

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ανάπτυξη του μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (NSCLC) οφείλεται στην προοδευτική συσσώρευση γενετικών/επιγενετικών μεταβολών, όπως μεταλλάξεις των *KRAS*, *EGFR* και *TP53*, που οδηγούν στην ενεργοποίηση του NF-κΒ (IKKβ-RelA/p65-p50). Ωστόσο, οι μηχανισμοί δράσης του NF-κΒ στην ανάπτυξη του NSCLC είναι ακόμη υπό διερεύνηση. Επομένως, σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση του μηχανισμού δράσης του NF-κΒ RelA/p65 στον NSCLC.

Ανθρώπινα κύτταρα και ιστά NSCLC αναλύθηκαν για τη μελέτη του ρόλου του RelA/p65 στον NSCLC και το μηχανισμό δράσης του σε ανοσοκατασταλμένα ποντίκια που αναλύθηκε με RNA-seq, ανοσοιστοχημεία, qPCR, ανοσοϊστοχημεία και *in vitro* δοκιμασίες.

Σε ανθρώπινα κύτταρα NSCLC μειορρυθμίστηκε η έκφραση του RelA/p65 (RelA/p65KD). Η μειορρύθμιση του RelA/p65 επιβράδυνε τον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη των όγκων ανθρώπινων κυττάρων NSCLC *in vivo* ως ξενομοσχέματα σε ανοσοκατασταλμένα ποντίκια. Ανάλυση RNA-seq ταυτοποίησε γονιδιαστόχους του RelA/p65 που εμπλέκονται στην ανάπτυξη των όγκων. RelA/p65^{KD} είχε ως αποτέλεσμα την αυξορρύθμιση του κατασταλικού γονιδίου της μετάστασης CD82/KAI1/TSKAN27. Ανοσοϊστοχημική και βιοπληροφορική ανάλυση ανθρώπινων δειγμάτων NSCLC κατέδειξε ότι η απώλεια της έκφρασης της CD82 συσχετίζεται με την κακοήθεια. Η μειορρύθμιση του RelA/p65 κατέστειλε την κυτταρική μετανάστευση και την επιθηλιακή-προς-μεσεγχυματική μετατροπή (EMT) των επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων, που οφείλεται, εν μέρει, στην υπερέκφραση της CD82/KAI1, και της σηματοδότησης διαμεσολαβούμενης από ντεγκρίνες που περιλαμβάνει τις μιτογόνες πρωτεΐνες ERK, Akt1 και Rac1.

Συμπερασματικά, η κανονική σηματοδοτική πορεία του NF-κΒ προάγει την ανάπτυξη NSCLC, εν μέρει, μειορρυθμίζοντας την CD82/KAI1 που αναστέλλει την μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων, την EMT και την ανάπτυξη όγκων.

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ

Ευάγγελος Κωλέτσας, Εργαστήριο Γ. Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Παν/μιο Ιωαννίνων, και Τμήμα Βιοιατρικών Ερευνών, ΙΜΒΒ-ΙΤΕ, Ιωάννινα
Email: ekoletas@uoi.gr
Phone: 0030-26510-07578
Website: <https://www.imbb.forth.gr/en/research-en/biomedical-research/Item/5510-evangelos-kolettas>

ER141 - ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΚΑΝΟΝΙΚΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΤΟΥ NF-κΒ ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Ευγενία Ρουπακιά^{1,2}, Γεωργία Καρπαθίου³, Άννα Μπαπιστάτου³, Άννα Γούσια³ και Ευάγγελος Κωλέτσας^{1,2}

¹Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα, ²Τμήμα Βιοιατρικών Ερευνών, Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας & Βιοτεχνολογίας (IMBB), Ίδρυμα Τεχνολογίας & Έρευνας (ΙΤΕ), Ιωάννινα, ³Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι η συχνότερη μορφή καρκίνου με την υψηλότερη θνησιμότητα παγκοσμίως. Κλινικά διακρίνεται στο μη-μικροκυτταρικό (NSCLC) και στο μικροκυτταρικό καρκίνου του πνεύμονα (SCLC) που αντιπροσωπεύουν το ~85% και ~15% όλων των περιπτώσεων, αντίστοιχα. Το αδενοκαρκίνωμα του NSCLC, που αποτελεί τον κύριο ιστοπαθολογικό υπότυπο (~55%), οφείλεται στη συσσώρευση ογκογόνων μεταλλάξεων, όπως μεταλλάξεις στα ογκογονίδια *KRAS* και *EGFR* που οδηγούν στην ενεργοποίηση της κανονικής σηματοδοτικής πορείας του NF-κΒ, IKKβ-p65/p50².

Οι μεταγραφικοί παράγοντες NF-κΒ σχηματίζουν ομο- ή ετερο-διμερή σύμπλοκα από πέντε υπομονάδες. Αποτελούν κύριους ρυθμιστές της γονδιακής έκφρασης και φυσιολογικά εμπλεκονται στη ρύθμιση των προ-φλεγμονωδών και στρεσογόνων κυτταρικών αποκρίσεων. Ενεργοποιούνται διαμέσου δύο κύριων πορειών, της κανονικής και μη-κανονικής πορείας ενεργοποίησης οι οποίες επάγονται από τις κινάσες IKKβ και IKKα αντίστοιχα^{3,4}. Επιπλέον, οι δύο κινάσες εμφανίζουν και ανεξάρτητες δράσεις από την ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων NF-κΒ⁵.

Η κανονική πορεία IKKβ-p65/p50 εμφανίζεται ιδιοστατικά ενεργή σε πολλούς τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του NSCLC², προάγοντας την ανάπτυξη του όγκου. Ωστόσο, στο NSCLC οι μοριακοί μηχανισμοί δράσης της δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως. Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκαν νέοι πιθανοί μηχανισμοί δράσης της κανονικής πορείας ενεργοποίησης του NF-κΒ στο NSCLC.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Καλλιέργεια κυττάρων: Οι κυτταρικές σειρές NSCLC, A549 και H1437 καλλιιεργήθηκαν σε DMEM και RPMI αντίστοιχα, εμπλουτισμένα με 10% ορό, 1% Pen/Strep και 1% L-Gln στους 37°C, 5% CO₂.

Κατασκευή κυτταρικών σειρών: Για την αποξήνωση της υπομονάδας p65 τα κύτταρα επιμολύνθηκαν είτε με το φορέα ελέγχου rSuper-puro, είτε με τον φορέα rSuper-puro-shr65 με τη χρήση λιπιδίων PEI και επιλέχθηκαν σε ποικιλία. Για την υπερέκφραση του CD82 τα κύτταρα επιμολύνθηκαν είτε με το φορέα ελέγχου rMCherry-C1, είτε με τον φορέα mCherry-CD82 και επιλέχθηκαν σε νεομικτή.

Ξενομοσχέματα *in vivo*: 2 x 10⁶ κύτταρα σε 200 μl PBS εμβολιάστηκαν υποδόρια σε ανοσοκατασταλμένους μύες NSG (NOD-SCID-IL2Rgamma) ηλικίας 5 εβδομάδων. Τα ζώα εμβολιάστηκαν αμφότερα με κύτταρα A549-rp65^{KD} και H1437rp65^{KD} και τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου.

RNAseq: Οι βιβλιοθήκες RNA-Seq παρασκευάστηκαν με το TruSeq RNA v2 kit της Illumina. Η αλληλοψήφισή πραγματοποιήθηκε με το NextSeq500 sequencer της Illumina και ακολουθήσε βιοπληροφορική ανάλυση.

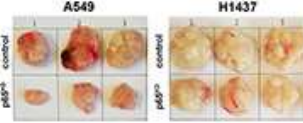
qRT-PCR: πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται⁶

Ανοσοϊστοχημεία: Τομές ιστών πάχους 2 μm μονοποτιμώμενες σε παραφινί επεξεργάστηκαν αρχικά με το PT Link pre-treatment system και ακολουθώντας ανοσοιστοχημική χροιά των τομών με τη χρήση του Autostainer Link automated immunohistochemistry system με αντισώμα ενάντια στο CD82. Τέλος οι τομές επώασθησαν με αιματοξυλίνη.

Scratch assay: Σε καλλιιεργούμενα κύτταρα σε πλήρες πραγματοποιήθηκε μια αμυχή και τότε παρακολούθηθηκε ο ρυθμός κάλυψης της αμυχής. **Ανοσοιστοχημεία κατά Western:** πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται⁶

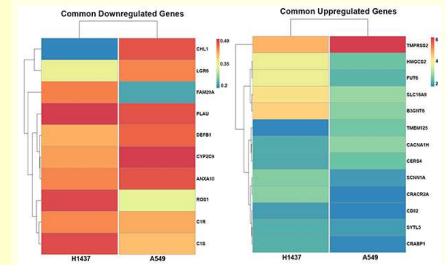
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η κανονική πορεία του NF-κΒ προάγει την ανάπτυξη του NSCLC *in vivo*. Η αποξήνωση του μεταγραφικού παράγοντα p65 στα κύτταρα A549 και H1437 και η ακόλουθη ανάπτυξη τους σε ανοσοκατασταλμένα ποντίκια ως ξενομοσχέματα *in vivo*, είχε σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη σημαντικά μικρότερων όγκων (Εικ. 1.)



Εικ. 1. Αντιπροσωπευτικές εικόνες των όγκων των κυττάρων A549-rp65^{KD} και H1437-rp65^{KD} και των κυττάρων ελέγχου που αναπτύχθηκαν ως ξενομοσχέματα *in vivo* (n=5).

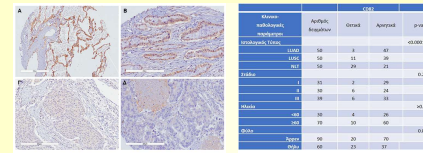
Η υπομονάδα p65 ρυθμίζει την έκφραση της τετρασπανίνης CD82. Δείγματα RNA από τους όγκους που αναπτύχθηκαν αναλύθηκαν με RNAseq. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν τη μεταβολή στην έκφραση μιας σειράς γονιδίων (Εικ. 2) μεταξύ των οποίων και το γονίδιο που κωδικοποιεί την τετρασπανίνη CD82, που έχει χαρακτηριστεί ως καταστολέας της μετάστασης.



Εικ. 2. Χάρτες θερμότητας (Heat maps) που απεικονίζουν τα κοινά γονίδια που παρουσιάζουν διαφορική έκφραση έπειτα από την αποξήνωση της υπομονάδας p65 στα κύτταρα A549 και H1437.

Τα επίπεδα του CD82 μειώνονται σημαντικά σε ασθενείς NSCLC. Η έκφραση του CD82 μελετήθηκε ανοσοϊστοχημικά σε 50 δείγματα φυσιολογικού ιστού πνεύμονα, 50 δείγματα ασθενών με αδενοκαρκίνωμα NSCLC (LUAD), και 50 δείγματα ασθενών με καρκίνωμα του πλακώδους επιθηλίου του NSCLC (LUSC). Η ανοσοϊστοχημική ανάλυση κατέδειξε τη στατιστικά σημαντική απώλεια της έκφρασης του αντιγόνου CD82 στους ασθενείς με LUAD και LUSC σε σύγκριση με τα δείγματα του φυσιολογικού ιστού, ενώ σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε και μεταξύ του ιστολογικού τύπου της νόσου. Αντίθετα, καμία σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε στην έκφραση του CD82 αναφορικά με το φύλο, την ηλικία ή το στάδιο της νόσου (Εικ. 3 και Πίνακας 1).

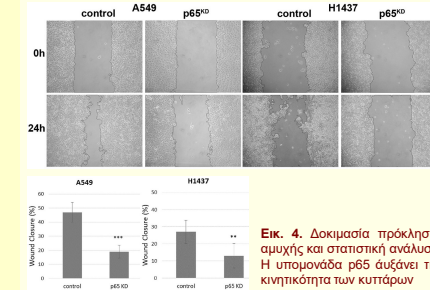
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικ. 3. Ανοσοϊστοχημική έκφραση του CD82. (Α) Φυσιολογικός ιστός, (Β, Δ) Θητικό και αρνητικό δείγμα αντιστοίχα ασθενών με LUAD, (Γ) Αρνητικό δείγμα ασθενή με LUSC.

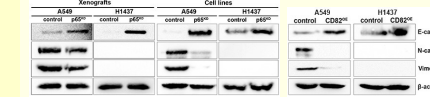
Κατάσταση	Αρσφίς	Οσάφ	Αρσφίς	Οσάφ
control	100	100	100	100
LUAD	10	15	20	25
LUSC	10	15	20	25

Ο μεταγραφικός παράγοντας p65 προάγει τη μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων. Για τη μελέτη της μεταναστευτικής ικανότητας των κυττάρων πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία πρόκλησης αμυχής (scratch assay), όπου παρατηρήθηκε ότι η υπομονάδα p65 προάγει την κινητικότητα των κυττάρων (Εικ. 4).



Εικ. 4. Δοκιμασία πρόκλησης αμυχής και στατιστική ανάλυση. Η υπομονάδα p65 αυξάνει την κινητικότητα των κυττάρων

Επιπλέον, μελετήθηκε η επίδραση τόσο του p65 όσο και του CD82 στην έκφραση δεικτών της επιθηλιακής προς μεσεγχυματικής μετατροπής (EMT) που αποτελεί ένα από τα πρώτα στάδια της διαδικασίας της μετάστασης. Τόσο η μειορρύθμιση του p65 όσο και η υπερέκφραση του CD82 αναστέλλουν τη διαδικασία της EMT καθώς προάγουν την έκφραση του επιθηλιακού δείκτη E-κατερίνη ενώ καταστέλλουν τους μεσεγχυματικούς δείκτες N-κατερίνη και βιμεντίνη (Εικ. 5).



Εικ. 5. Ανοσοιστοχημική κατά western για την έκφραση της E-κατερίνης, της N-κατερίνης και της βιμεντίνης σε κύτταρα A549 και H1437 τα οποία υποεκκράζουν τον παράγοντα p65 ή υπερεκκράζουν την τετρασπανίνη CD82.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε ο μηχανισμός δράσης της κανονικής πορείας IKKβ-RelA/p65 στην ανάπτυξη του ανθρώπινου NSCLC. Για το σκοπό αυτό κατασκευάστηκαν κύτταρα p65^{KD} τα οποία εμβολιάστηκαν σε αδύναμους μύες για την ανάπτυξη όγκων. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν ότι η υπομονάδα p65 προάγει την ανάπτυξη του NSCLC *in vivo*, σύμφωνα και με προηγούμενες μελέτες^{3,9}.

Με σκοπό την ταυτοποίηση νέων πιθανών γονιδίων στόχων του παράγοντα p65 απομονώθηκαν ολικά δείγματα RNA από τους όγκους που αναπτύχθηκαν τα οποία αναλύθηκαν με RNAseq. Μεταξύ των γονιδίων ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε το γονίδιο *CD82/KAI1*, που κωδικοποιεί μια τετρασπανίνη και του οποίου η έκφραση παρατηρήθηκε αυξημένη, καθώς έχει συσχετιστεί με διάφορες μορφές καρκίνου συμπεριλαμβανομένου του NSCLC. Πράγματι, μελέτη της έκφρασης του CD82 ανοσοϊστοχημικά σε ένα σύνολο ασθενών με NSCLC κατέδειξε ότι η κινητικότητα των κυττάρων στο δείγμα ασθενών με κακοήθεια σε σύγκριση με το φυσιολογικό ιστό.

Η τετρασπανίνη CD82 έχει χαρακτηριστεί ως καταστολέας της μετάστασης¹⁰, επομένως μελετήθηκε η κινητικότητα των κυττάρων αλλά και κύριοι δείκτες της EMT, της κεντρικής διαδικασίας έναρξης της μετάστασης. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν ότι τόσο η μειορρύθμιση της υπομονάδας p65 όσο και η υπερέκφραση του CD82 (δεν παρουσιάζεται) αναστέλλουν την κινητικότητα των κυττάρων και τη διαδικασία της EMT.

Συνολικά, παρουσιάζεται ένας νέος μηχανισμός δράσης της υπομονάδας p65 στο NSCLC διαμέσου της μείωσης των επιπέδων έκφρασης της τετρασπανίνης CD82.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Η πορεία IKKβ-RelA/p65 προάγει την ανάπτυξη του NSCLC *in vivo*.
- Ο μεταγραφικός παράγοντας p65 προάγει την ανάπτυξη του NSCLC *in vitro* και *in vivo*, εν μέρει, διαμέσου της καταστολής της έκφρασης του καταστολέα της μετάστασης CD82
- Η αποξήνωση του μεταγραφικού παράγοντα p65 ή η υπερέκφραση του CD82 καταστέλλουν την κινητικότητα των κυττάρων αλλά και τη διαδικασία της EMT
- Η έκφραση του CD82 χάνεται σε δείγματα ασθενών με LUAD και LUSC σε σύγκριση με φυσιολογικό δείγματα πνεύμονα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Herbst et al (2008) *N Engl J Med* 359:1367-80
- Chen et al (2011) *Front Biosci* 16:1172-85
- Perkins ND (2007) *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:49-62
- Perkins ND (2012) *Nat Rev Cancer* 12:321-32
- Chariot A (2009) *Trends Cell Biol* 19:404-13
- Chavoula E et al (2019) *Life Sci Alliance* 2(6)
- Meylan E et al (2019) *Nature* 462(7269):104-7
- Xia Y et al (2012) *Nat Cell Biol* 14(3):257-65;
- Stathopoulos GT et al (2007) *Proc Natl Acad Sci USA* 104(47):18514-9
- Liu WM (2006) *Cancer Lett.* 240(2):183-94

Χρηματοδότηση: Μοριακή Ανάλυση Βιολογικών – BIOMEDTECH του προγράμματος «Ερευνητικές Δραστηριότητες στη Βιοιατρική Τεχνολογία & Αγροδιατροφή - Ηπειρος» (ΒΙΤΑΔ) με κωδικό ΟΠΣ (MIS) 5002469 (IMBB-ITE), ΕΣΠΑ 2014-20