



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών
ΜΠΣ Βιοϊατρικές μέθοδοι και τεχνολογία στη διάγνωση



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη του ανοσολογικού προφίλ καρκινικών δειγμάτων
παχέος εντέρου με απενεργοποιημένη MLL3
μεθυλοτρανσφεράση**

POST GRADUATE THESIS

**Study of the immune profile of colorectal cancer samples with inacti-
vated MLL3 methyltransferase**

ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/NAME OF STUDENT

Χριστίνα Σόνου

Christina Sonou

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

Θεόδωρος Ράμπιας

Theodoros Rampias

ΑΙΓΑΛΕΩ/ΑΙΓΑΛΕΟ 2021



Faculty of Health and Caring Professions
Department of Biomedical Sciences
Postgraduate program:
Biomedical methods and technology in diagnosis



POST GRADUATE THESIS
**Study of the immune profile of colorectal cancer samples
with inactivated MLL3 methyltransferase**

CHRISTINA SONOU
Registration Number: 17020
christina.sonou@hotmail.com

FIRST SUPERVISOR
THEODOROS RAMPIAS

SECOND SUPERVISOR
CHRYSANTHI VOYIATZAKI

THIRD SUPERVISOR
APOSTOLOS BELOUKAS

AIGALEO 2021

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Χριστίνα Σόνου του Νέστη, με αριθμό μητρώου 17020 φοιτητήτρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Βοϊατρικές μέθοδοι και Τεχνολογία στη Διάγνωση του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της, είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα

Χριστίνα Σόνου

Ευχαριστίες

Η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Βιοϊατρικές μέθοδοι και τεχνολογία στη διάγνωση», του τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής σε συνεργασία με το Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ).

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλους εκείνους που συνέβαλαν στην ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας και κατά συνέπεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα μου, Ερευνητή Γ΄ του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, Δρ. Θεόδωρο Ράμπια. Η υποστήριξη και η διαθεσιμότητα του καθ'όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας αποτέλεσε σπουδαία βοήθεια παρέχοντας μεταξύ άλλων πολύτιμες συμβουλές και καθοδήγηση.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την ομάδα του εργαστηρίου και το επιστημονικό προσωπικό της Μονάδας Ιστοχημείας, της Μονάδας Βιολογικής Απεικόνισης και της Μονάδας Ζωϊκών Προτύπων του ΙΙΒΕΑΑ για τις τεχνικές γνώσεις που μου παρείχαν.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την τεχνικό του εργαστηρίου, Λορένα Χοτζαλάρι για τη στήριξη, την έμπρακτη βοήθεια και την καθοριστική συμβολή της στην ολοκλήρωση της εργασίας.

Τέλος, νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου για την αγάπη, την κατανόηση και την υποστήριξη τους.

Αφιέρωσεις

Στην οικογένεια μου

Στους φίλους μου

Περίληψη

Εισαγωγή: Ο καρκίνος παχέος εντέρου αποτελεί έναν από τους πιο συχνά εμφανιζόμενους καρκίνους παγκοσμίως. Μια υποσχόμενη σύγχρονη θεραπευτική προσέγγιση για την αντιμετώπιση του αποτελεί η ανοσοθεραπεία. Έχει δειχθεί ότι τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που διηθούν όγκους παχέος εντέρου διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία αντιμετώπισης του και ότι ο βαθμός της διήθησης έχει προγνωστική αξία για την εξέλιξη της νόσου. Υπάρχουν όμως παράγοντες που αποτρέπουν τη διήθηση του όγκου από κύτταρα του ανοσοποιητικού. Ένας από αυτούς είναι ο μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας β (transforming growth factor β, TGFβ) όταν βρίσκεται ενεργοποιημένος στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Συγκεκριμένα, δεδομένα υποδεικνύουν ότι το γονίδιο KMT2C (MLL3) υποεκφράζεται σε διαφορετικές νεοπλασίες, συμπεριλαμβανομένου του ορθοκολικού αδενοκαρκινώματος. Με δεδομένο ότι ο επιγενετικός αυτός τροποποιητής εμπλέκεται στη μεταγραφική ρύθμιση πολλών γονιδίων στη χρωματίνη, η γονιδιακή αποσιώπηση του οδηγεί σε υποέκφραση πολλών γονιδίων-στόχων του όπως είναι το ITGB6. Το γονίδιο ITGB6 κωδικοποιεί την ανβ6 πρωτεΐνη, η οποία είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση του μεταμορφωτικού αυξητικού παράγοντα β (transforming growth factor β, TGFβ). Η αποσιώπηση λοιπόν της MLL3 μεθυλοτρασφεράσης οδηγεί στην υποέκφραση του γονιδίου ITGB6 και επηρεάζει την παραγωγή της ιντεγκρίνης ανβ6 και κατ' επέκταση την ενεργοποίηση του TGFβ και τη διήθηση καρκινικών όγκων από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.

Σκοπός: Ο εντοπισμός διαφορών στο πρότυπο διήθησης από CD8α κύτταρα του ανοσοποιητικού σε καρκινικά δείγματα παχέος εντέρου με απενεργοποιημένη MLL3 μεθυλοτρασφεράση (#1500) σε σχέση με καρκινικά δείγματα ελέγχου όπου η MLL3 μεθυλοτρασφεράση εκφράζεται φυσιολογικά.

Μέθοδος: Σε μια ομάδα από BALB/c μύες ενέθηκαν CT26 κύτταρα (control) και σε μία δεύτερη CT26 κύτταρα με αποσιώπηση της MLL3 μεθυλοτρασφεράσης (#1500). Στους όγκους που αναπτύχθηκαν και στις δύο ομάδες πραγματοποιήθηκαν λήψεις τομών παραφίνης και εφαρμόστηκε πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας για τον εντοπισμό των CD8α κυττάρων. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μικροσκοπική ανάλυση, ψηφιακή απεικόνιση και τέλος στατιστική ανάλυση.

Αποτελέσματα: Παρατηρήσαμε στατιστικά σημαντική αύξηση του ποσοστού των CD8a ογκοδιηθητικών λεμφοκυττάρων σε καρκινικά δείγματα με απενεργοποίηση της MLL3 μεθυλτρανσφεράσης.

Συμπεράσματα: Φαίνεται ότι στα καρκινικά κύτταρα που έχει πραγματοποιηθεί απενεργοποίηση της MLL3 μεθυλτρανσφεράσης, αυτή συνοδεύεται από αναστολή του μονοπατιού ενεργοποίησης του TGFβ και αύξηση του ποσοστού διήθησης από CD8a λεμφοκύτταρα.

Λέξεις κλειδιά: επιγενετική ρύθμιση, ανοσοθεραπεία, KMT2C, TGFβ

Abstract

Introduction: Colorectal cancer is one of the most commonly diagnosed cancers worldwide. A promising modern therapeutic approach regarding colon cancer is immunotherapy. It has been shown that cells of the immune system that infiltrate colon tumors play an important role in the treating process and that the degree of infiltration has prognostic value. However, there are factors that prevent tumor infiltration by immune cells. One of these factors is transforming growth factor β (TGF β) when is found activated in the tumor microenvironment. Data suggest that KMT2C gene (MLL3) is underexpressed in various cancers, including colorectal adenocarcinoma. Because this epigenetic modifier is involved in the transcriptional regulation of many genes in chromatin, its gene silencing leads to underexpression of many of its target genes such as ITGB6. ITGB6 gene encodes $\alpha\beta6$ protein, which is responsible for activating transforming growth factor β (TGF β). Silencing of MLL3 methyltransferase leads to underexpression of ITGB6 gene and affects the production of $\alpha\beta6$ integrin and consequently the activation of TGF β and the infiltration of tumors by cells of the immune system.

Purpose: Detection of differences in CD8a immune cells infiltration pattern in colorectal cancer tumors with inactivated MLL3 methyltransferase (#1500) compared to control tumor samples where MLL3 methyltransferase is normally expressed.

Method: CT26 cells (control) and MLL3 methyltransferase silenced CT26 cells (#1500) were injected in a group of BALB/c mice respectively. From the tumors developed in both groups paraffin slides were obtained and immunohistochemistry protocol was applied for the detection of CD8a cells. Microscopic analysis, digital imaging and statistical analysis were performed.

Results: We observed a statistically significant increase of CD8a tumor infiltrating lymphocytes rate in tumors with inactivated MLL3 methyltransferase.

Discussion: It appears that MLL3 methyltransferase inactivation is accompanied by inhibition of the TGF β activation pathway and increase of the percentage of CD8a tumor infiltrating lymphocytes.

Key words: epigenetic regulation, immunotherapy, KMT2C, TGF β

Περιεχόμενα

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας	iv
Ευχαριστίες.....	vi
Αφιερώσεις.....	viii
Περίληψη.....	ix
Abstract	xi
Συνοτομογραφίες	xv
Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή	2
Καρκίνος παχέος εντέρου	2
Ανάπτυξη καρκίνου παχέος εντέρου	2
Επιδημιολογία	3
Παράγοντες κινδύνου	4
Σταδιοποίηση του καρκίνου παχέος εντέρου με βάση το σύστημα ταξινόμησης TNM	4
Σημεία-Συμπτώματα	5
Θεραπεία	5
Ανοσοθεραπεία	5
Ο βαθμός διήθησης του όγκου από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος αποτελεί προγνωστικό δείκτη στην ανοσοθεραπεία	6
Μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας β (TGFβ)	7
Μοριακή δομή του TGFβ.....	7
Ενεργοποίηση των υποδοχέων TGFβ	8
Η οικογένεια των Smad πρωτεϊνών.....	9
Ο βιολογικός ρόλος του TGFβ	10
Ογκοκατασταλτική δράση του TGFβ	11
Δράση του TGFβ στις μεταστάσεις	11
Δράση στην αγγειογένεση	11
Ανοσοκατασταλτική δράση του TGFβ	12
Ο ρόλος των ιντεγκρινών στην ενεργοποίηση του λανθάνοντος συμπλόκου TGFβ	13
Ιντεγκρινες	13
Ανβ6 Ιντεγκρίνη	14
Ενεργοποίηση του TGFβ από την ιντεγκρίνη ανβ6.....	15

Κεφάλαιο 2. Σκοπός	17
Κεφάλαιο 3. Μέθοδος.....	17
Κυτταρική σειρά CT26.....	17
Κυτταροκαλλιέργειες.....	18
Υποδερμικές ενέσεις CT26 κυττάρων σε μύες – Αλλομεταμόσχευση (Xenografts)	19
Μονιμοποίηση ιστοτεμαχίων.....	20
Λήψη τομών παραφίνης.....	20
Πρωτόκολλο Ανοσοϊστοχημείας.....	20
Ψηφιακή απεικόνιση - επεξεργασία	22
Στατιστική ανάλυση.....	22
Κεφάλαιο 4. Αποτελέσματα	23
Ψηφιακή απεικόνιση.....	23
Αποτελέσματα καταμέτρησης CD8a ογκοδιηθητικών λεμφοκυττάρων	25
Έλεγχος στατιστικής σημαντικότητας μετρήσεων	26
Κεφάλαιο 5. Συμπεράσματα	27
Αναφορές	28

Συντομογραφίες

Αγγλική ορολογία

Ελληνική ορολογία

MLL	Mixed lineage leukemia	Μικτής γενεαλογίας λευχαιμία
TGFβ	Transforming growth factor beta	Μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας β
APC	Adenomatous polyposis coli	Αδενοματώδης πολυποδίαση παχέος εντέρου
TME	Tumor microenvironment	Μικροπεριβάλλον όγκου
TILs	Tumor-infiltrating lymphocytes	Ογκοδιηθητικά λεμφοκύτταρα
NK	Natural killers	Φυσικοί φονείς
MMPs	Matrix metalloproteinases	Μεταλλοπρωτεϊνάσες εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας
IL-10	Interleukin 10	Ιντερλευκίνη 10
ECM	Extracellular matrix	Εξωκυττάρια θεμέλια ουσία
VEGF	Vascular endothelial growth factor	Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας
IDO	Indolamine 2,3 dioxygenase	Ινδολαμίνη 2,3 διοξυγενάση
SGF	Sarcoma growth factor	Αναπτυξιακός παράγοντας σαρκώματος
LAP	Latency associated peptide	Λανθάνον σχετιζόμενο πεπτίδιο
Ser/Thr	Serine/Threonine	Σερίνη/Θρεονίνη
Gly/Ser	Glycin/Serine	Γλυκίνη/Σερίνη
CTGF	Connective tissue growth factor	Αυξητικός παράγοντας συνδετικού ιστού
SLC	Small latent complex	Μικρό λανθάνον σύμπλοκο
LLC	Large latent complex	Μεγάλο λανθάνον σύμπλοκο
LTBF	Latent TGFβ binding proteins	Πρωτεΐνες δέσμησης λανθάνοντος TGFβ
NMU	N-nitroso-N-methylurethane	N-νιτροζο-N-μέθυλο-ουρεθάνη
FBS	Fetal bovine serum	Βόειος εμβρυϊκός ορός
Pen-Strep	Penicillin-Streptomycin	Πενικιλίνη-Στρεπτομυκίνη
PBS	Phosphate buffered saline	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος
SPF	Specific pathogen free	Ελεύθερο ειδικών παθογόνων
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations	Ευρωπαϊκή Ομοσπονδία Εταιρειών Ζώων Εργαστηρίου

Πρόλογος

Έχει αποδειχθεί ότι διαταραχές στον επιγενετικό μηχανισμό σχετίζονται με την καρκινογένεση και την εξέλιξη της νόσου. Πολλοί επιγενετικοί τροποποιητές όπως οι MLL πρωτεΐνες, που συχνά εντοπίζονται γενετικά τροποποιημένες στον καρκίνο ελέγχουν την έκφραση γονιδίων και κατ'επέκταση παράγοντες που ρυθμίζουν τη διήθηση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος σε συμπαγείς όγκους. Ένας από τους παράγοντες αυτούς είναι ο μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας β (transforming growth factor β, TGFβ). Έχει δειχθεί ότι όταν ο TGFβ βρίσκεται ενεργοποιημένος στο μικροπεριβάλλον του όγκου, αποτρέπει τη διήθηση από κύτταρα του ανοσοποιητικού. Μελέτες δείχνουν ότι ο βαθμός της διήθησης παίζει καθοριστικό ρόλο στην αντιμετώπιση και την εξέλιξη της νόσου. Θελήσαμε λοιπόν να εξετάσουμε την επίδραση του TGFβ στο πρότυπο διήθησης από CD8a λεμφοκύτταρα σε δύο ομάδες καρκινικών δειγμάτων παχέος εντέρου. Στη μια ομάδα έχει πραγματοποιηθεί αποσιώπηση της MLL3 μεθυλοτρανσφεράσης, με σκοπό την αναστολή του μονοπατιού ενεργοποίησης του TGFβ, ενώ στην δεύτερη ομάδα η MLL3 μεθυλοτρανσφεράση εκφράζεται φυσιολογικά.

Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή

Καρκίνος παχέος εντέρου

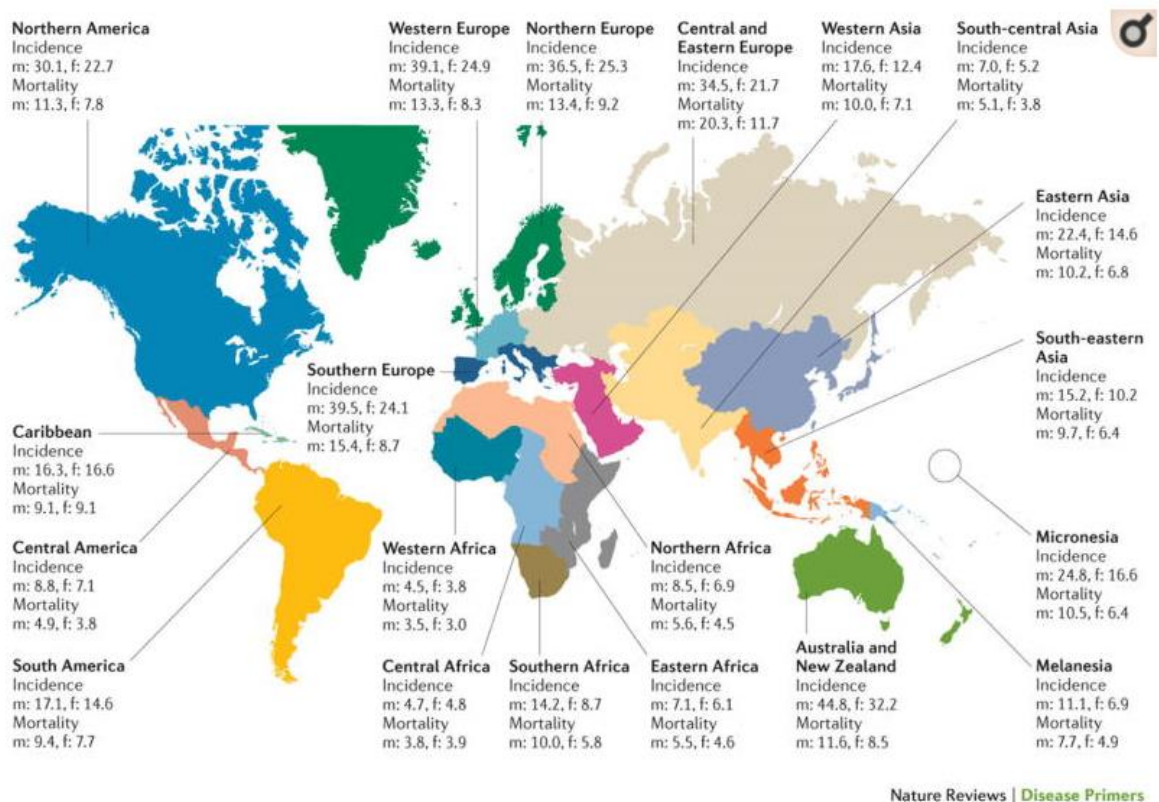
Ο όρος καρκίνος παχέος εντέρου αναφέρεται σε έναν αργά αναπτυσσόμενο καρκίνο που ξεκινά με την υπερπλασία ιστού ή την ανάπτυξη όγκου στην εσωτερική επιφάνεια του ορθού ή του παχέος εντέρου. Εάν αυτή η ανώμαλη ανάπτυξη, γνωστή ως πολύποδας, τελικά γίνει καρκινική, μπορεί να σχηματίσει όγκο στο τοίχωμα του ορθού ή του παχέος εντέρου και στη συνέχεια να αναπτύξει αιμοφόρα ή λεμφικά αγγεία, αυξάνοντας την πιθανότητα μετάστασης σε άλλες ανατομικές θέσεις. Από τους καρκίνους που ξεκινούν στην περιοχή του παχέος εντέρου, η συντριπτική πλειονότητα (άνω του 95%) είναι αδenoκαρκινώματα. Άλλοι λιγότερο συνηθισμένοι καρκίνοι του παχέος εντέρου περιλαμβάνουν καρκινοειδείς όγκους, γαστρεντερικούς στρωματικούς όγκους (που σχηματίζονται σε κύτταρα του παχέος εντέρου, γνωστά ως διάμεσα κύτταρα Cajal), λεμφώματα (καρκίνοι του ανοσοποιητικού συστήματος που σχηματίζονται στο παχύ έντερο ή ορθό) και σαρκώματα (που συνήθως ξεκινούν στα αιμοφόρα αγγεία αλλά ενίοτε σχηματίζονται στα ορθοκολικά τοιχώματα) (1).

Ανάπτυξη καρκίνου παχέος εντέρου

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, στις περισσότερες περιπτώσεις ο καρκίνος παχέος εντέρου προκύπτει από δυσπλαστικούς αδενωματώδεις πολύποδες. Αυτό συμβαίνει σε μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων που περιλαμβάνει την απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων και την ταυτόχρονη ενεργοποίηση ογκογονιδίων. Αυτό παρέχει ένα επιλεκτικό δυναμικό ανάπτυξης στα επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου και οδηγεί στο μετασχηματισμό του φυσιολογικού επιθηλίου σε αδενωματώδη πολύποδα και τελικά σε καρκίνο παχέος εντέρου. Οι γαμετικές (κληρονομικές) μεταλλάξεις ενοχοποιούνται για τα κληρονομικά σύνδρομα καρκίνου παχέος εντέρου, ενώ οι σποραδικοί καρκίνοι προκύπτουν από μία σταδιακή συσσώρευση σωματικών γενετικών μεταλλάξεων. Μια μόνο γαμετική μετάλλαξη στο APC (Adenomatous Polyposis Coli) ογκοκατασταλτικό γονίδιο είναι υπεύθυνη για το κυρίαρχο κληρονομικό σύνδρομο, την οικογενή αδενωματώδη πολυποδίαση. Χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη εκατοντάδων έως χιλιάδων αδενωματωδών πολυπόδων στο παχύ έντερο και την ανάπτυξη καρκίνου παχέος εντέρου και άλλων καρκίνων κατά την τρίτη και τέταρτη δεκαετία της ζωής. Η κλινική έκφραση της νόσου παρατηρείται όταν η κληρονομική μετάλλαξη ενός APC αλληλίου ακολουθηθεί από μετάλλαξη ή διαγραφή δεύτερου αλληλόμορφου γονιδίου (2).

Επιδημιολογία

Ο καρκίνος παχέος εντέρου είναι ένας από τους πιο συχνά διαγνωσμένους καρκίνους παγκοσμίως. Μεταξύ των ανδρών με καρκίνο, ο καρκίνος παχέος εντέρου εμφανίζεται τρίτος σε συχνότητα (746.000 περιπτώσεις, 10% του συνολικού ανδρικού πληθυσμού), μετά τον καρκίνο του πνεύμονα και του προστάτη. Μεταξύ των γυναικών με καρκίνο, ο καρκίνος παχέος εντέρου καταλαμβάνει τη δεύτερη θέση στην επικράτηση (614.000 περιπτώσεις, 9.2% του συνολικού πληθυσμού των γυναικών), μετά τον καρκίνο του μαστού. Η συχνότητα εμφάνισης και θνησιμότητας παρουσιάζει μεγάλες γεωγραφικές παραλλαγές σε ολόκληρο τον κόσμο (3). Στις δυτικές χώρες το ποσοστό εμφάνισης είναι 10 φορές υψηλότερο από αυτό των αναπτυσσόμενων χωρών (4).



Εικόνα 1. Ποσοστά προσβολής και θνησιμότητας σε άνδρες (m) και γυναίκες (f) (ανά 100.000 άτομα) σε όλες τις γεωγραφικές ζώνες

Τα ποσοστά είναι σταθερά υψηλότερα στους άνδρες από ότι στις γυναίκες και ποικίλουν σημαντικά μεταξύ των περιοχών. Τα υψηλότερα ποσοστά εμφανίζονται στην Αυστραλία και τη Νέα Ζηλανδία, την Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική (4).

Παράγοντες κινδύνου

Αυτή η γεωγραφική διακύμανση δείχνει ότι οι περιβαλλοντικοί παράγοντες (π.χ. η κατανάλωση κρέατος, το αλκοόλ και το κάπνισμα) μπορεί να διαδραματίσουν βασικό ρόλο στην αιτιολογία του καρκίνου παχέος εντέρου. Οι αντίστροφοι συσχετισμοί περιλαμβάνουν την κατανάλωση λαχανικών και τη σωματική δραστηριότητα. Άλλοι παράγοντες κινδύνου είναι η ηλικία, το οικογενειακό προσωπικό ιστορικό καρκίνου (π.χ. κόλον, ορθού, ωθηκών και ενδομητρίου), οι χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις του εντέρου και το ιστορικό πολυπόδων στο κόλον (5).

Σταδιοποίηση του καρκίνου παχέος εντέρου με βάση το σύστημα ταξινόμησης TNM

Πίνακας 1. Σταδιοποίηση του καρκίνου παχέος εντέρου (5)

Στάδιο	Ορισμός
0	Καρκίνωμα in situ: Ενδοεπιθηλιακός όγκος ή όγκος που διηθεί το χόριο του βλεννογόνου (lamina propria mucosae)
1	Ο όγκος διηθεί την υποβλεννογόνιο (T1) ή μυϊκή στιβάδα (T2)
2A	Ο όγκος διηθεί τη μυϊκή στιβάδα (T3)
2B	Ο όγκος διηθεί το σπλαχνικό περιτόναιο (T4a)
2C	Ο όγκος διηθεί άλλα παρακείμενα όργανα ή δομές (T4b)
3A	T1 ή T2 όγκος με παρουσία μετάστασης σε 1-3 επιχώριους λεμφαδένες (N1)
	T1 όγκος με παρουσία μετάστασης σε 4-6 επιχώριους λεμφαδένες (N2a)
3B	T1 ή T2 όγκος με τη παρουσία μετάστασης σε 7 ή περισσότερους επιχώριους λεμφαδένες (N2b)
	T2 ή T3 όγκος με παρουσία N2a μετάστασης
	T3 ή T4a όγκος με παρουσία N1 μετάστασης
3C	T3 ή T4 όγκος με παρουσία N2b μετάστασης
	T4 όγκος με παρουσία N2a μετάστασης
	T4b όγκος με παρουσία N1 ή N2 μετάστασης
4A	Παρουσία μετάστασης περιορισμένης σε ένα όργανο χωρίς περιτοναϊκή μετάσταση
4B	Παρουσία μετάστασης σε περισσότερα από ένα όργανα
4C	Παρουσία μετάστασης στο περιτόναιο με ή χωρίς μετάσταση σε άλλα όργανα

Σημεία-Συμπτώματα

Αυτά μπορεί να περιλαμβάνουν αιμορραγία από το ορθό ή αίμα στα κόπρανα, αλλαγή στις φυσιολογικές εντερικές συνήθειες του ασθενούς διάρκειας τριών εβδομάδων και άνω, πόνο στην κοιλιακή χώρα, ανεξήγητη απώλεια βάρους και αναιμία (6).

Θεραπεία

Η επιλογή θεραπείας για τον καρκίνο του παχέος εντέρου μπορεί να εξαρτηθεί από διάφορους παράγοντες, όπως η κατάσταση της υγείας του ασθενούς, το μέγεθος του όγκου και η θέση του. Οι τυπικές συμβατικές θεραπείες για τον καρκίνο παχέος εντέρου περιλαμβάνουν τη χειρουργική επέμβαση, τη χημειοθεραπεία και την ακτινοθεραπεία, οι οποίες μπορούν να εφαρμοστούν και σε συνδυασμό. Η χειρουργική επέμβαση είναι η πιο κοινή επιλογή θεραπείας και ο τύπος της χειρουργικής επέμβασης που χρησιμοποιείται εξαρτάται από μεταβλητές όπως η θέση του όγκου, η ύπαρξη μετάστασης και η έκταση της. Για παράδειγμα στην περίπτωση ύπαρξης πολύποδα, μπορεί να πραγματοποιηθεί η απομάκρυνση του κατά τη διάρκεια κολonosκόπησης. Ωστόσο, εάν έχει προσβληθεί μια μεγαλύτερη περιοχή μπορεί να είναι απαραίτητη η εκτομή του εντέρου. Η εκτομή μπορεί να περιλαμβάνει μερική ή ολική αφαίρεση του παχέος εντέρου καθώς και άλλων γειτονικών οργάνων (όπως στομάχι ή κοιλιακό τοίχωμα) (1,7). Ωστόσο, συχνά δεν είναι δυνατή η πλήρης αφαίρεση όλων των καρκινικών κυττάρων. Περίπου το 66% των ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο σταδίου II και το 61% σταδίου III υποβλήθηκαν σε περαιτέρω θεραπείες με επικουρική χημειοθεραπεία ή/και ακτινοθεραπεία. Αυτές οι θεραπείες προκαλούν πολλές παρενέργειες λόγω της μη ειδικότητας και της κυτταροτοξικότητας προς κάθε κύτταρο που αναπτύσσεται και διαιρείται. Επομένως είναι ζωτικής σημασίας η ύπαρξη περισσότερων αποτελεσματικών θεραπειών για τους ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου. Στην κατεύθυνση αυτή, η ανοσοθεραπεία αποτελεί μια σύγχρονη υποσχόμενη θεραπεία (7).

Ανοσοθεραπεία

Η ανοσοθεραπεία σε σύγκριση με τις τυπικές θεραπείες, χρησιμοποιεί το ανοσοποιητικό σύστημα των ασθενών για την καταπολέμηση των καρκινικών κυττάρων. Ήταν γνωστό πολλά χρόνια πριν ότι οι έμφυτες και οι προσαρμοστικές αποκρίσεις του ανοσοποιητικού συστήματος είναι ικανές να καταστρέψουν τα καρκινικά κύτταρα και ενδεχομένως να εξαλείψουν τον όγκο. Με τη χρήση ανοσοθεραπείας έχουν αναφερθεί πολλές επιτυχίες ειδικά σε αιματολογικές κακοήθειες και συμπαγείς όγκους. Η ανοσοθεραπεία στον

καρκίνο ξεπερνά το ζήτημα της ειδικότητας που είναι το μεγαλύτερο πρόβλημα στη χημειοθεραπεία και την ακτινοθεραπεία. Στοχεύει ειδικά στα καρκινικά αντιγόνα στα κακοήθη κύτταρα, προειδοποιεί το ανοσοποιητικό σύστημα για την παρουσία ξένων ουσιών και στρέφεται εναντίον του όγκου μέσω των ανοσολογικών αποκρίσεων. Τα φυσιολογικά κύτταρα χωρίς καρκινικά αντιγόνα δεν επηρεάζονται και οι ασθενείς που ανταποκρίνονται καλά στην ανοσοθεραπεία έχουν καλύτερη πρόγνωση και καλύτερη ποιότητα ζωής (7).

Ο βαθμός διήθησης του όγκου από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος αποτελεί προγνωστικό δείκτη στην ανοσοθεραπεία. Έχει αποδειχθεί ότι το μικροπεριβάλλον του όγκου (tumor microenvironment, TME) καθορίζει την ανάπτυξη και την εξέλιξη του και ότι η παρουσία ογκοδιηθητικών λεμφοκυττάρων (tumor-infiltrating lymphocytes, TILs) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία αντιμετώπισης των όγκων κατά την ανοσοθεραπεία (8). Στοιχεία δείχνουν ότι τα TILs σχετίζονται με την ανάπτυξη και την εξέλιξη του καρκίνου και έχουν προγνωστική αξία στην επιβίωση των ασθενών. Αποτελούν λευκά αιμοσφαίρια όπως για παράδειγμα T-κύτταρα, B-κύτταρα, μακροφάγα ή κύτταρα φυσικούς φονείς (NK). Πολλές μελέτες έχουν δείξει την επίδραση του ανοσολογικού μικροπεριβάλλοντος του όγκου στην ανάπτυξη του καρκίνου παχέος εντέρου, υποδηλώνοντας ότι η διήθηση ανοσοκυττάρων μπορεί να είναι μια πολλά υποσχόμενη πηγή νέων διαγνωστικών και προγνωστικών βιοδεικτών (9).

Το μικροπεριβάλλον του όγκου αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της ανοσοαπόκρισης. Τα συστατικά του μικροπεριβάλλοντος του όγκου περιλαμβάνουν ινοβλάστες και μυοϊνοβλάστες, νευροενδοκρινικά κύτταρα, κύτταρα του ανοσοποιητικού και φλεγμονώδη κύτταρα, αίμα και δίκτυα λεμφικών αγγείων και εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (extracellular matrix, ECM). Περιλαμβάνει ένα πολύπλοκο πλέγμα μη κακοήθων κυττάρων, δομικών συστατικών και μορίων που περιβάλλουν τα καρκινικά κύτταρα. Τα μη κακοήθη κύτταρα συμπεριλαμβανομένων των ενδοθηλιακών κυττάρων, των περικυττάρων, των ινοβλαστών και των ανοσοκυττάρων, μαζί με την περιβάλλουσα εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, περιλαμβάνουν το υποστηρικτικό στρώμα του όγκου και ρυθμίζουν το μικροπεριβάλλον του. Τόσο τα κύτταρα του όγκου όσο και τα στρωματικά κύτταρα εκκρίνουν συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας όπως ινονεκτίνη, κολλαγόνα, πρωτεογλυκάνες, γλυκοπρωτεΐνες, αυξητικούς παράγοντες και

μεταλλοπρωτεϊνάσες εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (matrix metalloproteinases, MMPs) (10).

Αλλαγές στο φυσιολογικό TME επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και την ανάπτυξη του όγκου. Στις περιπτώσεις αυτές, το TME έχει προωθητική δράση όσον αφορά την ανάπτυξη του όγκου και τη μετάσταση, συσσωρεύοντας για παράδειγμα MMPs και ενεργοποιώντας αυξητικούς παράγοντες που διευκολύνουν την αυτοκρινή και παρακρινή σηματοδότηση (10).

Ανάμεσα στους παράγοντες που παίζουν ρόλο στον αποκλεισμό των TILs από τον όγκο είναι η έκφραση της β-κατενίνης, η ιντερλευκίνη 10 (IL-10), ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF), η ινδολαμίνη 2,3 διοξυγενάση (IDO) και ο μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας β (Transforming Growth Factor β, TGFβ) (11,12).

Μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας β (TGFβ)

Ο TGFβ ανήκει σε μια ομάδα κυτοκινών που συλλογικά ονομάζεται «TGFβ υπερικογένεια». Τα μέλη της ρυθμίζουν λειτουργίες όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η απόπτωση κυττάρων, η εμβρυϊκή ανάπτυξη, η ρύθμιση ανοσολογικών μηχανισμών (13,14) καθώς επίσης παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην ομοιοστάση και αναγέννηση των ιστών και στην καρκινογένεση (15).

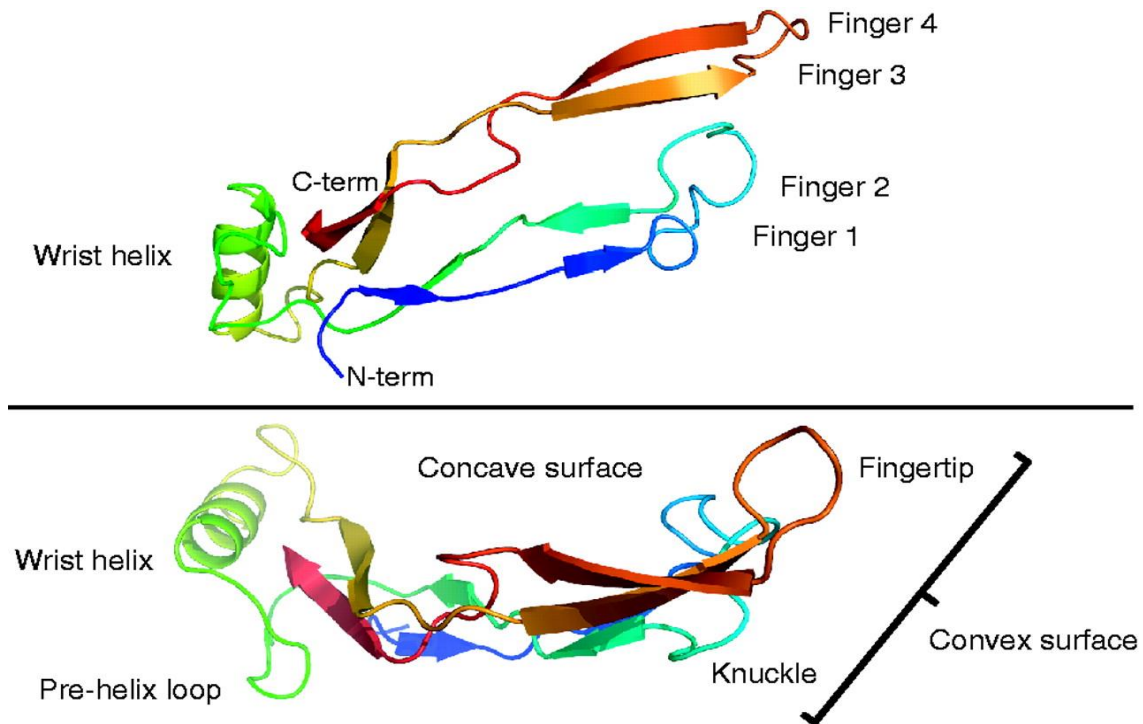
Ο TGFβ ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά από τους Todaro και De Larco το 1978 ως ένας παράγοντας εκκρινόμενος από κύτταρα ινοβλαστών ποντικού που ήταν μετασηματισμένα με τον ιό του σαρκώματος και ήταν ικανά να επάγουν τη δημιουργία αποικιών σε ρευστό άγαρ. Ο παράγοντας αυτός ονομάστηκε αρχικά Αναπτυξιακός Παράγοντας Σαρκώματος (Sarcoma Growth Factor, SFG) και έπειτα δείχθηκε ότι αποτελείται από δυο διαφορετικούς παράγοντες, τον TGF-α και β (13,14).

Μοριακή δομή του TGFβ

Ο TGFβ παράγεται ως μια μεγάλη πρόδρομη πρωτεΐνη που βρίσκεται σε ανενεργό μορφή. Αποτελείται από ένα N-τελικό άκρο, από μία κεντρική περιοχή (Latency Associated Peptide, LAP) και ένα C-τελικό άκρο (16).

Η γενική μορφή του μονομερούς TGFβ περιλαμβάνει δύο ζεύγη αντιπαράλληλων β-κλώνων που σχηματίζουν μια επίπεδη επιφάνεια και εκτείνονται μακριά από μια μακριά α-έλικα. Μια σταθερή τρισδιάστατη μορφή, γνωστή ως «cysteine knot» σχηματίζεται στον

πυρήνα ενός από τους δισουλφιδικούς δεσμούς που ταξιδεύουν μέσω ενός δακτυλίου, που σχηματίζεται από άλλους δύο δισουλφιδικούς δεσμούς. Αυτό το μονομερές περιγράφεται ως ένα χέρι με τέσσερα δάκτυλα, όπου κάθε β-κλώνος παρομοιάζεται με ένα δάκτυλο. Τα δάκτυλα 1 και 2 είναι αντιπαράλληλα στο N-τελικό άκρο ενώ τα δάκτυλα 3 και 4 είναι αντιπαράλληλα στο C-τελικό άκρο (17).



Εικόνα 2. Ένα τυπικό μονομερές TGFβ

Ένα τυπικό μονομερές TGFβ αποτελείται από ένα μοτίβο που ονομάζεται «cysteine knot» με δύο ζεύγη αντιπαράλληλων β-κλώνων (δακτύλων) που εκτείνονται από μια α-έλικα (περιοχή «καρπού»). Οι β-κλώνοι καμπυλώνουν για να σχηματίσουν μία κοίλη και μια κυρτή επιφάνεια ώστε να είναι δυνατή η αλληλεπίδραση με υποδοχείς (17).

Ενεργοποίηση των υποδοχέων TGFβ

Τα μέλη της οικογένειας TGFβ συνδέονται με τα κύτταρα-στόχο μέσω ειδικών υποδοχέων οι οποίοι διακρίνονται σε τρεις τύπους: τύπου I (TGFβRI), τύπου II (TGFβRII) και τύπου III (TGFβRIII). Οι υποδοχείς αυτοί είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες στην επιφάνεια των κυττάρων, οι οποίοι παρουσιάζουν ενεργότητα κινάσης σερίνης/θρεονίνης (Ser/Thr). Ο προσδέτης TGFβ προσδένεται στον υποδοχέα TGFβRII και αναγνωρίζεται από τον TGFβRI. Ο TGFβRI συνδέεται στο σύμπλοκο TGFβ-TGFβRII, δημιουργώντας ένα ετερο-ολιγομερές, όπου ο TGFβRII έχοντας δράση κινάσης Ser/Thr φωσφορυλιώνει τον TGFβRI. Η φωσφορυλίωση του υποδοχέα TGFβRI γίνεται σε μία περιοχή που βρίσκεται λίγο κάτω από την πλασματική μεμβράνη και είναι πλούσια σε γλυκίνη και σερίνη (Gly/Ser), γνωστή

ως GS-box. Η φωσφορυλίωση αυτή δημιουργεί θέσεις πρόσδεσης για σηματοδοτικά μόρια τελεστές. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα TGFβ συνοδεύεται από πολλαπλές φωσφορυλίωσεις στις κυτταροπλασματικές περιοχές του υποδοχέα. Ο ενεργοποιημένος υποδοχέας στη συνέχεια μεταφέρει το μήνυμα στον πυρήνα μέσω των μεταγραφικών παραγόντων Smads (Smad2, Smad3) (18–20).

Η οικογένεια των Smad πρωτεϊνών

Τα μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών Smad αρχικά ταυτοποιήθηκαν σαν προϊόντα από τα γονίδια Mad (Mothers against decapendaplegic) της *Drosophila melanogaster* και Sma (Small body size) του *Caenorhabditis elegans* (21). Έχουν ταυτοποιηθεί οκτώ διαφορετικές πρωτεΐνες Smad (Sma Mad Homology Domain) στα θηλαστικά, οι οποίες ενεργοποιούνται από μέλη της υπεροικογένειας του TGFβ. Οι Smad πρωτεΐνες εκφράζονται ευρέως καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης και σε όλους τους ανήλικους ιστούς. Οι Smad πρωτεΐνες ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες: 1) αυτές που ενεργοποιούνται από υποδοχείς (R-Smads, Smad1, Smad2, Smad3, Smad5, Smad8) 2) τις κοινές μεταγωγικές πρωτεΐνες (Co-Smads, Smad4) που σχηματίζουν ολιγομερή με τις ενεργοποιημένες R-Smads και 3) τις Smad που έχουν ανασταλτική δράση (I-Smads, Smad6 και Smad7) (22).

Οι υποδοχείς TGFβ και οι υποδοχείς ακτιβίνης φωσφορυλιώνουν τις πρωτεΐνες Smad2 και Smad3, ενώ οι υποδοχείς BMP φωσφορυλιώνουν τις πρωτεΐνες Smad1, Smad5 και Smad8. Όταν μία από τις παραπάνω πρωτεΐνες Smad φωσφορυλιωθεί, αποδεσμεύεται από τον υποδοχέα τύπου I και συνδέεται με την πρωτεΐνη Smad4 σχηματίζοντας ένα σύμπλεγμα το οποίο μεταφέρεται στον πυρήνα του κυττάρου. Εκεί, το σύμπλεγμα των Smad συνδέεται σε ειδικές θέσεις του DNA και κάτω από την επίδραση άλλων ρυθμιστικών πρωτεϊνών, ενεργοποιεί συγκεκριμένα γονίδια-στόχους επάγοντας τη μεταγραφή του DNA (21).

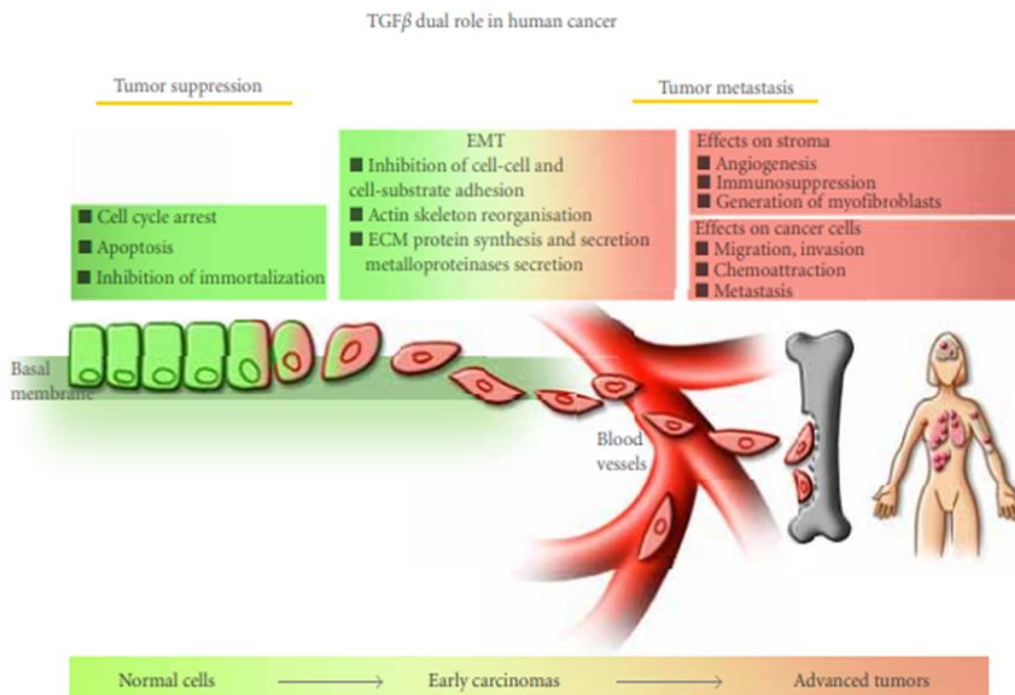
Υπάρχουν πρωτεΐνες Smad που δρουν ανασταλτικά. Συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες Smad6 και Smad7 συνδέονται με τον υποδοχέα τύπου I χωρίς να φωσφορυλιωθούν. Έτσι, εμποδίζουν τα άλλα μόρια Smad να ενωθούν μαζί του. Το αποτέλεσμα της αναστολής αυτής είναι να μπλοκάρει η περαιτέρω μεταβίβαση σήματος στον πυρήνα. Μόλις το φωσφορυλιωμένο σύμπλεγμα των Smads μεταφερθεί στον πυρήνα αλληλεπιδρά με ένα πλήθος ποικίλων μεταγραφικών παραγόντων ρυθμίζοντας την έκφραση των γονιδίων-

στόχων. Το γεγονός αυτό πιθανόν εξηγεί την πληθώρα των διαφορετικών λειτουργικών αποκρίσεων της οικογένειας TGFβ (21).

Οποιαδήποτε λοιπόν διαταραχή στη μεταβίβαση του σήματος διαμέσου της οδού TGFβ μέχρι τον πυρήνα, θα έχει ως αποτέλεσμα διαταραχή της μεταγραφής των γενετικών πληροφοριών και επομένως τη διαταραχή των ανάλογων κυτταρικών διεργασιών, όπως είναι για παράδειγμα ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η ανάπτυξη και η απόπτωση (21).

Ο βιολογικός ρόλος του TGFβ

Ο TGFβ παρουσιάζει ογκοκατασταλτική αλλά και ογκογονική συμπεριφορά. Αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επάγει την απόπτωση σε διάφορους κυτταρικούς τύπους εκδηλώνοντας έτσι την ογκοκατασταλτική του δράση. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης καρκίνου και κατά τη δημιουργία μεταστάσεων, τα καρκινικά κύτταρα γίνονται ανθεκτικά στην κυτταροστατική δράση του TGFβ, ενώ στην πλειονότητα τους υπερεκφράζουν TGFβ, ο οποίος δρα προς όφελος της ανάπτυξης και εξέλιξης των όγκων, μέσω αυτοκρινών και παρακρινών δράσεων, όπως είναι η επιθηλιομεσεγχυματική μετατροπή, η προαγωγή της κινητικότητας, η ανοσοκαταστολή, η αγγειογένεση και η τροποποίηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (23–26).



Εικόνα 3. Ο διττός ρόλος του TGF-β στον καρκίνο του ανθρώπου

Συνοπτικά, ο TGFβ δρα ογκοκατασταλτικά σε φυσιολογικά κύτταρα και πρώιμα καρκινώματα, ενώ προάγει τη μετάσταση του όγκου σε πιο προχωρημένα στάδια καρκίνου (27).

Ογκοκατασταλτική δράση του TGFβ

Οι πιο καλά χαρακτηρισμένες επιδράσεις του TGFβ είναι αυτές της καταστολής όγκων σε επιθηλιακούς, ενδοθηλιακούς μυελοειδείς και λεμφοειδείς τύπους κυττάρων. Η έκφραση του υποδοχέα TGFβRII στον καρκίνο του μαστού αποτρέπει το σχηματισμό όγκων, ενώ απενεργοποιεί μεταλλάξεις ή υπερέκφραση μιας κυρίαρχης αρνητικής μορφής του υποδοχέα που καταργεί τις ογκοκατασταλτικές επιδράσεις του TGFβ και αυξάνει την ογκογένεση. Επιπλέον τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης του TGFβRII συσχετίζονται με πιο προχωρημένα και επιθετικά στάδια όγκου, υποδηλώνοντας ότι η οδός σηματοδότησης του TGFβ δρα ογκοκατασταλτικά στα αρχικά στάδια ανάπτυξης του όγκου. Ο TGFβ ασκεί ισχυρές κυτταροστατικές επιδράσεις στους περισσότερους ιστούς-στόχους αναστέλλοντας τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G1. Επιπλέον, ο TGFβ προκαλεί απόπτωση και αποτρέπει την αθανатоποίηση κυττάρων σε πολλούς ιστούς-στόχους (27).

Δράση του TGFβ στις μεταστάσεις

Στο μικροπεριβάλλον του όγκου μεταβολές στα σηματοδοτικά μονοπάτια των καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου συνοδεύονται από υπερπαραγωγή του TGFβ η οποία επιδρά τόσο στα καρκινικά κύτταρα όσο και στις αλληλεπιδράσεις όγκου-στρώματος. Απορρύθμιση σε αυτή τη διεπικοινωνία (cross-talk) οδηγεί στην δημιουργία ενός «ανεκτικού στρώματος» που χαρακτηρίζεται από φαινοτυπικά χαρακτηριστικά που ευνοούν την εξάπλωση του όγκου. Στα καρκινικά κύτταρα ο TGFβ προκαλεί επιθηλιομεσεγχυματική μετάβαση και χαρακτηριστικά βλαστικών καρκινικών κυττάρων. Κύτταρα που υφίστανται επιθηλιομεσεγχυματική μετάβαση δείχνουν αυξημένη μεταναστευτική ικανότητα, ευνοώντας έτσι τη μετάσταση: παίρνουν σχήμα ατράκτου και υφίστανται κυτταροσκελετικές αλλαγές που κάνουν τα κύτταρα επιρρεπή στη διάδοση και τον αποικισμό άλλων οργάνων. Στα επιθηλιακά κύτταρα η απώλεια της E-καντχερίνης, μιας πρωτεΐνης που απαιτείται για την προσκόλληση κυττάρου με κύτταρο (epithelial cell-cell adhesion) και η αυξημένη έκφραση μεσεγχυματικών δεικτών όπως η N-καντχερίνη, η βιμεντίνη και η ινονεκτίνη είναι γεγονότα που προκαλούνται από την EMT (28).

Δράση στην αγγειογένεση

Στον καρκίνο η αγγειογένεση δε ρυθμίζεται σωστά και είναι κρίσιμη για την ανάπτυξη και τη διάδοση των καρκινικών κυττάρων. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα και αγγεία επιτρέπουν σε

έναν ταχέως αναπτυσσόμενο όγκο να λαμβάνει τα θρεπτικά συστατικά και το οξυγόνο που απαιτούνται για την ανάπτυξη του. Επιπλέον, τα αγγεία αυτά χρησιμεύουν και ως σημεία πρόσβασης για την αιματογενή εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων σε όλο το σώμα.

Μέσω των επιδράσεων του στα τοπικά αγγειογενετικά δίκτυα κυτοκίνης, ο TGFβ μπορεί να προκαλέσει ένα προ-αγγειογόνο περιβάλλον και να διεγείρει την αγγειογένεση. In vitro μελέτες δείχνουν ότι αρκετοί βασικοί αγγειογενείς μεσολαβητές όπως ο ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (endothelial growth factor, VEGF) και ο αυξητικός παράγοντας συνδετικού ιστού (connective-tissue growth factor, CTGF) είναι άμεσοι στόχοι της οδού σηματοδότησης του TGFβ. Οι καταστάσεις υποξίας που υπάρχουν στον πυρήνα του όγκου σε συνδυασμό με τη σηματοδότηση του TGFβ μπορούν να προκαλέσουν ισχυρά επίπεδα mRNA VEGF μέσω της ενεργοποίησης του επαγόμενου παράγοντα υποξίας 1 (hypoxia-inducible factor 1, HIF1) και των πρωτεϊνών Smad. Αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες έχει δειχθεί ότι αλληλεπιδρούν και προκαλούν την έκφραση του VEGF. Επιπλέον ο TGFβ μπορεί να ρυθμίζει την έκφραση, έκκριση και δραστηριότητα των μεταλλοπρωτεασών θεμέλιας ουσίας MMP-2 και MMP-9 και να ρυθμίσει προς τα κάτω την έκφραση του αναστολέα πρωτεάσης TIMP στον όγκο και τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Μέσω αυτών των δραστηριοτήτων, ο TGFβ μπορεί να ενισχύσει μεταναστευτικές και επεμβατικές ιδιότητες των ενδοθηλιακών κυττάρων που απαιτούνται για αγγειογένεση.

Ο TGFβ λοιπόν, διεγείρει την αγγειογένεση. Η διέγερση μπορεί να ανασταλεί με αντισώματα έναντι του TGFβ. Η επάλειψη είτε του TGFβ ή των υποδοχέων τύπου II του TGFβ σε μύες οδηγεί σε μείωση της αγγειογένεσης. Η διέγερση της αγγειογένεσης μπορεί να είναι ένας ακόμα μηχανισμός, μέσω του οποίου ο TGFβ ενισχύει την αύξηση των όγκων προχωρημένου σταδίου (29,30).

Ανοσοκατασταλτική δράση του TGFβ

Τα αυξημένα επίπεδα TGFβ που απελευθερώνονται από την ECM ασκούν βαθιά επίδραση στο ανοσοποιητικό σύστημα. Μελέτες δείχνουν ότι όταν ο TGFβ βρίσκεται ενεργοποιημένος στο μικροπεριβάλλον του όγκου έχει ανοσοκατασταλτική δράση. Ο TGFβ δρα ως ισχυρός επαγωγέας απόπτωσης ανοσοκυττάρων. Μέσω της αύξησης της λιπιδικής φωσφατάσης SHIP και της επακόλουθης αναστολής του μονοπατιού επιβίωσης PI3kinase / Akt, ο TGFβ μπορεί να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο τόσο στα B όσο και στα T λεμφοκύτταρα. Ο TGFβ αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των T

λεμφοκυττάρων, των ενεργοποιημένων από λεμφοκίνες κυττάρων φονέων, των φυσικών φονέων (NK), των ουδετερόφιλων, των μακροφάγων και των Β κυττάρων. Η αυξημένη συγκέντρωση του ενεργού TGFβ στην περιοχή του όγκου συμβάλλει δραματικά στη διαδικασία εξέλιξης του όγκου, καθώς η ανοσοκαταστολή που προκαλείται από τον TGFβ επιτρέπει στον όγκο να διαφύγει της ανοσοεπιτήρησης. Η δημιουργία γενετικών μοντέλων μυών που ανέπτυξαν καρκίνο παχέος εντέρου προσέφερε περαιτέρω πληροφορίες όσον αφορά την αλληλεπίδραση του ενεργού TGFβ με το ανοσοποιητικό σύστημα. Αυξημένα επίπεδα TGFβ στο μικροπεριβάλλον του όγκου προκάλεσαν τον αποκλεισμό CD4+ και CD8+ T κυττάρων από τον όγκο (27,31,32).

Ο ρόλος των ιντεγκρινών στην ενεργοποίηση του λανθάνοντος συμπλόκου TGFβ

Ο TGFβ παράγεται πάντα ως ένα ανενεργό σύμπλοκο που πρέπει να ενεργοποιηθεί ώστε να συνδεθεί με τον υποδοχέα του. Η κατανόηση του τρόπου με τον οποίο ενεργοποιείται είναι πολύ σημαντική όχι μόνο για την κατανόηση της λειτουργίας του γενικότερα αλλά και για τη χρησιμότητα του στη δημιουργία πιθανών στόχων για θεραπεία στην καρκινογένεση. Αρκετές μελέτες δείχνουν ότι βασικοί ενεργοποιητές του είναι οι ιντεγκρίνες (33).

Ιντεγκρίνες

Οι ιντεγκρίνες είναι διαμεμβρανικοί υποδοχείς που βοηθούν στη διακυτταρική σύνδεση άλλα και στη σύνδεση των κυττάρων με την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (34). Αποτελούνται από δύο αλυσούς, την α και β υπομονάδα, οι οποίες σχηματίζουν ένα μη ομοιοπολικό ετεροδιμερές. Στα θηλαστικά έχουν χαρακτηριστεί 18 α και 8 β ιντεγκρίνες που συνδυάζονται για να σχηματίσουν 24 υποδοχείς α/β που έχουν αναγνωριστεί μέχρι στιγμής (35,36). Οι περισσότερες ιντεγκρίνες δεσμεύουν γλυκοπρωτεΐνες της ECM όπως η ινονεκτίνη, η φιβρονεκτίνη, η λαμίνη ή το κολλαγόνο. Οι ιντεγκρίνες μπορούν να επηρεάσουν τη μετανάστευση, τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και τη διαφοροποίηση και συνεπώς εμπλέκονται σε διαδικασίες όπως η ανάπτυξη και επιδιόρθωση ιστών, η ανοσοαπόκριση και η αιμόσταση. Κατά συνέπεια, η απορρύθμιση της σηματοδότησης των ιντεγκρινών σχετίζεται με διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως η αυτοανοσία, η φλεγμονή και ο καρκίνος (37).

Η σηματοδότηση των ιντεγκρινών ρυθμίζει διάφορες λειτουργίες και στα καρκινικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένης της μετανάστευσης, της διήθησης, του

πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης. Σε διάφορους τύπους όγκων, η έκφραση συγκεκριμένων ιντεγκρινών συσχετίζεται με την εξέλιξη της νόσου και με μειωμένη επιβίωση ασθενών. Πιο συγκεκριμένα οι ιντεγκρίνες ανβ3, α5β1 και ανβ6, συνήθως εκφράζονται σε χαμηλά ή μη ανιχνεύσιμα επίπεδα στα περισσότερα επιθήλια ενηλίκων αλλά μπορούν να αυξηθούν σε μεγάλο βαθμό σε ορισμένους όγκους (38).

Ανβ6 Ιντεγκρίνη

Δεδομένα υποδεικνύουν ότι το γονίδιο KMT2C (MLL3) υποεκφράζεται σε αρκετές νεοπλασίες, συμπεριλαμβανομένου του ορθοκολικού αδενοκαρκινώματος. Μάλιστα η γονιδιακή αποσιώπηση του συγκεκριμένου γονιδίου οδηγεί σε υποέκφραση γονιδίων όπως είναι το ITGB6 (39). Το γονίδιο ITGB6 κωδικοποιεί την ανβ6 πρωτεΐνη, η οποία συμμετέχει στην δέσμευση πρωτεϊνών εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Αποτελεί μέλος της αν υποοικογένειας ιντεγκρινών (ανβ1, ανβ3, ανβ5 και ανβ8) που ορίζεται από τις β και αν υπομονάδες (36,40,41).

Η ιντεγκρίνη ανβ6 δεν εκφράζεται σε φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα, αλλά εκφράζεται έντονα στην εμβρυογένεση, στην επιδιόρθωση των ιστών και στους προερχόμενους από επιθήλια κακοήθεις όγκους. Στους τελευταίους, εντοπίζεται εστιακά στο διηθητικό άκρο των νησιδίων τους. Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι η ανβ6 αυξάνεται σε διάφορα διηθητικά επιθηλιακά καρκινώματα του παχέος εντέρου, του παγκρέατος, του προστάτη, της μήτρας, του πνεύμονα του μαστού και της κεφαλής και τραχήλου. Αποτελεί προγνωστικό δείκτη σε καρκινώματα πνεύμονα και παχέος εντέρου. Έχει διαπιστωθεί ότι η επαγωγή της υπερέκφρασης της ανβ6 σε καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου μπορεί να διεγείρει την έκκριση MMP-9 και να αποδομήσει την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, επάγοντας την μετάσταση (40,41).

Ο πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου μπορεί να προωθηθεί από την ανβ6 μέσω αναστολής της οδού απόπτωσης των μιτοχονδρίων. Σε έρευνα θεωρήθηκε ότι η έκφραση της ανβ6 σε 36.7% ασθενών με γαστρικό καρκίνωμα, σχετίζεται με το στάδιο του όγκου, τη λεμφική μετάσταση και υποτροπή και ότι μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως μεμονωμένος παράγοντας πρόγνωσης κινδύνου. Στοιχεία επίσης υποδεικνύουν ότι η ανβ6 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση των ασθενών που παρουσιάζουν εξαιρετικά υψηλό κίνδυνο εμφάνισης μεταστατικής νόσου

και ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το βαθμό επικινδυνότητας ασθενών με in situ καρκίνωμα του μαστού (40,41).

Ενεργοποίηση του TGFβ από την ιντεγκρίνη ανβ6

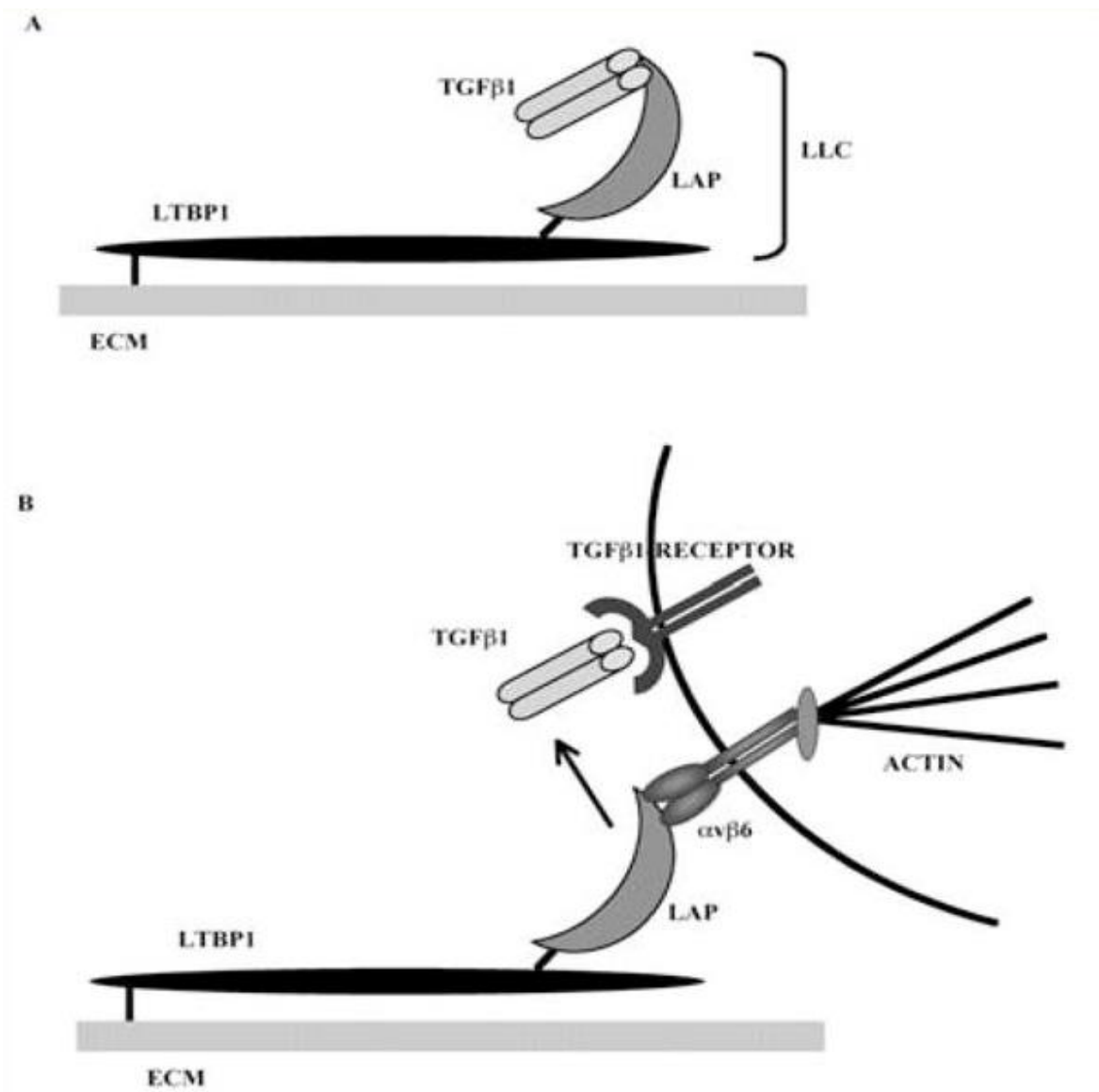
Η οικογένεια TGFβ όπως αναφέρθηκε και παραπάνω έχει 3 ισομορφές TGFβ1, TGFβ2 και TGFβ3. Κάθε μια από τις ισομορφές συντίθεται ως ομοδιμερές προ-TGFβ, όπου αποτελείται από TGFβ ομοιοπολικά συνδεδεμένο με την πρωτεΐνη LAP (Latency Associated Protein). Το προ-TGFβ διασπάται με ένζυμα τύπου φουρίνης μέσα στο κύτταρο και παραμένει συνδεδεμένο με την LAP με μη ομοιοπολικό δεσμό που σχηματίζει το μικρό λανθάνον σύμπλοκο (Small Latent Complex, SLC). Ο TGFβ σε αυτή τη μορφή είναι ανενεργός και δεν μπορεί να δεσμευτεί στον υποδοχέα του. Θα πρέπει να απελευθερωθεί από αυτό το σύμπλοκο ώστε να είναι ενεργός. Τα SLC ανευρίσκονται και εκκρίνονται σε πολύ λίγες περιπτώσεις (42).

Ο TGFβ κυρίως εκκρίνεται ως ένα μεγάλο λανθάνον σύμπλοκο (Large Latent Complex, LLC). Τα LLC σχηματίζονται από τη συσχέτιση των πρωτεϊνών δέσμευσης λανθάνοντος TGFβ (Latent TGFβ Binding Proteins, LTBP) με τα SLC (TGF-LAP) με ομοιοπολικούς δισουλφιδικούς δεσμούς β. Οι LTBPs έχουν 4 ισομορφές, LTBP1, LTBP2, LTBP3 και LTBP4. Εκτός από την LTBP3, όλες οι άλλες LTBP μπορούν να προσδεθούν σε όλες τις ισομορφές του TGFβ. Οι LTBP ανήκουν στην υπεροικογένεια των EMC πρωτεϊνών και δεσμεύονται με άλλες ECM πρωτεΐνες όπως η φμπρονεκτίνη και η βιτρονεκτίνη. Έτσι οι LLC παρέχουν μια μεγάλη δεξαμενή λανθάνοντος TGFβ στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία που είναι διαθέσιμη όταν χρειάζεται και μπορεί να ενεργοποιηθεί αναλόγως (42).

Η ενεργοποίηση του TGFβ από την ανβ6 έχει μελετηθεί από διάφορες ομάδες. Ένας κοινός μηχανισμός που προέκυψε από τέτοιες μελέτες είναι ότι μετά τη σύνδεση της ανβ6 στο πεπτίδιο RGD που υπάρχει στο LAP (που σχετίζεται με το TGFβ1), η ανβ6 δεσμεύεται στον κυτταροσκελετό της ακτίνης. Αυτό με τη σειρά του προκαλεί μια αλλαγή στη διαμόρφωση του συμπλόκου TGFβ1-LAP-LTBP1 (LLC). Αυτό απελευθερώνει τον TGFβ1 από το LLC, το οποίο στη συνέχεια δεσμεύεται στον υποδοχέα του, ενεργοποιώντας έτσι το σηματοδοτικό μονοπάτι. Η ιντεγκρίνη ανβ6 δεν μπορεί να ενεργοποιήσει τον TGFβ δεσμευμένο σε οποιοδήποτε άλλο LTBP όπως το LTBP3. Οι διαφορετικές ισομορφές των LTBP έχουν σημαντικές διαφορές στην αλληλουχία της περιοχής άρθρωσης,

υποδηλώνοντας ότι αυτή η περιοχή έχει σημαντικό ρόλο στην ειδική σύνδεση και ενεργοποίηση του TGFβ από διάφορες ιντεγκρίνες (42).

Σε καρκίνους όπως το βασικοκυτταρικό καρκίνωμα, η αυξημένη έκφραση της ιντεγκρίνης ανβ6 σχετίζεται με επιθετική νόσο, πιθανώς λόγω της αυξημένης ενεργοποίησης του TGFβ. Μελέτες δείχνουν ότι η ενεργοποίηση του TGFβ in vivo από την ανβ6 συμβάλει στην ανάπτυξη του όγκου και ότι η αύξηση της ρύθμισης της ιντεγκρίνης ανβ6 σε καρκινικά κύτταρα σχετίζεται με επιθήλιομεσεγχυματική μετάβαση (EMT) και αυξημένη μετανάστευση. Η σηματοδότηση της ιντεγκρίνης μπορεί επίσης να διαμορφώσει άμεσα τις αποκρίσεις του TGFβ (38).



Εικόνα 4. Ενεργοποίηση του TGFβ από την ανβ6

(A) Ο TGFβ1 βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη ως ένα μεγάλο λανθάνον σύμπλοκο (LLC). Το LLC αποτελείται από τον TGFβ1, την πρωτεΐνη LAP και την LTBP1. Η LTBP1 αγκιστρώνει την LLC στην ECM. Ο TGFβ1 είναι ανενεργός σε αυτή τη μορφή. (B) Ενεργοποίηση του TGFβ από την ανβ6. Η ιντεγκρίνη ανβ6 προσδένεται στην αλληλουχία RGD στη LAP προκαλώντας την πρόσδεση της ανβ6 στον κυτταροσκελετό της ακτίνης προκαλώντας μια διαμορφωτική αλλαγή (conformational change) που απελευθερώνει τον TGFβ από την LAP. Ο μη δεσμευμένος TGFβ είναι πλέον ενεργός και μπορεί να δεσμεύσει τον υποδοχέα του και να ενεργοποιήσει τον καταρράκτη σηματοδότησης TGFβ (42).

Κεφάλαιο 2. Σκοπός

Σκοπός της εργασίας είναι ο εντοπισμός διαφορών όσον αφορά το πρότυπο διήθησης από CD8a λεμφοκύτταρα σε δύο ομάδες καρκινικών δειγμάτων παχέος εντέρου. Στη μία ομάδα έχει πραγματοποιηθεί αποσιώπηση της MLL3 μεθυλοτρανσφεράσης ενώ στη δεύτερη εκφράζεται φυσιολογικά. Θελήσαμε με αυτό τον τρόπο να εξετάσουμε εάν η αναστολή του μονοπατιού ενεργοποίησης του TGFβ καθιστά τα κύτταρα του ανοσοποιητικού ικανά να διηθήσουν όγκους παχέος εντέρου σε μεγαλύτερο βαθμό.

Κεφάλαιο 3. Μέθοδος

Κυτταρική σειρά CT26

Από τα υψηλά ποσοστά εμφάνισης του καρκίνου παχέος εντέρου στον πληθυσμό, προκύπτει η ανάγκη ανάπτυξης προσαρμοσμένων μοντέλων που θα μπορούν να αντιπροσωπεύουν καλύτερα την παθολογία του ανθρώπου με στόχο τη βελτίωση διαγνωστικών μεθόδων ή πιθανών νέων θεραπειών με σκοπό τη μείωση του ποσοστού θνησιμότητας από τον καρκίνο παχέος εντέρου (43).

Η κυτταρική σειρά καρκινώματος παχέος εντέρου CT26 είναι μια από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες κυτταρικές σειρές για την ανάπτυξη φαρμάκων. Πολλοί κυτταροτοξικοί παράγοντες καθώς και θεραπείες που στοχεύουν σε συγκεκριμένες οδούς σηματοδότησης, έχουν μελετηθεί με αυτά τα κύτταρα. Η CT26 είναι κυτταρική σειρά μύος που αναπτύχθηκε το 1975 μέσω της έκθεσης BALB/c ποντικών σε N-nitroso-N-methylurethane (NMU) με αποτέλεσμα ένα ταχέως αναπτυσσόμενο σταδίου IV καρκίνωμα που εμφυτεύεται εύκολα. Καθώς τα CT26 κύτταρα σε BALB/c μύες παρέχουν ένα συγγενικό σύστημα in vivo δοκιμής, χρησιμοποιείται συχνά για την ανάπτυξη και τον έλεγχο πρωτοκόλλων ανοσοθεραπείας καθώς και σε μελέτες σχετικά με τη ανοσοαπόκριση (44). Για αυτούς του λόγους στην παρούσα μελέτη επιλέξαμε να χρησιμοποιήσουμε την κυτταρική σειρά CT26 σε BALB/c μύες.

Κυτταροκαλλιέργειες

Όλες οι διαδικασίες καλλιέργειας των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν σε ειδικό χώρο υπό στείρες συνθήκες εργασίας. Η ανάπτυξη τους έγινε σε ειδικό επωαστικό κλίβανο υπό κατάλληλες συνθήκες υγρασίας, θερμοκρασίας 37 °C και ατμόσφαιρας 5% CO₂. Όλοι οι χειρισμοί των κυττάρων έγιναν σε εστία κάθετης νηματικής ροής (tissue culture laminar flow hood). Χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένα τρυβλία και υλικά μίας χρήσης.

Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε ήταν η CT26 καθώς επίσης και η CT26 με αποσιώπηση της MLL3 μεθυλοτρανσφεράσης (#1500). Τα κύτταρα, όπου βρίσκονταν ήδη σε καλλιέργειες στο εργαστήριο μας, αναπτύχθηκαν σε μονοστιβάδες σε τρυβλία διαμέτρου 150 mm και θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) (HyClone) με υψηλή περιεκτικότητα σε γλυκόζη, 4.0 mM L-γλουταμίνη και πυροσταφυλικό νάτριο, εμπλουτισμένο με 10% βόειο εμβρυϊκό ορό (Fetal Bovine Serum, FBS) (Invitrogen) και 1% πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη (Pen-Strep) (10.000 units/ml πενικιλίνη, 10.000 μg/ml στρεπτομυκίνη) (Gibco). Όταν τα κύτταρα καταλάμβαναν όλη την επιφάνεια του τρυβλίου, πραγματοποιούνταν ανακαλλιέργεια σε νέα τρυβλία. Κατά τη διάρκεια της ανακαλλιέργειας τα κύτταρα εκπλένονταν με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (Phosphate-Buffered Saline, PBS) (Gibco) χωρίς Ca και Mg, με pH=7,4 το οποίο είχε προηγουμένως αραιωθεί από την αρχική συγκέντρωση του συμπυκνωμένου διαλύματος 10x, σε dH₂O με τελική συγκέντρωση 1x και αφού στη συνέχεια είχε αποστειρωθεί σε αυτόκαυστο στους 120 °C. Τα κύτταρα έπειτα επώαζονταν για 2 min με ποσότητα 2 ml διαλύματος τρυψίνης (Trypsin-EDTA) (Biosera) το οποίο έχει αραιωθεί από την αρχική συγκέντρωση 10x, σε 1x PBS με τελική συγκέντρωση 1x, ώστε να αποκολληθούν από το τρυβλίο. Μετά την αποκόλληση των κυττάρων προστίθεντο 15ml DMEM προκειμένου να ανασταλεί η δράση την τρυψίνης και το κυτταρικό εναιώρημα αναδεύονταν με πιπέτα ώστε να διασπαστούν τα συσσωματώματα των κυττάρων. Στη συνέχεια μεταφέρονταν 2 ml διαλύματος σε νέα τρυβλία και προστίθεντο 15 ml DMEM.

Για τη μακροχρόνια διατήρηση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η ψύξη τους σε θερμοκρασία -80 °C και μέσο αποθήκευσης που αποτελείτο από 80% FBS και 20% DMSO (Sigma-Aldrich). Κατά τη διαδικασία αυτή, τρυβλία με κύτταρα σε εκθετική φάση ανάπτυξης επλύθηκαν με PBS και επώαστηκαν με 2 ml τρυψίνη για 2 min. Μετά την προσθήκη DMEM και τη διάσπαση των συσσωματωμάτων με την πιπέτα, το εναιώρημα

τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο φυγοκεντρικό σωλήνα χωρητικότητας 15ml και φυγοκεντρήθηκε σε 1.500 rpm για 5min. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε με αναρρόφηση το υπερκείμενο και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 1 ml μέσου αποθήκευσης και μεταφέρθηκε σε αμπούλες ψύξης οι οποίες αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία -80°C.

Υποδερμικές ενέσεις CT26 κυττάρων σε μύες – Αλλομεταμόσχευση (Xenografts)

Για τη διαδικασία των xenografts, στα CT26 κύτταρα και στα CT26 κύτταρα με απενεργοποιημένη MLL3 μεθυλοτρανσφεράση (#1500) που βρίσκονταν σε καλλιέργειες και είχαν αναπτυχθεί καλύπτοντας περίπου το 90% της επιφάνειας του τρυβλίου ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω μέχρι το στάδιο της φυγοκέντρησης. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε με αναρρόφηση το υπερκείμενο και το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 1.5 ml DMEM εμπλουτισμένο με 10% FBS και 1% Pen-Strep. Με σύριγγα ινσουλίνης 1ml (29g) x 12.7mm μεταφέρθηκαν 200μl (περίπου 3.000.000 κύτταρα) από το κυτταρικό διάλυμα και ενέθηκαν στην αριστερή οπίσθια/πλευρική πτυχή του κατώτερου θωρακικού κλωβού μυός. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε συνολικά σε 6 BALB/c μύες σε απαγωγό. Σε 3 ενέθηκαν τα CT26 κύτταρα και σε 3 τα #1500. Πριν από την υποδερμική χορήγηση των κυττάρων οι μύες αναισθητοποιήθηκαν με αναισθητικό διάλυμα που περιελάμβανε 1 ml ketamidol (Chanelle) 1 ml xylazine (NeoCell) και 8 ml sterile water for injection. Σε κάθε μυ ενέθηκαν ενδοπεριτοναϊκά 100 μl από το αναισθητικό διάλυμα. Οι μύες ήταν αρσενικού γένους και ηλικίας μεταξύ 2 και 3 εβδομάδων.

Οι μύες ελέγχονταν για την ανάπτυξη όγκων δύο φορές την εβδομάδα. Μετά το πέρας 3 εβδομάδων από την αλλομεταμόσχευση ανέπτυξαν όγκους οι οποίοι αφού μετρήθηκαν με τη βοήθεια caliper (w 0.2mm x l 0.2mm) αφαιρέθηκαν. Οι μύες θυσιάστηκαν πριν την απομάκρυνση των όγκων.

Όλα τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν στεγάστηκαν σε αυτόνομα εξαεριζόμενους κλωβούς σε συνθήκες ελεύθερες ειδικών παθογόνων (Specific Pathogen Free, SPF) σε πλήρη συμμόρφωση με τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ομοσπονδίας Εταιρειών Ζώων Εργαστηρίου (Federation of European Laboratory Animal Science Associations, FELASA), στη Μονάδα Ζωικών Προτύπων του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (IIBEAA, Ελλάδα). Η θερμοκρασία και η υγρασία του περιβάλλοντος

διατηρούνταν σταθερές και η εναλλαγή ημέρας και νύχτας ήταν προγραμματισμένη ανά 12 ώρες. Η πρόσβαση σε τροφή και νερό ήταν ελεύθερη.

Μονιμοποίηση ιστοτεμαχίων

Προκειμένου να μονιμοποιηθούν, οι όγκοι μετά την αφαίρεση τους από τους BALB/c μύες εκπλύθηκαν με 1x PBS και στη συνέχεια εμβάπτιστηκαν σε 10% φορμαλίνη (Carlo Erba) ολονύκτια στους 4 °C. Την επόμενη μέρα εκπλύθηκαν κάτω από τρεχούμενο νερό βρύσης για 10 min και τοποθετήθηκαν σε κασέτες έγκλεισης. Οι κασέτες με τα ιστοτεμάχια εμβάπτιστηκαν σε ποτήρι ζέσεως με 70% EtOH (Applichem) ολονύκτια στους 4 °C. Την επόμενη μέρα ακολούθησαν τα στάδια της αφυδάτωσης με διαδοχικές συγκεντρώσεις EtOH (70%, 95%, 100%) της διαύγασης με ξυλόλη (Fisher) και της παραφίνωσης με παραφίνη σε μηχάνημα ιστοκινέτας (Automatic Tissue Processor Leica TP1020). Μετά από αυτά τα στάδια πραγματοποιήθηκε η έγκλειση σε παραφίνη σε μηχάνημα σκίνωσης (Tissue embedding system Sakura Tec5 Tissue Tek). Οι κύβοι παραφίνης τοποθετήθηκαν στους -20 °C προκειμένου να γίνει αργότερα λήψη τομών.

Λήψη τομών παραφίνης

Για την απόκτηση τομών παραφίνης οι κύβοι τοποθετήθηκαν σε μικροτόμο (Microtome Leica RM 2125) και λήφθηκαν τομές πάχους 5 μm που στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες (slides) επικαλυμμένες με πολυλυσίνη (Thermo Scientific). Η μονιμοποίηση των ιστοτεμαχίων, η έγκλειση και η λήψη τομών πραγματοποιήθηκαν στη Μονάδα Ιστοχημείας του ΙΙΒΕΑΑ.

Πρωτόκολλο Ανοσοϊστοχημείας

Οι τομές παραφίνης παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου ολονύκτια και την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκε αποπαραφίνωση που περιελάμβανε:

- Τοποθέτηση των slides με τις τομές παραφίνης σε θερμαινόμενη πλάκα στους 56 °C για 7 min.
- Εμβάπτιση σε ξυλόλη για 10 min.
- Εμβάπτιση σε δεύτερη ξυλόλη για 10 min.
- Εμβάπτιση σε 100% EtOH για 5 min.
- Εμβάπτιση σε 95% EtOH για 2 min.
- Εμβάπτιση σε 85% EtOH για 2 min.
- Εμβάπτιση σε 80% EtOH για 2 min.

- Έκπλυση με νερό βρύσης (x3).

Μετά το στάδιο της αποπαραφίνωσης, τα slides τοποθετήθηκαν σε δοχείο με antigen retrieval, όπου για την παρασκευή του προστέθηκαν 2.94 gr tri-sodium citrate dehydrate (Fisher) και 990 ml dH₂O και αναδεύτηκαν με τη χρήση μαγνήτη. Το pH=6 ρυθμίστηκε με την προσθήκη 1N HCL (Acros) και ακόμα προστέθηκαν 0,5 ml Tween 20 (Appllichem) και dH₂O έως ότου το διάλυμα αποκτήσει τελικό όγκο 1 L. Το δοχείο με τα slides στο antigen retrieval τοποθετήθηκε σε χύτρα ταχύτητας για 10 min. Στη συνέχεια οι τομές εκπλύθηκαν δύο φορές με 1x PBS και έπειτα προστέθηκε σε αυτές blocking buffer για 30min. Το blocking buffer παρασκευάστηκε με 1x PBS, 10% FBS και 1% BSA (Appllichem). Μετά την απομάκρυνση του blocking buffer προστέθηκε αντίσωμα CD8A (C8/144B, mouse mAb, #70306, Cell Signaling) με αραιώση 1:400 σε Ab buffer (1x PBS, 1% BSA) και επώαστηκε ολονύκτια στους 4 °C. Την επόμενη μέρα απομακρύνθηκε το αντίσωμα και προστέθηκε στις τομές wash buffer που αποτελείτο από 1x PBS και 0.025% Triton x 100 (Sigma-Aldrich) για 3 min. Μετά την απομάκρυνση του wash buffer, στις τομές προστέθηκε δευτερεύον αντίσωμα anti-mouse (G21040, Invitrogen) με αραιώση 1:500 σε Ab buffer για 2 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μετά το πέρας των 2 ωρών απομακρύνθηκε το δευτερεύον αντίσωμα και προστέθηκε ξανά wash buffer. Μετά την απομάκρυνση του wash buffer, στις τομές προστέθηκε χρωμογόνο DAB (5ml dH₂O, 30 μl buffer pH 7.5 stock solution, 60 μl DAB stock solution, 30μl hydrogen peroxide solution) (DAB peroxidase substrate kit, Vector), με παράλληλη παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Μετά την παρατήρηση της χρωμογόνου επίδρασης του DAB ακολούθησε έκπλυση με νερό βρύσης. Έπειτα, τα slides με τις τομές εμβαπτίστηκαν σε αιματοξυλίνη (Harris) για 7 sec και εκπλύθηκαν με νερό βρύσης (x3). Στη συνέχεια ακολούθησε το στάδιο της αφυδάτωσης:

- Εμβάπτιση σε 80% EtOH για 30 sec.
- Εμβάπτιση σε 95% EtOH για 30 sec.
- Εμβάπτιση σε 100% EtOH για 1min.
- Εμβάπτιση σε 100% EtOH για 1 min.
- Εμβάπτιση σε ξυλόλη για 3 min.
- Εμβάπτιση σε δεύτερη ξυλόλη για 3 min.

Στη συνέχεια ακολούθησε η διαδικασία της επικάλυψης των τομών με μέσο επικάλυψης DPX (VWR) και καλυπτρίδα.

Ψηφιακή απεικόνιση - επεξεργασία

Μετά την εφαρμογή του πρωτοκόλλου ανοσοϊστοχημείας, τα slides παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου (Leica DM LS2 / Leica DFC500 color camera) και λήφθηκαν φωτογραφίες με φακό 40x. Η ψηφιακή απεικόνιση πραγματοποιήθηκε στη Μονάδα Βιοαπεικόνισης του ΙΙΒΕΑΑ. Για την καταμέτρηση των CD8a λεμφοκυττάρων χρησιμοποιήθηκε το Fiji-ImageJ software.

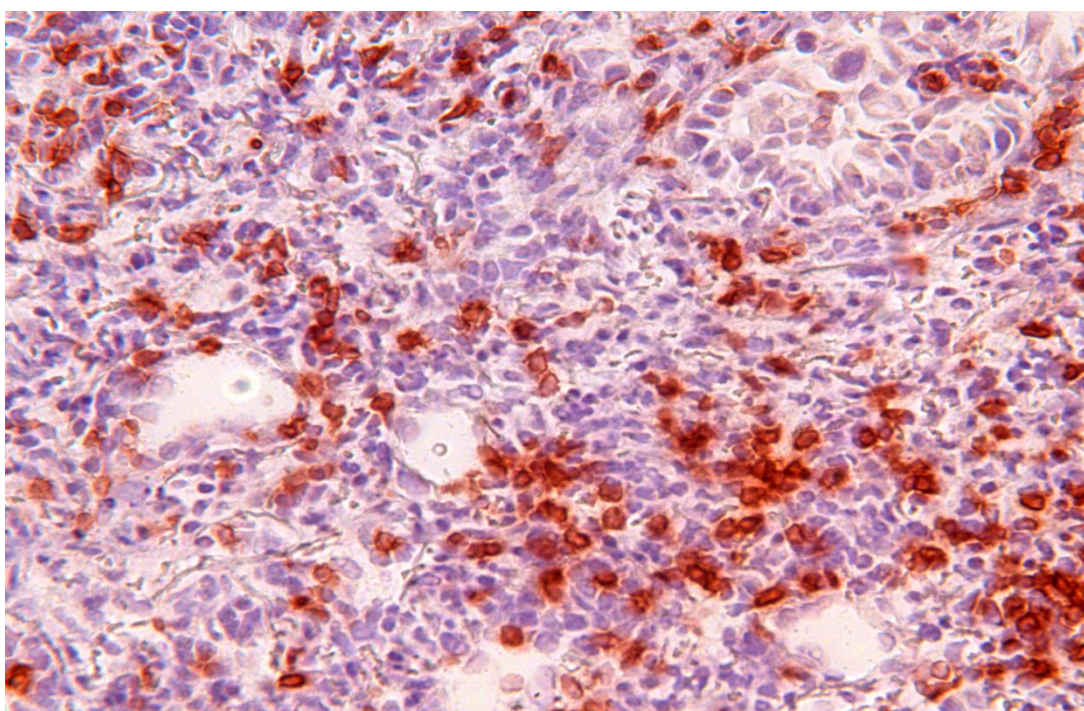
Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση και τον έλεγχο της στατιστικής σημαντικότητας των μετρήσεων, χρησιμοποιήθηκε το GraphPad Prism software.

Κεφάλαιο 4. Αποτελέσματα

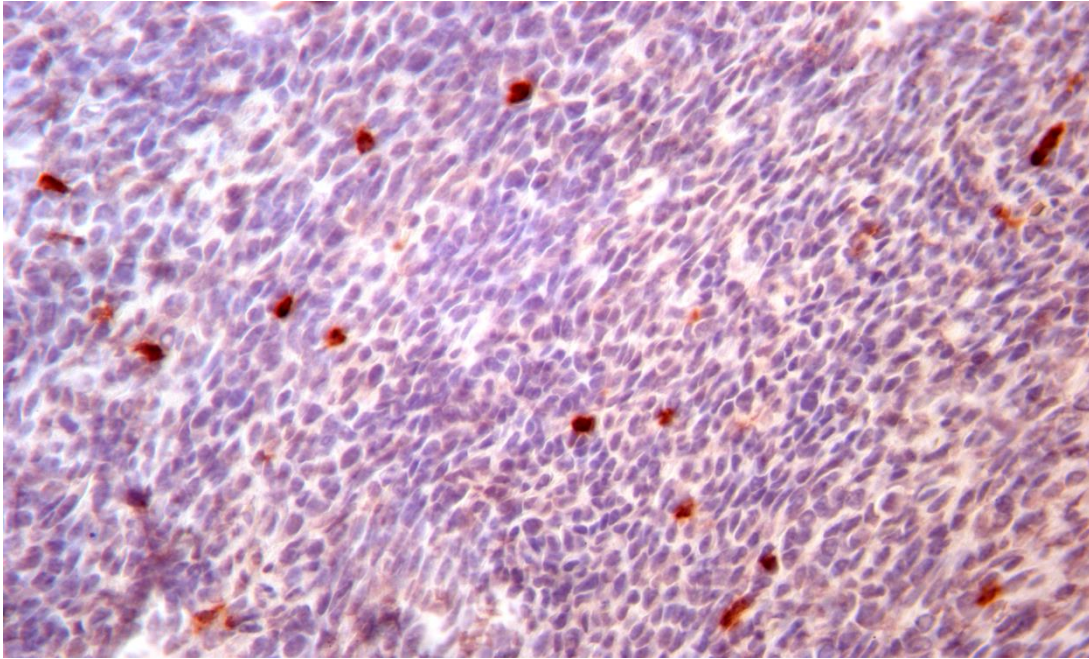
Ψηφιακή απεικόνιση

Το πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας πραγματοποιήθηκε αρχικά σε τομή θύμου αδένου μύος καθώς είναι πλούσιος σε λεμφοκύτταρα. Με αυτό τον τρόπο χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο για την εφαρμογή της ανοσοϊστοχημικής χρώσης στα καρκινικά δείγματα παχέος εντέρου. Στη συνέχεια φαίνονται ενδεικτικά εικόνες από την εφαρμογή της ανοσοϊστοχημικής χρώσης στο θύμο αδένου, σε όγκο παχέος εντέρου όπου η MLL3 μεθυλοτρανσφεράση εκφράζεται φυσιολογικά (control) και σε όγκο όπου έχει πραγματοποιηθεί αποσιώπηση της MLL3 μεθυλοτρανσφεράσης (#1500).



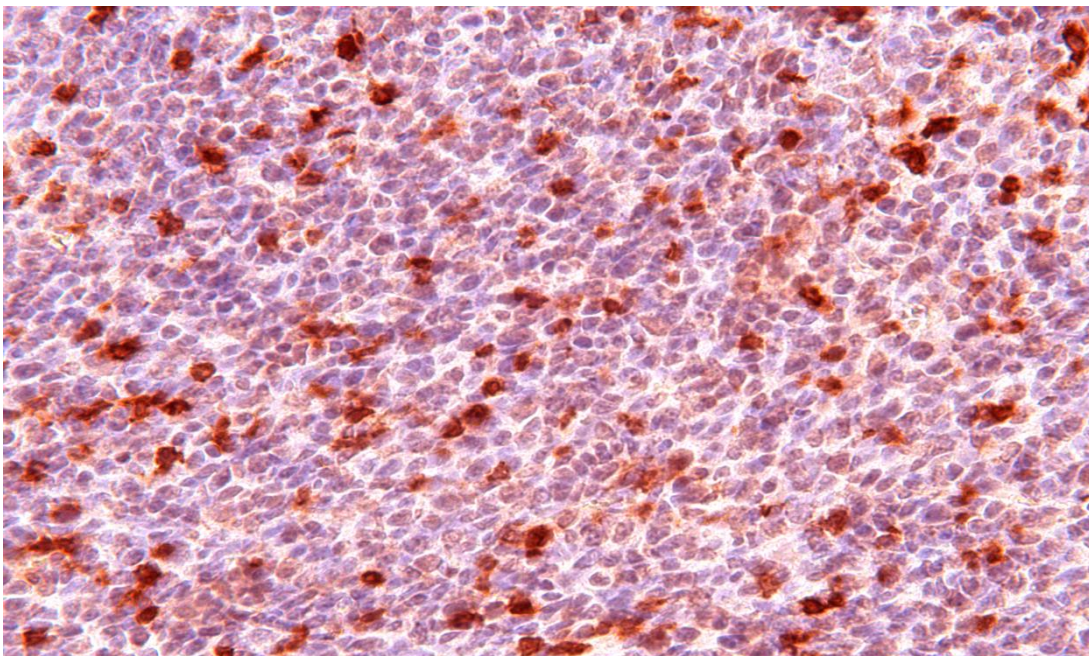
Εικόνα 5. Θύμος αδένου

Ανοσοϊστοχημική χρώση για τον εντοπισμό CD8a λεμφοκυττάρων σε θύμο αδένου. Με καφέ χρώμα εντοπίζονται τα CD8a λεμφοκύτταρα (χρώση DAB) και με μωβ χρώμα τα κύτταρα του ιστού (χρώση αιματοξυλίνης).



Εικόνα 6. Όγκος παχέος εντέρου (control)

Ανοσοϊστοχημική χρώση για τον εντοπισμό και την καταμέτρηση CD8a ογκοδιηθητικών λεμφοκυττάρων σε όγκο παχέος εντέρου όπου η MLL3 μεθυλοτρανσφεράση εκφράζεται φυσιολογικά (control). Με καφέ χρώμα εντοπίζονται τα CD8a λεμφοκύτταρα (χρώση DAB) και με μωβ χρώμα τα κύτταρα του όγκου (χρώση αιματοξυλίνης).



Εικόνα 7. Όγκος παχέος εντέρου (#1500)

Ανοσοϊστοχημική χρώση για τον εντοπισμό και την καταμέτρηση CD8a ογκοδιηθητικών λεμφοκυττάρων σε όγκο παχέος εντέρου όπου η MLL3 μεθυλοτρανσφεράση είναι απενεργοποιημένη (#1500). Με καφέ

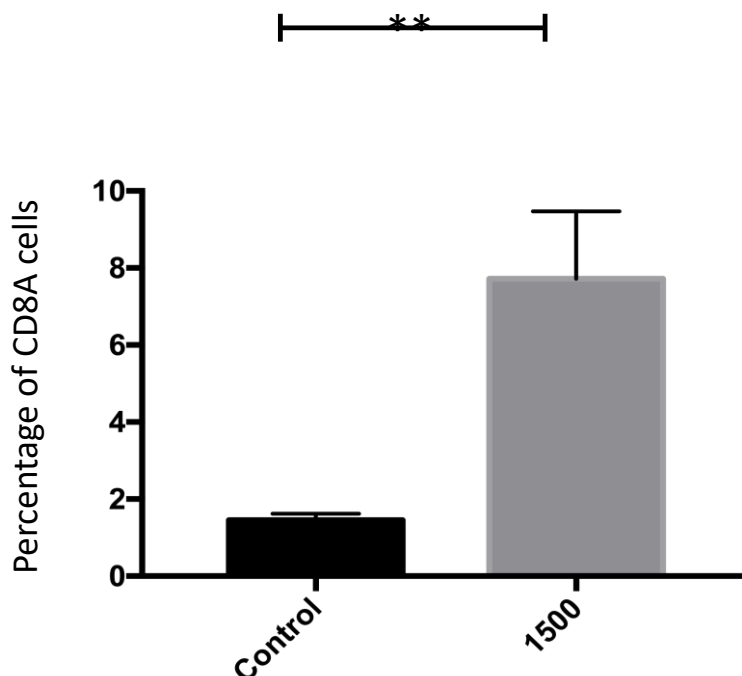
χρώμα εντοπίζονται τα CD8a λεμφοκύτταρα (χρώση DAB) και με μωβ χρώμα τα κύτταρα του όγκου (χρώση αιματοξυλίνης).

Αποτελέσματα καταμέτρησης CD8a ογκοδιηθητικών λεμφοκυττάρων

Πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση των CD8a λεμφοκυττάρων σε 3 καρκινικά δείγματα όπου η MLL3 μεθυλοτρανσφεράση εκφράζεται φυσιολογικά (control) και σε 3 καρκινικά δείγματα όπου έχει πραγματοποιηθεί αποσιώπηση της MLL3 μεθυλοτρανσφεράσης (#1500). Τα αποτελέσματα των μετρήσεων περιλαμβάνονται στον παρακάτω πίνακα (βλ. Πιν 2).

Πίνακας 2. Αποτελέσματα καταμέτρησης CD8a λεμφοκυττάρων (Figi-ImageJ software).

Control			#1500		
Καρκινικά δείγματα	Συνολικός αριθμός κυττάρων	CD8a λεμφοκύτταρα	Καρκινικά δείγματα	Συνολικός αριθμός κυττάρων	CD8a λεμφοκύτταρα
Όγκος 1	11994	197	Όγκος 1α	8652	842
Όγκος 2	7775	108	Όγκος 2α	11423	787
Όγκος 3	9567	128	Όγκος 3α	12592	824



Εικόνα 8. Ποσοστό (%) των CD8a ογκοδιηθητικών λεμφοκυττάρων στα καρκινικά δείγματα control και στα καρκινικά δείγματα #1500.

Στον οριζόντιο άξονα του διαγράμματος φαίνονται τα καρκινικά δείγματα. Η πρώτη στήλη περιλαμβάνει τα control δείγματα και η δεύτερη τα #1500, n=3. Στον κάθετο άξονα φαίνεται το ποσοστό (%) των CD8a

ογκοδιθητικών λεμφοκυττάρων. Το ποσοστό των CD8a κυττάρων στα control δείγματα είναι 1.45% και το ποσοστό στα #1500 είναι 7.72%.

Έλεγχος στατιστικής σημαντικότητας μετρήσεων

Μετά την καταμέτρηση των CD8a λεμφοκυττάρων στα control δείγματα και στα #1500 πραγματοποιήθηκε έλεγχος στατιστικής σημαντικότητας των μετρήσεων με την εφαρμογή T-test. Οι μετρήσεις κρίθηκαν στατιστικά σημαντικές ($P=0.035$) όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (βλ. Πιν 3).

Πίνακας 3. T-test

Εξετάζεται η στατιστική σημαντικότητα των μετρήσεων ($P \leq 0.05$) (GraphPad Prism software).

Column B	1500
vs.	vs.
Column A	Control
Unpaired t test	
P value	0.0035
P value summary	**
Significantly different ($P < 0.05$)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=6.177 df=4
How big is the difference?	
Mean \pm SEM of column A	1.456 \pm 0.09416, n=3
Mean \pm SEM of column B	7.722 \pm 1.01, n=3
Difference between means	6.265 \pm 1.014
95% confidence interval	3.449 to 9.082
R squared (eta squared)	0.9051
F test to compare variances	
F, DF _n , Dfd	115.1, 2, 2
P value	0.0172
P value summary	*
Significantly different ($P < 0.05$)?	Yes

Κεφάλαιο 5. Συμπεράσματα

Τα τελευταία χρόνια έχουν παρουσιάσει τεράστιο ενδιαφέρον οι εξελίξεις όσον αφορά την ανοσοθεραπεία στην αντιμετώπιση του καρκίνου παχέος εντέρου. Τα TILs παίζουν καθοριστικό ρόλο στην αντιμετώπιση της νόσου καθώς επίσης έχουν προγνωστική αξία για την εξέλιξη της. Ο αυξητικός παράγοντας TGFβ έχει μελετηθεί για την αποτρεπτική δράση του όσον αφορά τη διήθηση όγκων από κύτταρα του ανοσοποιητικού και έχει προταθεί ως ένας υποσχόμενος θεραπευτικός στόχος. Στην παρούσα μελέτη θελήσαμε να εξετάσουμε το πρότυπο διήθησης από CD8a ογκοδιηθητικά λεμφοκύτταρα σε καρκινικά δείγματα παχέος εντέρου όπου έχει πραγματοποιηθεί αποσιώπηση της MLL3 μεθυλοτρανσφεράσης και σε καρκινικά δείγματα όπου η MLL3 μεθυλοτρανσφεράση εκφράζεται φυσιολογικά. Στα καρκινικά δείγματα που πραγματοποιήθηκε αναστολή του μονοπατιού ενεργοποίησης του TGFβ παρατηρήσαμε σημαντική αύξηση των TILs που εντοπίζονται στον όγκο. Τα αποτελέσματα φαίνονται ενθαρρυντικά, παρ'όλα αυτά είναι απαραίτητη η περαιτέρω διερεύνηση. Μελλοντικά θα επιθυμούσαμε να μελετήσουμε και να εξετάσουμε σε βάθος την υπόθεση αυτή, με την εφαρμογή μεθόδων ποσοτικοποίησης του TGFβ σε αντίστοιχα δείγματα. Επίσης ιδιαίτερο ενδιαφέρον θα είχε η συσχέτιση της έκφρασης των MLL3 και TGFβ γονιδίων με τα επίπεδα διήθησης από CD8a σε κλινικά δείγματα ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου.

Αναφορές

1. Marley AR, Nan H. Epidemiology of colorectal cancer. *Int J Mol Epidemiol Genet*. 2016 Sep 30;7(3):105–14.
2. Ballinger AB, Anggiansah C. Colorectal cancer. *BMJ*. 2007 Oct 6;335(7622):715–8.
3. Navarro M, Nicolas A, Ferrandez A, Lanas A. Colorectal cancer population screening programs worldwide in 2016: An update. *World J Gastroenterol*. 2017 May 28;23(20):3632–42.
4. Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, Seufferlein T, Sung JJ, Boelens PG, et al. Colorectal cancer. *Nat Rev Dis Prim*. 2015 Nov 5;1:15065.
5. Sagaert X, Vanstapel A, Verbeek S. Tumor Heterogeneity in Colorectal Cancer: What Do We Know So Far? *Pathobiology*. 2018;85(1–2):72–84.
6. Clinical update Colorectal cancer. 2016;(25):2016.
7. Johdi NA, Sukor NF. Colorectal Cancer Immunotherapy: Options and Strategies. *Front Immunol*. 2020;11(September):1–18.
8. Zhao Y, Ge X, He J, Cheng Y, Wang Z, Wang J, et al. The prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer differs by anatomical subsite: a systematic review and meta-analysis. *World J Surg Oncol*. 2019;17(1):85.
9. Zhou R, Zhang J, Zeng D, Sun H, Rong X, Shi M, et al. Immune cell infiltration as a biomarker for the diagnosis and prognosis of stage I-III colon cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2018/12/19. 2019 Mar;68(3):433–42.
10. Gould CM, Courtneidge SA. Regulation of invadopodia by the tumor microenvironment. *Cell Adh Migr*. 2014;8(3):226–35.
11. Spencer KR, Wang J, Silk AW, Ganesan S, Kaufman HL, Mehnert JM. Biomarkers for Immunotherapy: Current Developments and Challenges. *Am Soc Clin Oncol Educ B*. 2016 May 1;(36):e493–503.
12. Chew V, Toh HC, Abastado J-P. Immune Microenvironment in Tumor Progression: Characteristics and Challenges for Therapy. Benencia F, editor. *J Oncol*. 2012;2012:608406.
13. Chin D, Boyle GM, Parsons PG, Coman WB. What is transforming growth factor-beta (TGF- β)? *Br J Plast Surg*. 2004;57(3):215–21.
14. Lifshitz V, Frenkel D. Tgf-B. In: *Handbook of Biologically Active Peptides*. 2013. p. 1647–53.

15. David CJ, Massagué J. Contextual determinants of TGF β action in development, immunity and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19(7):419–35.
16. Khalil N. TGF- β : From latent to active. *Microbes Infect.* 1999;1(15):1255–63.
17. Lin SJ, Lerch TF, Cook RW, Jardetzky TS, Woodruff TK. The structural basis of TGF- β , bone morphogenetic protein, and activin ligand binding. *Reproduction.* 2006;132(2):179–90.
18. Grütter C, Wilkinson T, Turner R, Podichetty S, Finch D, McCourt M, et al. A cytokine-neutralizing antibody as a structural mimetic of 2 receptor interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A [Internet].* 2008/12/10. 2008 Dec 23;105(51):20251–6.
19. Massagué J. TGFbeta in Cancer. *Cell [Internet].* 2008 Jul 25;134(2):215–30.
20. Liu T, Feng X-H. Regulation of TGF-beta signalling by protein phosphatases. *Biochem J [Internet].* 2010 Sep 1;430(2):191–8.
21. Derynck R, Zhang Y, Feng XH. Smads: Transcriptional activators of TGF- β responses. *Cell.* 1998;95(6):737–40.
22. Attisano L, Lee-Hoeflich ST. The Smads. *Genome Biol.* 2001/08/02. 2001;2(8):REVIEWS3010–REVIEWS3010.
23. Jakowlew SB. Transforming growth factor- β in cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2006;25(3):435–57.
24. Slingerland J. Transforming growth factor- β and breast cancer: Introduction. *Breast Cancer Res.* 2000;2(2):91.
25. Siegel PM, Massagué J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF- β in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(11):807–20.
26. Yingling JM, Blanchard KL, Sawyer JS. Development of TGF- β signalling inhibitors for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(12):1011–22.
27. Neel J-C, Humbert L, Lebrun J-J. The Dual Role of TGF β in Human Cancer: From Tumor Suppression to Cancer Metastasis. *ISRN Mol Biol.* 2012;2012:1–28.
28. Villalba M, Evans SR, Vidal-Vanaclocha F, Calvo A. Role of TGF- β in metastatic colon cancer: it is finally time for targeted therapy. *Cell Tissue Res.* 2017;370(1):29–39.
29. Guerrero P, McCarty J. TGF- β Activation and Signaling in Angiogenesis. In 2017.
30. Padua D, Massagué J. Roles of TGF β in metastasis. *Cell Res.* 2009;19(1):89–102.
31. Batlle E, Massagué J. Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity.* 2019 Apr 16;50(4):924–40.

32. Tauriello DVF, Palomo-Ponce S, Stork D, Berenguer-Llgero A, Badia-Ramentol J, Iglesias M, et al. TGF β drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis. *Nature*. 2018;554(7693):538–43.
33. Worthington JJ, Klementowicz JE, Travis MA. TGF β : A sleeping giant awoken by integrins. *Trends Biochem Sci*. 2011;36(1):47–54.
34. Hynes RO. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell*. 2002;110(6):673–87.
35. Bendas G, Borsig L. Cancer Cell Adhesion and Metastasis: Selectins, Integrins, and the Inhibitory Potential of Heparins. Gotte M, editor. *Int J Cell Biol*. 2012;2012:676731.
36. Murphy M, Brown G, Wallin C et al. ITGB6 integrin subunit beta 6 [Homo sapiens (human)]No Title. In: Gene Help: Integrated Access to Genes of Genomes in the Reference Sequence Collection. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2006.
37. Anderson LR, Owens TW, Naylor MJ. Structural and mechanical functions of integrins. *Biophys Rev*. 2013/10/08. 2014 Jun;6(2):203–13.
38. Desgrosellier JS, Cheresch DA. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*. 2010 Jan;10(1):9–22.
39. Rampias T, Karagiannis D, Avgeris M, Polyzos A, Kokkalis A, Kanaki Z, et al. The lysine-specific methyltransferase KMT2C/MLL3 regulates DNA repair components in cancer. *EMBO Rep*. 2019/01/21. 2019 Mar;20(3):e46821.
40. Zhang Y, Wei L, Yu J, Li G, Zhang X, Wang A, et al. Targeting of the β 6 gene to suppress degradation of ECM via inactivation of the MAPK pathway in breast adenocarcinoma cells. *Oncol Rep*. 2014/08/20. 2014 Nov;32(5):1787–95.
41. Tian Z, Xi H, Wang X, Feng S, Jia G. Study on the effect of integrin α v β 6 on the proliferation and apoptosis of thyroid carcinoma cells. 2017;22(3):704–8.
42. Bandyopadhyay A, Raghavan S. Defining the role of integrin α v β 6 in cancer. *Curr Drug Targets*. 2009 Jul;10(7):645–52.
43. Seguin J, Doan B-T, Latorre Ossa H, Jugé L, Gennisson J-L, Tanter M, et al. Evaluation of Nonradiative Clinical Imaging Techniques for the Longitudinal Assessment of Tumour Growth in Murine CT26 Colon Carcinoma. Watabe H, editor. *Int J Mol Imaging*. 2013;2013:983534.

44. Castle JC, Loewer M, Boegel S, de Graaf J, Bender C, Tadmor AD, et al. Immunomic, genomic and transcriptomic characterization of CT26 colorectal carcinoma. *BMC Genomics*. 2014;15(1):190.

