.4 Η οικογένεια των τετρασπανινών και η συμβολή τους στον καρκίνο.....	23
1.5 ο ρόλος των τετρασπανινών CD81 & CD82 στον καρκίνο του παχέος εντέρου.	35
1.6 Σκοπός της παρούσας μελέτης	49
2. Μεθοδολογία	51
2.1 Ανοσοϊστοχημική μελέτη των μορίων CD81 και CD82 σε ιστολογικό υλικό ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου	51
2.2 Μελέτη της τετρασπανίνης CD81 <i>in vitro</i> σε κυτταρικές σειρές από καρκίνο του παχέος εντέρου.	56
2.2.1 Παραγωγή Πλασμιδίων από Επιδεκτικά Βακτήρια	56
2.2.2 Ευκαρυωτικές κυτταρικές σειρές.....	62
2.2.3 Μοριακές τεχνικές & ανάλυση πρωτεϊνών.....	67
2.2.4 Πειράματα ελέγχου του φαινοτύπου των καρκινικών σειρών	73
2.3 Καταληκτικά Σημεία & Στατιστική Μεθοδολογία.....	76
3. Αποτελέσματα	79
3.1 Ανοσοϊστοχημική μελέτη των μορίων CD81 και CD82 σε ιστολογικό υλικό ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου	79
3.2 Συσχετίσεις μεταξύ κλινικών, εργαστηριακών και παθολόγο-ανατομικών δεδομένων ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου.....	86
3.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την επιβίωση των ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου.....	101
3.4 Τροποποίηση της έκφρασης της τετρασπανίνης CD81 σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές καρκίνου παχέος εντέρου DLD1, CAC2 & HCT116.....	115
3.5 Επίδραση του CD81 στον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου.....	117
3.6 Προσδιορισμός κυτταρικής μετανάστευσης (Wound Healing Assay).	128
3.7 Η επίδραση της τετρασπανίνης CD81 στη δυνατότητα σχηματισμού όγκων. ..	140
3.8 Επίδραση της τετρασπανίνης CD81 στον κυτταρικό κύκλο καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου.	142
3.9 Επίδραση της τετρασπανίνης CD81 στις οδούς σηματοδότησης του NF-κΒ.....	146
5. Συζήτηση.....	150
5.1 Ανοσοϊστοχημική ανάλυση ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου.	151
5.2 Ο ρόλος του CD81 στην εξέλιξη του καρκίνου του παχέος εντέρου <i>in vitro</i>	157

5.3 Συμπεράσματα	166
Ελληνική Περίληψη	167
Αγγλική Περίληψη	172
Βιβλιογραφία	177

1. Εισαγωγή

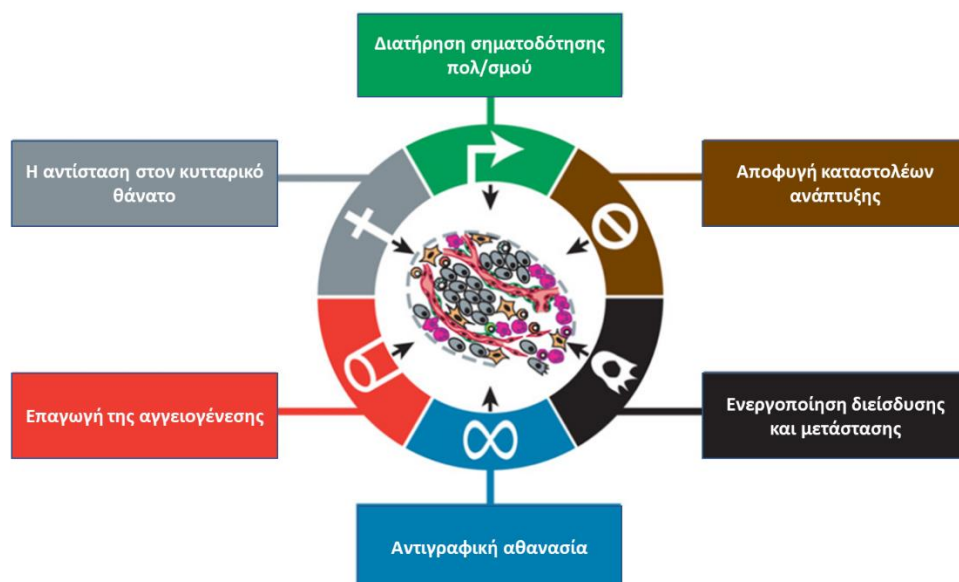
1.1 Καρκινογένεση

Η καρκινογένεση, δηλαδή η μετατροπή των φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά, είναι μια πολύ-σταδιακή διαδικασία η οποία περιλαμβάνει τη συσσώρευση γενετικών μεταλλάξεων, οι οποίες σε συνδυασμό με επιγενετικές τροποποιήσεις, οδηγούν σε καθοριστικές μεταβολές στην γονιδιακή έκφραση και τη κυτταρική φυσιολογία. Υπό φυσιολογικές συνθήκες υπάρχει μία ισορροπία μεταξύ κυτταρικού πολλαπλασιασμού και κυτταρικού θανάτου διαμέσου της απόπτωσης. Ωστόσο, οι αλλαγές που συμβαίνουν στο επίπεδο του κυττάρου διαταράσσουν αυτή την ισορροπία με αποτέλεσμα την μη φυσιολογική και ανεξέλεγκτη διαίρεση του κυττάρου και την απόκτηση μηχανισμών αποφυγής της απόπτωσης που οδηγούν στην καρκινογένεση (1–3).

Σύμφωνα με την πιο επικρατούσα θεωρία καρκινογένεσης η συσσώρευση σωματικών μεταλλάξεων στο DNA διαταράσσουν τον κυτταρικό προγραμματισμό και ανατρέπουν την φυσιολογική ισορροπία μεταξύ κυτταρικού πολλαπλασιασμού και κυτταρικού θανάτου (3). Συγκεκριμένα, μία από τις παλιότερες θεωρίες της καρκινογένεσης προτείνει ότι τα περισσότερα νεοπλάσματα προέχονται από ένα αρχικό κύτταρο και ότι η εξέλιξη του όγκου προκύπτει από την επίκτητη γενετική μεταβλητότητα αυτού του αρχικού κλώνου που έχει ως αποτέλεσμα τη διαδοχική επιλογή όλο και πιο επιθετικών κλώνων (4). Βασικό ρόλο στη διαδικασία αυτή έχει η εμφάνιση μεταλλάξεων σε ογκογονίδια και σε ογκοκατασταλτικά γονίδια. Στα ογκογονίδια παρατηρούμε μεταλλάξεις που οδηγούν σε αύξηση της έκφρασης και ενεργοποίηση τους, αντιθέτως, μεταλλάξεις που οδηγούν σε καταστολή της έκφρασης και της δράσης των ογκοκατασταλτικών γονιδίων εμφανίζονται κατά την πορεία των κυττάρων προς την καρκινογένεση (1,2). Συνοπτικά, αναφέρονται 6 χαρακτηριστικές ιδιότητες (εικόνα 1.1) που διαδοχικά αποκτούν τα κύτταρα κατά την πορεία τους στην καρκινογένεση (2). Σε αυτές περιλαμβάνονται:

- a) Η συνεχής ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών του πολλαπλασιασμού του κυττάρου.

- b) Η αποφυγή μηχανισμών που καταστέλλουν την ανάπτυξη του κυττάρου μέσω αναστολής των ογκοκατασταλτικών γονιδίων .
- c) Η αποφυγή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου/απόπτωσης.
- d) Η αθανатоποίηση του κυττάρου μέσω αποφυγής της προγραμματισμένης γήρανσης του κυττάρων με τη χρήση μηχανισμών που δίνουν στο κύτταρο την ικανότητα να υπερβεί τους εγγενείς φραγμούς/περιορισμούς σχετιζόμενους με τα τελομερή.
- e) Η επαγωγή της αγγειογένεσης
- f) Η ενεργοποίηση των μηχανισμών διήθησης και μετάστασης (2).



Εικόνα 1.1: Ιδιότητες που αποκτούν τα κύτταρα κατά την πορεία στους στην καρκινογένεση. [Η εικόνα προέρχεται από Douglas *et al* (2)] Η ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών πολλαπλασιασμού, η αποφυγή καταστολών ανάπτυξης (π.χ. απορρύθμιση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων), η αντίσταση στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, η αθανатоποίηση των κυττάρων μέσω της αντιγραφής, η επαγωγή της αγγειογένεσης και η ενεργοποίηση της διείσδυσης και της μετάστασης αποτελούν τις έξι χαρακτηριστικές ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων που βοηθούν στην κατανόηση της βιολογίας του καρκίνου (2).

Ως εκ τούτου, λόγω της γενετικής ετερογένειας που προκύπτει από τη διαδοχική συσσώρευση σωματικών μεταλλάξεων, οι κακοήθειες είναι καρυοτυπικά και βιολογικά ετερογενείς γεγονός που περιπλέκει την αντιμετώπιση τους και για αυτό

το λόγο ήδη από το 1976 έχει προταθεί ότι ο καρκίνος κάθε ασθενούς απαιτεί ατομική ειδική θεραπεία (4).

Η πορεία στην εξέλιξη του καρκίνου, ωστόσο, αποτελεί μία ακόμη πιο περίπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει, εκτός από τις τροποποιήσεις διαφόρων γενετικών και επιγενετικών παραγόντων στο επίπεδο του κυττάρου, επίσης το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή, το μικρο-περιβάλλον του όγκου και τον επαναπρογραμματισμό του ενεργειακού μεταβολισμού (2). Μάλιστα, γνωρίζουμε για αρκετούς τύπους συμπαγών όγκων, την ύπαρξη ενός φλεγμονώδους στοιχείου και αρκετές μελέτες αποκαλύπτουν μια σχέση μεταξύ φλεγμονής και ανοσο-απόκρισης του ξενιστή με την εμφάνιση και εξέλιξη του καρκίνου (5–7). Μεταξύ των γονιδίων που απορυθμίζονται στον καρκίνο είναι και οι μεταγραφικοί παράγοντες του NF-κΒ οι οποίοι εμπλέκονται στην επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό, τη μετάσταση και την αγγειογένεση των καρκινικών κυττάρων αλλά και στην φλεγμονώδη απάντηση (8–10). Επιπλέον, έχει φανεί ότι μοριακά μονοπάτια στα οποία εμπλέκονται διάφορες τετρασπανίνες, και στα οποία περιλαμβάνονται και οι οδοί σηματοδότησης του NF-κΒ, είναι θεμελιώδεις σε κυτταρικές διεργασίες στις οποίες συμπεριλαμβάνονται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η μετανάστευση των κυττάρων και επίσης ρυθμίζουν την παρουσία ανοσο-ενεργών κυττάρων σε καρκινικούς ιστούς (11–13).

1.2 Φλεγμονή και Ανοσία

Η χρόνια φλεγμονή θεωρείται χαρακτηριστικό γνώρισμα του καρκίνου (2). Αποτελεί μία κατάσταση που οδηγείται μέσω αυτοκρινών μηχανισμών που πηγάζουν στο μικρο-περιβάλλον του όγκου και είναι ικανή να προάγει την εμφάνιση, την ανάπτυξη και την εξέλιξη του καρκίνου (14). Επίσης, επηρεάζει την ανοσο-επιτήρηση επιδρώντας στην μεταξύ επικοινωνία των κυττάρων τελεστών του ανοσοποιητικού συστήματος που διεισδύουν στο μικρο-περιβάλλον του όγκου (2,15–18). Επιπλέον, γνωρίζουμε για αρκετούς τύπους συμπαγών όγκων, μεταξύ των οποίων είναι ο καρκίνος του παχέος εντέρου, του πνεύμονα και του μαστού, την ύπαρξη ενός φλεγμονώδους στοιχείου και αρκετές μελέτες αποκαλύπτουν μια σχέση μεταξύ φλεγμονής και ανοσο-απόκρισης του ξενιστή με την εμφάνιση και εξέλιξη του καρκίνου (5–7). Μάλιστα, θεωρείτε ότι το ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί να διαμορφώσει το μικρο-περιβάλλον του όγκου, είτε τροφοδοτώντας την ανάπτυξη του καρκίνου, είτε αποτρέποντας την (14). Για παράδειγμα, το ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί να αναγνωρίσει μετασχηματισμένα κύτταρα που έχουν ξεφύγει από τους εγγενείς κυτταρο-κατασταλτικούς μηχανισμούς και να τα εξαλείψει προτού μπορέσουν να δημιουργήσουν κακοήθεια σε μια διαδικασία που ονομάζεται ανοσο-επιτήρηση του καρκίνου. Ωστόσο, αυτή η διαδικασία απέχει πολύ από το να είναι τέλεια καθώς οι μη ανοσογονικές παραλλαγές του όγκου διαφεύγουν, με αποτέλεσμα την υποτροπή του καρκίνου (18–23). Ενθαρρυντικά αποτελέσματα από κλινικές μελέτες την τελευταία δεκαετία έδειξαν ότι οι αναστολείς των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος (immune-checkpoint inhibitors – ICIs), οι οποίοι στοχεύουν ανασταλτικούς υποδοχείς στα T-λεμφοκύτταρα, μπορούν να αναζωογονήσουν την αντικαρκινική ανοσία και να δημιουργήσουν επιτυχημένες αντικαρκινικές αποκρίσεις, αλλάζοντας ραγδαία την κλινική πρακτική για την αντιμετώπιση κακοήθων νεοπλασμάτων (24–26). Ωστόσο, παρόλο τη χρήση των ICIs οι αντικαρκινικές απαντήσεις δεν είναι πάντα επιτυχείς.

Η αντικαρκινική ανοσοθεραπεία ρυθμίζεται από κυτταρικά και μοριακά δίκτυα που παρεμποδίζουν την αυτό-ανοσία και παράλληλα την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων περιορίζοντας σημαντικά την αποτελεσματικότητα του ανοσοποιητικού συστήματος κατά του όγκου και τη δραστικότητα των υφιστάμενων ανοσοθεραπειών (αρνητική ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος). Σε αυτή την

περίπτωση το ανοσοποιητικό σύστημα δυνητικά μπορεί να βοηθήσει στην εξέλιξη του καρκίνου προάγοντας ένα ανοσο-κατασταλτικό μικρο-περιβάλλον (18,27). Η αλληλεπίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος με τον όγκο στα στάδια της καρκινογένεσης, της ανάπτυξης και της εξέλιξης του, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην διαμόρφωση του μικρο-περιβάλλοντος του όγκου, γεγονός που επηρεάζει και την ανοσοθεραπεία. Συγκεκριμένα, γνωρίζουμε ότι το μικρο-περιβάλλον του όγκου διαμορφώνεται από την αλληλεπίδραση με το ανοσιακό σύστημα (7) και οι διαφορετικοί τύποι ανοσοκυττάρων που είναι παρόντες φαίνεται να καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό την αποτελεσματικότητα της αντικαρκινικής ανοσίας (28–30). Ως εκ τούτου, η ικανότητα συγκεκριμένων πληθυσμών λευκοκυττάρων να μεταναστεύσουν από την κυκλοφορία στα σημεία της φλεγμονής/καρκίνου είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική άμυνα του ξενιστή (11,31).

Μεταξύ των μορίων που επιδρούν στο ανοσοποιητικό σύστημα και οι τετρασπανίνες καθώς και οι οδοί σηματοδότησης του NF-κΒ. Η συμβολή της ΙΚΚβ-διαμεσολαβούμενης, κανονικής σηματοδοτικής πορείας του NF-κΒ στην ανάπτυξη της φλεγμονής η οποία προάγει την καρκινογένεση είναι καλά τεκμηριωμένη (32,33). Παρομοίως, οι μοριακές οδοί στις οποίες εμπλέκονται οι τετρασπανίνες και στις οποίες συμπεριλαμβάνονται οι οδοί σηματοδότησης του NF-κΒ, ελέγχουν την ενεργοποίηση, τον πολλαπλασιασμό, την ωρίμανση και την στόχευση διάφορων κυττάρων-τελεστών του ανοσοποιητικού συστήματος σε καρκινικούς ιστούς διαμέσου της αλληλεπίδρασης τους με σημαντικούς υποδοχείς των λευκοκυττάρων (11,28,34–39).

1.3 Ο ρόλος των σηματοδοτικών μονοπατιών του NF-κΒ στον καρκίνο.

i) Ο NF-κΒ

Μεταξύ όλων των πιθανών γενετικών μηχανισμών που οδηγούν στην εμφάνιση και την εξέλιξη του καρκίνου, οι μεταγραφικοί παράγοντες του NF-κΒ και οι οδοί σηματοδοσίας με τους οποίους σχετίζεται παίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο και τη βιωσιμότητα της κυτταρικής ανάπτυξης και συχνά υπόκεινται σε απορρύθμιση στον καρκίνο και γενικά προάγουν τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων (8–10,40).

Ο NF-κΒ είναι ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα που λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας, καθώς επηρεάζει την παραγωγή κυτοκινών και την επιβίωση του κυττάρου, ελέγχοντας τη μεταγραφή του DNA. Οι μεταγραφικοί παράγοντες του NF-κΒ κατέχουν ιδιαίτερο ρόλο στην ρύθμιση των κυτταρικών αποκρίσεων καθώς συγκαταλέγονται στους μεταγραφικούς παράγοντες «ταχείας δράσης». Κύριο χαρακτηριστικό τους είναι ότι είναι παρόν στα κύτταρα σε ανενεργό μορφή και δεν απαιτούν πρωτεϊνική σύνθεση για να ενεργοποιηθούν (41). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ο NF-κΒ να ενεργοποιείται ταχύτατα σε απάντηση σε επιβλαβή ερεθίσματα (42). Οι μεταγραφικοί παράγοντες του NF-κΒ είναι σημαντικοί ρυθμιστές των προ-φλεγμονωδών και σχετιζόμενων με το κυτταρικό στρες κυτταρικών αποκρίσεων. Επιπλέον, κατέχουν κεντρικό ρόλο στην ρύθμιση της ανοσιακής απάντησης στις λοιμώξεις. Απορρύθμιση της λειτουργίας των μεταγραφικών παραγόντων του NF-κΒ έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση αυτοάνοσων νοσημάτων αλλά και με τον καρκίνο (43).

Η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων του NF-κΒ (πίνακας 1.1) περιλαμβάνει 5 υπομονάδες οι οποίες με τη σειρά τους χωρίζονται σε 2 τάξεις. Η τάξη 1 περιλαμβάνει: την α) NF-κΒ1/p105 ή p50 και την β) NF-κΒ2/p100 ή p52. Η τάξη 2 περιλαμβάνει τις: α) RelA/p65, β) c-Rel και γ) RelB. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας του NF-κΒ δεσμεύονται στο DNA ως έτερο- ή ομοδιμερή (44). Όλες οι υπομονάδες που ανήκουν στην οικογένεια του NF-κΒ περιέχουν μια αμινοτελική ομόλογη επικράτεια 'Rel' υπεύθυνη για το διμερισμό και τη δέσμευση των διμερών στο DNA. Οι υποοικογένεια των πρωτεϊνών της τάξης 2 του NF-κΒ στις οποίες περιλαμβάνονται οι

RelA/p65, c-Rel και RelB έχουν μία περιοχή ενεργοποίησης στο καρβοξυτερλικό τους άκρο. Αντιθέτως οι πρωτεΐνες της τάξης 1 (NF-κB1/p50 και NF-κB2/p52), συντίθεται αρχικά στις μεγαλύτερες πρόδρομες μορφές τους, τις p105 και p100 αντίστοιχα. Οι p100 και p105 θα υποβληθούν σε επεξεργασία διαμέσου του πρωτεασώματος ώστε να απελευθερωθούν οι ώριμες μορφές τους. Από το p105 θα δημιουργηθεί το p50 και από το p100 θα δημιουργηθεί το p52. Η επεξεργασία των p100 και p105 διαμέσου του πρωτεασώματος περιλαμβάνει την επιλεκτική αποικοδόμηση της καρβοξυτελικής τους περιοχής. Οι περιοχές αυτές περιέχουν επαναλήψεις ανγκυρίνης και δρουν ως μεταγραφικοί καταστολείς (40,43,45).

	Name/Gene	Protein
NF-κB Class I	NF-κB ₁	p105 → p50
	NF-κB ₂	p100 → p52
NF-κB Class II	REL	c-rel
	RELA	p65
	RELB	RelB
IκBs	IKBA	IκBα
	IKBB	IκBβ
	BCL3	Bcl-3
Πίνακας 1.1: Η οικογένεια των πρωτεϊνών του NF-κB και IκBs (44).		

ii) Η σηματοδοτική πορεία του NF-κB

Ο NF-κB μπορεί να ενεργοποιηθεί κυρίως μέσω δύο οδών σηματοδότησης, της κλασικής και μη κλασικής οδού. Σε κύτταρα που δεν έχουν λάβει ερεθίσματα τα διμερή του NF-κB παραμένουν απενεργοποιημένα στο κυτταρόπλασμα συνδεδεμένα με ειδικούς αναστολείς (inhibitors of κB – “IκB”). Οι IκB αποτελούν μία οικογένεια αναστολέων στις οποίες περιλαμβάνονται οι IκBα, IκBβ, IκBε και Bcl-3. Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν περιοχές με επαναλήψεις ανγκυρίνης στο καρβοξυ-τελικό τους άκρο και συνδεδεμένες με τις πρωτεΐνες του NF-κB στο κυτταρόπλασμα αποτρέπουν την ενεργοποίησή τους (43,46).

Όπως είναι αναμενόμενο, πρώτο βήμα για την ενεργοποίηση των πρωτεϊνών του NF-κΒ είναι η αποδόμηση των ΙκΒ. Κεντρικό ρόλο σε αυτό το σημείο έχει η ενεργοποίηση μιας ειδικής κινάσης που ονομάζεται κινάση του ΙκΒ (IKK). Η IKK είναι ένα ετεροδιμερές που αποτελείτε από τις υπομονάδες ΙΚΚα και ΙΚΚβ και από τη ρυθμιστική πρωτεΐνη NEMO. Όταν υπάρξουν τα απαραίτητα ερεθίσματα από την επιφάνεια του κυττάρου η IKK φωσφορυλιώνει τις ΙκΒ πρωτεΐνες σε δύο σερίνες που βρίσκονται στη ρυθμιστική περιοχή τους. Η φωσφορυλίωση των σερινών αυτών έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της ουβικιτινίωσης και αποδόμησης των ΙκΒ μέσω του πρωτεοσώματος. Τα απελευθερωμένα ετεροδιμερή του NF-κΒ μπορούν τώρα να μεταβούν στον πυρήνα και να ενεργοποιήσουν την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων. Μεταξύ των γονιδίων που εκφράζονται είναι και τα γονίδια των ΙκΒ, οι οποίες απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα και μπορούν εκ νέου να δεσμεύσουν τους μεταγραφικούς παράγοντες του NF-κΒ στην κυτταρική μεμβράνη δημιουργώντας έτσι ένα αυτό-ρυθμιστικό βρόγχο (43,46–48). Συγκεκριμένα, όσον αφορά την ενεργοποίηση της κανονικής πορείας του NF-κΒ, τα αρχέτυπα ετεροδιμερή του RelA/p65 και p50 συγκρατούνται στο κυτταρόπλασμα διαμέσου της δέσμευσης τους από αναστολείς του NF-κΒ της υποοικογένειας των ΙκΒs (inhibitors of NF-κΒ), απουσία προ-φλεγμονωδών ή στρεσογόνων ερεθισμάτων. Η ενεργοποίηση της κανονικής σηματοδοτικής πορείας του NF-κΒ απαιτεί την φωσφορυλίωση της ΙκΒα στις σερίνες 32/33 (Ser32/36) που προκαλεί την ουβικιτινίωση και πρωτεοσωμική αποικοδόμηση της ΙκΒα, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση και την μετατόπιση του ετεροδιμερούς NF-κΒ RelA/p65 και p50 στον πυρήνα και την ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων-στόχων του (46,49–53). Η έκφραση των γονιδίων αυτών έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση φλεγμονωδών ή ανοσολογικών αποκρίσεων, την ενεργοποίηση της κυτταρικής επιβίωσης και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (48).

Η φωσφορυλίωση του ΙκΒα διαμεσολαβείτε επίσης από την κινάση IKK, δηλαδή το υψηλού μοριακού βάρους σύμπλεγμα κινασών του NF-κΒ, (IKK : ΙΚΚα & ΙΚΚβ κινάσες σερίνης/θρεονίνης και NEMO-IKKγ που αποτελεί τη ρυθμιστική υπομονάδα του σηματοδοτικού συμπλέγματος των κινασών IKK). Η NEMO απαιτείται πάντα για την ενεργοποίηση της ΙΚΚβ, η οποία πραγματοποιείται με φωσφορυλίωση στις Ser177/181 του T-βρόγχου ενεργοποίησης που φέρει η ΙΚΚβ, ως απόκριση σε προ-

φλεγμονώδη ή στρεσογόνα εξωκυτταρικά ερεθίσματα. Αντίθετα, η ενεργοποίηση της IKKα διαμέσου της φωσφορυλίωσης της στις Ser176/180 είναι ανεξάρτητη από τη NEMO και διαμεσολαβείτε από την κινάση ενεργοποίησης του NF-κΒ (NF-κΒ-Inducing Kinase – “NIK”), η οποία ενεργοποιείται από ερεθίσματα της επίκτητης ανοσίας. *In vivo*, η IKKα φωσφορυλιώνει το πρόδρομο μόριο p100 επάγοντας την ουβικιτινίωση του και την εξαρτώμενη από το πρωτεόσωμα επεξεργασία του, παράγοντας την ώριμη υπομονάδα NF-κΒ p52 και τον σχηματισμό των ετεροδιμερών p52 - RelB τα οποία μετατοπίζονται στον πυρήνα και ενεργοποιούν την μεταγραφή ενός διαφορετικού συνόλου γονιδίων-στόχων που σχετίζονται με τη μη-κανονική ή εναλλακτική πορεία σηματοδότησης του NF-κΒ. Η πρόδρομη πρωτεΐνη p100 λειτουργεί παρόμοια με την IκΒα, απομονώνοντας την υπομονάδα RelB μέσα στο κυτταρόπλασμα (41,43,46,54).

iii) Παθολογική σηματοδότηση του NF-κΒ και καρκίνος.

Γνωρίζουμε ότι τα γονίδια που ρυθμίζονται από τους μεταγραφικούς παράγοντες του NF-κΒ εμπλέκονται στην επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό, αγγειογένεση και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων (8,9). Παρόλα αυτά ο ακριβής μηχανισμός δράσης της IKKβ-εξαρτώμενης σηματοδοτικής πορείας του NF-κΒ στην έναρξη, ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου παραμένει σε μεγάλο βαθμό άγνωστος. Η καλύτερη γνώση αυτών των μηχανισμών δράσης είναι μεγάλης σημασίας διότι θα μπορούσε να οδηγήσει στην ανάπτυξη στοχευτικών θεραπειών και αποτελεσματικών στρατηγικών ενάντια στον καρκίνο. Επομένως, η αναγνώριση νέων γονιδίων-στόχων της κανονικής σηματοδοτικής πορείας του NF-κΒ που σχετίζονται λειτουργικά με ογκογόνα σήματα θα μπορούσε να χρησιμεύσει στην ανάπτυξη βιοδεικτών ή δυνητικών θεραπευτικών προσεγγίσεων.

Οι αποκρίσεις του NF-κΒ φυσιολογικά αυτοπεριορίζονται από την παρουσία βρόγχων αρνητικής ανατροφοδότησης. Αυτοί οι αυτό-ρυθμιστικοί βρόγχοι όμως συχνά απορυθμίζονται στα καρκινικά κύτταρα. Παρά τη γνώση της ύπαρξης του μηχανισμού αυτού, το ρυθμιστικό δίκτυο το οποίο ευθύνεται για τις εξαρτώμενες από τις σηματοδοτικές πορείες του IKK/NF-κΒ στα καρκινικά κύτταρα παραμένει ασαφές. Επιπλέον, οι οδοί σηματοδότησης του NF-κΒ έχουν πλειοτροπικές βιολογικές επιδράσεις που μπορεί να εξαρτώνται από το κυτταρικό περιβάλλον και

τον τύπου του ιστού και επομένως η κανονική σηματοδοτική πορεία του NF-κΒ μπορεί να λειτουργήσει ως προαγωγέας του καρκίνου εντός των μετασχηματισμένων κυττάρων (8,9,49,51,55). Επιπροσθέτως, η συμβολή της ΙΚΚβ-διαμεσολαβούμενης, κανονικής σηματοδοτικής πορείας του NF-κΒ στην ανάπτυξη του της φλεγμονής η οποία προάγει την καρκινογένεση έχει τεκμηριωθεί και φαίνεται να επηρεάζει επίσης την έμφυτη ανοσο-απόκριση του ξενιστή στα καρκινικά κύτταρα ρυθμίζοντας ορισμένες λειτουργίες των λεμφοκυττάρων και των μακροφάγων που διηθούν τον όγκο (32,33,50,53,56,57).

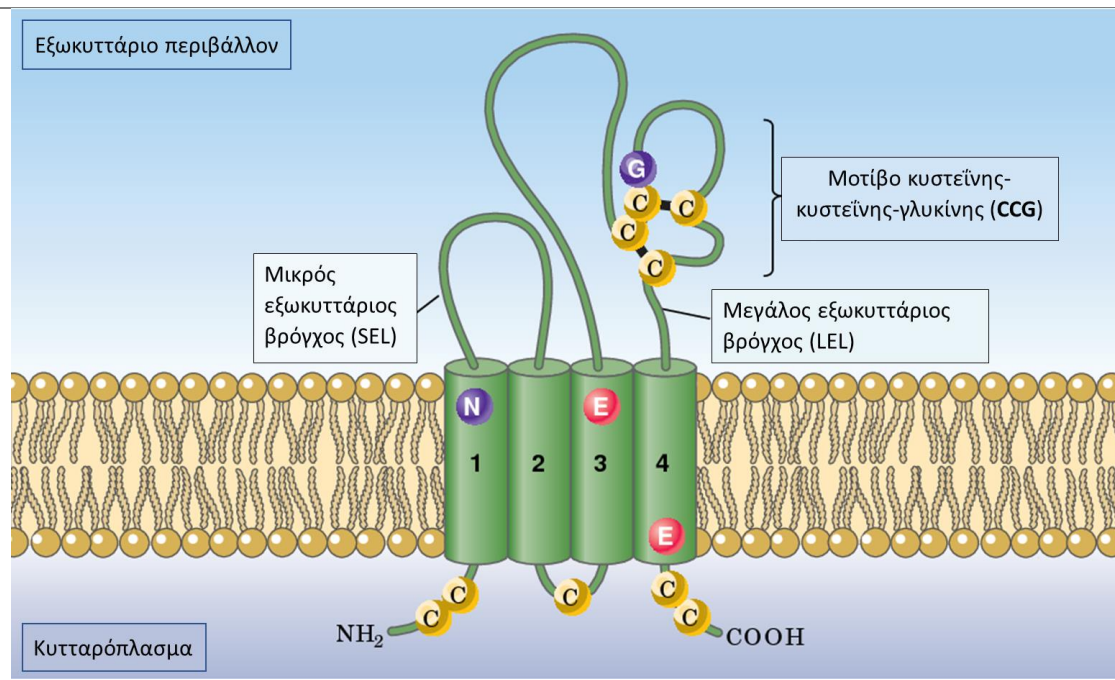
1.4 Η οικογένεια των τετρασπανινών και η συμβολή τους στον καρκίνο.

Τα αντιγόνα του συμπλέγματος διαφοροποίησης (Cluster of Differentiation – “CD”) είναι μόρια κυτταρικής επιφανείας που εκφράζονται σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και σε άλλα κύτταρα και συμβάλλουν σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες, όπως η επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων, η κυτταρική σηματοδότηση και η εκδήλωση ανοσο-αποκρίσεων έναντι ξένων παραγόντων, ενώ κάποια από αυτά έχουν συσχετιστεί με την εξέλιξη διάφορων τύπων καρκίνου (58,59). Η διερεύνηση του προφίλ έκφρασης των διάφορων αντιγόνων CD, επέτρεψε την αναγνώριση, απομόνωση και την εκτίμηση του φαινοτύπου των κυττάρων του ανοσοποιητικού, σύμφωνα με τη λειτουργία τους στις ανοσολογικές διεργασίες. Μέχρι σήμερα, έχουν χαρακτηριστεί εκατοντάδες μόρια CD, ωστόσο, εκτιμάται ότι συνολικά υπάρχουν περίπου 2500 μόρια στην επιφάνεια των λευκοκυττάρων. Οι αξιολόγηση της έκφρασης αυτών των αντιγόνων-δεικτών CD σε συμπαγείς όγκους έχει συμβάλει στη διάγνωση της νόσου σε αρχικά στάδια ενώ παράλληλα προφέρει πληροφορίες σχετικά με τις ιδιότητες που αποκτώνται από τα καρκινικά κύτταρα. Μάλιστα τα αντιγόνα-δείκτες CD φαίνεται να υπερτερούν ως διαγνωστικοί και προγνωστικοί δείκτες σε σύγκριση με άλλους καρκινικούς δείκτες (58,59). Σε αυτά τα μόρια CD συμπεριλαμβάνονται και οι τετρασπανίνες, μεταξύ των οποίων είναι το CD82, και CD81.

ι) Η οικογένεια των τετρασπανινών και η χαρακτηριστική τους δομή

Οι τετρασπανίνες αποτελούν μία οικογένεια διατηρημένων πρωτεϊνών σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς και το χαρακτηριστικό τους είναι ότι διαπερνούν την μεμβράνη 4 φορές (12,28,36,60). Στον άνθρωπο έχουν αναγνωριστεί 33 μέλη με ξεχωριστή κατανομή σε διαφορετικούς ιστούς (11,12,36,60). Ορισμένες τετρασπανίνες εκφράζονται μόνο σε συγκεκριμένους ιστούς (όπως το CD37 και CD53 που η έκφραση τους περιορίζεται σε αιμοποιητικά κύτταρα), ενώ άλλες όπως το CD9, CD81 και CD151 έχουν πιο ευρεία κατανομή (60,61). Συγκεκριμένα, οι τετρασπανίνες αποτελούνται από τέσσερις άλφα-έλικες οι οποίες διαπερνούν την μεμβράνη, δύο εξωκυττάριους βρόγχους και 2 κυτταροπλασματικές ουρές. Οι α-έλικες δημιουργούν στην εξωκυττάρια περιοχή δύο βρόγχους, έναν μικρότερο τον EC1 και έναν

μεγαλύτερο τον EC2 ή «μεγάλου εξωκυττάριου βρόγχου» (large extracellular loop – LEL), που αποτελείται συνήθως από 100 αμινοξέα. Οι τετρασπανίνες διακρίνονται από άλλες παρόμοιες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες λόγω της παρουσίας συντηρημένων αμινοξέων που εντοπίζονται στις διαμεμβρανικές τους περιοχές, καθώς επίσης και στην παρουσία του «μεγάλου εξωκυττάριου βρόγχου» (LEL) (11,12,36). Χαρακτηριστικό του μεγάλου εξωκυττάριου βρόγχου των τετρασπανινών είναι η παρουσία τεσσάρων ή περισσότερων συντηρημένων αμινοξέων κυστεΐνης, καθώς και δύο εξαιρετικά διατηρημένων αλληλουχιών "CCG". Οι "CCG" αλληλουχίες χρησιμεύουν για τη δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών οι οποίοι σταθεροποιούν τον «μεγάλο εξωκυττάριο βρόγχο» (12). Ο LEL κατέχει πρωτεύοντα ρόλο για τη λειτουργία των τετρασπανινών καθώς είναι η περιοχή όπου πραγματοποιούνται οι περισσότερες μοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των τετρασπανινών και άλλων πρωτεϊνών της κυτταρικής επιφάνειας (12,36). Ως εκ τούτου η μορφολογία του LEL ποικίλει μεταξύ των μελών της οικογένειας των τετρασπανινών, με εξαίρεση της συντηρημένες δομές, αντικατοπτρίζοντας τις διαφορετικές λειτουργίες που έχουν οι διαφορετικές τετρασπανίνες. Μάλιστα, λόγω της ποικιλομορφίας του ο LEL χρησιμεύει και στην ταυτοποίηση των διαφορετικών μελών των τετρασπανινών (12,36). Επιπλέον χαρακτηριστικό ορισμένων τετρασπανινών είναι ότι γλυκοζυλιώνονται στην περιοχή του LEL, άλλες υπόκεινται σε ομοιοπολική προσκόλληση λιπαρών οξέων στην ενδοκυττάρια περιοχή τους (62). Επιπροσθέτως, μεγάλο ενδιαφέρον έχουν και οι κυτταροπλασματικές περιοχές των τετρασπανινών οι οποίες μπορούν να αλληλοεπιδράσουν με τα μόρια σηματοδότησης (11,38).



Εικόνα 1.2: Δομικά χαρακτηριστικά τετρασπανινών. [Η εικόνα προέρχεται από Levy *et al* (63)]. Οι τετρασπανίνες αποτελούνται από 4 διαμεμβρανικές περιοχές (πράσινοι κύλινδροι), οι οποίες περιέχουν ορισμένα συντηρημένα αμινοξέα. Μεταξύ της 1^{ης} και 2^{ης} διαμεμβρανικής περιοχής σχηματίζεται στην εξωκυττάρια επιφάνεια ο μικρός εξωκυττάριος βρόγχος (small extracellular loop – SEL) και μεταξύ της 3^{ης} και 4^{ης} διαμεμβρανικής περιοχής σχηματίζεται ο μεγάλος εξωκυττάριος βρόγχος (large extracellular loop – LEL). Η οικογένεια των τετρασπανινών παρουσιάζει ορισμένα συντηρημένα αμινοξέα. Για παράδειγμα, η LEL χαρακτηρίζεται από την παρουσία του συντηρημένου μοτίβου CCG, το οποίο είναι απαραίτητο για την δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών. Ο αριθμός των δισουλφιδικών δεσμών διαφέρει μεταξύ των διαφόρων πρωτεϊνών στην οικογένεια των τετρασπανινών (μεταξύ δύο και τεσσάρων). Αυτές οι δισουλφιδικές γέφυρες προσδιορίζουν και σταθεροποιούν την τριτογενή δομή της LEL, η οποία είναι καθοριστικής σημασίας για την λειτουργία της εκάστοτε τετρασπανίνης. Στο παρόν παράδειγμα, απεικονίζεται η τετρασπανίνη CD81 που περιέχει 2 δισουλφιδικούς δεσμούς στη LEL. (63)

iii) Ο φυσιολογικός ρόλος και οι πολλαπλές λειτουργίες των τετρασπανινών

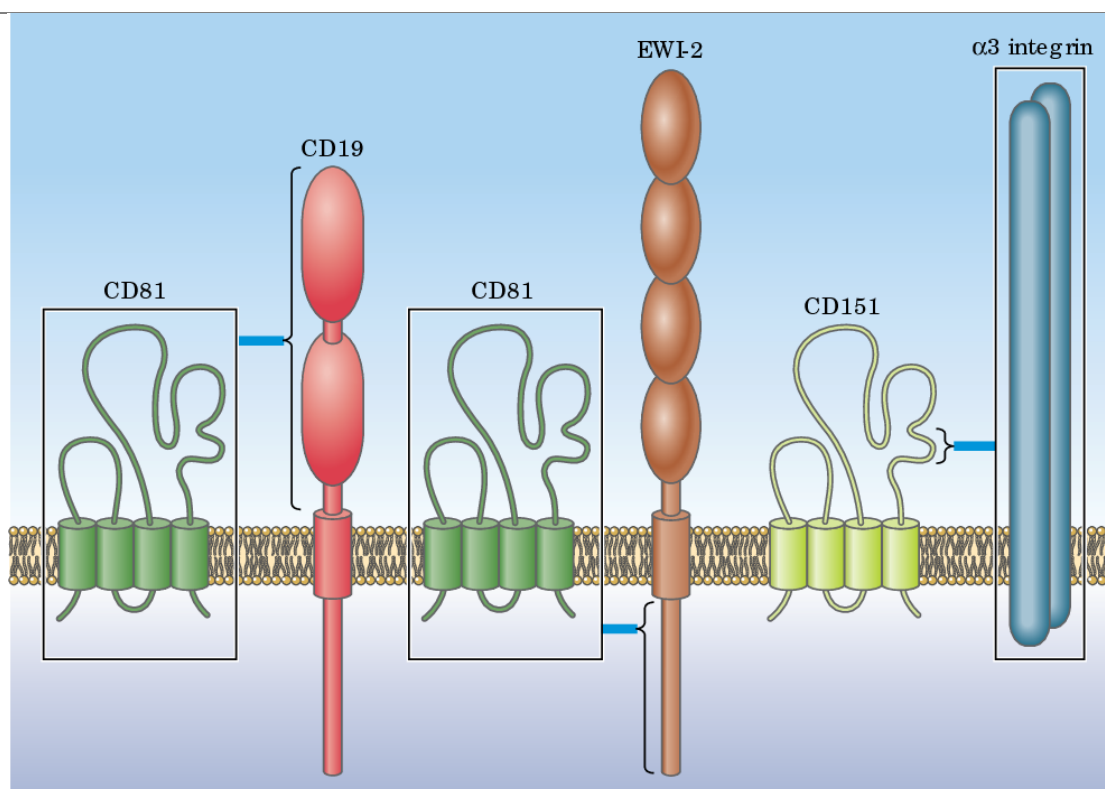
Οι τετρασπανίνες εμπλέκονται σε θεμελιώδεις κυτταρικές διεργασίες, όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η μετανάστευση, και επίσης όταν απορρυθμίζονται στις κακοήθειες και σε λοιμώδεις νόσους (11,60). Ιδιαίτερο γνώρισμα των τετρασπανινών είναι η παρουσία τους στα εξωσώματα. Οι τετρασπανίνες αρχικώς χρησίμευαν ως δείκτες για την αναγνώριση και ταξινόμηση των εξωσωμάτων. Τα εξωσώματα έχουν κερδίσει την προσοχή της επιστημονικής κοινότητας λόγω της δράσης τους ως διαμεσολαβητές της επικοινωνίας μεταξύ κυττάρων. Επιπλέον, έχει φανεί ότι τα εξωσώματα που απελευθερώνονται από τα καρκινικά κύτταρα εμπλέκονται ενεργά στη δημιουργία μεταστάσεων και είναι σαφές ότι οι τετρασπανίνες έχουν ενεργό ρόλο στη λειτουργία των εξωσωμάτων

(60,64). Συγκεκριμένα, οι τετρασπανίνες επηρεάζουν την παράδοση του φορτίου που μεταφέρουν τα εξωσώματα και με αυτό τον τρόπο μπορούν έμμεσα να επηρεάσουν την εμφάνιση μεταστάσεων ή να επηρεάσουν την ανοσολογική απόκριση στο μικρο-περιβάλλον του όγκου (28,64,65).

Βασική λειτουργία των τετραπανινών είναι ότι συνδυάζονται μεταξύ τους, καθώς και με μία σειρά άλλων διαμεμβρανικών και κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών για να σχηματίσουν τις μεμβρανικές μικροεπικράτειες, γνωστές επίσης ως μικροπεριοχές μοριακών συμπλεγμάτων εμπλουτισμένων με τετρασπανίνες (Tetraspanin Enriched Microdomains-TERMs or TEMs). Αυτά τα πρωτεϊνικά συμπλέγματα αναφέρονται επίσης στη βιβλιογραφία ως δίκτυα τετρασπανινών (tetraspanin webs) (11,12,36,61). Συγκεκριμένα, οι τετρασπανίνες χρησιμεύουν ως μεμβρανικές «σκαλωσιές» όπου συγκεντρώνονται τα διάφορα μόρια της επιφάνειας του κυττάρου όπως οι ιντεγκρίνες και διάφοροι κυτταρικοί υποδοχείς, ενώ επιπλέον φαίνεται ότι εμπλέκονται στη στρατολόγηση μορίων σηματοδότησης και την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών (12,36,38,60,61,66,67).

Εξ ορισμού λοιπόν, ένα βασικό χαρακτηριστικό των τετρασπανινών είναι να οργανώνουν συγκεκριμένους υποδοχείς και πρωτεΐνες σηματοδότησης σε μεμβρανικές μικροεπικράτειες (microdomains) στην επιφάνεια των κυττάρων. Ως εκ τούτου, οι τετρασπανίνες αναδεικνύονται ως κεντρικά δομικά στοιχεία της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, και παρόλο που δεν διαθέτουν συμβατικούς υποδοχείς/συνδέτες, λόγω της ικανότητάς τους να αλληλοεπιδρούν με μια ποικιλία μορίων εντός του TEM (πχ ανοσο-υποδοχείς, ένζυμα, μόρια σηματοδότησης, κ.α.), έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν μία ποικιλία κυτταρικών διεργασιών μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται η διακίνηση πρωτεϊνών, η προσκόλληση, η μετανάστευση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η σηματοδότηση (11,12,28,36,60,67). Επιπλέον, μέσω του δικτύου που σχηματίζουν, οι τετρασπανίνες έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν διάφορα σύμπλοκα σηματοδότησης του ανοσοποιητικού συστήματος. Συγκεκριμένα, καθώς τα περισσότερα επιφανειακά ανοσοτροποποιητικά μόρια εξαρτώνται από αλληλεπιδράσεις μεταξύ υποδοχέα-προσδέτη για την ενεργοποίηση τους, οι τετρασπανίνες επηρεάζουν τη σηματοδότηση διευκολύνοντας την πλευρική τοποθέτηση στη μεμβράνη των πρωτεϊνών με τις οποίες σχετίζονται (68). Επίσης, ιδιαίτερο γνώρισμα των τετρασπανινών είναι ότι το ίδιο μόριο τετρασπανίνης μπορεί

να συσχετιστεί με διαφορετικές πρωτεΐνες ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου (68). Επομένως, η πληθώρα των μορίων με τα οποία μπορούν να αλληλεπιδράσουν σε συνδυασμό με την ποικιλία των μοριακών αλληλεπιδράσεων και την ετερογένεια των TEMs εξηγούν πως μία μοναδική τετρασπανίνη μπορεί να έχει πλειοτροπικές και διαφορετικές λειτουργίες και να εμπλέκεται σε μία ποικιλία κυτταρικών διεργασιών τόσο υπό φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές συνθήκες (11,60,68).



Εικόνα 1.3: Το δίκτυο των τετρασπανινών (tetraspanin-web). [Η εικόνα προέρχεται από Levy *et al* (63)]. Οι τετρασπανίνες διαθέτουν την ικανότητα να συγκροτούν οργανωμένα πολυμερή σύμπλοκα, αποτελούμενα τόσο από μέλη της οικογένειας των τετρασπανινών, όσο και από άλλες πρωτεΐνες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, σχηματίζοντας ένα δίκτυο τετρασπανινών (Tetraspanin web). Το δίκτυο των τετρασπανινών διαμορφώνει παροδικά συμπλέγματα από διαμεμβρανικά και ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μόρια, επάγοντας σηματοδοτικές πορείες ως απόκριση σε ποικίλα εξωκυτταρικά ερεθίσματα. Επιπλέον, το μέλος της οικογένειας των τετρασπανινών CD81 συνδέεται με μέλη που ανήκουν στην οικογένεια πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση πολλών οδών ενδοκυτταρικής σηματοδότησης. Αλληλεπιδράσεις επίσης έχουν εντοπιστεί μεταξύ τετρασπανινών και μελών υπερ-οικογένειας των ανοσοσφαιρινών, όπως η EWI2. Συνολικά, η ικανότητα των τετρασπανινών να αλληλεπιδρούν ταυτόχρονα τόσο μεταξύ τους, όσο και με πολλά άλλα σηματοδοτικά μόρια επιτρέπει την προαγωγή σημάτων και διευκολύνει τον συντονισμό της διαδικασίας της ενδοκυτταρικής σηματοδότησης (63,68).

iv) Παθολογική δράση τετρασπανινών

Τα τελευταία χρόνια οι τετρασπανίνες έχουν αναδειχθεί ως βασικοί συντελεστές στην καρκινογένεση. Η έκφραση τους σε καρκινικούς ιστούς ποικίλει και ο ρόλος τους είναι διττός αφού ορισμένες λειτουργούν ως καταστολείς του καρκίνου ενώ άλλες κατευθύνουν την εξέλιξη του όγκου (πίνακας 1.2) (28,34–36,69–71). Λειτουργώντας ως μοριακές σκαλωσιές, οι τετρασπανίνες συγκεντρώνονται στα TEM μαζί με άλλες πρωτεΐνες της κυτταρικής επιφάνειας, όπως υποδοχείς κυτταροκινών, ιντεγκρίνες, υποδοχείς προσκόλλησης, μεταλλοπρωτεάσες, συμβάλλοντας σε όλα τα στάδια της ογκογένεσης και της εξέλιξης του καρκίνου (29,35,36,60,70).

Μελέτες σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα έχουν αναδείξει συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης ορισμένων τετρασπανινών και του καρκίνου. Για παράδειγμα οι τετρασπανίνες CD9 και CD82 παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση σε διάφορους καρκινικούς ιστούς, ενώ οι τετρασπανίνες CD151 και Tspan8 εμφανίζουν αυξημένη έκφραση (28). Μεταξύ των τετρασπανινών που υπάρχουν στον άνθρωπο οι Tspan8, Tspan12, CD9, CD37, CD63, CD81, CD82, και CD151 φαίνεται να παίζουν κάποιο ρόλο στην εξέλιξη του καρκίνου και ρύθμιση της έκφρασης των τετρασπανινών αυτών μπορεί να επηρεάσει την πρόγνωση του καρκίνου. Ιστορικά δεδομένα από τη μελέτες προηγούμενων ετών που συνέκριναν την έκφραση ορισμένων τετρασπανινών μεταξύ φυσιολογικών και καρκινικών ιστών ανέδειξαν τη Tspan8, τη CD63 και τη CD151 ως αντιγόνα σχετιζόμενα με τον όγκο, ενώ η CD82 και η CD9 έχουν αναγνωριστεί ως αρνητικοί ρυθμιστές των μεταστάσεων (60,72). Η διαφορετική έκφραση των τετρασπανινών μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών ιστών επιτρέπει την χρήση των τους ως προγνωστικούς βιοδείκτες αλλά και ως θεραπευτικούς στόχους (60). Για παράδειγμα, η παρουσία mRNA της Tspan8 σε υγρή βιοψία μπορεί να χρησιμεύσει ως ευαίσθητος δείκτης για τη ανίχνευση του καρκίνου του παχέος εντέρου (73). Ως θεραπευτικός στόχος το αντιγόνο CD63 που εκφράζεται σε καρκινικούς ιστούς έχει χρησιμοποιηθεί για να κατασκευαστεί ένα «bispecific» αντίσωμα που αναγνωρίζει το CD63 στα καρκινικά κύτταρα επιτρέποντας έτσι την αποτελεσματική παράδοση της anti-HER2 θεραπείας στο κύτταρο-στόχο (74). Η στρατηγική αυτή έχει δείξει καλά αποτελέσματα με βελτίωση της επιβίωσης και καθυστέρηση της εξέλιξης του όγκου σε προκλινικά, πειραματικά μοντέλα (60,74).

Υπάρχουν αρκετά προκλινικά δεδομένα που δείχνουν ότι οι τετρασπανίνες συμβάλουν στην ανάπτυξη του όγκου, την κυτταρική προσκόλληση, την εισβολή και τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων (60) και μάλιστα η στόχευση ορισμένων τετρασπανινών έχει αποδειχθεί αποτελεσματική στην εξάλειψη των καρκινικών κυττάρων σε προκλινικά μοντέλα (60,75). Για παράδειγμα, η CD151 υποστηρίζει την καρκινική διήθηση και μετάσταση, επομένως η αποσιώπιση της σε πειραματικά μοντέλα ποντικών με Lewis lung carcinoma ή B16F10 μελάνωμα φάνηκε να περιορίζει τον αριθμό των μεταστάσεων (71), καθώς επίσης και σε κύτταρα καρκίνου του μαστού όπου σίγαση της CD151 επηρέασε αρνητικά την ενεργοποίηση του p38 από το TGF- β με αποτέλεσμα μειωμένη προσκόλληση, οδηγώντας μειωμένο αριθμό πνευμονικών μεταστάσεων σε πειραματικά μοντέλα (76). Επιπλέον, η CD9 έχει αναγνωριστεί ως αναστολέας της εξάπλωσης του καρκίνου και μειωμένη έκφραση της μειώνεται κατά τη διάρκεια εξέλιξης του καρκίνου γεγονός που έχει συσχετιστεί με κακή πρόγνωση σε αρκετούς τύπους καρκίνου, στους οποίους συμπεριλαμβάνονται το μελάνωμα, ο καρκίνος του πνεύμονα, του μαστού, του παχέος εντέρου του προστάτη, του παγκρέατος και των ωοθηκών (60,72). Αντιθέτως, στον καρκίνο του οισοφάγου η CD9 φαίνεται να υπερεκφράζεται και να σχετίζεται με το στάδιο της νόσου και τις λεμφαδενικές μεταστάσεις (77). Αν και τα αποτελέσματα αυτά μοιάζουν παράδοξα μπορούν να εξηγηθούν από τις πλειοτροπικές δράσεις των τετρασπανινών. Συγκεκριμένα, μειωμένη έκφραση της CD9 φαίνεται να συσχετίζεται αυξημένη φλεβική διήθηση από τα καρκινικά κύτταρα και αυξημένο αριθμό μεταστάσεων για τους περισσότερους τύπους όγκου. Παραδείγματος χάρη, η σίγαση της CD9 σε μοντέλα ποντικών με καρκίνο του προστάτη οδηγεί σε αυξημένο αριθμό ηπατικών μεταστάσεων (78). Για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί στρατηγικές που ενισχύουν τη δράση της CD9 σε καρκίνο του στομάχου με τη χρήση αντισωμάτων και φάνηκε ότι η χρήση αυτών των αντισωμάτων αυτών σε ποντίκια που φέρουν ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα καρκίνου του στομάχου μπορεί να αναστείλει επιτυχώς την εξέλιξη του όγκου μέσω προαποπτικών και αντι-αγγειογενετικών δράσεων (72). Επιπλέον, η υπερέκφραση της Tspan8 έχει συσχετιστεί με πρόοδο του καρκίνου των ωοθηκών και η στόχευση της με τη χρήση αντισωμάτων έχει αποδειχθεί αποτελεσματική στρατηγική καθώς μπορεί να αναστείλει την εισβολή και μετάσταση των καρκινικών κυττάρων που εκφράζουν την Tspan8 (79).

Μεταξύ των μοριακών μονοπατιών που σχετίζονται με την καρκινογένεση και στις οποίες εμπλέκονται οι τετρασπανίνες είναι και οι οδοί σηματοδότησης του NF-κΒ. Για παράδειγμα, έχει φανεί ότι η Tspan1 συμβάλλει στην αντίσταση κατά της απόπτωσης των κυττάρων μέσω της οδού του NF-κΒ. Συγκεκριμένα, η Tspan1 καταστέλει το φωσφορυλιωμένο p-IκΒ με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της μετατόπισης των ετεροδιμερών του NF-κΒ στον πυρήνα και την αναστολή της απόπτωσης (80). Έχει παρατηρηθεί ότι η Tspan15, που υπερεκφράζεται στα πλακώδη καρκινώματα του οισοφάγου, προάγει την εμφάνιση μεταστάσεων μέσω ενεργοποίησης της οδού σηματοδότησης του NF-κΒ. Συγκεκριμένα φάνηκε ότι η Tspan15 αλληλοεπιδρά με το BTRC (Beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase) και έτσι προάγει την πρωτεοσωμική αποδόμηση της IκΒα που απελευθερώνει και ενεργοποιεί τους μεταγραφικούς παράγοντες του NF-κΒ (13).

Ρόλος στην καρκινογένεση	Σχετιζόμενες κακοήθειες	Πιθανοί μηχανισμοί
Tspan8 Προάγει	• Κολο-ορθικός • Στομάχου • Οισοφάγου • Παγκρέατος • Ήπατος	• Διευκολύνει τη μετάσταση • Προάγει την αγγειογένεση
CD151 Προάγει	• Παχέος εντέρου • Μαστού • Προστάτη • Παγκρέατος • Ήπατος • Πνεύμονα	• Διευκολύνει τη μετάσταση • Προάγει την ικανότητα διείσδυσης των καρκινικών κυττάρων • Προωθεί την αγγειογένεση μέσω υπερέκφρασης πρωτεασών που αποικοδομούν το εξωκυττάριο περιβάλλον
CD9 Καταστέλλει	• Πνεύμονα • Μαστού • Παχέος εντέρου • Δέρματος • Ωοθηκών • Στομάχου • Κεφαλής/τραχήλου • Προστάτη • Παγκρέατος • Αιματολογικές	• Καταστέλλει την κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων • Αναστέλλει την σηματοδότηση αυξητικών παραγόντων • Ρυθμίζει τη δραστηριότητα των ενζύμων αποικοδόμησης • Σχηματίζει ένα σύμπλεγμα με την podoplanin, η οποία ευαισθητοποιεί τα καρκινικά κύτταρα με αποτέλεσμα να αναχαιτίζονται στη μικροκυκλοφορία ή να καταστρέφονται από κύτταρα “φυσικούς φονείς” (natural killer – NK) ή από T-λεμφοκύτταρα που έχουν ενεργοποιηθεί από IL-2
CD63 Πιθανώς Καταστέλλει	• Μελάνωμα • Ωοθηκών • Πνεύμονα • Γλοιοβλάστωμα	• Διευκολύνει την μεταφορά ενζύμων αποικοδόμησης στο λυσόσωμα ώστε να αποικοδομηθούν • Προάγει την έκφραση αναστολέων των μεταλλοπρωτεϊνών (MMP)
CD82 Καταστέλλει	• Πνεύμονα • Προστάτη • Μαστού • Στομάχου • Ήπατος • Ουροδόχου • Παχέος εντέρου • Παγκρέατος • Οισοφάγου • Πέους • Ενδομήτριου	• Παρεμποδίζει την κυτταρική κινητικότητα • Καταστέλλει σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην κυτταρική προσκόλληση • Αναστέλλει τη σηματοδότηση μέσω υποδοχέων αυξητικών παραγόντων • Επηρεάζει τη διαμερισματοποίηση του κυττάρου, καθώς και την αλληλεπίδραση του κυτταροσκελετού με την πλασματική μεμβράνη που οδηγεί σε αναστολή της κυτταρικής κινητικότητας • Αλληλεπιδρά με το DARC στα ενδοθηλιακά κύτταρα και προκαλεί τη γήρανση των καρκινικών κυττάρων
CD81 Προάγει & Πιθανώς Καταστέλλει	• Παχέος εντέρου • Μαστού • Οστεοσάρκωμα • Ήπατος • Αιματολογικές • Προστάτη	• Επιδρά στην έκφραση και λειτουργία των μεταλλοπρωτεϊνών (πχ MMP1) • Προωθεί την κινητικότητα του κυττάρου • Έχει συσχετιστεί τη διαδικασία της επιθήλιο-μεσεγχυματικής μετατροπής (EMT) • Εμπλέκεται στην φυσική και ειδική ανοσία
Πίνακας 1.2: Ρόλος τετρασπανινών στην εξέλιξη του καρκίνου (37).		

Λαμβάνοντας υπόψη τις πλειοτροπικές λειτουργίες των τετρασπανινών που εξυπηρετούνται μέσω αλληλοεπιδράσεων με μόρια της κυτταρικής επιφάνειας, συμπεριλαμβανομένων των μορίων που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό (π.χ. ιντεργκρίνες, μείζων σύστημα ισοσυμβατότητας, υποδοχείς T-λεμφοκυττάρων, κ.α.), δεν είναι παράδοξο το γεγονός ότι η τετρασπανίνες μπορούν να προσαρμόζουν την ανοσιακή απάντηση, είτε εναντίων είτε σε όφελος του όγκου (πίνακας 1,3) (11,28). Για παράδειγμα σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού παρατηρήθηκε ότι η παρουσία της τετρασπανίνης CD9 συσχετίστηκε με καλύτερη επιβίωση ελεύθερης νόσου, αντιθέτως, η παρουσία της CD9 στα καρκινικά κύτταρα έδειξε τα αντίθετα αποτελέσματα (28,81).

Επιπροσθέτως, μελέτες όπου έγινε χρήση πειραματικών μοντέλων με ποντίκια έχουν εντοπίσει σημαντικές ανοσολογικές λειτουργίες των τετρασπανινών σε διαφορετικά υποσύνολα λευκοκυττάρων υποδηλώνοντας ότι μπορεί να εμπλέκονται στην ανοσολογική απόκριση κατά των όγκων (28). Μεταξύ αυτών, υπάρχει ένας αυξανόμενος όγκος στοιχείων που υποδεικνύουν ότι οι τετρασπανίνες έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν τη μετανάστευση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος σε όλο το σώμα (11,82), γεγονός που σημαίνει ότι οι τετρασπανίνες πιθανώς να εμπλέκονται και στην μετανάστευση των λεμφοκυττάρων στο μικρο-περιβάλλον του όγκου (11,28,31,60,82).

Είναι ευρέως γνωστό ότι η αντικαρκινική ανοσία διαμορφώνεται από τους διαφορετικούς τύπους ανοσοκυττάρων που υπάρχουν στο μικρο-περιβάλλον του όγκου (11,28). Συγκεκριμένα, σήματα που υπάρχουν στο μικρο-περιβάλλον (όπως διαλυτοί παράγοντες ή μέσω διακυτταρικής επαφής) καθορίζουν ποια ανοσοκύτταρα ενεργοποιούνται ή αναστέλλονται, και οι τετρασπανίνες οι οποίες είναι γνωστές για την ικανότητά τους να οργανώνουν μόρια εντός της κυτταρικής μεμβράνης επηρεάζουν σημαντικά την μετανάστευση των λευκοκυττάρων (11,28). Τα εξωκυττάρια σήματα τα οποία διεγείρουν την μετανάστευση των κυττάρων πρέπει να μεταδοθούν στον κυτταροσκελετό ώστε να γίνει κυτταροσκελετική αναδιοργάνωση. Οι τετρασπανίνες συμβάλουν στην μετάδοση των σημάτων αυτών μέσω με της επικοινωνία τους με τις Rho-GTPases και άλλες πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού (11). Ανάμεσα στην οικογένεια των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, γνωρίζουμε ότι τα μόρια CD9, CD37, CD63, CD81, CD82, CD151, TSPAN5 και TSPAN17

εμπλέκονται στη διαδικασία μετανάστευσης των κυττάρων του ανοσοποιητικού (82), ωστόσο, και άλλα μόρια τετρασμανινών αξίζει να μελετηθούν για τη δράση τους στη στρατολόγηση των λευκοκυττάρων (11). Για παράδειγμα, ενώ η παρουσία της τετρασπανίνης CD151 στους καρκινικούς ιστούς έχει συσχετιστεί με κακή πρόγνωση, φάνηκε ότι η απουσία της στα T-λεμφοκύτταρα μειώνει την κινητικότητα τους (83).

Εκτός από τη δράση τους στη στρατολόγηση των λεμφοκυττάρων, ορισμένες τετρασπανίνες εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση, τη σηματοδότηση και επακόλουθη ενεργοποίηση των T- και B- λεμφοκυττάρων (11,28,31,84,85). Για παράδειγμα, μια σειρά μελετών δείχνει ότι οι τετρασπανίνες μπορούν να επηρεάσουν την παρουσίαση αντιγόνου δρώντας στα σύμπλοκα του μείζων συστήματος ιστοσυμβατότητας, τα οποία είναι κρίσιμα για την επιτυχή ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων (28,86,87). Συγκεκριμένα, οι τετρασπανίνες CD53, CD81, CD82, CD63 και CD37 έχουν παρατηρηθεί ότι συνδέονται με σύμπλοκα του μείζων συστήματος ιστοσυμβατότητας τάξης II (28,87). Επιπλέον, η τετρασπανίνη CD9 ρυθμίζει την αντιγονο-παρουσίαση των δενδριτικών κυττάρων μέσω ρύθμισης της ενδοκυτταρικής διακίνησης του μείζων συστήματος ιστοσυμβατότητας τάξης II (88).

TSPANs	Έκφραση	Επίδραση σε κύτταρα του ανοσοποιητικού	
CD37	• Β-λεμφοκύτταρα • Τ-λεμφοκύτταρα • Δενδριτικά • Ουδετερόφιλα	↓ ↑	Την έκπτυξη/πολλαπλασιασμό των Τ-λεμφοκυττάρων, την αντιγονοπαρουσίαση διαμέσω του MHC, την παραγωγή αντισωμάτων, την σηματοδότηση μέσω της IL-6 στα Β-λεμφοκύτταρα Την μετανάστευση των δενδριτικών κυττάρων, την επιβίωση των Β-λεμφοκυττάρων.
CD53	• Β-λεμφοκύτταρα	↓ ↑	Την σηματοδότηση των Β-λεμφοκυττάρων μέσω της PKC (protein-kinase C) Την παραγωγή IL-6 & TNFα
Tspan6	• Τ-λεμφοκύτταρα	↓	Την έκπτυξη/πολλαπλασιασμό των Τ-λεμφοκυττάρων
CD9	• Μακροφάγα • Τ-λεμφοκύτταρα • Ουδετερόφιλα • Ενδοθηλιακά	↓ ↑	Την παραγωγή TNFα Την διακίνηση του MHC τάξης II στο κύτταρο
CD81	• NK κύτταρα • Β-λεμφοκύτταρα • Τ-λεμφοκύτταρα • Μακροφάγα • Δενδριτικά • Ενδοθηλιακά	↓ ↑	Την έκπτυξη/πολλαπλασιασμό των Τ-λεμφοκυττάρων, την παραγωγή TNFα Την κινητικότητα των δενδριτικών κυττάρων, την Th2-ανοσοαπάντηση, την οργάνωση των συμπλόκων της ανοσοποιητικής σηματοδότησης, την παραγωγή αντισωμάτων.
CD82	• Δενδριτικά • Τ-λεμφοκύτταρα	↓ ↑	Την μετανάστευση των δενδριτικών κυττάρων Την αντιγονοπαρουσίαση, τη σύζευξη των δενδριτικών κυττάρων
CD151	• Τ-λεμφοκύτταρα • Ουδετερόφιλα • Ενδοθηλιακά	↓	Την έκπτυξη/πολλαπλασιασμό των Τ-λεμφοκυττάρων, την κινητικότητα των Τ-λεμφοκυττάρων, την συνδιέγερση των δενδριτικών κυττάρων
CD63	• Ενδοθηλιακά	↓	Την έκκριση των εξωσωμάτων
Πίνακας 1.3: Βασικές λειτουργίες των τετρασπανινών σε κύτταρα του ανοσοποιητικού (11,28).			

1.5 ο ρόλος των τετρασπανινών CD81 & CD82 στον καρκίνος του παχέος εντέρου.

i) Ο καρκίνος του παχέος εντέρου

Ο κολο-ορθικός καρκίνος είναι από τους συχνότερους καρκίνους παγκοσμίως με περισσότερους από 1,9 εκατομμύρια ασθενείς το 2020 και 935.000 θανάτους. Συνολικά κατατάσσεται 3^{ος} ως προς τη συχνότητα εμφάνισης, αλλά δεύτερος ως προς τη θνησιμότητα και αντιπροσωπεύει περίπου 1 στις 10 περιπτώσεις καρκίνου αλλά και θανάτου από καρκίνο. Η συχνότητα του είναι αυξημένη σε περιοχές με υψηλό κοινωνικό-οικονομικό επίπεδο, όπως η Ευρώπη, η Βόρεια Αμερική, η Αυστραλία, η Νέα Ζηλανδία, η Νορβηγία και η Ουγγαρία. Ως εκ τούτου, ο κολο-ορθικός καρκίνος θεωρείται και δείκτης κοινωνικό-οικονομικής ανάπτυξης, γεγονός που αντικατοπτρίζει την παρουσία παραγόντων κινδύνου που έχουν να κάνουν με τον τρόπο ζωής (89). Τέτοιοι παράγοντες κινδύνου που παρουσιάζουν ανεξάρτητη συσχέτιση με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου είναι η αυξημένη πρόσληψη τροφής ζωικής προέλευσης, ένας πιο καθιστικός τρόπος ζωής, η μειωμένη σωματική δραστηριότητα και το υπερβολικό σωματικό βάρος (89). Παρόλα αυτά τα τελευταία χρόνια παρατηρούμε μία μείωση της επίπτωσης του κολο-ορθικού καρκίνου στις δυτικές χώρες, καθώς επίσης και μείωση της θνησιμότητας. Η μείωση στην επίπτωση και θνησιμότητα του καρκίνου του παχέος εντέρου θεωρείται ότι είναι αποτέλεσμα των πολιτικών πρόληψης και πρώιμης διάγνωσης με τη χρήση τεστ προσυμπτωματικού ελέγχου, καθώς και λόγω της ανάπτυξης νεότερων και πιο αποτελεσματικών θεραπειών (90). Ωστόσο, μελανό σημείο τα τελευταία χρόνια αποτελεί η αύξηση της συχνότητας εμφάνισης καρκίνου παχέος εντέρου στις νεαρότερες ηλικίες. Συγκεκριμένα η ετήσια επίπτωση έχει αυξηθεί κατά 1% στις ηλικίες 50 έως 64 ετών και κατά 2% τους ασθενείς κάτω των 50 ετών (90), ενώ προβλέπεται η επίπτωση του κολο-ορθικού καρκίνου να αυξηθεί κατά 90% με 124% στις ηλικίες 20 έως 34 ετών μέχρι το 2030.

Ο κολο-ορθικός καρκίνος είναι μια ετερογενής ασθένεια. Στην προσπάθεια να χαρακτηριστεί καλύτερα πριν μερικά χρόνια μία διεθνής σύμπραξη επιστημών πρότεινε μία μοριακή ταξινόμηση, όπου ο καρκίνος του παχέος εντέρου χωρίζεται σε τέσσερις μοριακά ξεχωριστές ομάδες (91):

- **CMS1:** χαρακτηρίζεται από μικροδορυφορική αστάθεια (MSI), παρουσία πολλαπλών μεταλλάξεων και ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος (Lynch Syndrome).
- **CMS2:** χαρακτηρίζει τα επιθηλιακά καρκινώματα με χρομοσωμική αστάθεια και εκσεσημασμένη ενεργοποίηση της οδού σηματοδότησης των WNT και MYC.
- **CMS3:** είναι ο μεταβολικός υπότυπος και χαρακτηρίζει τα επιθηλιακά καρκινώματα με εκσεσημασμένη μεταβολική απορρύθμιση.
- **CMS4:** είναι ο μεσεγχυματικός υπότυπος με προεξέχων ενεργοποίηση του TGF- β (transforming growth factor- β) και χαρακτηριστικά την νέο-αγγειογένεση και τη διήθηση του στρώματος (91).

Παρόλα αυτά, η παραπάνω η μοριακή ταξινόμηση δεν έχει αποδεχθεί ακόμη χρήσιμη στην κλινική πράξη.

Στους περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου περιλαμβάνονται το κάπνισμα, η υπερβολική κατανάλωση κόκκινου κρέατος και επεξεργασμένων προϊόντων κρέατος, η κατανάλωση αλκοόλ, ο σακχαρώδης διαβήτης, η παχυσαρκία, ο καθιστικός τρόπος ζωής, απουσία φυσική άσκησης και το μεταβολικό σύνδρομο (92). Επίσης, ασθενείς με φλεγμονώδη νόσου του εντέρου, όπως νόσος Chron ή ελκώδης κολίτιδα παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης κολο-ορθικού καρκίνου (92,93). Εκτός όμως από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου που προαναφέραμε, περίπου το 20% των περιπτώσεων του καρκίνου του παχέος εντέρου σχετίζονται με οικογενή προδιάθεση (94,95). Ασθένειες με γενετική προδιάθεση στον κολο-ορθικό καρκίνο περιλαμβάνουν γνωστά κληρονομικά σύνδρομα όπως:

- Το σύνδρομο Lynch (επίσης γνωστός ως κληρονομικός μη πολυποδιασικός κολο-ορθικός καρκίνος – HNPCC) που σχετίζεται με την παρουσία μικροδορυφορικής αστάθειας. Εμφανίζεται λόγω της παρουσίας γενετικών μεταλλάξεων σε κάποιο από τα MMR (mismatch repair) γονίδια επιδιόρθωσης του DNA (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2). Ασθενείς με μικροδορυφορική αστάθεια παρουσιάζουν μεταλλάξεις και ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού. Στους ασθενείς αυτούς θεραπεία εκλογής είναι η χρήση PDL1 αναστολέων (95,96).

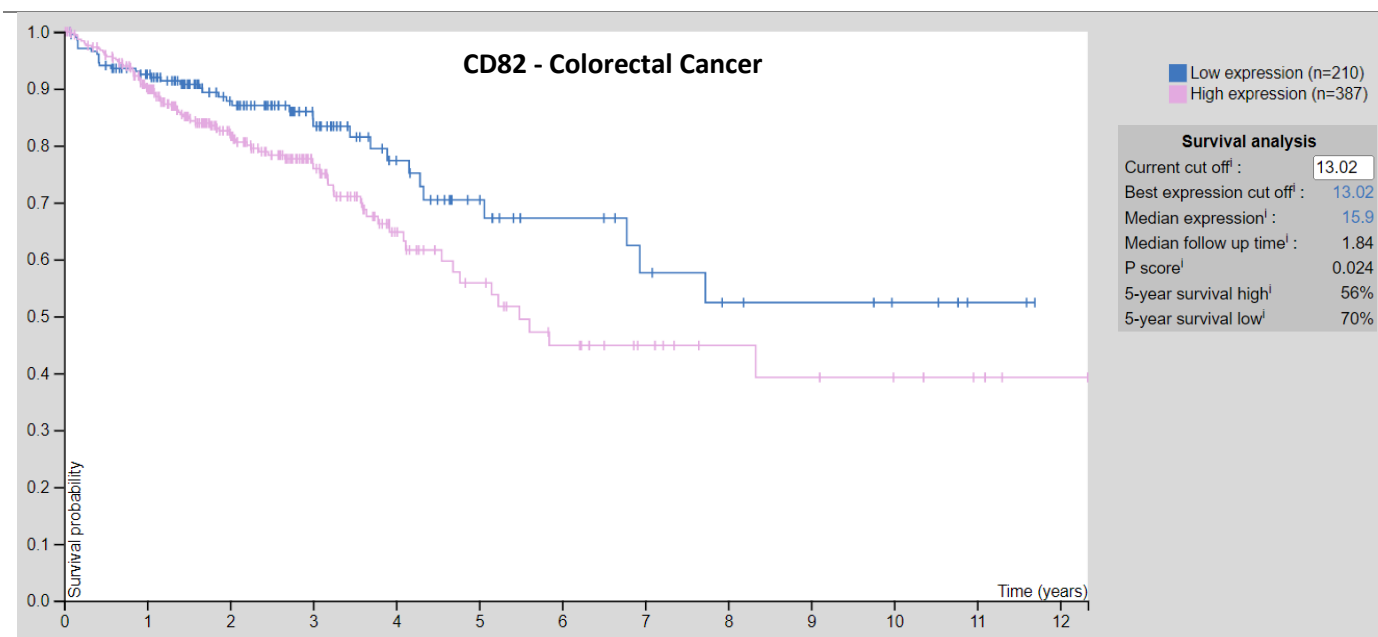
- Την οικογενή πολυποδίαση (familial adenomatous polyposis – FAP) που χαρακτηρίζεται από την παρουσία πολλαπλών αδενωμάτων πολυπόδων (>100) στο παχύ έντερο και οφείλεται σε μεταλλάξεις στο γονίδιο APC (97).
- Το σύνδρομο Gardner: αποτελεί υπότυπο του FAP και οφείλεται σε μεταλλάξεις στο APC.
- Την εξασθενημένη οικογενή πολυποδίαση (attenuated FAP). Χαρακτηρίζεται από μικρότερο αριθμό πολυπόδων (<100) σε σύγκριση με την κλασική FAP.
- Peutz-Jeghers. Χαρακτηρίζεται από αμαρτωματώδεις πολύποδες. Αυξάνει τον ολικό κίνδυνο κατά 39% για την εμφάνιση καρκίνου του παχέος εντέρου. Οφείλετε σε μεταλλάξεις στο γονίδιο του STK11.
- Li-Fraumeni: δεν χαρακτηρίζεται από την παρουσία πολυπόδων. Αυξάνει τον ολικό κίνδυνο κατά 20%. Οι ασθενείς παρουσιάζουν μεταλλάξεις στο γονίδιο του TP53
- Σύνδρομο νεανικής πολυποδίασης: Οφείλετε σε μεταλλάξεις στο SMAD4. Αυξάνει τον κίνδυνο κατά 50%

Ο κολο-ορθικός καρκίνος προέρχεται από τη συσσώρευση μεταλλάξεων στα επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου. Οι μεταλλάξεις μπορεί να είναι κληρονομούμενες, οπότε μιλάμε για σύνδρομα με κληρονομική προδιάθεση στον καρκίνο του παχέος εντέρου, ή να είναι επίκτητες. Από τα γονίδια που συχνότερα διαταράσσονται στον καρκίνο του παχέος εντέρου είναι το APC το οποίο είναι επίσης υπεύθυνο για την εμφάνιση του κληρονομικού συνδρόμου που προαναφέραμε. Το APC λειτουργεί ως ογκο-κατασταλτικό γονίδιο. Απώλεια λειτουργίας του APC έχει ως αποτέλεσμα άρση της αναστολής της β-κατενίνης και ενεργοποίηση της οδού σηματοδότησης του Wnt. Ως αποτέλεσμα η β-κατενίνη μετακινείται στον πυρήνα και ενεργοποιεί την έκφραση πρωτο-ογκογονιδίων, τα οποία είναι φυσιολογικά απαραίτητα για την ανανέωση και διαφοροποίηση των βλαστοκυττάρων, αλλά όταν η έκφραση τους απορυθμίζεται οδηγώντας σε υψηλά επίπεδα στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου μπορούν να προκαλέσουν καρκίνο. Πέρα από μεταλλάξεις στο APC γονίδιο, οι ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου μπορεί να έχουν αυξημένη έκφραση β-κατενίνης λόγω μεταλλάξεων στο γονίδιο της β-κατενίνης που

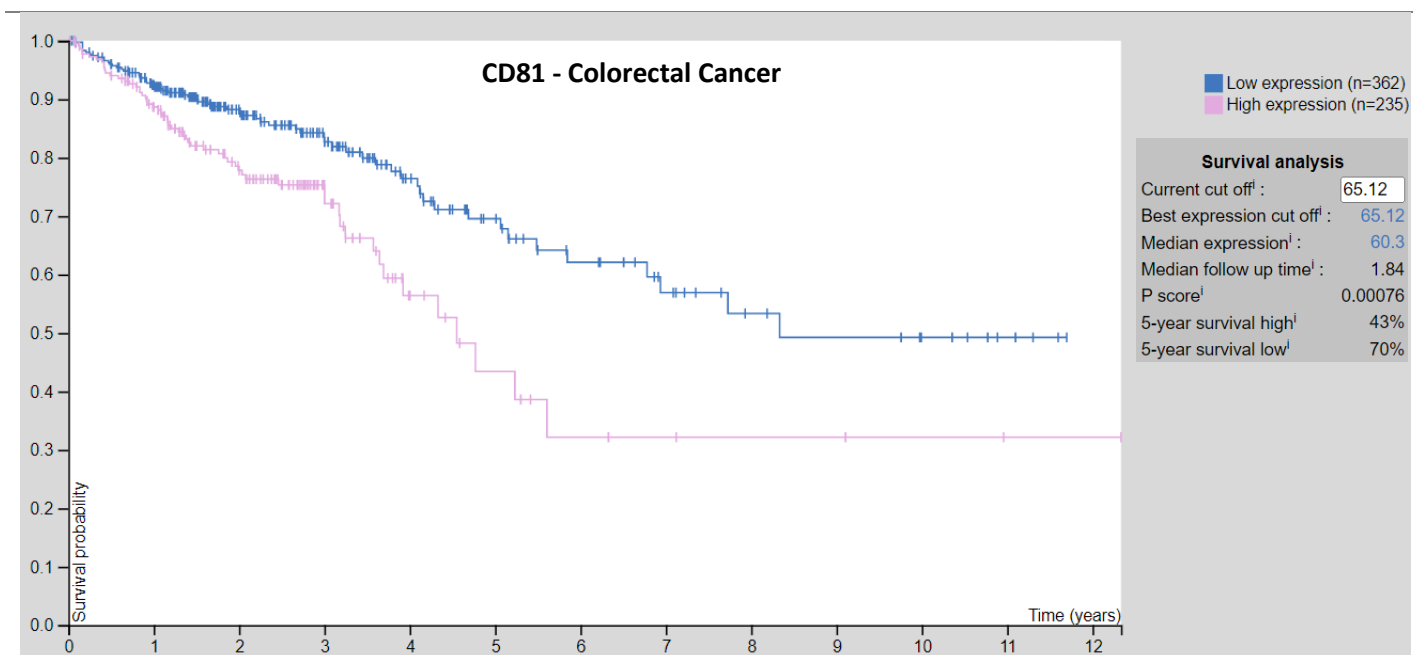
αποτρέπουν την αποδόμηση της εκφραζόμενης πρωτεΐνης (98). Εκτός όμως από μεταλλάξεις που ενεργοποιούν το Wnt μονοπάτι, κατά την πορεία προς την καρκινογένεση εμφανίζονται και άλλες μεταλλάξεις οι οποίες επενεργούν αθροιστικά, όπως μεταλλάξεις στο TP53. Το TP53 είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό είναι ένα από τα αρχικά γεγονότα προς την πορεία στην καρκινογένεση με αποτέλεσμα τα περισσότερα καρκινικά κύτταρα να φέρουν την μετάλλαξη αυτή. Μεταλλάξεις στο TP53 έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της πρωτεΐνης p53 η οποία σε φυσιολογικές συνθήκες παρακολουθεί κυτταρική διαίρεση και προκαλεί προγραμματισμένο θάνατο, ειδικά σε κύτταρα στα οποία έχει απορυθμιστεί η σηματοδότηση του Wnt μονοπατιού (98). Εκτός όμως από τα προαναφερθέντα υπάρχουν αρκετά ακόμη γονίδια που απορυθμίζονται (πχ RAS, BRAF, PI3K, κ.α) και συμβάλουν στην εμφάνιση και εξέλιξη του καρκίνου του παχέος εντέρου. Για πολλά μάλιστα από αυτά σήμερα υπάρχουν θεραπευτικοί στόχοι. Για το λόγο αυτό σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου προτείνεται να γίνεται έλεγχος για: μεταλλάξεις στα RAS (KRAS/NRAS), και BRAF, υπερέκφραση HER2, και NTRK-fusions. Επιπροσθέτως πρέπει να εξετάζεται η παρουσία μικροδορυφορικής αστάθειας, καθώς πέρα από τη διάγνωση του συνδρόμου Lynch, οι ασθενείς με μικροδορυφορική αστάθεια ανταποκρίνονται καλά στην ανοσοθεραπεία, καθώς επίσης και οι ασθενείς με αυξημένο φορτίο μεταλλάξεων (Tumor mutational burden – “TMB”). Η έρευνα συνεχίζεται με σκοπό στο μέλλον να αναγνωριστούν περεταίρω μόρια για τα οποία θα μπορούσαν εν δυνάμει να αποτελούν θεραπευτικούς στόχους

Εκτός όμως από τους προαναφερθέντες μηχανισμούς, υπάρχουν αρκετές μελέτες που υποστηρίζουν τη συμβολή της οικογένειας των τετρασπανινών στην εμφάνιση και εξέλιξη του καρκίνου του παχέος εντέρου. Μεταξύ αυτών φάνηκε ότι οι τετραπανίνες Tspan1, Tspan12 και CD51 παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση στους καρκινικούς ιστούς ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου και μάλιστα η έκφραση τους σχετίζεται αρνητικά με την ολική επιβίωση των ασθενών αυτών (99–101). Επιπλέον, η Tspan12 *in vitro* φάνηκε να ρυθμίζει προ τα πάνω τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και το διηθητικό δυναμικό καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου (101). Αντίστοιχα η Tspan8 μέσω αλληλοεπίδρασης με την E-cadherin εμπλέκεται στη δημιουργία ενός δικτύου σηματοδότησης που προάγει την εξέλιξη του όγκου και τη μετάσταση στον καρκίνο του παχέος εντέρου (102). Αντιθέτως, παρατηρούμε ότι η

έκφραση της τετρασπανίνης CD9 σε βιοπτικό υλικό ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου σχετίζεται με όφελος επιβίωσης των ασθενών αυτών (103). Επιπλέον, γνωρίζουμε ότι υπάρχουν ορισμένες τετρασπανίνες που δρουν προστατευτικά, όπως η CD82 της οποίας η έκφραση μειώνεται ή και χάνεται τελείως στα υψηλότερα στάδια κακοήθειας (103). Υπάρχουν πολλά ακόμη ερωτήματα που πρέπει να απαντηθούν για το ρόλο των τετρασπανινών στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Για παράδειγμα, παρά τον καθιερωμένο ρόλο της CD82 ως αρνητικός ρυθμιστής του καρκίνου, από δεδομένα του TCGA παρατηρούμε ότι στην Kaplan Meier οι ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου και υψηλότερη έκφραση της CD82 εμφανίζονται να έχουν χειρότερη πρόγνωση (εικόνα 1.3), ωστόσο, δεδομένου ότι η διαφορά που προκύπτει δεν είναι στατιστικά σημαντική ($p= 0.024$, statistical significance for log-rank $p < 0.001$) δεν μπορούμε να ισχυριστούμε ότι το CD82 έχει προγνωστική ρόλο σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου με βάση με τα παρόντα δεδομένα γονιδιακής έκφρασης (mRNA) από το TCGA (104,105). Όσον αφορά το CD81, πάλι από δεδομένα του TCGA, παρατηρούμε ότι η γονιδιακή (mRNA) έκφραση του CD81 είναι στατιστικά σημαντικός, αρνητικός προγνωστικός παράγοντας στον καρκίνο του παχέος εντέρου, καθώς ασθενείς με υψηλότερη έκφραση του CD81 εμφανίζονται να έχουν χειρότερη επιβίωση στην Kaplan Meier (εικόνα 1.4), με τη διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική ($p=0.00076$, statistical significance for log-rank $p < 0.001$) (104,106). Ιδανικά, η πρωτεϊνική έκφραση των τετρασπανινών αυτών μέσω ανοσοϊστοχημικής μελέτης βιοπτικών υλικών από ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου θα μπορούσε να δώσει πιο ξεκάθαρες απαντήσεις, τόσο για το ρόλο της CD82 όσο και να επιβεβαιώσει τον προγνωστικό χαρακτήρα της CD81.



Εικόνα 1.3: Επιβίωση ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου βάση της έκφρασης σε επίπεδο mRNA της τετρασπανίνης CD82. Από τη καμπύλη επιβίωσης φαίνεται ότι ασθενείς με υψηλή έκφραση CD82 σε επίπεδο mRNA έχουν χειρότερη πρόγνωση, ωστόσο η διαφορά που προκύπτει δεν είναι στατιστικά σημαντική βάση του ορίου στατιστικής σημαντικότητας ($p < 0.001$) που έχει ορίσει η μελέτη (log-rank $p = 0.024$, όριο στατιστικής σημαντικότητας $p < 0,001$). Πηγή Protein Atlas: (104,105)



Εικόνα 1.4: Επιβίωση ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου βάση της έκφρασης σε επίπεδο mRNA της τετρασπανίνης CD81. Από τη καμπύλη επιβίωσης φαίνεται ότι ασθενείς με υψηλή έκφραση CD81 σε επίπεδο mRNA έχουν χειρότερη πρόγνωση και η διαφορά που προκύπτει είναι στατιστικά σημαντική βάση του ορίου στατιστικής σημαντικότητας ($p < 0.001$) που έχει ορίσει η μελέτη ($\log\text{-rank } p = p = 0.00076$, όριο στατιστικής σημαντικότητας $p < 0,001$). Πηγή Protein Atlas (104,106).

ii) CD82 και καρκίνος

Το μόριο επιφανείας του κυττάρου CD82, επίσης γνωστό ως KAI1 ανήκει στην οικογένεια των τετρασπανινών, θεωρείται ότι λειτουργεί κατασταλτικά στην εξέλιξη του καρκίνου παρακωλύοντας την εμφάνιση μεταστάσεων, χωρίς όμως να επηρεάζει την εξέλιξη του πρωτοπαθή όγκου. Η αντι-μεταστατική δράση της CD82 αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά για στον καρκίνο του προστάτη. Εκτός του καρκίνου του προστάτη έχει παρατηρηθεί ότι η CD82 καταστέλλει την εμφάνιση μεταστάσεων και σε άλλους τύπους καρκίνου όπως το μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα (NSCLC), το μελάνωμα, τον καρκίνο του παγκρέατος, των μαστών, του ήπατος και των ωοθηκών (37,82). Παρόλα αυτά είναι ενδιαφέρον ότι μία συγκεκριμένη παραλλαγή του CD82 (splice variant) όπου λείπει το εξώνιο 7 προάγει αντί να καταστέλλει την διήθηση και εξέλιξη του όγκου (107). Η τετρασπανίνη CD82 εκφράζεται ευρέως σε επιθηλιακούς ιστούς, ωστόσο έχει παρατηρηθεί ότι η έκφραση της μειώνεται με την εξέλιξη της κακοήθειας ή και χάνεται στα υψηλότερα στάδια. Για το λόγο υπάρχει αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της CD82 στους καρκινικούς ιστούς με την πρόγνωση των ασθενών (37).

Στο κυτταρικό επίπεδο η τετρασπανίνη CD82 αναστέλλει την κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων και το διηθητικό τους δυναμικό (37). Σε μοριακό επίπεδο η CD82, διαμέσω αλληλοεπιδράσεων στα TEMs, επηρεάζει τις λειτουργίες μορίων της κυτταρικής επιφάνειας όπως οι ιντεργκρίνες, ο EGFR, η κινάση c-met και uPAR (ο urokinase-type plasminogen activator receptor) που βρίσκονται στα TEMs (37). Συγκεκριμένα, η τετρασπανίνη CD82 εκτός του ότι σχετίζεται με διάφορες ιντεγκρίνες, αλληλοεπιδρά άμεσα και με τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (epidermal growth factor receptor – “EGFR”) και εξασθενεί την σηματοδότηση διαμέσου του EGFR προάγοντας την απευαισθητοποίηση του. Περεταίρω μελέτες στην δράση της τετρασπανίνης CD82 ανέδειξαν ότι ορισμένες αντικαρκινικές ιδιότητες της CD82 μεσολαβούνται μέσω αναστολής της ενεργοποίησης των κινασών c-met και Scr κινασών, καθώς και μέσω καταστολής της έκφρασης της φимπρονεκτίνης, μείωσης της ενζυματικής λειτουργίας της μεταλλοπρωτεϊνάσης-9 (MMP-9) και ενεργοποίησης της b1-ιντεγκρίνης. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι η CD82 αναστέλλει την κινητικότητα μελανοκυττάρων και την εμφάνιση μεταστάσεων διαμέσω καταστολής της έκφρασης των Rho-GTPases και της

μεταλλοπρωτεϊνάση-2 (MMP-2), καθώς και μέσω ρύθμισης του ING4 (Inhibitor of Growth 4) (82). Σε κύτταρα του καρκίνου του πνεύμονα η CD82 καταστέλλει το διηθητικό και μεταστατικό τους δυναμικό συμβάλλοντας στην αδρανοποίηση της MMP-9 καθώς και μέσω υπερέκφρασης του αναστολέα των μεταλλοπρωτεϊνών-1 (TIMP metalloproteinase inhibitor 1 – “TIMP1”) (108).

Πέρα από τη δράση της ως καταστολέας της μετάστασης του όγκου, η CD82 συμμετέχει και στην φυσική ανοσία. Υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ότι η CD82 επηρεάζει τη σηματοδότηση και την ενδοκυττάρια διακίνηση των υποδοχέων TLR3 (Toll-like receptor 3) που υπάρχουν στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα όπως τα δενδριτικά κύτταρα, τα μακροφάγα και τα NK-κύτταρα (Natural Killer cells) (109). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι τα δενδριτικά κύτταρα που δεν εκφράζουν CD82 εμφανίζουν ελαττωματική επεξεργασία του μείζων συστήματος ιστοσυμβατότητας τάξης II, αντιθέτως δενδριτικά κύτταρα που έχουν υψηλή έκφραση της CD82 παρουσιάζουν βελτιωμένη ενεργοποίηση των ανώριμων T-λεμφοκυττάρων (86).

iii) CD81 και καρκίνος

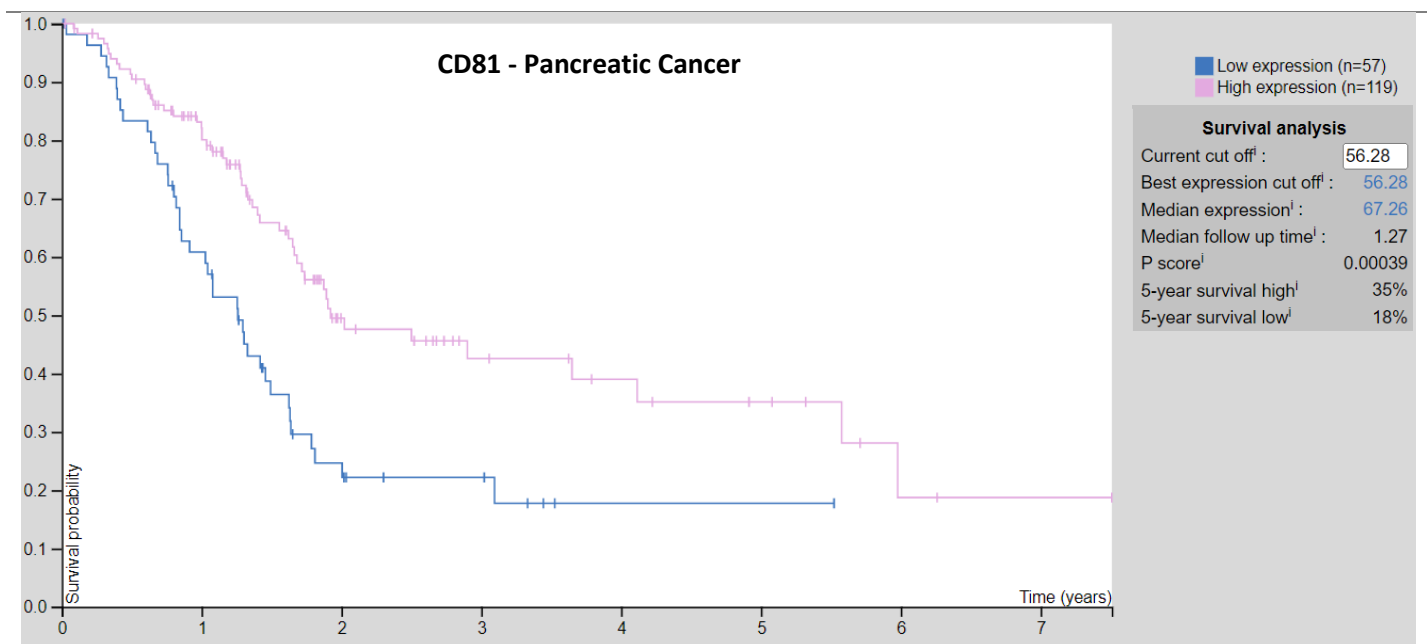
Το μόριο επιφανείας του κυττάρου του συμπλέγματος διαφοροποίησης ανήκει στην οικογένεια των τετρασπανινών και είναι επίσης γνωστός ως Tspan28 (τετρασπανίνη 28) και TAPA-1 (Target of the Antiproliferative Antibody 1), καθώς είχε αρχικά αναγνωριστεί ως στόχος του αντι-πολλαπλασιαστικού αντισώματος TAPA-1 (110–112). Το γονίδιο του CD81 εντοπίζεται στο κοντό άκρο του χρωμοσώματος 11 (11p15.5) και εκφράζει μία πρωτεΐνη μεγέθους 26kDa. Η τετρασπανίνη CD81 εκφράζεται ευρέως σε αιμοποιητικά, ενδοθηλιακά και επιθηλιακά κύτταρα, απουσιάζει όμως στα ουδετερόφιλα και τα αιμοπετάλια. Η τετρασπανίνη CD81 αποτελεί μία γλυκοπρωτεΐνη και είναι γνωστό ότι αλληλοεπιδρά με τις ιντεργκρίνες της κυτταρικής επιφάνειας, μεταξύ των οποίων alpha 4 beta 1 (VLA-4) και alpha L beta 2 (LFA-1), ενώ επίσης εμπλέκεται στη μετάδοση σημάτων στο κύτταρο (110). Αντισώματα έναντι της τετρασπανίνης CD81 μπορούν να ενεργοποιήσουν την ιντεργκρίνη alpha 4 beta 1 (VLA-4) στα B-λεμφοκύτταρα, καθώς και την ιντεργκρίνη alpha L beta 2 (LFA-1) στα θυμοκύτταρα εξαιτίας της αλληλοεπίδρασης της CD81 με τις ιντεργκρίνες αυτές (110).

Η τετρασπανίνη CD81 εκφράζεται ευρέως στους περισσότερους καρκινικούς ιστούς, ωστόσο η λειτουργία της στα κακοήγη κύτταρα και στα κύτταρα του ανοσοποιητικού στο μικρο-περιβάλλον του όγκου δεν έχει μελετηθεί επαρκώς μέχρι σήμερα αν και τα περισσότερα δεδομένα επιδεικνύουν ότι δρα προάγοντας της εξέλιξη του όγκου, παρά καταστέλλοντας τη (111). Επιπλέον, εκτός από το ρόλο της στην εξέλιξη του καρκίνου η τετρασπανίνη έχει ενοχοποιηθεί και σε εμφάνιση αντίστασης στη θεραπεία και συγκεκριμένα σε ασθενείς με καρκίνο τραχήλου της μήτρας που παρουσιάζουν αντίσταση στην πλατίνη (113).

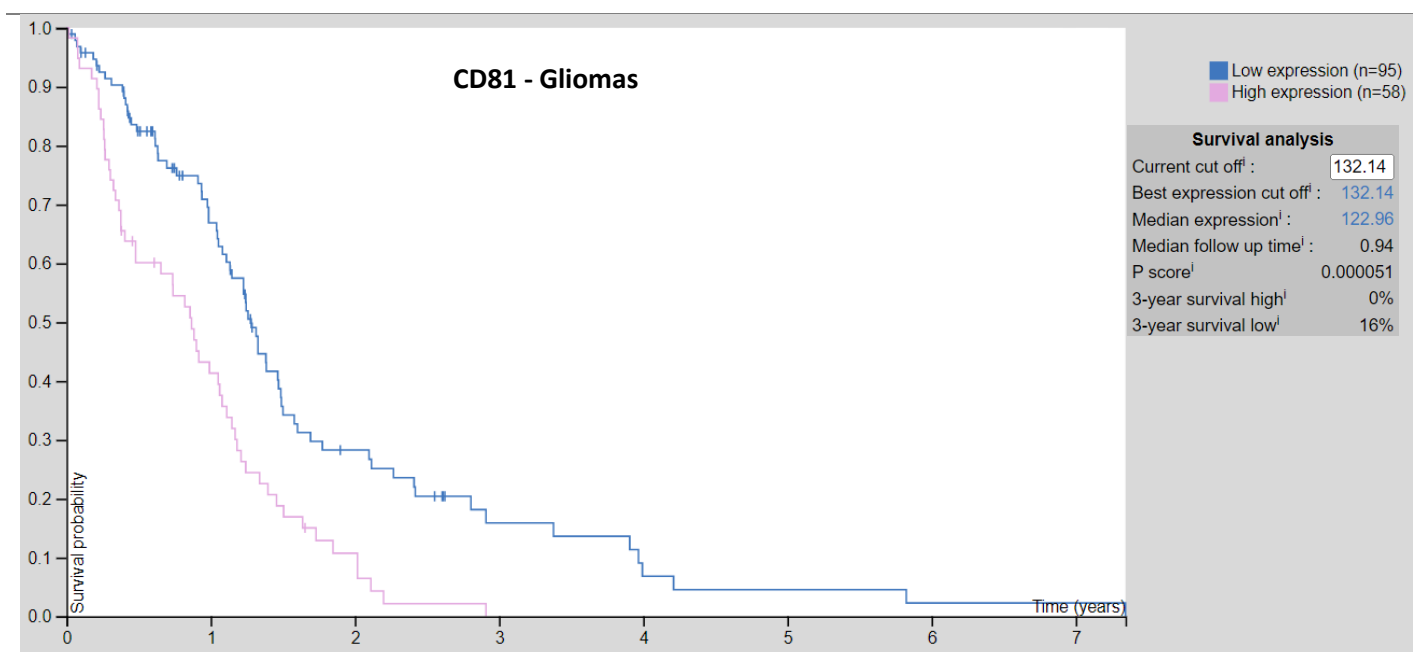
Η τετρασπανίνη CD81 είχε αρχικά ενοχοποιηθεί σε λεμφο-υπερπλαστικές (112) νόσους ωστόσο αργότερα βρέθηκε η ύπαρξη συσχέτισης και με αρκετές συμπαγείς κακοήθειες συμπεριλαμβανομένων του καρκίνου του προστάτη και του καρκίνου του μαστού (114). Μάλιστα, η τετρασπανίνη CD81 έχει συσχετιστεί τη διαδικασία της επιθήλιο-μεσεγχυματικής μετατροπής (EMT), καθώς τα επίπεδα της CD81 πρωτεΐνης αυξάνονται σταδιακά καθώς τα καρκινικά κύτταρα υποβάλλονται σε EMT (114). Αυξημένη έκφραση της τετρασπανίνης CD81 σε βιοψίες καρκίνου του μαστού σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση των ασθενών αυτών, καθώς και αυξημένη κινητικότητα και πολλαπλασιασμό των κυτταρικών σειρών καρκίνου του μαστού MDA-MB-231 και MDA-MB-435S *in vitro* (115). Η αποσιώπηση της τετρασπανίνης CD81 σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού έδειξε μειωμένη ικανότητα μετανάστευσης *in vitro*, ενώ *in vivo* είχε ως αποτέλεσμα μειωμένη ανάπτυξη του πρωτοπαθούς όγκου και μειωμένο αριθμό μεταστάσεων (114). Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα και σε πειραματικά μοντέλα οστεοσαρκώματος όπου η τετρασπανίνη CD81 φαίνεται να συμβάλει στην εξέλιξη των όγκων και την εμφάνιση μεταστάσεων. Η αναστολή της τετρασπανίνης CD81 σε κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος είχε ως αποτέλεσμα την μείωση του πολλαπλασιασμού και της ικανότητας κινητικότητας και διήθησης των καρκινικών κυττάρων *in vitro*. Σε μοριακό επίπεδο η αναστολή της τετρασπανίνης CD81 είχε ως αποτέλεσμα την καταστολή της φωσφορυλίωσης του Akt και Erk, καθώς και την μείωση των επιπέδων έκφρασης των μεταλλοπρωτεϊνών -2 και -9. Επιπλέον, πειραματικά μοντέλα ποντικών με οστεοσάρκωμα στα οποία η τετρασπανίνη CD81 έχει αποσιωπηθεί παρουσίασαν μικρότερους όγκους και μικρότερο αριθμό μεταστάσεων (116). Ομοίως, στα κύτταρα μελανώματος η τετρασπανίνη CD81 μπορεί και προάγει την έκφραση της MMP-1, διαμέσου

ενεργοποίησης του εξαρτώμενου από την Akt Sp1 μονοπατιού, με αποτέλεσμα την αύξηση της κινητικότητας τους, γεγονός που αυξάνει το διηθητικό και μεταστατικό δυναμικό του μελανώματος (117). Στον καρκίνο του προστάτη η έκφραση της τετρασπανίνη CD81 έχει συσχετιστεί με χειρότερη πρόγνωση των ασθενών αυτών. Συγκεκριμένα, μεγαλύτερη έκφραση της τετρασπανίνη CD81 συσχετίστηκε με περισσότερες λεμφαδενικές μεταστάσεις, υψηλότερο στάδιο νόσου κατά TNM και μικρότερη ολική επιβίωση. Επιπρόσθετα, η καταστολή της τετρασπανίνη CD81 σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του προστάτη είχε ως αποτέλεσμα τον μειωμένο πολλαπλασιασμό των κυττάρων όγκου, αναστολή της μετανάστευσης και της εισβολής (114). Στο κεντρικό νευρικό σύστημα φάνηκε ότι η έκφραση της τετρασπανίνη CD81 είναι υψηλότερη στα κακοήγη κύτταρα του γλοιοβλαστώματος σε σύγκριση με τα φυσιολογικά αστροκύτταρα. Επιπλέον, αναστολή της τετρασπανίνη CD81 σε κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος (U251 & U118) μείωσε δραματικά την δυνατότητα μετανάστευσης των κακοήθων κυττάρων, ενώ η πλήρης αποσιώπηση της τετρασπανίνης CD81 προώθησε τη διαδικασία της απόπτωσης στις κυτταρικές σειρές αυτές. Τα αποτελέσματα αυτά επιδεικνύουν ότι η παρουσία της τετρασπανίνης CD81 στα κύτταρα του γλοιοβλαστώματος προάγουν την εξέλιξη του όγκου, ενώ καταστολή της οδηγεί σε μείωση του πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης και διευκολύνει την απόπτωση (118). Αντιθέτως, η έκφραση της τετρασπανίνη CD81 στα T-λεμφοκύτταρα έχει συσχετιστεί με καλύτερη πρόγνωση σε ασθενείς με γλοιοβλάστωμα (119). Επιπροσθέτως, παρά το γεγονός ότι τα περισσότερα δεδομένα ενοχοποιούν την τετρασπανίνη CD81 στην πορεία της εξέλιξης του καρκίνου, υπάρχουν αναφορές ότι μπορεί να έχει ωφέλιμη δράση στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης, όπου η καταστολή της CD81 μέσω shRNAs σε καρκινικές σειρές ουροδόχου κύστης (T24, J82) αύξησε το διηθητικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων *in vitro* (120). Οι παρατηρήσεις αυτές επιβεβαιώνονται και σε άλλη μελέτη όπου φάνηκε ότι ασθενής με μη-μυοδιηθητικό καρκίνο της ουροδόχου κύστης έχουν καλύτερη επιβίωση όσο υψηλότερη είναι η έκφραση της τετρασπανίνης CD81 σε βιοπτικό υλικό (121). Παρομοίως, δεδομένα από TCGA (εικόνα 1.5) δείχνουν ότι η έκφραση της CD81 σε επίπεδο mRNA, αποτελεί θετικό προγνωστικό παράγοντα σε ασθενείς με καρκίνο του παγκρέατος, δηλαδή ασθενείς με υψηλότερη mRNA έκφραση CD81 σε βιοπτικό υλικό από καρκίνο του παγκρέατος παρουσιάζουν

καλύτερη επιβίωση ($p = 0.00039$, statistical significance for log-rank $p < 0.001$) (122). Αντιθέτως, στον καρκίνο του παχέος εντέρου και στα γλοιώματα (εικόνες 1.4 & 1.6), τα TCGA δεδομένα δείχνουν ότι υψηλή mRNA έκφραση της CD81 σχετίζεται με χειρότερη επιβίωση των ασθενών αυτών (104,106,123).



Εικόνα 1.5: Επιβίωση ασθενών με καρκίνο παγκρέατος βάση της έκφρασης σε επίπεδο mRNA της τετρασπανίνης **CD81**. Από τη καμπύλη επιβίωσης φαίνεται ότι ασθενείς με υψηλή έκφραση CD81 σε επίπεδο mRNA έχουν καλύτερη πρόγνωση, με τη διαφορά στο όφελος επιβίωσης που προκύπτει να είναι στατιστικά σημαντική βάση του ορίου στατιστικής σημαντικότητας ($p < 0.001$) που έχει ορίσει η μελέτη (log-rank $p = 0.00039$, όριο στατιστικής σημαντικότητας $p < 0,001$). Πηγή Protein Atlas: (104,122).



Εικόνα 1.6: Επιβίωση ασθενών με γλοιώματα βάση της έκφρασης σε επίπεδο mRNA της τετρασπανίνης CD81. Από τη καμπύλη επιβίωσης φαίνεται ότι ασθενείς με υψηλή έκφραση CD81 σε επίπεδο mRNA έχουν χειρότερη πρόγνωση, με τη διαφορά στην μείωση επιβίωσης που προκύπτει να είναι στατιστικά σημαντική βάση του ορίου στατιστικής σημαντικότητας ($p < 0.001$) που έχει ορίσει η μελέτη ($\log\text{-rank } p = 0.000051$, όριο στατιστικής σημαντικότητας $p < 0,001$). Πηγή Protein Atlas: (104,123).

Πέρα από τη δράση της στα καρκινικά κύτταρα, είναι η δράση της τετρασπανίνης CD81 στο ανοσοποιητικό σύστημα έχει ευρέως τεκμηριωθεί (111). Επηρεάζει για παράδειγμα την φυσική ανοσία καθώς μέσω αλληλεπίδρασης με την GPR56 συμβάλει στην αναστολή της κυτταροτοξικότητας των NK κυττάρων (124). Στα Β-λεμφοκύτταρα η CD81 αλληλοεπιδρά με τα μόρια CD21, CD19 και Leu13 δημιουργώντας ένα σύμπλοκο που μειώνει την ουδό για την ενεργοποίηση των Β κυττάρων μέσω του υποδοχέα Β κυττάρων (110,111). Παρομοίως στα Τ-λεμφοκύτταρα η τετρασπανίνη CD81 αλληλοεπιδρά με τα CD4 και CD8 όπου σε συνδυασμό με το CD3 παρέχει συνδιεγερτικό σήμα. Με τον τρόπο αυτό η CD81 μειώνει την ουδό σηματοδότησης που απαιτείται για την ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων (110). Η τετρασπανίνη CD81 εκτός από τη δράση της στη σηματοδότηση διαμέσου των υποδοχέων των Τ κυττάρων παίζει επίσης ρόλο και στην ωρίμανση των Τ κυττάρων στον θύμο αδένα. Αντισώματα έναντι του CD81

παρεμποδίζουν την ωρίμανση των CD4-CD8-θυμοκυττάρων σε κυτταροκαλλιέργειες, αν και ποντίκια στα οποία αποσιωπήθηκε η έκφραση του CD81 έχουν φυσιολογικούς αριθμούς και υποσύνολα T-λεμφοκυττάρων (110). Ωστόσο, τα ποντίκια αυτά παρουσιάζουν μειωμένες χυμικές ανοσο-αποκρίσεις σε πρωτεϊνικά αντιγόνα (110). Παρομοίως, ασθενείς με γενετική ανεπάρκεια της CD81 παρουσιάζουν ανεπαρκή ενεργοποίηση των B-λεμφοκυττάρων καθώς διαταράσσεται ο σχηματισμός συμπλόκου CD19-CD81, οδηγώντας σε μειωμένα επίπεδα αντισωμάτων παρά τη διέγερση του υποδοχέα αντιγόνων των B-λεμφοκυττάρων (125). Επιπλέον, η CD81 επηρεάζει τις αλληλοεπιδράσεις μεταξύ των B- και T-λεμφοκυττάρων, καθώς έχει φανεί ότι αντισώματα έναντι της CD81 προκαλούν αύξηση της σύνθεσης στα T-λεμφοκύτταρα της ιντερλευκίνης 4 (IL-4), η οποία προκαλεί τη διαφοροποίηση των ανώριμων βοηθητικών T-λεμφοκυττάρων, σε ανταπόκριση στην παρουσίαση αντιγόνων από τα B-λεμφοκύτταρα (110). Υπάρχουν επίσης προκλινικά δεδομένα σε πειραματικά μοντέλα ποντικών που υποστηρίζουν ότι η τετρασπανίνη CD81 επηρεάζει την ανοσοκατασταλτική δράση των T-ρυθμιστικών κυττάρων (Tregs) και των MDSC (Myeloid-Derived Suppressor Cells) στο μικρο-περιβάλλον του όγκου (126). Συγκεκριμένα Tregs με αποσιώπηση της τετρασπανίνης CD81 δεν μπορούσαν να προκαλέσουν επαρκή καταστολή των CD4- και CD8 T-λεμφοκυττάρων όταν αυτά ήταν παρόντα στο μικρο-περιβάλλον του όγκου, με αποτέλεσμα μικρότερη ανάπτυξη του όγκου και λιγότερο αριθμό μεταστάσεων (126).

1.6 Σκοπός της παρούσας μελέτης

Οι τετρασπανίνες συγκαταλέγονται στα μόρια της κυτταρικής επιφάνειας του συμπλέγματος διαφοροποίησης και είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που διαπερνούν τη μεμβράνη του κυττάρου με 4 α-έλικες. Μεταξύ των τετρασπανινών συγκαταλέγονται οι CD81, CD82. Οι πρωτεΐνες αυτές συνδυάζονται μεταξύ τους, καθώς και με μία σειρά άλλων διαμεμβρανικών και κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών για να σχηματίσουν τις μεμβρανικές μικροεπικράτειες (μικροπεριοχές μοριακών συμπλεγμάτων εμπλουτισμένων με τετρασπανίνες (Tetraspanin Enriched Microdomains-TERMs or TEMs). Αυτά τα πρωτεϊνικά συμπλέγματα αναφέρονται επίσης στη βιβλιογραφία ως δίκτυα τετρασπανινών (tetraspanin webs). Εξ ορισμού, ένα βασικό χαρακτηριστικό των τετρασπανινών είναι να οργανώνουν συγκεκριμένους υποδοχείς και πρωτεΐνες σηματοδότησης σε μεμβρανικές μικροεπικράτειες (microdomains) στην επιφάνεια των κυττάρων.

Οι τετρασπανίνες εμπλέκονται σε θεμελιώδεις κυτταρικές διεργασίες, όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η διείσδυση και η μετάσταση των κυττάρων και όταν απορυθμίζονται οι τετρασπανίνες εμπλέκονται στην παθογένεση των νεοπλασμάτων (70). Επίσης οι μοριακές πορείες στις οποίες εμπλέκονται οι τετρασπανίνες ελέγχουν την ενεργοποίηση, τον πολλαπλασιασμό, την ωρίμανση και την στόχευση διάφορων κυττάρων-τελεστών του ανοσοποιητικού συστήματος σε καρκινικούς ιστούς διά μέσου της αλληλεπίδρασης τους με σημαντικούς υποδοχείς των λευκοκυττάρων, ωστόσο ο ακριβής μηχανισμός δράσης τους δεν είναι πλήρως κατανοητός.

Παρόλο που αρκετές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην αποκρυπτογράφηση της λειτουργίας των τετρασπανινών στα καρκινικά κύτταρα και υπάρχουν σαφείς ενδείξεις για την εμπλοκή τους στην εξέλιξη του όγκου και την μετάσταση, αρκετά ερωτήματα για τη δράση τους σε διαφορετικούς καρκινικούς ιστούς παραμένουν ακόμη αναπάντητα. Επιπλέον, αρκετές μελέτες έχουν εντοπίσει σημαντικές ανοσολογικές λειτουργίες των τετρασπανινών σε διαφορετικά υποσύνολα λευκοκυττάρων, υποδεικνύοντας ότι ενδέχεται να εμπλέκονται στην ανοσολογική απόκριση κατά του καρκίνου (28,86,88,125,127), ωστόσο η επίδραση τους στα ανοσοκύτταρα και στην αντικαρκινική-ανοσιακή απάντηση παραμένει ανεπαρκώς μελετημένη (28,35,70). Οι τετρασπανίνες CD81 και CD82 εκφράζονται ευρέως σε

καρκινικούς ιστούς. Γνωρίζουμε από άλλες μελέτες ότι η CD82 αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή της εξέλιξης του όγκου, όμως από δεδομένα TCGA σε επίπεδο mRNA ο προγνωστικός της ρόλος δεν είναι ξεκάθαρος στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Επιπροσθέτως, η τετρασπανίνη CD81 φαίνεται να αποτελεί αρνητικό προγνωστικό παράγοντα στον καρκίνο του παχέος εντέρου βάση των δεδομένων του TCGA σε επίπεδο mRNA. Ωστόσο, η CD81 φαίνεται να δρά τόσο προάγοντας όσο και καταστέλλοντας την εξέλιξη του όγκου σε διαφορετικές κακοήθειες και ο ρόλος της δεν έχει αποσαφηνιστεί στον καρκίνο του παχέος εντέρου.

Στην πρότασή μας, θα μελετήσουμε τη λειτουργική επίδραση επιλεγμένων CD/TSPAN τόσο στα καρκινικά όσο και στα ανοσοποιητικά κύτταρα στο TME, θα εξετάσουμε τα προφίλ έκφρασής τους, θα παρατηρήσουμε τις αλληλεπιδράσεις τους με τα λεμφοκύτταρα που διηθούν τον όγκο (Tumor Infiltrating Lymphocytes – “TILs”) και θα ανακαλύψουμε το ρόλο που παίζουν τα μόρια αυτά στην εξέλιξη του καρκίνου με απώτερο σκοπό την ανακάλυψη νέων, ενεργών στόχων. Συγκεκριμένα θα μελετήσουμε της έκφραση των μορίων CD/τετρασπανίνης CD81 και CD82 με ανοσοϊστοχημεία (IHC) σε καρκινικούς ιστούς ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου, με σκοπό να διερευνηθεί η προγνωστική τους σημασία και οι τυχόν αλληλεπιδράσεις των τετρασπανινών αυτών με το ανοσοποιητικό σύστημα στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Επιπλέον, θα διερευνηθεί ο ρόλος και ο μηχανισμός δράσης της τετρασπανίνης CD81 στην διαδικασία της καρκινογένεσης *in vitro*, ως πιθανός προαγωγέας ή καταστολέας της ανάπτυξης και εξέλιξης του καρκίνου του παχέος εντέρου. Συνολικά, η παρούσα μελέτη θα μας επιτρέψει να εκτιμήσουμε την προγνωστική αξία των τετρασπανινών CD81 και CD82 και τη συμβολή τους στο ανοσοποιητικό σύστημα στο μικροπεριβάλλον του καρκίνου του παχέος εντέρου, καθώς και να προσδιορίσουμε το μηχανισμό δράσης της τετρασπανίνης CD81 στα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου.

2. Μεθοδολογία

2.1 Ανοσοϊστοχημική μελέτη των μορίων CD81 και CD82 σε ιστολογικό υλικό ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου

i) Μελέτη των μορίων CD81 και CD82 σε καρκινικά κύτταρα από ιστολογικό υλικό ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να διερευνηθεί η έκφραση των μορίων CD/τετρασπανινών CD81 & CD82, με ανοσοϊστοχημεία, σε καρκινικό ιστό μονιμοποιημένο με φορμαλδεϋδη-παραφίνη (FFPE) ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου σταδίων I έως IV ώστε να εντοπίσουμε τυχόν συσχετίσεις με κλινικο-εργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών και να εκτιμηθεί η προγνωστική τους αξία.

Θα μελετήσουμε με ανοσοϊστοχημεία την έκφραση των τετρασπανινών CD81 & CD82 στα καρκινικά κύτταρα από το μονιμοποιημένο (FFPE) ιστό. Η έκφραση των εν λόγω τετρασπανινών θα μελετηθεί επίσης και στα κύτταρα του ανοσοποιητικού που διηθούν το μικρο-περιβάλλον του όγκου. Εκτός από τις τετρασπανίνες CD81 & CD82 θα εξετάσουμε και την έκφραση των δεικτών PD1 και PDL1 τόσο στα καρκινικά κύτταρα όσο και στα κύτταρα του ανοσοποιητικού που βρίσκονται στο μικροπεριβάλλον τους όγκου.

Η έκφραση των τετρασπανινών CD81 & CD82 στα καρκινικά κύτταρα ποσοτικοποιήθηκε τόσο ως προς το ποσοστό των θετικά κεχρωσμένων κυττάρων, την ένταση του σήματος (0: απύσχα, 1: ελάχιστη, 2: μέτρια, 4: έντονη), αλλά και με τη χρήση του H-score που αποτελεί το άθροισμα των ποσοστών των θετικά κεχρωσμένων κυττάρων βάσει της έντασης του σήματος ($H\text{-index} = \text{intensity} * \text{percentage}$). Για τη μέτρηση της έκφρασης των δεικτών PD1 & PDL1 ως μέτρο σύγκρισης χρησιμοποιήθηκε μόνο το ποσοστό των θετικά κεχρωσμένων κυττάρων.

ii) Μελέτη των κυττάρων του ανοσοποιητικού που διηθούν τον όγκο σε ιστολογικό υλικό ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου.

Εκτός από τη μελέτη έκφρασης των τετρασπανινών CD81 & CD82 στους καρκινικούς ιστούς ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου θα εξετάσουμε το ποσοστό διήθησης και τον τύπο των κυττάρων-τελεστών του ανοσοποιητικού συστήματος που στρατολογούνται στη θέση του όγκου. Σκοπός μας είναι να διερευνήσουμε πιθανές συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης των τετρασπανινών CD81 & CD82 στα καρκινικά κύτταρα με τα κύτταρα του ανοσοποιητικού που διηθούν το μικρο-περιβάλλον του όγκου. Επιπλέον, θα εξετάσουμε την έκφραση των εν λόγω τετρασπανινών στα διηθούμενα λεμφοκύτταρα (Tumor Infiltrating Lymphocytes – TILs). Συνολικά, επιζητούμε να διερευνήσουμε κατά πόσο η έκφραση των μορίων CD81 και CD82 σε καρκινικά κύτταρα, καθώς επίσης και σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος επηρεάζουν το ανοσολογικό μικροπεριβάλλον του όγκου.

Το ποσοστό διήθησης και ο τύπος των κυττάρων-τελεστών του ανοσοποιητικού συστήματος θα πραγματοποιηθεί με ανοσοϊστοχημεία, με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων για τα αντιγόνα CD προς διερεύνηση (CD8, CD3) ώστε να ταυτοποιηθούν οι συγκεκριμένοι τύποι κυττάρων-τελεστών (κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα και ολικά T-λεμφοκύτταρα αντίστοιχα) του ανοσοποιητικού συστήματος. Το ποσοστό διήθησης των CD3(+) και CD8(+) λεμφοκυττάρων θα εκτιμηθεί ξεχωριστά για το στρώμα του όγκου (stomal) όσο και ενδο-ογκικά (intratumoral).

Επιπλέον, θα μελετήσουμε την έκφραση των CD81 & CD82 στα λεμφοκύτταρα με σκοπό να χαρακτηρίσουμε το ρόλο των εν λόγω μορίων (προ- ή αντι-μεταστατικό) στα κύτταρα αυτά καθώς και στην ανάπτυξη και την εξέλιξη του καρκίνου. Για τη μέτρηση των CD8 και CD3 T-λεμφοκυττάρων, καθώς και για τη μέτρηση των κυττάρων του ανοσοποιητικού που εκφράζουν τις τετρασπανίνες CD81 & CD82 χρησιμοποιήσαμε το ποσοστό των θετικά κεχρωσμένων κυττάρων ως μέτρο σύγκρισης.

iii) Τεχνικές λεπτομέρειες

Το ιστολογικό υλικό των ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου συγκεντρώθηκε από το εργαστήριο Μοριακής Ογκολογίας του ΕΛΙΕΚ στη Θεσσαλονίκη σε συνεργασία με την Ελληνική Συνεργαζόμενη Ογκολογική Ομάδα (ΕΣΟΟ). Αφορά ιστολογικό υλικό που είναι σε μορφή tissue microarrays (TMAs) και απαρτίζεται από >75 περιστατικά σταδίου I-II-III και >75 περιστατικά σταδίου IV (πρωτοπαθής όγκος ή μεταστάσεις). Η ποσοτικοποίηση των TILs των ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου σταδίου IV καθώς και η μελέτη της έκφρασης των τετρασπανινών για όλα τα δείγματα πραγματοποιήθηκε στο Παθολογοανατομικό Τμήμα του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Τα κλινικά δεδομένα των ασθενών δόθηκαν από την ΕΣΟΟ.

Οι ανοσοϊστοχημικές μελέτες θα διεξαχθούν βάσει της προβλεπόμενης μεθοδολογίας με την χρήση των επιλεγμένων αντισωμάτων. Συγκεκριμένα, η ανοσοϊστοχημική χρώση θα εφαρμοστεί σε τομές ιστού TMA χρησιμοποιώντας ένα πρωτογενές αντίσωμα στο υπό διερεύνηση μόριο (π.χ. τετρασπανίνη CD82, τετρασπανίνη CD81, CD3, CD8, PD1, PDL1). Η έκφραση των υπό διερεύνηση μορίων θα εκτιμηθεί ως ποσοστό θετικών χρωματισμένων κυττάρων. Για τις τετρασπανίνες CD81 και CD82 θα καταγραφεί επίσης και η ένταση χρώσης, επιτρέποντάς μας έτσι να υπολογίσουμε το H-score (άθροισμα του ποσοστού (%) των κεκρωσμένων κυττάρων ανά διαβάθμιση έντασης χρώσης). Η έκφραση των μορίων CD/Tetraspanin θα εξεταστεί τόσο σε κύτταρα όγκου όσο και στα λεμφοκύτταρα που διηθούν τον όγκο. Στον πίνακα 2.4 αναγράφεται η λίστα των αντισωμάτων που χρησιμοποιήσαμε στο σύνολο των πειραμάτων τόσο για την ανοσοϊστοχημική μελέτη στους καρκινικούς ιστούς, όσο και για τα ανοσο-αποτυπώματα κατά Western από εκχυλίσματα πρωτεϊνών καρκινικών κυτταρικών σειρών. Η διαδικασία επισήμανσης των ιστών με τα αντισώματα για τους αντίστοιχους δείκτες έγινε στο αυτόματο μηχάνημα ανοσοϊστοχημείας Cenchmark XT της Roche, χρησιμοποιώντας το Iview DAB Detection kit της Ventana.

Τα σχετικά κλινικά, εργαστηριακά και μοριακά δεδομένα των ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου σταδίων I, II, III, IV, τα εξήγαμε από τα αρχεία των ασθενών και θα αποθηκευτούν σε φύλλα εργασίας Excel. Τα εν λόγω κλινικο-εργαστηριακά δεδομένα θα χρησιμοποιηθούν στη στατιστική διερεύνηση των διαφόρων συσχετίσεων και στην ανάλυση της προγνωστικής και προβλεπτικής αξίας με τις

παραμέτρους από τις μελέτες ανοσοϊστοχημείας. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών που θα καταγραφούν σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημικής ανάλυσης είναι:

a) το στάδιο νόσου κατά TNM, b) ο βαθμός διαφοροποίησης του όγκου, c) η εντόπιση της πρωτοπαθούς νόσου (δεξιό κόλον, αριστερό κόλον, ορθό), d) η γενική κατάσταση του ασθενούς (performance status) κατά ECOG, e) το τύπος της χημειοθεραπείας που χρησιμοποιήθηκε (συνδυασμός με oxaliplatin ή irinotecan), f) η παρουσία μικροδορυφορικής αστάθειας μέσω ανίχνευσης των MMR (mis-match repair) πρωτεϊνών, g) την παρουσία μεταλλάξεων σε K/NRAS ή/ και BRAF, h) ο αριθμός των αιμοπεταλίων, i) τα επίπεδα της LDH, j) τα επίπεδα των καρκινικών δεικτών CEA ή και CA 19-9 και τα ανοσοϊστοχημικά δεδομένα, k) έκφραση CD81 στα καρκινικά κύτταρα, l) έκφραση CD81 στα λεμφοκύτταρα, m) έκφραση PD1 στα καρκινικά κύτταρα, n) έκφραση PD1 στα λεμφοκύτταρα, o) έκφραση PDL1 στα καρκινικά κύτταρα, p) έκφραση PDL1 στα λεμφοκύτταρα, q) ποσοστό διήθησης CD3(+) λεμφοκυττάρων, r) ποσοστό διήθησης CD8(+) λεμφοκυττάρων, s) όρια εκτομής (R0/1/2).

Όλα τα δεδομένα θα αποθηκεύονται, θα χειρίζονται και θα αναλύονται με τρόπο συμβατό με το GCPR.

iv) Σκοπός της ανοσοϊστοχημικής μελέτης των καρκινικών ιστών ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου είναι:

- Να διαλευκανθεί ο βαθμός έκφρασης των τετρασπανινών CD81 και CD82 σε ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου και να μελετηθεί η συσχέτιση τους με τα κλινικά και εργαστηριακά στοιχεία των ασθενών (στάδιο νόσου, πρόγνωση, επιβίωση, κ.α). Με την ανάλυση αυτή επιζητούμε να διερευνήσουμε την προγνωστική αξία των παραπάνω τετρασπανινών και να προσδιορίσουμε τον ρόλο τους είτε ως προαγωγείς είτε ως καταστολείς του καρκίνου του παχέος εντέρου, ώστε να σχεδιαστούν στη συνέχεια οι κατάλληλες πειραματικές διαδικασίες για να διερευνηθεί η λειτουργία τους σε μοριακό επίπεδο.

- Να διαλευκανθούν οι τυχόν συσχετίσεις της έκφρασης των τετρασπανινών CD81 και CD82 με την παρουσία των TILs, καθώς και η σχέση τους με τα κλινικά δεδομένα των ασθενών.

2.2 Μελέτη της τετρασπανίνης CD81 *in vitro* σε κυτταρικές σειρές από καρκίνο του παχέος εντέρου.

Θα χειριστούμε την έκφραση του CD81 σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου χρησιμοποιώντας φορείς που βασίζονται σε ρετροϊούς και θα διερευνήσουμε τις επιπτώσεις τους στην ανάπτυξη, την κινητικότητα και την ικανότητα δημιουργίας αποικιών ανεξάρτητα προσκόλλησης (anchorage independent growth) *in vitro*. Επίσης θα διερευνήσουμε εάν η τροποποίηση του CD81 στα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου επηρεάζει τον κυτταρικό κύκλο και αν η έκφραση της τετρασπανίνης αυτή εξαρτάται από τη σηματοδότηση του NF-κΒ. Για την εξάλειψη του CD81 θα χρησιμοποιήσουμε πολλαπλά shRNA που στοχεύουν το ίδιο CD/TSpan μόριο και θα επιλέξουμε τα καλύτερα knockdowns για να αξιολογήσουμε την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων *in vitro* έναντι των κατάλληλων κυττάρων ελέγχου φορέα. Η έκφραση του CD81 στο τροποποιημένο κύτταρο θα διερευνηθεί με ανοσοσύτρωση κατά Western καθώς και RT-qPCR. Τα πειράματα αυτά θα διεξαχθούν στο Εργαστήριο Βιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

2.2.1 Παραγωγή Πλασμιδίων από Επιδεκτικά Βακτήρια

i) Παρασκευή L- broth και και τρυβλίων L-άγαρ με αντιβιοτικό

Η παρασκευή των τρυβλίων L-άγαρ έγινε παράλληλα με την παρασκευή διαλύματος LBroth. 10 g θρυπτόνης (Bacteriological thryptone), 5 g εκχυλίσματος ζύμης (yeast extract powder) και 10 g χλωριούχου νατρίου (LAB M), διαλύθηκαν με ανάδευση σε 1 L δις απεσταγμένου νερού και το διάλυμα μεταβιβάστηκε σε 2 φιάλες των 500 ml. Στη μια φιάλη προστέθηκαν 7.5 g άγαρ και αφού έγινε αποστείρωση σε αυτόκαυστο, η φιάλη αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για να κατέβει η θερμοκρασία στους 55oC, προστέθηκε αμπικιλίνη (100 µg/ml), το υλικό μοιράστηκε σε 20 τρυβλία και αφέθηκε να πολυμεριστεί σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, τα τρυβλία αποθηκεύτηκαν στους 4oC για περαιτέρω χρήση. 100 mg/ml Αμπικιλίνης: Σκόνη αμπικιλίνης διαλύθηκε σε κατάλληλη ποσότητα

αποστειρωμένου ddH₂O, φιλτραρίστηκε μέσω ενός αποστειρωμένου μικροφίλτρου 0.2 μm και διατηρήθηκε στους -20°C σε μικρές ποσότητες (aliquots).

ii) Παρασκευή Επιδεκτικών Βακτηρίων

Για την παραγωγή των πλασμιδίων χρησιμοποιήθηκαν επιδεκτικά βακτήρια τα οποία είναι ικανά να δεχθούν ξένο DNA με παθητική διάχυση μέσω πόρων στο κυτταρικό τους τοίχωμα. Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή ήταν το στέλεχος *E. Coli*. Η δημιουργία επιδεκτικών βακτηρίων, απαιτεί την κατεργασία τους με παράγοντες που σχηματίζουν πόρους στο κυτταρικό τους τοίχωμα, επιτρέποντας έτσι την εισαγωγή με παθητική διάχυση του εξωγενώς προστιθέμενου DNA. Το πρώτο πρωτόκολλο για τεχνητό μετασχηματισμό των *E. Coli* δημοσιεύθηκε για πρώτη φορά το 1970 (128) και περιλαμβάνει την επεξεργασία των βακτηρίων με ασβέστιο και σύντομη έκθεση σε υψηλή θερμοκρασία, γνωστή επίσης ως θερμικό σοκ (heat shock). Αυτή η μέθοδος είναι επίσης γνωστή και ως χημικός μετασχηματισμός των βακτηρίων και βελτιστοποιήθηκε το 1983 (129).

Αρχικά, μη επιδεκτικά βακτήρια *E. Coli* 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 cm², όπου επωάστηκαν για 2-3 ώρες στους 37°C, μέχρι η OD₆₀₀ να φτάσει 0.5. Έπειτα, η καλλιέργεια μοιράστηκε σε 2 σωλήνες των 15 ml και φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά σε 3000Xg στους 4°C. Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 4 ml διαλύματος χλωριούχου ασβεστίου (CaCl₂) (Διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου (CaCl₂): 60 mM CaCl₂, 15% γλυκερόλη, 10 mM PIPES pH 7.0) και φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά σε 2000Xg στους 4°C. Το ίζημα επαναιωρήθηκε με άλλα 4 ml CaCl₂ και 27 επωάστηκε για 30 λεπτά στον πάγο. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 7 λεπτά στις 2500 στροφές και τους 4°C. Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 1.5 ml CaCl₂ και δείγματα των 100 μl βακτηρίων τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένους σωλήνες errendorff και αποθηκεύτηκαν στους -80°C για μελλοντική χρήση.

iii) Μετασχηματισμός βακτηρίων με πλασμιδιακό DNA

100 μ l επιδεκτικών βακτηρίων από το στέλεχος Stable 3 του E.coli, αναμείχθηκαν με πλασμιδιακό DNA (50-200 ng) σε σωλήνα erppendorf και επωάστηκαν για 10 λεπτά στον πάγο. Εν συνεχεία, τα βακτήρια επιστρώθηκαν πάνω στα τρυβλία L-άγαρ, που περιείχαν 100 μ g/ml αμπικιλίνη σε στείρες συνθήκες και αφέθηκαν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, τοποθετήθηκαν ανάποδα σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C ολονύκτια για να αναπτυχθούν αποικίες βακτηρίων.

Τα τρυβλία L-αγαρ στα οποία έχουν αναπτυχθεί αποικίες βακτηρίων μπορούν να αποθηκευτούν προσωρινά στο cold room (4 °C). Στη συνέχεια μπορούμε να επιλέξουμε αποικίες βακτηρίων με στείλεο τις οποίες θα αναπτύξουμε ξεχωριστά σε υγρή βακτηριακή καλλιέργεια με σκοπό την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA. Για την αρχική ανάπτυξη των μετασχηματισμένων βακτηρίων 4 ml L-Broth με 100 μ g/ml αμπικιλίνης εμβολιάστηκαν με μοναδικές αποικίες (ή αποθέματα γλυκερόλης βακτηρίων), με τη χρήση κρικοφόρου στυλεού και επωάστηκαν σε θερμαινόμενο τροχιακό αναδευτήρα (orbital shaker) στους 37°C για όλη τη νύχτα (>16 ώρες). Αφού αναπτυχθούν τα μετασχηματισμένα βακτήρια σε υγρή αποικία και βεβαιωθούμε ότι φέρουν το πλασμιδιακό DNA που μας ενδιαφέρει μπορούμε να αποθηκεύσουμε τα επιλεγμένα βακτήρια στους -80 °C σε διάλυμα γλυκερόλης. Για το σκοπό αυτό 1200 μ l καλλιέργειας βακτηρίων στα οποία αναπτύχθηκαν τα μετασχηματισμένα βακτήρια, και τα οποία επιλέξαμε από μοναδική αποικία (από στα τρυβλία L-άγαρ), αναμιγνύονται με 300 μ l γλυκερόλης (τελική συγκέντρωση γλυκερόλης 10%). Τα βακτήρια αυτά μπορούμε να τα διατηρήσουμε στους -80 °C για περαιτέρω χρήση.

iv) Ανάπτυξη μετασχηματισμένων βακτηρίων σε υγρές καλλιέργειες και απομόνωση πλασμιδιακού DNA (mini-prep & midi-prep)

Για να βεβαιωθούμε τα βακτήρια που επιλέξαμε (από την βακτηριακή αποικία στο τρυβλίο L-αγαρ) φέρουν το πλασμιδιακό DNA που μας ενδιαφέρει πρέπει να προχωρήσουμε σε απομόνωση του βακτηριακού DNA μικρής κλίμακας (mini-prep). Όπως αναφέραμε παραπάνω, αρχικώς επιλέξαμε μία μοναδική αποικία από τα μετασχηματισμένα βακτήρια που αναπτύχθηκαν στο τρυβλίο L-άγαρ για να την αναπτύξουμε σε υγρή καλλιέργεια με 4 ml L-broth. Συγκεκριμένα, για να αυξήσουμε

τις πιθανότητες να έχουμε επιλέξει βακτήρια που πράγματι έχουν μετασχηματιστεί και φέρουν το πλασμιδικό DNA, επιλέξαμε αρχικώς περισσότερες βακτηριακές αποικίες (>4) τις οποίες αναπτύξαμε ξεχωριστά σε υγρή καλλιέργεια με 4 ml L-broth, σε θερμαινόμενο τροχιακό αναδευτήρα (orbital shaker) στους 37°C για όλη τη νύχτα (>16 ώρες).

Mini-Prep: Ακολουθώντας, για την απομόνωση πλασμιδικού DNA μικρής κλίμακας μεταφέραμε 1,5ml από τις υγρές καλλιέργειες όπου αναπτύξαμε τα μετασχηματισμένα βακτήρια σε erppendorf και φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά, στις 6500 στροφές, στους 4 °C. Μετά την απόρριψη του υπερκείμενου, το βακτηριακό ίζημα επαναιωρήθηκε 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 erppendorff, όπου προστέθηκαν 100 μl ισοπροπανόλης. Το πλασμιδικό DNA αφέθηκε να κατακρημνιστεί για 5 λεπτά στους -80 °C και συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση για 7 λεπτά στις 13000 στροφές στους 4 °C. Το ίζημα/DNA επαναιωρήθηκε σε περίπου 25 μl διαλύματος 1X TE και αποθηκεύτηκε στους -20°C για περαιτέρω χρήση. Για να επιβεβαιώσουμε την παρουσία του πλασμιδικού DNA υποβάλουμε το DNA που απομονώθηκε σε PCR με τους κατάλληλους primers. Όπως προαναφέραμε στην παράγραφο **B1.3** αποθηκεύουμε τα μετασχηματισμένα βακτήρια που αναπτύχθηκαν στις υγρές καλλιέργειες και γνωρίζουμε ότι φέρουν το πλασμίδιο που μας ενδιαφέρει, στους -80 °C σε διάλειμμα γλυκερόλης.

Midi-Prep: Για την απομόνωση πλασμιδικού DNA σε μεγάλους όγκους (maxi-prep), η ανάπτυξη υγρών καλλιεργειών βακτηρίων πραγματοποιήθηκε με ανάμιξη 0.5 ml ανεπτυγμένης καλλιέργειας βακτηρίων σε 4 ml L-Broth και 100 μg/ml αμπικιλίνης σε θερμαινόμενο τροχιακό αναδευτήρα στους 37°C για όλη τη νύχτα (>16 ώρες) και στη συνέχεια με τον εμβολιασμό 200 ml L-Broth και 100 μg/ml αμπικιλίνης με 5 ml της ολονύχτιας ανεπτυγμένης βακτηριακής καλλιέργειας και επώαση σε θερμαινόμενο τροχιακό αναδευτήρα στους 37°C για όλη τη νύχτα.

Η απομόνωση του πλασμιδικού DNA έγινε με τη χρήση Nucleobond kit Xtra Midi EF/Maxi EF, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Εν συντομία, οι

καλλιέργειες των βακτηρίων που αναπτύχθηκαν σε 150-200 ml L-Broth με 100 µg/ml αμπικιλίνης, φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά, στις 6000 στροφές στους 4°C. Το βακτηριακό ίζημα υπέστη αλκαλική λύση και έπειτα εισάχθηκε σε ειδική στήλη Nucleobond tip-100, που κατακρατά το πλασμιδιακό DNA. Στη συνέχεια, οι στήλες εκπλύθηκαν με ρυθμιστικά διαλύματα έκπλυσης (wash buffer) και απομάκρυνσης των ενδονουκλεασών και το πλασμιδιακό DNA εκχυλίστηκε σε 5 ml ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης (elution buffer).

Το πλασμιδιακό DNA κατακρημνίσθηκε με 3.5 ml ισοπροπανόλης με φυγοκέντρηση σε 6000Xg για 40 λεπτά στους 4°C. Ακολούθησε έκπλυση του με 1 ml 70% αιθανόλης, φυγοκέντρηση σε 13000Xg για 5 λεπτά και το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου. Το πλασμιδιακό DNA εναιωρήθηκε σε 100-200 µl 1X TE pH8.0 και αποθηκεύτηκε στους -20°C για περαιτέρω χρήση. Η ποσότητα του απομονωμένου DNA υπολογίστηκε φωτομετρικά με τη χρήση του Nanodrop 2000.

Διάλειμμα	Σύσταση
100 mg/ml Αμπικιλλίνης	Σκόνη αμπικιλλίνης διαλύθηκε σε κατάλληλη ποσότητα αποστειρωμένου ddH ₂ O, φιλτραρίστηκε μέσω ενός αποστειρωμένου μικροφίλτρου 0.2 μm και διατηρήθηκε στους -20oC σε μικρές ποσότητες (aliquots).
Διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου (CaCl₂)	60 mM CaCl ₂ , 15% γλυκερόλη, 10 mM PIPES pH 7.0
Ρυθμιστικό διάλυμα STET	8% σουκρόζη, 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
PBS	Ρυθμιστικό διάλυμα φυσιολογικού ορού - φωσφορικού άλατος (Phosphate Buffered Saline; PBS) 10X: 1.37M NaCl, 27mM KCl, 100mM Na ₂ HPO ₄ , 18mM KH ₂ PO ₄
Διάλυμα RIPA	150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1% NP-40, 0,5% Triton X-100, 1 mM EDTA pH 8.0, 0.5% δεοξυχολικό άλας του νατρίου (sodium deoxycholate), 1mM Dithiothreitol (DTT), 1 mM PMSF, 1 mM ορθοβαναδικό άλας του νατρίου (Na ₃ VO ₄) και 1X αναστολείς πρωτεασών Sigma, S8820).
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
1X Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών	(Transfer blotting buffer): 0.0025 M Tris, 0.192 M γλυκίνη, 20% μεθανόλη
Πίνακας 2.1: Διαλείμματα και η σύσταση τους.	

2.2.2 Ευκαρυωτικές κυτταρικές σειρές.

i) Κυτταρικές σειρές

Χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές από καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου DLD1, CACO2, HCT116. Επίσης για την παραγωγή ρετροϊών χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά Phoenix για την επιμόλυνση των καρκινικών κυτταρικών σειρών.

DLD1: Η επιθηλιακή κυτταρική σειρά DLD1 επίσης γνωστή ως CoCL3 είναι μια αθανатоποιημένη κυτταρική σειρά αδενοκαρκινώματος παχέος εντέρου που απομονώθηκε το 1973 από το παχύ έντερο ενός ασθενούς με αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου. Τα DLD1 είναι επιθηλιακά κύτταρα από αδενοκαρκινώματος παχέος εντέρου και χαρακτηρίζεται από την παρουσία μεταλλάξεων σε APC, KRAS, PIK3CA, TP53, κ.α. (130). Η κυτταρική σειρά DLD-1 καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό υλικό RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) (Gibco™) εμπλουτισμένη με 10% εμβρυικό ορό βοός (Fetal Bovine Serum; FBS), 100 IU/ml πενικιλίνη, 100 µg/ml στρεπτομυκίνη και 1.4 mM L-γλουταμίνη (Biowest). Η καλλιέργεια των κυτταρικών σειρών πραγματοποιήθηκε σε επωαστικό κλίβανο με ελεγχόμενο περιβάλλον (37°C, 5% CO₂).

CACO2: Η κυτταρική σειρά CACO2 είναι μία αθανатоποιημένη κυτταρική σειρά αποτελείται από επιθηλιακά κύτταρα που απομονώθηκαν από αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου. Στην καλλιέργεια, τα κύτταρα CACO2 διαφοροποιούνται αυθόρμητα σε ένα ετερογενές μείγμα εντερικού τύπου επιθηλιακών κυττάρων. Χαρακτηρίζεται από την παρουσία μεταλλάξεων σε APC, SMAD4 και TP53, αλλά όχι σε RAS (131). Η κυτταρική σειρά Caco-2 επώαστηκε σε θρεπτικό υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) με χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης (DMEM low glucose, 1 g/L) (Gibco™), εμπλουτισμένη με 10% εμβρυικό ορό βοός (Fetal Bovine Serum; FBS), 100 IU/ml πενικιλίνη, 100 µg/ml στρεπτομυκίνη και 1.4 mM L-γλουταμίνη (Biowest). Η καλλιέργεια των κυτταρικών σειρών πραγματοποιήθηκε σε επωαστικό κλίβανο με ελεγχόμενο περιβάλλον (37°C, 5% CO₂).

HCT116: Η κυτταρική σειρά HCT116 είναι επίσης είναι μία αθανатоποιημένη κυτταρική σειρά αποτελείται από επιθηλιακά κύτταρα που απομονώθηκαν από αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου. Φέρει μία χαρακτηριστική μετάλλαξη στο κωδικόνιο 13 του KRAS "Gly13Asp (GGC>GAC)", καθώς και μεταλλάξεις στο BRCA2,

CDKN2A, CTNNB1, PIK3CA και TGFBR2 (132). Η κυτταρική σειρά HCT116 επώαστηκε σε θρεπτικό υλικό DMEM με υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης (DMEM high glucose, 4 g/L) (GibcoTM) εμπλουτισμένη με 10% εμβρυικό ορό βοός (Fetal Bovine Serum; FBS), 100 IU/ml πενικιλίνη, 100 µg/ml στρεπτομυκίνη και 1.4 mM L-γλουταμίνη (Biowest). Η καλλιέργεια των κυτταρικών σειρών πραγματοποιήθηκε σε επωαστικό κλίβανο με ελεγχόμενο περιβάλλον (37°C, 5% CO₂).

Phoenix: Η κυτταρική σειρά Phoenix είναι μια σειρά δεύτερης γενιάς παραγωγής ρετροϊών. Η κυτταρική σειρά Phoenix βασίζονται στην κυτταρική σειρά 293T, μια ανθρώπινη εμβρυϊκή γραμμή νεφρού μετασχηματισμένη με αδενοϊό E1a. Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό αυτής της κυτταρικής σειράς είναι ότι είναι εξαιρετικά επιμολύνσιμη είτε με διαμόλυνση με μεσολάβηση φωσφορικού ασβεστίου είτε με πρωτόκολλα που βασίζονται σε λιπίδια. Η κυτταρική σειρά Phoenix επώαστηκε σε θρεπτικό υλικό DMEM με υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης (DMEM high glucose, 4 g/L) (GibcoTM) εμπλουτισμένη με 10% εμβρυικό ορό βοός (Fetal Bovine Serum; FBS), 100 IU/ml πενικιλίνη, 100 µg/ml στρεπτομυκίνη και 1.4 mM L-γλουταμίνη (Biowest). Η καλλιέργεια των κυτταρικών σειρών πραγματοποιήθηκε σε επωαστικό κλίβανο με ελεγχόμενο περιβάλλον (37°C, 5% CO₂).

ii) Χειρισμός κυτταρικών σειρών.

Καλλιέργεια Κυτταρικών σειρών: Τα κύτταρα από την κάθε κυτταρική σειρά ανακαλλιεργούνται, όταν κάλυπταν κατά 70-90% το τρυβλίο (70-90% confluent). Μετά την απόρριψη του θρεπτικού υλικού τους, προστίθεντο σε αυτά 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος PBS (Phosphate Buffered Saline) (έκπλυση) και στη συνέχεια προστίθεντο 1mL διάλυμα θρυψίνης-EDTA (GibcoTM). Εν συνεχεία, τα κύτταρα παρέμεναν στον κλίβανο από 2 έως και 10 λεπτά, προκειμένου το πρωτεολυτικό ένζυμο θρυψίνη να τα αποκολλήσει από το τρυβλίο. Μετά το πέρας της επώασης, προστίθεντο πλήρες θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα μεταφέρονταν σε νέα τρυβλία σε αναλογίες 1:2 έως 1:10, ανάλογα με την επιθυμητή συγκέντρωση στην οποία αυτά έπρεπε να βρίσκονται. Τέλος, προστίθεντο σε αυτά πλήρες θρεπτικό υλικό με τελικό όγκο 10 mL και τα τρυβλία των 100mm τοποθετούνταν στον επωαστικό κλίβανο.

Αποθήκευση των κυττάρων σε υγρό άζωτο: Για την αποθήκευση των κυττάρων στο υγρό άζωτο (-196°C) τρυβλία 100mm με συγκέντρωση κυττάρων 80-90%,

εκπλύθηκαν με 10 mL ρυθμιστικό διάλυμα PBS και στη συνέχεια προστέθηκε σε αυτά 1mL διάλυμα θρυψίνης-EDTA. Μετά την αποκόλληση των κυττάρων από το τρυβλίο, προστέθηκαν 7-8 mL ρυθμιστικού διαλύματος PBS και το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρθηκε σε σωλήνες Falcon των 15 mL. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά, στις 1500 στροφές. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, το υπερκείμενο απορρίφθηκε και στο ίζημα, το οποίο περιείχε τα κύτταρα, προστέθηκε διάλυμα, που αποτελούνταν από FBS και διμεθυλοσουλφοξείδιο (Dimethyl sulfoxide; DMSO) σε αναλογία 9:1 για τελικό όγκο 1mL. Μετά την επαναιώρηση των κυττάρων με το συγκεκριμένο διάλυμα, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε ειδικές αμπούλες (cryovials) και τοποθετήθηκαν σε ισοθερμικό δοχείο, που περιείχε ισοπροπανόλη (μείωση θερμοκρασίας κατά 1°C το λεπτό). Το δοχείο παρέμεινε για 24 ώρες στους -80°C και στη συνέχεια οι αμπούλες μεταφέρθηκαν στο υγρό άζωτο.

Ανασύσταση των κυττάρων από το υγρό άζωτο: Οι αμπούλες (cryovials) που περιείχαν τα παγωμένα κύτταρα μεταφέρθηκαν από το υγρό άζωτο σε υδατόλουτρο στους 37°C και παρέμεναν εκεί για 1-3 λεπτά. Εν συνεχεία, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν στάγδην σε τρυβλίο των 100 mm, στα οποία είχαν ήδη προστεθεί 13 ml πλήρους θρεπτικού υλικού. Τα τρυβλία, έπειτα, τοποθετήθηκαν στον κλίβανο για την καλλιέργεια των κυττάρων. Την επόμενη μέρα, πραγματοποιήθηκε αλλαγή θρεπτικού υλικού (10 ml).

Καταμέτρηση κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer: Καλλιεργούμενα κύτταρα αποκολλήθηκαν από το τρυβλίο με διάλυμα θρυψίνης. Μετά την αποκόλληση των κυττάρων, προστέθηκε πλήρες θρεπτικό υλικό και 10 μl από το εναιώρημα των κυττάρων τοποθετήθηκαν στην πλάκα Neubauer, 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 1 ml του αρχικού εναιωρήματος. Για να είναι οι μετρήσεις του αριθμού των κυττάρων ακριβής η κάθε μέτρηση επαναλήφθηκε 2 φορές.

iii) Δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών καρκίνου παχέος εντέρου

Η μείωση της έκφρασης της τετρασπανίνης CD81 έγινε στις καρκινικές κυτταρικές σειρές DLD1, CACO2, HCT116 με τη χρήση shRNA έναντι της CD81. Για το λόγο αυτό

χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί ρέτρο-υκοί φορείς pSIREN-RetroQ-shCD81 (shRNA έναντι του CD81) και pSIREN-RetroQ (control). Η αύξηση της έκφρασης της τετρασπανίνης CD81 έγινε στις κυτταρικές σειρές CACO2 και HCT116 μέσω μεταγωγής του γονιδίου για τη CD81 με τη χρήση των πλασμιδιακών ρέτρο-υκών φορέων pLXIN-CD81OE (εισάγει το γονίδιο για τη CD81) και pLXIN-vector (control). Στην κυτταρική σειρά DLD1 δεν πραγματοποιήθηκε υπερέκφραση της CD81 λόγω της εγγενούς αυξημένης έκφρασης της CD81 στην συγκεκριμένη κυτταρική σειρά. Οι πλασμιδιακοί ρετροϊκοί φορείς που μας επιτρέπουν το γενετικό χειρισμό της έκφρασης των CD81 στις περιγραφείσες καρκινικές κυτταρικές σειρές ήταν ευγενική προσφορά του Καθηγητή Christopher S. Stipp, Πανεπιστήμιο της Iowa, ΗΠΑ.

Για την παραγωγή των ρετρο-υκών σωματιδίων χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά Phoenix, η οποία διαμολύνθηκε (transfection) με τους επιθυμητούς πλασμιδιακούς ρέτρο-υκούς φορείς (πίνακας 2.2) με τη χρήση λιπιδίων (PEI). Συγκεκριμένα, 10 μg του επιθυμητού πλασμιδίου αναμείχθηκαν με 125 μl θρεπτικού υλικού (χωρίς προσθήκη ορού) και 30 μg λιπιδίου, 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 πλασμιδιακών ρέτρο-υκών φορέων. Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο 37°C, 5% CO₂, για την παραγωγή των ρετροϊκών σωματιδίων.

Η συλλογή των ρετροϊκών σωματιδίων και επιμόλυνση των ανθρώπινων καρκινικών σειρών έγινε την 2^η και 3^η ημέρα από την διαμόλυνση των κυττάρων Phoenix. Έπειτα από 24 ώρες πραγματοποιήθηκε αλλαγή του θρεπτικού υλικού στα κύτταρα Phoenix. Η πρώτη συλλογή των υκών σωματίων έγινε την 2^η ημέρα. Για το σκοπό αυτό συλλέχθηκε το θρεπτικό υλικό των κυττάρων Phoenix, το οποίο περιείχε τα ικά σωματίδια, φιλτραρίστηκε μέσω ενός αποστειρωμένου μικροφίλτρου 0.45 μm και προστέθηκε σε αυτό πολυβρίνη (polybrene) (8 μl ανά 10 ml ιού). Το διάλυμα αυτό, στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε για την επιμόλυνση των καλλιεργούμενων κυττάρων. Νεό θρεπτικό υλικό τοποθετήθηκε στα κύτταρα Phoenix και η ανωτέρω διαδικασία πραγματοποιήθηκε ξανά την 3^η ημέρα επόμενη ημέρα για να επιτευχθεί μεγαλύτερος αριθμός επιμολυσμένων κυττάρων.

Η επιλογή των κυττάρων που επιμολύνθηκαν με τους ρετροϊκούς φορείς pSIREN-RetroQ και pSIREN-RetroQ-shCD81 έγινε με χορήγηση υγρομυκίνης (hygromycin). Το αντιβιοτικό χορηγήθηκε σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις με τελική συγκέντρωση 600 µg/mL για 15-25 ημέρες. Η επιλογή των κυττάρων που επιμολύνθηκαν με τους ρετροϊκούς φορείς pLXIN-vector και pLXIN-CD81OE έγινε με χορήγηση του αντιβιοτικού G418 (Geneticin). Το αντιβιοτικό χορηγήθηκε σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις με τελική συγκέντρωση 600 µg/mL για 15-25 ημέρες.

Πλασμίδια	Ρετρο-ϊκοί Φορείς	Επιλογή
PLXIN-vector	Ρετρο-ϊκός φορέας που εισάγει το πλασμίδιο PLXIN - Control	Bacterial: ampicillin Eucaryotic: G418
PLXIN-CD81 OE	Ρετρο-ϊκός φορέας που εισάγει το πλασμίδιο PLXIN που περιέχει γονίδιο για την έκφραση της CD81	Bacterial: ampicillin Eucaryotic: G418
PSiren-vector	Ρετρο-ϊκός φορέας για το πλασμίδιο Psiren - Control	Bacterial: ampicillin Eucaryotic: υγρομυκίνη
PSiren-SH1 CD81	Ρετρο-ϊκός φορέας που εισάγει το πλασμίδιο Psiren που περιέχει γονίδιο για την έκφραση του shRNA έναντι της CD81	Bacterial: ampicillin Eucaryotic: υγρομυκίνη
Πίνακας 2.2: Πλασμίδια και ρετρο-ϊκοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν για την τροποποίηση της έκφρασης της CD81 στις κυτταρικές σειρές καρκίνου του παχέος εντέρου.		

2.2.3 Μοριακές τεχνικές & ανάλυση πρωτεϊνών

i) Απομόνωση και ανάλυση RNA

Απομόνωση RNA: Το ολικό RNA από τα καλλιεργούμενα κύτταρα απομονώθηκε με τη χρήση του RNeasy Mini Kit (QIAGEN). Πιο αναλυτικά, μετά την έκπλυση των καλλιεργούμενων κυττάρων με 10 ml ψυχρού PBS εις διπλούν, προστέθηκε 1 ml από το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα και με τη βοήθεια ειδικού σιλικονούχου υλικού, πραγματοποιήθηκε η συλλογή των κυττάρων από τα τρυβλία. Τα εναιωρήματα των κυττάρων μεταβιβάστηκαν σε σωλήνες erpendorf των 1.5 ml, τα οποία φυγοκεντρήθηκαν για 1.5 λεπτό, στις 6500 στροφές, στους 4°C. Στη συνέχεια, απορρίφθηκαν τα υπερκείμενα και προστέθηκε διάλυμα QIAzol σε ποσότητα 700 μl, ακολούθησε ισχυρή ανάδευση με δίνη και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Εν συνεχεία, προστέθηκαν 140 μl διαλύματος χλωροφορμίου και ακολούθησε χειροκίνητη ανάδευση και επώαση για 2 με 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά, στα 12.000 g, στους 4°C και μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, μεταφέρθηκε η επάνω διάφανη ζώνη που περιείχε το RNA, σε νέους σωλήνες erpendorf των 1.5 ml. Εν συνεχεία, προστέθηκε διάλυμα 100% αιθανόλης σε ποσότητα ίση με 1.5 φορές τον όγκο του δείγματος, πραγματοποιήθηκε ανάδευση με την πιπέτα και το διάλυμα μεταφέρθηκε σε στήλες τοποθετημένες πάνω σε σωλήνες συλλογής (collection tubes). Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 δευτερόλεπτα, στα 8000 g, σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, προστέθηκαν 700 μl διαλύματος έκπλυσης RWT και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 δευτερόλεπτα, στα 8000 g, σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε προσθήκη 500 μl διαλύματος RPE και φυγοκέντρηση για 2 λεπτά, στα 8000 g, σε θερμοκρασία δωματίου. Το βήμα επαναλήφθηκε και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 2 λεπτά, στα 8000 g, σε θερμοκρασία δωματίου. Οι στήλες μεταφέρθηκαν σε καινούριους αποστειρωμένους σωλήνες erpendorf των 1.5 ml και προστέθηκαν 60 μl νερού ελεύθερου RNAσών για την έκλυση του RNA. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 1 λεπτό, στα 8000 g, σε θερμοκρασία δωματίου με αποτέλεσμα την απομόνωση του ολικού RNA σε συνολικό όγκο 60 μl. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσής του RNA έγινε με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου

Thermo Scientific™ NanoDrop 2000. Το RNA διατηρήθηκε στους -80oC μέχρι την περαιτέρω χρήση.

Δημιουργία cDNA: Η αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε cDNA έγινε με τη χρήση του PrimeScript™ RT reagent Kit (TaKaRa, #RR037A), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Πιο συγκεκριμένα, 0.5 µg RNA προστέθηκαν σε διάλυμα, που περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα σε τελική συγκέντρωση 1X, 25 pmol oligo-dT εκκινητές, 50 pmol τυχαία εξαμερή και κατάλληλη ποσότητα του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση σύμφωνα με τον κατασκευαστή. Τέλος, προστέθηκε νερό ελεύθερο RNAσών με τελικό όγκο 10 µl. Τα δείγματα επώαστηκαν για 15 λεπτά, σε υδατόλουτρο, στους 37oC. Εν συνεχεία, τα δείγματα θερμάνθηκαν για 5 δευτερόλεπτα, στους 85oC για την απενεργοποίηση του ενζύμου. Τα δείγματα cDNA αποθηκεύτηκαν στους -20oC για περαιτέρω χρήση.

Αλυσιδωτή αντίδραση μεταγραφής πραγματικού χρόνου – Real Time PCR (RT q-PCR) : Τα επίπεδα έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων μελετήθηκαν με τη χρήση RT q-PCR. Συγκριμένα μετρήθηκαν τα επίπεδα mRNA έκφρασης γονιδίων του κυτταρικού κύκλου (E2F1, CyclinD1, CDC6), γονιδίων που σχετίζονται με την οδό σηματοδότησης του NF-κΒ (RelA/p65, IKKβ, CHUK) και το γονίδιο της CD81. Τα επίπεδα mRNA έκφρασης των συγκεκριμένων γονιδίων μετρήθηκαν στα καρκινικά κύτταρα τα οποία έχουν υποβληθεί σε τροποποίηση της έκφρασης της CD81 και συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες control κυτταρικές σειρές. Για το σκοπό αυτό, τα δείγματα cDNA ενισχύθηκαν για αυτούς τους συγκεκριμένους στόχους με τη χρήση του KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (Kapa Biosystems) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και τη χρήση κατάλληλων εκκινητών (primers), 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). Ως γονίδια αναφοράς (housekeeping gene) χρησιμοποιήθηκε η έκφραση της RNA πολυμεράσης II (RP11) για τις κυτταρικές σειρές DLD1 και HCT116. Για τις κυτταρικές σειρές CACO2 μετά από πολλαπλούς ελέγχους διάφορων house-keeping genes (RP11, GAPDH) επιλέχθηκε το H18S ως το καταλληλότερο γονίδιο αναφοράς για τη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά. Η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο ΔΔCT.

Target-Gene		Sequence 5→3
E2F1	F:	TCAATGCTGGTTTTGGTGACG
	R:	GCATGTTGGACTCGATGCAG
CDC6	F:	CGCTGTGCAGTTTGTTGAGG
	R:	CGGGTTTGAGGCATGACGAC
CyclinD1	F:	CCGAGGAGCYGCGCAAATG
	R:	AGGGCGATTGGAATGAACCT
RPII	F:	TCAATGCTGGTTTTGGTGACG
	R:	GCATGTTGGACTCGATGCAG
IKKβ	F:	AGACATGTGGGGCCTGGGAA
	R:	TTGGGGTGGGTCAGCCTTCT
CHUK	F:	CTGTCATGTGTGGTAACTCCTCA
	R:	AGGTTTGGGGACAGTGAACAA
CD81	F:	GCGCCCAAACACCTTCTATGT
	R:	CCAGGCAGGTGAAGAACGTC
H18S	F:	CTACCACATCCAAGGAAGCA
	R:	TTTTTCGTCACCTCCCCG
Πίνακας 2.3: Ζεύγη εκκινητών (primers) για τα γονίδια στόχους των οποίων η έκφραση εκτιμήθηκε με τη χρήση RT-qPCR.		

ii) Απομόνωση και ανάλυση πρωτεϊνών

Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών: Η απομόνωση των ολικών πρωτεϊνών έγινε από κύτταρα τα οποία καλλιέργηθηκαν σε 80-90% confluency σε 100mm τρυβλία. Τα καλλιεργούμενα κύτταρα σε τρυβλία των 100 mm αρχικά ξεπλύθηκαν εις διπλούν με 10 ml ψυχρού ρυθμιστικού διαλύματος PBS-EDTA pH 8.0. Στη συνέχεια προστέθηκε 1 ml από το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα και έγινε απόξεση των κυττάρων από το τρυβλίο με τη χρήση ψήκτρας από σιλικόνη. Η όλη διαδικασία έγινε πάνω σε πάγο. Τα ελαιώδη υλικά των κυττάρων συλλέχθηκαν σε σωλήνες eppendorf των 1.5 ml, τα οποία φυγοκεντρήθηκαν για 1.5 λεπτό, στις 6500 στροφές, στους 4°C. Στη συνέχεια, απορρίφθηκαν τα υπερκείμενα και προστέθηκε διάλυμα RIPA σε ποσότητες από 50 έως και 200 μl, αναλόγως της ποσότητας του ιζήματος που σχηματιζόταν μετά την

φυγοκέντρωση. Ακολούθησε επώαση σε πάγο με το διάλυμα RIPA για 30 λεπτά και ανά 10 λεπτά ανάδευση (Vortex). Εν συνεχεία, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 13000 στροφές, για 20 λεπτά, στους 4°C. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, συλλέχθηκε το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης σε καινούριους σωλήνες errendorf και μικρή ποσότητα (2-5μl) των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη χρήση του Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fischer Scientific™, #23225) βάση οδηγιών κατασκευαστή. Η μέτρηση της συγκέντρωσής τους έγινε με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου Thermo Scientific™ NanoDrop 2000. Τέλος, τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80°C για περαιτέρω χρήση.

Πηκτή πολυακρυλαμίδιου: Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε σε τζελ/πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδιου. Το τζελ αποτελείται από δύο μέρη: Από την πηκτή επιστοιβάξης με μικρή συγκέντρωση πολυακρυλαμίδιου και επομένως με μεγάλο μέγεθος πόρων και περισσότερο διαπερατή και την πηκτή διαχωρισμού με μεγαλύτερη συγκέντρωση πολυακρυλαμίδιου και επομένως με μικρότερο μέγεθος πόρων και λιγότερο διαπερατή. Τα πρωτεϊνικά μόρια διαπερνούν γρήγορα την πρώτη συσσωρεύονται σε μια λεπτή στιβάδα και εισέρχονται στη δεύτερη πηκτή, όπου και γίνεται ο διαχωρισμός. Η αναλογία όγκων πηκτής διαχωρισμού: πηκτή επιστοιβάξης ήταν 5:1.

Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου: Με την ηλεκτροφόρηση πηκτής SDS-πολυακρυλαμίδιου επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε με τη συσκευή MiniProtean gel electrophoresis tank (Bio-Rad). Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE) παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν πηκτές διαχωρισμού συγκέντρωσης ακρυλαμίδιου 10% - 14% ανάλογα με το μέγεθος της πρωτεΐνης που επιθυμούμε να διαχωρίσουμε. Το μίγμα αφέθηκε να πολυμεριστεί σε θερμοκρασία δωματίου. Χρησιμοποιήσαμε 40-60 μg ολικής πρωτεΐνης από κάθε δείγμα για την ηλεκτροφόρηση. Στα δείγματα αυτά προστέθηκε 1X διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών (loading buffer) και αφού θερμάνθηκαν για 10 λεπτά στους 100°C, φορτώθηκαν στην πηκτή. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 115 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).

Ανάλυση πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωμα κατά Western (Western blot): Με την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης και του διαχωρισμού των πρωτεϊνών βάση του μοριακού του βάρους συνέχεια έχει η μεταφορά των πρωτεϊνών από το τζελ πολυακρυλαμιδίου στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Macherey-Nagel, #741280). Η μεταφορά πραγματοποιήθηκε με οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών για όλη τη νύχτα (>16 ώρες) στους 4°C και τάση 25V. Αφού ολοκληρώθηκε η μεταφορά των πρωτεϊνών στις μεμβράνες νιτροκυτταρίνης, οι μεμβράνες επωάστηκαν για >1 ώρα (1-3 ώρες) σε 5% άπαχο γάλα σε σκόνη ελεύθερο λιπιδίων διαλυμένο σε PBS (5% blocking solution). Στην συνέχεια, οι μεμβράνες επωάστηκαν με το κατάλληλο πρωτογενές αντίσωμα (Πίνακας 2.4) σε 3.5% blocking solution ολονύκτια στους 4°C υπό ανάδευση. Μετά την επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα οι μεμβράνες ξεπλύθηκαν 3 φορές για 10' την φορά με PBS και ακολούθως επωάστηκαν με κατάλληλο δευτερογενές αντίσωμα (Jackson Immunoresearch) σε 3.5% blocking solution για 1.5 ώρα, υπό ανάδευση. Οι μεμβράνες ξεπλύθηκαν ξανά 3 φορές για 10' τη φορά με PBS και στη συνέχεια αναπτύχθηκαν σε σκοτεινό θάλαμο με τη χρήση του Clarity Western ECL Substrate (BioRad). Η έκθεση των μεμβρανών πραγματοποιήθηκε στο Molecular Imager® Chemi Doc™ XRS (Bio-Rad).

Αντίσωμα/ Στόχος	Εταιρεία	Κωδικός	Ισότυπος	Αραίωση (WB)	Μοριακό Βάρος (WB)	Χρήση
CD81	Santa-Cruz	Sc-166029	mouse	1:300	26 kDa	IHC, WB
CD82	Exbio	11-559-c025	mouse	1:150	34 kDa	IHC, WB
PD1	Cell Marque	NAT105	mouse	1:1000	<i>n.a.</i>	IHC
CD3	Zytomed	RBK024 SP7	rabbit	1:50	<i>n.a.</i>	IHC
CD8	DAKO	M710301-2 C8/144B	mouse	1:50	<i>n.a.</i>	IHC
CDC6	Santa-Cruz	Sc-9964	mouse	1:200	62 kDa	WB
CyclinD1	Santa-Cruz	Sc-20044	mouse	1:200	37 kDa	WB
E2F1	Santa-Cruz	Sc-251	mouse	1:200	60 kDa	WB
p65	Santa-Cruz	Sc-372	rabbit	1:200	65 kDa	WB
Phospho-p65	Santa-Cruz	Sc-136548	mouse	1:200	65 kDa	WB
GAPDH	Santa-Cruz	Sc-47724	mouse	1:4000	36 kDa	WB
Actin	A5441	Sigma	mouse	1:4000	42 kDa	WB
Πίνακας 2.4: Πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. <i>WB: Western Blot, ICH: immunohistochemistry</i>						

2.2.4 Πειράματα ελέγχου του φαινοτύπου των καρκινικών σειρών

Τα πειράματα με σκοπό τον έλεγχο του φαινοτύπου των καρκινικών σειρών όπου είχε γίνει υπερέκφραση ή αποσιώπηση της τετρασπανίνης CD81 και η σύγκριση τους με τις αντίστοιχες control κυτταρικές σειρές πραγματοποιήθηκε άμεσα μετά την επιμόλυνση και επιλογή των τροποποιημένων καρκινικών σειρών. Για να διασφαλιστεί ότι η έκφραση της CD81 είχε τροποποιηθεί καταλλήλως ελέγξαμε την έκφραση της CD81 ταυτόχρονα σε επίπεδο mRNA με Real-Time quantitative PCR (RT q-PCR) και σε επίπεδο πρωτεΐνης με ανοσοαποτύπωμα κατά Western Blot.

i) Καμπύλες ανάπτυξης κυττάρων (Growth Curves)

Ο ρυθμός ανάπτυξης των τροποποιημένων καρκινικών σειρών συγκρίθηκε με τις αντίστοιχες control κυτταρικές σειρές. Προκειμένου να παρατηρηθεί η ανάπτυξη των προς μελέτη κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν πολυτρυβλία των 96 θέσεων (96-well plate) τα οποία επιστρώθηκαν με κατάλληλο αριθμό κυττάρων (από 4×10^3 έως 7×10^3). Μετά την τοποθέτηση κατάλληλου αριθμού κυττάρων στα πολυτρυβλία 96 θέσεων, πραγματοποιήθηκε παρατήρηση της ανάπτυξης αυτών για 96 ώρες με χρήση του συστήματος απεικόνισης πραγματικού χρόνου IncuCyte ZOOM (Essen BioScience), πραγματοποιώντας λήψη φωτογραφιών κάθε 4 ώρες (σε σύνολο 96 ωρών) με τη χρήση αντικειμενικού φακού 10X. Στο τέλος, συλλέχθηκαν τα δεδομένα με τα ποσοστά επιφανειακής κάλυψης/ πυκνότητας των κυττάρων (% confluency) με τη χρήση του λογισμικού IncuCyte ZOOM. Τα δεδομένα στη συνέχεια εξήχθησαν σε φύλλα του Excel και η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το SPSS v24.

ii) Ανάπτυξη κυττάρων σε ημι-στέρεο μέσο για το σχηματισμό αποικιών

Μελετήσαμε την ικανότητα των τροποποιημένων καρκινικών σειρών να αναπτύσσουν αποικίες σε ημι-στερεό υλικό ανεξαρτήτως της παρουσίας στερεής επιφάνειας, σε σύγκριση με τις αντίστοιχες control κυτταρικές σειρές. Η δοκιμασία “Anchorage-Independent Cell Growth” δηλαδή ανάπτυξης αποικιών σε ημι-στερεό υλικό (Soft agar colony formation assay), έχει καθιερωθεί για τον χαρακτηρισμό *in vitro* της ικανότητας των καρκινικών κυττάρων να επιβιώνουν και αναπτύσσονται απουσία αγκύστρωσης στην εξωκυτταρική επιφάνεια (extracellular matrix) και

δυνητικά αποτελεί μία δοκιμασία πρόβλεψης της ικανότητας των καρκινικών κυττάρων να σχηματίζουν όγκους *in vivo*.

Αρχικά, επιστρώθηκε σε ένα πολυτρυβλίο 6 θέσεων (6-well plate) η κάτω φάση, η οποία αποτελούνταν από 0.8% άγαρ σε 2 ml πλήρους θρεπτικού υλικού. Το πολυτρυβλίο αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 30 λεπτά, ώστε να στερεοποιηθεί η κάτω φάση. Στη συνέχεια, προστέθηκε η πάνω φάση, η οποία αποτελούνταν από 0.4% άγαρ σε 2 ml πλήρους θρεπτικού υλικού και κυττάρων. Σε κάθε θέση του πολυτρυβλίου επιστρώθηκαν 6×10^3 κύτταρα. Το πολυτρυβλίο αφέθηκε ξανά για περίπου μισή ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, έπειτα προστέθηκε μικρή ποσότητα πλήρους θρεπτικού (περίπου 500 μ l) σε κάθε θέση, το οποίο ανανεώνονταν κάθε 3 ημέρες, και το πολυτρυβλίο τοποθετήθηκε στον επωαστικό κλίβανο ώστε να αναπτυχθούν οι αποικίες για σύνολο 3 εβδομάδων.

Έπειτα από χρονικό διάστημα περίπου τριών εβδομάδων, παρατηρήθηκε ο σχηματισμός αποικιών. Για την καταμέτρηση και ποσοτικοποίηση των αποικιών πραγματοποιήθηκε χρώση των κυττάρων με διάλυμα τετραζολίου (tetrazolium violet). Πιο συγκεκριμένα, σε κάθε θέση του πολυτρυβλίου προστέθηκε 1 ml χρώσης συγκέντρωσης 0,5 ng/ml. Το πολυτρυβλίο τοποθετήθηκε στον επωαστικό κλίβανο για ολονύκτια επώαση. Την επόμενη μέρα, οι αποικίες έλαβαν χαρακτηριστικό σκούρο χρώμα και πραγματοποιήθηκε η λήψη φωτογραφιών του πολυτρυβλίου με τη χρήση του Molecular Imager® Chemi Doc™ XRS (Bio-Rad).

iii) Προσδιορισμός κυτταρικής μετανάστευσης (Wound healing assay)

Η ικανότητα μετανάστευσης των τροποποιημένων καρκινικών σειρών συγκρίθηκε με τις αντίστοιχες control κυτταρικές σειρές. Προκειμένου να παρατηρηθεί η ικανότητα μετανάστευσης των προς μελέτη κυττάρων *in vitro* επιστρώθηκε κατάλληλος αριθμός κυττάρων (από 3×10^5) σε πολυτρυβλία των 24 θέσεων (24-well plate) με χρήση θρεπτικού υλικού (παρουσία μόνο 1% ορού). Έπειτα από 24 ώρες, απορρίφθηκε το θρεπτικό υλικό, και πραγματοποιήθηκε μία κάθετη αμυχή σε κάθε θέση του πολυτρυβλίου με τη χρήση αποστειρωμένου πλαστικού ρύγχους. Ακολούθησε 2 φορές έκπλυση των κυττάρων με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος PBS για την απομάκρυνση των αποκολλημένων κυττάρων. Τέλος, προστέθηκε, εκ νέου, θρεπτικό υλικό (παρουσία μόνο 1% ορού). Στη συνέχεια, η παρατήρηση των

κυττάρων έγινε με χρήση του συστήματος απεικόνισης πραγματικού χρόνου IncuCyte ZOOM (Essen BioScience) για 48 ώρες. Σε αυτό το διάστημα λαμβάνονταν φωτογραφίες των κυττάρων ανά 2 ώρες, σε δύο διαφορετικά οπτικά πεδία κάθε αμυχής, με τη χρήση αντικειμενικού φακού 4X. Τέλος, τα δεδομένα για τον υπολογισμό κάλυψης της αμυχής αναλύθηκαν με χρήση του λογισμικού ImageJ και το εργαλείο Wound Healing size tool (133). Τα δεδομένα εξήχθησαν σε φύλλα του Excell και αναλύθηκαν με τη βοήθεια του SPSS v24.

2.3 Καταληκτικά Σημεία & Στατιστική Μεθοδολογία

i) Καταληκτικά σημεία μελέτης

Πρωταρχικός στόχος της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της έκφρασης μορίων CD81 και CD82 με ανοσοϊστοχημεία (IHC) σε καρκινικά κύτταρα από ιστολογικό υλικό ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου και η συσχέτιση τους με τα κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα των ασθενών αυτών, με σκοπό να διερευνηθεί η προγνωστική τους σημασία.

Επιπλέον, θα εξετάσουμε το βαθμό διήθησης στο μικροπεριβάλλον του όγκου κυττάρων τελεστών του ανοσοποιητικού συστήματος (CD3 & CD8 T-λεμφοκύτταρα) και μοριακών δεικτών της ανοσίας (PD1 & PDL1) καθώς και την έκφραση των μορίων CD81 και CD82 σε λεμφοκύτταρα που διηθούν το μικροπεριβάλλον του όγκου σε ιστολογικό υλικό ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου ώστε να διαπιστώσουμε πιθανές συσχετίσεις και να εντοπίσουμε, εφόσον υπάρχει, την επίδραση των τετρασπανινών αυτών στο ανοσολογικό μικροπεριβάλλον του όγκου.

Τέλος, θα μελετήσουμε την επίδραση της τετρασπανίνης CD81 στη λειτουργία (πολλαπλασιασμό, κινητικότητα) καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου *in vitro* τροποποιώντας στα κύτταρα αυτά την έκφραση της CD81. Σκοπός μας είναι να διερευνήσουμε τον ρόλο της τετρασπανίνης CD81 στον καρκίνο του παχέος εντέρου και στην ανάπτυξη των καρκινικών αυτών κυττάρων *in vitro*, καθώς και να εξετάσουμε, εφόσον υπάρχει, τη συμβολή της κανονικής σηματοδοτικής πορείας του NF-κΒ στην ρύθμιση της έκφρασης της τετρασπανίνης CD81 *in vitro*.

ii) Στατιστική Μεθοδολογία

Περιγραφική ανάλυση: Περιγραφικές μέθοδοι στατιστικής χρησιμοποιήθηκαν για την παρουσίαση των δημογραφικών και κλινικών χαρακτηριστικών των ασθενών που αποτελούν το δείγμα της παρούσας μελέτης.

Συνεχείς μεταβλητές: Μέτρα θέσης και διασποράς όπως μέση τιμή, ελάχιστη και μέγιστη τιμή, τυπική απόκλιση χρησιμοποιήθηκαν για την περιγραφή των συνεχών μεταβλητών. Πιο συγκεκριμένα για μεταβλητές των οποίων η κατανομή των τιμών προσεγγίζει ικανοποιητικά την κανονική, τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση

τιμή και τυπική απόκλιση (mean, standard deviation) ενώ για μεταβλητές των οποίων τα δεδομένα δεν κατανέμονται κανονικά, τα αποτελέσματα εκφράζονται ως διάμεσος και ενδοτεταρτημοριακό εύρος (median, IQR). Οι συνεχείς μεταβλητές ελέγχθηκαν για απόκλιση από την κανονική κατανομή με στατιστικό έλεγχο Kolmogorov-Smirnov για ένα δείγμα, όσο και με γραφικό έλεγχο (ιστόγραμμα, P-P plots, Q-Q plots) και για παραβίαση της υπόθεσης ομοιογένειας της διακύμανσης (δοκιμή Levene) για κάθε σύγκριση.

Αν τα δεδομένα ακολουθούσαν κανονική κατανομή τότε για τη σύγκρισή τους μεταξύ δύο ομάδων χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος Student's T-test και μεταξύ τριών ή περισσότερων ομάδων One Way ANOVA. Αν τα δεδομένα δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή τότε για τη σύγκρισή τους μεταξύ δύο ομάδων χρησιμοποιήθηκε ο μη παραμετρικός έλεγχος Mann-Whitney U test και μεταξύ τριών ή περισσότερων ομάδων Kruskal-Wallis test. Οι μη παραμετρικοί έλεγχοι χρησιμοποιήθηκαν και σε περιπτώσεις που στις συνεχείς μεταβλητές οι τιμές που καταγράφηκαν ήταν λίγες.

Αν τα δεδομένα ακολουθούσαν κανονική κατανομή τότε για τη συσχέτιση μεταξύ δύο συνεχών μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε Pearson correlation coefficient, διαφορετικά χρησιμοποιήθηκε Spearman correlation coefficient.

Κατηγορικές μεταβλητές: Για τη περιγραφή κατηγορικών μεταβλητών χρησιμοποιήθηκαν η συχνότητα και η σχετική συχνότητα (%). Για τη διερεύνηση πιθανής συσχέτισης μεταξύ δυο κατηγορικών μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος chi-squared test (χ^2).

Ανάλυση επιβίωσης: Το ποσοστό επιβίωσης των ασθενών αναλύθηκε με τη μέθοδο Kaplan-Meier και η σύγκριση των ποσοστών επιβίωσης δύο ή περισσότερων ομάδων αναλύθηκε με log-rank test. Επιπλέον διεξήχθη μονοπαραγοντική ανάλυση, χρησιμοποιώντας παλινδρόμηση Cox (cox-regression) για να εξεταστούν αν οι μεταβλητές (συνεχείς και κατηγορικές) σχετίζονται στατιστικά σημαντικά με την ολική επιβίωση και την πρόοδο της νόσου. Η ολική επιβίωση (overall survival – OS) ορίστηκε από την ιστολογική διάγνωση έως το θάνατο και η επιβίωση ελεύθερης νόσου (progression free survival – PFS) ορίστηκε από την έναρξη της θεραπείας έως το θάνατο.

Επαναλαμβανόμενες μετρήσεις: Πραγματοποιήθηκε one-way ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) επαναλαμβανόμενων μετρήσεων μεταξύ των χρονικών στιγμών και έλεγχος διαφοράς μεταξύ των δύο ομάδων ανά χρονική στιγμή.

Όλοι οι υπολογισμοί για την πιθανότητα εσφαλμένης απόρριψης της μηδενικής υπόθεσης H_0 (p-value) βασίστηκαν σε δοκιμασίες δύο κατευθύνσεων, ενώ ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας θεωρήθηκε το όριο του 5%. Τα δεδομένα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας IBM SPSS Statistics for Windows, Version.26.0 (IBM Corp., Armonk, NY, ΗΠΑ).

3. Αποτελέσματα

3.1 Ανοσοϊστοχημική μελέτη των μορίων CD81 και CD82 σε ιστολογικό υλικό ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου

Για να διερευνήσουμε το ρόλο των τετρασπανινών CD81 και CD82 στον καρκίνο του παχέος εντέρου, καθώς και την προγνωστική τους αξία στους ασθενείς αυτούς, εκτιμήσαμε την έκφραση των τετρασπανινών σε ιστολογικό υλικό ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου και τη συγκρίναμε σε σχέση με κλινικο-εργαστηριακούς παράγοντες καθώς και με την επιβίωση των ασθενών αυτών. Για αυτό το λόγο, ιστολογικό υλικό ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου, μονιμοποιημένο με φορμαλδεΰδη-παραφίνη (FFPE) και σε μορφή TMAs (tissue microarrays) συγκεντρώθηκε με τη συνεργασία της Ελληνικής Συνεργαζόμενης Ογκολογικής Ομάδας (ΕΣΟΟ).

Η ανάλυση των διαφόρων δεικτών στο ιστολογικό υλικό των ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου έγινε εκτιμώντας με ανοσοϊστοχημεία, με τη χρήση των κατάλληλων αντισωμάτων, το προφίλ έκφρασης των υπό διερεύνηση δεικτών στο ιστολογικό υλικό που συγκεντρώσαμε (Εικόνα 3.1, Εικόνα 3.2, Εικόνα 3.3, Εικόνα 3.4). Η έκφραση των τετρασπανινών CD81 & CD82 μελετήθηκε τόσο στα καρκινικά κύτταρα, όσο και στα λεμφοκύτταρα που ήταν παρόντα στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Η εκτίμηση των CD81 & CD82 στα καρκινικά κύτταρα έγινε με τη χρήση του H-index που περιλαμβάνει την ένταση (0: καθόλου/απούσα ένταση, 1: λίγη ένταση, 2: μέτρια ένταση, 3: έντονη ένταση) επί το ποσοστό των καρκινικών κυττάρων που εκφράζουν το συγκεκριμένο δείκτη (δηλαδή $H\text{-index} = \text{intensity} * \text{percentage}$) και ως εκ τούτου το εύρος τιμών του H-index (0 – 300). Για την εκτίμηση της έκφρασης των CD81 & CD82 στα κύτταρα του ανοσοποιητικού ως μέτρο σύγκρισης χρησιμοποιήθηκε το ποσοστό των κυττάρων αυτών που εξέφραζαν τις συγκεκριμένες τετρασπανίνες στο μικροπεριβάλλον του όγκου.

Η παρουσία των κυττάρων τελεστών του ανοσοποιητικού συστήματος και συγκεκριμένα των ολικών T-λεμφοκυττάρων και των κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων εκτιμήθηκε με ανοσοϊστοχημεία με τη χρήση αντισωμάτων έναντι

των δεικτών CD3 και CD8 αντίστοιχα. Ως μέτρο σύγκρισης χρησιμοποιήθηκε το ποσοστό των λεμφοκυττάρων που ήταν παρόντα στο μικροπεριβάλλον του όγκου επί της συνολικής επιφάνειας. Η παρουσία των λεμφοκυττάρων αυτών εκτιμήθηκε ξεχωριστά για το στρώμα (stromal) του όγκου και μεταξύ των καρκινικών κυττάρων (intratumoral). Επιπλέον, με ανοσοϊστοχημεία εκτιμήσαμε την έκφραση των δεικτών PD1 (programmed death 1) και PDL1 (programmed death ligand 1) τόσο στα καρκινικά κύτταρα όσο και στα ανοσιακά κύτταρα που ήταν παρόντα στο ιστολογικό υλικό.

Εκτός από την ανοσοϊστοχημική ανάλυση των παραπάνω δεικτών στο ιστολογικό υλικό συγκεντρώσαμε επίσης τις κλινικές πληροφορίες των ασθενών: i) στάδιο, ii) βαθμός κακοήθειας (grade), iii) εντόπιση πρωτοπαθούς όγκου σε παχύ έντερο ή στο ορθό, iv) αριστερά η δεξιά αρχική εντόπιση του όγκου, v) χειρουργικά όρια σε περίπτωση εκτομής, vi) είδος χορηγούμενης χημειοθεραπείας (θεραπεία που περιέχει ιρινοτεκάνη ή οξαλιπλατίνη), vii) καρκινικοί δείκτες στη διάγνωση (CEA, Ca-19-9), viii) αριθμό αιμοπεταλίων, ix) LDH. Καταγράψαμε επίσης την ολική επιβίωση των ασθενών (Overall Survival – OS) και την επιβίωση ελεύθερης νόσου (Progress Free Survival-PFS). Το διάστημα ολικής επιβίωσής (OS) ορίστηκε από την ιστολογική διάγνωση έως το θάνατο και το PFS από την έναρξη της 1^{ης} θεραπείας έως την υποτροπή. Τέλος, για την ομάδα ασθενών σταδίου I-II-III (μη μεταστατικοί ασθενείς) συγκεντρώσαμε πληροφορίες σχετικά με το τον συνολικό αριθμό μεταλλάξεων, την παρουσία μεταλλάξεων στα γονίδια KRAS/NRAS και BRAF, καθώς και την παρουσία ανεπάρκειας στα γονίδια επιδιόρθωσης-ανασυνδυασμού (mismatch repair deficiency -MMR).

Τα βασικά κλινικά, εργαστηριακά και ανοσοϊστοχημικά χαρακτηριστικά των ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου παρουσιάζονται στον πίνακα 3.1. Η έκφραση του PDL1 στα καρκινικά κύτταρα ήταν καθολικά αρνητική και ο δείκτης αυτός δεν χρησιμοποιήθηκε στην περεταίρω ανάλυση. Συνολικά εξετάσαμε ιστολογικό υλικό σε μορφή TMAs από 194 ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου. Οι 85 ασθενείς είχαν μεταστάσεις (στάδιο IV κατά TNM), ενώ οι 108 ήταν σταδίου I έως III κατά TNM. Ο βαθμός διαφοροποίησης μπορούσε να εκτιμηθεί σε 185 ασθενείς, σε 152 ασθενείς ο όγκος ήταν καλά ή μέτρια διαφοροποιημένος (Grade 1 & 2), ενώ σε 33 ασθενείς ήταν αδιαφοροποίητος (Grade 3). 42 ασθενείς είχαν καρκίνο του ορθού και 149 καρκίνο στο κόλον. Επιπλέον, όσων αφορά την εντόπιση του πρωτοπαθούς

όγκου, σε 134 ασθενείς ο καρκίνος εντοπίζονταν αριστερά (κατιόν κόλον και ορθό) και σε 57 ασθενείς δεξιά (ανιόν κόλον και εγκάρσιο). Κατά τη διάγνωση 158 ασθενείς ήταν σε πολύ καλή γενική κατάσταση (performance status-PS: 0, κατά ECOG) και 28 ασθενείς είχαν PS 1 ή 2. Από τους 128 ασθενείς που έχουμε δεδομένα θεραπείας, οι 97 έλαβαν σχήμα που περιείχε οξαλιπλατίνη και οι 31 σχήμα με ιρινοτεκάνη.

A.

		N (%)
Stage	I/II/III	108 (56.0%)
	IV	85 (44%)
Histologic grade	1 & 2	152 (82.7%)
	3	33 (17.8%)
Primary Site	COLON	149 (78.0%)
	RECTAL	42 (22.0%)
	LEFT	134 (70.2%)
	RIGHT	57 (29.8%)
Margins	R0	148 (87.1%)
	R1/2	22 (12.9%)
Performance status	0	158 (84.9%)
	1	22 (11.8%)
	2	6 (3.2%)
Regimen	Oxaliplatin	97 (75.8%)
	Irinotecan	31 (24.2%)
MMR-status	Proficient	84 (88.4%)
	Deficient	11 (11.6%)
K/NRAS	Mutant	42 (52.5%)
	Wild-type	38 (47.5%)
BRAF	Mutant	3 (3.8%)
	Wild-type	77 (96.3%)
CEA	≤262	171 (88.2%)
	>262	23 (11.8%)
CA-19-9	≤219	175 (90.2%)
	>219	19 (9.8%)
Platelets	≤152*10 ³	71 (51.5%)
	>152*10 ³	67 (48.5%)
Response	CR/PR	41 (21.1%)
	SD	24 (12.3%)
	PD	9 (4.6%)
	missing	120 (61.8%)

B.

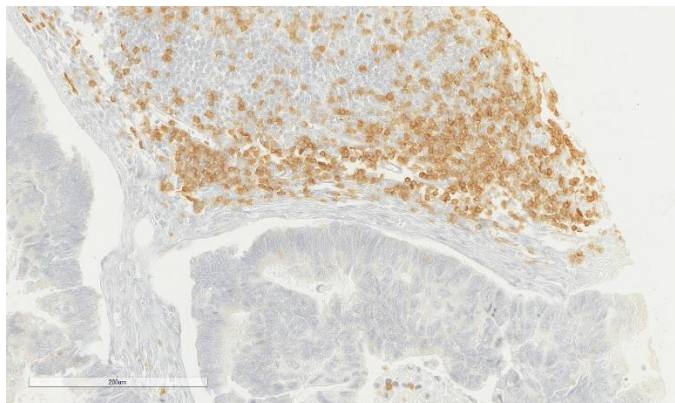
		n (%)
PDL1-Immune cells	(+)	6 (3.1%)
	(-)	188 (96.6%)
PD1-Immune cells	(+)	77 (37.9%)
	(-)	117 (60.3%)
PD1-Tumor cells	(+)	100 (48.5%)
	(-)	94 (51.4%)
CD81-Tumor Cells (Intensity)	Negative	103 (53.1%)
	Mild	65 (33.5%)
	Moderate	17 (8.8%)
	Strong	9 (4.6%)
CD81-Immune Cells	(+)	99 (51.3%)
	(-)	94 (48.7%)
CD82-Tumor Cells (Intensity)	Negative	52 (26.9%)
	Mild	55 (28.5%)
	Moderate	44 (22.8%)
	Strong	42 (21.8%)
CD82-Immune Cells	(+)	104 (73.1%)
	(-)	83 (26.9%)
CD3 intratumoral	(+)	104 (55.6%)
	(-)	83 (44.4%)
CD3 stromal	(+)	178 (95.2%)
	(-)	9 (4.8%)
CD3 stromal (cut-off 20%)	<20%	93 (49.7%)
	>20%	94 (50.3%)
CD8 intratumoral	(+)	108 (57.8%)
	(-)	79 (42.2%)
CD8 Stromal	(+)	171 (91.4%)
	(-)	16 (91.4%)
CD8 Stromal (cut-off 20%)	<20%	148 (79.1%)
	>20%	39 (20.9%)

F.

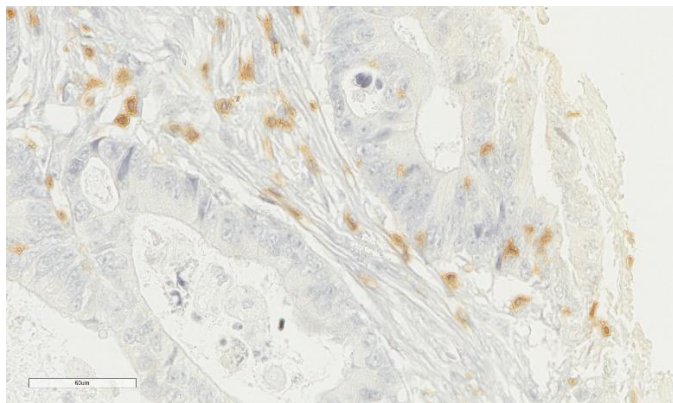
	Mean	SD	Median	Min – Max
PD1-Tumor Cells (%)	36.0	44.9	10	0 – 100
PD1-Immune Cells (%)	6.6	13.1	0	0 – 100
CD81- Tumor Cells (%)	43.2	48.4	0	0 – 100
CD81-Tumor Cells H-Index	60.8	80.8	0	0 – 300
CD81-Immune Cells (%)	29.0	40.0	10	0 – 100
CD82-Tumor Cells (%)	60.4	45.0	100	0 – 100
CD82-Tumor Cells H-Index	117.1	112.2	100	0 – 300
CD82-Immune Cells (%)	56.9	43.9	50	0 – 100
CD3-Intratumoral (%)	1.4	2.3	1	0 – 15
CD3-Stromal (%)	18.4	14.6	20	0 – 80
CD8-Intratumoral (%)	1.2	2.0	1	0 – 15
CD8-Stromal (%)	10.4	8.8	10	0 – 40

Πίνακας 3.1: Βασικά κλινικά, εργαστηριακά και ανοσοϊστοχημικά χαρακτηριστικά ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου. Α) Ποιοτικά κλινικο-εργαστηριακά χαρακτηριστικά. Β) Ανοσοϊστοχημικοί δείκτες. Γ) Συνεχείς μεταβλητές ανοσοϊστοχημικών δεικτών.

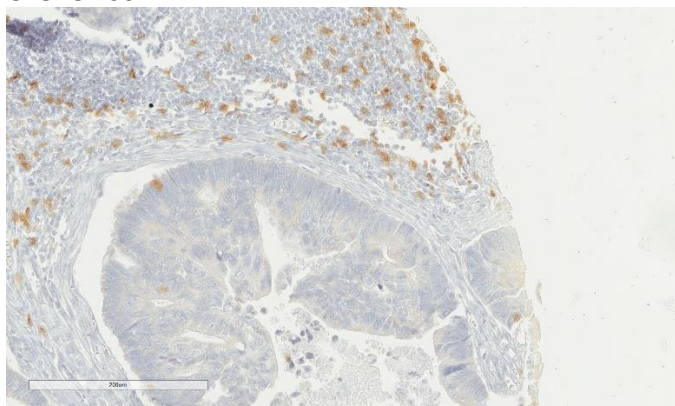
A. CD3 200x



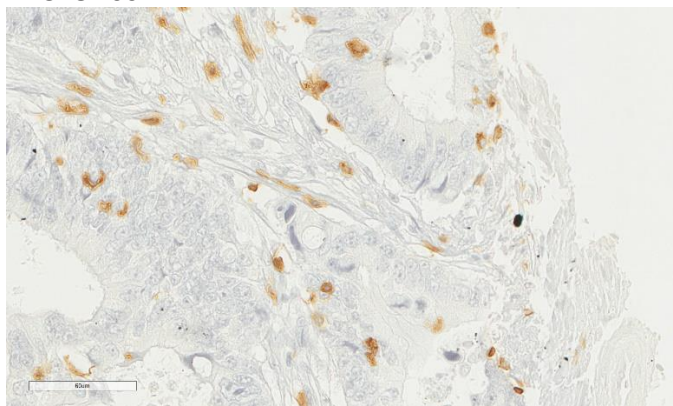
B. CD3 400x



C. CD8 200x

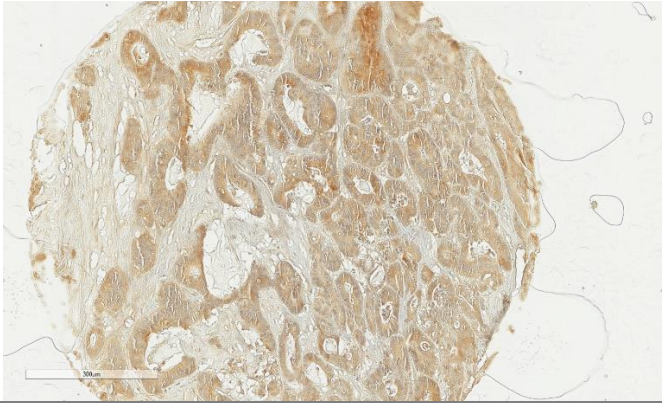


D. CD8 400x

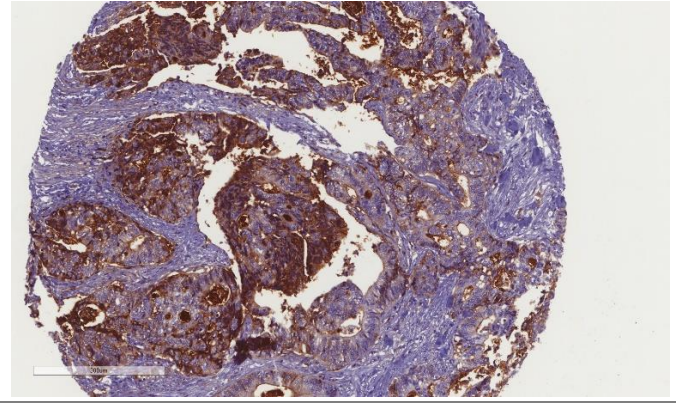


Εικόνα 3.1. Διήθηση CD3 και CD8 λεμφοκυττάρων σε ιστολογικό υλικό ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου. Το ιστολογικό υλικό είναι μονιμοποιημένο με φορμαλδεΰδη-παραφίνη (FFPE) και είναι σε μορφή tissue microarrays (TMAs). Α) CD3 200x μεγέθυνση, Β) CD3 400x μεγέθυνση, Γ) CD8 200x μεγέθυνση, Δ) CD8 400x μεγέθυνση.

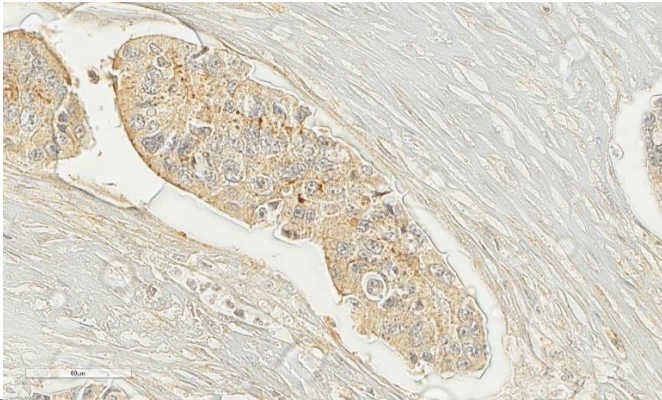
A. CD81 100x



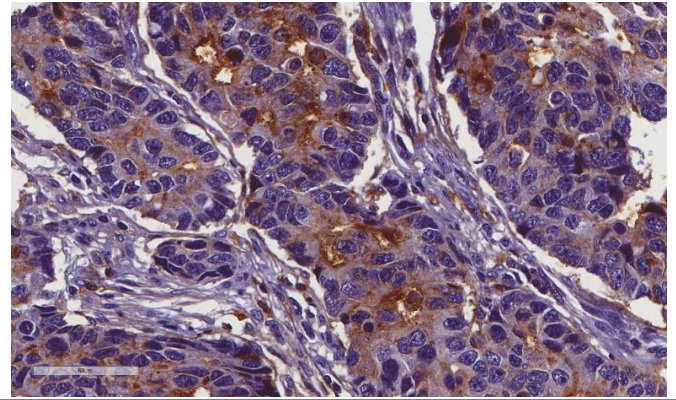
B. CD82 100x



C. CD81 400x

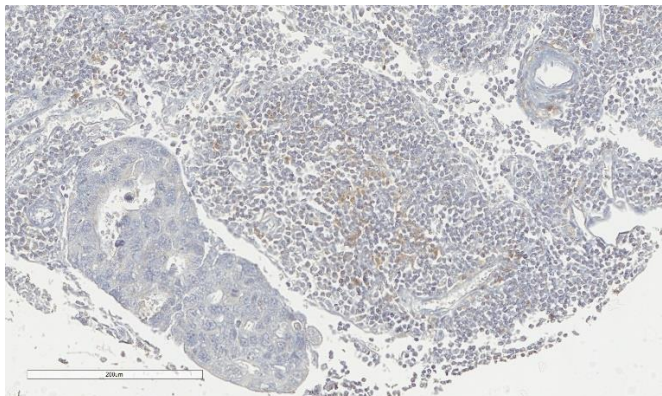


D. CD82 400x

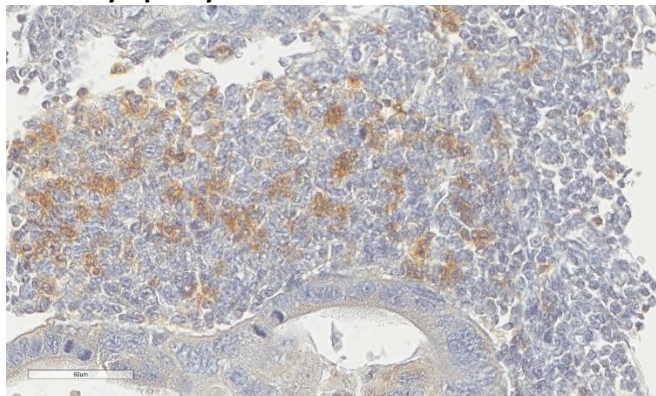


Εικόνα 3.2. Ανοσοϊστοχημική έκφραση CD81 και CD82 σε ιστολογικό υλικό ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου. Το ιστολογικό υλικό είναι μονιμοποιημένο με φορμαλδεΰδη-παραφίνη (FFPE) και είναι σε μορφή tissue microarrays (TMAs). Α) CD81 100x μεγέθυνση, Β) CD82 100x μεγέθυνση, Γ) CD81 400x μεγέθυνση, Δ) CD82 400x μεγέθυνση.

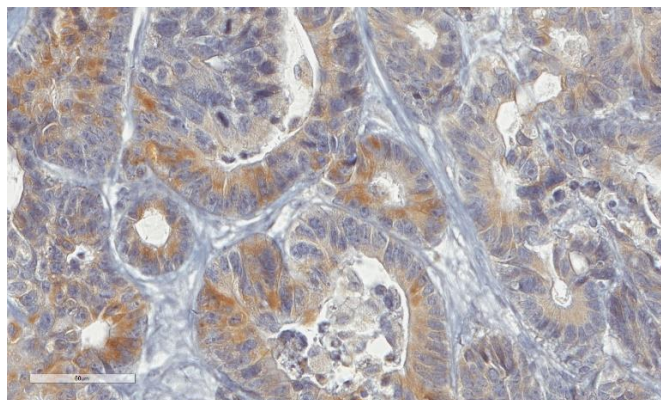
A. PD1 200x



B. PD1 Lymphocytes 400x

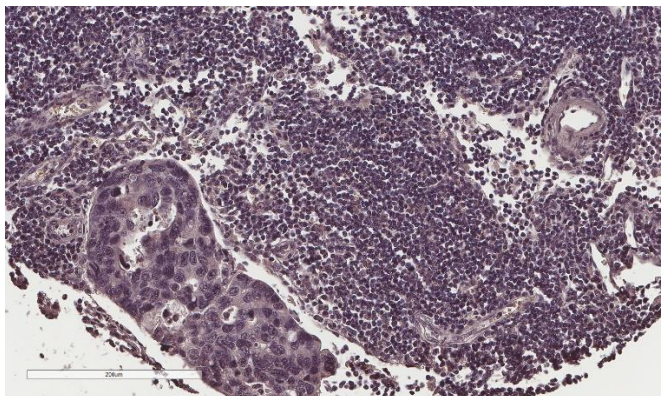


C. PD1 Tumour cells 400x

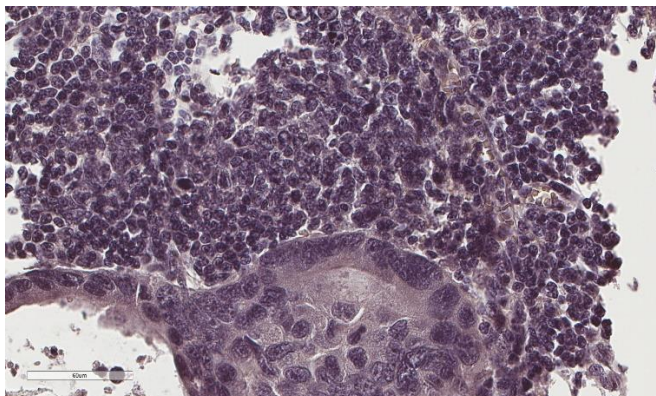


Εικόνα 3.3. Ανοσοϊστοχημική έκφραση PD1 σε ιστολογικό υλικό ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου. Το ιστολογικό υλικό είναι μονιμοποιημένο με φορμαλδεΰδη-παραφίνη (FFPE) και είναι σε μορφή tissue microarrays (TMAs). A) PD1 200x μεγέθυνση, B) PD1 400x μεγέθυνση – έκφραση σε λεμφοκύτταρα, C) PD1 400x μεγέθυνση – έκφραση σε καρκινικά κύτταρα.

A. PDL1 200x



B. PDL1 400x



Εικόνα 3.4. Ανοσοϊστοχημική έκφραση PDL1 σε ιστολογικό υλικό ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου. Το ιστολογικό υλικό είναι μονιμοποιημένο με φορμαλδεΰδη-παραφίνη (FFPE) και είναι σε μορφή tissue microarrays (TMAs). A) PDL1 200x μεγέθυνση, B) PDL1 400x μεγέθυνση.

3.2 Συσχετίσεις μεταξύ κλινικών, εργαστηριακών και παθολόγο-ανατομικών δεδομένων ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου.

Διερευνήσαμε την παρουσία συσχετίσεων μεταξύ όλων των κλινικών, εργαστηριακών και ανοσοϊστοχημικών χαρακτηριστικών των ασθενών που εξετάσαμε στην παρούσα μελέτη. Σκοπός μας ήταν να ερευνήσουμε εάν ορισμένοι ανοσοϊστοχημικοί δείκτες (CD81, CD82, CD3, CD8, PD1, PDL1) επηρεάζονται από τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών και να εντοπίσουμε τις στατιστικά σημαντικές αλληλεξαρτήσεις. Οι συσχετίσεις μεταξύ των συνεχών μεταβλητών πραγματοποιήθηκαν με το μη παραμετρικό test Spearman-correlation. Η σύγκριση των δίτιμων μεταβλητών έγινε με τη χρήση του μη-παραμετρικού test Mann-Whitney-U. Για τις συνεχείς μεταβλητές σε περίπτωση που εντοπίσαμε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση βάση της spearman-correlation ανάλυσης, προχωρήσαμε σε περαιτέρω ανάλυση ώστε να εντοπίσουμε τον βαθμό της διαφοράς. Συγκεκριμένα, μετατρέψαμε τις συνεχείς μεταβλητές σε δίτιμες με τη χρήση της μέσης τιμής ως cut-off και συγκρίναμε τα επίπεδα των δεικτών μεταξύ των ομάδων που δημιουργήθηκαν με τη χρήση Mann-Whitney-U test. Για τα στρωματικά CD8(+) T-λεμφοκύτταρα ως cut-off χρησιμοποιήσαμε το 20% που έχει φανεί από παλιότερες μελέτες ως κλινικά σημαντικό, για όλες τις υπόλοιπες μεταβλητές ως cut-off χρησιμοποιήθηκε η μέση τιμή. Η spearman-correlation ανάλυση μεταξύ των συνεχών μεταβλητών παρουσιάζεται στον πίνακα 3.2. Στον πίνακα 3.3 αναλύσαμε την έκφραση του CD81 στα καρκινικά κύτταρα και στα διηθούντα λεμφοκύτταρα βάση των κλινικο-εργαστηριακών χαρακτηριστικών των ασθενών. Στον πίνακα 3.4 αναλύσαμε την έκφραση του CD82 στα καρκινικά κύτταρα και στα διηθούντα λεμφοκύτταρα βάση των κλινικο-εργαστηριακών χαρακτηριστικών των ασθενών. Στον πίνακα 3.5 αναλύσαμε την έκφραση του PD1 στα καρκινικά κύτταρα και στα διηθούντα λεμφοκύτταρα βάση των κλινικο-εργαστηριακών χαρακτηριστικών των ασθενών. Στον πίνακα 3.6 εξετάσαμε το ποσοστό διηθούντων CD3(+) λεμφοκυττάρων, στο στρώμα (stromal) είτε και εδνο-ογκικά (intra-tumoral) σε σχέση με τα κλινικο-εργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών. Στον πίνακα 3.7 εξετάσαμε το ποσοστό διηθούντων CD8(+) λεμφοκυττάρων, στο στρώμα (stromal)

είτε και εδνο-ογκικά (intra-tumoral) σε σχέση με τα κλινικο-εργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών.

i) Συσχετίσεις μεταξύ των συνεχών μεταβλητών

Το σύνολο της ανάλυσης μεταξύ των συνεχών μεταβλητών παρουσιάζεται στον πίνακα 3.2. Όσον αφορά την έκφραση του CD81 στα καρκινικά κύτταρα διαπιστώσαμε την ύπαρξη θετικής συσχέτισης με το ποσοστό των καρκινικών κυττάρων που εκφράζουν το δείκτη PD1, ενώ αντιθέτως παρατηρήσαμε την παρουσία αρνητικής συσχέτισης με τον αριθμό των αιμοπεταλίων καθώς και με τον αριθμό των λεμφοκυττάρων (CD3-stromal, CD8-intratumoral, CD8-stromal) (πίνακας 3.2). Η παρουσία της αρνητικής συσχέτισης μεταξύ του CD81 στα καρκινικά κύτταρα και του αριθμού των λεμφοκυττάρων σημαίνει ότι όσο υψηλότερη είναι η έκφραση του CD81 στον καρκίνο, τόσο χαμηλότερος είναι ο αριθμός των διηθούντων λεμφοκυττάρων στο μικρο-περιβάλλον του όγκου. Σχετικά με το ποσοστό των λεμφοκυττάρων που εκφράζουν CD81, διαπιστώσαμε την παρουσία θετικής συσχέτισης με το ποσοστό των λεμφοκυττάρων που εκφράζουν PD1, καθώς επίσης και με τα ποσοστά των διηθούντων CD3(+) & CD8(+) λεμφοκυττάρων (πίνακας 3.2). Αντιθέτως, υπήρξε αρνητική συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού των CD81(+) λεμφοκυττάρων και των καρκινικών δεικτών CEA και CA 19-9. Παρομοίως, οι συγκεκριμένοι καρκινικοί δείκτες, CEA και CA 19-9, σχετίζονται επίσης αρνητικά με την έκφραση του CD82 στα καρκινικά κύτταρα (πίνακας 3.2). Πρακτικά, αυτό σημαίνει ότι όσο μεγαλύτερη είναι η έκφραση του CD82 στα καρκινικά κύτταρα τόσο χαμηλότερη θα πρέπει να είναι η τιμή των συγκριμένων καρκινικών δεικτών. Επομένως, σε ασθενείς με υψηλές τιμές των δεικτών CEA, CA 19-9, γεγονός που υποδηλώνει εκτεταμένη νόσο, θα αναμένουμε χαμηλή έκφραση του CD82 στα καρκινικά κύτταρα αντανακλώντας τον προγνωστικό και παράλληλα προστατευτικό ρόλο του δείκτη CD82 στον καρκίνο του παχέος εντέρου.

Όσον αφορά την έκφραση του CD82 στα καρκινικά κύτταρα βρέθηκε θετική συσχέτιση με το ποσοστό των καρκινικών κυττάρων που εκφράζουν PD1, όπως είχε βρεθεί προηγουμένως και με τον δείκτη CD81. Επίσης, υπήρξε θετική συσχέτιση

μεταξύ των CD82(+) λεμφοκυττάρων, με το ποσοστό των λεμφοκυττάρων που εκφράζουν PD1 καθώς και με το ποσοστό των CD3(+) και CD8(+) λεμφοκυττάρων, ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του CD82 στα καρκινικά κύτταρα και του ποσοστού των CD3(+) και CD8(+) λεμφοκυττάρων, γεγονός που σημαίνει ότι η παρουσία στατιστικά σημαντικής αρνητικής συσχέτισης μεταξύ της έκφρασης του CD81 στα καρκινικά κύτταρα και των διηθούντων λεμφοκυττάρων αντικατοπτρίζει την ξεχωριστή λειτουργία και ρόλο της συγκεκριμένης τετρασπανίνης όσων αφορά την ανοσολογική απάντηση στο μικροπεριβάλλον του όγκου (πίνακας 3.2).

	CD81-Tumor Cells <i>H-index</i>		CD81-Immune Cells (%)		CD82-Tumor Cells <i>H-index</i>		CD82-Immune Cells (%)	
	<i>rho</i>	<i>p</i>	<i>rho</i>	<i>p</i>	<i>rho</i>	<i>p</i>	<i>rho</i>	<i>p</i>
Platelets	-0.27	0.001	-0.06	0.462	-0.04	0.67	-0.02	0.788
LDH	0.003	0.974	0.03	0.781	-0.05	0.605	0.06	0.485
CEA	-0.03	0.696	-0.17	0.019	-0.27	0.0001	-0.11	0.137
CA19-9	-0.2	0.784	-0.14	0.051	-0.24	0.001	-0.03	0.687
PD1-Tumor Cells (%)	0.39	0.0001	0.07	0.371	0.29	0.0001	0.13	0.072
PD1-Immune Cells (%)	0.01	0.93	0.28	0.0001	0.12	0.193	0.35	0.0001
CD3-Intratumoral (%)	-0.13	0.193	0.17	0.023	0.05	0.465	0.24	0.001
CD3-Stromal (%)	-0.16	0.031	0.37	0.0001	0.03	0.688	0.45	0.0001
CD8-Intratumoral (%)	-0.18	0.015	0.15	0.041	0.02	0.741	0.25	0.001
CD8-Stromal (%)	-0.24	0.001	0.36	0.0001	0.08	0.279	0.33	0.0001
Number of Mutations	-0.11	0.263	0.03	0.751	-0.09	0.333	-0.01	0.925

Πίνακας 3.2: Συσχετίσεις μεταξύ ανοσοϊστοχημικής μελέτης και κλινικο-εργαστηριακών χαρακτηριστικών ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου (test: Spearman - correlation)

ii) Συσχέτιση του CD81 με κλινικο-εργαστηριακούς παράγοντες των ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου

Η έκφραση του CD81 στα καρκινικά κύτταρα εκτιμήθηκε με τη χρήση του δείκτη H-index, ενώ για τα κύτταρα του ανοσοποιητικού ως μέτρο έκφρασης χρησιμοποιήσαμε το ποσοστό των ανοσιακών κυττάρων που εξέφραζαν το CD81 στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Παρατηρήσαμε ότι η έκφραση του CD81 στα καρκινικά κύτταρα διέφερε ανάλογα με τη γενική κατάσταση των ασθενών (performance status – PS) και τη παρουσία μικροδορυφορικής αστάθειας (MMR), ενώ το ποσοστό των CD81(+) λεμφοκυττάρων διέφερε στους ασθενείς ανάλογα της παρουσίας BRAF-μεταλλάξεων (πίνακας 3.3). Συγκεκριμένα, ασθενείς με καλή γενική κατάσταση (PS0) παρουσίαζαν χαμηλότερη έκφραση του CD81 στα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τους ασθενείς PS1/2 ($p=0.034$). Αντιθέτως, ασθενείς που ήταν MMR-proficient (όλοι ήταν σταδίου I έως III) παρουσίαζαν υψηλότερη έκφραση του CD81 στα καρκινικά τους κύτταρα σε σχέση με MMR-deficient ασθενείς ($p= 0.042$). Το ποσοστό των CD81(+) λεμφοκυττάρων διέφερε ανάλογα του σταδίου νόσου των ασθενών, με τους μεταστατικούς ασθενείς να παρουσιάζουν χαμηλότερα επίπεδα CD81(+) λεμφοκυττάρων ($p = 0.002$). Επιπλέον, οι ασθενείς με BRAF-μεταλλάξεις παρουσίαζαν χαμηλότερα ποσοστά CD81(+) λεμφοκυττάρων στο μικρο-περιβάλλον του όγκου σε σχέση με τους BRAF-wt ασθενείς ($p=0.037$). Όσων αφορά τα ποσοστά των διηθούντων στρωματικών CD3(+) και CD8(+) λεμφοκυττάρων στο μικροπεριβάλλον του όγκου καθώς και του ποσοστού των λεμφοκυττάρων που εξέφραζαν τον δείκτη PD1, αυτά ήταν υψηλότερα στους ασθενείς με τα υψηλότερα ποσοστά CD81(+) λεμφοκυττάρων ($p < 0.01$).

Για να διερευνήσουμε καλύτερα την ύπαρξη αρνητικής συσχέτισης μεταξύ της έκφρασης του CD81 στα καρκινικά κύτταρα και του ποσοστού των CD3(+) και CD8(+) διηθούντων λεμφοκυττάρων, που εντοπίσαμε προηγουμένως από την ανάλυση των συνεχών μεταβλητών, χωρίσαμε τους ασθενείς σε 2 υπο-ομάδες ανάλογα με το ποσοστό διήθησης. Για τα CD8(+) λεμφοκύτταρα που διηθούν το στρώμα του όγκου, το 20% χρησιμοποιήθηκε ως cut-off, για τους υπόλοιπους πληθυσμούς λεμφοκυττάρων χρησιμοποιήθηκε η μέση τιμή ως το cut-off για τον σχηματισμό των ομάδων. Πράγματι, φάνηκε ότι ασθενείς με χαμηλό αριθμό διηθούντων κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων (CD8-intratumoral lymphocytes $< 1.2\%$ & CD8-

stromal lymphocytes <20%) παρουσίαζαν υψηλότερη έκφραση του CD81 στα καρκινικά τους κύτταρα ($p=0.018$ & $p=0.001$ αντίστοιχα) (πίνακας 3.3). Μάλιστα, η διαφορά στην έκφραση της CD81 ανάλογα της παρουσίας στο στρώμα του όγκου των CD8(+) T-λεμφοκυττάρων παρέμεινε στατιστικά σημαντική ανεξάρτητα του σταδίου νόσου (στάδιο I-II-III $p=0.009$; στάδιο IV: $p=0,037$), υποδηλώνοντας ότι το CD81 αποτελεί ανεξάρτητο, αρνητικό, προγνωστικό παράγοντα για τη διήθηση των κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων στο μικροπεριβάλλον του όγκου.

CD81		CD81-Tumor Cells				CD81-Immune Cells		
			H-index			H-index		
		<u>n</u>	<u>Mean</u>	<u>Median</u>	<u>p</u>	<u>Mean</u>	<u>Median</u>	<u>p</u>
Stage	I-II-III	108	57.96	0	0.411	38.32	10	0.002
	IV	85	63.88	10		16.36	0	
Histologic Grade	1 & 2	152	60.66	0	0.615	27.24	5.5	0.262
	3	33	62.73	0		37.5	10	
Primary Site	Left	134	57.46	0	0.878	26.2	0	0.216
	Right	57	64.74	0		36.25	10	
Performance status	0	158	55.25	0	0.034	29.11	10	0.224
	1 & 2	28	87.86	100		17.89	0	
Margins	R0	148	63.45	0	0.584	29.39	0	0.798
	R1/2	22	54.55	0		21.41	5.5	
MMR-status	Prof.	84	61.67	0	0.042	35.06	10	0.629
	Def.	11	13.64	0		47.27	20	
K/NRAS	(+)	42	54.76	0	0.784	40.49	10	0.967
	(-)	38	49.74	0		36.05	10	
BRAF	(+)	3	33.33	0	0.793	100	100	0.037
	(-)	77	53.12	0		35.92	10	
Platelets	$\leq 152 \times 10^3$	71	70.7	100	0.061	26.77	1	0.515
	$> 152 \times 10^3$	67	49.25	100		20.45	0	
CEA	≤ 262.2	171	60.64	0	0.811	30.36	10	0.544
	> 262.2	23	61.74	0		18.7	10	
CA 19-9	≤ 219.8	175	62.11	0	0.515	30	10	0.72
	> 219.8	19	48.42	0		19.53	10	
PDL1-Immune cells	(-)	188	62.18	0	0.135	27.71	1	0.037
	(+)	6	16.67	0		68.33	100	
PD1-Tumor Cells	≤ 36	124	33.79	0	<0.001	26.7	5.5	0.497
	> 36	70	108.57	100		33.04	10	
PD1-Immune Cells	≤ 6.6	137	61.53	0	0.704	23.39	0	0.001
	> 6.6	57	58.95	10		42.28	20	
CD3-intratumoral	≤ 1.4	147	64.15	0	0.35	27.4	0	0.144
	> 1.4	40	43.25	0		35	10	
CD3-stromal	≤ 18.4	93	70.54	10	0.109	16.32	0	<0.001
	> 18.4	94	48.94	0		41.49	20	
CD8-intratumoral	≤ 1.2	145	68.07	0	0.018	26.4	0	0.082
	> 1.2	42	30.95	0		37.62	10	
CD8-stromal	$\leq 20\%$	148	69.73	30	0.001	21.74	0	<0.001
	$> 20\%$	39	21.79	0		44.41	30	
Response	CR&PR	41	55.61	0	0.955	16.59	0	0.925
	SD	24	58.33	0		14.58	0	
	PD	9	88.89	0		22.23	0	

Πίνακας 3.3: Μονο-παραγοντική ανάλυση της έκφρασης του CD81 στα καρκινικά κύτταρα και στα κύτταρα του ανοσοποιητικού.

iii) Συσχέτιση του CD82 με κλινικο-εργαστηριακούς παράγοντες των ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου

Για να διερευνήσουμε καλύτερα τον ρόλο των καρκινικών δεικτών σε σχέση με την τετρασπανίνη CD82 δημιουργήσαμε υπο-ομάδες χρησιμοποιώντας ως cut-off την μέση τιμή των δεικτών CEA και CA 19-9. Παρατηρήσαμε ότι η έκφραση του CD82 στα καρκινικά κύτταρα είναι χαμηλότερη στους ασθενείς με υψηλές τιμές CEA ή CA 19-9 (CEA: $p < 0.001$; CA 19-9: $p = 0.02$) (πίνακας 3.4). Παρομοίως, παρατηρούμε ότι ασθενείς με υψηλότερου βαθμού κακοήθειας (σταδίου IV) παρουσιάζουν χαμηλότερη έκφραση του CD82 στα καρκινικά τους κύτταρα συγκριτικά με μη μεταστατικούς ασθενείς (στάδιο I-II-III) με τη διαφορά που προκύπτει να είναι στατιστικά σημαντική ($p < 0.001$) (πίνακας 3.4). Επιπλέον, η μέση έκφραση του CD82 στον καρκινικό ιστό των ασθενών που είχαν εκτομή με καθαρά όρια (R0) ήταν υψηλότερη έναντι των ασθενών όπου η πλήρης χειρουργική εξαίρεση δεν μπορούσε να επιτευχθεί (R1/2) ($p = 0.035$). Τα παραπάνω ευρήματα συμβαδίζουν με τον ρόλο του CD82 ως καταστολέα της εξέλιξης του όγκου. Ενδιαφέρον είναι επίσης ότι οι πρωτοπαθής όγκοι που εντοπίζονται δεξιά παρουσιάζουν υψηλότερη έκφραση του CD82 από τους όγκους που εντοπίζονται αριστερά ($p = 0.008$). (πίνακας 3.4).

Σχετικά με την έκφραση του CD82 στα κύτταρα του ανοσοποιητικού, παρατηρήσαμε αυξημένο ποσοστό CD82(+) λεμφοκυττάρων σε ασθενείς που ήταν σε καλή γενική κατάσταση (PS 0), έναντι των ασθενών με PS 1 ή 2 ($p = 0.016$) (πίνακας 3.4). Επιπλέον, το ποσοστό των CD82(+) λεμφοκυττάρων διέφερε ανάλογα με το στάδιο νόσου, με ασθενείς που ήταν σταδίου I-II-III να παρουσιάζουν υψηλότερο ποσοστό διηθούντων λεμφοκυττάρων με θετική έκφραση του CD82, έναντι ασθενών σταδίου IV ($p < 0.001$). Παρομοίως, υψηλό ήταν το ποσοστό των CD82(+) λεμφοκυττάρων σε ασθενείς με χαμηλούς καρκινικούς δείκτες CEA & CA 19-9 ($p < 0.001$ και $p = 0.029$ αντίστοιχα) καθώς επίσης και σε ασθενείς με αυξημένη έκφραση του PD1 στα καρκινικά κύτταρα ($p = 0.003$) (πίνακας 3.4)

CD82			CD82-Tumor Cells H-index			CD82-Immune Cells (%)		
		<u>n</u>	<u>Mean</u>	<u>Median</u>	<u>p</u>	<u>Mean</u>	<u>Median</u>	<u>p</u>
Stage	I-II-III	108	146.76	120	<0.001	66.11	100	<0.001
	IV	84	76.79	35		45.12	30	
Histologic Grade	1 & 2	151	111.85	100	0.37	59.27	80	0.301
	3	33	129.39	100		50	50	
Primary Cite	Left	133	100.45	80	0.008	57.97	50	0.532
	Right	57	154.04	120		53.51	80	
Performance status	0	157	120.7	100	0.349	60.19	80	0.016
	1 & 2	28	93.21	35		36.79	20	
Margins	R0	147	118.98	100	0.035	57.07	50	0.964
	R1/2	22	60.91	50		59.55	80	
MMR-status	Prof.	84	139.88	100	0.424	65.36	100	0.572
	Def.	10	164	150		73	100	
K/NRAS	(+)	42	155.48	170	0.391	58.33	75	0.17
	(-)	38	130.79	100		71.32	100	
BRAF	(+)	3	216.67	300	0.315	50	50	0.563
	(-)	77	140.91	100		65.06	100	
Platelets	≤152*10 ³	71	106.06	60	0.676	55.07	80	0.707
	>152*10 ³	67	100.45	80		58.21	60	
CEA	≤262.2	170	127.41	100	<0.001	60.59	100	<0.001
	>262.2	23	40.87	10		29.57	0	
CA 19-9	≤219.8	174	123.1	100	0.02	58.68	80	0.029
	>219.8	19	62.11	10		40.53	20	
PDL1-Immune cells	(-)	187	115.4	100	0.229	56.31	50	0.195
	(+)	6	170	160		75	100	
PD1-Tumor Cells (%)	≤36	123	94.15	60	<0.001	53.5	50	0.003
	>36	70	157.43	200		62.86	100	
PD1-Immune Cells (%)	≤6.6	136	110.88	100	0.181	48.01	50	0.119
	>6.6	57	131.93	100		78.07	100	
CD3-intratumoral (%)	≤1.4	146	112.19	100	0.437	54.11	50	0.504
	>1.4	40	128.75	100		70.25	100	
CD3-stromal (%)	≤18.4	92	113.37	100	0.872	40.65	20	0.714
	>18.4	94	118.09	100		74.15	100	
CD8-intratumoral (%)	≤1.2	144	114.93	100	0.768	55.42	50	0.991
	>1.2	42	123.1	100		67.38	100	
CD8-stromal (%)	≤20%	147	119.18	100	0.872	51.5	50	0.714
	>20%	39	107.69	80		72.37	100	
Response	CR/PR	40	81.75	50	0.829	45.75	50	0.779
	SD	24	55.83	15		49.17	40	
	PD	9	77.78	30		36.67	20	

Πίνακας 3.4: Μονο-παραγοντική ανάλυση της έκφρασης του CD82 στα καρκινικά κύτταρα και στα κύτταρα του ανοσοποιητικού.

iv) Συσχέτιση του PD1 με κλινικο-εργαστηριακούς παράγοντες των ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου

Το σύνολο της ανάλυσης που αφορά την έκφραση του δείκτη PD1 στα καρκινικά κύτταρα ή στα λεμφοκύτταρα παρουσιάζεται στον πίνακα 3.5. Το ποσοστό των καρκινικών κυττάρων που εξέφραζαν τον δείκτη PD1 διέφερε ανάλογα με το στάδιο του ασθενούς, με τα μικρότερα ποσοστά να εμφανίζονται στους μεταστατικούς ασθενείς ($p < 0.001$). Παρομοίως, υψηλότερα ποσοστά καρκινικών κυττάρων που εκφράζουν τον δείκτη PD1 διαπιστώθηκαν στους ασθενείς με χαμηλούς καρκινικούς δείκτες CEA ή και CA 19-9 ($p = 0.038$ & $p = 0.023$) αντίστοιχα. Επιπλέον ασθενείς με υψηλά ποσοστά PD1(+) καρκινικών κυττάρων παρουσίαζαν και υψηλή έκφραση των δεικτών CD81 και CD82 στα καρκινικά κύτταρα βάση του H-index ($p < 0.001$).

Όσον αφορά την έκφραση του PD1 στα λεμφοκύτταρα παρατηρήσαμε ότι ασθενείς με υψηλά ποσοστά PD1(+) λεμφοκυττάρων ήταν συνήθως μη μεταστατικοί (στάδιο I-II-III), ήταν σε καλή γενική κατάσταση (PS:0) και οι τιμές των καρκινικών τους δεικτών CEA και CA 19-9 ήταν χαμηλότερες (πίνακας 3.5). Επιπλέον, ασθενείς αυξημένα ποσοστά λεμφοκυττάρων που εξέφραζαν τις τετρασπανίνες CD81 και CD82 καθώς και CD3(+) και CD8(+) λεμφοκύτταρα παρουσίαζαν και υψηλότερα ποσοστά PD1(+) λεμφοκυττάρων (πίνακας 3.5)

PD1		PD1-Tumor Cells (%)				PD1- Immune cells (%)		
		<u>n</u>	<u>Mean</u>	<u>Median</u>	<u>p</u>	<u>Mean</u>	<u>Median</u>	<u>p</u>
Stage	I-II-III	108	49.68	25	<0.001	9.46	1	<0.001
	IV	85	17.88	0		2.69	0	
Histologic Grade	1 & 2	152	36.81	10	0.806	7.3	0	0.172
	3	33	35.45	0		4.45	0	
Primary Cite	Left	134	31.08	0	0.058	5.76	0	0.277
	Right	57	47.72	20		8.4	0	
Performance status	0	158	36.68	10	0.503	6.8	0	0.013
	1 & 2	28	28.21	5		2.71	0	
Margins	R0	148	38.61	10	0.655	6.48	0	0.675
	R1/2	22	29.55	10		5.55	0	
MMR-status	Prof.	84	51.85	50	0.104	7.39	1	0.415
	Def.	11	34.55	0		15	5	
K/NRAS	(+)	42	44.29	10	0.781	7.69	0.5	0.544
	(-)	38	46.84	25		12.42	1	
BRAF	(+)	3	40	20	0.981	8.33	5	0.774
	(-)	77	45.71	10		10	1	
Platelets	≤152*10 ³	69	35.8	0	0.33	9.18	0	0.181
	>152*10 ³	69	25.07	0		4.69	0	
CEA	≤262.2	171	38.51	10	0.038	7.2	0	0.003
	>262.2	23	17.39	0		1.74	0	
CA 19-9	≤219.8	175	38.66	10	0.023	6.98	0	0.043
	>219.8	19	11.58	0		2.63	0	
PDL1-Immune cells	(-)	188	35.98	10	0.965	6.06	0	0.148
	(+)	6	36.67	10		21.83	5.5	
CD81-Tumor Cells H-Index	≤60.77	113	24.03	0	<0.001	6.85	0	0.863
	>60.77	81	52.72	50		6.42	0	
CD81-Immune Cells (%)	≤28.97	129	33.06	5	0.349	5.43	0	0.007
	>28.97	64	40.94	10		8.91	1	
CD82-Tumor Cells H-Index	≤117.1	116	27.46	0	<0.001	5.43	0	0.545
	>117.1	77	49.35	30		8.32	0	
CD82-Immune Cells (%)	≤56.89	97	31.13	0	0.076	3.26	0	<0.001
	>56.89	96	41.3	10		9.95	1	
CD3-intratumoral (%)	≤1.4	147	36.12	10	0.811	5.93	0	0.027
	>1.4	40	34.38	2.5		9.48	1.5	
CD3-stromal (%)	≤18.4	93	30.43	0	0.208	2.96	0	<0.001
	>18.4	94	41.01	10		10.37	3.5	
CD8-intratumoral (%)	≤1.2	145	35.55	10	0.542	6.2	0	0.364
	>1.2	42	35.95	0		7.88	0	
CD8-stromal (%)	≤20%	148	35.81	10	0.634	5.31	0	<0.001
	>20%	39	35	0		11.38	5	
Response	CR/PR	41	16.34	0	0.932	3.05	0	0.374
	SD	24	14.17	0		3.21	0	
	PD	9	23.33	0		0.11	0	

Πίνακας 3.5: Μονο-παραγοντική ανάλυση της έκφρασης του PD1 στα καρκινικά κύτταρα και στα κύτταρα του ανοσοποιητικού.

iv) Συσχέτιση του των CD3(+) T-λεμφοκυττάρων στο μικρο-περιβάλλον του όγκου με κλινικο-εργαστηριακούς παράγοντες των ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου

Διαπιστώσαμε διαφορά στο ποσοστό των διηθούντων ενδο-ογκικών CD3(+) λεμφοκυττάρων στους ασθενείς με αυξημένα ποσοστά CD82(+) και PD1(+) λεμφοκυττάρων, καθώς επίσης και στους BRAF-mutated ασθενείς. Ωστόσο η σύγκριση βάση της BRAF μετάλλαξης είναι επισφαλής λόγω του μικρού αριθμού των ασθενών με μεταλλάξεις του BRAF (πίνακας 3.6).

Όσον αφορά τη διήθηση στο στρώμα του όγκου από CD3(+) λεμφοκύτταρα παρατηρήσαμε υψηλότερα ποσοστά διήθησης CD3(+) λεμφοκυττάρων στους μη μεταστατικούς ασθενείς (St. I-II-III) καθώς και σε ασθενείς με καλή γενική κατάσταση (PS 0). Επιπλέον, σε ασθενείς με υψηλή έκφραση CD81 στα καρκινικά κύτταρα βάση του H-index η διήθηση των CD3(+) λεμφοκυττάρων στο στρώμα ήταν χαμηλή. Αντιθέτως, ασθενείς με υψηλά ποσοστά CD3(+) λεμφοκυττάρων στο στρώμα παρουσιάζουν επίσης υψηλή έκφραση των δεικτών PDL1, PD1, CD81 και CD82 στα λεμφοκύτταρα (πίνακας 3.6).

CD3		CD3-Intratumoral (%)				CD3-Stromal (%)		
		<u>n</u>	<u>Mean</u>	<u>Median</u>	<u>p</u>	<u>Mean</u>	<u>Median</u>	<u>p</u>
Stage	I-II-III	107	1.06	1	0.605	20.26	20	<0.001
	IV	80	1.76	1		15.98	10	
Histologic Grade	1 & 2	146	1.34	1	0.56	18.85	20	0.303
	3	32	1.38	1		17.66	15	
Primary Cite	Left	130	1.32	1	0.974	17.48	15	0.262
	Right	55	1.47	1		20.96	20	
Performance status	0	153	1.39	1	0.59	19.01	20	0.007
	1 & 2	27	1.22	0		13.59	10	
Margins	R0	141	1.33	1	0.23	19.12	20	0.293
	R1/2	22	2.09	1		19.05	10	
MMR-status	Prof.	84	2.82	1	0.094	19.35	20	0.077
	Def.	11	0.82	1		26.09	30	
K/NRAS	(+)	42	1.14	1	0.837	20.43	20	0.656
	(-)	38	1.32	1		22.24	20	
BRAF	(+)	3	3.33	4	0.011	40	40	0.064
	(-)	77	1.14	1		20.56	20	
Platelets	≤152*10 ³	68	1.31	1	0.219	18.24	15	0.98
	>152*10 ³	64	1.83	1		17.83	20	
CEA	≤262.2	164	1.29	1	0.764	18.77	20	0.236
	>262.2	23	1.87	1		15.96	10	
CA 19-9	≤219.8	168	1.36	1	0.901	18.38	20	0.326
	>219.8	19	1.37	1		18.84	10	
PDL1-Immune cells	(-)	181	1.31	1	0.254	17.77	15	0.003
	(+)	6	2.83	1.5		38.33	35	
CD81-Tumor Cells H-Index	≤60.77	110	1.43	1	0.2	20.51	20	0.026
	>60.77	77	1.26	0		15.45	15	
CD81-Immune Cells (%)	≤28.97	125	1.31	1	0.114	15.93	10	<0.001
	>28.97	61	1.48	1		23.72	20	
CD82-Tumor Cells H-Index	≤117.1	112	1.33	1	0.663	18.37	17.5	0.671
	>117.1	74	1.42	1		18.74	20	
CD82-Immune Cells (%)	≤56.89	92	0.96	0	0.005	13.14	10	<0.001
	>56.89	94	1.77	1		23.78	20	
PD1-Tumor Cells (%)	≤36	120	1.38	1	0.327	18.08	15	0.188
	>36	67	1.31	0		19.04	20	
PD1-Immune Cells (%)	≤6.6	131	1.17	1	0.024	15.47	10	<0.001
	>6.6	56	1.8	1		25.36	20	
Response	CR/PR	39	1.64	1	0.705	15.18	5	0.32
	SD	23	2.43	1		18.39	10	
	PD	8	0.63	0.5		9.63	7.5	

Πίνακας 3.6: Μονο-παραγοντική ανάλυση των CD3(+) T-λεμφοκυττάρων στο μικρο-περιβάλλον του όγκου με κλινικο-εργαστηριακούς παράγοντες των ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου.

ν) Συσχέτιση του των CD8(+) T-λεμφοκυττάρων στο μικροπεριβάλλον του όγκου με κλινικο-εργαστηριακούς παράγοντες των ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου

Ενδο-ογκικά παρατηρήσαμε ότι τα CD8(+) λεμφοκύτταρα ήταν λιγότερα στους ασθενείς με υψηλή έκφραση του CD81 βάση του H-index στα καρκινικά κύτταρα, ενώ αντιθέτως το ποσοστό των CD8(+) ενδο-ογκικών λεμφοκυττάρων ήταν υψηλότερο σε ασθενείς με υψηλά ποσοστά PD1(+) και CD82(+) λεμφοκυττάρων (πίνακας 3.7).

Όσον αφορά το στρώμα το ποσοστό των διηθούντων CD8(+) λεμφοκυττάρων διέφερε ανάλογα με την γενική κατάσταση των ασθενών και τα όρια της χειρουργικής εκτομής. Συγκεκριμένα, τα ποσοστά των CD8(+) λεμφοκυττάρων στο στρώμα ήταν υψηλότερα στους ασθενείς με καλή γενική κατάσταση (PS 0 έναντι PS 1/2) και στους ασθενείς που είχαν R0 εκτομή έναντι R1/2. Παρομοίως, διαπιστώσαμε ότι οι ασθενείς με μικροδορυφορική αστάθεια (MMR-deficient), καθώς και οι ασθενείς με χαμηλές τιμές των καρκινικών δεικτών CEA και CA 19-9 είχαν υψηλότερα ποσοστά διηθούντων CD8(+) λεμφοκυττάρων στο στρώμα του όγκου. Υψηλότερα ποσοστά στρωματικών CD8(+) λεμφοκυττάρων διαπιστώσαμε επίσης σε ασθενείς με υψηλά ποσοστά CD81(+), CD82(+), PDL1(+) και PD1(+) λεμφοκυττάρων. Αντιθέτως, ασθενείς με υψηλή έκφραση του CD81 βάση του H-index στα καρκινικά τους κύτταρα παρουσιάζουν χαμηλά ποσοστά διήθησης CD8(+) λεμφοκυττάρων στο στρώμα (πίνακας 3.7).

CD8		CD8-Intratumoral (%)				CD8-Stromal (%)		
		<u>n</u>	<u>Mean</u>	<u>Median</u>	<u>p</u>	<u>Mean</u>	<u>Median</u>	<u>p</u>
Stage	I-II-III	107	1.32	1	0.114	12.7	10	<0.001
	IV	79	1.1	1		7.24	3	
Histologic Grade	1 & 2	147	1.29	1	0.808	10.43	10	0.781
	3	31	1.06	1		10.9	10	
Primary Cite	Left	129	1.11	1	0.489	9.45	10	0.167
	Right	56	1.52	1		12.57	10	
Performance status	0	153	1.25	1	0.394	10.87	10	0.018
	1 & 2	27	1.11	0		7.67	5	
Margins	R0	142	1.36	1	0.273	10.77	10	0.026
	R1/2	22	0.73	0		8.18	2.5	
MMR-status	Prof.	84	1.05	1	0.021	12.08	10	0.047
	Def.	11	3	2		18.09	20	
K/NRAS	(+)	42	1.29	1	0.782	12.24	10	0.259
	(-)	38	1.61	1		14	12.5	
BRAF	(+)	3	3	2	0.103	21.67	20	0.072
	(-)	77	1.38	1		12.74	10	
Platelets	≤152*10 ³	68	1.24	1	0.917	10.62	10	0.456
	>152*10 ³	64	1.27	1		9.17	10	
CEA	≤262.2	165	1.29	1	0.226	10.9	10	0.012
	>262.2	22	0.77	0		6.64	4	
CA 19-9	≤219.8	170	1.29	1	0.203	10.64	10	0.038
	>219.8	17	0.59	0		8	2	
PDL1-Immune cells	(-)	181	1.17	1	0.373	10.01	10	0.014
	(+)	6	3	1		22.17	22.5	
CD81-Tumor Cells H-Index	≤60.77	110	1.38	1	0.036	11.96	10	0.003
	>60.77	77	1.01	1		8.16	6	
CD81-Immune Cells (%)	≤28.97	125	1.18	1	0.095	8.88	7	<0.001
	>28.97	61	1.34	1		13.59	10	
CD82-Tumor Cells H-Index	≤117.1	111	1.21	1	0.795	10.21	10	0.441
	>117.1	75	1.28	1		10.79	10	
CD82-Immune Cells (%)	≤56.89	90	0.9	0	0.009	8.42	5.5	<0.001
	>56.89	96	1.55	1		12.33	10	
PD1-Tumor Cells (%)	≤36	120	1.21	1	0.281	10.29	10	0.689
	>36	67	1.27	0		10.58	8	
PD1-Immune Cells (%)	≤6.6	132	1.09	1	0.032	8.63	6.5	<0.001
	>6.6	55	1.56	1		14.64	15	
Response	CR/PR	38	0.74	1	0.777	6.55	2	0.076
	SD	23	1.78	1		10.17	10	
	PD	8	0.88	0.5		4.5	1	

Πίνακας 3.7: Μονο-παραγοντική ανάλυση των CD3(+) T-λεμφοκυττάρων στο μικρο-περιβάλλον του όγκου με κλινικο-εργαστηριακούς παράγοντες των ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου.

3.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την επιβίωση των ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου.

Επόμενο ερώτημα μας ήταν να διερευνήσουμε την πιθανή επίπτωση των τετρασπανινών CD81 & CD82 στην πρόγνωση των ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου. Για το λόγο αυτό συγκρίναμε την επιβίωση των ασθενών βάση της έκφρασης των τετρασπανινών CD81 & CD82 στα καρκινικά κύτταρα και στα λεμφοκύτταρα. Επιπλέον, εξετάσαμε την προγνωστική αξία και των άλλων των χαρακτηριστικών των ασθενών που καταγράψαμε στη μελέτη συμπεριλαμβανομένων της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των δεικτών PD1 και PDL1, της διήθησης στο μικροπεριβάλλον του όγκου από CD3(+) ή και CD8(+) λεμφοκύτταρα, των καρκινικών δεικτών CEA και CA 19-9, το στάδιο νόσου, το βαθμό διαφοροποίησης (histologic grade), τα όρια εκτομής, την θέση του πρωτοπαθούς όγκου αριστερά ή δεξιά, την παρουσία BRAF και N/KRAS μεταλλάξεων ή μικροδορυφορικής αστάθειας και του αριθμού των αιμοπεταλίων. Ορίσαμε την ολική επιβίωση (OS) από την ιστολογική διάγνωση έως τον θάνατο και την επιβίωση ελεύθερης νόσου (PFS) από την έναρξη της θεραπείας ως την πρόοδο νόσου ή το θάνατο.

i) Προγνωστική αξία των τετρασπανινών CD81 & CD82.

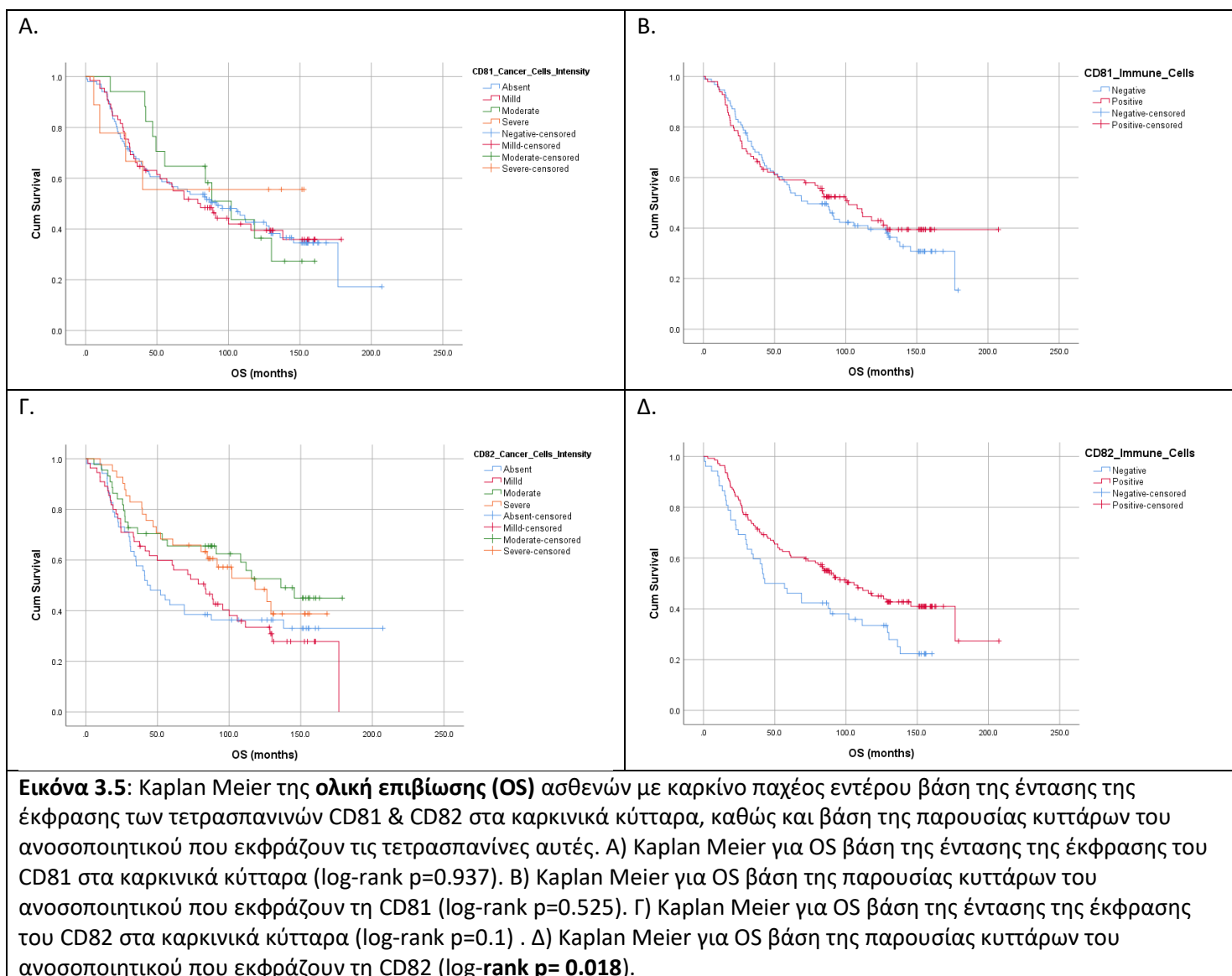
Η επιβίωση ελεύθερης νόσου (PFS) και η ολική επιβίωση (OS) των ασθενών συγκρίθηκε βάση της έντασης της ανοσοϊστοχημικής χρώσης (intensity: απούσα, λίγη, μέτρια, έντονη) των τετρασπανινών CD81 και CD82 στα καρκινικά κύτταρα. Για να εκτιμήσουμε την προγνωστική αξία των CD81(+) και CD82(+) λεμφοκυττάρων, χωρίσαμε τους ασθενείς σε δύο υπο-ομάδες βάση της παρουσίας ή όχι λεμφοκυττάρων που εκφράζουν τους συγκεκριμένους δείκτες στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Τα OS και PFS συγκρίθηκαν με τη χρήση του log-rank test και εκτιμήθηκαν ξεχωριστά για τα στάδια I-II-III και για το στάδιο IV, αλλά και στο σύνολο των ασθενών.

Βάση της έντασης της έκφρασης της τετρασπανίνης CD81 στα καρκινικά κύτταρα δεν παρατηρήσαμε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά στη ολική επιβίωση (OS),

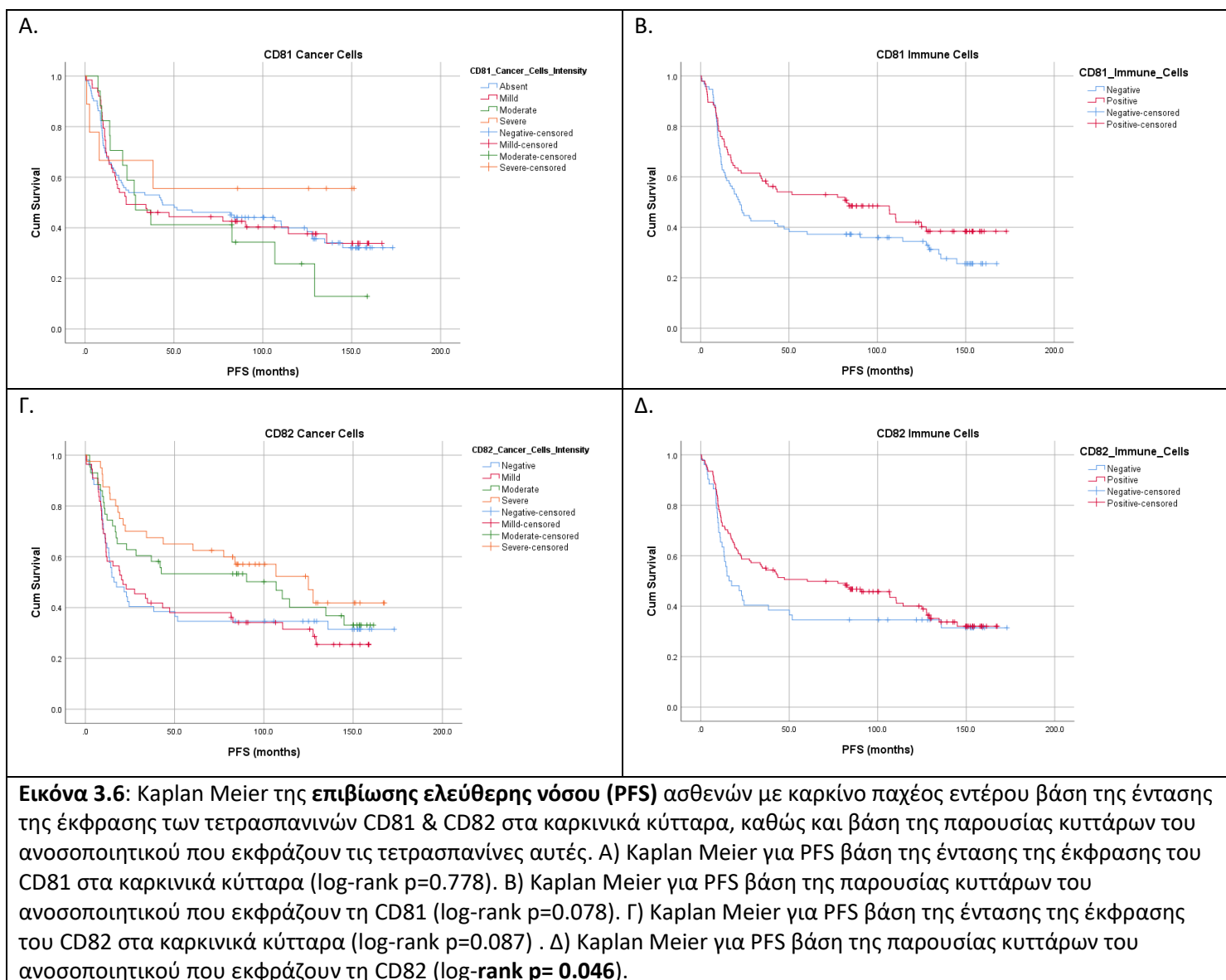
ούτε στην επιβίωση ελεύθερης νόσου (PFS) (εικόνες 3.1 & 3.2; πίνακες 3.8 & 3.9). Επιπλέον, αν και οι Kaplan Meier καμπύλες για το OS και το PFS φαίνεται να ξεχωρίζουν μεταξύ των ασθενών με CD81(+) και CD81(-) λεμφοκύτταρα, οι διαφορές που εντοπίσαμε δεν ήταν στατιστικά σημαντικές (εικόνες 3.1 & 3.2; πίνακες 3.8 & 3.9). Παρομοίως, το PFS και το OS επίσης δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά όσον αφορά την ένταση της έκφρασης του CD82 στα καρκινικά κύτταρα. Αντιθέτως, στατιστικά σημαντική διαφορά διαπιστώσαμε ανάλογα της παρουσίας των λεμφοκυττάρων που εκφράζουν ή όχι την τετρασπανίνη CD82 (εικόνες 3.1 & 3.2; πίνακες 3.8 & 3.9).

OS-Univariate		Overall				Stage I-II-III			Stage IV		
Features		n	Deaths	Median OS	p	n	Deaths	p	n	Deaths	p
CD81-Tumor Cells (Intensity)	Absent	102	61%	91.6	0.937	60	40%	0.542	42	90%	0.546
	Mild	65	58%	80.4		32	25%		32	91%	
	Moderate	17	65%	101.9		9	33%		8	100%	
	Strong	9	44%	n.r		6	17%		3	100%	
CD81-Immune Cells	(-)	94	65%	73.2	0.525	45	36%	0.79	49	92%	0.572
	(+)	98	55%	101.9		61	33%		36	92%	
CD82-Tumor Cells (Intensity)	Absent	52	65%	43	0.1	21	24%	0.116	31	94%	0.617
	Mild	55	69%	83.3		29	48%		26	92%	
	Moderate	44	48%	136.2		27	26%		17	82%	
	Strong	41	51%	118.2		30	33%		10	100%	
CD82-Immune Cells	(-)	52	73%	43	0.018	20	30%	0.353	32	100%	0.004
	(+)	140	54%	105.7		87	34%		52	87%	
Πίνακας 3.8: Μονοπαραγοντική ανάλυση της ολικής επιβίωσης (OS) ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου βάση της έντασης της έκφρασης των τετρασπανινών CD81 & CD82 στα καρκινικά κύτταρα, καθώς και βάση της παρουσίας κυττάρων του ανοσοποιητικού που εκφράζουν τις τετρασπανίνες αυτές, συνολικά και ανά στάδιο νόσου. Η σύγκριση της ολικής επιβίωσης έγινε με log-rank.											

PFS-Univariate		Overall				Stage I-II-III			Stage IV		
Features		n	Deaths	Median PFS	p	n	Deaths	p	n	Deaths	p
CD81-Tumor Cells (Intensity)	Absent	103	63%	43.6	0.772	61	39%	0.347	42	98%	0.897
	Mild	65	63%	30.9		32	28%		32	97%	
	Moderate	17	76%	28.4		9	56%		8	100%	
	Strong	9	44%			6	17%		3	100%	
CD81- Immune Cells	(-)	94	70%	21.7	0.084	45	38%	0.804	49	100%	0.041
	(+)	99	58%	81.7		62	35%		36	94%	
CD82-Tumor Cells (Intensity)	Absent	52	67%	16	0.097	21	24%	0.264	31	97%	0.982
	Mild	55	71%	21		29	48%		26	96%	
	Moderate	44	61%	90.3		27	37%		17	100%	
	Strong	42	50%	124.9		31	32%		10	100%	
CD82-Immune Cells	(-)	52	75%	21.2	0.048	20	35%	0.505	32	100%	0.505
	(+)	141	59%	51.7		88	36%		84	98%	
Πίνακας 3.9: Μονοπαραγοντική ανάλυση της επιβίωσης ελεύθερης νόσου (PFS) ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου βάση της έντασης της έκφρασης των τετρασπανινών CD81 & CD82 στα καρκινικά κύτταρα, καθώς και βάση της παρουσίας κυττάρων του ανοσοποιητικού που εκφράζουν τις τετρασπανίνες αυτές, συνολικά και ανά στάδιο νόσου. Η σύγκριση της επιβίωσης ελεύθερης νόσου έγινε με log-rank.											



Εικόνα 3.5: Kaplan Meier της **ολική επιβίωσης (OS)** ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου βάση της έντασης της έκφρασης των τετρασπανινών CD81 & CD82 στα καρκινικά κύτταρα, καθώς και βάση της παρουσίας κυττάρων του ανοσοποιητικού που εκφράζουν τις τετρασπανίνες αυτές. Α) Kaplan Meier για OS βάση της έντασης της έκφρασης του CD81 στα καρκινικά κύτταρα ($\log\text{-rank } p=0.937$). Β) Kaplan Meier για OS βάση της παρουσίας κυττάρων του ανοσοποιητικού που εκφράζουν τη CD81 ($\log\text{-rank } p=0.525$). Γ) Kaplan Meier για OS βάση της έντασης της έκφρασης του CD82 στα καρκινικά κύτταρα ($\log\text{-rank } p=0.1$). Δ) Kaplan Meier για OS βάση της παρουσίας κυττάρων του ανοσοποιητικού που εκφράζουν τη CD82 ($\log\text{-rank } p=0.018$).



ii) Προγνωστική αξία των υπόλοιπων κλινικών και εργαστηριακών παραγόντων.

Ακολουθώς εξετάσαμε όλα τα χαρακτηριστικά των ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου που είχαμε καταγράψει για την προγνωστική τους αξία όσων αφορά την ολική επιβίωση και επιβίωση ελεύθερης νόσου. Οι ομάδες σύγκρισης για τις συνεχείς μεταβλητές δημιουργήθηκαν χρησιμοποιώντας ως cut-off την μέση τιμή της εκάστοτε συνεχούς μεταβλητής. Για τα στρωματικά CD8-λεμφοκύτταρα ως cut-off χρησιμοποιήθηκε το 20%. Το OS και το PFS συγκρίθηκαν με τη χρήση του log-rank test και εκτιμήθηκαν ξεχωριστά για τα στάδια I-II-III και για το στάδιο IV, αλλά και στο σύνολο των ασθενών.

Διαπιστώσαμε ότι στο σύνολο των ασθενών η έκφραση του δείκτη PD1 στα καρκινικά καθώς και στα λεμφοκύτταρα σχετίζεται με υψηλότερη διάμεση ολική επιβίωση και επιβίωση ελεύθερης νόσου με τη διαφορά που προκύπτει να είναι στατιστικά σημαντική. Επιπλέον, η διήθηση του στρώματος του όγκου από CD3(+) λεμφοκύτταρα σχετίζεται με στατιστικά σημαντικό υψηλότερο OS και PFS στο σύνολο των ασθενών, το ίδιο όμως δεν ισχύει και για τα CD8(+) λεμφοκύτταρα. Από τους υπόλοιπους δείκτες, το στάδιο της νόσου κατά TNM, το όριο εκτομής, ο αριθμός αιμοπεταλίων και οι καρκινικοί δείκτες CEA και CA 19-9 εμφανίζουν επίσης προγνωστική αξία όσων αφορά την ολική επιβίωση και την επιβίωση ελεύθερης νόσου σε ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου (πίνακας 3.10 και 3.11).

OS		Overall				Stage I-II-III			Stage IV		
Features		n	Deaths	Median OS	p	n	Deaths	p	n	Deaths	p
PDL1-Immune cells	(-)	187	60%	87.6	0.48	102	32%	0.287	84	93%	0.149
	(+)	6	50%	129.2		5	60%		1	0%	
PD1-Tumor Cells (%)	≤36	124	67%	60.3	0.002	55	36%	0.487	69	91%	0.71
	>36	70	46%	138		52	31%		16	94%	
PD1-Immune Cells (%)	≤6.6	137	65%	68.8	0.015	65	34%	0.903	72	93%	0.415
	>6.6	56	46%	130.1		42	33%		13	85%	
CD3-intratumoral (%)	≤1.4	146	60%	91.6	0.786	85	33%	0.48	61	97%	0.015
	>1.4	40	57%	91		21	38%		19	79%	
CD3-stromal (%)	≤18.4	92	70%	58.6	0.006	42	38%	0.637	50	96%	0.324
	>18.4	94	49%	138.1		64	31%		30	87%	
CD8-intratumoral (%)	≤1.2	144	60%	18.8	0.152	80	34%	0.959	64	96%	0.066
	>1.2	42	50%	n.r		27	33%		15	80%	
CD8-stromal (%)	≤20%	147	60%	88.4	0.214	81	35%	0.643	66	92%	0.924
	>20%	39	49%	129.2		26	31%		13	85%	
Stage	I-II-III	107	44%	n.r	<0.001	n.a					
	IV	85	92%	33.2							
Histologic Grade	1 & 2	151	58%	100.1	0.086	87	33%	0.596	63	90%	0.283
	3	33	70%	41.5		15	40%		18	94%	
Primary Cite	Left	134	60%	89	0.882	67	31%	0.376	66	89%	0.002
	Right	56	57%	111.4		39	38%		17	100%	
Margins	R0	148	55%	111.9	<0.001	95	36%		52	90%	0.234
	R1/2	22	95%	24.3		0			22	95%	
K/NRAS	(+)	41	32%	n.r	0.568	41	32%	0.568	n.a		
	(-)	38	32%	n.r		38	32%				
BRAF	(+)	3	67%	129.2	0.064	3	67%	0.64	n.a		
	(-)	76	30%	n.r		76	30%				
Platelets	≤152*10 ³	71	58%	101.9	0.032	39	28%	0.712	32	94%	0.446
	>152*10 ³	67	70%	52.2		19	21%		48	90%	
CEA	≤262.2	170	54%	111.9	<0.001	107	34%	n.a	62	89%	0.008
	>262.2	23	100%	24.3		0			23	100%	
CA 19-9	≤219.8	174	55%	108.1	<0.001	107	34%	n.a	66	89%	0.094
	>219.8	19	100%	29.5		0			19	100%	
MMR-status	Prof.	11	45%	n.r	0.479	10	40%	0.746	0	0	n.a
	Def.	83	32%	n.r		83	32%		1	100%	

Πίνακας 3.10: Μονοπαραγοντική ανάλυση της ολικής επιβίωσης (OS) ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου βάση κλινικο-εργαστηριακών παραγόντων, συνολικά και ανά στάδιο νόσου. Η σύγκριση της ολικής επιβίωσης έγινε με log-rank.

PFS		Overall				Stage I-II-III			Stage IV		
Features		n	Deaths	Median PFS	p	n	Deaths	p	n	Deaths	p
PDL1-Immune cells	(-)	188	64%	9.7	0.314	103	35%	0.366	84	99%	0.062
	(+)	6	50%	2.2		5	60%		1	0%	
PD1-Tumor Cells (%)	≤36	124	71%	19.3	0.002	55	38%	0.757	69	97%	0.955
	>36	70	50%	127.6		53	34%		16	100%	
PD1-Immune Cells (%)	≤6.6	137	69%	21.7	0.007	65	35%	0.912	72	99%	0.314
	>6.6	57	51%	127.6		43	37%		13	92%	
CD3-intratumoral (%)	≤1.4	147	63%	38.3	0.807	86	36%	0.774	61	100%	0.008
	>1.4	40	62%	42.6		21	38%		19	89%	
CD3-stromal (%)	≤18.4	93	72%	19.1	0.002	43	39%	0.592	50	100%	0.166
	>18.4	94	53%	114.4		64	34%		30	93%	
CD8-intratumoral (%)	≤1.2	145	65%	28.4	0.081	81	37%	0.668	64	100%	0.026
	>1.2	42	52%	114.4		27	33%		15	87%	
CD8-stromal (%)	≤20%	148	65%	27.6	0.058	82	37%	0.609	66	100%	0.055
	>20%	39	51%	127.6		26	35%		13	85%	
Stage	I-II-III	108	36%	n.r.	<0.001	n.a.					
	IV	85	98%	10.5							
Histologic Grade	1 & 2	152	62%	41.9	0.111	88	36%	0.755	63	97%	0.472
	3	33	73%	17.2		15	40%		18	100%	
Primary Cite	Left	134	65%	23.6	0.252	67	33%	0.373	66	97%	0.605
	Right	57	58%	83.8		40	40%		17	100%	
Margins	R0	148	59%	81.7	<0.001	95	38%		52	96%	0.525
	R1/2	22	100%	11.6		0			22	100%	
K/NRAS	(+)	42	31%	n.r.	0.907	42	31%	0.907	n.a.		
	(-)	38	29%	n.r.		38	39%				
BRAF	(+)	3	67%	127.6	0.1	3	67%	0.1	n.a.		
	(-)	77	34%			77	34%				
Platelets	≤152*10 ³	71	59%	81.7	0.001	39	28%	0.169	32	97%	0.901
	>152*10 ³	67	79%	15.5		19	32%		48	98%	
CEA	≤262.2	171	58%	81.7	<0.001	108	36%		62	97%	0.019
	>262.2	23	100%	9.6		0			23	100%	
CA 19-9	≤219.8	175	59%	60.3	<0.001	108	36%		66	97%	0.986
	>219.8	19	100%	11.2		0			19	100%	
MMR-status	Prof.	11	45%		0.591	10	40%	0.927	0	0	n.a.
	Def.	84	34%	144.9		84	34%		1	100%	

Πίνακας 3.11: Μονοπαραγοντική ανάλυση της επιβίωσης ελεύθερης νόσου (PFS) ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου βάση κλινικο-εργαστηριακών παραγόντων, συνολικά και ανά στάδιο νόσου. Η σύγκριση της επιβίωσης ελεύθερης νόσου έγινε με log-rank.

iii) Σχετικός κίνδυνος θανάτου και υποτροπής.

Στη συνέχεια, αναλύοντας τα δεδομένα με cox-regression υπολογίσαμε τον σχετικό κίνδυνο θανάτου (hazard ratio – HR) για την ολική επιβίωση (OS) και τον σχετικό κίνδυνο υποτροπής ή θανάτου για την επιβίωση ελεύθερης νόσου (PFS) σε σχέση με τα κλινικο-εργαστηριακά χαρακτηριστικά που καταγράψαμε στους ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, με τη χρήση του cox-regression, δεν χρειάστηκε να δημιουργηθούν ομάδες για τη σύγκριση των συνεχών μεταβλητών, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν ως είχαν. Για την εκτίμηση της έκφρασης των τετρασπανινών CD81 και CD82 στα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιήθηκε το H-index, ενώ για τα λεμφοκύτταρα το ποσοστό των θετικά κεχρωσμένων κυττάρων.

Τα αποτελέσματα της μονοπαραγοντικής cox-regression ανάλυσης όσων αφορά την επίπτωση των εξεταζόμενων χαρακτηριστικών των ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου στην ολική επιβίωση και επιβίωση ελεύθερης νόσου παρουσιάζονται στους πίνακες 3.12 και 3.13 και σε γενικές γραμμές δεν παρέκκλιναν από τα συμπεράσματα της μονοπαραγοντικής log-rank ανάλυσης. Η έκφραση τόσο του CD81 όσο και του CD82, καθώς και του PD1 στα λεμφοκύτταρα φαίνεται να είναι προγνωστικά του OS και του PFS, με τους ασθενείς που παρουσιάζουν υψηλότερα ποσοστά διήθησης από CD81(+), CD82(+) και PD1(+) λεμφοκύτταρα να εμφανίζουν και καλύτερη επιβίωση, ωστόσο η μείωση του κινδύνου θανάτου ή υποτροπής είναι μικρός (πίνακες 3.12 και 3.13). Η υψηλή έκφραση του CD82 στα καρκινικά κύτταρα βάση του H-index, όσο και το υψηλότερο ποσοστό PD1(+) καρκινικών κυττάρων φάνηκαν επίσης να προσδίδουν μικρό όφελος στο OS και PFS, αντιθέτως καμία διαφορά στην επιβίωση δεν παρατηρήθηκε όσων αφορά την έκφραση του CD81 στα καρκινικά κύτταρα. Διαπιστώσαμε επίσης ότι το ποσοστό διήθησης από CD8(+) λεμφοκύτταρα ήταν προγνωστική του OS και του PFS, με μείωση κατά 0,4% και 0,6% του κινδύνου θανάτου και υποτροπής αντίστοιχα όσο υψηλότερο είναι το ποσοστό διήθησης των CD8(+) λεμφοκυττάρων στο στρώμα του όγκου. Από τα κλινικά χαρακτηριστικά το στάδιο της νόσου και τα όρια εκτομής ήταν ως αναμενόμενα προγνωστικά του OS και του PFS. Επίσης προγνωστικά ήταν οι καρκινικοί δείκτες CEA και CA 19-9, καθώς και ο αριθμός αιμοπεταλίων, με υψηλότερες τιμές των χαρακτηριστικών αυτών να

προσδίδουν χειρότερη ολική επιβίωση και επιβίωση ελεύθερης νόσου, ωστόσο η σχετική αύξηση του κινδύνου που διαπιστώσαμε ήταν ελάχιστη ($< 1\%$).

OS-Univariate	Overall			Stage I-II-III			Stage IV		
Cox regression	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p	HR	95%CI	p
CD81-Tumor Cells <i>H-Index</i>	1	0.99-1.002	0.697	0.998	0.99-1.002	0.337	1	0.99-1.003	0.897
CD81-Immune Cells (%)	0.995	0.99-1.00	0.047	1	0.99-1.007	0.96	1	0.99-1.009	0.908
CD82-Tumor Cells <i>H-Index</i>	0.998	0.99-1.00	0.021	1.001	0.99-1.004	0.429	0.999	0.996-1.001	0.398
CD82-Immune Cells (%)	0.995	0.99-0.99	0.012	1.001	0.99-1.008	0.859	0.993	0.987-0.998	0.013
PDL1-Immune Cells	0.99	0.95-1.03	0.57	1.04	0.99-1.09	0.106	0.94	0.83-1.07	0.34
PD1-Tumor Cells (%)	0.99	0.988-0.997	0.001	1.00	0.99-1.004	0.38	1.00	0.99-1.01	0.867
PD1-Immune Cells (%)	0.98	0.955-0.996	0.018	0.99	0.97-1.02	0.561	0.99	0.95-1.03	0.727
CD3-intratumoral (%)	0.99	0.914-1.074	0.82	1.08	0.95-1.22	0.246	0.85	0.77-0.94	0.002
CD3-stromal (%)	0.99	0.970-1.000	0.054	1.00	0.98-1.03	0.813	1.00	0.98-1.01	0.445
CD8-intratumoral (%)	0.89	0.78-1.000	0.05	1.01	0.88-1.17	0.868	0.78	0.66-0.92	0.004
CD8-stromal (%)	0.96	0.93-0.98	0.001	0.99	0.95-1.03	0.66	0.99	0.96-1.02	0.414
Stage (I-II-III vs IV)	6.67	4.39-10.14	0.0001	<i>n.a.</i>					
Histologic Grade (1-2 vs 3)	1.49	0.94-2.37	0.088	1.27	0.53-3.06	0.597	1.35	0.78-2.32	0.285
Primary Cite (right vs left)	0.97	0.64-1.46	0.882	1.35	0.69-2.62	0.378	2.38	1.35-4.20	0.003
Margins (R0 vs R1/2)	3.76	2.29-6.19	0.0001	<i>n.a.</i>			1.37	0.82-2.30	0.236
K/NRAS (+ / -)	1.26	0.57-2.78	0.568	1.26	0.57-2.78	0.568	<i>n.a.</i>		
BRAF (+ / -)	3.63	0.84-5.67	0.084	3.63	0.84-15.67	0.084	<i>n.a.</i>		
Platelets	<1,01		0.015	<1,01		0.978	<1,01		0.847
CEA	<1,01		0.0001	1.08	0.98-1.19	0.109	<1,01		0.034
CA 19-9	<1,01		0.0001	1.01	0.99-1.03	0.342	<1,01		0.022
MMR-status (prof. / def.)	0.71	0.27-1.85	0.481	0.84	0.29-2.41	0.747	<i>n.a.</i>		

Πίνακας 3.12: Σχετικός κίνδυνος θανάτου (Hazard Ratio – HR) της ολικής επιβίωσης ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου σε σχέση με το σύνολο των κλινικών, εργαστηριακών και παθολογο-ανατομικών παραγόντων που εξετάστηκαν στη μελέτη. Η εκτίμηση του κινδύνου της ολικής επιβίωσης έγινε με Cox-regression.

PFS-Univariate									
	Overall			Stage I-II-III			Stage IV		
Cox regression	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p	HR	95%CI	p
CD81-Tumor Cells <i>H-Index</i>	1	0.998-1.002	0.979	0.999	0.996-1.003	0.776	0.999	0.996-1.002	0.694
CD81- Immune Cells (%)	0.993	0.988-0.998	0.007	0.998	0.991-1.005	0.656	0.996	0.987-1.005	0.37
CD82-Tumor Cells <i>H-Index</i>	0.998	0.996-0.999	0.008	1.001	0.998-1.004	0.418	0.999	0.996-1.001	0.271
CD82-Immune Cells (%)	0.996	0.992-1	0.044	1	0.993-1.007	0.936	0.997	0.992-1.002	0.27
PDL1-Immune cells	0.56	0.18-1.76	0.321	1.04	0.99-1.09	0.151	0.94	0.85-1.04	0.223
PD1-Tumor Cells (%)	0.993	0.988-0.997	0.001	0.998	0.992-1.005	0.63	1	0.994-1.007	0.887
PD1-Immune Cells (%)	0.977	0.959-0.996	0.016	0.999	0.979-1.019	0.899	0.99	0.955-1.027	0.586
CD3-intratumoral (%)	1.013	0.94-1.09	0.723	1.056	0.93-1.21	0.421	0.87	0.79-0.95	0.003
CD3-stromal (%)	0.981	0.966-0.996	0.012	1	0.97-1.03	0.976	0.99	0.97-1.00	0.059
CD8-intratumoral (%)	0.903	0.81-1.01	0.073	0.99	0.86-1.15	0.926	0.81	0.70-0.93	0.003
CD8-stromal (%)	0.943	0.917-0.968	0.0001	0.99	0.95-1.03	0.588	0.96	0.94-0.99	0.011
Stage (I-II-III vs IV)	10.01	6.53-15.36	0.0001	<i>n.a.</i>					
Histologic Grade (1-2 vs 3)	1.44	0.92-2.25	0.113	1.05	0.78-1.40	0.755	1.07	0.89-1.27	0.473
Primary Cite (right vs left)	0.79	0.53-1.18	0.253	1.34	0.70-2.55	0.375	1.15	0.67-1.98	0.606
Margins (R0 vs R1/2)	3.24	2.00-5.25	0.0001	<i>n.a.</i>			0.85	0.51-1.41	0.526
K/NRAS (+ / -)	0.96	0.45-2.02	0.907	0.96	0.45-2.02	0.907	<i>n.a.</i>		
BRAF (+ / -)	3.17	0.74-13.55	0.119	3.17	0.74-13.55	0.119	<i>n.a.</i>		
Platelets	<1.01		0.001	<1.01		0.528	<1.01		0.977
CEA	<1.01		0.006	1.07	0.98-1.18	0.142	<1.01		0.527
CA 19-9	<1.01		0.0001	1.01	0.99-1.03	0.441	<1.01		0.56
MMR-status (prof. / def.)	0.77	0.30-1.99	0.592	0.95	0.33-2.71	0.927	<i>n.a.</i>		

Πίνακας 3.13: Σχετικός κίνδυνος θανάτου ή υποτροπής (Hazard Ratio – HR) της επιβίωσης ελεύθερης νόσου (PFS) ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου σε σχέση με το σύνολο των κλινικών, εργαστηριακών και παθολογο-ανατομικών

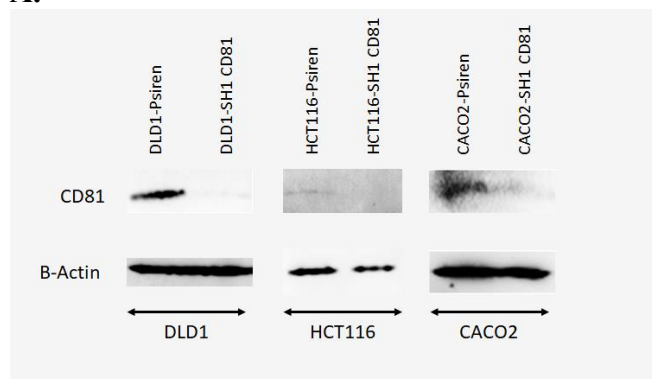
παραγόντων που εξετάστηκαν στη μελέτη. Η εκτίμηση του κινδύνου της επιβίωσης ελεύθερης νόσου έγινε με Cox-regression.

3.4 Τροποποίηση της έκφρασης της τετρασπανίνης CD81 σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές καρκίνου παχέος εντέρου DLD1, CAC2 & HCT116

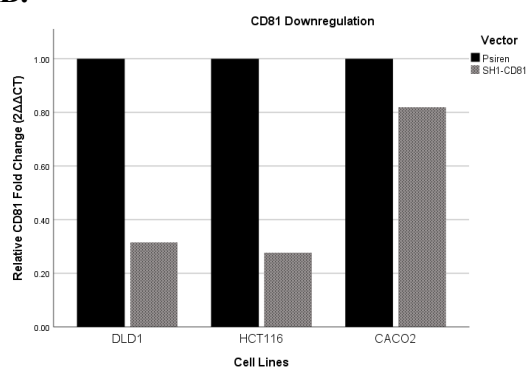
Προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος της τετρασπανίνης CD81 στην ανάπτυξη του καρκίνου του παχέος εντέρου, τροποποιήθηκε η έκφραση της στις καρκινικές σειρές DLD1, CACO2 και HCT116. Προβίκαμε σε μείωση της έκφρασης της CD81 στις καρκινικές σειρές DLD1, CACO2 & HCT116 με τη χρήση ρετρο-ικού φορέα που φέρει shRNA για το CD81 (Psiren SH1 CD81). Συγκεκριμένα, επιμολύναμε τα καρκινικά κύτταρα με ρετρο-ικό φορέα που φέρει το shRNA έναντι της CD81 (Psiren SH1 CD81). Επίσης επιμολύναμε μία δεύτερη ομάδα αυτών των καρκινικών σειρών με άδειο φορέα (Psiren), δηλαδή ρετρο-ιό ο οποίος δεν περιέχει την αλληλουχία του shRNA, ώστε να χρησιμεύσουν για ομάδα ομάδα ελέγχου. Η επιλογή των κυττάρων έγινε με τη χρήση του αντιβιοτικού «υγρομυκίνη» για το οποίο υπήρχε γονίδιο αντίστασης στα επιμολυσμένα κύτταρα. Συγκρίναμε τα επίπεδα έκφρασης της CD81 μεταξύ των πειραματικών κυττάρων που είχαν επιμολυνθεί με το shRNA και των κυττάρων της ομάδας ελέγχου. Για να επιβεβαιώσουμε τη μείωση της έκφρασης της τετρασπανίνης CD81 στις κυτταρικές σειρές DLD1, HCT116 & CACO2 πραγματοποιήσαμε RT-qPCR και Western Blot, ώστε να συγκρίνουμε, σε επίπεδο mRNA και σε επίπεδο πρωτεΐνης αντίστοιχα, τα επίπεδα έκφρασης της CD81 μεταξύ των πειραματικών κυττάρων που είχαν επιμολυνθεί με το shRNA και των κυττάρων της ομάδας ελέγχου (Εικόνα 3.7).

Πραγματοποιήσαμε υπερέκφραση της τετρασπανίνης CD81 στα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου HCT116 & CACO2. Δεν πραγματοποιήσαμε υπερέκφραση της CD81 στα κύτταρα DLD1, καθώς αυτά εξέφραζαν εξαρχής CD81 σε υψηλά επίπεδα. Για την υπερέκφραση επιμολύναμε τα καρκινικά κύτταρα με ρετρο-ικό φορέα που φέρει την αλληλουχία του γονιδίου για τη CD81 (PLXIN CD81-OE). Τα κύτταρα αυτά αποτέλεσαν τις πειραματικές μας ομάδες για την υπερέκφραση της CD81. Για ομάδα ελέγχου επιμολύναμε καρκινικά κύτταρα με άδειο ρετρο-ικό φορέα (PLXIN), που δεν περιείχε δηλαδή το γονίδιο για τη CD81. Η επιλογή των κυττάρων έγινε με τη χρήση του αντιβιοτικού «G418 (Geneticin) » για το οποίο υπήρχε γονίδιο αντίστασης στα επιμολυσμένα κύτταρα. Επιβεβαιώσαμε της υπερέκφραση της CD81 σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης με RT-qPCR και Western Blot (Εικόνα 3.8).

A.

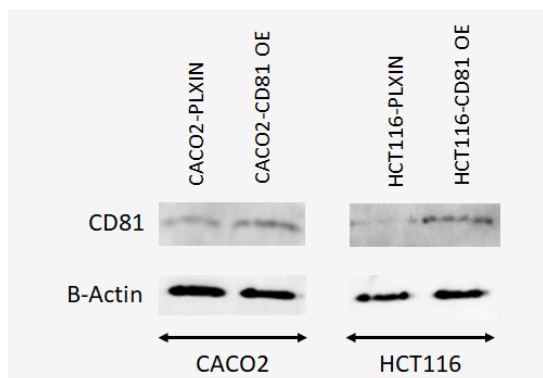


B.

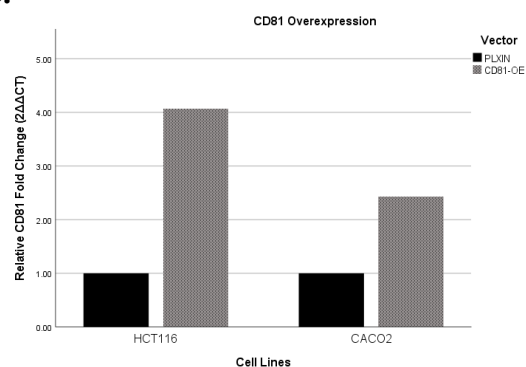


Εικόνα 3.7: Έκφρασης της τετρασπανίνης CD81 σε επίπεδο πρωτεϊνών και σε επίπεδο mRNA στις τροποποιημένες καρκινικές σειρές παχέος εντέρου DLD1, CACO2 & HCT116 με τη χρήση shRNA έναντι της CD81 και τις αντίστοιχες κυτταρικές σειρές των ομάδων ελέγχου. Α) Ανοσοαποτύπωμα κατά Western. Ως μάρτυρας ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η έκφραση της β-ακτίνης. Β) Real Time qPCR, mRNA CD81 Relative Fold Change (RFC). DLD1-RFC: 0.31, $p < 0.001$. HCT116-RFC: 0.28, $p < 0.001$, CACO2-RFC: 0.81, $p = 0.007$).

A.



B.



Εικόνα 3.8: Υπερέκφραση της τετρασπανίνης CD81 σε επίπεδο πρωτεϊνών και σε επίπεδο mRNA στις τροποποιημένες καρκινικές σειρές παχέος εντέρου CACO2 & HCT116 με την εισαγωγή γονιδίου για τη CD81 και τις αντίστοιχες κυτταρικές σειρές των ομάδων ελέγχου. Α) Ανοσοαποτύπωμα κατά Western, πρωτεϊνική έκφραση CD81. Ως μάρτυρας ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η έκφραση της β-ακτίνης. Β) Real Time qPCR, mRNA CD81 Relative Fold Change (RFC). HCT116-RFC: 4.08, $p < 0.001$, CACO2-RFC: 2.45, $p = 0.001$

3.5 Επίδραση του CD81 στον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου

Μελετήσαμε κατά πόσο η αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης της τετρασπανίνης CD81 θα μπορούσε να επηρεάζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου. Για το σκοπό αυτό, εξετάσαμε τον ρυθμό ανάπτυξης των τροποποιημένων καρκινικών σειρών συγκριτικά με τις αντίστοιχες control κυτταρικές σειρές. Συγκεκριμένα οι κυτταρικές σειρές DLD1-Psiren SH1 CD81, CACO2-Psiren SH1 CD81, CACO2-PLXIN CD81 Overexpression (OE), HCT116-Psiren SH1 CD81 και HCT116-PLXIN CD81 OE και οι αντίστοιχες κυτταρικές σειρές της ομάδας ελέγχου, στρώθηκαν σε πολλαπλά πηγάδια από 96-well plates και καλλιεργήθηκαν για 92 με 96 ώρες. Για την κυτταρική σειρά DLD1 πραγματοποιήσαμε και ένα πείραμα όπου τα κύτταρα στρώθηκαν σε πολλαπλά πηγάδια από 24-well plate. Σε κάθε περίπτωση τα κύτταρα στρώθηκαν σε κατάλληλο αριθμό ώστε στην έναρξη του πειράματος να καλύπτουν το 4-10% της επιφάνειας του πηγαδιού και με σκοπό στο πέρας των 92-96 ωρών να έχουν σχεδόν πλήρως καλύψει την επιφάνεια αυτή. Η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε στο ειδικό μηχάνημα απεικόνισης IncuCyte ZOOM, το οποίο επιτρέπει την παρακολούθηση της ανάπτυξης των κυττάρων σε πραγματικό χρόνο. Στο διάστημα των 92-96 ωρών ελήφθησαν φωτογραφίες των κυττάρων κάθε τέσσερις ώρες, από τις οποίες υπολογίστηκε το ποσοστό πληρότητας του τρυβλίου με τη με χρήση του λογισμικού IncuCyte ZOOM. Συγκεκριμένα, υπολογίσαμε το ποσοστό σε Pixels της ελεύθερης επιφάνειας (δηλ. επιφάνεια του πηγαδιού όπου δεν είχαν ακόμη αναπτυχθεί κύτταρα) για κάθε χρονική στιγμή.

Συγκρίναμε τον ρυθμό ανάπτυξης (δηλαδή τον ρυθμό κάλυψης των επιφανειών ανά 4 ώρες) στις 92-96 ώρες μεταξύ των τροποποιημένων κυτταρικών σειρών καρκίνου παχέος εντέρου και των σειρών της ομάδας ομάδας ελέγχου με της χρήση του στατιστικού μοντέλου "Repeated Measures ANOVA". Στο σύνολο των πειραμάτων που πραγματοποιήσαμε (πίνακας 3.14) φάνηκε ότι η τετρασπανίνη CD81 επηρεάζει προς τα πάνω τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυτταρικών σειρών καρκίνου παχέος εντέρου που μελετήθηκαν (DLD1, CACO2, HCT116), καθώς ο ρυθμός ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων ήταν υψηλότερος στις κυτταρικές σειρές με μεγαλύτερη έκφραση τετρασπανίνης CD81.

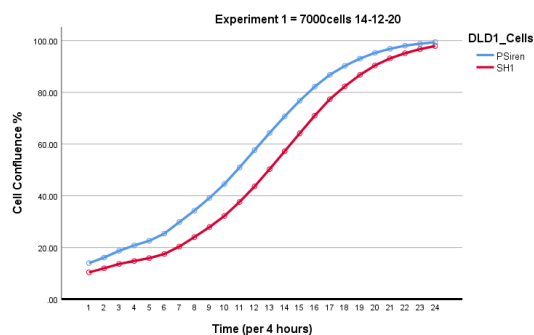
	Vector	n	Ρυθμός Πολλαπλασιασμού	p
DLD1	PSIREN	26		0.049
	SH1-CD81	26	↓	
HCT116	PSIREN	18		0.002
	SH1-CD81	18	↓	
HCT116	PLXIN	30		<0,001
	CD81-OE	30	↑	
CACO2	PSIREN	24		0.002
	SH1-CD81	24	↓	
CACO2	PLXIN	30		<0,001
	CD81-OE	30	↑	

Πίνακας 3.14: Ρυθμός Ανάπτυξης/Πολλαπλασιασμού καρκινικών κυττάρων με τροποποιημένη έκφραση της τετρασπανίνης CD81 συγκριτικά με κύτταρα της ομάδας ελέγχου.

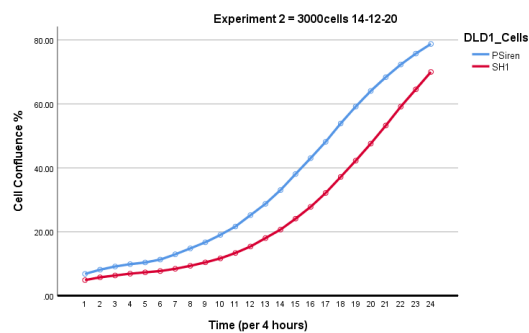
i) Ρυθμός ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου DLD1 με αποσιώπηση της έκφρασης της CD81.

Συγκρίναμε τον ρυθμό ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων DLD1 στα οποία έχουμε μειώσει την έκφραση της τετρασπανίνης CD81 μέσω shRNA για το CD81 (DLD1-Psiren SH1 CD81), έναντι της αντίστοιχης control κυτταρικής σειράς (DLD1-Psiren), δηλαδή κυττάρων τα οποία είχαν επιμολυνθεί με «άδειο» βέκτορα και χρησιμεύουν ως ομάδα ελέγχου. Συνολικά πραγματοποιήσαμε 5 πειράματα. Ένα έγινε με αρχικό αριθμό κυττάρων τα 7000 κύτταρα σε 96well-plate. Ένα με αρχικό αριθμό κυττάρων τα 3000 κύτταρα σε 96well-plate, δύο με αρχικό αριθμό κυττάρων 5000 κύτταρα σε 96well-plate και ένα με αρχικό αριθμό κυττάρων 25000 κύτταρα σε 24well-plate. Συνολικά μελετήσαμε τον ρυθμό ανάπτυξης σε 26 πειραματικές μονάδες για τα κύτταρα DLD1-Psiren και σε 26 πειραματικές μονάδες για τα κύτταρα DLD1-Psiren SH1_CD81. Ο ρυθμός ανάπτυξης ήταν εμφανώς χαμηλότερος (Εικόνα 3.9) στα κύτταρα DLD1-Psiren SH1_CD81 στα οποία είχαμε μειώσει την έκφραση της CD81, έναντι της ομάδας ελέγχου (DLD1_Psiren) και μάλιστα η διαφορά που παρατηρούμε στον ρυθμό πολλαπλασιασμού είναι στατιστικά σημαντική (Repeated Measure ANOVA: Mauchly's W $p < 0.001$, Greenhouse-Geiser Epsilon = 0.057, Sphericity NOT-Assumed → Correction: Greenhouse-Geiser (time4h*cell type) $p = 0,049$).

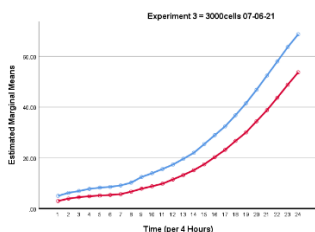
A.



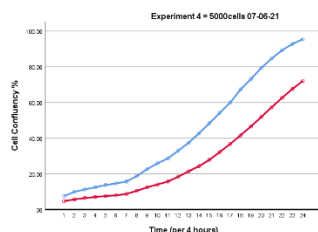
B.



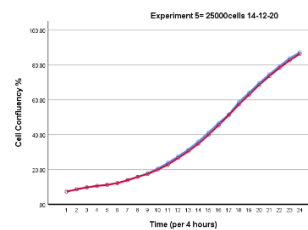
Γ.



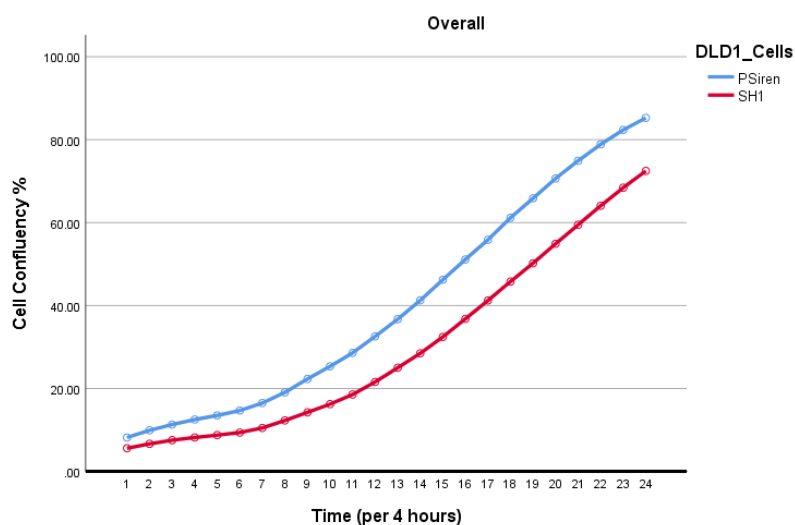
Δ.



E.



Στ.

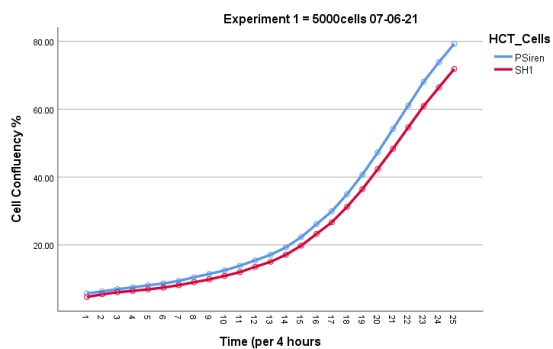


Εικόνα 3.9: Καμπύλες ανάπτυξης των καρκινικών σειρών παχέος εντέρου DLD1 και σύγκριση ρυθμού ανάπτυξης μεταξύ των καρκινικών κυτταρικών σειρών DLD1-Psiren (control) και DLD1-Psiren SH1 CD81 (knockdown CD81). Α) Πείραμα 1. 7000 κύτταρα 14-12-20, Β) Πείραμα 2. 3000 κύτταρα 14-12-20, Γ) Πείραμα 3. 3000 κύτταρα 07-06-21, Δ) Πείραμα 4. 5000 κύτταρα 07-06-21, Ε) Πείραμα 5. 25000 κύτταρα 14-12-20, Στ) Συνδυαστικά αποτελέσματα των πέντε πειραμάτων. Στατιστικά σημαντικά μειωμένος ρυθμός ανάπτυξης/πολλαπλασιασμού των DLD1-Psiren SH1 CD81 καρκινικών κυττάρων έναντι των DLD1-Psiren (Repeated Measure ANOVA: Mauchly's W $p < 0.001$, Greenhouse-Geiser Epsilon = 0.057, Sphericity NOT-Assumed → Correction: Greenhouse-Geiser (time^{4h}*cell type) $p = 0.049$).

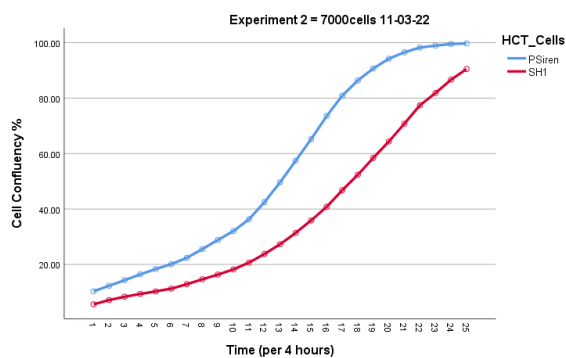
ii) Ρυθμός ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου HCT116 με αποσιώπηση της έκφρασης της CD81.

Συγκρίναμε τον ρυθμό ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου HCT116 στα οποία έχουμε μειώσει την έκφραση της τετρασπανίνης CD81 μέσω shRNA για το CD81 (HCT116-Psiren_SH1_CD81), έναντι της αντίστοιχης control κυτταρικής σειράς (HCT116-Psiren), δηλαδή κυττάρων τα οποία είχαν επιμολυνθεί με «άδειο» βέκτορα και χρησιμεύουν ως ομάδα ελέγχου. Συνολικά πραγματοποιήσαμε 2 πειράματα. Ένα έγινε με αρχικό αριθμό κυττάρων τα 7000 κύτταρα σε 96well-plate και ένα με αρχικό αριθμό κυττάρων τα 5000 κύτταρα σε 96well-plate. Στο σύνολο των δύο πειραμάτων μελετήσαμε τον ρυθμό ανάπτυξης σε 18 πειραματικές μονάδες για τα κύτταρα HCT116-Psiren και σε 18 πειραματικές μονάδες για τα κύτταρα HCT116-Psiren SH1_CD81. Ο ρυθμός ανάπτυξης ήταν εμφανώς χαμηλότερος (Εικόνα 3.10) στα κύτταρα HCT116-Psiren SH1_CD81 στα οποία είχαμε μειώσει την έκφραση της CD81, έναντι της ομάδας ελέγχου (HCT116 -Psiren) και μάλιστα η διαφορά που παρατηρούμε στον ρυθμό πολλαπλασιασμού μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών είναι στατιστικά σημαντική (Repeated Measure ANOVA: Mauchly's W $p < 0.001$, Greenhouse-Geiser Epsilon = 0.053, Sphericity NOT-Assumed → Correction: Greenhouse-Geiser (time^{4h}*cell type) $p = 0,002$).

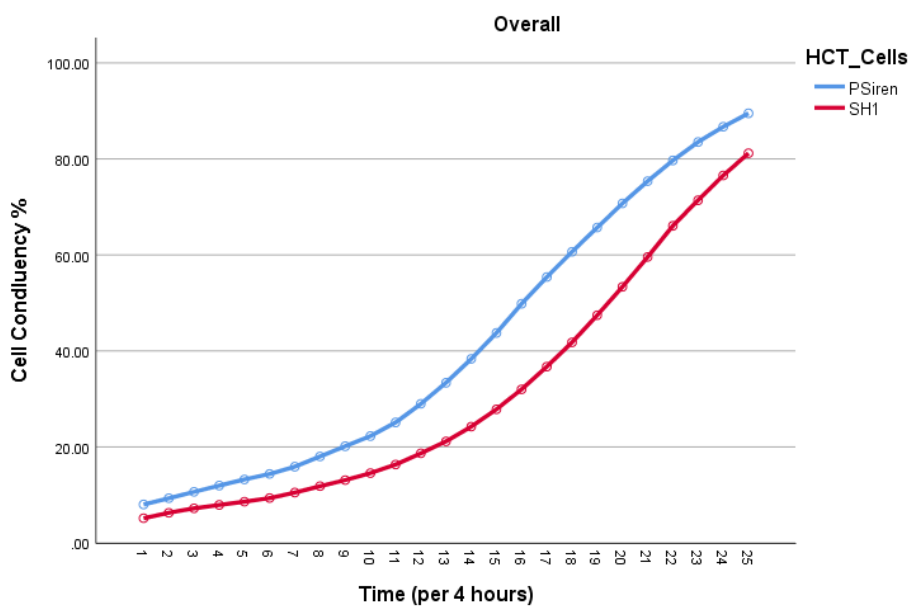
A.



B.



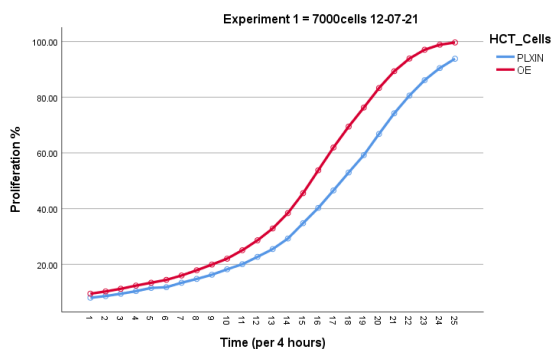
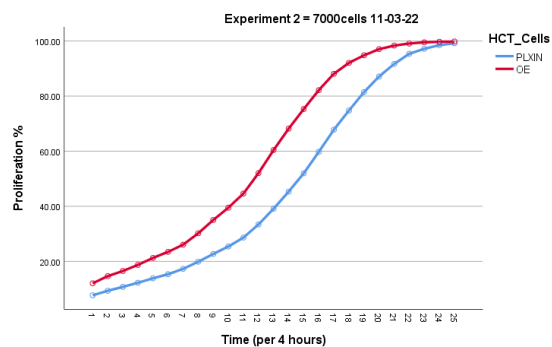
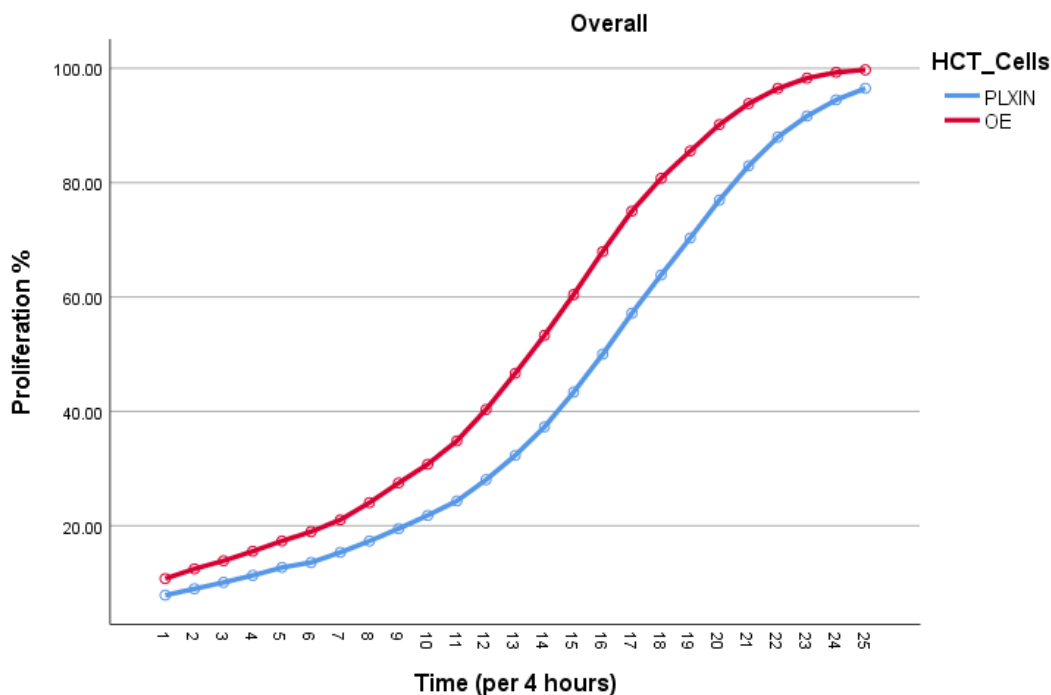
Γ.



Εικόνα 3.10: Καμπύλες ανάπτυξης των καρκινικών σειρών παχέος εντέρου HCT116-Psiren (control) και HCT116-Psiren SH1 CD81 (knockdown CD81). Α) Πείραμα 1. 5000 κύτταρα 07-06-21, Β) Πείραμα 2. 7000 κύτταρα 11-03-22, Γ) Συνδυαστικά αποτελέσματα των δύο πειραμάτων. Στατιστικά σημαντικά μειωμένος ρυθμός ανάπτυξης/πολλαπλασιασμού των HCT116-Psiren SH1 CD81 καρκινικών κυττάρων έναντι των HCT116-Psiren (Repeated Measure ANOVA: Mauchly's W $p < 0.001$, Greenhouse-Geiser Epsilon = 0.053, Sphericity NOT-Assumed → Correction: Greenhouse-Geiser (time^{4h}*cell type) $p = 0.002$).

iii) Ρυθμός ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου HCT116 με υπερέκφραση της CD81.

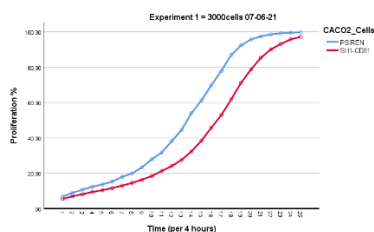
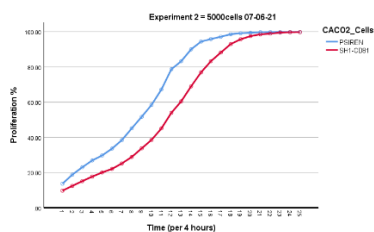
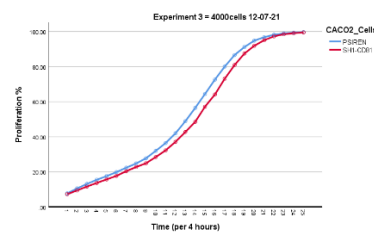
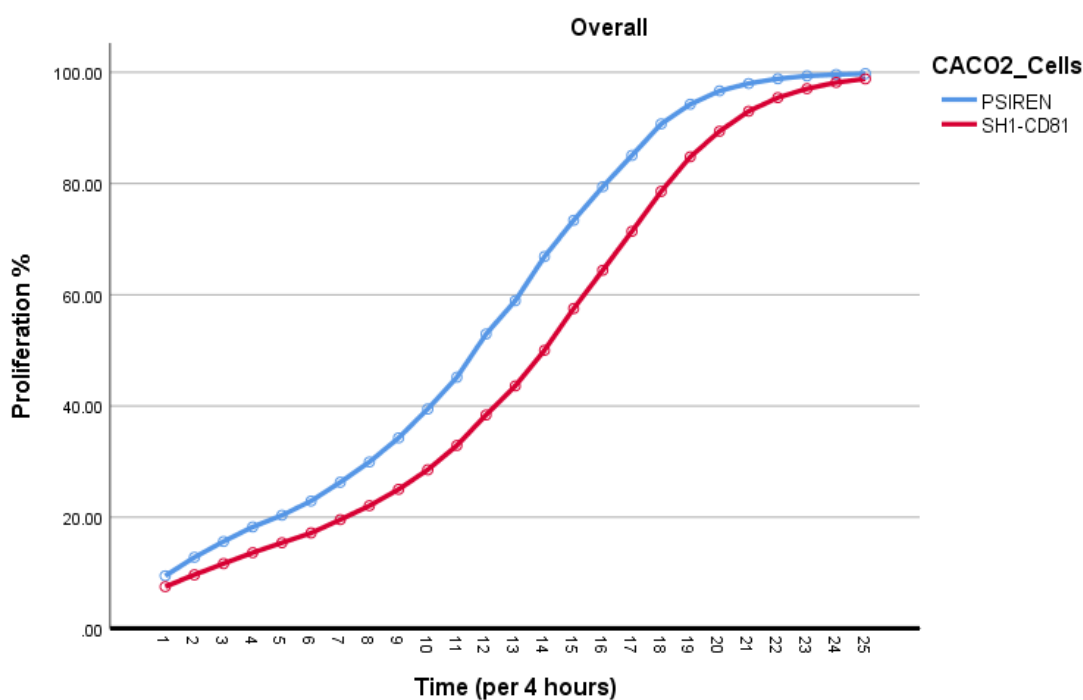
Συγκρίναμε τον ρυθμό ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου HCT116 στα οποία υπερεκφράσαμε την τετρασπανίνη CD81 επιμολύνοντας τα με ρετρο-ικό φορέα ο οποίος περιέχει το γονίδιο για την έκφραση της CD81 (HCT116 - PLXIN_CD81_OE), έναντι της αντίστοιχης control κυτταρικής σειράς (HCT116 -PLXIN), δηλαδή κυττάρων τα οποία είχαν επιμολυνθεί με «άδειο» βέκτορα PLXIN και χρησιμεύουν ως ομάδα ελέγχου. Συνολικά πραγματοποιήσαμε 2 πειράματα. Και τα δύο έγιναν με αρχικό αριθμό κυττάρων τα 7000 κύτταρα σε 96well-plate. Στο σύνολο των δύο πειραμάτων μελετήσαμε τον ρυθμό ανάπτυξης σε 30 πειραματικές μονάδες για τα κύτταρα HCT116- PLXIN και σε 30 πειραματικές μονάδες για τα κύτταρα HCT116- PLXIN_CD81_OE. Ο ρυθμός ανάπτυξης ήταν εμφανώς υψηλότερος (Εικόνα 3.11) στα κύτταρα HCT116- PLXIN_CD81_OE στα οποία είχαμε υπερεκφράσει την CD81, έναντι της ομάδας ελέγχου (HCT116 - PLXIN). Η διαφορά που παρατηρούμε στον ρυθμό πολλαπλασιασμού μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών είναι στατιστικά σημαντική [Repeated Measure ANOVA: Mauchly's W $p < 0.001$, Greenhouse-Geiser Epsilon = 0.066, Sphericity NOT-Assumed → Correction: Greenhouse-Geiser (time^{4h}*cell type) $p < 0.001$].

A.**B.****Γ.**

Εικόνα 3.11: Καμπύλες ανάπτυξης των καρκινικών σειρών παχέος εντέρου HCT116- PLXIN (control) και HCT116 -PLXIN_CD81_OE (υπερέκφραση CD81). Α) Πείραμα 1. 7000 κύτταρα 12-07-21, Β) Πείραμα 2. 7000 κύτταρα 11-03-22, Γ) Συνδυαστικά αποτελέσματα των δύο πειραμάτων: στατιστικά σημαντικά υψηλότερος ρυθμός ανάπτυξης/πολλαπλασιασμού των HCT116-PLXIN CD81-OE καρκινικών κυττάρων έναντι των HCT116 -PLXIN (Repeated Measure ANOVA: Mauchly's W $p < 0.001$, Greenhouse-Geiser Epsilon = 0.066, Sphericity NOT-Assumed → Correction: Greenhouse-Geiser (time^{4h}*cell type) $p < 0,001$).

iv) Ρυθμός ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου CACO2 με αποσιώπηση της έκφρασης της CD81.

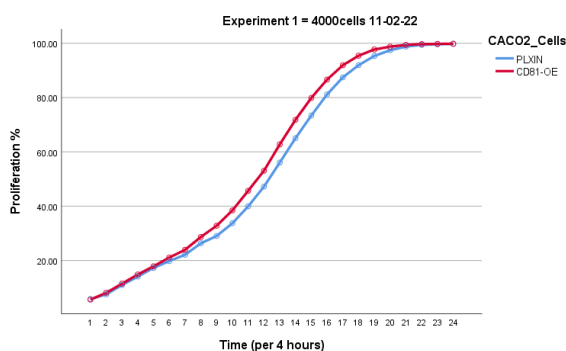
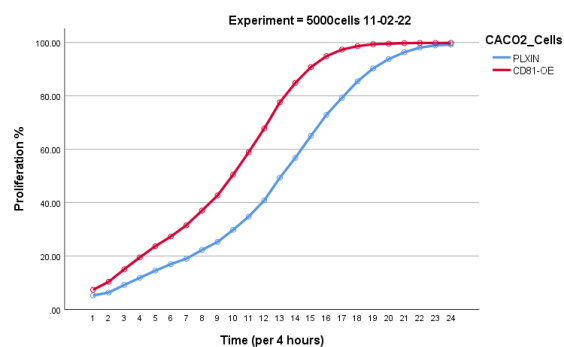
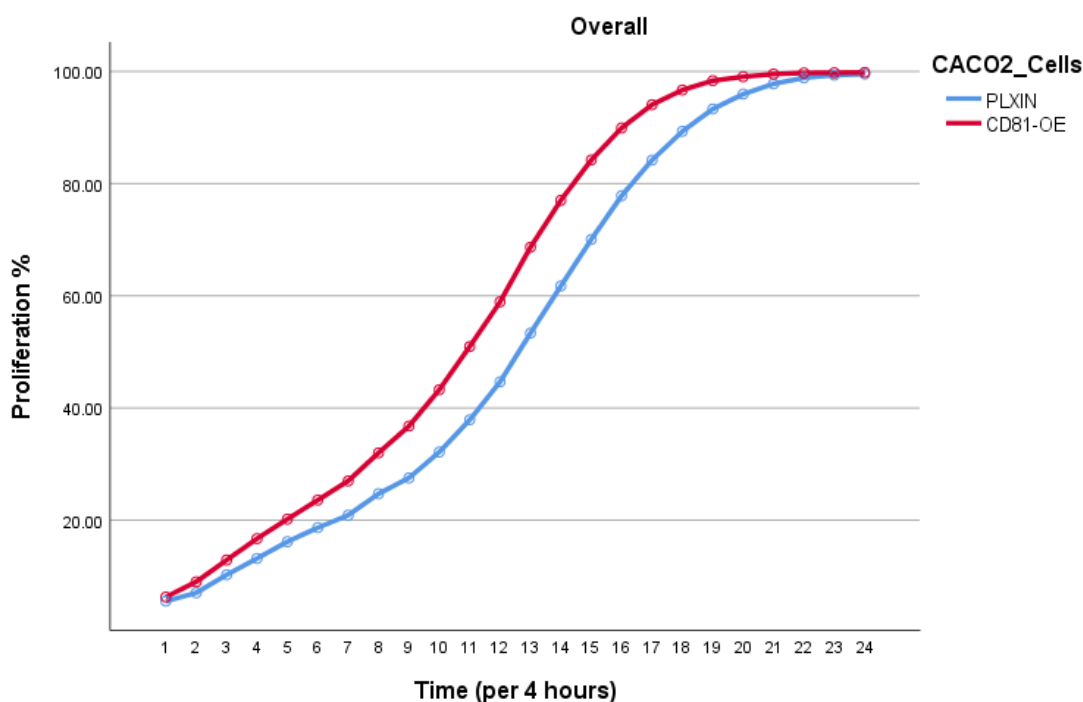
Συγκρίναμε τον ρυθμό ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου CACO2 στα οποία έχουμε μειώσει την έκφραση της τετρασπανίνης CD81 μέσω shRNA για το CD81 (CACO2 -Psiren_SH1_CD81), έναντι της αντίστοιχης control κυτταρικής σειράς (CACO2 -Psiren), δηλαδή κυττάρων τα οποία είχαν επιμολυνθεί με «άδειο» βέκτορα και χρησιμεύουν ως ομάδα ελέγχου. Συνολικά πραγματοποιήσαμε 3 πειράματα. Ένα έγινε με αρχικό αριθμό κυττάρων τα 3000 κύτταρα, ένα με 4000 κύτταρα και ένα με 5000 κύτταρα ανά well σε 96well-plate. Συνολικά μελετήσαμε τον ρυθμό ανάπτυξης σε 24 πειραματικές μονάδες για τα κύτταρα HCT116-Psiren και σε 24 πειραματικές μονάδες για τα κύτταρα CACO2 -Psiren SH1_CD81. Ο ρυθμός ανάπτυξης ήταν εμφανώς χαμηλότερος (Εικόνα 3.12) στα κύτταρα CACO2 -Psiren SH1_CD81 στα οποία είχαμε μειώσει την έκφραση της CD81, έναντι της ομάδας ελέγχου (CACO2 -Psiren) και μάλιστα η διαφορά που παρατηρούμε στον ρυθμό πολλαπλασιασμού μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών είναι στατιστικά σημαντική (Repeated Measure ANOVA: Mauchly's W $p < 0.001$, Greenhouse-Geiser Epsilon = 0.061, Sphericity NOT-Assumed → Correction: Greenhouse-Geiser (time^{4h}*cell type) $p = 0,002$).

A.**B.****Γ.****Δ.**

Εικόνα 3.12: Καμπύλες ανάπτυξης των καρκινικών σειρών παχέος εντέρου CACO2 -Psiren (control) και CACO2 -Psiren SH1 CD81 (knockdown CD81). Α) Πείραμα 1. 3000 κύτταρα 07-06-21, Β) Πείραμα 2. 5000 κύτταρα 07-06-21, Γ) Πείραμα 3. 4000 κύτταρα 12-07-21. Δ) Συνδυαστικά αποτελέσματα των δύο πειραμάτων. Στατιστικά σημαντικά μειωμένος ρυθμός ανάπτυξης/πολλαπλασιασμού των CACO2 -Psiren SH1 CD81 καρκινικών κυττάρων έναντι των CACO2 -Psiren (Repeated Measure ANOVA: Mauchly's W $p < 0.001$, Greenhouse-Geiser Epsilon = 0.061, Sphericity NOT-Assumed $\rightarrow$ Correction: Greenhouse-Geiser (time^{4h}*cell type) $p = 0.002$).

ν) Ρυθμός ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου CACO2 με υπερέκφραση της CD81.

Συγκρίναμε τον ρυθμό ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου CACO2 στα οποία υπερεκφράσαμε την τετρασπανίνη CD81 επιμολύνοντας τα με ρετρο-ικό φορέα ο οποίος περιέχει το γονίδιο για την έκφραση της CD81 (CACO2 - PLXIN_CD81_OE), έναντι της αντίστοιχης control κυτταρικής σειράς (CACO2 - PLXIN), δηλαδή κυττάρων τα οποία είχαν επιμολυνθεί με «άδειο» βέκτορα PLXIN και χρησιμεύουν ως ομάδα ελέγχου. Συνολικά πραγματοποιήσαμε 2 πειράματα, το ένα έγινε με αρχικό αριθμό κυττάρων τα 4000 κύτταρα ανά well και το άλλο με 5000 ανά well σε 96well-plate. Ο ρυθμός ανάπτυξης των κυτταρικών σειρών συγκρίθηκε για 92 ώρες. Συνολικά μελετήσαμε τον ρυθμό ανάπτυξης σε 30 πειραματικές μονάδες για τα κύτταρα CACO2 - PLXIN και σε 30 πειραματικές μονάδες για τα κύτταρα CACO2 - PLXIN_CD81_OE. Ο ρυθμός ανάπτυξης ήταν εμφανώς υψηλότερος (Εικόνα 3.13) στα κύτταρα CACO2 - PLXIN_CD81_OE στα οποία είχαμε υπερεκφράσει την CD81, έναντι της ομάδας ελέγχου (CACO2 - PLXIN). Η διαφορά που παρατηρούμε στον ρυθμό πολλαπλασιασμού μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών είναι στατιστικά σημαντική [Repeated Measure ANOVA: Mauchly's W $p < 0.001$, Greenhouse-Geiser Epsilon = 0.069, Sphericity NOT-Assumed → Correction: Greenhouse-Geiser (time^{4h}*cell type) $p < 0,001$].

A.**B.****Γ.**

Εικόνα 3.13: Καμπύλες ανάπτυξης των καρκινικών σειρών παχέος εντέρου HCT116- PLXIN (control) και HCT116 -PLXIN_CD81_OE (υπερέκφραση CD81). Α) Πείραμα 1. 7000 κύτταρα 12-07-21, Β) Πείραμα 2. 7000 κύτταρα 11-03-22, Γ) Συνδυαστικά αποτελέσματα των δύο πειραμάτων: στατιστικά σημαντικά υψηλότερος ρυθμός ανάπτυξης/πολλαπλασιασμού των CACO2-PLXIN/CD81-OE καρκινικών κυττάρων έναντι των CACO2-PLXIN (Repeated Measure ANOVA: Mauchly's W $p < 0.001$, Greenhouse-Geiser Epsilon = 0.069, Sphericity NOT-Assumed → Correction: Greenhouse-Geiser (time^{4h}*cell type) $p < 0.001$).

3.6 Προσδιορισμός κυτταρικής μετανάστευσης (Wound Healing Assay).

Η ικανότητα μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων εκτιμήθηκε *in vitro* με τη χρήση του “wound healing assay”. Η τεχνική που χρησιμοποιήσαμε περιγράφεται με λεπτομέρεια στην «μεθοδολογία». Μελετήσαμε τις καρκινικές σειρές καρκίνου παχέος εντέρου DLD1 και CACO2 στα οποία είχαμε τροποποιήσει την έκφραση της τετρασπανίνης CD81. Η μελέτη της ικανότητας μετανάστευσης των κυττάρων HCT116 με τη χρήση του wound healing assay δεν κατέστη δυνατή λόγω αδυναμίας δημιουργίας της ουλής. Συγκεκριμένα για να πραγματοποιηθεί η τεχνική αυτή πρέπει να δημιουργηθεί μία ουλή σε κύτταρα που αναπτύσσονται σε επίπεδη επιφάνεια και είναι σε confluency. Η κυτταρική σειρά HCT116 ωστόσο σε συνθήκες confluency δημιουργεί μία μεμβράνη πάνω από την επιφάνεια στην οποία αναπτύσσονται τα κύτταρα και κάθε προσπάθεια για δημιουργία ουλής έχει ως αποτέλεσμα την αποκόλληση των κυττάρων γύρω από την ουλή δημιουργώντας μία μη «καθαρή» ουλή.

Στρώθηκαν από 300.000 των τροποποιημένων, πειραματικών καρκινικών κυττάρων και των κυττάρων της ομάδας ελέγχου σε πολυτρυβλία 24 θέσεων ώστε να έχουν καλύψει πλήρως την επιφάνεια σε 24 ώρες. Οι ουλές πραγματοποιήθηκαν μετά από 24 ώρες και τα πολυτρυβλία τοποθετήθηκαν στο IncuCyte ZOOM (Essen BioScience) για τη λήψη φωτογραφιών. Μετρήσαμε με τη χρήση του Image J την επιφάνεια των ουλών σε pixels. Συγκρίναμε το ρυθμό κάλυψης της ουλής μεταξύ των πειραματικών κυττάρων και των κυττάρων της ομάδας ελέγχου. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε το ποσοστό ακάλυπτης επιφάνειας (σε pixels) επί της αρχικής επιφάνειας της ουλής (σε pixels) σε διαστήματα 6 ωρών, μέχρι και την χρονική στιγμή πριν την πλήρη κάλυψη της ουλής. Τη χρονική στιγμή που η ουλή είχε πλήρως ή μερικώς καλυφθεί δεν μπορούσαμε να εξαγάγουμε αξιόπιστα δεδομένα από το Image J για την ανάλυση, οπότε οι χρονικές στιγμές αυτές δεν χρησιμοποιήθηκαν.

Το ποσοστό της εναπομείναντας ακάλυπτης επιφάνειας μετρήθηκε ως εξής:

- Όρα 0: $x0(\%) = \text{pixels (0h)} / \text{pixels (0h)} * 100\%$
- Όρα 6: $x6(\%) = \text{pixels (6h)} / \text{pixels (0h)} * 100\%$
- Όρα 12: $x12(\%) = \text{pixels (12h)} / \text{pixels (0h)} * 100\%$

- Ώρα 18: $x_{18}(\%) = \text{pixels}(18h) / \text{pixels}(0h) * 100\%$
- Ώρα 24: $x_{24}(\%) = \text{pixels}(24h) / \text{pixels}(0h) * 100\%$
- Ώρα 30: $x_{30}(\%) = \text{pixels}(30h) / \text{pixels}(0h) * 100\%$

Αναλύσαμε το ρυθμό κάλυψης των ουλών ανά 6 ώρες, συγκρίνοντας τα ποσοστά ακάλυπτης επιφάνειας της ουλής μεταξύ των πειραματικών κυττάρων και των κυττάρων της ομάδας ελέγχου με της χρήση του στατιστικού μοντέλου “Repeated Measures ANOVA”. Συνολικά, στα πειράματα που πραγματοποιήσαμε φάνηκε ότι η τετρασπανίνη CD81 παίζει σημαντικό ρόλο στα σηματοδοτικά μονοπάτια που ελέγχουν την κινητικότητα και τη μετανάστευση των κυττάρων. Συγκεκριμένα φάνηκε ότι η τετρασπανίνη CD81 ενεργώντας σε συνεργασία με άλλα μόρια της κυτταρικής επιφάνειας ενισχύει την κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων, καθώς η αποσιώπηση της έκφρασης της CD81 ανέστειλε την κινητικότητα των καρκινικών κυτταρικών σειρών παχέος εντέρου (DLD1 & CACO2) συγκριτικά με τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου, ενώ η υπερέκφραση της CD81 στην κυτταρική καρκινική σειρά CACO2 προήγαγε την κινητικότητά τους (Πίνακας 3.15).

	Vector	n	Κινητικότητα	p
DLD1	PSIREN	20		0.001
	SH1-CD81	33	↓	
CACO2	PSIREN	24		0.001
	SH1-CD81	33	↓	
CACO2	PLXIN	12		0.038
	CD81-OE	8	↑	

Πίνακας 3.15: Κινητικότητα καρκινικών κυτταρικών σειρών παχέος εντέρου με τροποποίηση της έκφρασης της τετρασπανίνης CD81 συγκριτικά με τα κύτταρα της αντίστοιχης ομάδας ελέγχου.

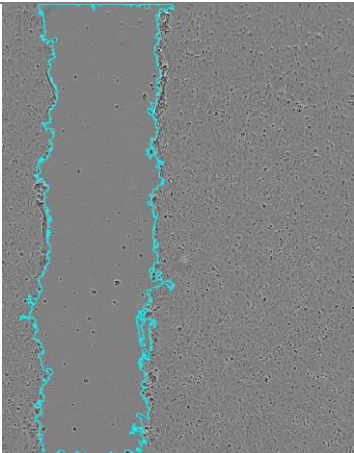
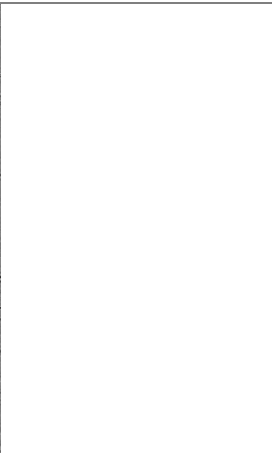
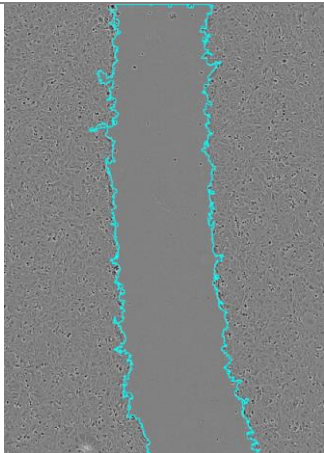
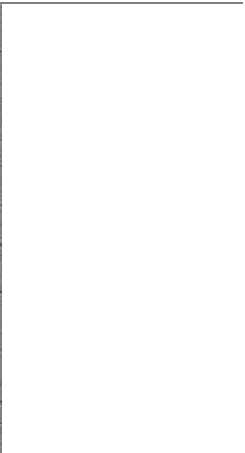
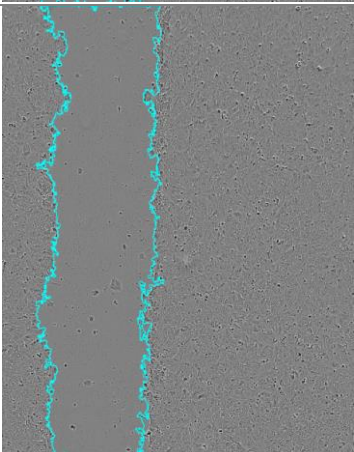
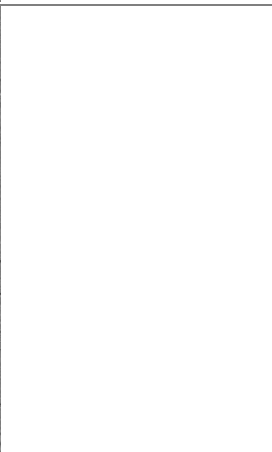
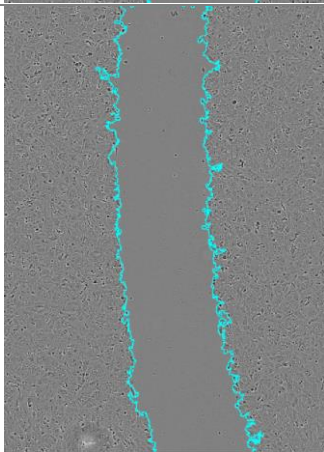
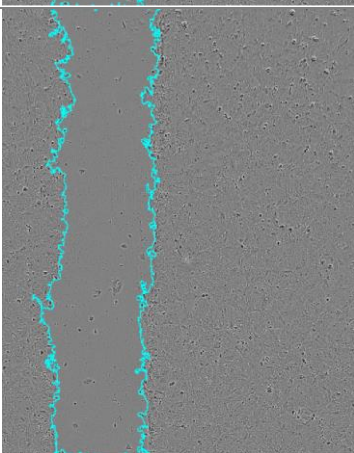
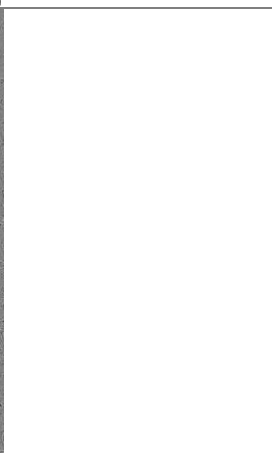
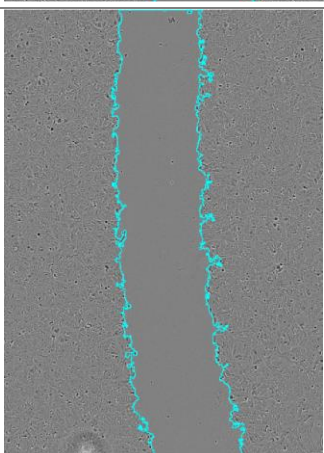
i) Ικανότητα μετανάστευσης των κυττάρων DLD1 με αποσιώπηση της έκφρασης της CD81.

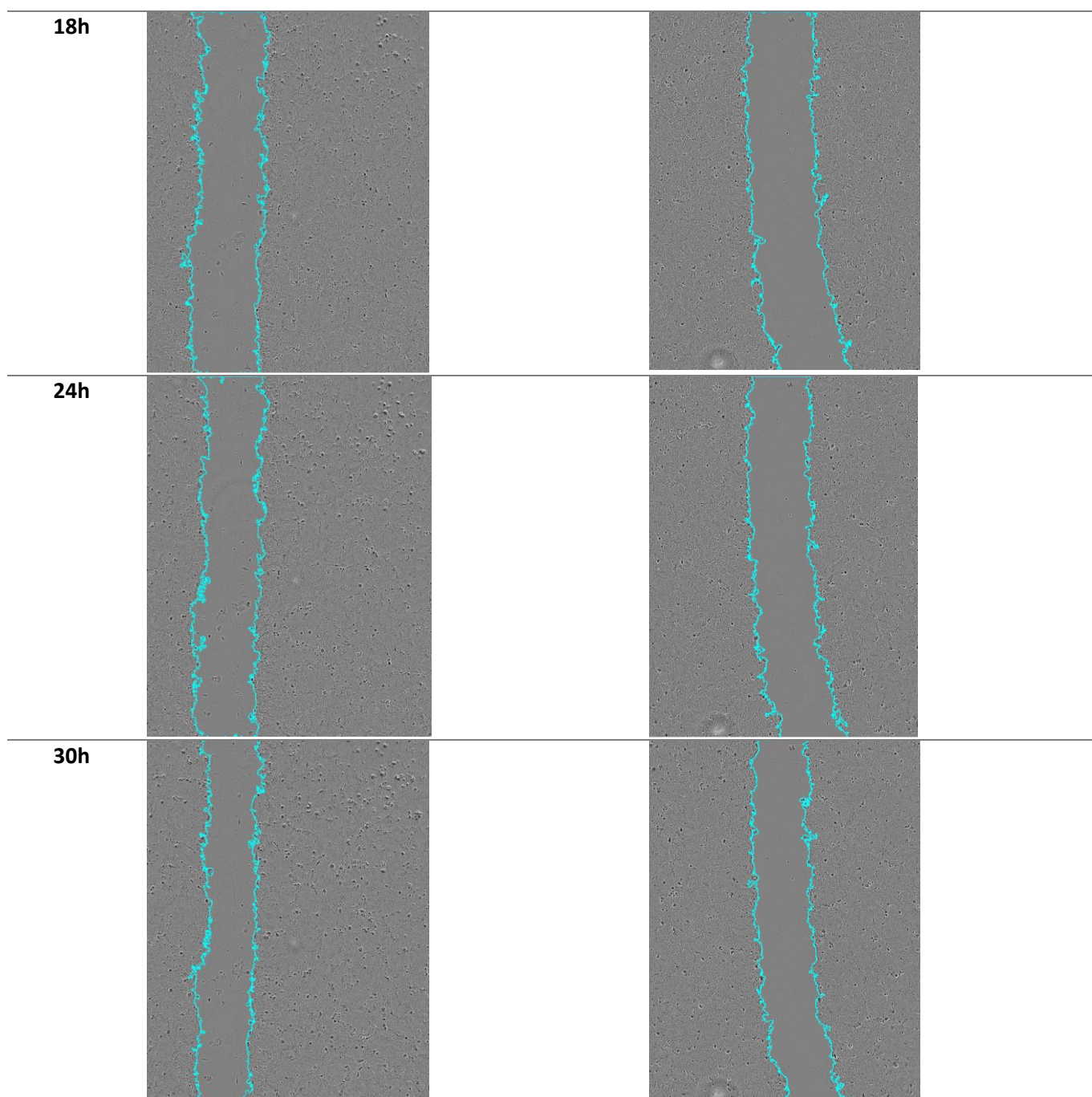
Συγκρίναμε την ικανότητα μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων DLD1 στα οποία έχουμε μειώσει την έκφραση της τετρασπανίνης CD81 μέσω shRNA για το CD81 (DLD1-Psiren SH1 CD81), έναντι της αντίστοιχης control κυτταρικής σειράς (DLD1-Psiren), δηλαδή κυττάρων τα οποία είχαν επιμολυνθεί με «άδειο» βέκτορα και χρησιμεύουν ως ομάδα ελέγχου. Μετρήσαμε με τη χρήση του Image J την επιφάνεια των ουλών σε pixels ανά 6 ώρες ξεκινώντας από την ώρα 0 (εικόνα 3.14). Η τελευταία μέτρηση έγινε πριν τη χρονική στιγμή που η ουλή είχε κλείσει ή μερικώς κλείσει ώστε το Image J να μπορεί να εξάγει ασφαλή δεδομένα για ανάλυση.

Πραγματοποιήσαμε 2 ξεχωριστά πειράματα το 1^ο στις 26-06-21 και το 2^ο στις 07-07-21. Πραγματοποιήσαμε μετρήσεις στις χρονικές στιγμές 0, 6, 12 και 18 για το πείραμα 1 και 0, 6, 12, 18 και 24 για το πείραμα 2. Συνολικά, τα δείγματα που δύναται να εκτιμηθούν από το πείραμα 1 ήταν 16. Συγκεκριμένα, οι 6 αφορούν τα κύτταρα DLD1-Psiren_SH1_CD81 και 10 την ομάδα ελέγχου DLD1-Psiren. Οι αξιολογήσιμες φωτογραφίες του πειράματος 2 ήταν 37, οι 10 αφορούν τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου, DLD1-Psiren, και οι 27 τα κύτταρα DLD1-Psiren_SH1_CD81. Για τις υπόλοιπες θέσεις οι φωτογραφίες που λάβαμε δεν ήταν αξιολογήσιμες καθώς το μηχάνημα δεν είχε εστιάσει στην περιοχή της ουλής ή ουλή δεν ήταν καθαρή.

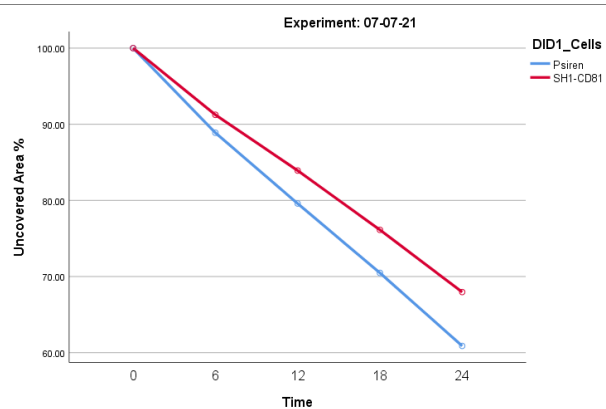
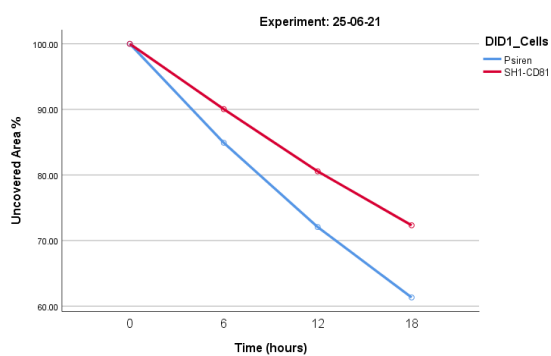
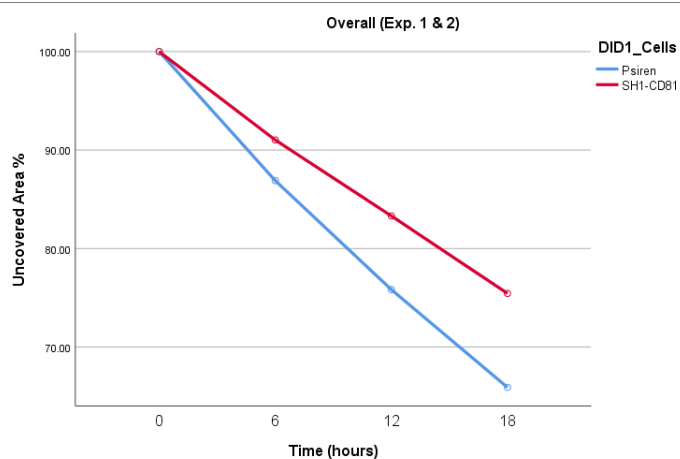
Τόσο στο πείραμα 1 όσο και στο πείραμα 2 οι καμπύλες) μας δείχνουν ότι ο ρυθμός με τον οποίο κλείνει η ουλή στα κύτταρα στα οποία έχει γίνει αποσιώπηση της έκφρασης της CD81 (DLD1-Psiren_SH1_CD81) είναι πιο αργός από τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου DLD1-Psiren τα οποία εκφράζουν κανονικά της CD81 (Εικόνα 3.15, καμπύλες A & B και η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική [πείραμα 1: Mauchly's W $p < 0.001$, Greenhouse-Geiser Epsilon = 0.470, Sphericity NOT-Assumed, Greenhouse-Geiser (time^{6h}*cell type) **$p = 0.004$** ; πείραμα 2: Mauchly's W $p < 0.001$, Greenhouse-Geiser Epsilon = 0.386, Sphericity NOT-Assumed, Greenhouse-Geiser (time^{6h}*cell type) **$p < 0.001$**). Συνολικά από το πείραμα 1 και πείραμα 2 αναλύσαμε 20 δείγματα της ομάδας ελέγχου DLD1-Psiren και 33 δείγματα των κυττάρων DLD1-Psiren_SH1_CD81. Η συνδυαστική ανάλυση των πειραμάτων 1 και 2 επιβεβαίωσε ότι τα κύτταρα που δεν εκφράζουν κανονικά την CD81 έχουν επηρεασμένη την ικανότητα μετανάστευσης (εικόνα 3.15, καμπύλη Γ) με στατιστικά σημαντικά αργότερο ρυθμό

σύγκλησης της ουλής συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου [Combined πείραμα 1 &2: Mauchly's W $p<0.001$, Greenhouse-Geiser Epsilon = 0.437, Sphericity NOT-Assumed, Greenhouse-Geiser (time^{6h}*cell type) **$p<0.001$**).

Hours	DLD1-Psiren		DLD1 -Psiren_SH1_CD81	
0h				
6h				
12h				



Εικόνα 3.14: Εκτίμηση επιφάνειας ουλής στα κύτταρα DLD1-Psiren & DLD1-Psiren_SH1_CD81. Η ανάπτυξη των κυττάρων και η λήψη φωτογραφιών έγινε στο IncuCyte ZOOM (Essen BioScience). Ελήφθησαν φωτογραφίες ανά 6 ώρες και η ανάλυση των εικόνων έγινε με τη χρήση του ImageJ.

A.**B.****Γ.**

Εικόνα 3.15: Ρυθμός κάλυψης της πληγής (wound healing assay) για τα κύτταρα DLD1-Psiren (control) και DLD1 SH1-CD81 (knockdown CD81). A) Πείραμα 1: 25-06-21, B) Πείραμα 2: 07-07-21, C) Συνολικά αποτελέσματα από συνδυασμό πειραμάτων 1 & 2.

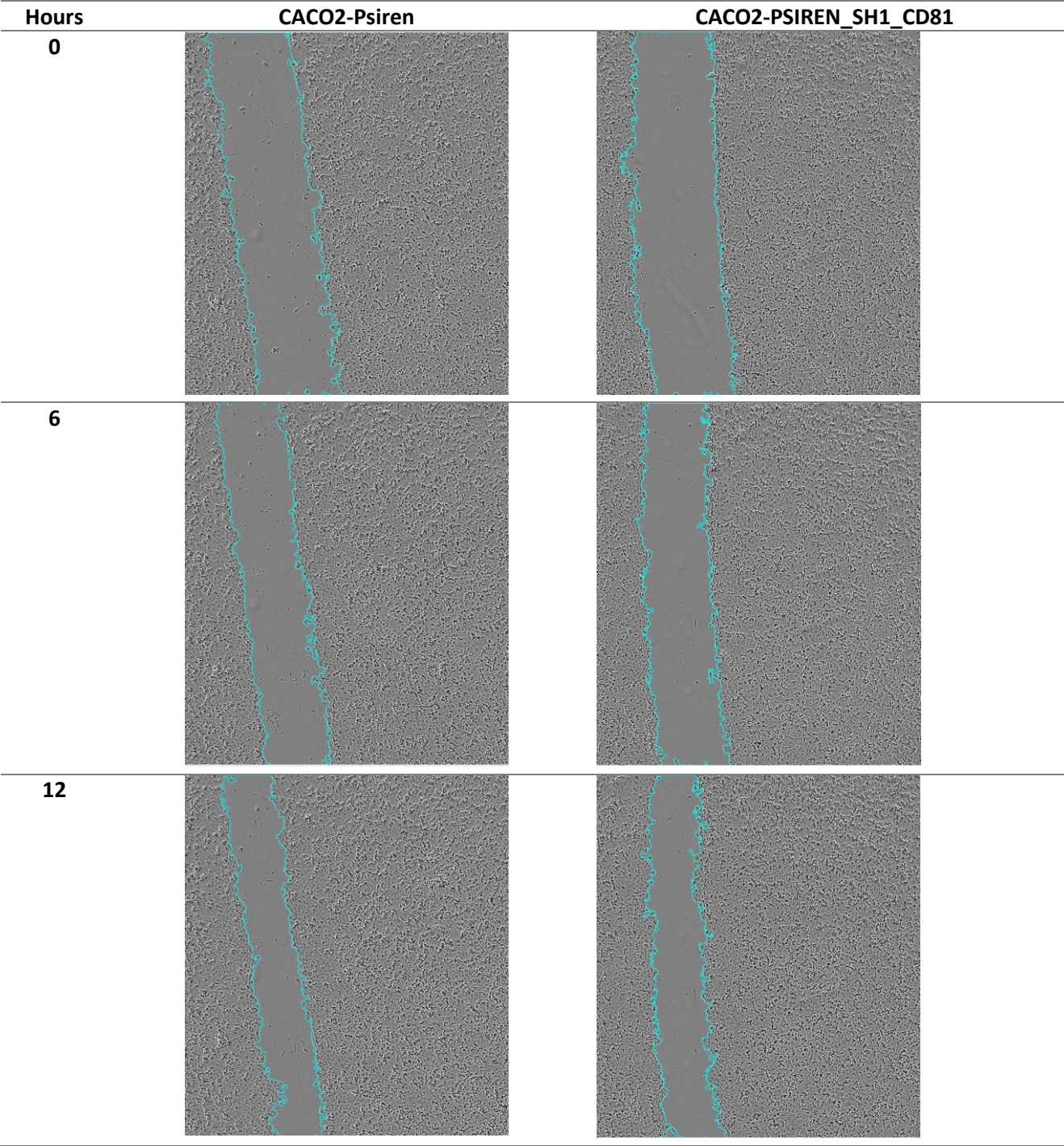
ii) Ικανότητα μετανάστευσης των κυττάρων CAC02 με αποσιώπηση της έκφρασης της CD81.

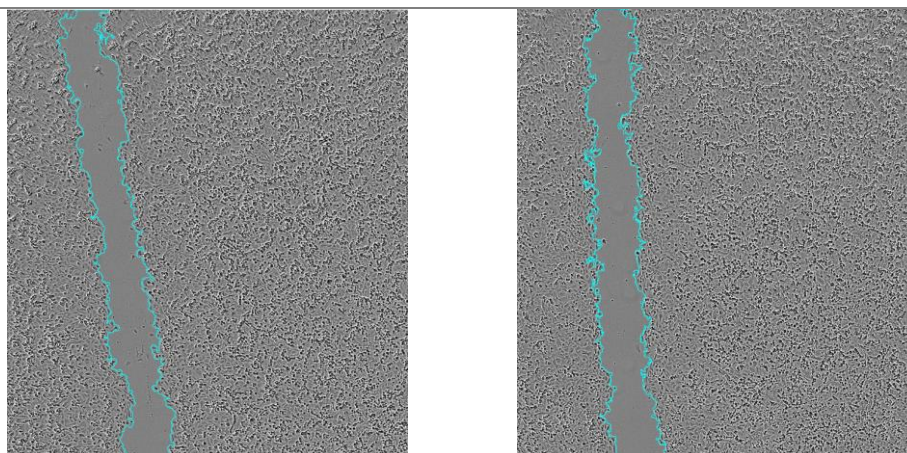
Συγκρίναμε την ικανότητα μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων CAC02 στα οποία έχουμε μειώσει την έκφραση της τετρασπανίνης CD81 μέσω shRNA για το CD81 (CAC02-Psiren SH1 CD81), έναντι της αντίστοιχης control κυτταρικής σειράς (CAC02-Psiren), δηλαδή κυττάρων τα οποία είχαν επιμολυνθεί με «άδειο» βέκτορα και χρησιμεύουν ως ομάδα ελέγχου. Μετρήσαμε με τη χρήση του Image J την επιφάνεια των ουλών σε pixels ανά 6 ώρες ξεκινώντας από την ώρα 0 (εικόνα 3.16). Η τελευταία μέτρηση έγινε πριν τη χρονική στιγμή που η ουλή είχε κλείσει ή μερικώς κλείσει ώστε το Image J να μπορεί να εξαγάγει ασφαλή δεδομένα για ανάλυση.

Πραγματοποιήσαμε 2 ξεχωριστά πειράματα το 1^ο στις 26-06-21 και το 2^ο στις 07-07-21. Πραγματοποιήσαμε μετρήσεις στις χρονικές στιγμές 0, 6, 12 και 18 για το πείραμα 1 και 2. Τα δείγματα που δύναται να εκτιμηθούν από το πείραμα 1 ήταν 28. Συγκεκριμένα, τα 13 αφορούν τα κύτταρα CAC02-Psiren_SH1_CD81 και τα 15 την ομάδα ελέγχου CAC02-Psiren. Οι αξιολογήσιμες φωτογραφίες του πειράματος 2 ήταν 29, οι 9 αφορούν τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου, DLD1-Psiren, και οι 20 τα κύτταρα CAC02-Psiren_SH1_CD81. Για τις υπόλοιπες θέσεις οι φωτογραφίες που λάβαμε δεν ήταν αξιολογήσιμες καθώς το μηχάνημα δεν είχε εστιάσει στην περιοχή της ουλής ή ουλή δεν ήταν καθαρή.

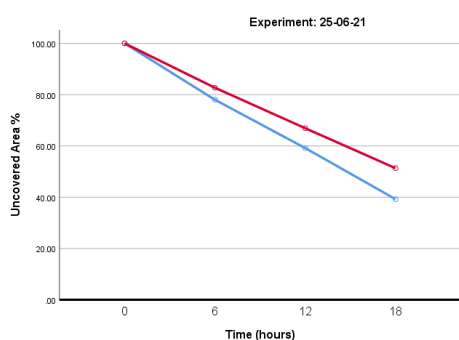
Τόσο στο πείραμα 1 όσο και στο πείραμα 2 οι καμπύλες) μας δείχνουν ότι ο ρυθμός με τον οποίο κλείνει η ουλή στα κύτταρα στα οποία έχει γίνει αποσιώπηση της έκφρασης της CD81 (CAC02-Psiren_SH1_CD81) είναι πιο αργός από τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου CAC02-Psiren τα οποία εκφράζουν κανονικά της CD81 (Εικόνα 3.17, καμπύλες A & B) και η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική [πείραμα 1: Mauchly's W $p < 0.001$, Greenhouse-Geiser Epsilon = 0.432, Sphericity NOT-Assumed, Greenhouse-Geiser (time^{6h}*cell type) **$p = 0.016$** ; πείραμα 2: Mauchly's W $p < 0.001$, Greenhouse-Geiser Epsilon = 0.409, Sphericity NOT-Assumed, Greenhouse-Geiser (time^{6h}*cell type) **$p < 0.003$**). Συνολικά από το πείραμα 1 και πείραμα 2 αναλύσαμε 24 δείγματα της ομάδας ελέγχου CAC02-Psiren και 33 δείγματα των κυττάρων CAC02-Psiren_SH1_CD81. Η συνδυαστική ανάλυση των πειραμάτων 1 και 2 επιβεβαίωσε ότι τα κύτταρα που δεν εκφράζουν κανονικά την CD81 έχουν επηρεασμένη την ικανότητα μετανάστευσης (εικόνα 3.17, καμπύλη Γ) με στατιστικά σημαντικά αργότερο ρυθμό

σύγκλησης της ουλής συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου [Repeated Measure ANOVA: Mauchly's W $p<0.001$, Greenhouse-Geiser Epsilon = 0.428, Sphericity NOT-Assumed, Greenhouse-Geiser (time^{6h}*cell type) $p<0.001$).

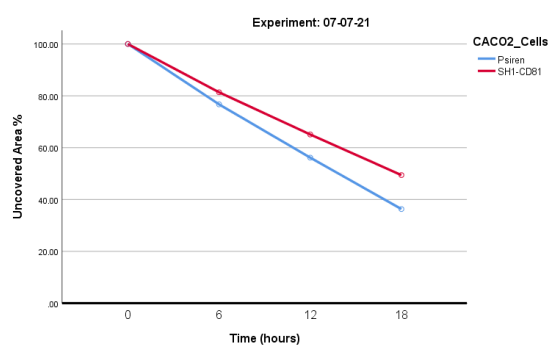




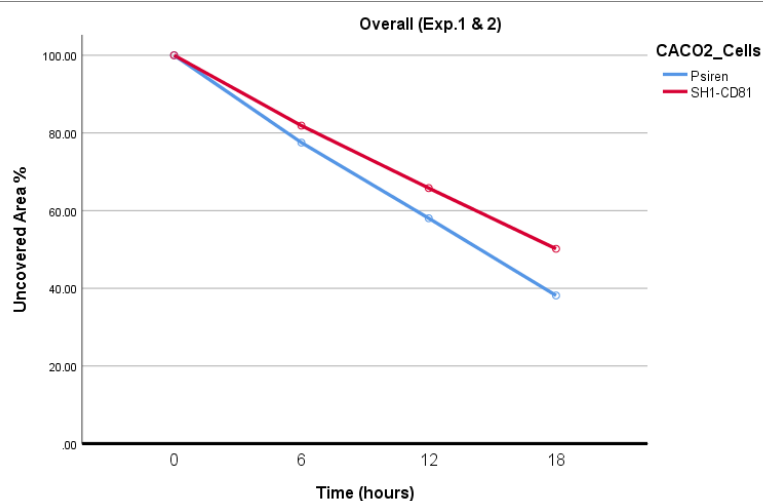
Εικόνα 3.16: Εκτίμηση επιφάνειας ουλής στα κύτταρα CACO2-Psiren & CACO2-Psiren_SH1_CD81. Η ανάπτυξη των κυττάρων και η λήψη φωτογραφιών έγινε στο IncuCyte ZOOM (Essen BioScience). Ελήφθησαν φωτογραφίες ανά 6 ώρες και η ανάλυση των εικόνων έγινε με τη χρήση του ImageJ.



A.



B.



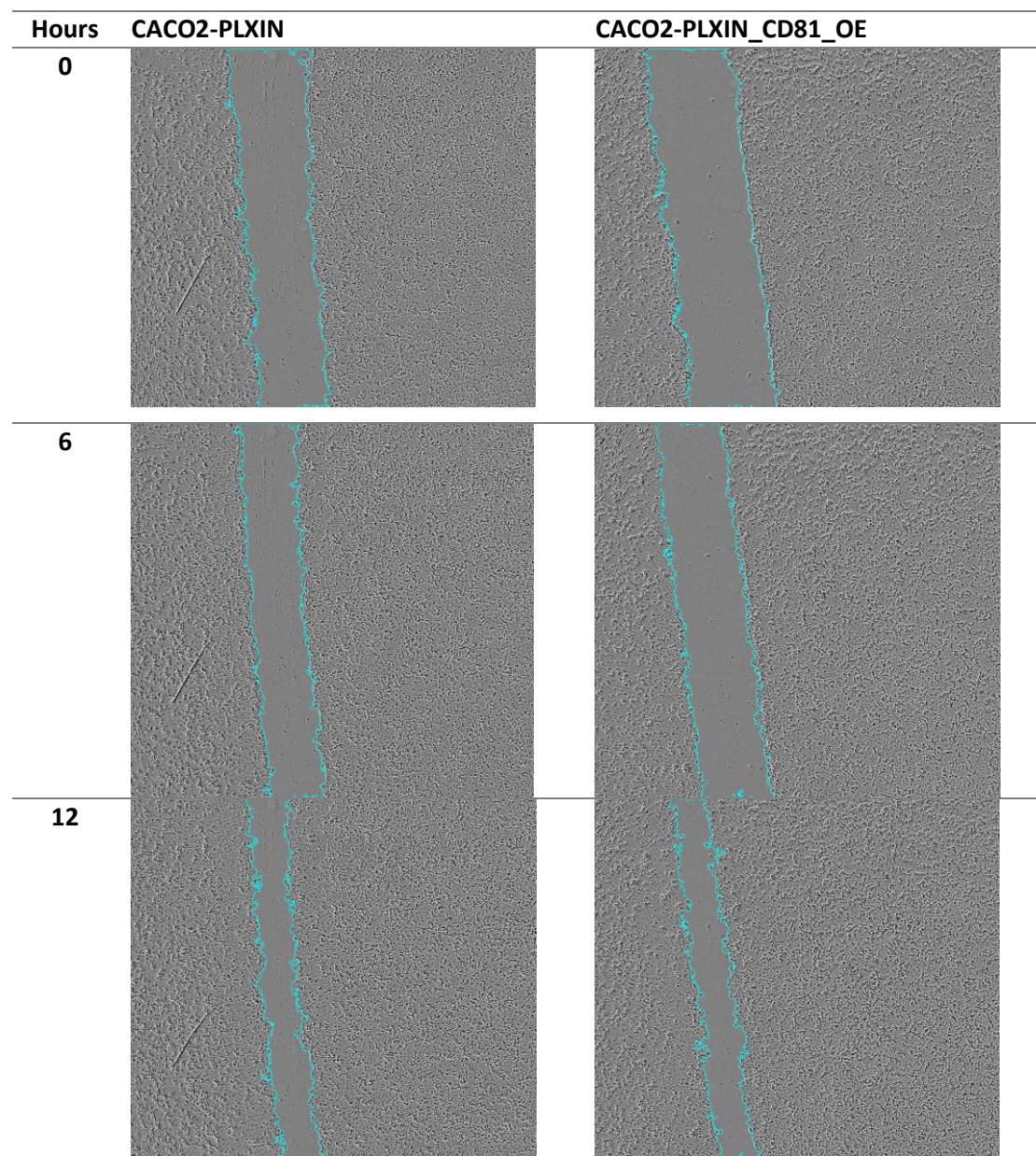
C.

Εικόνα 3.17. Ρυθμός κάλυψης της πληγής (wound healing assay) για τα κύτταρα CACO2-Psiren (control) και CACO2 SH1-CD81 (knockdown CD81). A) Πείραμα 1: 25-06-21, B) Πείραμα 2: 07-07-21, C) Συνολικά αποτελέσματα από συνδυασμό πειραμάτων 1 & 2.

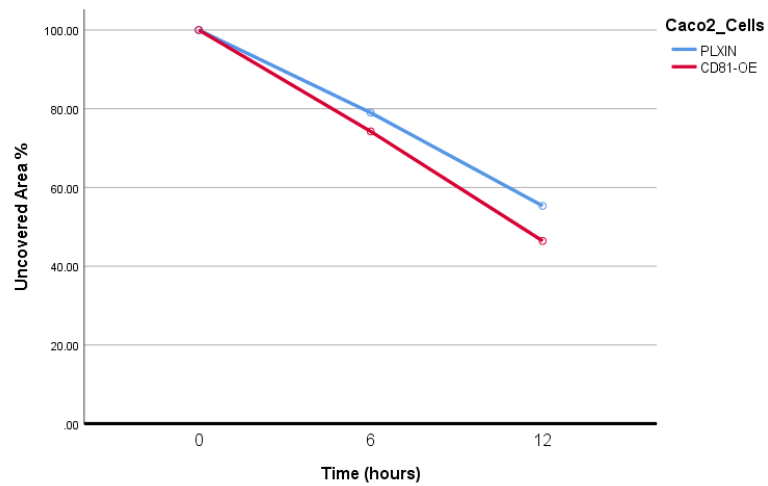
iii) Ικανότητα μετανάστευσης των κυττάρων CACO2 με υπερέκφραση της CD81.

Συγκρίναμε την ικανότητα μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων CACO2 στα οποία υπερεκφράσαμε τετρασπανίνη CD81 επιμολύνοντας τα με ρετρο-ικό φορέα ο οποίος περιέχει το γονίδιο για την έκφραση της CD81 (CACO2-PLXIN_CD81_OE), έναντι της αντίστοιχης control κυτταρικής σειράς (CACO2-PLXIN), δηλαδή κυττάρων τα οποία είχαν επιμολυνθεί με «άδειο» βέκτορα PLXIN και χρησιμεύουν ως ομάδα ελέγχου. Μετρήσαμε με τη χρήση του Image J την επιφάνεια των ουλών σε pixels στην ώρα 0, ώρα 6 και ώρα 12 από την έναρξη του πειράματος (εικόνα 3.18). Μετά από 18 ώρες η ουλή είχε κλείσει για περισσότερα από τα μισά δείγματα, ιδίως στην ομάδα CACO2-PLXIN_CD81_OE οπότε δεν μπορούσαμε να εξάγουμε δεδομένα για την ανάλυση.

Συνολικά, οι αξιολογήσιμες φωτογραφίες ήταν 8 για τα κύτταρα CACO2-PLXIN_CD81_OE και 12 για την ομάδα ελέγχου CACO2-PLXIN. Για τις υπόλοιπες θέσεις οι φωτογραφίες που λάβαμε δεν ήταν αξιολογήσιμες καθώς το μηχάνημα δεν είχε εστιάσει στην περιοχή της ουλής ή ουλή δεν ήταν καθαρή. Παρατηρούμε από την καμπύλη (εικόνα 3.19) ότι τα κύτταρα CACO2 στα οποία έχει υπερεκφραστεί η CD81 (CACO2-PLXIN_CD81_OE) καλύπτουν πιο γρήγορα την ουλή συγκριτικά με τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου (CACO2-PLXIN). Το στατιστικό μοντέλο “Repeated Measures ANOVA” έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στον ρυθμό κάλυψης της ουλής μεταξύ των κυττάρων CACO2-PLXIN_CD81_OE & CACO2-PLXIN [Repeated Measure ANOVA: Mauchly's W $p < 0.001$, Greenhouse-Geiser Epsilon = 0.557, Sphericity NOT-Assumed, Greenhouse-Geiser (time^{6h}*cell type) $p = 0.038$].



Εικόνα 3.18: Εκτίμηση επιφάνειας ουλής στα κύτταρα CACO2-PLXIN & CACO2-PLXIN_CD81_OE. Η ανάπτυξη των κυττάρων και η λήψη φωτογραφιών έγινε στο IncuCyte ZOOM (Essen BioScience). Ελήφθησαν φωτογραφίες ανά 6 ώρες και η ανάλυση των εικόνων έγινε με τη χρήση του ImageJ.



Εικόνα 3.19: Ρυθμός κάλυψης της πληγής (wound healing assay) για τα κύτταρα CACO2-PLXIN (control) και CACO2 PLXIN_CD81_OE (υπερέκφραση CD81).

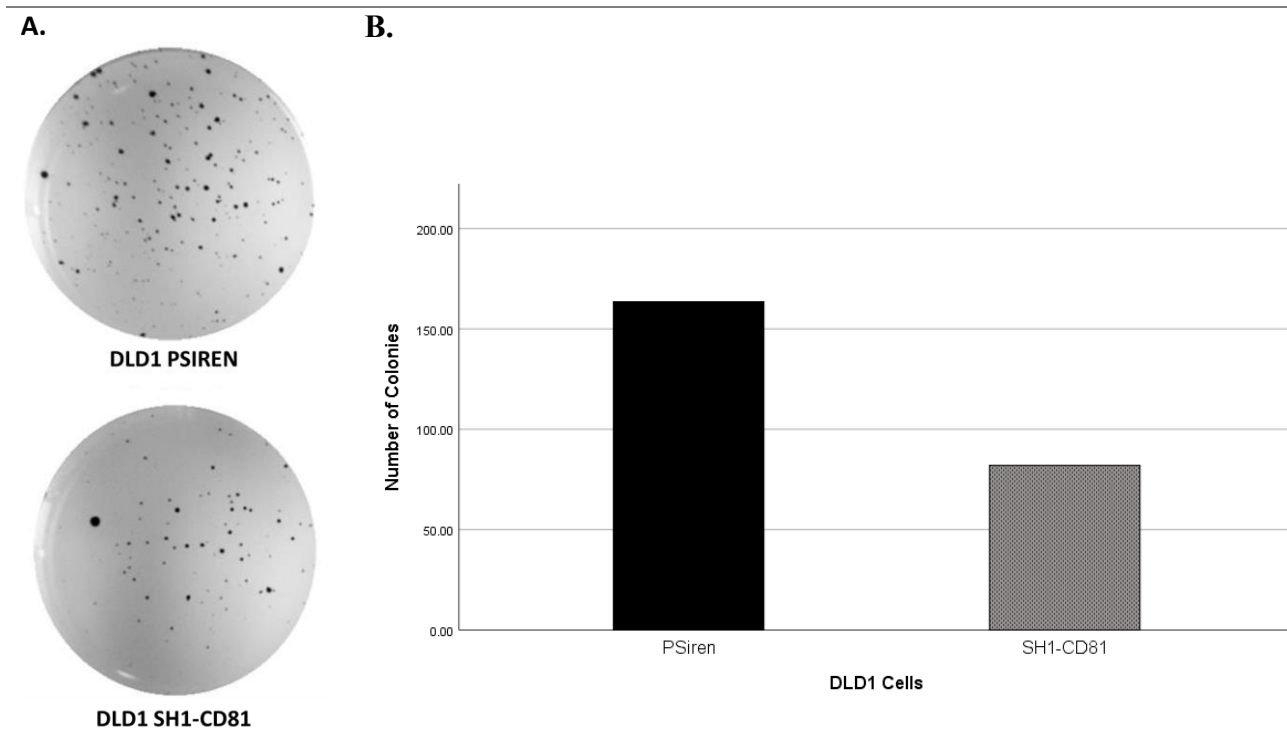
3.7 Η επίδραση της τετρασπανίνης CD81 στη δυνατότητα σχηματισμού όγκων.

Όπως φάνηκε με τα μέχρι στιγμής πειράματα η τετρασπανίνη CD81 συμβάλει στο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και στη δυνατότητα μετακίνησης τους, αυξάνοντας τόσο το ρυθμό πολλαπλασιασμού όσο και την ταχύτητα μετανάστευσης. Επόμενος στόχος μας ήταν να διερευνήσουμε εάν η τετρασπανίνη CD81 επηρεάζει τη δυνατότητα των καρκινικών κυττάρων να δημιουργήσουν όγκους. Για το σκοπό αυτό μελετήσαμε τη δυνατότητα των καρκινικών κυττάρων να αναπτύσσονται αποικίες *in vitro* σε ημι-στερεό υλικό (anchorage-independent growth). Η δοκιμασία “anchorage-independent growth” έχει καθιερωθεί καθώς είναι μία *in vitro* δοκιμασία η οποία μπορεί να προβλέψει την ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να σχηματίζουν όγκους *in vivo* και πραγματοποιείται αναπτύσσοντας τα καρκινικά κύτταρα μεταξύ δύο στιβάδων που έχουν διαφορετική συγκέντρωση σε άγαρ και είναι εμπλουτισμένες με το κατάλληλο θρεπτικό υλικό (soft-agar colony formation assay).

Για τη συγκεκριμένη δοκιμασία, δημιουργήσαμε μία κατώτερη στοιβάδα με 0,8% άγαρ, πάνω από την οποία στρώσαμε την ανώτερη στοιβάδα με 0,4% άγαρ. Τα υπό διερεύνηση κύτταρα εναιωρήθηκαν στην ανώτερη στοιβάδα με 0,4% άγαρ. Η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε “6-well plate”. Κάναμε 3 αντίγραφα για την κάθε κυτταρική σειρά υπό διερεύνηση (δηλαδή 3 πηγαδάκια στρώθηκαν με τα κύτταρα με τροποποιημένη έκφραση του CD81 και 3 πηγαδάκια με την αντίστοιχη ομάδα ελέγχου). Ο αριθμός των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 6.000 κύτταρα για κάθε πηγαδάκι/αντίγραφο. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για διάστημα περίπου τριών εβδομάδων για το σχηματισμό αποικιών. Στο τέλος των τριών εβδομάδων οι αποικίες βάφτηκαν με διάλυμα τετραζολίου (tetrazolium violet) και η ανάλυση των εικόνων και καταμέτρηση των αποικιών έγινε με το ImageJ.

Από τις 3 καρκινικές σειρές παχέος εντέρου που μελετήσαμε (DLD1, CACO2, HCT116) μόνο τα κύτταρα DLD1 αναπτύχθηκαν επαρκώς ώστε να έχουμε αξιολογήσιμα αποτελέσματα. Παρατηρήσαμε ότι η καταστολή της έκφρασης της CD81 από τα κύτταρα DLD1 (DLD1-Psiren SH1 CD81), μειώνει την ικανότητα των κυττάρων αυτών να δημιουργήσουν αποικίες σε ημι-στερεό υλικό (anchorage-independent growth). Συγκεκριμένα, όπως βλέπουμε και στην εικόνα 3.20, τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου (DLD1-PSiren) κατάφεραν να δημιουργήσουν κατά μέσο

όσο 163 αποικίες έναντι 82 αποικιών που δημιούργησαν τα υπό διερεύνηση κύτταρα
DLD1-PSiren SH1 CD81 (t-test $p = 0.002$)



Εικόνα 3.20: Η επίδραση της τετρασπανίνης CD81 στη δυνατότητα σχηματισμού όγκων των καρκινικών κυττάρων DLD1. Α) Ανάπτυξη αποικιών DLD1 κυττάρων σε άγαρ. Β) Μέσος αριθμός αποικιών για τα κύτταρα με καταστολή της έκφρασης της CD81 (DLD1 SH1-CD81) έναντι των κυττάρων της ομάδας ελέγχου (DLD1-PSiren) (t-test $p = 0.002$)

3.8 Επίδραση της τετρασπανίνης CD81 στον κυτταρικό κύκλο καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου.

Από τη μελέτη του φαινοτύπου των καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου που πραγματοποιήσαμε, παρατηρούμε ότι η τετρασπανίνη CD81 πιθανώς να εμπλέκεται στη διαδικασία του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου που εξετάσαμε. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι η τετρασπανίνη CD81 δρα ευοδώνοντας την πρόοδο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, καθώς οι κυτταρικές σειρές που είχαν ανέπαφη την έκφραση της CD81 παρουσίασαν υψηλότερους ρυθμούς ανάπτυξης *in vitro* συγκριτικά με τις κυτταρικές σειρές στις οποίες είχαμε προχωρήσει σε μείωση της έκφρασης της CD81 και η διαφορά αυτή στους ρυθμούς ανάπτυξης υπήρξε στατιστικά σημαντική και για τους 3 τύπους κυττάρων καρκίνου παχέος εντέρου που εξετάσαμε (DLD1, CACO2 & HCT116). Παρομοίως οι κυτταρικές σειρές στις οποίες προχωρήσαμε σε αύξηση της έκφρασης της CD81 (CACO2 & HCT116) παρουσίασαν υψηλότερους ρυθμούς ανάπτυξης συγκριτικά με τις αντίστοιχες κυτταρικές που εξέφραζαν τη βασική τιμή της CD81.

Για να διερευνήσουμε τους λόγους για τους οποίους η τετρασπανίνη CD81 επιδρά στον ρυθμό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού εξετάσαμε την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο. Τα γονίδια που εξετάσαμε και τα οποία εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο είναι τα E2F1, CDC6 και CyclinD1. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο του E2F1 ανήκει στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων του E2F οι οποίοι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταβατική φάση G1/S, ενώ ο E2F1 θεωρείται ενεργοποιητής του κυτταρικού κύκλου (134). Η CyclinD1 είναι μία πρωτεΐνη που εμπλέκεται στον κυτταρικό κύκλο και κωδικοποιείται από το γονίδιο CCND1. Αυτή η κυκλίνη σχηματίζει ένα σύμπλεγμα με τις κινάσες CDK4 ή CDK6 και λειτουργεί ως ρυθμιστική τους υπομονάδα, των οποίων η δραστηριότητα απαιτείται για τη μετάβαση του κυτταρικού κύκλου από τη φάση G1/S. Επιπλέον η κυκλίνη D1 φαίνεται να σχετίζεται με την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος. Υπερέκφραση της CyclinD1 έχει παρατηρηθεί σε διάφορες κακοήθειες και φαίνεται ότι εμπλέκεται στην ογκογένεση (135). Η πρωτεΐνη CDC6

είναι βασικός ρυθμιστής της αντιγραφής του DNA και παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση και διατήρηση των μηχανισμών του σημείου ελέγχου στον κυτταρικό κύκλο που συντονίζουν τη φάση S και τη μίτωση. Έχει αποδειχθεί ότι η CDC6 παρουσιάζει ογκογόνο δραστηριότητα (136).

Επομένως, σκοπός μας είναι να διαπιστώσουμε εάν υπάρχουν διαφορές στην έκφραση των γονιδίων αυτών μεταξύ των καρκινικών κυττάρων όπου είχαμε τροποποιήσει την έκφραση της CD81 και των κυττάρων της ομάδας ελέγχου. Για το λόγο αυτό εξετάσαμε τη σχετική έκφραση των γονιδίων αυτών σε επίπεδο mRNA, μεταξύ των τροποποιημένων καρκινικών κυττάρων και των αντίστοιχων κυττάρων της ομάδας ελέγχου, με τη χρήση Real-Time (quantitative) PCR (RT-qPCR).

Συγκεκριμένα, συγκρίναμε την έκφραση σε mRNA επίπεδο των τριών γονιδίων του κυτταρικού κύκλου (E2F1, CyclinD1 & CDC6) μεταξύ των κυτταρικών σειρών καρκίνου παχέος εντέρου όπου πραγματοποιήσαμε μείωση της έκφρασης της CD81 (εικόνα 3.21): a) DLD1-Psiren vs DLD1-Psiren_SH1_CD81, b) CACO2-Psiren vs CACO2-Psiren_SH1_CD81, c) HCT116-Psiren vs HCT116-Psiren_SH1_CD81, καθώς και μεταξύ των κυτταρικών σειρών καρκίνου πάχους εντέρου όπου πραγματοποιήσαμε υπερέκφραση της CD81: d) CACO2-PLXIN vs CACO2-PLXIN_CD81_OE, e) HCT116-PLXIN vs HCT116-PLXIN_CD81_OE. Για τα κύτταρα παχέος εντέρου CACO2 δεν κατέστη δυνατή η εκτίμηση της mRNA έκφρασης του γονιδίου CDC6. Συγκεκριμένα, φάνηκε ότι το συγκεκριμένο γονίδιο δεν εκφράζεται επαρκώς σε κανένα από τα CACO2 κύτταρα που εξετάσαμε, ούτε στα κύτταρα της ομάδας ελέγχου, ούτε στα κύτταρα με υποέκφραση ή υπερέκφραση της CD81, καθώς για την ενίσχυση του χρειάστηκαν > 35 κύκλοι και επομένως δεν χρησιμοποιήθηκε στην ανάλυση.

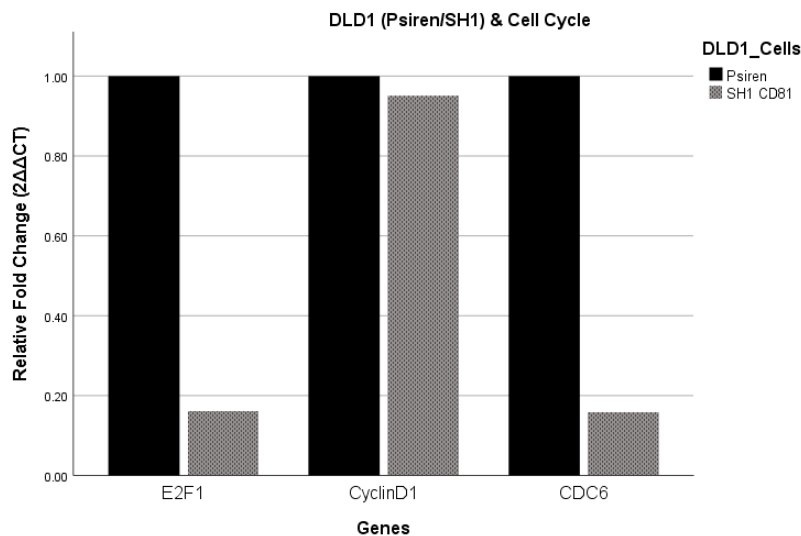
Για τα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου DLD1 παρατηρούμε ότι η μείωση της έκφρασης της CD81 οδηγεί σε μείωση της έκφρασης σε επίπεδο mRNA των γονιδίων του κυτταρικού κύκλου E2F1 και CDC6 συγκριτικά με τα κύτταρα της ομάδας control (E2F1: mean relative fold change= 0.16, $p < 0.001$; CDC6: mean relative fold change= 0.15, $p < 0.001$) με την διαφορά που προκύπτει στην έκφραση να είναι στατιστικά σημαντική, αλλά όχι για το γονίδιο CyclinD1, όπου τα επίπεδα έκφρασης παραμένουν σχεδόν ίδια. Οριακά στατιστική διαφορά παρατηρούμε στην έκφραση της CyclinD1 στα HCT113 κύτταρα με υπερέκφραση της CD81, ωστόσο το p είναι 0,47 και η διαφορά στα επίπεδα έκφρασης (relative fold change 0.947) είναι ουσιαστικά

αμελητέα και μη αξιολογίσιμη. Παρομοίως, για τις εναπομείναντες συγκρίσεις δεν παρατηρούμε καμία ουσιαστική διαφορά στα επίπεδα mRNA έκφρασης των 3 γονιδίων του κυτταρικού κύκλου για τα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου CACO2 και HCT116, ούτε στην περίπτωση όπου έχουμε μειώσει την έκφραση της CD81, αλλά ούτε και στις περιπτώσεις όπου πραγματοποιήσαμε υπερέκφραση της CD81.

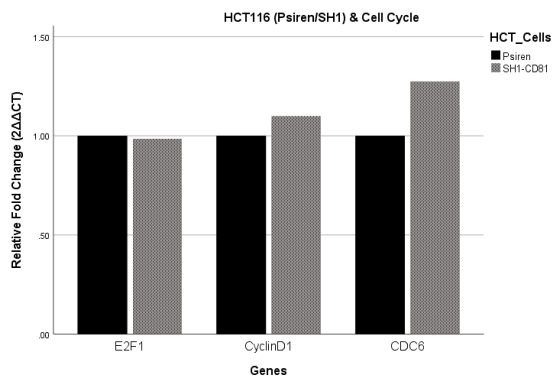
Τα αποτελέσματα (πίνακας 3.16) αυτά καταδεικνύουν, ότι η δράση της τετρασπανίνης CD81 προάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, διαμέσου της ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων που ελέγχουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (E2F1 & CDC6) στα κύτταρα καρκίνου παχέος εντέρου DLD1. Το γεγονός ότι δεν παρατηρούμε την ίδια επίδραση της τετρασπανίνης CD81 στα κύτταρα CACO2 & HCT116 όπως στα DLD1 σχετίζεται με την ετερογένεια των καρκινικών κυττάρων και τους διαφορετικούς μηχανισμούς επιβίωσης που επιστρατεύουν και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

		E2F1		CyclinD1		CDC6	
		<u>RFC</u>	<u>p</u>	<u>RFC</u>	<u>p</u>	<u>RFC</u>	<u>p</u>
DLD1	Psiren/SH1-CD81	0.161	<0.001	0.95	0.181	0.158	<0.001
HCT116	Psiren/SH1-CD81	0.958	0.375	1.08	0.112	1.213	0.181
	PLXIN/CD81-OE	1.118	0.90	0.936	0.047	1.00	0.975
CACO2	Psiren/SH1-CD81	0.799	0.113	0.701	0.152	<i>n.a.</i>	
	PLXIN/CD81-OE	1.04	0.781	0.958	0.583	<i>n.a.</i>	
Πίνακας 3.16: Σχετική mRNA έκφραση (relative fold change) E2F1, CyclinD1 & CDC6. Γονίδια του κυτταρικού κύκλου E2F1, CyclinD1 & CDC6 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου με τροποποιημένη έκφραση της τετρασπανίνης CD81 συγκριτικά με τα αντίστοιχα κύτταρα της ομάδας ελέγχου. RFC: Relative Fold Change							

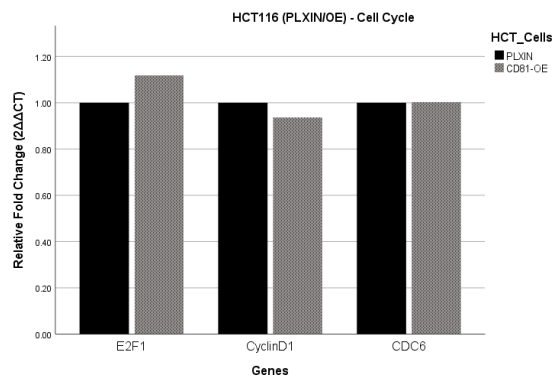
A.



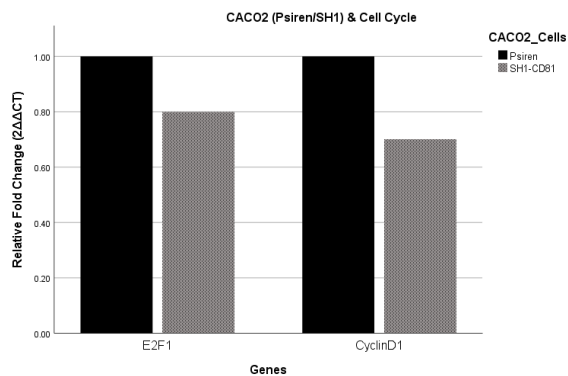
B.



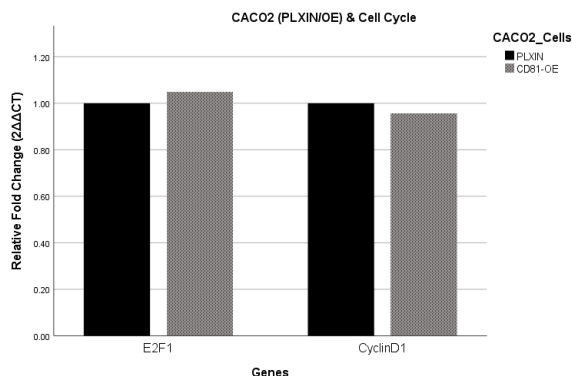
Γ.



Δ.



E.



Εικόνα 3.21: Επίδραση της τετρασπανίνης CD81 στον κυτταρικό κύκλο καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου -- Σχετική mRNA έκφραση (relative fold change) των γονιδίων E2F1, CyclinD1 & CDC6 που σχετίζονται με κυτταρικό κύκλο σε καρκινικές σειρές παχέος εντέρου με τροποποίηση της έκφρασης της CD81. A) *DLD1 (Psiren/SH1-CD81)* παρατηρούμε μείωση των επιπέδων της mRNA έκφρασης των γονιδίων E2F1 και CDC6 στα κύτταρα που υποεκφράζουν τη CD81 συγκριτικά με τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου. B) *HCT116 (Psiren/SH1-CD81)* δεν παρατηρούμε ουσιαστική διαφορά στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων του κυτταρικού κύκλου μεταξύ των κυττάρων με μειωμένη έκφραση της CD81 και των κυττάρων της ομάδας ελέγχου. Γ) *HCT116 (PLXIN/CD81-OE)* δεν παρατηρούμε ουσιαστική διαφορά στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων του κυτταρικού κύκλου μεταξύ των κυττάρων που υπερεκφράζουν CD81 και των κυττάρων της ομάδας ελέγχου. Δ) *CACO2 (Psiren/SH1-CD81)* παρουσία μικρής πτώσης της έκφρασης των E2F1 και CyclinD1 στα κύτταρα με υπο-έκφραση της C81. E) *CACO2*

3.9 Επίδραση της τετρασπανίνης CD81 στις οδούς σηματοδότησης του NF-κΒ.

Για να διερευνήσουμε την πιθανή εμπλοκή της τετρασπανίνης CD81 στα μονοπάτια σηματοδότησης του NF-κΒ, εξετάσαμε τα επίπεδα έκφρασης τριών γονιδίων που σχετίζονται με την ενεργοποίηση του NF-κΒ. Η μελέτη της έκφρασης των παραγόντων αυτών σχεδιάστηκε να γίνει τόσο σε επίπεδο πρωτεΐνης (Western Blot), όσο και σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης/mRNA (RT-qPCR). Ωστόσο, μετά από πολλαπλές προσπάθειες και λόγω προβλημάτων με τα πρωτογενή αντισώματα, τα αποτελέσματα που έχουμε σε επίπεδο πρωτεΐνης (Western Blot) είναι περιορισμένα και βασιστήκαμε κυρίως στα επίπεδα mRNA έκφρασης (RT-qPCR).

Οι παράγοντες που εξετάσαμε είναι: CHUK (IKKα), IKKβ και RELA (p65). Το γονίδιο CHUCK κωδικοποιεί την πρωτεϊνική κινάση IKKα (inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha). Το IKK-α είναι μέλος της οικογένειας πρωτεϊνικών κινασών σερίνης/θρεονίνης και αποτελεί μέρος του συμπλέγματος κινάσης IκΒ. Συγκεκριμένα, σχηματίζει ένα σύμπλεγμα στο κύτταρο με το IKK-β και το NEMO που παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ. Οι μεταγραφικοί παράγοντες NF-κΒ συνήθως διατηρούνται σε ανενεργή κατάσταση από τις ανασταλτικές πρωτεΐνες IκBs. Τα IKK-α και IKK-β φωσφορυλιώνουν τις πρωτεΐνες IκΒ, επισημαίνοντάς τις για αποικοδόμηση μέσω ουβικουϊτινοποίησης και επιτρέποντας στους παράγοντες μεταγραφής NF-κΒ να εισέλθουν στον πυρήνα. Ο μεταγραφικός παράγοντας p65, κωδικοποιείται από το γονίδιο RELA και εμπλέκεται στον σχηματισμό ετεροδιμερών NF-κΒ. Η φωσφορυλίωση και η ακετυλίωση του RELA είναι κρίσιμες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που απαιτούνται για την ενεργοποίηση του NF-κΒ. Το RELA έχει επίσης αποδειχθεί ότι ρυθμίζει τις ανοσολογικές αποκρίσεις και η ενεργοποίηση του RELA σχετίζεται θετικά με πολλαπλούς τύπους καρκίνου.

Μελετήσαμε τα επίπεδα mRNA έκφρασης των CHUK (IKKα), IKKβ και RELA (p65) σε όλα τα τροποποιημένες κυτταρικές σειρές καρκίνου παχέος εντέρου που είχαμε στη διάθεση μας. Συγκεκριμένα, συγκρίναμε την έκφραση μεταξύ των κυτταρικών σειρών

καρκίνου παχέος εντέρου όπου πραγματοποιήσαμε μείωση της έκφρασης της CD81 (εικόνα 3.23): a) DLD1-Psiren vs DLD1-Pirsen_SH1_CD81, b) CACO2-Psiren vs CACO2-Psiren_SH1_CD81, c) HCT116-Psiren vs HCT116-Psiren_SH1_CD81, καθώς και μεταξύ των κυτταρικών σειρών καρκίνου πάχους εντέρου όπου πραγματοποιήσαμε υπερέκφραση της CD81: d) CACO2-PLXIN vs CACO2-PLXIN_CD81_OE, e) HCT116-PLXIN vs HCT116-PLXIN_CD81_OE.

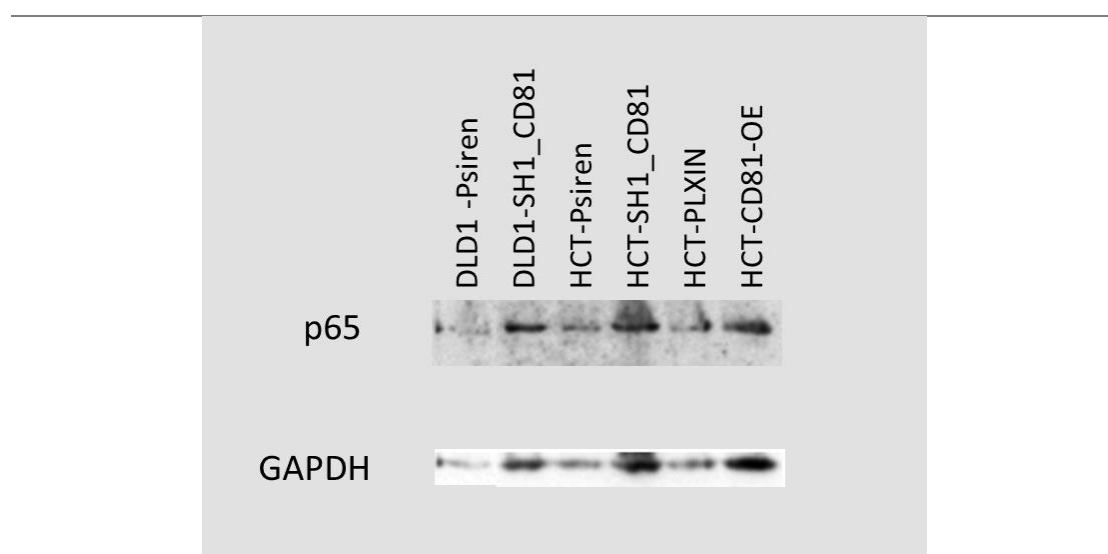
Στο σύνολο των πειραμάτων (πίνακας 3.17) που πραγματοποιήσαμε δεν παρατηρούμε ουσιαστική και αξιολογήσιμη διαφορά στα επίπεδα mRNA έκφρασης των γονιδίων του NF-κΒ μεταξύ των κυττάρων με τροποποίηση της έκφρασης της CD81 και των κυττάρων της ομάδας ελέγχου. Παρατηρούμε ωστόσο κάποιες μικρές διαφορές όπως:

- Μείωση της έκφρασης του CHUK στα DLD1 κύτταρα με υπο-έκφραση της CD81 (CHUK-RFC = 0.603, $p = 0.04$).
- Μικρή αύξηση της έκφρασης των RELA (p65) & IKKβ στα HCT116 κύτταρα που υπερεκφράζουν τη CD81 (RELA-RFC = 1.344, $p < 0.001$, IKKβ-RFC = 1.457, $p = 0.06$)
- Μικρή αύξηση της έκφρασης των CHUK & IKKβ στα CACO2 κύτταρα με αύξηση της έκφρασης της CD81 (CHUK-RFC = 1.343, $p = 0.115$; IKKβ-RFC = 1.20, $p = 0.007$).

Ωστόσο, οι διάφορες που προκύπτουν στα σχετικά επίπεδα έκφρασης (relative fold change) είναι πολύ μικρές και μη αξιολογήσιμες.

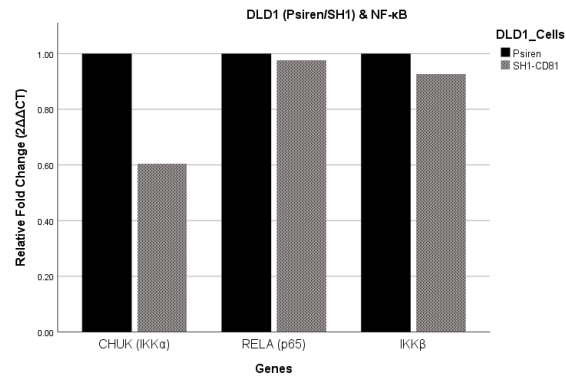
		CHUK (IKKα)		RELA (p65)		IKKβ	
		RFC	<i>p</i>	RFC	<i>p</i>	RFC	<i>p</i>
DLD1	Psiren/SH1-CD81	0.604	0.04	0.976	0.91	0.926	0.63
HCT116	Psiren/SH1-CD81	1.094	0.36	1.005	0.85	0.967	0.69
	PLXIN/CD81-OE	0.966	0.71	1.344	<0.001	1.457	0.06
CACO2	Psiren/SH1-CD81	0.872	0.26	0.986	0.51	1.07	0.15
	PLXIN/CD81-OE	1.343	0.115	0.968	0.51	1.20	0.007

Πίνακας 3.17: Σχετική mRNA έκφραση (relative fold change) των γονιδίων του κυτταρικού κύκλου E2F1, CyclinD1 & CDC6 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου σε καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου με τροποποιημένη έκφραση της τετρασπανίνης CD81 συγκριτικά με τα αντίστοιχα κύτταρα της ομάδας ελέγχου. RFC: Relative Fold Change

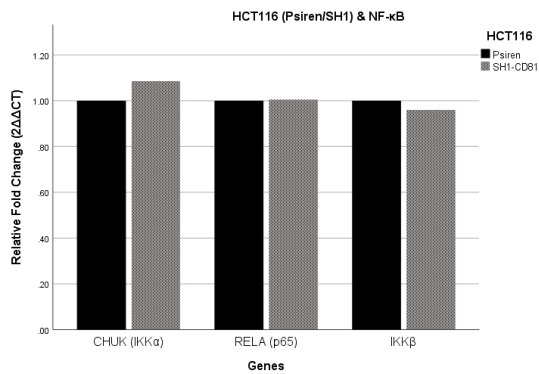


Εικόνα 3.22: Έκφραση του p65 σε επίπεδο πρωτεϊνών (Western Blot) στις τροποποιημένες κυτταρικές σειρές DLD1 & HCT116 όπου έγινε αποσιώπηση της CD81 με τη χρήση shRNA. Ως μάρτυρας ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η έκφραση του GAPDH.

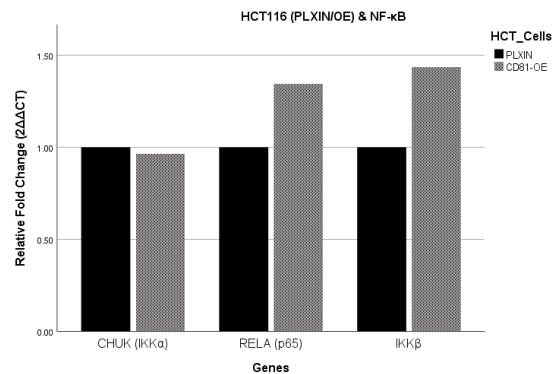
A.



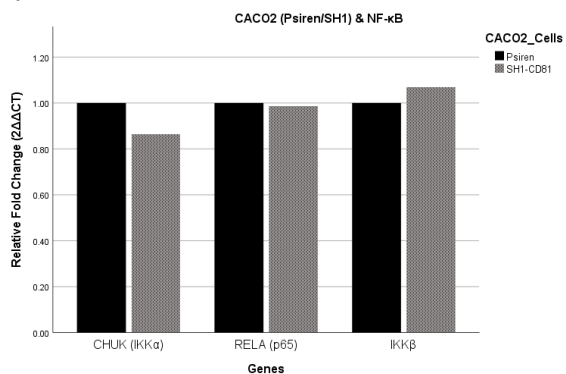
B.



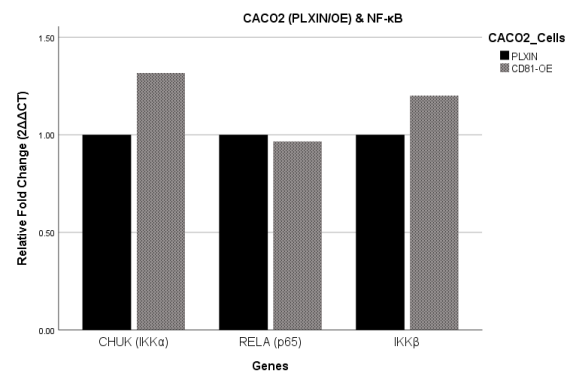
Γ.



Δ.



Ε.



Εικόνα 3.23: Σχετική mRNA έκφραση (relative fold change) των γονιδίων CHUK (IKKα), RELA (p65) & IKKβ που σχετίζονται με την ενεργοποίηση του NF-κB σε καρκινικές σειρές παχέος εντέρου με τροποποίηση της έκφρασης της CD81. A) DLD1 (Psiren/SH1-CD81). B) HCT116 (Psiren/SH1-CD81) Γ) HCT116 (PLXIN/CD81-OE). Δ) CACO2 (Psiren/SH1-CD81). Ε) CACO2 (PLXIN/CD81-OE). Χωρίς αξιόλογη διαφορά της έκφρασης των γονιδίων που μελετήθηκαν για το σύνολο των καρκινικών σειρών.

5. Συζήτηση

Οι τετρασπανίνες είναι διαμεμβρανικά μόρια της κυτταρικής επιφάνειας που ρυθμίζουν πολλαπλές βιολογικές διεργασίες μέσω της ικανότητας τους να συγκεντρώνουν και να οργανώνουν συγκεκριμένους υποδοχείς και πρωτεΐνες σηματοδότησης σε μικρο-περιοχές στην επιφάνεια του κυττάρου (36,61). Μεταξύ των βιολογικών διεργασιών που εμπλέκονται οι τετρασπανίνες υπάρχουν στοιχεία ότι ενέχονται στην καρκινογένεση καθώς και στην ανοσολογική απάντηση στο μικροπεριβάλλον του όγκου (11,28,70). Ωστόσο, οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί που διέπουν τη λειτουργία των τετρασπανινών και η συμβολή τους στην καρκινογένεση αλλά και στην ανοσολογική απάντηση δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Επιπλέον, η κάθε τετρασπανίνη μπορεί να συμβάλει σε πολλαπλές βιολογικές διεργασίες, ενώ και η επίδραση τους μπορεί να ποικίλει και να διαφοροποιείται μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών (110,137). Αυτό το χαρακτηριστικό γνώρισμα των τετρασπανινών καθιστά την μελέτη τους ιδιαίτερα επίπονη, αλλά και ιδιαζόντως σημαντική, καθώς η ίδια τετρασπανίνη μπορεί να έχει ξεχωριστές λειτουργίες σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου αλλά και σε διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς που απαντώνται στο μικροπεριβάλλον του όγκου, όπως τα καρκινικά κύτταρα και τα διηθούμενα λεμφοκύτταρα.

Στην συγκεκριμένη μελέτη σκοπός μας ήταν να διερευνήσουμε την επίδραση ορισμένων μορίων τετρασπανινών στην εξέλιξη του καρκίνου του παχέος εντέρου. Για να απαντήσουμε στο συγκεκριμένο ερώτημα θέσαμε δύο ξεχωριστά ερωτήματα. Το πρώτο μας ερώτημα ήταν πως κατανέμεται η έκφραση ορισμένων τετρασπανινών σε διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς που απαρτίζουν το μικροπεριβάλλον του όγκου σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου. Επομένως, ο πρώτος μας στόχος ήταν να εξετάσουμε την ανοσοϊστοχημική έκφραση επιλεγμένων τετρασπανινών (CD81 και CD82) σε ιστούς καρκίνου του παχέος εντέρου, αναλύοντας την έκφρασή τους τόσο στα καρκινικά κύτταρα όσο και στα λεμφοκύτταρα που διηθούν τον όγκο. Παράλληλα εκτιμήσαμε και την έκφραση άλλων ανοσοϊστοχημικών δεικτών όπως το PD1 και το PDL1, καθώς και τη διήθηση του όγκου από CD3(+) και CD8(+) λεμφοκύτταρα. Το σύνολο των παραπάνω πειραμάτων θα μας επιτρέψει να αξιολογήσουμε το ρόλο καθενός από αυτά τα μόρια τόσο στα καρκινικά κύτταρα όσο

και στα κύτταρα του ανοσοποιητικού, ενεργώντας είτε ως καταστολείς, είτε ως προαγωγείς της καρκινογένεσης, καθώς και να προσδιορίσουμε την προγνωστική ή/και προβλεπτική τους αξία σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου. Δεύτερος μας στόχος ήταν να μελετήσουμε τον ρόλο της τετρασπανίνης CD81 στην εξέλιξη (ανάπτυξη, κινητικότητα καρκινικών κυττάρων και δυνατότητα σχηματισμού όγκων) του καρκίνου του παχέος εντέρου *in vitro*, να διερευνήσουμε πιθανούς μηχανισμούς δράσης και να εξετάσουμε εάν η κανονική σηματοδοτική πορεία του NF-κΒ εμπλέκεται στην ρύθμιση της έκφρασης της CD81 στα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου .

5.1 Ανοσοϊστοχημική ανάλυση ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου.

Όπως προαναφέραμε, με τη χρήση της ανοσοϊστοχημείας εκτιμήσαμε, σε μονιμοποιημένο σε καρκινικό ιστό ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου, την έκφραση των δεικτών CD81, CD82, PD1, PDL1 τόσο στα καρκινικά κύτταρα, όσο και στα διηθούντα λεμφοκύτταρα. Παράλληλα, με τη βοήθεια ανοσοϊστοχημείας υπολογίσαμε το ποσοστό διήθησης των CD3(+) και CD8(+) T-λεμφοκυττάρων στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Οι ιστοί των ασθενών με καρκίνο παχέος εντέρου που εκτιμήθηκαν ήταν σε μορφή TMAs, από αυτούς 108 ασθενείς ήταν σταδίου I-II-III και 85 ασθενείς σταδίου IV. Στη συνέχεια συσχέτισαμε τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημικής ανάλυσης με τα κλινικά, εργαστηριακά και μοριακά χαρακτηριστικά των ασθενών που είχαμε καταγράψει. Επιπλέον εκτιμήσαμε την προγνωστική αξία των χαρακτηριστικών αυτών για την ολική επιβίωσή και την επιβίωση ελεύθερης νόσου.

i) Η τετρασπανίνη CD81 στον καρκίνο του παχέος εντέρου

Από την ανοσοϊστοχημική ανάλυση που πραγματοποιήσαμε δεν παρατηρήσαμε η έκφραση του CD81 στα καρκινικά να σχετίζεται με το στάδιο ή την έκταση της νόσου. Ωστόσο, ασθενείς που ήταν σε καλύτερη γενική κατάσταση (PS 0 vs PS 1 ή 2), καθώς και ασθενείς με μικροδορυφορική αστάθεια (MMR-deficient)

εξέφραζαν λιγότερο CD81 στα καρκινικά τους κύτταρα. Αντιθέτως η έκφραση της CD81 στα διηθούντα λεμφοκύτταρα φάνηκε να σχετίζεται με το στάδιο της νόσου, με τους μη μεταστατικούς ασθενείς να παρουσιάζουν μεγαλύτερο ποσοστό CD81(+) λεμφοκυττάρων συγκριτικά με τους μεταστατικούς ασθενείς. Ωστόσο, τα αποτελέσματα αυτά θα πρέπει να ερμηνευτούν με προσοχή, καθώς μπορεί να οφείλονται πρωτίστως στην παρουσία των διηθούντων λεμφοκυττάρων και όχι στη δράση της CD81 στα λεμφοκύτταρα. Εξάλλου, από τη μελέτη αυτή φάνηκε ότι οι μεταστατικοί ασθενείς παρουσιάζουν μικρότερο ποσοστό διηθούντων CD3(+) και CD8(+) λεμφοκυττάρων στο στρώμα του όγκου. Το σημαντικότερο ίσως όμως εύρημα της παρούσας ανοσοϊστοχημικής ανάλυσης όσον αφορά την έκφραση του CD81 στα καρκινικά κύτταρα, είναι η παρουσία αρνητικής συσχέτισης με τη διήθηση CD3(+) και CD8(+) T-λεμφοκυττάρων στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Συγκριμένα, φάνηκε ότι ασθενείς που είχαν αυξημένη διήθηση T-λεμφοκυττάρων εμφάνιζαν χαμηλή έκφραση της CD81 στα καρκινικά κύτταρα, ενώ στους ασθενείς όπου η έκφραση της CD81 στα καρκινικά κύτταρα ήταν υψηλή παρουσίαζαν χαμηλό ποσοστό διηθούντων CD3(+) και CD8(+) T-λεμφοκυττάρων. Όσον αφορά τον προγνωστικό ρόλο της CD81, υπάρχει η ένδειξη από τη cox-regression ανάλυση ότι η διήθηση από CD81(+) T-λεμφοκύτταρα μειώνει τον κίνδυνο θανάτου (OS) ή υποτροπής (PFS). Ωστόσο, και πάλι τα συγκεκριμένα αποτελέσματα θα πρέπει να ερμηνευτούν με προσοχή, καθώς η διαφορά είναι πολύ μικρή και επίσης η CD81 πιθανώς να αποτελεί συγχυτικό για το ποσοστό διήθησης των T-λεμφοκυττάρων.

Το CD81 αποτελεί μέλος της οικογένειας τετρασπανινών και αναγνωρίστηκε αρχικά ως ο στόχος του αντι-πολλαπλασιαστικού αντισώματος (TAPA-1) το οποίο ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των B-λεμφοκυττάρων (110,112,117). Η συμβολή της CD81 στην φυσιολογική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος έχει τεκμηριωθεί σε μεγάλο βαθμό (60,111,117). Στα B-λεμφοκύτταρα, υπό φυσιολογικές συνθήκες, η CD81 προάγει την επιφανειακή έκφραση του CD19 και συμβάλλει στην ωρίμανση (117,138). Επιπλέον, μέσα στα TEMs η CD81 αλληλοεπιδρά με τον κυτταροσκελετό του κυττάρου, διευκολύνοντας την σύνδεση με την ακτίνη, με αποτέλεσμα να ενισχύει τη σηματοδότηση μέσω των υποδοχέων των B-λεμφοκυττάρων (139). Ως εκ τούτου, γνωρίζουμε ότι η CD81 συνεισφέρει στην ενεργοποίηση των β-λεμφοκυττάρων (68), ενώ η απώλεια της CD81 έχει φανεί ότι

οδηγεί σε εξασθενημένες χυμικές ανοσολογικές αποκρίσεις σε πειραματικά μοντέλα ποντικών με απώλεια έκφρασης της CD81, καθώς και σε ασθενείς με μετάλλαξη στη CD81 (111,125,140). Το CD81 παίζει επίσης ρόλο στη σηματοδότηση των υποδοχέων των Τ-λεμφοκυττάρων και στην ανάπτυξη των Τ-λεμφοκυττάρων στον θύμο αδένα (68). Έχει τεκμηριωθεί ότι στα Τ-λεμφοκύτταρα η CD81 λειτουργεί συνδιεγερτικά με το μόριο CD3 (139). Επιπλέον, έχει προταθεί ότι η CD81 παίζει βασικό ρόλο στην αντιγονοπαρουσίαση καθώς συμμετέχει στο σύμπλοκο του CD3 με τον υποδοχέα των Τ-λεμφοκυττάρων (TCR) (141,142). Ο ρόλος της CD81 στην ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων υποστηρίζεται επίσης από αναλύσεις γονιδιακής έκφρασης με τη χρήση μικροσυστοιχιών (microarrays) που έδειξαν ότι η έκφραση της CD81 αυξάνεται κατά την ενεργοποίηση κυττάρων Jurkat και ανθρώπινων Τ-λεμφοκυττάρων από περιφερικό αίμα σε σχέση με τα κύτταρα αυτά σε ηρεμία (142,143).

Στον καρκίνο, υποστηρίζεται ότι η CD81 προάγει την ανοσοκαταστολή, καθώς σε πειραματικά μοντέλα ποντικών που φέρουν όγκους έχει φανεί ότι τα ποντίκια με απώλεια έκφρασης της CD81 έχουν μειωμένη ικανότητα να καταστείλουν την αντικαρκινική ανοσοαπάντηση (111). Μάλιστα η ανοσοκατασταλτική δράση της τετρασπανίνης CD81 πιθανώς να διαμεσολαβείτε μέσω της τροποποίησης των λειτουργιών των ρυθμιστικών Τ-λεμφοκυττάρων και των MDSC (myeloid derived suppressor cells) στο μικροπεριβάλλον του όγκου με αποτέλεσμα την προαγωγή της ανάπτυξης του όγκου και την εμφάνιση μεταστάσεων (126). Στην παρούσα μελέτη παρατηρήσαμε ότι ασθενείς με αυξημένη έκφραση της CD81 στα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν χαμηλά ποσοστά διήθησης από Τ-λεμφοκύτταρα στο μικροπεριβάλλον του όγκου, γεγονός που ενισχύει περεταίρω υπόθεση της ανοσοκατασταλτικής δράσης της τετρασπανίνης CD81.

ii) Η τετρασπανίνη CD82 στον καρκίνο του παχέος εντέρου.

Αντίθετα με την παρουσία συσχέτισης μεταξύ των TILs και της τετρασπανίνης CD81, από την ανοσοϊστοχημική ανάλυση της έκφρασης της τετρασπανίνης CD82 σε ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου δεν παρατηρήσαμε κάποια συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της CD82 στα καρκινικά κύτταρα και το ποσοστό των διηθούντων CD3(+) ή CD8(+) Τ-λεμφοκυττάρων. Ως εκ τούτου, η ανοσοκατασταλτική λειτουργία

που παρατηρήσαμε για τη CD81 αποτελεί μοναδικό χαρακτηριστικό της συγκεκριμένης τετρασπανίνης. Διαπιστώσαμε, ωστόσο, ότι η έκφραση της τετρασπανίνης CD82 σχετίζεται αρνητικά με δείκτες που έχουν να κάνουν με έκταση και την επιθετικότητα του καρκίνου. Συγκεκριμένα η έκφραση της τετρασπανίνης CD82 στους καρκινικούς ιστούς φάνηκε να χάνεται στα υψηλότερα στάδια νόσου κατά TNM, με τους μεταστατικούς ασθενείς να παρουσιάζουν πολύ χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης της CD82. Ενδεικτικό της αρνητικής συσχέτισης της CD82 με την έκταση και την επιθετικότητα της νόσου είναι το γεγονός ότι οι ασθενείς που δεν είχαν να κατορθώσει να χειρουργηθούν με ελεύθερα όρια εκτομής παρουσίαζαν ελαττωμένη έκφραση της CD82 στους καρκινικούς ιστούς. Αυτό πιθανώς να σημαίνει ότι η έκφραση της τετρασπανίνης CD82 μπορεί να χρησιμεύει ως προγνωστικός παράγοντας για την επιθετικότητα της νόσου και προβλεπτικός όσων αφορά τη δυνατότητα πλήρους χειρουργικής εκτομής (R0). Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζονται και από το γεγονός ότι όσο αυξάνονται οι τιμές των καρκινικών δεικτών CEA και CA 19-9, οι οποίοι αποτελούν δείκτες της επιθετικότητας και της έκτασης της νόσου, τόσο μειώνεται η έκφραση της CD82 στους καρκινικούς ιστούς. Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα όσων αφορά την έκφραση της CD82 στα διηθούντα T-λεμφοκύτταρα, όπου παρατηρήσαμε μειωμένα ποσοστά CD82(+) λεμφοκυττάρων σε μεταστατικούς ασθενείς, σε ασθενείς με κακή γενική κατάσταση (PS 1 ή 2) και σε ασθενείς με αυξημένες τιμές καρκινικών δεικτών CEA και Ca 19-9. Όσων αφορά την πρόγνωση, βάση της cox-regression ανάλυσης φάνηκε ότι η αυξημένη έκφραση της CD82 τόσο στα καρκινικά κύτταρα όσο και στα διηθούντα λεμφοκύτταρα σχετίζεται με καλύτερη ολική επιβίωση και επιβίωση ελεύθερης νόσου. Στο σύνολο τους τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποδηλώνουν ότι η τετρασπανίνη CD82 έχει προστατευτικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου του παχέος εντέρου και είναι σε συμφωνία με τα ευρήματα άλλων μελετών τεκμηριώνουν τον ογκοκατασταλτικό χαρακτήρα της τετρασπανίνης CD82 σε άλλους τύπους καρκίνου (108) .

Ένα εύρημα το οποίο πιθανώς χρήζει περαιτέρω διερεύνησης είναι το γεγονός ότι ασθενείς στους οποίους ο πρωτοπαθής όγκος εντοπίζεται δεξιά εκφράζουν ελαττωμένη CD82 στα καρκινικά κύτταρα. Η σημασία της διάκρισης μεταξύ δεξιά και αριστερά έχει αναγνωριστεί εδώ και αρκετά χρόνια στον καρκίνο του παχέος

εντέρου. Η δεξιά ή αριστερή εντόπιση του πρωτοπαθούς όγκου σχετίζεται με την παρουσία διαφορετικών μοριακών αλλαγών (144). Επίσης έχουν διαπιστωθεί διαφορές στην πρόγνωση, με τους ασθενείς που παρουσιάζουν όγκο δεξιά να εμφανίζουν χειρότερη επιβίωση (145), καθώς επίσης έχουν τεκμηριωθεί και διάφορες στην θεραπεία, με τους όγκους που εντοπίζονται αριστερά να ανταποκρίνονται καλύτερα στους anti-EGFR παράγοντες (146,147).

iii) PD1, PDL1 και λοιποί δείκτες.

Τα συμπεράσματα που μπορούμε να βγάλουμε σχετικά με την έκφραση του PDL1 στον καρκίνο του παχέος εντέρου είναι περιορισμένα, καθώς στα καρκινικά κύτταρα η έκφραση του PDL1 βρέθηκε καθολικά αρνητική, ενώ μόνο σε 6 ασθενείς βρέθηκε θετική έκφραση του PDL1 στα λεμφοκύτταρα που διηθούσαν το μικροπεριβάλλον του όγκου. Όσον αφορά το PD1, η έκφραση του στα καρκινικά κύτταρα ήταν υψηλότερη στους ασθενείς σταδίου I έως III κατά TNM έναντι των μεταστατικών ασθενών. Παρομοίως, παρατηρήσαμε υψηλότερη έκφραση του PD1 στα καρκινικά κύτταρα, αλλά και στα λεμφοκύτταρα σε ασθενείς με χαμηλούς καρκινικούς δείκτες CEA και CA 19-9. Θετική συσχέτιση διαπιστώθηκε μεταξύ των δεικτών CD82, CD81 και του δείκτη PD1 στα καρκινικά κύτταρα. Αναλυτικότερα, οι ασθενείς που παρουσίαζαν υψηλές τιμές PD1 στα καρκινικά κύτταρα διαπιστώθηκε ότι παρουσιάζουν επίσης υψηλές τιμές CD82 και CD81 στα καρκινικά κύτταρα. Παρομοίως, θετική συσχέτιση παρατηρήσαμε επίσης μεταξύ των PD1(+) λεμφοκυττάρων και των CD81(+), CD82(+), CD3(+), CD8(+) λεμφοκυττάρων. Η έκφραση του δείκτη PD1 τόσο στα καρκινικά κύτταρα, όσο και στα λεμφοκύτταρα φάνηκε ότι έχει προγνωστική σημασία όσον αφορά την πιθανότητα θανάτου και την πιθανότητα υποτροπής των ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου. Αναλυτικότερα, οι ασθενείς που παρουσίαζαν υψηλή έκφραση του PD1, είτε στα καρκινικά κύτταρα, είτε στα διηθούμενα λεμφοκύτταρα παρουσίαζαν μικρότερο κίνδυνο θανάτου (OS) ή/και υποτροπής (PFS). Η παρουσία του PD1 στα λεμφοκύτταρα είναι τεκμηριωμένη και έχει συσχετιστεί με χειρότερη επιβίωση σε ασθενείς με σαρκώματα μαλακών μορίων (148), αλλά καλύτερη επιβίωση σε

ασθενείς με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού (149). Το PD1 αποτελεί έναν γνωστό υποδοχέα των λεμφοκυττάρων και λειτουργικά η ενεργοποίηση του εξασθενεί τις ανοσολογικές (148,149). Στην παρούσα μελέτη η έκφραση του PD1 στα διηθούντα λεμφοκύτταρα ήταν ένας ευνοϊκός προγνωστικός παράγοντας. Οι αναφορές σχετικά με την έκφραση του PD1 στα καρκινικά κύτταρα είναι σχετικά περιορισμένες, ωστόσο έχει περιγραφεί και σε άλλες κακοήθειες συμπεριλαμβανομένων στον μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (150), στο σάρκωμα Ewing (151) και στον ορώδη καρκίνο των ωοθηκών (152). Μάλιστα όπως και στην δική μας μελέτη η έλλειψη του PD1 στα καρκινικά κύτταρα συσχετίστηκε με φτωχή ολική επιβίωση και επιβίωση ελεύθερης νόσου σε ασθενείς με σάρκωμα Ewing (151) και ορώδη καρκίνο των ωοθηκών (152). Συμπερασματικά, στην παρούσα μελέτη, το σύνολο των αποτελεσμάτων από την ανοσοϊστοχημική έκφραση του PD1 σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου δείχνουν ότι ο δείκτης αυτός σχετίζεται με ευνοϊκά κλινικο-παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά της νόσου και καλύτερη έκβαση.

Από τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά των ασθενών που εξετάσαμε, επιβεβαιώσαμε την προγνωστική αξία των ήδη γνωστών κλινικο-παθολογοανατομικών παραμέτρων, όπως το στάδιο της νόσου, την πλήρης χειρουργική εκτομή και τις τιμές των καρκινικών δεικτών CEA και CA 19-9. Επιπλέον, η διήθηση από CD8(+) λεμφοκύτταρα αναδείχθηκε ως θετικός προγνωστικός παράγοντας, προσδίδοντας σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου μειωμένο κίνδυνο υποτροπής και θανάτου. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τα ευρήματα πολλαπλών μελετών σε διάφορους τύπους καρκίνου (153,154) και λειτουργικά η παρουσία τους στο μικροπεριβάλλον του όγκου σχετίζεται με τη δυνατότητα ανοσολογικής απάντησης έναντι του όγκου (155).

5.2 Ο ρόλος του CD81 στην εξέλιξη του καρκίνου του παχέος εντέρου *in vitro*.

Για να καταδείξουμε το ρόλο της τετρασπανίνης CD81 στην εξέλιξη του καρκίνου του παχέος εντέρου *in vitro*, προχωρήσαμε σε τροποποίηση της έκφρασης της τετρασπανίνης αυτής, είτε μειώνοντας, είτε αυξάνοντας την έκφραση της σε καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου. Με τη χρήση ρετρο-ικού φορέα ο οποίος φέρει shRNA έναντι της CD81 πετύχαμε τη μείωση της έκφρασης της τετρασπανίνης CD81 σε καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου DLD1, CACO2 και HCT116, ενώ αντίστοιχος ρετρο-ικός φορέας που έφερε αντίγραφο του γονιδίου της CD81 χρησιμοποιήθηκε για να πετύχουμε την υπερέκφραση της τετρασπανίνης αυτής στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου CACO2 και HCT116. Επιβεβαιώσαμε την τροποποίηση της έκφρασης της CD81 σε επίπεδο mRNA και σε επίπεδο πρωτεϊνικής έκφρασης με τη χρήση RT-qPCR και ανοσοαποτύπωμα κατά Western αντίστοιχα. Δεν υποβάλλαμε τα κύτταρα DLD1 σε αύξηση της έκφρασης της τετρασπανίνης CD81 λόγω της ήδη εγγενούς υψηλής έκφρασης της τετρασπανίνης αυτής στα κύτταρα αυτά. Αντιθέτως η έκφραση της CD81 στα κύτταρα CACO2 & HCT116 ήταν κυμαινόμενη σε χαμηλά επίπεδα, ώστε τόσο η υπερέκφραση όσο και η μειорύθμιση της να μπορούσε, εν δυνάμει, να μας δώσει βιολογικά σημαντικά αποτελέσματα.

Αφού εξασφαλίσουμε την τροποποίηση της έκφρασης της τετρασπανίνης CD81 στις ανθρώπινες καρκινικές σειρές παχέος εντέρου, μελετήσαμε την επίδραση της CD81 στον πολλαπλασιασμό, την κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων και την δυνατότητα δημιουργίας όγκων *in vitro* εξετάζοντας τις κυτταρικές αυτές σειρές έναντι των αντίστοιχων κυττάρων ομάδας ελέγχου στις οποίες δεν είχε τροποποιηθεί η έκφραση της CD81. Επιπλέον, μελετήσαμε την έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στον κυτταρικό κύκλο με σκοπό να εντοπίσουμε πιθανούς μηχανισμούς δράσης με τους οποίους συμβάλει η CD81 στην εξέλιξη του καρκίνου, καθώς και γονιδίων που ανήκουν στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων του NF-κΒ ώστε να εξετάσουμε εάν η σηματοδοτική πορεία του NF-κΒ εμπλέκεται στην ρύθμιση της έκφρασης της CD81. Αυξημένη έκφραση της τετρασπανίνης CD81 έχει παρατηρηθεί σε ποικίλους τύπους καρκινικών κυττάρων, και η δράση της έχει συσχετιστεί με τον πολλαπλασιασμό, τη διείσδυση και τη μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων αυτών (82,110,114–117,156,157), ενώ πρόσφατα διαπιστώθηκε ότι το CD81

συμμετέχει επίσης στην αντίσταση στη θεραπεία με βάση την πλατίνα (113). Το σύνολο των παραπάνω πειραμάτων θα μας επιτρέψει να εκτιμήσουμε τον ρόλο της CD81 στον καρκίνο του παχέος εντέρου, της οποίας η δράση μέχρι στιγμής δεν είναι σαφής καθώς έχει παρατηρηθεί να συμβάλλει τόσο καταστέλλοντας (πχ ουροθηλιακός καρκίνος (120,121)) όσο και προάγοντας (π.χ. καρκίνος του μαστού (115)) τον καρκίνο.

i) Η τετρασπανίνη CD81 προάγει στον ρυθμό πολλαπλασιασμού ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου.

Το σύνολο των φαινοτυπικών πειραμάτων που πραγματοποιήσαμε για να εκτιμήσουμε τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου καταδεικνύει τη συμβολή της CD81 στην επιτάχυνση του ρυθμού ανάπτυξης των κυττάρων αυτών. Μάλιστα η επίδραση της τετρασπανίνης αυτής στον ρυθμό πολλαπλασιασμού φάνηκε στο σύνολο των εξεταζόμενων καρκινικών κυτταρικών σειρών, τόσο στα κύτταρα με μειωμένη έκφραση (DLD1-SH1 CD81, CACO2-SH1 CD81, HCT116-SH1 CD81) όσο και σε αυτά με υπερέκφραση (CACO2-CD81 OE, HCT116-CD8 OE) της CD81 συγκριτικά με τα αντίστοιχα κύτταρα των ομάδων ελέγχου. Αναλυτικότερα, τα κύτταρα καρκίνου παχέος εντέρου DLD1, HCT116 & CACO2 στα οποία ελαττώσαμε την έκφραση της CD81 (PSiren-SH1 CD81) παρουσίασαν μειωμένους ρυθμούς ανάπτυξης συγκριτικά με τα αντίστοιχα κύτταρα των ομάδων ελέγχου. Αντιστρόφως, ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων καρκίνου παχέος εντέρου HCT116 & CACO2 με αυξημένη έκφραση της CD81 (PLXIN-CD81 OE) ήταν αισθητά αυξημένος συγκριτικά με τα αντίστοιχα κύτταρα των ομάδων ελέγχου. Σε όλες τις προαναφερθείσες συγκρίσεις οι διαφορές που εντοπίσαμε στους ρυθμούς ανάπτυξης ήταν στατιστικά σημαντικές ($p < 0.05$). Τα αποτελέσματα αυτά συμβαδίζουν με τα ευρήματα προηγούμενων μελετών που εξέτασαν της δράση της CD81 σε διαφορετικούς τύπους καρκινικών κυττάρων, όπου η καταστολή της έκφρασης της CD81 είχε ως αποτέλεσμα μειωμένο ρυθμό πολλαπλασιασμού κυττάρων οστεοσαρκώματος (116) και καρκινικών κυττάρων προστάτη (114), ενώ ανάλογα με πριν, η αύξηση της έκφρασης της CD81 σε καρκινικά κύτταρα μαστού είχε ως αποτέλεσμα αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού (115).

ii) Η τετρασπανίνη CD81 αυξάνει την κινητικότητα των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου.

Μελετήσαμε την κινητικότητα όλων των καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου στα οποία είχαμε τροποποιήσει την έκφραση της CD81 συγκριτικά με τα κύτταρα των αντίστοιχων ομάδων ελέγχου. Όλα τα αποτελέσματα από το σύνολο των κυτταρικών σειρών που μελετήσαμε συνηγορούν ότι η τετρασπανίνη CD81 προάγει την κινητικότητα των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου. Στα καρκινικά κύτταρα DLD1, HCT116 & CACO2 όπου καταστείλαμε (PSiren-SH1 CD81) την έκφραση της CD81 παρατηρήσαμε στατιστικά σημαντική ($p < 0.05$) μείωση της κινητικότητας των κυττάρων αυτών έναντι των κυττάρων ελέγχου. Αντιστρόφως, η υπερέκφραση της CD81 (PLXIN-CD81 OE) στα καρκινικά κύτταρα HCT116 & CACO2 είχε ως αποτέλεσμα την στατιστικά σημαντική ($p < 0.05$) αύξηση της κινητικότητας των κυττάρων αυτών συγκριτικά με τα κύτταρα ελέγχου. Τα ευρήματά μας σχετικά με την επίδραση της CD81 στην κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου υποστηρίζονται και από δεδομένα άλλων μελετών που εξέτασαν την κινητικότητα σε κύτταρα οστεοσαρκώματος (116), μελανώματος (117), καρκίνο του προστάτη (114) και καρκίνο του μαστού (115) και έδειξαν την παρουσία θετικής συσχέτισης με την έκφραση της CD81. Ωστόσο, υπάρχουν και δεδομένα που υποδεικνύουν την παρουσία αντίστροφης σχέσης μεταξύ της κινητικότητας των καρκινικών κυττάρων και της τετρασπανίνης CD81, όπως στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης (120).

Συνολικά, υπάρχουν αρκετά δεδομένα που υποδεικνύουν ότι η τετρασπανίνη CD81 προάγει τη μεταναστευτική ικανότητα, τη διείσδυση και τη μετάσταση ορισμένων καρκινικών κυττάρων (114–117). Σε αρκετές μελέτες ο εμπλεκόμενος μηχανισμός δράσης φαίνεται να σχετίζεται με την ρύθμιση της έκφρασης των μεταλλοπρωτεϊνών, όπου η αύξηση της έκφρασης τους αποικοδομεί το εξωκυττάριο στρώμα και δημιουργεί μία δίοδο για την μετανάστευση των κυττάρων, προάγοντας με αυτό τον τρόπο την κινητικότητα και διήθηση των καρκινικών κυττάρων (116,117,120). Στο μελάνωμα η τετρασπανίνη CD81 φάνηκε ότι αυξάνει την κινητικότητα των κυττάρων του μελανώματος προκαλώντας υπερέκφραση της μεταλλοπρωτεϊνάσης MT1-MMP (117). Παρομοίως, στα κύτταρα του οστεοσαρκώματος εκτός από την MT1-MMP, οι μεταλλοπρωτεϊνάσεις MMP-2 και MMP-9 φάνηκε επίσης να επηρεάζονται θετικά από την CD81 (116). Σε αντίθεση με

τα προηγούμενα ευρήματα, στον ουροθηλιακό καρκίνο η τετρασπανίνη CD81 φάνηκε να έχει προστατευτική δράση, μειώνοντας την κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων μέσω αρνητικής ρύθμισης της έκφρασης των μεταλλοπρωτεϊνών (120). Στους προτεινόμενους μηχανισμούς δράσης περιλαμβάνεται και η αλληλεπίδραση της CD81 με την πρωτεΐνη Rac (158,159), μία GTPάση η οποία συμμετέχει στη ρύθμιση της κυτταρικής κίνησης μέσω διαμόρφωσης της ακτίνης και σχετίζεται με την προσκόλληση, μετανάστευση και στρατολόγηση των ουδετερόφιλων (160). Παρομοίως, στους πιθανούς μηχανισμούς θα πρέπει να συμπεριληφθεί και η αλληλεπίδραση της τετρασπανίνης CD81 με διάφορες ιντεγκρίνες. Για παράδειγμα έχει αποδειχθεί η CD81 συνεισφέρει στη λειτουργία της ιντεγκρίνης $\alpha 3 \beta 1$ (137), καθώς και στη λειτουργία της ιντεγκρίνης $\alpha 6 \beta 1$ (161). Μάλιστα, έχει παρατηρηθεί ότι αντισώματα έναντι της CD81 είναι ικανά να αναστείλουν την επαγόμενη από την ιντεγκρίνη $\alpha 6 \beta 1$ και εξαρτώμενη από την CD81 μετανάστευση των κυττάρων (161). Στην παρούσα μελέτη διαπιστώσαμε ότι στον καρκίνο του παχέος εντέρου η τετρασπανίνη CD81 προάγει την κινητικότητα και την μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων, σε συμφωνία με τα ευρήματα της πλειοψηφίας παλιότερων μελετών σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου.

iii) Η τετρασπανίνη CD81 προάγει την σχηματισμό όγκων *in vitro* στα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου DLD1.

Για να εξετάσουμε την δυνατότητα των καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου να δημιουργήσουν όγκους *in vitro* αναπτύξαμε τα κύτταρα αυτά σε ημιστερεό υλικό από άγαρ. Η διαδικασία αυτή μας επιτρέπει να εκτιμήσουμε εάν τα καρκινικά κύτταρα έχουν την δυνατότητα να αναπτυχθούν ανεξάρτητα προσκόλλησης (anchorage independent growth). Η δυνατότητα ανάπτυξης ανεξάρτητα προσκόλλησης είναι ένα από τα χαρακτηριστικά της καρκινογένεσης. Επιτρέπει στα καρκινικά κύτταρα να επεκταθούν και να εισβάλουν σε παρακείμενους ιστούς οδηγώντας σε μεταστάσεις. Η δοκιμασία αυτή έχει αρκετά κοινά χαρακτηριστικά με την επιθήλιο-μεσεγχυματογενή μετατροπή (epithelial-mesenchymal transition – EMT) που συμβαίνει *in vivo*. Κατά την EMT τα επιθηλιακά κύτταρα αποκτούν μεσεγχυματογενή χαρακτηριστικά. Βασικό χαρακτηριστικό της διαδικασίας αυτής είναι η μείωση της έκφρασης της E-Cadherin και σχετίζεται με κακή πρόγνωση σε

πολλά καρκινώματα, καθώς η EMT επιτρέπει στους συμπαγείς όγκους να γίνουν ακόμη πιο επιθετικοί, αυξάνοντας τη διεισδυτικότητα και τη μεταστατική τους δραστηριότητα (162,163). Αντίστροφα έχει φανεί ότι η E-cadherin μπορεί να καταστείλει το anchorage independent growth σε κύτταρα σαρκώματος (163). Επομένως, η συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία (anchorage independent growth) χρησιμοποιείται για να εκτιμήσουμε με *in vitro* τεχνικές την ογκογόνο δυναμικότητα που θα έχουν τα καρκινικά κύτταρα *in vivo*. Οι κυτταρικές σειρές HCT116 & CACO2, τόσο οι πειραματικές όσο και οι ομάδες ελέγχου, δεν αναπτύχθηκαν επαρκώς ανεξάρτητα προσκόλλησης σε ημιστερεό υλικό για να μας δώσουν αξιολογήσιμα αποτελέσματα και δεν περιγράφονται την μελέτη.

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήσαμε ότι τα κύτταρα DLD1, αναπτυσσόμενα σε ημιστερεό υλικό από άγαρ παρουσίασαν διαφορά στον αριθμό και μέγεθος των αποικιών που μπορούσαν να δημιουργήσουν ανάλογα της έκφρασης της τετρασπανίνης CD81. Συγκριμένα τα κύτταρα DLD1 με μειωμένη έκφραση της CD81 (PSiren-SH1 CD81) ανέπτυξαν χαμηλότερο αριθμό αποικιών, ανεξάρτητα προσκόλλησης, και με μικρότερο μέγεθος συγκριτικά με τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου. Παράλληλα, δεδομένα στο οστεοσάρκωμα φάνηκε ότι ποντίκια που μεταμοσχεύθηκαν με κύτταρα οστεοσαρκώματος που δεν εξέφραζαν τη CD81 εμφάνισαν σημαντικά μικρότερο σχηματισμό όγκων και μετάσταση στους πνεύμονες από τα ποντίκια στην ομάδα ελέγχου (116). Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η έκφραση της τετρασπανίνης CD81 αυξάνεται κατά την διαδικασία της EMT και αναγνωρίζεται ως ένας νέος συντελεστής, ο οποίος εμπλεκόμενος στη διαδικασία αυτή μπορεί να προάγει τη μετάσταση στον καρκίνο του μαστού (156). Επομένως, σε συμφωνία με τα ευρήματα άλλων μελετών (116), η *in vitro* πειραματική δοκιμασία (anchorage independent growth) που χρησιμοποιήσαμε μας υποδηλώνει την ύπαρξη ογκογονικότητας της τετρασπανίνης CD81, η οποία φαίνεται να συμβάλει στην εξέλιξη του καρκίνου έχοντας κεντρικό ρόλο στην δημιουργία και την ανάπτυξη των όγκων, ενώ δυνητικά η καταστολή της θα μπορούσε να αναστείλει την ανάπτυξη των όγκων *in vivo*.

iv) Η επίδραση της τετρασπανίνης CD81 στον κυτταρικό κύκλο και ο NF-κΒ.

Ρύθμιση γονιδίων του κυτταρικού κύκλου από την τετρασπανίνη CD81: Τα φαινοτυπικά πειράματα των καρκινικών σειρών παχέος εντέρου μας έδειξαν ότι η τετρασπανίνη CD81 προάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αυτών. Προκειμένου να διερευνήσουμε την ύπαρξη μηχανισμών δράσης με τους οποίους η τετρασπανίνη CD81 συμβάλλει στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αναλύσαμε την έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στον κυτταρικό κύκλο με RT-qPCR. Τα γονίδια που μελετήσαμε είναι τα E2F1, CyclinD1 & CDC6. Το E2F1 ανήκει στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων του E2F, οι οποίοι συμμετέχουν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ρυθμίζοντας την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, την αντιγραφή και τη σύνθεση του DNA. Ο E2F1 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος συμμετέχει στην φάση S του κυτταρικού κύκλου και ρυθμίζεται αρνητικά από την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος. Η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος παρεμποδίζει την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής στα ετεροδιμερή που συμμετέχει το E2F1 καθώς και την στρατολόγηση περαιτέρω μεταγραφικών παραγόντων. Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος απομακρύνει τον περιορισμό που υφίσταται το E2F1 και απελευθερώνει τη δράση του (164,165). Στους μεταγραφικούς στόχους του E2F1 ανήκει και ο μεταγραφικός παράγοντας CDC6. Η πρωτεΐνη CDC6 είναι βασικός ρυθμιστής της αντιγραφής του DNA και παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση και διατήρηση των μηχανισμών του σημείου ελέγχου στον κυτταρικό κύκλο που συντονίζουν τη φάση S και τη μίτωση, ενώ η καλύτερα χαρακτηρισμένη δράση του είναι η συγκρότηση του προ-αντιγραφικού συμπλόκου στις θέσεις έναρξης της αντιγραφής κατά τη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου (136,166). Η CyclinD1 είναι μία πρωτεΐνη που εμπλέκεται στον κυτταρικό κύκλο και κωδικοποιείται από το γονίδιο CCND1. Η πρωτεΐνη αυτή σχηματίζει ένα σύμπλεγμα με τις κινάσες CDK4 ή CDK6 και λειτουργεί ως ρυθμιστική τους υπομονάδα, των οποίων η δραστηριότητα απαιτείται για τη μετάβαση του κυτταρικού κύκλου από τη φάση G1/S. Επιπλέον, η κυκλίνη D1 φαίνεται να σχετίζεται με την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος, ενώ υπερέκφραση της έχει παρατηρηθεί σε διάφορες κακοήθειες όπου φαίνεται ότι εμπλέκεται στην ογκογένεση (135).

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήσαμε στατιστικά σημαντική μείωση της έκφρασης σε επίπεδο mRNA των γονιδίων του κυτταρικού κύκλου E2F1 & CDC6 στα καρκινικά κύτταρα DLD1 στα οποία είχαμε αναστείλει την έκφραση της CD81. Η μείωση των επιπέδων έκφρασης του CDC6, αντικατοπτρίζει την εξάρτηση του από το E2F1, του οποίου αποτελεί μεταγραφικό στόχο. Ως εκ τούτου, στην παρούσα μελέτη, παρατηρούμε ότι στα DLD1 κύτταρα όπου έχει ελαττωθεί η έκφραση της CD81, η μείωση των επιπέδων έκφρασης του CDC6 ακολουθεί παράλληλα την μείωση της έκφρασης του E2F1 (RFC: 0.158 και 0,161 αντίστοιχα), στηρίζοντας ακόμη περισσότερη την ύπαρξη αληθούς βιολογικής επίδρασης της CD81 στην έκφραση των γονιδίων του κυτταρικού κύκλου. Το E2F1 έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκεται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Πρόσφατα διαπιστώθηκε ότι το E2F1 συμμετέχει επίσης στη μετάσταση και τη χημειοανθεκτικότητα του καρκίνου του παχέος εντέρου. Υπάρχουν άφθονα πειραματικά δεδομένα σχετικά με τις δράσεις του E2F1, οι οποίες μπορούν να ομαδοποιηθούν είτε ως προ-ογκογόνες είτε ως προ-αποπτωτικές. Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον για τη μελέτη του ρόλου του E2F1 στην εξέλιξη του καρκίνου του παχέος εντέρου είναι αυξημένο, με τις περισσότερες μελέτες να επικεντρώνονται στην διερεύνηση διαφόρων γονιδίων και microRNA (miRNAs) που επηρεάζουν την έκφραση αυτού του μεταγραφικού παράγοντα. (167). Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης φανερώνουν την επίδραση της CD81 στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου επηρεάζοντας την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα E2F1 και κατά συνέπεια του CDC6.

Αλληλεπίδραση της τετρασπανίνης CD81 με τα σηματοδοτικά μονοπάτια του NF-κΒ: Τα δεδομένα που υπάρχουν στη διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με την αλληλεπίδραση μεταξύ τετρασπανινών και πρωτεϊνών που συμπεριλαμβάνονται στα σηματοδοτικά μονοπάτια του NF-κΒ είναι περιορισμένα. Για παράδειγμα, γνωρίζουμε ότι η Tspan1 προσδίδει αντίσταση στην απόπτωση των κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων του πνεύμονα ρυθμίζοντας της σηματοδότηση του NF-κΒ (80). Επίσης, η CD81 διαμέσου του NF-κΒ ρυθμίζει τη μεταγραφή του ιού της ανθρώπινης επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (142). Ωστόσο, υπάρχουν περιορισμένα

δεδομένα σχετικά με τη ρύθμιση της έκφρασης των τετρασπανινών από τη σηματοδότηση του NF-κΒ.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να εξετάσουμε εάν υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ της έκφρασης της τετρασπανίνης CD81 και του σηματοδοτικού μονοπατιού του NF-κΒ σε καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου. Για το λόγο αυτό αναλύσαμε με RT-qPCR την έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στη σηματοδότηση του NF-κΒ, μεταξύ καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου που έφεραν τροποποίηση στην έκφραση της CD81 και των αντίστοιχων κυττάρων της ομάδας ελέγχου. Τα γονίδια τα οποία μελετήσαμε ήταν το CHUK, το IKKβ και το RELA.

Το γονίδιο CHUK κωδικοποιεί την πρωτεϊνική κινάση CHUK, επίσης γνωστή ως IKK1 ή IKK-α. Η κινάση αυτή ανήκει στην οικογένεια των κινασών σερίνης/θρεονίνης και μαζί με την IKK-β και το NEMO αποτελούν μέρος του συμπλέγματος κινάσης IκΒ που παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ (168). Οι μεταγραφικοί παράγοντες NF-κΒ συνήθως διατηρούνται σε ανενεργή κατάσταση από τις ανασταλτικές πρωτεΐνες IκBs. Τα IKK-α και IKK-β φωσφορυλιώνουν τις πρωτεΐνες IκΒ, επισημαίνοντάς τις για αποικοδόμηση μέσω ουβικουΐτινοποίησης και επιτρέποντας στους παράγοντες μεταγραφής NF-κΒ να εισέλθουν στον πυρήνα. Επομένως, αυξημένη έκφραση της IKK-α ή IKK-β θα έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του NF-κΒ. Η RELA, επίσης γνωστή ως p65, εμπλέκεται στον σχηματισμό ετεροδιμερών NF-κΒ, την πυρηνική μετατόπιση και την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα.

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήσαμε πολύ μικρές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων CHUK, IKK-β και RELA, μεταξύ των καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου με τροποποίηση της έκφρασης της CD81 και των κυττάρων της ομάδας ελέγχου. Συγκεκριμένα, διαπιστώσαμε μείωση της mRNA έκφρασης του γονιδίου CHUK (RFC: 0.604, $p = 0.04$) στα κύτταρα DLD1 με καταστολή της έκφρασης της CD81 (PSiren-SH1 CD81). Με εξαίρεση τα DLD1 κύτταρα, δεν παρατηρήσαμε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα έκφρασης των τριών αυτών γονιδίων στις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές με καταστολή της έκφρασης της CD81. Παρατηρήσαμε όμως αύξηση της mRNA έκφρασης του γονιδίου IKK-β (RFC: 1.20, $p = 0.007$) στα CACO2 κύτταρα με υπερέκφραση της CD81 (PLXIN-CD81 OE) έναντι των κυττάρων της ομάδας ελέγχου. Παρομοίως, η έκφραση του γονιδίου RELA ήταν

αυξημένη (RFC: 1.344, $p < 0.001$) στα HCT116 κύτταρα με υπερέκφραση της CD81 (PLXIN-CD81 OE) έναντι των κυττάρων της ομάδας ελέγχου. Συνολικά, τα παραπάνω αποτελέσματα θα μπορούσαν να υποδηλώνουν ότι υπάρχει μία αλληλεξάρτηση μεταξύ της έκφρασης της τετρασπανίνης CD81 και της σηματοδότησης του NF-κΒ και συγκεκριμένα την ύπαρξη μιας θετικής συσχέτισης μεταξύ της έκφρασης της CD81 και της ενεργοποίησης της σηματοδότησης του NF-κΒ. Ωστόσο τα αποτελέσματα αυτά θα πρέπει να ερμηνευτούν με πολύ προσοχή, καθώς οι απόλυτες διαφορές που προκύπτουν στα επίπεδα έκφρασης των τριών αυτών γονιδίων είναι πάρα πολύ μικρές και ακόμη και αν παρουσιάζονται ως στατιστικά σημαντικές η βιολογική τους διαφορά είναι πιθανώς μη αξιολογήσιμη. Επιπλέον, το σύνολο των πειραμάτων αυτών δεν μπορεί να απαντήσει στο ερώτημα εάν η έκφραση της CD81 ρυθμίζεται μέσω της σηματοδότησης του NF-κΒ, μας υποδεικνύει όμως ότι ίσως να υπάρχει κάποια αλληλεξάρτηση μεταξύ τους, η οποία όμως χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

5.3 Συμπεράσματα

Στο σύνολο της, η παρούσα μελέτη διερεύνησε με ανοσοϊστοχημεία τον ρόλο των τετρασπανινών CD81 και CD82, αλλά και των δεικτών PD1 και PDL1, καθώς και το βαθμό διήθησης από CD3 και CD8 T-λεμφοκύτταρα σε καρκινικούς ιστούς ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου, σε συνδυασμό με τα κλινικο-παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών. Παράλληλα, μελετήσαμε, *in vitro*, σε καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου, τον ρόλο της τετρασπανίνης CD81 στην εξέλιξη του καρκίνου.

Καταρχάς, διαπιστώσαμε τον ογκοκατασταλτικό χαρακτήρα της τετρασπανίνης CD82, καθώς η έκφραση της στους καρκινικούς ιστούς συσχετίστηκε με ευνοϊκά κλινικο-παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών και αυξημένη επιβίωση. Παρομοίως, η έκφραση του PD1 αναγνωρίστηκε επίσης ως θετικός προγνωστικός παράγοντας. Από όσο γνωρίζουμε, αυτή είναι η πρώτη μελέτη που τεκμηριώνει με τη χρήση ανοσοϊστοχημείας τον προγνωστικό ρόλο της τετρασπανίνης CD82 και του δείκτη PD1 στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Παράλληλα, στην παρούσα μελέτη περιγράφεται η αρνητική συσχέτιση της τετρασπανίνης CD81 με τα διηθούντα CD3(+) και CD8(+) T-λεμφοκύτταρα, υποδεικνύοντας για πρώτη φορά, εξ όσων γνωρίζουμε, τον ανοσοκατασταλτικό ρόλο της τετρασπανίνης CD81 στον καρκίνο του παχέος εντέρου.

Από την *in vitro* ανάλυση διαπιστώσαμε ότι η τετρασπανίνη CD81 συμβάλλει στην ανάπτυξη και την εξέλιξη του καρκίνου του παχέος εντέρου. Παρατηρήσαμε ότι προάγει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου διαμέσου ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Επιπλέον, διαπιστώσαμε ότι η έλλειψη της τετρασπανίνης CD81 επηρεάζει αρνητικά την κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων αλλά και την ικανότητα δημιουργίας όγκων *in vitro*. Το σύνολο των παραπάνω αποτελεσμάτων καταδεικνύουν τον ογκογόνο ρόλο της τετρασπανίνης CD81 στον καρκίνο του παχέος εντέρου, που όπως διαπιστώσαμε συμβάλλει στην επιθετικότητα του καρκίνου του παχέος εντέρου.

Μελέτη του ρόλου μορίων της κυτταρικής επιφανείας του συμπλέγματος διαφοροποίησης (CD) στην ανάπτυξη του καρκίνου: Ρόλος της κανονικής σηματοδοτικής πορείας του NF-κΒ στην ρύθμιση των μορίων CD.

Η καρκινογένεση είναι μια πολύ-σταδιακή διαδικασία η οποία σε κυτταρικό επίπεδο περιλαμβάνει τη συσσώρευση γενετικών μεταλλάξεων, οι οποίες σε συνδυασμό με επιγενετικές τροποποιήσεις οδηγούν σε καθοριστικές μεταβολές στην γονιδιακή έκφραση και τη κυτταρική φυσιολογία, με αποτέλεσμα την ανεξέλεγκτη διαίρεση του κυττάρου και την απόκτηση μηχανισμών αποφυγής της απόπτωσης. Η ανάπτυξη και η εξέλιξη του καρκίνου ωστόσο αποτελεί μία περισσότερο περίπλοκη διαδικασία στην οποία συμβάλουν κύτταρα και άλλοι παράγοντες που είναι παρόντες στο μικροπεριβάλλον του όγκου, συμπεριλαμβανόμενου και του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή. Στους μοριακούς μηχανισμούς που σχετίζονται με την καρκινογένεση εμπλέκονται και τα μόρια της κυτταρικής επιφάνειας του συμπλέγματος διαφοροποίησης που είναι γνωστά ως τετρασπανίνες. Οι τετρασπανίνες είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που διαπερνούν τη μεμβράνη του κυττάρου με 4 α-έλικες και ρυθμίζουν πολλαπλές βιολογικές διεργασίες μέσω της ικανότητας τους να συγκεντρώνουν και να οργανώνουν συγκεκριμένους υποδοχείς και πρωτεΐνες σηματοδότησης σε μικρο-περιοχές στην επιφάνεια του κυττάρου. Οι πρωτεΐνες αυτές συνδυάζονται μεταξύ τους, καθώς και με μία σειρά άλλων διαμεμβρανικών και κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών για να σχηματίσουν τις μεμβρανικές μικροεπικράτειες (μικροπεριοχές μοριακών συμπλεγμάτων εμπλουτισμένων με τετρασπανίνες -Tetraspanin Enriched Microdomains - TEMs). Αυτά τα πρωτεϊνικά συμπλέγματα αναφέρονται τους στη βιβλιογραφία ως δίκτυα τετρασπανινών (tetraspanin webs). Εξ ορισμού, ένα βασικό χαρακτηριστικό των τετρασπανινών είναι να οργανώνουν συγκεκριμένους υποδοχείς και πρωτεΐνες σηματοδότησης σε μεμβρανικές μικροεπικράτειες (microdomains) στην επιφάνεια των κυττάρων. Οι τετρασπανίνες έχουν λάβει ιδιαίτερης αναγνώρισης, καθώς ο ξεχωριστός μηχανισμός δράσης τους, τους επιτρέπει να έχουν πολλαπλές

διαφορετικές λειτουργίες σε ένα κύτταρο ή/και μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών τύπων.

Οι τετρασπανίνες εμπλέκονται σε θεμελιώδεις κυτταρικές διεργασίες όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η μετανάστευση των κυττάρων. Επιπλέον, εμπλέκονται στην ενεργοποίηση, τον πολλαπλασιασμό, την ωρίμανση και την στόχευση διάφορων κυττάρων-τελεστών του ανοσοποιητικού συστήματος. Μεταξύ των βιολογικών διεργασιών που εμπλέκονται οι τετρασπανίνες υπάρχουν στοιχεία ότι ενέχονται στην καρκινογένεση καθώς και στην ανοσολογική απάντηση στο μικροπεριβάλλον του όγκου (11,28,70), ωστόσο, λόγω των πλειοτροπικών τους λειτουργιών, οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί που διέπουν τη λειτουργία των τετρασπανινών και η συμβολή τους στην καρκινογένεση αλλά και στην ανοσολογική απάντηση δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Στην οικογένεια των τετρασπανινών συγκαταλέγονται τα μόρια επιφανείας CD81 και CD82. Η τετρασπανίνη CD82 θεωρείται ότι δρα κατασταλτικά στην εξέλιξη του καρκίνου ενώ η τετρασπανίνη CD81 έχει ενοχοποιηθεί ότι προάγει την ανάπτυξη του όγκου, ωστόσο, δεδομένου των πλειοτροπικών τους λειτουργιών, η συμβολή τους στον καρκίνο του παχέος εντέρου παραμένει άγνωστη. Με την παρούσα πρόταση στοχεύουμε να διερευνήσουμε τον ρόλο τετρασπανινών CD81 και CD82 στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου του παχέος εντέρου αλλά και στην ανοσολογική απάντηση στο μικροπεριβάλλον του όγκου.

Στην παρούσα διατριβή μελετήσαμε, σε ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου, με τη χρήση ανοσοϊστοχημείας την έκφραση των τετρασπανινών CD81 και CD82 και των δεικτών PD1 και PDL1 σε καρκινικά κύτταρα και διηθούντα λεμφοκύτταρα, καθώς επίσης τη διήθηση του όγκου από CD3(+) και CD8(+) λεμφοκύτταρα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν μονιμοποιημένοι ιστοί ασθενών σε μορφή TMAs. Τα ανοσοϊστοχημικά δεδομένα των ασθενών συσχετίστηκαν με τα κλινικο-εργαστηριακά τους χαρακτηριστικά. Εκτιμήσαμε επίσης την ολική επιβίωση και την επιβίωση ελεύθερης νόσου των ασθενών βάση των παθολογοανατομικών και κλινικο-εργαστηριακών τους χαρακτηριστικών. Σκοπός μας ήταν να αξιολογήσουμε το ρόλο καθενός από αυτά τα μόρια στον καρκίνο του παχέος εντέρου, ενεργώντας είτε ως καταστολείς, είτε ως προαγωγείς της καρκινογένεσης, καθώς και να προσδιορίσουμε την προγνωστική ή/και προβλεπτική τους αξία. Επιπλέον,

μελετήσαμε τον ρόλο της τετρασπανίνης CD81 στην εξέλιξη (ανάπτυξη, κινητικότητα καρκινικών κυττάρων και δυνατότητα σχηματισμού όγκων) του καρκίνου του παχέος εντέρου *in vitro*, διερευνήσαμε πιθανούς μηχανισμούς δράσης και εξετάσαμε εάν η κανονική σηματοδοτική πορεία του NF-κΒ εμπλέκεται στην ρύθμιση της έκφρασης της CD81 στα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου. Για το λόγο αυτό τροποποιήσαμε την έκφραση της CD81 στα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου DLD1, HCT116, CACO2. Χρησιμοποιώντας ρετρο-ιικούς φορείς μπορέσαμε να μειώσουμε την έκφραση της CD81 στα κύτταρα DLD1, HCT116, CACO2 (με τη χρήση shRNA έναντι της CD81), αλλά και να την αυξήσουμε στα κύτταρα HCT116, CACO2 (με τη χρήση ρετρο-ιικού φορέα που έφερε αντίγραφο του γονιδίου της CD81).

Αποτελέσματα:

- Παρατηρήσαμε χαμηλότερη έκφραση της τετρασπανίνης CD81 στα καρκινικά κύτταρα σε ασθενείς PS 0, έναντι PS 1 ή 2.
- Παρατηρήσαμε χαμηλότερη έκφραση της τετρασπανίνης CD81 στα καρκινικά κύτταρα σε ασθενείς MMR-deficient έναντι MMR-proficient ασθενών.
- Παρατηρήσαμε υψηλότερα ποσοστά διηθούντων CD81(+) λεμφοκυττάρων στους μη μεταστατικούς ασθενείς έναντι των μεταστατικών.
- Παρατηρήσαμε αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση της CD81 στα καρκινικά κύτταρα και τη διήθηση στο μικροπεριβάλλον του όγκου από CD3(+) και CD8(+) λεμφοκύτταρα
- Παρατηρήσαμε ότι η έκφραση της τετρασπανίνης CD82 στους καρκινικούς ιστούς χάνεται στα υψηλότερα στάδια νόσου κατά TNM, με τους μεταστατικούς ασθενείς να παρουσιάζουν πολύ χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης της CD82 έναντι των μη-μεταστατικών ασθενών.
- Παρατηρήσαμε ότι ασθενείς με R1 ή R2 εκτομή παρουσίαζαν ελαττωμένη έκφραση της CD82 στους καρκινικούς ιστούς συγκριτικά με τους ασθενείς που είχαν R0 εκτομή.
- Παρατηρήσαμε μειωμένη έκφραση της CD82 στους καρκινικούς ιστούς σε ασθενείς με αυξημένες τιμές καρκινικών δεικτών CEA και CA 19-9.

- Παρατηρήσαμε ότι ασθενείς στους οποίους ο πρωτοπαθής όγκος εντοπίζεται δεξιά εκφράζουν ελαττωμένη CD82 στα καρκινικά κύτταρα, έναντι της αριστερής εντόπισης.
- Παρατηρήσαμε μειωμένα ποσοστά CD82(+) λεμφοκυττάρων σε μεταστατικούς ασθενείς, σε ασθενείς με κακή γενική κατάσταση (PS 1 ή 2) και σε ασθενείς με αυξημένες τιμές καρκινικών δεικτών CEA και Ca 19-9.
- Παρατηρήσαμε υψηλότερα ποσοστά PD1(+) καρκινικών κυττάρων στους μη-μεταστατικούς ασθενείς έναντι των μεταστατικών.
- Παρατηρήσαμε υψηλότερο ποσοστό PD1(+) καρκινικών κύτταρων και λεμφοκυττάρων, σε ασθενείς με χαμηλούς καρκινικούς δείκτες CEA και CA 19-9.
- Παρατηρήσαμε συσχέτιση μεταξύ των δεικτών CD82, CD81 και του δείκτη PD1 στα καρκινικά κύτταρα.
- Παρατηρήσαμε θετική συσχέτιση μεταξύ των PD1(+) λεμφοκυττάρων και των CD81(+), CD82(+), CD3(+), CD8(+) λεμφοκυττάρων.
- Παρατηρήσαμε υψηλότερα ποσοστά διηθούντων CD3(+) και CD8(+) λεμφοκυττάρων στους μη μεταστατικούς ασθενείς έναντι των μεταστατικών ασθενών.
- Το ποσοστό των διηθούντων CD3 ή και CD8 T-λεμφοκυττάρων ήταν υψηλότερο στους ασθενείς με καλή γενική κατάσταση (PS0 έναντι PS1&2).
- Ασθενείς με υψηλές τιμές CEA & Ca 19-9 παρουσίαζαν χαμηλότερα ποσοστά διηθούντων CD8-λεμφοκυττάρων.
- Τα ποσοστά διήθησης των CD8 λεμφοκυττάρων ήταν υψηλότερα στους MMR-deficient ασθενείς.
- Παρατηρήσαμε ότι η διήθηση από CD81(+) T-λεμφοκύτταρα μειώνει τον κίνδυνο θανάτου (OS) ή υποτροπής (PFS).
- Παρατηρήσαμε ότι η αυξημένη έκφραση της τετρασπανίνης CD82 στα καρκινικά κύτταρα όσο και το αυξημένο ποσοστό διηθούντων CD82(+) λεμφοκυττάρων σχετίζεται με καλύτερη ολική επιβίωση και επιβίωση ελεύθερης νόσου.
- Παρατηρήσαμε ότι οι ασθενείς που παρουσίαζαν υψηλή έκφραση του PD1, είτε στα καρκινικά κύτταρα, είτε στα διηθούμενα λεμφοκύτταρα παρουσίαζαν μικρότερο κίνδυνο θανάτου (OS) ή/και υποτροπής (PFS).

- Η διήθηση από CD8(+) λεμφοκύτταρα αναδείχθηκε ως θετικός προγνωστικός παράγοντας, προσδίδοντας σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου μειωμένο κίνδυνο υποτροπής και θανάτου.
- Επιβεβαιώσαμε την προγνωστική αξία των ήδη γνωστών κλινικο-παθολογοανατομικών παραμέτρων, όπως το στάδιο της νόσου, την πλήρης χειρουργική εκτομή και τις τιμές των καρκινικών δεικτών CEA και CA 19-9.
- Διαπιστώσαμε *in vitro* ότι η τετρασπανίνη CD81 προάγει στον ρυθμό πολλαπλασιασμού ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου.
- Διαπιστώσαμε *in vitro* ότι τετρασπανίνη CD81 αυξάνει την κινητικότητα των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου.
- Διαπιστώσαμε *in vitro* ότι τετρασπανίνη CD81 προάγει την σχηματισμό όγκων στα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου DLD1.
- Διαπιστώσαμε *in vitro* ότι τετρασπανίνη CD81 προάγει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου επηρεάζοντας θετικά την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα E2F1 και του CDC6.
- Παρατηρήσαμε πιθανή αλληλεπίδραση της τετρασπανίνης CD81 με τα σηματοδοτικά μονοπάτια του NF-κΒ που όμως χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Συμπερασματικά, διαπιστώσαμε ότι η τετρασπανίνη CD82 έχει προστατευτικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου του παχέος εντέρου, καθώς η έκφραση της στους καρκινικούς ιστούς συσχετίστηκε με ευνοϊκά κλινικο-παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών και αυξημένη επιβίωση. Παρομοίως, η έκφραση του PD1 αναγνωρίστηκε επίσης ως θετικός προγνωστικός παράγοντας. Παράλληλα, παρατηρήσαμε ότι η τετρασπανίνη CD81 πιθανώς λειτουργεί καταστέλλοντας την ανοσιακή απόκριση στο μικροπεριβάλλον του όγκου στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Τέλος, διαπιστώσαμε ότι η τετρασπανίνη CD81 συμβάλει στην ανάπτυξη και την εξέλιξη του καρκίνου του παχέος εντέρου *in vitro*, προάγοντας τον πολλαπλασιασμό και την κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων, ενώ επίσης παρατηρήσαμε ότι ρυθμίζει θετικά την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου.

The role of cell surface cluster of differentiation (CD) molecules in cancer development and the role of canonical NF-κB signaling on CD regulation

Carcinogenesis is a multistep process, which at a cellular level involves the accumulation of genetic mutations in conjunction with epigenetic modifications, resulting in dominant alterations in gene expression and cellular physiology. Consequently, these changes lead to uncontrolled cell division and evasion of apoptosis. The development and progression of cancer, however, is a much more complex process involving also cells and other factors present in the tumor microenvironment, including the host's immune system. Among the cluster of differentiation cell surface molecules that are involved in carcinogenesis are tetraspanins. Tetraspanins are transmembrane proteins that span the cell membrane with 4 α -helices and regulate multiple biological processes through their ability to cluster and organize specific receptors and signaling proteins into micro-regions/-domains on the cell surface. These proteins combine with each other, as well as with a series of other transmembrane and cytoplasmic proteins to form membrane microdomains (tetraspanin enriched microdomains - TEMs). These protein complexes are also referred to in the literature as tetraspanin webs. By definition, a key feature of tetraspanins is to organize specific receptors and signaling proteins into membrane microdomains on the cell surface. Tetraspanins have received particular recognition, as their distinct mechanism of action allows them to have multiple and diverse functions within a single cell and/or between different cell types.

Tetraspanins are involved normally in fundamental cellular processes such as cell proliferation, differentiation and migration. In the immune system, tetraspanins interact with prominent leukocyte receptors leading to their activation and the downstream signal transduction pathways. Among the biological processes tetraspanins are involved in, there is evidence that they are implicated in carcinogenesis, acting as tumor or metastasis suppressors or promoters, as well as regulating the immune response in the tumor microenvironment. However, due to

the pleiotropic functions of tetraspanins, the precise molecular mechanisms contributing to carcinogenesis but also in the immune response are not fully understood. The tetraspanin family includes the surface molecules CD81 and CD82. CD82 tetraspanin is thought to act as a tumor suppressor, while CD81 tetraspanin has been thought to be a tumor promoter, however, given their pleiotropic functions, their role in colon cancer remains unknown. With the present proposal we aim to investigate the role of tetraspanins CD81 and CD82 in the development and progression of colon cancer.

In the current study we examined, in patients with colon cancer by using immunohistochemistry, the expression of the tetraspanins CD81 and CD82 and the expression of the markers PD1 and PDL1 in tumor cells as well as in tumor infiltrating lymphocytes. We also examined the infiltration of the tumor microenvironment by CD3(+) and CD8(+) lymphocytes. For that purpose, fixed patient tissues in the form of tissue-microarrays (TMAs) were used. The patients' immunohistochemical data were correlated with their clinical and laboratory findings. We also estimated the overall survival and progression-free survival of the colon cancer patients according to their pathologic, clinical and laboratory characteristics. Our aim was to evaluate the role of each of these molecules/markers in colon cancer, acting either as suppressors or promoters of carcinogenesis, as well as to determine their prognostic and/or predictive value. Furthermore, we studied the role of tetraspanin CD81 in the progression (growth, tumor cell motility and tumorigenicity) of colon cancer *in vitro*, investigated possible mechanisms of action and examined whether the normal NF- κ B signaling pathway is involved in the regulation of its expression CD81 in colon cancer cells. For this reason, we modified the expression of CD81 in DLD1, HCT116, CACO2 colon cancer cells. Using retroviral vectors, we were able to downregulate the expression of CD81 in DLD1, HCT116, CACO2 cells (using shRNA against CD81), and also upregulate CD81 expression in HCT116, CACO2 cells (using a retroviral vector carrying a of the CD81 gene).

Results:

- We observed that patients with a performance status (PS) 0, had a lower expression of CD81 by immunohistochemistry on cancer cells compares to patients with PS 1 or 2.
- Patients with mismatch-repair (MMR) proficient tumors had a higher CD81 expression by immunohistochemistry on cancer cells than MMR-deficient patients
- Non-metastatic patients were found to have a higher percentage of CD81(+)-lymphocytes infiltrating their tumors than metastatic patients.
- We observed a negative correlation between the expression by immunohistochemistry of CD81 on tumor cells and tumor infiltrating CD3(+) and CD8(+) lymphocytes.
- We found that CD82 expression on cancer cells by immunohistochemistry was less prominent in higher disease stages according to TNM staging, with metastatic patients displaying much lower levels of CD82 expression compared to non-metastatic patients.
- We observed that patients with R1 or R2 resection had reduced expression of CD82 in tumor tissues compared to patients who had R0 resection.
- Patients with elevated values of the tumor markers CEA and CA 19-9 displayed reduced CD82 expression on tumor cells by immunohistochemistry.
- We observed that left-sided primary tumors displayed higher CD82 expression on cancer cells by immunohistochemistry, compared to right-sided primary tumors.
- Metastatic patients, patients with a poor general health status (PS1 or 2) and patients with elevated CEA and CA 19-9 values, displayed a reduced percentage of CD82(+) tumor infiltrating lymphocytes.
- The percentage of PD1(+) tumor cells was higher in non-metastatic patients compared to metastatic patients.
- A higher percentage of PD1(+) tumor cells and PD1(+) lymphocytes was observed in patients with low CEA and CA 19-9 tumor marker values.
- We observed a positive correlation between the expression of CD81 and CD82 on tumor cells and the expression of PD1 on tumor cells.

- We observed a positive correlation between PD1(+)-lymphocytes and CD81(+)-lymphocytes, CD82(+)-lymphocytes, CD3(+)-lymphocytes, CD8(+)-lymphocytes.
- The percentage of CD3(+) and CD8(+) tumor infiltrating lymphocytes was higher in non-metastatic patients compared to metastatic.
- The percentage of CD3(+) and CD8(+) tumor infiltrating lymphocytes was higher in patients with a good performance status (PS0 vs PS1&2).
- Infiltration by CD8(+)-lymphocytes was lower in patients with high CEA and Ca 19-9 values.
- Infiltration by CD8(+) lymphocytes was higher in MMR-deficient patients.
- Patients with a higher percentage of infiltrating CD81(+) lymphocytes demonstrated better overall survival (OS) and progression-free survival (PFS).
- We observed that increased expression by immunohistochemistry of tetraspanin CD82 in tumor cells as well as increased percentage of infiltrating CD82(+) lymphocytes was associated with better overall and progression-free survival.
- Patients with higher percentages of PD1(+) tumor cells or PD1(+) infiltrating tumor lymphocytes, had a lower risk of death (OS) and/or relapse (PFS).
- Patients with higher percentages CD8(+) infiltrating tumor lymphocytes demonstrated improved overall and progression-free survival.
- We confirmed the prognostic value of the already known clinical and pathological parameters, such as disease stage, complete surgical resection and values of CEA and CA 19-9 tumor markers.
- We found that tetraspanin CD81 promotes *in vitro* the proliferation rate of human colon cancer cells DLD1, CACO2 and HCT116.
- We found that tetraspanin CD81 *in vitro* increases the motility of human colon cancer cells DLD1, CACO2 and HCT116.
- We found that tetraspanin CD81 *in vitro* promotes tumorigenesis in DLD1 colon cancer cells.
- We found that tetraspanin CD81 *in vitro* promotes cell cycle progression by positively influencing the expression of the transcription factors E2F1 and CDC6.
- We observed a possible interaction of the tetraspanin CD81 with the signaling pathways of NF-κB, which, however, needs further investigation.

In conclusion, we found by immunohistochemistry that tetraspanin CD82 has a protective role in the development and progression of colon cancer, as its expression in cancer tissues was associated with favorable clinicopathological characteristics of patients and increased survival. Similarly, PD1 expression was also identified as a positive prognostic factor by immunohistochemistry. Additionally, we observed by immunohistochemistry that the tetraspanin CD81 probably functions by suppressing the immune response in the tumor microenvironment in colon cancer, since infiltration of CD3(+) and CD8(+) T-lymphocytes was less prominent in patients with high CD81 expression in tumor cells. Finally, we found that tetraspanin CD81 contributes *in vitro* to the growth and progression of colon cancer, by promoting cancer cells' proliferation and motility, while also positively regulating cell cycle progression.

Βιβλιογραφία

1. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell* [Internet]. 2000 Jan 7 [cited 2022 Aug 14];100(1):57–70. Available from: <http://www.cell.com/article/S0092867400816839/fulltext>
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. Vol. 144, *Cell*. 2011. p. 646–74.
3. Majérus M-A. The cause of cancer: The unifying theory. *Adv Cancer Biol - Metastasis*. 2022 Jul 1;4:100034.
4. Nowell PC. The Clonal Evolution of Tumor Cell Populations. *Science* (80-) [Internet]. 1976 [cited 2022 Aug 18];194(4260):23–8. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.959840>
5. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. Vol. 420, *Nature*. 2002. p. 860–7.
6. Munn LL. Cancer and Inflammation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2017 Mar 1;9(2).
7. Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, Chan V, Fearon DF, Merad M, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med*. 2018 May 1;24(5):541–50.
8. Xiong HQ, Abbruzzese JL, Lin E, Wang L, Zheng L, Xie K. NF-κB activity blockade impairs the angiogenic potential of human pancreatic cancer cells. *Int J Cancer* [Internet]. 2004 Jan 10 [cited 2020 Mar 6];108(2):181–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.11562>
9. Lee DF, Hung MC. Advances in targeting IKK and IKK-related kinases for cancer therapy. Vol. 14, *Clinical Cancer Research*. American Association for Cancer Research; 2008. p. 5656–62.
10. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2009.
11. Yeung L, Hickey MJ, Wright MD. The many and varied roles of tetraspanins in immune cell recruitment and migration. *Front Immunol*. 2018;9(JUL).
12. Hemler ME. Tetraspanin functions and associated microdomains. Vol. 6, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 2005. p. 801–11.
13. Zhang B, Zhang Z, Li L, Qin YR, Liu H, Jiang C, et al. TSPAN15 interacts with BTRC to promote oesophageal squamous cell carcinoma metastasis via activating NF-κB signaling. *Nat Commun* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2022 Aug 17];9(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29650964/>
14. McAllister SS, Weinberg RA. The tumour-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis. Vol. 16, *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group; 2014. p. 717–27.

15. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. Vol. 454, *Nature*. 2008. p. 436–44.
16. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: Links to genetic instability. Vol. 30, *Carcinogenesis*. 2009. p. 1073–81.
17. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. Vol. 21, *Cancer Cell*. 2012. p. 309–22.
18. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. *Annu Rev Immunol*. 2011;29(1):235–71.
19. Quezada SA, Peggs KS, Simpson TR, Allison JP. Shifting the equilibrium in cancer immunoediting: from tumor tolerance to eradication. *Immunol Rev* [Internet]. 2011 May 1 [cited 2020 Mar 6];241(1):104–18. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-065X.2011.01007.x>
20. Disis ML. Immune regulation of cancer. Vol. 28, *Journal of Clinical Oncology*. American Society of Clinical Oncology; 2010. p. 4531–8.
21. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. Vol. 480, *Nature*. Nature Publishing Group; 2011. p. 480–9.
22. Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, Ribas A. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. Vol. 168, *Cell*. Cell Press; 2017. p. 707–23.
23. McGranahan N, Swanton C. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. Vol. 168, *Cell*. Cell Press; 2017. p. 613–28.
24. Havel JJ, Chowell D, Chan TA, Program P, Sloan M, Cancer K, et al. The evolving landscape of biomarkers for checkpoint inhibitor immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2019;19(3):133–50.
25. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Vol. 12, *Nature Reviews Cancer*. 2012. p. 252–64.
26. Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. *Science* (80-). 2015 Apr 3;348(6230):56–61.
27. Kitamura T, Qian BZ, Pollard JW. Immune cell promotion of metastasis. Vol. 15, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2015. p. 73–86.
28. Schaper F, van Spriel AB. Antitumor immunity is controlled by tetraspanin proteins. *Front Immunol*. 2018;9(MAY).
29. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. Vol. 19, *Nature Medicine*. 2013. p. 1423–37.
30. Lindau D, Gielen P, Kroesen M, Wesseling P, Adema GJ. The immunosuppressive tumour network: Myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells [Internet]. Vol. 138, *Immunology*.

- 2013 [cited 2020 Mar 27]. p. 105–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23216602>
31. van der Woude LL, Gorris MAJ, Halilovic A, Figdor CG, de Vries IJM. Migrating into the Tumor: a Roadmap for T Cells. *Trends in cancer* [Internet]. 2017 Nov 1 [cited 2020 Mar 26];3(11):797–808. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29120755>
 32. Hu MCT, Lee DF, Xia W, Golfman LS, Ou-Yang F, Yang JY, et al. I κ B kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. *Cell*. 2004 Apr 16;117(2):225–37.
 33. Markopoulos GS, Roupakia E, Tokamani M, Alabasi G, Sandaltzopoulos R, Marcu KB, et al. Roles of NF- κ B signaling in the regulation of miRNAs impacting on inflammation in cancer. Vol. 6, *Biomedicines*. MDPI AG; 2018.
 34. Romanska HM, Berditchevski F. Tetraspanins in human epithelial malignancies [Internet]. Vol. 223, *Journal of Pathology*. 2011 [cited 2020 Mar 26]. p. 4–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20938929>
 35. Hemler ME. Tetraspanin proteins promote multiple cancer stages. Vol. 14, *Nature Reviews Cancer*. 2014. p. 49–60.
 36. Charrin S, Jouannet S, Boucheix C, Rubinstein E. Tetraspanins at a glance. *J Cell Sci*. 2014;127(17):3641–8.
 37. Richardson MM, Jennings LK, Zhang XA. Tetraspanins and tumor progression. Vol. 28, *Clinical and Experimental Metastasis*. Springer; 2011. p. 261–70.
 38. Berditchevski F, Odintsova E. ErbB receptors and tetraspanins: casting the net wider. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2016 [cited 2020 May 26];77:68–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2016.05.017>
 39. Detchokul S, Williams ED, Parker MW, Frauman AG. Tetraspanins as regulators of the tumour microenvironment : implications for metastasis. 2014;
 40. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2000 [cited 2022 Aug 16];18:621–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10837071/>
 41. Fusco AJ, Huang D Bin, Miller D, Wang VYF, Vu D, Ghosh G. NF- κ B p52:RelB heterodimer recognizes two classes of κ B sites with two distinct modes. *EMBO Rep* [Internet]. 2009 [cited 2022 Aug 16];10(2):152–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19098713/>
 42. Chandel NS, Trzyna WC, McClintock DS, Schumacker PT. Role of oxidants in NF- κ B activation and TNF- α gene transcription induced by hypoxia and endotoxin. *J Immunol* [Internet]. 2000 Jul 15 [cited 2022 Aug 16];165(2):1013–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10878378/>
 43. Gilmore TD. Introduction to NF- κ B: Players, pathways, perspectives. *Oncogene*. 2006.

44. Nabel GJ, Verma IM. Proposed NF-kappa B/I kappa B family nomenclature. *Genes Dev* [Internet]. 1993 [cited 2022 Aug 16];7(11):2063. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8224837/>
45. Senftleben U, Cao Y, Xiao G, Greten FR, Krähn G, Bonizzi G, et al. Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* [Internet]. 2001 Aug 24 [cited 2022 Aug 16];293(5534):1495–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11520989/>
46. Jacobs MD, Harrison SC. Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex. *Cell* [Internet]. 1998 Dec 11 [cited 2022 Aug 17];95(6):749–58. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9865693/>
47. Nishikori M. Classical and Alternative NF-.KAPPA.B Activation Pathways and Their Roles in Lymphoid Malignancies. *J Clin Exp Hematop*. 2005;
48. Nelson DE, Ihekweaba AEC, Elliott M, Johnson JR, Gibney CA, Foreman BE, et al. Oscillations in NF-kappaB signaling control the dynamics of gene expression. *Science* [Internet]. 2004 Oct 22 [cited 2022 Aug 17];306(5696):704–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15499023/>
49. Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-κB and IKK function. Vol. 8, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007. p. 49–62.
50. Karin M. NF-kappaB as a critical link between inflammation and cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2009.
51. Perkins ND. The diverse and complex roles of NF-κB subunits in cancer [Internet]. Vol. 12, *Nature Reviews Cancer*. 2012 [cited 2020 Mar 7]. p. 121–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22257950>
52. Hayden MS, Ghosh S. NF-κB, the first quarter-century: Remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev*. 2012 Feb 1;26(3):203–34.
53. Taniguchi K, Karin M. NF-B, inflammation, immunity and cancer: Coming of age. Vol. 18, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2018. p. 309–24.
54. Bonizzi G, Bebie M, Otero DC, Johnson-Vroom KE, Cao Y, Vu D, et al. Activation of IKKα target genes depends on recognition of specific κB binding sites by RelB:p52 dimers. *EMBO J* [Internet]. 2004 Oct 10 [cited 2022 Aug 17];23(21):4202. Available from: </pmc/articles/PMC524385/>
55. Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X. NF-κB in development and progression of human cancer. *Virchows Archiv*. 2005.
56. Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S. Crosstalk in NF-κB signaling pathways [Internet]. Vol. 12, *Nature Immunology*. 2011 [cited 2020 May 19]. p. 695–708. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ni.2065>
57. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2009.

58. Zola H, Swart B, Banham A, Barry S, Beare A, Bensussan A, et al. CD molecules 2006 - Human cell differentiation molecules. *J Immunol Methods*. 2007 Jan 30;319(1–2):1–5.
59. Zola H, Swart B, Nicholson I, Aasted B, Bensussan A, Boumsell L, et al. CD molecules 2005: human cell differentiation molecules. *Blood* [Internet]. 2005 Nov [cited 2022 Aug 17];106(9):3123–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16020511/>
60. Vences-Catalán F, Levy S. Immune targeting of tetraspanins involved in cell invasion and metastasis. *Front Immunol* [Internet]. 2018 Jun 12 [cited 2020 Mar 9];9(JUN):1–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29946318>
61. Yunta M, Lazo PA. Tetraspanin proteins as organisers of membrane microdomains and signalling complexes. *Cell Signal*. 2003;15(6):559–64.
62. Wright MD, Tomlinson MG. The ins and outs of the transmembrane 4 superfamily. *Immunol Today* [Internet]. 1994 [cited 2022 Aug 17];15(12):588–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7531445/>
63. Levy S, Shoham T. Protein-protein interactions in the tetraspanin web. *undefined*. 2005;(4):218–24.
64. Andreu Z, Yáñez-Mó M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front Immunol* [Internet]. 2014 [cited 2020 Mar 28];5(SEP):442. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25278937>
65. Mittelbrunn M, Gutiérrez-Vázquez C, Villarroya-Beltri C, González S, Sánchez-Cabo F, González MÁ, et al. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun*. 2011;2(1).
66. Termini CM, Gillette JM. Tetraspanins function as regulators of cellular signaling. Vol. 5, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media S.A.; 2017.
67. Van Deventer SJ, Dunlock VME, Van Spriel AB. Molecular interactions shaping the tetraspanin web [Internet]. Vol. 45, *Biochemical Society Transactions*. Portland Press Ltd; 2017 [cited 2020 Mar 27]. p. 741–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28620035>
68. Levy S, Shoham T. The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2005 Feb [cited 2022 Oct 8];5(2):136–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15688041/>
69. Beckwith KA, Byrd JC, Muthusamy N. Tetraspanins as therapeutic targets in hematological malignancy: a concise review. *Front Physiol* [Internet]. 2015 [cited 2020 Mar 26];6(MAR):91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25852576>
70. Zöller M. Tetraspanins: Push and pull in suppressing and promoting metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(1):40–55.

71. Takeda Y, Li Q, Kazarov AR, Epardaud M, Elpek K, Turley SJ, et al. Diminished metastasis in tetraspanin CD151-knockout mice. *Blood* [Internet]. 2011 Jul 14 [cited 2020 Mar 26];118(2):464–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21536858>
72. Murayama Y, Oritani K, Tsutsui S. Novel CD9-targeted therapies in gastric cancer. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2015 Mar 3 [cited 2022 Aug 18];21(11):3206. Available from: </pmc/articles/PMC4363749/>
73. Rodia MT, Ugolini G, Mattei G, Montroni I, Zattoni D, Ghignone F, et al. Systematic large-scale meta-analysis identifies a panel of two mRNAs as blood biomarkers for colorectal cancer detection. *Oncotarget* [Internet]. 2016 May 24 [cited 2022 Aug 18];7(21):30295–306. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26993598/>
74. De Goeij BECG, Vink T, Ten Napel H, Breij ECW, Satijn D, Wubbolts R, et al. Efficient Payload Delivery by a Bispecific Antibody-Drug Conjugate Targeting HER2 and CD63. *Mol Cancer Ther* [Internet]. 2016 Nov 1 [cited 2022 Aug 18];15(11):2688–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27559142/>
75. Hemler ME. Targeting of tetraspanin proteins — potential benefits and strategies. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2008 [cited 2022 Aug 18];7(9):747. Available from: </pmc/articles/PMC4737550/>
76. Sadej R, Romanska H, Kavanagh D, Baldwin G, Takahashi T, Kalia N, et al. Tetraspanin CD151 regulates transforming growth factor beta signaling: implication in tumor metastasis. *Cancer Res* [Internet]. 2010 Jul 15 [cited 2022 Aug 18];70(14):6059–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20570898/>
77. Huan J, Gao Y, Xu J, Sheng W, Zhu W, Zhang S, et al. Overexpression of CD9 correlates with tumor stage and lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(3):3054–61.
78. Copeland BT, Bowman MJ, Boucheix C, Ashman LK. Knockout of the tetraspanin Cd9 in the TRAMP model of de novo prostate cancer increases spontaneous metastases in an organ-specific manner. *Int J cancer* [Internet]. 2013 Oct 15 [cited 2022 Aug 18];133(8):1803–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23575960/>
79. Park CS, Kim TK, Kim HG, Kim YJ, Jeoung MH, Lee WR, et al. Therapeutic targeting of tetraspanin8 in epithelial ovarian cancer invasion and metastasis. *Oncogene* [Internet]. 2016 Aug 25 [cited 2022 Aug 18];35(34):4540–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26804173/>
80. Yang L, Wang Y, Pan Z, Gao S, Zou B, Lin Z, et al. Tetraspanin 1 inhibits TNF α -induced apoptosis via NF- κ B signaling pathway in alveolar epithelial cells. *Inflamm Res* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2022 Aug 17];67(11–12):951–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30291375/>
81. Kwon HJ, Choi JE, Kang SH, Son Y, Bae YK. Prognostic significance of CD9

- expression differs between tumour cells and stromal immune cells, and depends on the molecular subtype of the invasive breast carcinoma. *Histopathology* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2022 Aug 19];70(7):1155–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28178752/>
82. Jiang X, Zhang J, Huang Y. Tetraspanins in cell migration. *Cell Adhes Migr* [Internet]. 2015 [cited 2020 Mar 27];9(5):406–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26091149>
 83. Zelman-Toister E, Bakos E, Cohen S, Zigmond E, Shezen E, Grabovsky V, et al. CD151 Regulates T-Cell Migration in Health and Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2016 Jan 11 [cited 2022 Aug 19];22(2):257–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26529559/>
 84. Rocha-Perugini V, González-Granado JM, Tejera E, López-Martín S, Yañez-Mó M, Sánchez-Madrid F. Tetraspanins CD9 and CD151 at the immune synapse support T-cell integrin signaling. *Eur J Immunol* [Internet]. 2014 Jul [cited 2020 Mar 27];44(7):1967–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24723389>
 85. van Spriël AB, Puls KL, Sofi M, Pouniotis D, Hochrein H, Orinska Z, et al. A regulatory role for CD37 in T cell proliferation. *J Immunol* [Internet]. 2004 Mar 1 [cited 2020 Mar 27];172(5):2953–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14978098>
 86. Jones EL, Wee JL, Demaria MC, Blakeley J, Ho PK, Vega-Ramos J, et al. Dendritic Cell Migration and Antigen Presentation Are Coordinated by the Opposing Functions of the Tetraspanins CD82 and CD37. *J Immunol*. 2016 Feb 1;196(3):978–87.
 87. Engering A, Pieters J. Association of distinct tetraspanins with MHC class II molecules at different subcellular locations in human immature dendritic cells. *Int Immunol* [Internet]. 2001 Feb [cited 2020 Mar 27];13(2):127–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11157846>
 88. Rocha-Perugini V, Martínez del Hoyo G, González-Granado JM, Ramírez-Huesca M, Zorita V, Rubinstein E, et al. CD9 regulates MHC-II trafficking in Monocyte-derived Dendritic Cells. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2017 [cited 2020 Mar 26];37(May):MCB.00202-17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28533221>
 89. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2021 Oct 30];71(3):209–49. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21660>
 90. Siegel RL, Miller KD, Goding Sauer A, Fedewa SA, Butterly LF, Anderson JC, et al. Colorectal cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2020 May [cited 2022 Aug 20];70(3):145–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32133645/>

91. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, De Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med* [Internet]. 2015 Nov 1 [cited 2022 Aug 20];21(11):1350–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26457759/>
92. Johnson CM, Wei C, Ensor JE, Smolenski DJ, Amos CI, Levin B, et al. Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer Causes Control* [Internet]. 2013 Jun [cited 2022 Aug 20];24(6):1207–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23563998/>
93. Beaugerie L, Svrcek M, Seksik P, Bouvier AM, Simon T, Allez M, et al. Risk of colorectal high-grade dysplasia and cancer in a prospective observational cohort of patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* [Internet]. 2013 [cited 2022 Aug 20];145(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23541909/>
94. Ahsan H, Neugut AI, Garbowski GC, Jacobson JS, Forde KA, Treat MR, et al. Family history of colorectal adenomatous polyps and increased risk for colorectal cancer. *Ann Intern Med* [Internet]. 1998 Jun 1 [cited 2022 Aug 20];128(11):900–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9634428/>
95. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. Guttmacher AE, Collins FS, editors. *N Engl J Med* [Internet]. 2003 Mar 6 [cited 2022 Aug 20];348(10):919–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12621137/>
96. Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, et al. Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 2008 Dec 10 [cited 2022 Aug 20];26(35):5783–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18809606/>
97. Galiatsatos P, Foulkes WD. Familial adenomatous polyposis. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2006 Feb [cited 2022 Aug 20];101(2):385–98. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16454848/>
98. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular Basis of Colorectal Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2009 Dec 17 [cited 2022 Aug 21];361(25):2449–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20018966/>
99. Hashida H, Takabayashi A, Tokuhara T, Hattori N, Taki T, Hasegawa H, et al. Clinical significance of transmembrane 4 superfamily in colon cancer. *Br J Cancer* [Internet]. 2003 Jul 7 [cited 2022 Aug 21];89(1):158–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12838318/>
100. Chen L, Zhu YY, Zhang XJ, Wang GL, Li XY, He S, et al. TSPAN1 protein expression: a significant prognostic indicator for patients with colorectal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2009 May 14 [cited 2022 Aug 21];15(18):2270–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19437569/>
101. Liu J, Chen C, Li G, Chen D, Zhou Q. Upregulation of TSPAN12 is associated

- with the colorectal cancer growth and metastasis. *Am J Transl Res* [Internet]. 2017 [cited 2022 Aug 21];9(2):812. Available from: [/pmc/articles/PMC5340717/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27780340/)
102. Greco C, Bralet MP, Ailane N, Dubart-Kupperschmitt A, Rubinstein E, Le Naour F, et al. E-cadherin/p120-catenin and tetraspanin Co-029 cooperate for cell motility control in human colon carcinoma. *Cancer Res* [Internet]. 2010 Oct 1 [cited 2022 Aug 21];70(19):7674–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20858717/>
 103. Kim KJ, Kwon HJ, Kim MC, Bae YK. CD9 Expression in Colorectal Carcinomas and Its Prognostic Significance. *J Pathol Transl Med* [Internet]. 2016 [cited 2022 Aug 21];50(6):459–68. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27780340/>
 104. Uhlen M, Zhang C, Lee S, Sjöstedt E, Fagerberg L, Bidkhori G, et al. A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science* (80-). 2017 Aug 18;357(6352).
 105. Expression of CD82 in colorectal cancer - The Human Protein Atlas [Internet]. [cited 2022 Aug 21]. Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000085117-CD82/pathology/colorectal+cancer>
 106. Expression of CD81 in colorectal cancer - The Human Protein Atlas [Internet]. [cited 2022 Aug 21]. Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000110651-CD81/pathology/colorectal+cancer>
 107. Feng J, Huang C, Wren JD, Wang DW, Yan J, Zhang J, et al. Tetraspanin CD82: a suppressor of solid tumors and a modulator of membrane heterogeneity. *Cancer Metastasis Rev*. 2015 Dec 1;34(4):619–33.
 108. Jee BK, Park KM, Surendran S, Lee WK, Han CW, Kim YS, et al. KAI1/CD82 suppresses tumor invasion by MMP9 inactivation via TIMP1 up-regulation in the H1299 human lung carcinoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2006 Apr 7 [cited 2022 Aug 19];342(2):655–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16488391/>
 109. Lukason SP, Feliu DP, Ward MA, Lord RA, Reedy AK, Ramirez-Ortiz JL, et al. CD82 controls CpG-dependent TLR9 signaling. *FASEB J* [Internet]. 2019;33:12500–14. Available from: www.fasebj.org
 110. Levy S, Todd SC, Maecker HT. CD81 (TAPA-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 1998 [cited 2022 Aug 19];16:89–109. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9597125/>
 111. Vences-Catalán F, Rajapaksa R, Srivastava MK, Marabelle A, Kuo CC, Levy R, et al. Tetraspanin CD81, a modulator of immune suppression in cancer and metastasis. *Oncoimmunology* [Internet]. 2016 May 3 [cited 2020 Nov 30];5(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27467918/>

112. R O, S T, C D, R L, S L. TAPA-1, the target of an antiproliferative antibody, defines a new family of transmembrane proteins. *Mol Cell Biol* [Internet]. 1990 Aug [cited 2022 Aug 20];10(8):4007–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1695320/>
113. He Y, Han S Bin, Liu Y, Zhang JJ, Wu YM. Role of APOA1 in the resistance to platinum-based chemotherapy in squamous cervical cancer. *BMC Cancer* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2022 Aug 20];22(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35421932/>
114. Zhang Y, Qian H, Xu A, Yang G. Increased expression of CD81 is associated with poor prognosis of prostate cancer and increases the progression of prostate cancer cells in vitro. *Exp Ther Med* [Internet]. 2019 Nov 26 [cited 2020 Nov 29];19(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31885712/>
115. Zhang N, Zuo L, Zheng H, Li G, Hu X. Increased expression of CD81 in breast cancer tissue is associated with reduced patient prognosis and increased cell migration and proliferation in MDA-MB-231 and MDA-MB-435s human breast cancer cell lines in vitro. *Med Sci Monit* [Internet]. 2018 Aug 17 [cited 2020 Nov 29];24:5739–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30117494/>
116. Mizoshiri N, Shirai T, Terauchi R, Tsuchida S, Mori Y, Hayashi D, et al. The tetraspanin CD81 mediates the growth and metastases of human osteosarcoma. *Cell Oncol* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2020 Nov 27];42(6):861–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31494861/>
117. Hong IK, Byun HJ, Lee J, Jin YJ, Wang SJ, Jeoung D Il, et al. The tetraspanin CD81 protein increases melanoma cell motility by Up-regulating metalloproteinase MT1-MMP expression through the pro-oncogenic Akt-dependent Sp1 activation signaling pathways. *J Biol Chem* [Internet]. 2014 May 30 [cited 2020 Nov 30];289(22):15691–704. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24733393/>
118. Luo N, Sun X, Ma S, Li X, Zhu W, Fu M, et al. Development of a Novel Prognostic Model of Glioblastoma Based on m6A-Associated Immune Genes and Identification of a New Biomarker. Available from: www.frontiersin.org
119. Kim YH, Jung TY, Jung S, Jang WY, Moon KS, Kim IY, et al. Tumour-infiltrating T-cell subpopulations in glioblastomas. *Br J Neurosurg* [Internet]. 2012 Feb [cited 2020 Jun 22];26(1):21–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21707245/>
120. Park HS, Lee S, Lee J, Shin H Bin, Yoo SM, Lee MS, et al. Suppression of CD81 promotes bladder cancer cell invasion through increased matrix metalloproteinase expression via extracellular signal-regulated kinase phosphorylation. *Investig Clin Urol* [Internet]. 2019 [cited 2020 Nov 29];60(5):396–404. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31501803/>

121. Lee MS, Kim JH, Lee JS, Yun SJ, Kim WJ, Ahn H, et al. Prognostic significance of CREB-binding protein and CD81 expression in primary high grade non-muscle invasive bladder cancer: Identification of novel biomarkers for bladder cancer using antibody microarray. PLoS One [Internet]. 2015 Apr 27 [cited 2020 Nov 29];10(4):125405. Available from: [/pmc/articles/PMC4411067/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26329536/)
122. Expression of CD81 in pancreatic cancer - The Human Protein Atlas [Internet]. [cited 2022 Aug 22]. Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000110651-CD81/pathology/pancreatic+cancer>
123. Expression of CD81 in glioma - The Human Protein Atlas [Internet]. [cited 2022 Aug 22]. Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000110651-CD81/pathology/glioma>
124. Chang GW, Hsiao CC, Peng YM, Vieira Braga FA, Kragten NAM, Remmerswaal EBM, et al. The Adhesion G Protein-Coupled Receptor GPR56/ADGRG1 Is an Inhibitory Receptor on Human NK Cells. Cell Rep. 2016 May 24;15(8):1757–70.
125. Van Zelm MC, Smet J, Adams B, Mascart F, Schandené L, Janssen F, et al. CD81 gene defect in humans disrupts CD19 complex formation and leads to antibody deficiency. J Clin Invest. 2010 Apr 1;120(4):1265–74.
126. Vences-Catalán F, Rajapaksa R, Srivastava MK, Marabelle A, Kuo CC, Levy R, et al. Tetraspanin CD81 promotes tumor growth and metastasis by modulating the functions of T regulatory and myeloid-derived suppressor cells. Cancer Res [Internet]. 2015 Nov 1 [cited 2020 Nov 28];75(21):4517–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26329536/>
127. Wright MD, Geary SM, Fitter S, Moseley GW, Lau L-M, Sheng K-C, et al. Characterization of Mice Lacking the Tetraspanin Superfamily Member CD151. Mol Cell Biol. 2004 Jul 1;24(13):5978–88.
128. Mandel M, Higa A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. J Mol Biol [Internet]. 1970 Oct 14 [cited 2022 Aug 23];53(1):159–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4922220/>
129. Hanahan D. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. J Mol Biol [Internet]. 1983 Jun 5 [cited 2022 Aug 23];166(4):557–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6345791/>
130. Cellosaurus cell line DLD-1 (CVCL_0248) [Internet]. [cited 2022 Aug 24]. Available from: https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_0248
131. Cellosaurus cell line Caco-2 (CVCL_0025) [Internet]. [cited 2022 Aug 24]. Available from: https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_0025
132. Cellosaurus cell line HCT 116 (CVCL_0291) [Internet]. [cited 2022 Aug 24]. Available from: https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_0291
133. Suarez-Arnedo A, Figueroa FT, Clavijo C, Arbeláez P, Cruz JC, Muñoz-Camargo C. An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch

- wound healing assays. PLoS One [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2022 Aug 24];15(7 July). Available from: <https://github.com/AlejandraArnedo/Wound-healing-size-tool>
134. Ioshita S, Terada Y, Nakashima O, Kuwahara M, Sasaki S, Marumo F. Regulation of the G1/S transition phase in mesangial cells by E2F1. *Kidney Int* [Internet]. 1999 Oct 1 [cited 2022 Sep 14];56(4):1238–41. Available from: <http://www.kidney-international.org/article/S008525381546421X/fulltext>
 135. He Y, Liu Z, Qiao C, Xu M, Yu J, Li G. Expression and significance of Wnt signaling components and their target genes in breast carcinoma. *Mol Med Rep* [Internet]. 2014 Jan [cited 2022 Sep 14];9(1):137–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24190141/>
 136. Borlado LR, Méndez J. CDC6: from DNA replication to cell cycle checkpoints and oncogenesis. *Carcinogenesis* [Internet]. 2008 Feb [cited 2022 Sep 14];29(2):237–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18048387/>
 137. Gustafson-Wagner E, Stipp CS. The CD9/CD81 Tetraspanin Complex and Tetraspanin CD151 Regulate $\alpha 3 \beta 1$ Integrin-Dependent Tumor Cell Behaviors by Overlapping but Distinct Mechanisms. *PLoS One*. 2013 Apr 17;8(4).
 138. Shoham T, Rajapaksa R, Kuo C-C, Haimovich J, Levy S. Building of the tetraspanin web: distinct structural domains of CD81 function in different cellular compartments. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2006 Feb 15 [cited 2022 Nov 4];26(4):1373–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16449649/>
 139. Levy S. Function of the tetraspanin molecule CD81 in B and T cells. *Immunol Res* [Internet]. 2014 [cited 2020 May 26];58(2–3):179–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24522698/>
 140. Maecker HT, Levy S. Normal lymphocyte development but delayed humoral immune response in CD81-null mice. *J Exp Med* [Internet]. 1997 Apr 21 [cited 2022 Nov 4];185(8):1505–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9126932/>
 141. Mittelbrunn M, Yáñez-Mó M, Sancho D, Ursa Á, Sánchez-Madrid F. Cutting edge: dynamic redistribution of tetraspanin CD81 at the central zone of the immune synapse in both T lymphocytes and APC. *J Immunol* [Internet]. 2002 Dec 15 [cited 2022 Nov 3];169(12):6691–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12471100/>
 142. Tardif MR, Tremblay MJ. Tetraspanin CD81 provides a costimulatory signal resulting in increased human immunodeficiency virus type 1 gene expression in primary CD4+ T lymphocytes through NF-kappaB, NFAT, and AP-1 transduction pathways. *J Virol* [Internet]. 2005 Apr [cited 2022 Nov 2];79(7):4316–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15767432/>
 143. Lin Z, Fillmore GC, Um TH, Elenitoba-Johnson KSJ, Lim MS. Comparative

- microarray analysis of gene expression during activation of human peripheral blood T cells and leukemic Jurkat T cells. *Lab Invest* [Internet]. 2003 Jun 1 [cited 2022 Nov 3];83(6):765–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12808112/>
144. Yaeger R, Chatila WK, Lipsyc MD, Hechtman JF, Cercek A, Sanchez-Vega F, et al. Clinical Sequencing Defines the Genomic Landscape of Metastatic Colorectal Cancer. *Cancer Cell* [Internet]. 2018 Jan 8 [cited 2022 Nov 4];33(1):125-136.e3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29316426/>
 145. Yahagi M, Okabayashi K, Hasegawa H, Tsuruta M, Kitagawa Y. The Worse Prognosis of Right-Sided Compared with Left-Sided Colon Cancers: a Systematic Review and Meta-analysis. *J Gastrointest Surg* [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2022 Nov 4];20(3):648–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26573851/>
 146. Arnold D, Lueza B, Douillard JY, Peeters M, Lenz HJ, Venook A, et al. Prognostic and predictive value of primary tumour side in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with chemotherapy and EGFR directed antibodies in six randomized trials. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2022 Nov 4];28(8):1713–29. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28407110/>
 147. Wang F, Bai L, Liu TS, Yu YY, He MM, Liu KY, et al. Right-sided colon cancer and left-sided colorectal cancers respond differently to cetuximab. *Chin J Cancer* [Internet]. 2015 Jun 10 [cited 2022 Nov 4];34(9). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26111811/>
 148. Kim JR, Moon YJ, Kwon KS, Bae JS, Wagle S, Kim KM, et al. Tumor Infiltrating PD1-Positive Lymphocytes and the Expression of PD-L1 Predict Poor Prognosis of Soft Tissue Sarcomas. *PLoS One* [Internet]. 2013 Dec 11 [cited 2022 Nov 6];8(12). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24359621/>
 149. Ren X, Wu H, Lu J, Zhang Y, Luo Y, Xu Q, et al. PD1 protein expression in tumor infiltrated lymphocytes rather than PDL1 in tumor cells predicts survival in triple-negative breast cancer. *Cancer Biol Ther* [Internet]. 2018 May 4 [cited 2022 Nov 6];19(5):373. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29715030/>
 150. D’Incecco A, Andreozzi M, Ludovini V, Rossi E, Capodanno A, Landi L, et al. PD-1 and PD-L1 expression in molecularly selected non-small-cell lung cancer patients. *Br J Cancer* 2015 1121 [Internet]. 2014 Oct 28 [cited 2022 Nov 6];112(1):95–102. Available from: <https://www.nature.com/articles/bjc2014555>
 151. Machado I, López-Guerrero JA, Scotlandi K, Picci P, Llombart-Bosch A. Immunohistochemical analysis and prognostic significance of PD-L1, PD-1, and CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in Ewing’s sarcoma family of tumors (ESFT). *Virchows Arch* [Internet]. 2018 May 1 [cited 2022 Nov 6];472(5):815–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29445891/>

152. Darb-Esfahani S, Kunze CA, Kulbe H, Sehouli J, Wienert S, Lindner J, et al. Prognostic impact of programmed cell death-1 (PD-1) and PD-ligand 1 (PD-L1) expression in cancer cells and tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian high grade serous carcinoma. *Oncotarget* [Internet]. 2015 Nov 29 [cited 2022 Nov 6];7(2):1486–99. Available from: <https://www.oncotarget.com/article/6429/text/>
153. Sharma P, Shen Y, Wen S, Yamada S, Jungbluth AA, Gnjatic S, et al. CD8 tumor-infiltrating lymphocytes are predictive of survival in muscle-invasive urothelial carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2007 Mar 6 [cited 2022 Nov 6];104(10):3967–72. Available from: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.0611618104>
154. Chen J, He Q, Liu J, Xiao Y, Xiao C, Chen K, et al. CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes as a novel prognostic biomarker in lung sarcomatoid carcinoma, a rare subtype of lung cancer. *Cancer Manag Res* [Internet]. 2018 [cited 2022 Nov 6];10:3505. Available from: <https://pmc/articles/PMC6145683/>
155. Li F, Li C, Cai X, Xie Z, Zhou L, Cheng B, et al. The association between CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and the clinical outcome of cancer immunotherapy: A systematic review and meta-analysis. *eClinicalMedicine* [Internet]. 2021 Nov 1 [cited 2022 Nov 6];41. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S2589537021004144/fulltext>
156. Kagiali ZCU, Sanal E, Karayel Ö, Polat AN, Saatci Ö, Ersan PG, et al. Systems-level Analysis Reveals Multiple Modulators of Epithelial-mesenchymal Transition and Identifies DNAJB4 and CD81 as Novel Metastasis Inducers in Breast Cancer. *Mol Cell Proteomics* [Internet]. 2019 [cited 2020 Nov 27];18(9):1756–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31221721/>
157. Yue GGL, Gomes AJ, Saeed MEM, Tsui KY, Dawood M, Drif AI, et al. Identification of active components in *Andrographis paniculata* targeting on CD81 in esophageal cancer in vitro and in vivo. *Phytomedicine* [Internet]. 2022;102(May):154183. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2022.154183>
158. Tejera E, Rocha-Perugini V, López-Martín S, Pérez-Hernández D, Bachir AI, Horwitz AR, et al. CD81 regulates cell migration through its association with Rac GTPase. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2013 Jan 1 [cited 2022 Nov 1];24(3):261–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23264468/>
159. Martínez del Hoyo G, Ramírez-Huesca M, Levy S, Boucheix C, Rubinstein E, Minguito de la Escalera M, et al. CD81 Controls Immunity to *Listeria* Infection through Rac-Dependent Inhibition of Proinflammatory Mediator Release and Activation of Cytotoxic T Cells . *J Immunol*. 2015 Jun 15;194(12):6090–101.
160. Pantarelli C, Welch HCE. Rac-GTPases and Rac-GEFs in neutrophil adhesion, migration and recruitment. *Eur J Clin Invest* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2022 Nov 2];48 Suppl 2(Suppl Suppl 2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29682742/>

161. Domanico SZ, Pelletier AJ, Havran WL, Quaranta V. Integrin alpha 6A beta 1 induces CD81-dependent cell motility without engaging the extracellular matrix migration substrate. *Mol Biol Cell* [Internet]. 1997 [cited 2022 Nov 2];8(11):2253–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9362067/>
162. Ribatti D, Tamma R, Annese T. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: A Historical Overview. *Transl Oncol* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2022 Nov 2];13(6). Available from: [/pmc/articles/PMC7182759/](https://pmc/articles/PMC7182759/)
163. Jolly MK, Ware KE, Xu S, Gilja S, Shetler S, Yang Y, et al. E-Cadherin Represses Anchorage-Independent Growth in Sarcomas through Both Signaling and Mechanical Mechanisms. *Mol Cancer Res* [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2022 Nov 2];17(6):1391–402. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30862685/>
164. Rowland BD, Bernards R. Re-evaluating cell-cycle regulation by E2Fs. *Cell* [Internet]. 2006 Dec 1 [cited 2022 Oct 16];127(5):871–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17129771/>
165. Frolov M V., Dyson NJ. Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression. *J Cell Sci* [Internet]. 2004 May 1 [cited 2022 Oct 16];117(Pt 11):2173–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15126619/>
166. Jiang W, Yu Y, Liu J, Zhao Q, Wang J, Zhang J, et al. Downregulation of Cdc6 inhibits tumorigenesis of osteosarcoma in vivo and in vitro. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2022 Oct 16];115. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31100539/>
167. Fang Z, Lin M, Li C, Liu H, Gong C. A comprehensive review of the roles of E2F1 in colon cancer. *Am J Cancer Res* [Internet]. 2020 [cited 2022 Oct 16];10(3):757. Available from: [/pmc/articles/PMC7136928/](https://pmc/articles/PMC7136928/)
168. Häcker H, Karin M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE* [Internet]. 2006 [cited 2022 Nov 3];2006(357). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17047224/>