



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ
ΔΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ-ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΜΟΡΙΑΚΗ-ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»



Πανεπιστήμιο
Ιωαννίνων

*«Η συμβολή του θώκου των Καρκινικών Βλαστικών Κυττάρων στη
χημειοανθεκτικότητα – Προοπτικές για επιγενετική θεραπεία»*

*«Contribution of the Cancer Stem Cell-niche in drug resistance-Perspectives
for epigenetic therapy»*

ΚΟΡΔΙΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

Επιβλέπουσα: Αγγελική Μαγκλάρα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας &
Μέλος ΔΕΠ Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών (ΙΒΕ) - ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ (ΙΤΕ)

Πρόλογος

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο της Κλινικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και στο Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών (ΙΒΕ-ΙΤΕ) στα Ιωάννινα, κατά τη χρονική περίοδο 2019-2022, υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας κα Μαγκλάρα.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα μου Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα. Αγγελική Μαγκλάρα που μου έδωσε την ευκαιρία να πραγματοποιήσω τη μεταπτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριο της. Η εμπιστοσύνη που μου έδειξε, η βοήθεια που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας αλλά και η συνεργασία μας σε γενικότερο πλαίσιο είναι πράγματα τα οποία θα με συνοδεύουν καθ' όλη την διάρκεια της επιστημονικής μου πορείας. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα τέσσερα επιπλέον μέλη της πενταμελούς συμβουλευτικής μου επιτροπής, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Γεώργιο Λεονταρίτη, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Παναγιώτη Κούκλη, τον Καθηγητή κ. Ευστάθιο Φριλίγγο και την Καθηγήτρια κα. Θωμαή Παπαμαρκάκη, για τη βοήθεια και τις συμβουλές τους κατά τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλλαν στη διεξαγωγή των πειραμάτων για την παρούσα εργασία. Ειδικότερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά το μεταδιδακτορικό ερευνητή Ιωάννη Βερίγο και την υποψήφια διδάκτορα Κατερίνα Βλατάκη τόσο για την στήριξή τους σαν συνεργάτες αλλά και σαν φίλοι. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου μας, τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Στυλιανή Παπαδάκη, το μεταπτυχιακό φοιτητή Λευτέρη Σινάνη και τη μεταπτυχιακό φοιτήτρια Ιωάννα Ζηκοπούλου, για τη βοήθεια τους όλα αυτά τα χρόνια.

Επιπροσθέτως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου και ιδιαίτερα την Κατερίνα και το Γιάννη, που ήταν εκεί όποτε και αν τους χρειάστηκα όλα αυτά τα χρόνια. Ωστόσο, το μεγαλύτερο ευχαριστώ θα ήθελα να το πω στους γονείς μου Άννα και Γιώργο αλλά και στον αδελφό μου Παναγιώτη, που πιστεύουν σε μένα και με στηρίζουν κάθε μέρα σε ότι απόφαση και να πάρω.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	4
Abstract	5
Εισαγωγή	6
1.1 Ο Καρκίνος του μαστού.....	6
1.2 Ετερογένεια του Καρκίνου του μαστού	6
1.3 Μοντέλα καρκινικής ετερογένειας	10
1.4 Ιδιότητες των Καρκινικών Βλαστικών κυττάρων – Ανθεκτικότητα στις συμβατικές μορφές θεραπείας	12
1.4.1. Οι μηχανισμοί που συμβάλλουν στη χημειοανθεκτικότητα των ΚΒΚ	14
1.5 Καρκινικά βλαστικά κύτταρα	17
1.6 Επιγενετική	20
1.6.1 Επιγενετικοί μηχανισμοί	20
1.6.2 Απορρύθμιση επιγενετικών τροποποιήσεων και Καρκίνος.....	21
1.6.3 Τροποποιήσεις Ιστονών – Μεθυλίωση/Απομεθυλίωση Ιστονών.....	22
1.6.4 Επιγενετικοί ρυθμιστές και ΚΒΚ	24
1.7 Η οικογένεια απομεθυλασών KDM5.....	26
1.7.1 KDM5A.....	28
1.7.2 KDM5B.....	29
1.7.3 KDM5C και KDM5D.....	30
1.8 Χημειοανθεκτικότητα και KDM5 απομεθυλάσες	30
Σκοπός της εργασίας	33
2. Υλικά και Μέθοδοι	34
2.1 Κυτταροκαλλιέργεια.....	34
2.1.1 Καρκινικές κυτταρικές σειρές σου μαστού	34
2.1.2 Συνθήκες καλλιέργειας προσκολλημένων κυττάρων	35
2.1.3 Mammosphere Formation Assay (M.F.A)	35
2.1.4 Καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων του μαστού σε συνθήκες τρισδιάστατης καλλιέργειας-Matrigel.....	36
2.1.5 Συγκαλλιέργεια MCF-7 κυττάρων και CAFs	36
2.1.6 Χημικά Φάρμακα – Αναστολείς	36
2.2 Μοριακές και Βιοχημικές τεχνικές	40
2.2.1 Έμμεσος ανοσοφθορισμός.....	40
2.2.2 Συνεστιακή μικροσκοπία.....	40
2.3 Κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry).....	40
3. Αποτελέσματα	43

3.1 Εγκαθίδρυση και χαρακτηρισμός <i>in vitro</i> τρισδιάστατων (3D) συστημάτων καλλιέργειας, εμπλουτισμένων σε καρκινικά βλαστικά κύτταρα, προερχόμενα από την καρκινική σειρά του μαστού MCF-7	43
3.1.1 Εγκαθίδρυση <i>in vitro</i> τρισδιάστατων (3D) συστημάτων καλλιέργειας.....	43
3.1.2 Ικανότητα σχηματισμού σφαιρικών δομών μεταξύ των διαφορετικών συστημάτων 3D καλλιέργειας.....	44
3.1.3 Εμπλουτισμός των συστημάτων σε KBK μαστού - CD44 ⁺ /CD24 ^{-/low}	44
3.1.4 Ταυτοποίηση καρκινικών ινοβλαστών στο <i>in vitro</i> τρισδιάστατο σύστημα συγκαλλιέργειας.....	46
3.2 Μελέτη της χημειοανθεκτικότητας στα διάφορα συστήματα 3D καλλιέργειας KBK...	48
3.3 Η KDM5 απομεθυλάση ιστονών είναι ένας πιθανός θεραπευτικός στόχος στα KBK του μαστού.....	51
3.3.1 Η φαρμακολογική αναστολή των KDM5 στοχεύει τα KBK του μαστού.....	51
3.3.2 Επίδραση της συνδυαστικής χορήγησης του αναστολέα των KDM5 απομεθυλασών με Δοξορουβικίνη και Πακλιταξέλη σε MCF-7 σφαιροειδή	54
4. Συζήτηση.....	60
5. Βιβλιογραφία.....	67

Περίληψη

Ο καρκίνος του μαστού είναι ο πιο συχνός και πιο θανατηφόρος καρκίνος στις γυναίκες παγκοσμίως. Η ετερογένεια της νόσου αποτελεί εμπόδιο στην ανάπτυξη αποτελεσματικών θεραπειών, που να οδηγούν στην οριστική εξάλειψη των όγκων αυτών. Τα Καρκινικά Βλαστικά Κύτταρα (KBK) αποτελούν έναν κυτταρικό υποπληθυσμό του όγκου, ο οποίος χαρακτηρίζεται από τις ιδιότητες της αυτο-ανανέωσης και της διαφοροποίησης. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των κυττάρων αυτών είναι η αυξημένη ανθεκτικότητα στις συμβατικές αντικαρκινικές θεραπείες, με αποτέλεσμα να εμπλέκονται στην υποτροπή της νόσου και στην εμφάνιση μεταστάσεων σε διάφορους τύπους καρκίνου, μεταξύ των οποίων και σε αυτόν του μαστού.

Τα KBK εδράζονται σε θώκους, οι οποίοι αποτελούνται από κυτταρικά συστατικά, όπως μη βλαστικά καρκινικά κύτταρα, ανοσοποιητικά κι ενδοθηλιακά κύτταρα και καρκινικούς ινοβλάστες, αλλά και από μη κυτταρικά συστατικά, όπως εξωκυττάρια μήτρα (ΕΚΜ), κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες. Μελέτες έχουν δείξει ότι η αλληλεπίδραση των συστατικών του θώκου με τα KBK συντελεί στη συντήρηση και αυτο-ανανέωση του πληθυσμού αυτού, καθώς και στην χημειοανθεκτικότητά του.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η εγκαθίδρυση και ο χαρακτηρισμός τρισδιάστατων συστημάτων κυτταροκακαλλιέργειας εμπλουτισμένων σε KBK μαστού, που ενσωματώνουν και συστατικά του θώκου, με στόχο την ανάπτυξη *in vitro* μοντέλων, που προσομοιάζουν περισσότερο τις *in vivo* συνθήκες. Υποθέσαμε ότι στα μοντέλα αυτά οι λειτουργικές ιδιότητες των KBK θα διαφέρουν σε σύγκριση με αυτές που εμφανίζουν στα απλά συστήματα των tumorspheres (σφαιρικές δομές εμπλουτισμένες σε KBK) και για το σκοπό αυτό ελέγχθηκε η απόκρισή τους σε διάφορα χημειοφάρμακα. Χρησιμοποιήσαμε την MCF7 καρκινική σειρά μαστού κι εγκαθιδρύσαμε δύο συστήματα 3D καλλιέργειας, ένα με την χρήση Matrigel – που περιέχει υλικά της ΕΚΜ- και ένα συγκαλλιέργειας καρκινικών κυττάρων με καρκινικούς ινοβλάστες. Και τα δύο αυτά συστήματα ήταν πιο εμπλουτισμένα σε KBK σε σύγκριση με τα tumorspheres που μεγαλώνουν σε εναιώρημα. Επιπροσθέτως, τα συστήματα αυτά έδειξαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε δύο ευρέως χρησιμοποιούμενα χημειοφάρμακα στον καρκίνο του μαστού, τη δοξορουβικίνη και την πακλιταξέλη.

Δεδομένου ότι επιγενετικοί μηχανισμοί φαίνεται να ελέγχουν τις ιδιότητες των KBK, η συνδυαστική χορήγηση αντι-καρκινικού φαρμάκου και επιγενετικού αναστολέα, που μπορεί να στοχεύει ειδικά τα KBK, εκτιμάται ότι μπορεί να επιφέρει καλύτερα θεραπευτικά αποτελέσματα. Στην παρούσα εργασία ελέγχθηκε η δράση ενός αναστολέα κατά της απομεθυλάσης ιστονών KDM5 κι επιβεβαιώθηκε ότι στοχεύει τα KBK μαστού *in vitro*. Η συνδυαστική χορήγηση του αναστολέα με τα χημειοφάρμακα δοξορουβικίνη ή πακλιταξέλη ήταν ακόμα πιο αποτελεσματική στα 3D συστήματα σε σύγκριση με τη μονοθεραπεία.

Συμπερασματικά, τα παραπάνω αποτελέσματα αναδεικνύουν το σημαντικό ρόλο των συστατικών του θώκου στη χημειοανθεκτικότητα των KBK του μαστού, και υπογραμμίζουν την ανάγκη τα *in vitro* συστήματα που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη των KBK να ενσωματώνουν τους παράγοντες αυτούς. Επιπλέον, η αναστολή του επιγενετικού ενζύμου KDM5 φαίνεται να στοχεύει τα KBK μαστού κι ενδεχομένως να αποτελεί μια νέα θεραπευτική οδό για την πιο αποτελεσματική καταπολέμηση του καρκίνου αυτού.

Abstract

Breast cancer is the most common and most fatal cancer in women worldwide. The heterogeneity of the disease presents a hurdle to the development of effective treatments that can lead to permanent tumor elimination. Cancer Stem Cells (CSCs) constitute a rare tumor subpopulation, which is characterized by the properties of self-renewal and differentiation. An important feature of these cells is their increased resistance to conventional anti-cancer therapies, thus they have been involved in tumor recurrence and the development of metastases in various types of cancer, including breast cancer.

CSCs are located in a niche, which is composed of cellular components, such as non-stem cancer cells, immune and endothelial cells and cancer fibroblasts, but also of non-cellular components, such as extracellular matrix (ECM), cytokines and growth factors. Studies have shown that the interaction of the niche components with the CSCs contributes to the maintenance and self-renewal of this population, as well as to its therapy resistance.

The purpose of this dissertation was the establishment and characterization of three-dimensional cell culture systems enriched in breast CSCs, which incorporate niche components aiming to develop in vitro models that more closely resemble the in vivo conditions. We hypothesized that in these models the functional properties of CSCs would differ from those displayed in the simpler tumorsphere systems (spherical structures enriched in CSCs) and for this purpose their response to various chemotherapeutic drugs was tested. We used the MCF7 breast cancer line and established two 3D culture systems, the first one incorporating Matrigel - which mimics the ECM - and the second one by co-culturing cancer cells with cancer fibroblasts. Both systems were more enriched in CSCs compared to tumorspheres grown in suspension. In addition, these systems showed higher resistance to two of the most widely used breast cancer chemotherapeutic agents, doxorubicin and paclitaxel.

Since epigenetic mechanisms appear to control the properties of CSCs, the combined administration of an anti-cancer drug and an epigenetic inhibitor, which specifically targets CSCs, may have better therapeutic effects. In the present study, the activity of an inhibitor against the histone demethylase KDM5 was tested and it was confirmed that it targets breast CSCs in vitro. Co-administration of the inhibitor with the chemotherapeutic drugs doxorubicin or paclitaxel was even more effective in the 3D systems compared to monotherapy.

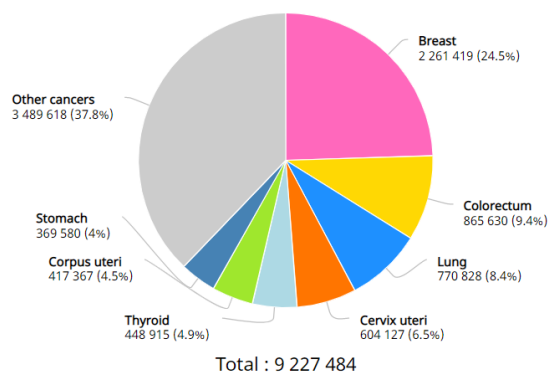
In conclusion, the above results highlight the important role of the niche components in the chemoresistance of breast CSCs and underline the need for the employment of systems that incorporate these factors for the in vitro study of CSCs. In addition, inhibition of the epigenetic enzyme KDM5 appears to target breast CSCs and may be a new therapeutic avenue for the more effective management of the disease.

Εισαγωγή

1.1 Ο Καρκίνος του μαστού

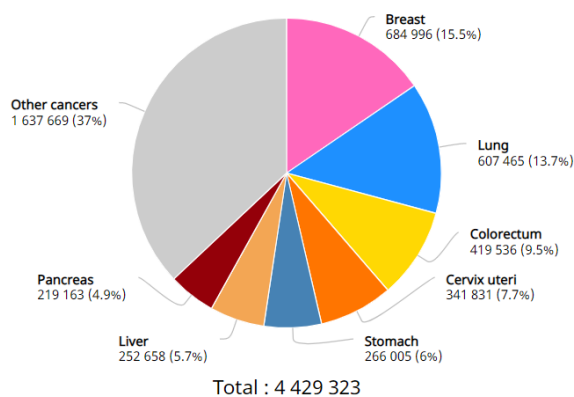
Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί την πιο συχνά διαγνωσθείσα κακοήθεια και στα δύο φύλα παγκοσμίως, ενώ το 2020, από τις περίπου 2.300.000 περιπτώσεις γυναικών με καρκίνο του μαστού **(Εικόνα 1.1)** οι 685.000 οδηγήθηκαν στον θάνατο **(Εικόνα 1.2)** [1]. Συγκεκριμένα, στην Ελλάδα, μόλις το 2020, οι καινούριες περιπτώσεις γυναικών με καρκίνο του μαστού έφτασαν κοντά στις 8.000 [2].

Estimated number of new cases in 2020, worldwide, females, all ages



Εικόνα 1.1: Ποσοστά περιπτώσεων ανά καρκίνο μεταξύ των γυναικών παγκοσμίως το 2020 (World Health Organization)

Estimated number of deaths in 2020, worldwide, females, all ages

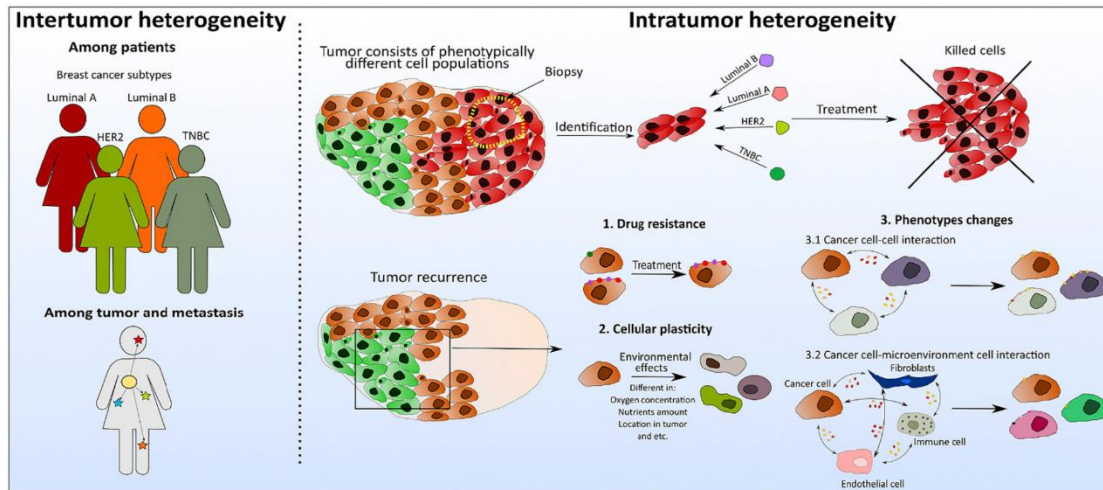


Εικόνα 1.2: Ποσοστά θανάτων ανά καρκίνο μεταξύ των γυναικών παγκοσμίως το 2020 (World Health Organization)

1.2 Ετερογένεια του Καρκίνου του μαστού

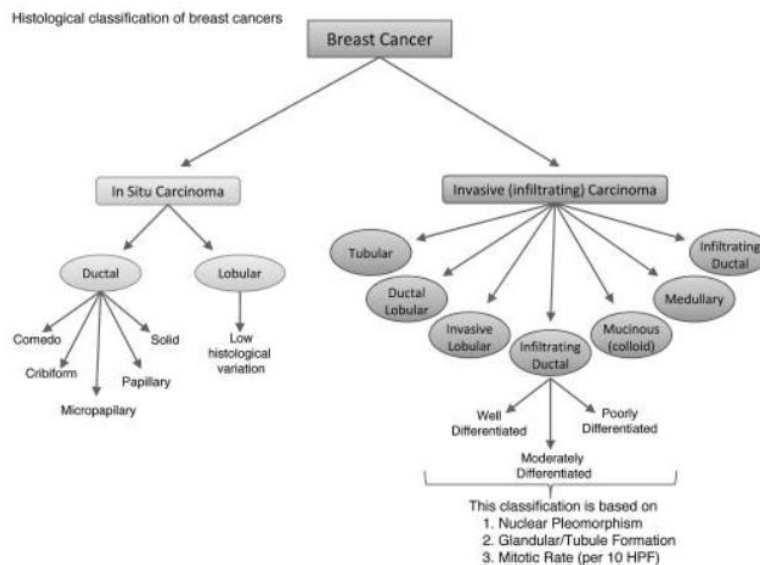
Ο καρκίνος του μαστού είναι μια σύνθετη και ετερογενής ασθένεια, γεγονός το οποίο είναι υπεύθυνο, εν μέρει, για την αποτυχία πολλών θεραπευτικών σχημάτων να εξαλείψουν τη συγκεκριμένη νόσο [3]. Πιο αναλυτικά, η ετερογένεια του καρκίνου του μαστού εμφανίζεται τόσο μεταξύ διαφορετικών ασθενών (ιστοπαθολογική ετερογένεια και ετερογένεια βιοδεικτών), όσο και στην ίδια την ασθενή λόγω της παρουσίας διαφορετικών κυτταρικών υποπληθυσμών που απαρτίζουν έναν συγκεκριμένο όγκο [3]. Ένας συνδυασμός ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων παραγόντων, προερχόμενων από το μικροπεριβάλλον του

όγκου, συμβάλλουν στην εμφάνιση διαφορετικών γενετικών και επιγενετικών υπογραφών μεταξύ των κυττάρων του ίδιου όγκου, που έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση-δημιουργία κυτταρικών πληθυσμών με διαφορετικό φαινότυπο και λειτουργικότητα όσον αφορά την ογκογόνο δράση, ανθεκτικότητα στις συμβατικές μορφές θεραπείας, μεταστατική ικανότητα κτλ (**Εικόνα 1.2**) [4].



Εικόνα 1.2: Ετερογένεια των όγκων μεταξύ διαφορετικών και ίδιων ασθενών. Η γενετική ετερογένεια του καρκίνου του μαστού εμφανίζεται σε πολλαπλά επίπεδα: μεταξύ διαφορετικών ασθενών, μεταξύ πρωτογενών και μεταστατικών εστιών αλλά και μεταξύ μεμονωμένων κυττάρων ενός όγκου [5].

Η ετερογένεια των όγκων του μαστού σε κυτταρικό επίπεδο αντικατοπτρίζεται στην ιστολογική τους ταξινόμηση, ανάλογα με το αν ο όγκος περιορίζεται στα επιθηλιακά κύτταρα του μαστού (in situ) ή έχει εισβάλει (διηθήσει) στο γύρω στρώμα (invasive carcinoma). Περαιτέρω ταξινόμηση γίνεται ανάλογα με το εάν ο όγκος έχει εμφανιστεί στους μαστικούς πόρους (ductal) ή λοβούς (lobular) [6]. Στην **Εικόνα 1.3** φαίνονται οι ταξινομήσεις του καρκίνου του μαστού βασιζόμενες στις ιστολογικές διαφορές.



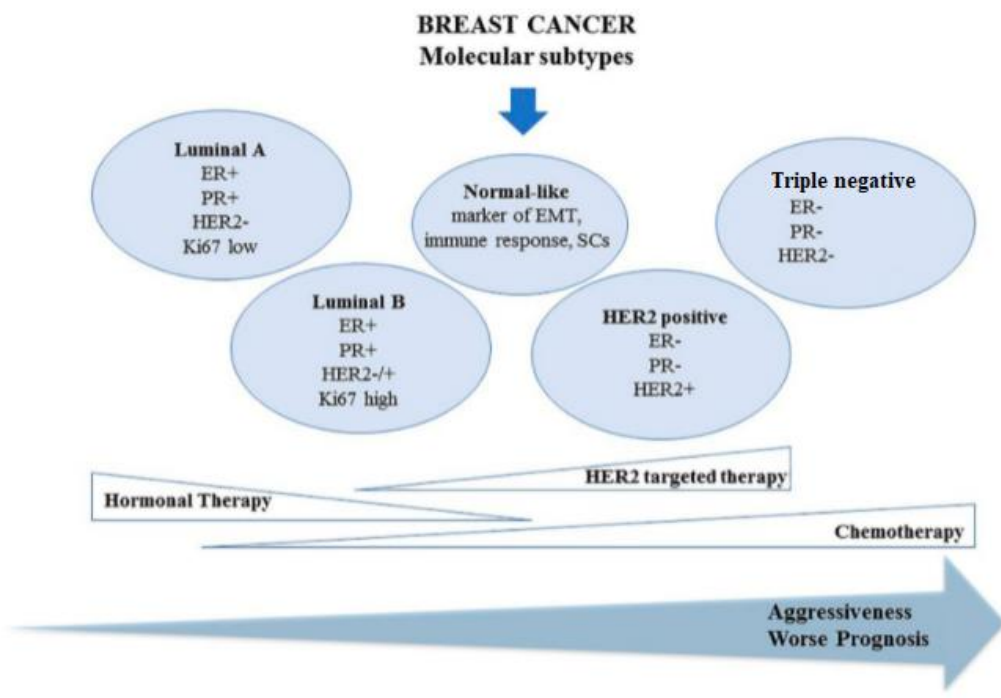
Εικόνα 1.3: Ιστολογική ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού. Το παραπάνω σχήμα κατηγοριοποιεί την ετερογένεια που εντοπίζεται στον καρκίνου του μαστού με βάση τα αρχιτεκτονικά χαρακτηριστικά και τα πρότυπα ανάπτυξης [6].

Όσον αφορά τη μοριακή ταξινόμηση των όγκων μαστού, αυτή βασίζεται στα επίπεδα έκφρασης διαφόρων γονιδίων και κυρίως στην έκφραση τριών καλά μελετημένων βιοδεικτών [7]. Αναλυτικότερα πρόκειται για τον υποδοχέα οιστρογόνων (ER), για τον υποδοχέα προγεστερόνης (PR) και για τον ανθρωπινό αυξητικό επιδερμικό παράγοντα 2 (HER2). Ο διαφορετικός συνδυασμός έκφρασης αυτών των τριών βιοδεικτών έχει ως αποτέλεσμα την ένταξη των όγκων σε διαφορετικούς υποτύπους του καρκίνου του μαστού.

Έτσι, προκύπτουν ο υπότυπος Luminal A (ER^+ , $PR^{+/-}$, $HER2^-$), ο Luminal B (ER^+ , $PR^{+/-}$, $HER2^+$), ο υπότυπος $HER2^+$ (ER^- , PR^- , $HER2^+$) που χαρακτηρίζεται από την έκφραση του υποδοχέα HER2 και ο τριπλά αρνητικός υπότυπος (Triple negative breast cancer - TNBC) που διαχωρίζεται από τους υπόλοιπους λόγω της έλλειψης έκφρασης και των τριών υποδοχέων (ER^- , PR^- , $HER2^-$) [6]. Ο luminal A υπότυπος είναι ο πιο κοινός και περιλαμβάνει περίπου τις μισές από τις νεοδιαγνωσθείσες περιπτώσεις του καρκίνου του μαστού. Το ανοσοϊστοχημικό προφίλ αυτού του υποτύπου περιλαμβάνει χαμηλά επίπεδα έκφρασης του Ki-67, ενώ επίσης χαρακτηριστικό των όγκων αυτών είναι η υψηλή έκφραση κυτταροκερατινών [6]. Από την άλλη, ο luminal B υπότυπος είναι υπεύθυνος για το 20%-30% περίπου των περιπτώσεων με διηθητικό καρκίνου του μαστού και χαρακτηρίζεται από την υψηλή έκφραση του Ki-67 [6]. Η βασική διαφορά μεταξύ των δύο luminal υποτύπων, είναι ότι ο B χαρακτηρίζεται από την υψηλή έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, όπως η NSEP1 (Nuclease sensitive element binding protein 1) και η Cyclin E1 (CCNE1) [6]. Επιπροσθέτως, ο luminal B θεωρείται η πιο επιθετική μορφή υποτύπου που επιδέχεται ορμονοθεραπεία. Ο υπότυπος $HER2^+$, αντιπροσωπεύει το 15%-20% των νεοδιαγνωσθείσων περιπτώσεων με καρκίνου του μαστού, ενώ η ενίσχυση έκφρασης του γονιδίου HER2 και η αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης της, έχει συσχετιστεί με όγκους μεγαλύτερου ιστολογικού βαθμού, υψηλού πολλαπλασιαστικού δυναμικού και αυξημένης τάσης για μετάσταση [7]. Ο TNBC αποτελεί το 10%-15% του συνόλου των πασχόντων και είναι ο πιο επιθετικός τύπος καρκίνου του μαστού

με χαμηλή συνολική επιβίωση και κακή πρόγνωση [7]. Οι όγκοι αυτοί είναι γενικά πιο διαδεδομένοι σε ασθενείς με μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο BRCA1 και σε νεαρές γυναίκες. Χαρακτηριστικό της ετερογένειας του συγκεκριμένου υποτύπου, είναι ότι κατηγοριοποιείται περαιτέρω σε επτά υποτύπους (Basal 1, Basal 2, Luminal androgen receptor type, Immunomodulatory type, Claudin low, Mesenchymal, Mesenchymal like) και καθένας από αυτούς έχει διαφορετική απόκριση στη θεραπεία [7]. Στην **Εικόνα 1.4** φαίνονται οι διαφορετικοί υπότυποι του καρκίνου του μαστού βάσει των μοριακών διαφορών τους.

Όπως επίσης προαναφέρθηκε, ο κάθε υπότυπος έχει διαφορετική πρόγνωση και ανταπόκριση στη θεραπεία. Για παράδειγμα, ο υποδοχέας οιστρογόνων είναι ένας θεραπευτικός στόχος, και κατ' επέκταση οι υπότυποι luminal A και luminal B είναι επιδεκτικοί σε ορμονοθεραπεία [8]. Παρομοίως, ο υπότυπος HER2 είναι πιθανό να ανταποκριθεί σε θεραπεία με το trastuzumab (μονοκλωνικό αντίσωμα κατά του υποδοχέα HER2+). Αντίθετα όμως, οι όγκοι που υπάγονται στον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού (TAKM), περιλαμβάνουν μια ετερογενή ομάδα όγκων μαστού, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από την έλλειψη έκφρασης των υποδοχέων οιστρογόνων (ER) και προγεστερόνης (PR) κι από έλλειψη ενίσχυσης ή υπερέκφρασης του γονιδίου του ανθρώπινου υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2 (HER2) [9]. Ως εκ τούτου, οι TAKM δεν ανταποκρίνονται σε αντι-ορμονική ή αντι-HER2 στοχευμένη θεραπεία, με τη συστηματική χημειοθεραπεία να αποτελεί το κύριο όπλο καταπολέμησης της συγκεκριμένης μορφής καρκίνου [10].

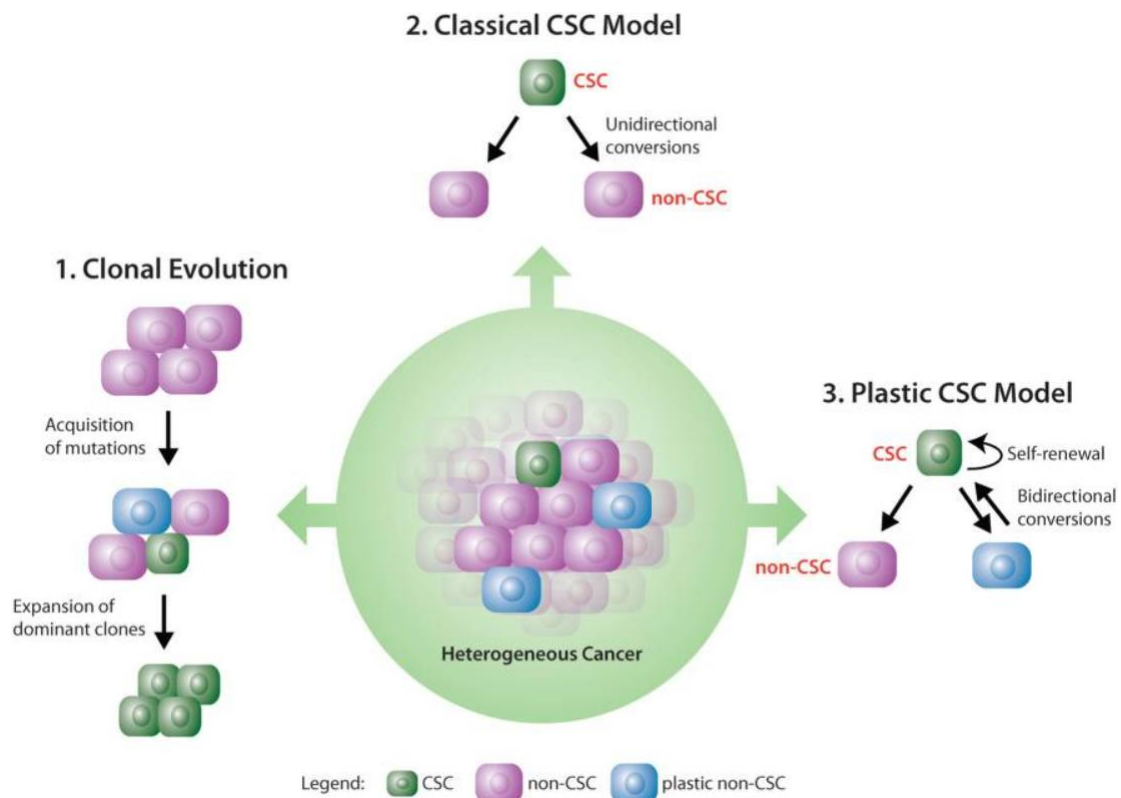


Εικόνα 1.4: Μοριακοί υπότυποι του καρκίνου του μαστού. Μοριακή ταξινόμηση των υποτύπων του καρκίνου του μαστού βασιζόμενη στον συνδυασμό έκφρασης των βιοδεικτών ER, PR και HER2 [11].

Η ετερογένεια λοιπόν του καρκίνου του μαστού, έχει ως άμεσο αντίκτυπο τη διαφορετική ανταπόκριση των ασθενών σε ένα πλήθος θεραπευτικών σχημάτων που εφαρμόζονται σε αυτούς.

1.3 Μοντέλα καρκινικής ετερογένειας

Ένα σημαντικό γεγονός για την κατανόηση της εμφάνισης και της προόδου της νόσου, είναι ότι τα κύτταρα ενός όγκου εκτός από μορφολογική ετερογένεια, χαρακτηρίζονται και από λειτουργική ετερογένεια, όσον αφορά την ικανότητα ογκογένεσης και μετάστασης. Συγκεκριμένα, δύο είναι τα πιθανά μοντέλα που εξηγούν την ετερογένεια μεταξύ των κυττάρων ενός όγκου, το μοντέλο της κλωνικής εξέλιξης (Clonal Evolution) και το μοντέλο των καρκινικών βλαστικών κυττάρων (Cancer Stem Cell Model) (Εικόνα 1.5) [12, 13].



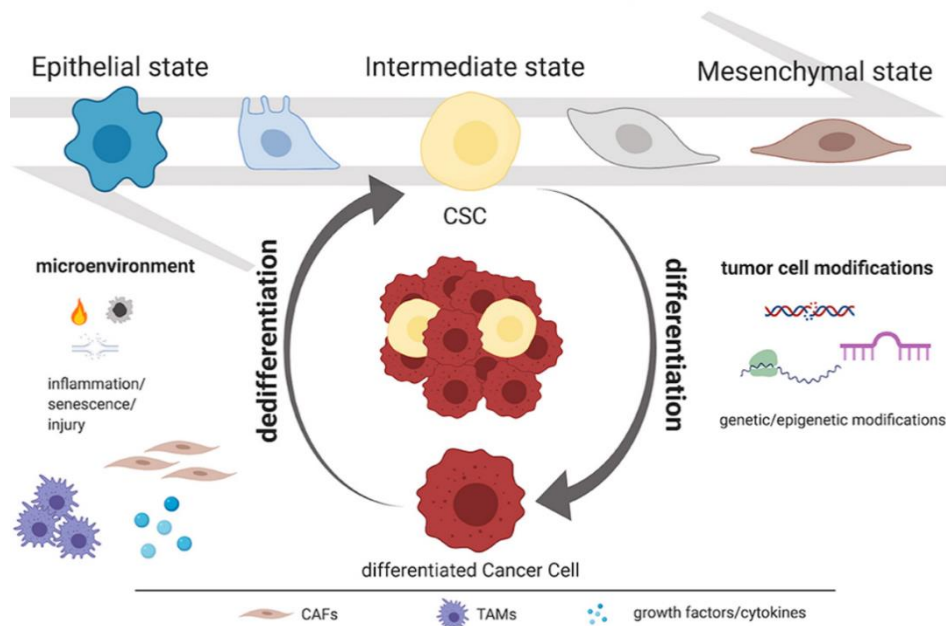
Εικόνα 1.5: Μοντέλα που εξηγούν την ετερογένεια μεταξύ των κυττάρων ενός όγκου. Το μοντέλο της κλωνικής εξέλιξης καθώς και το κλασσικό και πλαστικό μοντέλο των ΚΒΚ, εξηγούν την ετερογένεια μεταξύ των κυττάρων ενός όγκου [14].

Σύμφωνα με το μοντέλο της κλωνικής εξέλιξης, όλα τα κύτταρα ενός όγκου έχουν την ίδια ικανότητα να συνεισφέρουν στην εμφάνιση και ανάπτυξη του όγκου, καθώς όλα είναι βιολογικά ισοδύναμα [15]. Συνεπώς, λόγω της μεγάλης γενετικής αστάθειας που διακρίνει τα καρκινικά κύτταρα, η συσσώρευση διαφόρων γενετικών και επιγενετικών τροποποιήσεων οδηγεί στην εμφάνιση κυτταρικών υποπληθυσμών με διακριτά χαρακτηριστικά από την υπόλοιπη κυτταρική μάζα του όγκου. Τα χαρακτηριστικά αυτά μπορεί να σχετίζονται με την ογκογόνο δράση, το μεταστατικό δυναμικό και την αντοχή στις συμβατικές μορφές θεραπείας. Μέσω λοιπόν αυτών των διαδικασιών, οι τροποποιήσεις αυτές θα παρέχουν ένα εξελικτικό προβάδισμα στα κύτταρα αυτά, και θα είναι εκείνα τα οποία θα αποκτήσουν ένα πλεονέκτημα ανάπτυξης-πολλαπλασιασμού έναντι των υπολοίπων κυττάρων του όγκου που σιγά-σιγά ενδέχεται να εξαφανιστούν [16].

Σύμφωνα με το κλασσικό μοντέλο των καρκινικών βλαστικών κυττάρων (KBK), οι όγκοι θεωρείται ότι είναι οργανωμένοι κατά έναν ιεραρχικό τρόπο, όπου στην κορυφή αυτής της ιεραρχίας βρίσκονται τα KBK, και είναι ικανά να συντηρούν μια δεξαμενή όμοιων κυττάρων, αλλά και να παράγουν περισσότερο διαφοροποιημένους απόγονους, δημιουργώντας τελικά την κυτταρική ετερογένεια, που χαρακτηρίζει τους περισσότερους όγκους [17]. Τα KBK ή καρκινικά κύτταρα που επάγουν τη δημιουργία όγκων (Tumor initiating cells - TICs) αποτελούν έναν ξεχωριστό υποπληθυσμό των όγκων με τα μοναδικά χαρακτηριστικά της αυτο-ανανέωσης και της διαφοροποίησης [15]. Τα πρώτα ισχυρά *in vivo* στοιχεία για την υποστήριξη της θεωρίας των καρκινικών βλαστικών κυττάρων προήλθαν από τους Bonnet και Dick ύστερα από έγχυση κυττάρων ανθρώπινης λευχαιμίας σε μοντέλα ποντικών. Μέσω κυτταρομετρίας ροής (FACS) κατάφεραν να απομονώσουν ένα συγκεκριμένο υποπληθυσμό κυττάρων από ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία (AML) βασιζόμενοι στην έκφραση των δεικτών επιφανείας CD34⁺/CD38⁻. Ο υποπληθυσμός αυτός ήταν ικανός να προκαλέσει οξεία μυελογενή λευχαιμία (AML), ύστερα από έγχυση του σε ανοσοκατασταλμένα ποντίκια (NOD/SCID), σε πολύ μικρότερους αριθμούς σε σχέση με τα υπόλοιπα λευχαιμικά κύτταρα [18]. Από την άλλη, τα πρώτα στοιχεία για την ταυτοποίηση των KBK σε συμπαγείς όγκους προήλθαν το 2003, από μελέτες στον καρκίνο του μαστού, όπου και απομονώθηκε ένα υποσύνολο καρκινικών κυττάρων με το φαινότυπο ESA⁺/CD44⁺/CD24^{-/low} και αποδείχθηκε ότι μόλις 100 τέτοια κύτταρα ήταν υπεύθυνα για την ανάπτυξη όγκων σε ανοσοκατασταλμένα ποντίκια και μάλιστα σε διαδοχικές γενιές [19]. Η ικανότητα σχηματισμού όγκων από κύτταρα με φαινότυπο ESA⁺/CD44⁺/CD24^{-/low} έχει πλέον επιβεβαιωθεί και από άλλες επιστημονικές ομάδες [20]. Μετέπειτα, KBK ταυτοποιήθηκαν σε διάφορους τύπους συμπαγών όγκων, όπως στο παχύ έντερο [21], στον εγκέφαλο [22] κτλ.

Εκτός από το ιεραρχικό μοντέλο των KBK, φαίνεται, σε ορισμένους όγκους, να ισχύει ένα πιο πλαστικό μοντέλο, που περιλαμβάνει τη δημιουργία καρκινικών κυτταρικών πληθυσμών με βλαστικές ιδιότητες από διαφοροποιημένα κύτταρα, μέσω μιας διαδικασίας αποδιαφοροποίησης που επάγεται από παράγοντες του μικροπεριβάλλοντος (**Εικόνα 1.6**). Μια τέτοια κυτταρική διαδικασία είναι και η επιθηλιακή-προς-μεσεγχυματική μετάβαση (Epithelial to Mesenchymal Transition, EMT) [23].

Cancer cell plasticity



Εικόνα 1.6: Μηχανισμοί που επάγουν το πλαστικό μοντέλο των ΚΒΚ. Η ετερογένεια μεταξύ των κυττάρων ενός όγκου, βασίζεται στην ικανότητα τους να μετατοπίζονται μεταξύ βλαστικής και διαφοροποιημένης κατάστασης. Υπεύθυνες για την πλαστικότητα των καρκινικών κυττάρων, μπορεί να είναι οι γενετικές και επιγενετικές τροποποιήσεις καθώς και οι αλληλεπιδράσεις του μικροπεριβάλλοντος [24].

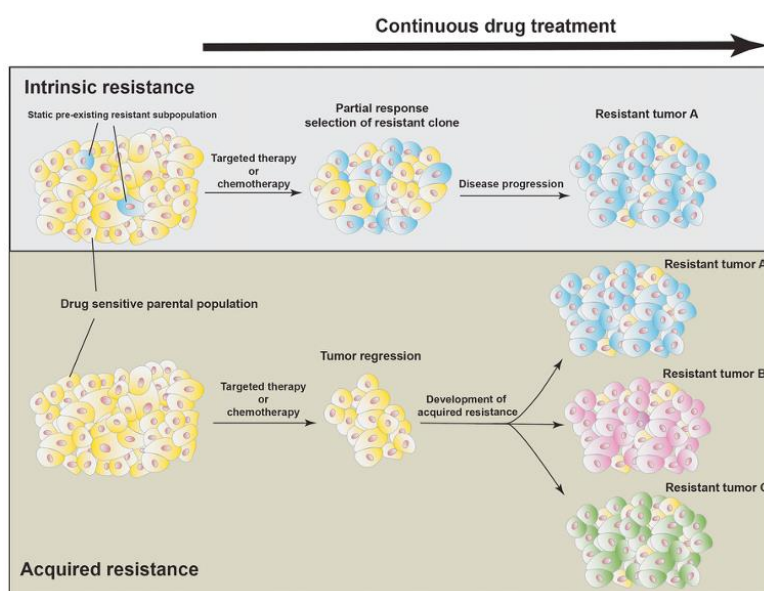
Πιο αναλυτικά, το 2011 η Chaffer και οι συνεργάτες του ταυτοποίησαν έναν πληθυσμό ανθρώπινων καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων του μαστού, ο οποίος μπορούσε να από-διαφοροποιηθεί σε κύτταρα με βλαστικές ιδιότητες, τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε έγχυση σημασμένων $CD44^{low}$ μετασχηματισμένων ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων σε ανοσοκατασταλμένα ποντίκια (NOD/SCID), και μετά από 8-10 εβδομάδες παρατηρήθηκε μέσω πειραμάτων κυτταρομετρίας ροής (FACS) ότι τα $CD44^{low}$ κύτταρα είχαν μετατραπεί σε $CD44^{high}$ [25]. Το γεγονός αυτό υποστηρίζει την ύπαρξη ενός πιο πλαστικού μοντέλου των ΚΒΚ, απ' όπου ΚΒΚ μπορεί να προκύψουν από διαφοροποιημένα καρκινικά κύτταρα [25,26]. Η όλη διαδικασία αυτή, υποστηρίζεται από μια σειρά γεγονότων, καθώς συγκεκριμένα ερεθίσματα επάγουν την επίτευξη αυτού του φαινομένου.

1.4 Ιδιότητες των Καρκινικών Βλαστικών κυττάρων – Ανθεκτικότητα στις συμβατικές μορφές θεραπείας

Παρόλο που η θεραπεία του καρκίνου συνεχώς εξελίσσεται και το προσδόκιμο ζωής έχει αυξηθεί για αρκετούς τύπους καρκίνου, μεγάλα ποσοστά θνησιμότητας οφείλονται στο ότι οι ασθενείς εμφανίζουν συχνά ανθεκτικότητα στις θεραπείες και τελικά υποκύπτουν στη νόσο. Επομένως είναι επιτακτική ανάγκη η κατανόηση των μηχανισμών που συμβάλλουν στην ανάπτυξη της ανθεκτικότητας αυτής και η ανάπτυξη νέων αποτελεσματικών θεραπειών, που θα την υπερνικούν.

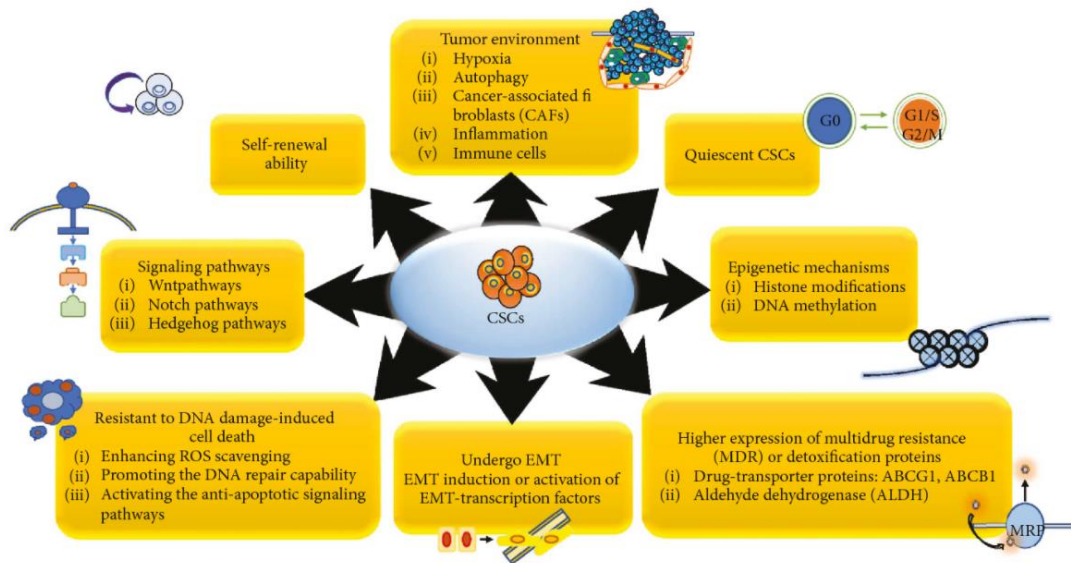
Εκτός των ιδιοτήτων που προαναφέρθηκαν και χαρακτηρίζουν τα ΚΒΚ, δηλαδή την αυτό-ανανέωση και τη διαφοροποίηση, μια ακόμα σημαντική ιδιότητα η οποία και αποτελεί μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον, είναι η αντοχή των κυττάρων αυτών στις συμβατικές μορφές θεραπείας [27]. Συγκεκριμένα, όλο και περισσότερες μελέτες αναδεικνύουν ότι όγκοι που είναι εμπλουτισμένοι σε ΚΒΚ είναι και πιο ανθεκτικοί σε χημειοθεραπεία, αλλά και ότι ύστερα από χημειοθεραπεία, ο εναπομείναν νεοπλασματικός ιστός εμφανίζεται εμπλουτισμένος σε ΚΒΚ [28].

Η ανθεκτικότητα στην χημειοθεραπεία, στη ραδιοθεραπεία ή και την ορμονοθεραπεία μπορεί να είναι εγγενής ή επίκτητη [29]. Η πρώτη οφείλεται σε παράγοντες οι οποίοι προϋπάρχουν στα καρκινικά κύτταρα, και οι παράγοντες αυτοί καθιστούν τα κύτταρα αυτά ανθεκτικά, ενώ η δεύτερη οφείλεται στην εμφάνιση ανθεκτικών κυττάρων ύστερα από την παρατεταμένη χορήγηση αντικαρκινικών φαρμάκων (**Εικόνα 1.7**) [30].



Εικόνα 1.7: Εγγενής και επίκτητη χημειοανθεκτικότητα. Προϋπάρχοντες υποπληθυσμοί εντός του όγκου μπορούν και μεσολαβούν στην εγγενή ανθεκτικότητα έναντι των χημειοφαρμάκων. Αυτοί οι υποπληθυσμοί συχνά φιλοξενούν μεταλλάξεις και είναι αυτοί που θα αποτελέσουν τον κυρίαρχο πληθυσμό και θα συντελέσουν στην εξέλιξη της νόσου. Από την άλλη, όγκοι που αρχικά παρουσιάζουν απόκριση στα χημειοφάρμακα μπορεί μεταγενέστερα να αναπτύξουν ποικίλους μηχανισμούς επίκτητης ανθεκτικότητας [31].

Μελέτες υποδεικνύουν ότι μηχανισμοί που μεσολαβούν τη χημειοανθεκτικότητα, όπως η αυξημένη έκφραση διακυτταρικών πρωτεϊνών εκροής φαρμάκων και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών, η υπερενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών που επιτρέπουν την κυτταρική επιβίωση, οι αποτελεσματικότεροι μηχανισμοί επιδιόρθωσης του DNA, και η αλληλεπίδραση με το μικροπεριβάλλον του όγκου, υπερεκφράζονται ή/και υπερλειτουργούν στα ΚΒΚ (**Εικόνα 1.8**) [27].



Εικόνα 1.8: Μηχανισμοί που συμβάλλουν στη χημειοανθεκτικότητα των ΚΒΚ. Τα ΚΒΚ επιβιώνουν από τις συμβατικές μορφές θεραπείας μέσω υπερέκφρασης/υπερλειτουργίας διακυτταρικών πρωτεϊνών εκροής φαρμάκων, σηματοδοτικών μονοπατιών επιδιόρθωσης του DNA, επιγενετικών τροποποιήσεων και αλληλεπιδράσεων με το μικροπεριβάλλον του όγκου [27].

1.4.1. Οι μηχανισμοί που συμβάλλουν στη χημειοανθεκτικότητα των ΚΒΚ

- Αυξημένη έκφραση διακυτταρικών πρωτεϊνών εκροής φαρμάκων

Η ανθεκτικότητα στα χημειοφάρμακα έχει συσχετιστεί με την παρουσία διάφορων αντλιών, οι οποίες εδράζονται στις μεμβράνες των καρκινικών κυττάρων και είναι υπεύθυνες στην ουσία για την απομάκρυνση των φαρμάκων από το εσωτερικό των κυττάρων. Αυτό επιτρέπει στα καρκινικά κύτταρα να απομακρύνουν τις τοξικές ουσίες οι οποίες θα εισέρχονταν στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα τους. Συγκεκριμένα, η ATP-binding cassette (ABC) οικογένεια μεμβρανικών πρωτεϊνών εμπλέκεται συχνά στη μεταφορά ενώσεων και μικρών μορίων εκτός του κυττάρου. Αυτές οι πρωτεΐνες μεταφορείς διαδραματίζουν φυσιολογικά σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της χημικής ομοιόστασης και της επιβίωσης των κυττάρων σε δυσμενείς συνθήκες και εκφράζονται σε ένα ευρύ φάσμα κυττάρων στο οποίο περιέχονται και τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα [32]. Πιο αναλυτικά, η αυξημένη έκφραση της P-gp (μέλος της ATP-binding cassette), σχετίζεται με την αυξημένη ανθεκτικότητα των κυττάρων σε κοινά χημειοφάρμακα, όπως η Πακλιταξέλη, η Δοξορουβικίνη και τη Βινμπλαστίνη [33, 34,35].

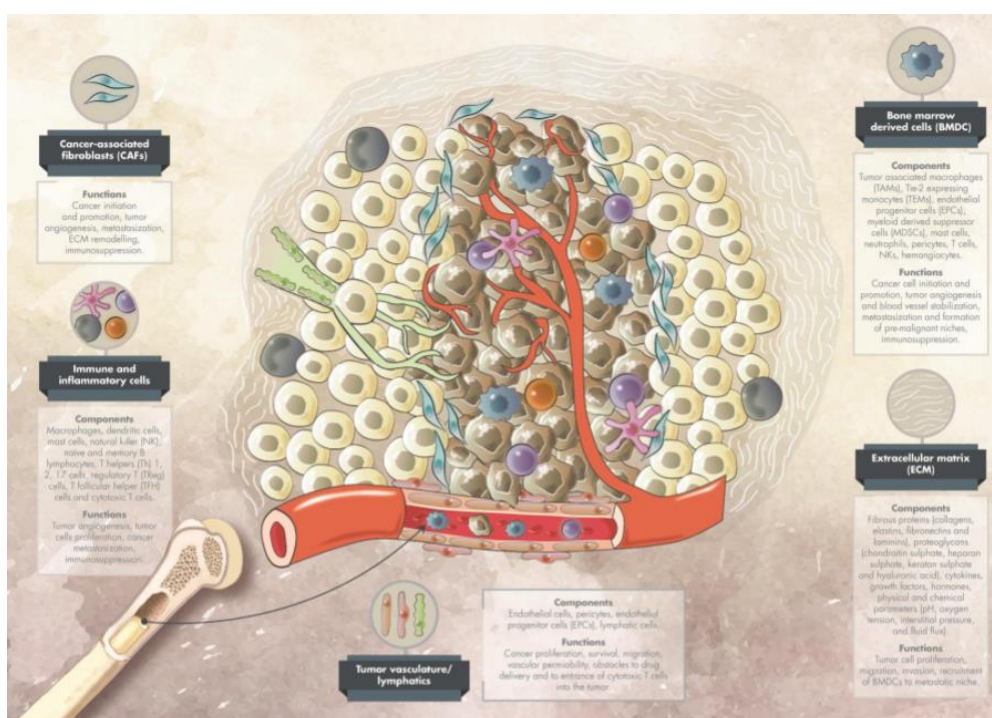
- Αυξημένη έκφραση ενζύμων-γονιδίων που σχετίζονται με την επιδιόρθωση του DNA

Υπάρχουν πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με την αντίσταση των κυττάρων, στην, από επαγόμενη βλάβη του DNA, θανάτωση, και πολλά από αυτά φαίνεται να υπερεκφράζονται στα ΚΒΚ. Συγκεκριμένα, τα ΚΒΚ χαρακτηρίζονται, από αυξημένη ικανότητα αδρανοποίησης των ελευθέρων ριζών (ROS), υψηλή έκφραση επιδιορθωτικών μορίων του DNA μέσω της φωσφορυλίωσης των ATM και CHK1/CHK2, και από ενεργοποίηση διαφόρων αντι-αποπτωτικών σηματοδοτικών μονοπατιών. Αυτά τα μοναδικά χαρακτηριστικά, παρέχουν την ικανότητα προστασίας στα καρκινικά κύτταρα από τον οξειδωτικό θάνατο. Για παράδειγμα, ΚΒΚ τα οποία χαρακτηρίζονται από υψηλή έκφραση του δείκτη επιφανείας

CD44, ένα μόριο το οποίο ρυθμίζει τα ενδοκυττάρια επίπεδα συγκέντρωσης της γλουταθειόνης (GSH), εμφανίζουν υψηλότερα ποσοστά προστασίας έναντι των ελευθέρων ριζών [34]. Στον καρκίνο του μαστού μάλιστα, το επιδιορθωτικό μόριο ATM προσδίδει ανθεκτικότητα έναντι της ραδιοθεραπείας. Επιπλέον, το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch, το οποίο συχνά υπερλειτουργεί στα ΚΒΚ, επίσης επάγει την ραδιοανθεκτικότητα των ΚΒΚ του γλοιοβλαστώματος [35].

➤ Μικροπεριβάλλον του όγκου (niche)

Στα φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα, ένα χωρικά οριοθετημένο μικροπεριβάλλον του οργάνου όπου βρίσκονται, αποτελούμενο από διαφορετικά είδη κυττάρων, είναι υπεύθυνο για την προστασία και τη ρύθμιση της βλαστικότητας τους [36]. Παρόμοια, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, επηρεάζουν τον φαινότυπο πολλών από των καρκινικών κυττάρων που τον απαρτίζουν (Εικόνα 1.9) [37].



Εικόνα 1.9: Συστατικά του μικροπεριβάλλοντος του όγκου . Το μικροπεριβάλλον του όγκου αποτελείται από κυτταρικά (καρκινικοί ινοβλάστες, ενδοθηλιακά κύτταρα, κύτταρα του ανοσοποιητικού) και μη κυτταρικά (εξωκυττάρια μήτρα, κυτοκίνες, αυξητικοί παράγοντες) συστατικά. Το σύνολο των αλληλεπιδράσεων αυτών των συστατικών καθορίζει τον φαινότυπο πολλών από των καρκινικών κυττάρων τον απαρτίζουν [38].

Αναλυτικότερα, το μικροπεριβάλλον του όγκου απαρτίζεται από διάφορους τύπους κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των ινοβλαστών, των κυττάρων του ανοσοποιητικού και των ενδοθηλιακών κυττάρων, καθώς επίσης και συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας (ECM), κυτοκινών, αυξητικών παραγόντων και εξωκυττάριας κυστιδίων [23]. Τα ΚΒΚ θεωρούνται ότι εδράζονται εντός του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, σε ειδικά διαμορφωμένες περιοχές, οι

οποίες ονομάζονται θώκοι KBK (CSC niche), και είναι υπεύθυνοι για τη συντήρηση των διακριτών χαρακτηριστικών τους. Οι θώκοι επάγουν τη δημιουργία ή/και διατήρηση των KBK, προστατεύουν τα KBK από το ανοσοποιητικό σύστημα και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε διαδικασίες όπως η μετάσταση, ενώ συνεισφέρουν στην ανθεκτικότητα των κυττάρων αυτών στα κοινά θεραπευτικά σχήματα [39].

- Ενδοθηλιακά κύτταρα

Τα αιμοφόρα αγγεία παρέχουν οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά τα οποία είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων. Υπεύθυνα για την οργάνωση του αγγειακού δικτύου είναι τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Συγκεκριμένα, ενδοθηλιακά κύτταρα του όγκου, επάγουν το φαινότυπο των καρκινικών βλαστικών κυττάρων μέσω της σηματοδότησης Notch και του σηματοδοτικού μονοπατιού του μονοξειδίου του αζώτου [40, 41]. Επιπλέον, ο Jiang και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι μεταξύ των KBK του μαστού και των ενδοθηλιακών κυττάρων του όγκου, υπάρχει μια θετική ανατροφοδοτική σχέση, μέσω του Notch υποδοχέα και του VEGF-A παράγοντα [42]. Συμπληρωματικά, ο VEGF-A παράγοντας είναι γνωστό ότι επάγει την έκφραση της προγραμματισμένης πρωτεΐνης κυτταρικού θανάτου (PD-1) και άλλων μορίων-αναστολέων της ανοσιακής απάντησης, δημιουργώντας έτσι ένα περιβάλλον που ευνοεί την ύπαρξη των KBK [43].

- Καρκινικοί ινοβλάστες

Οι καρκινικοί ινοβλάστες (Cancer associated fibroblasts - CAFs) παράγουν την εξωκυττάρια μήτρα εντός της περιοχής του όγκου, και επίσης παρέχουν μια σειρά από παράγοντες οι οποίοι συμβάλλουν στην ταχύτερη ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων [44]. Επιπλέον, οι καρκινικοί ινοβλάστες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αδρανοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος [45], ενώ επίσης παρέχουν και προστασία έναντι των κοινών χημειοφαρμάκων. Πιο αναλυτικά, ο Su και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι ένας συγκεκριμένος υποπληθυσμός ινοβλαστών, ο οποίος χαρακτηρίζεται από τον φαινότυπο CD10⁺/GPR77⁺, τόσο στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού αλλά και του πνεύμονα, συμβάλλει στη διατήρηση των ιδιοτήτων των KBK αλλά και στη χημειοανθεκτικότητα των κυττάρων αυτών μέσω της έκκρισης IL-6 και IL-8 [46]. Παρόμοιες μελέτες και στην περίπτωση του ηπατοκυτταρικού καρκίνου, έδειξαν ότι η IL-6 και ο ηπατικός αυξητικός παράγοντας (HGF) που εκκρίνονται από τους CAFs συνδράμουν στο φαινότυπο των καρκινικών βλαστικών κυττάρων [47].

- Κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος

Οι καρκίνοι πολύ συχνά συνδέονται με μια φλεγμονώδη απόκριση, -με αποτέλεσμα την έναρξη κάποιας ανοσοαπάντησης-, η οποία προκαλείται από φλεγμονώδη σήματα που απελευθερώνονται από τα καρκινικά κύτταρα και από τα κύτταρα του στρώματος [48]. Παρ' όλα ταύτα, τα καρκινικά κύτταρα είτε μέσω μορίων που εκφράζουν είτε μέσω της έκκρισης διαφόρων παραγόντων, μπορούν να αναστείλουν τη δράση των κυττάρων του ανοσοποιητικού, με άμεσο αποτέλεσμα την πρόοδο και την ανάπτυξη του όγκου [49]. Συγκεκριμένα, μακροφάγα που σχετίζονται με τον όγκο, συχνά συνεισφέρουν στη διατήρηση του φαινοτύπου των KBK μέσω μονοπατιών όπως το Sonic hedgehog [50]. Επίσης, τα ίδια κύτταρα (μακροφάγα) επάγουν τη διαδικασία του EMT, και κατ' επέκταση την εμφάνιση καρκινικών κυττάρων με βλαστικές ιδιότητες, σε πολλούς τύπους καρκίνου όπως τον ηπατικό και του παχέος εντέρου [51,52]. Στην περίπτωση του γλοιοβλαστώματος και του μελανώματος, KBK CD133⁺ και ABCB5⁺ αντίστοιχα, υποεκφράζουν την έκφραση

αντιγονοπαρουσιαστικών μορίων της οικογένειας MHC I και έτσι διαφεύγουν από τη δράση των T κυτταροτοξικών κυττάρων [53, 54].

- Εξωκυττάρια μήτρα

Το μίγμα των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας (ECM), που εκκρίνονται από τους καρκινικούς ινοβλάστες και τα κύτταρα του στρώματος, αποτελούν τη θεμέλια δομή στην οποία εδράζεται το μικροπεριβάλλον του όγκου. Η μηχανική υποστήριξη που παρέχει η ECM και οι υποξικές συνθήκες επάγουν το φαινότυπο των KBK. Συγκεκριμένα, ο Malanchi και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η Periostin -μια πρωτεΐνη της ECM όπου συνδέεται με ιντεγκρίνες και προάγει τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων-, στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού, είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση κυττάρων με βλαστικές ιδιότητες σε μεταστατικούς ιστούς όπως ο πνεύμονας, μέσω του μονοπατιού Wnt [55]. Επίσης, στην περίπτωση του ηπατικού καρκίνου, η lamini-5, – επίσης πρωτεΐνη της ECM- διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην χημειοανθεκτικότητα των KBK ύστερα από τη χορήγηση των φαρμάκων Δοξορουβικίνης και Σοραφενίμπης [56]. Επιπλέον, στον καρκίνο του γλοιοβλαστώματος, καρκινικά κύτταρα στα οποία φαίνεται να υπάρχει αυξημένη λειτουργία του μονοπατιού NFK-B, υπερεκφράζουν την tenascin C, η οποία επάγει την αυτό-ανανέωση των KBK του γλοιοβλαστώματος [57].

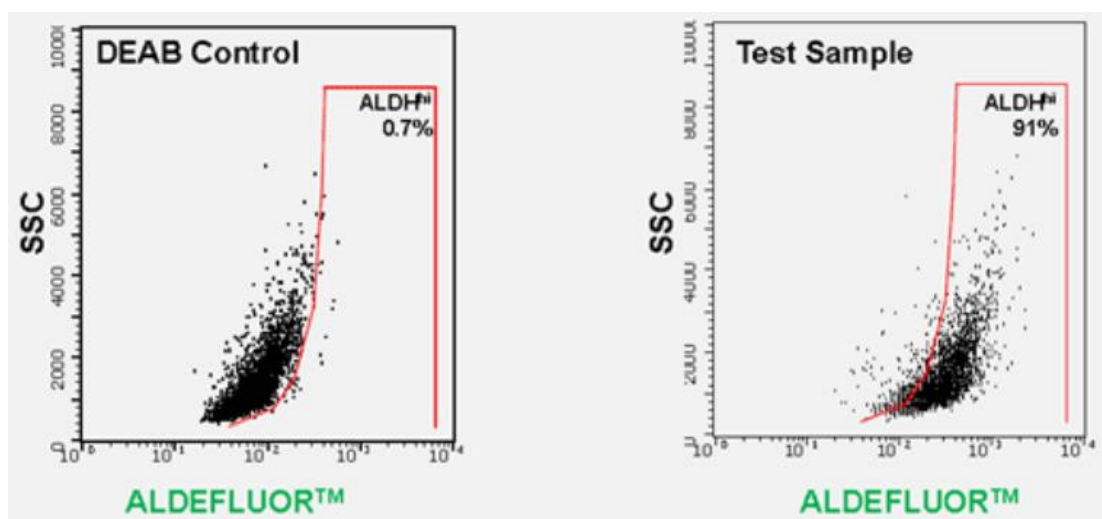
1.5 Καρκινικά βλαστικά κύτταρα

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί την πρώτη περίπτωση συμπαγή όγκου, στην οποία ταυτοποιήθηκαν τα KBK. Συγκεκριμένα, ο Al-Hajj και οι συνεργάτες του το 2003, απομόνωσαν ογκογόνους πληθυσμούς κυττάρων από δείγματα όγκων ασθενών με καρκίνου του μαστού, βασιζόμενοι στο φαινότυπο $ESA^+/CD44^+/CD24^{-/low}$ χρησιμοποιώντας τη μέθοδο κυτταρομετρία ροής (FACS) [19]. Μάλιστα όταν εισήχθησαν σε ανοσοκατασταλμένα ποντίκια, μόλις 200 κύτταρα με αυτό το φαινότυπο ήταν ικανά να σχηματίσουν όγκους, ενώ αντίθετα 20000 κύτταρα με φαινότυπο $CD44^+/CD24^+$ απέτυχαν να σχηματίσουν [19]. Μπορεί ο πιο συνηθισμένος συνδυασμός δεικτών κυτταρικής επιφανείας που χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό των KBK του μαστού να είναι ο $CD44^+/CD24^{-/low}$, ωστόσο μέχρι σήμερα δεν υπάρχει ένα καθολικό αντιγόνο κυτταρικής επιφανείας ή ένας συνδυασμός αντιγόνων για την απομόνωση «καθαρών» πληθυσμών KBK του μαστού με τεχνικές αντισωμάτων. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην ετερογενή φύση της ασθένειας και στην ύπαρξη διαφορετικών πληθυσμών των KBK του μαστού ακόμα κι εντός του ίδιου όγκου. Παραδείγματος χάριν, κάποιοι άλλοι δείκτες επιφανείας που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των KBK του μαστού είναι ο CD133 [58], ενώ ο συνδυασμός των δεικτών $CD44^+CD49^{hi}CD133/2^{hi}$ έχει ταυτοποιηθεί σε κύτταρα με ογκογόνο δράση [59]. Επιπροσθέτως, μελέτες τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* έχουν εισαγάγει τα αντιγόνα επιφανείας CD49f [60] και CD61 [61] ως δείκτες KBK του μαστού.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το CD44 και το CD24 είναι οι συνηθέστεροι δείκτες για τη ταυτοποίηση των καρκινικών βλαστικών κυττάρων του μαστού. Πιο αναλυτικά, η CD44 είναι μια πολυλειτουργική διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη η οποία δρα ως υποδοχέας για το υαλουρονικό οξύ, προάγοντας τη μετανάστευση σε φυσιολογικά κύτταρα [62]. Η δράση της συνδέεται κυρίως με πρωτεΐνες που ρυθμίζουν εξωκυττάριας λειτουργίες, όπως η κυτταρική προσκόλληση, η μετανάστευση και η αγγειογένεση [63]. Από την άλλη η CD24 είναι μια πρωτεΐνη επιφανείας και συμμετέχει στην προσκόλληση μεταξύ των κυττάρων. Η CD24 ανακαλύφθηκε σε ποντίκια και χρησιμοποιείται ως δείκτης διαφοροποίησης τόσο σε αιμοποιητικά όσο και σε νευρωνικά κύτταρα [64, 65].

Άλλες τεχνικές που χρησιμοποιούνται ευρέως για την απομόνωση ΚΒΚ του μαστού περιλαμβάνουν τη τεχνική του παράπλευρου πληθυσμού (Side population) και τη τεχνική ALDEFUOR. Η ιδέα του παράπλευρου πληθυσμού προτάθηκε από τον Patrawala, και στηρίζεται στην ικανότητα των βλαστικών κυττάρων να εκκρίνουν χρωστικές όπως το Hoechst, λόγω της αυξημένης έκφρασης διακυτταρικών πρωτεϊνών-αντλιών που διαθέτουν [66]. Έτσι, ένας μικρός υποπληθυσμός του όγκου ανιχνεύεται μέσω πειραμάτων κυτταρομετρίας ροής, και αποτελείται από βλαστικά και όχι από διαφοροποιημένα κύτταρα [66].

Τα ΚΒΚ του μαστού επίσης χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα του ενζύμου ALDH1. Τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του στους όγκους των ασθενών με καρκίνο του μαστού συσχετίζονται με κακή πρόγνωση. Πιο αναλυτικά, το ALDH1 ανήκει σε μια κατηγορία ενζύμων που είναι υπεύθυνα για την οξείδωση των ενδοκυτταρικών αλδεϋδών. Τα επίπεδα του μπορούν να διαπιστωθούν μέσω μιας μεθόδου που ονομάζεται ALDEFUOR, όπου απομονώνονται καρκινικά βλαστικά κύτταρα του μαστού μέσω κυτταρομετρίας ροής και έτσι ανιχνεύονται κύτταρα με υψηλή ενεργότητα του ενζύμου αυτού (**Εικόνα 1.10**) [67].

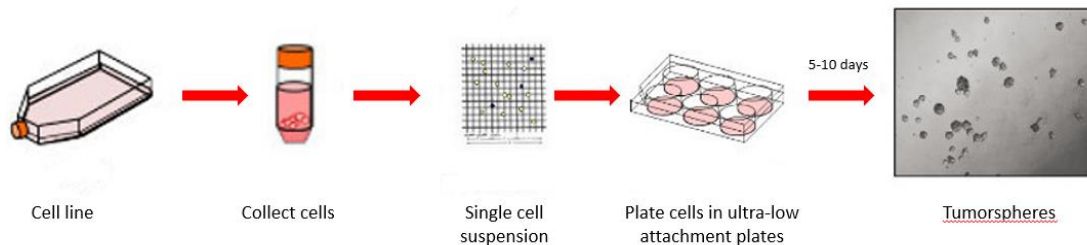


Εικόνα 1.10: Ταυτοποίηση ΚΒΚ του μαστού σε SKBR3 κύτταρα μέσω της μεθόδου ALDEFUOR. Ανίχνευση ALDH θετικών κυττάρων σε ποσοστό 91% χρησιμοποιώντας έναν συνδυασμό μπλε λέιζερ (488 nm) με ανίχνευση στο FITC (525 nm).

Μία εναλλακτική μέθοδος εμπλουτισμού καρκινικών βλαστικών κυττάρων, αφορά η τρισδιάστατη (3D) καλλιέργεια. Τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα που αναπτύσσονται σε τρισδιάστατα συστήματα καλλιέργειας, έχουν σε πολύ μεγάλο βαθμό υψηλή ταύτιση των σηματοδοτικών μονοπατιών, της γονιδιακής έκφρασης, των αλληλεπιδράσεων μεταξύ κυττάρων και εξωκυττάριας μήτρας αλλά και της χημειοανθεκτικότητας, που προσομοιάζουν σε υψηλά ποσοστά τις *in vivo* συνθήκες. Στο 3D σύστημα καλλιέργειας ευνοούνται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων, οι οποίες συμβαίνουν φυσιολογικά μέσα στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Εν συγκρίσει με τα δισδιάστατα (2D) συστήματα καλλιέργειας, τα 3D παρουσιάζουν μια πιο κοντά στον ασθενή φυσιολογία ιστού, δομή και οργάνωση.

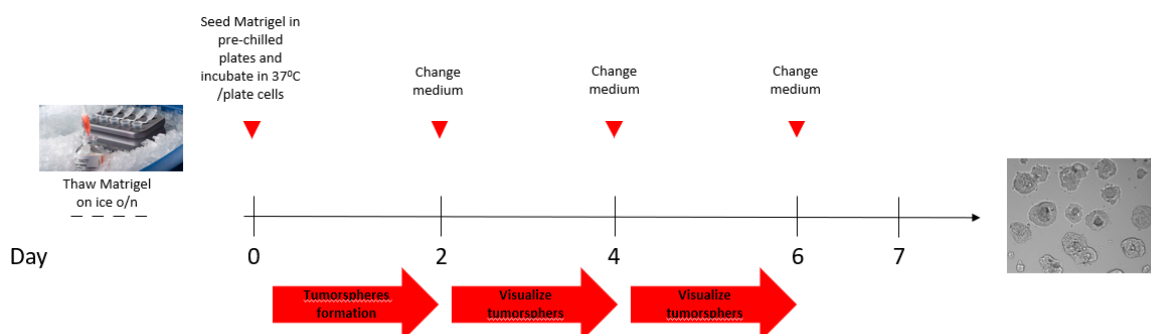
Ένας τρόπος τρισδιάστατης καλλιέργειας των καρκινικών κυττάρων είναι σε εναιώρημα (**Εικόνα 1.11**). Εάν οι συνθήκες καλλιέργειας είναι τέτοιες ώστε να μην επιτρέπουν την προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια του τρυβλίου, τα βλαστικά (και προγονικά κύτταρα) επιβιώνουν, ενώ τα υπόλοιπα πεθαίνουν λόγω ανοικίας (apoptosis) και μπορούν να πολλαπλασιαστούν και να σχηματίσουν σφαιροειδείς δομές. Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε

αρχικά σε νευρικά βλαστικά κύτταρα, όπου ένας μη διαφοροποιημένος πληθυσμός φάνηκε να μπορεί να σχηματίσει σφαιρικές δομές (neurospheres) οι οποίες αποτελούνται από 4% έως 20% από βλαστικά κύτταρα [68]. Με βάση αυτό το σύστημα, έχουν αναπτυχθεί παρόμοια συστήματα κυτταροκαλλιέργειών εμπλουτισμένων σε καρκινικά βλαστικά κύτταρα από διάφορους τύπους καρκίνου συμπεριλαμβανομένου και του μαστού, το οποίο περιγράφεται αναλυτικά σε επόμενη ενότητα (2.1.3) [69].



Εικόνα 1.11: Επεξεργασία καρκινικών κυττάρων για τη δημιουργία σφαιρικών δομών σε εναιώρημα

Μια άλλη μορφή 3D καλλιέργειας (Scaffold culture), αφορά την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων σε ειδικά βιοϋλικά, τα οποία αποτελούν το υπόστρωμα για την καλλιέργεια των κυττάρων. Ένα τέτοιο υλικό είναι και το Matrigel (**Εικόνα 1.12**), το οποίο προέρχεται από πρωτεΐνες της βασικής μεμβράνης όγκου ποντικού (Engelbreth-Holm-Swarm mouse), και στις οποίες περιλαμβάνεται το κολλαγόνο IV, η λαμίνη, η εντακτίνη και πολλές κυτοκίνες και αυξητικοί παράγοντες [70]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα του πλεονεκτήματος που παρέχει η καλλιέργεια σε Matrigel στα καρκινικά κύτταρα του μαστού, και γενικότερα η 3D καλλιέργεια, είναι η διασταύρωση των μονοπατιών της β-ιντεκγρίνης και του EGFR μονοπατιού μέσω των MAPK κινασών, κάτι το οποίο δεν συμβαίνει στη συμβατική 2D καλλιέργεια [71]. Επίσης, στην περίπτωση του καρκίνου του προστάτη, παρατηρείται υπερέκφραση μονοπατιών όπως του TGF-β, που σχετίζονται με την χημειοανθεκτικότητα και τη ραδιοανθεκτικότητα των καρκινικών κυττάρων [72]. Πιο αναλυτική περιγραφή της καλλιέργειας των κυττάρων σε Matrigel υπάρχει στην ενότητα 2.1.4.



Εικόνα 1.12 : Επεξεργασία καρκινικών κυττάρων για τη δημιουργία σφαιρικών δομών σε Matrigel

1.6 Επιγενετική

Επιγενετική, είναι η μελέτη των κληρονομήσιμων αλλαγών στη γονιδιακή έκφραση, χωρίς να μεταβάλλεται η αλληλουχία του DNA [73]. Οι κυριότερες επιγενετικές τροποποιήσεις συμπεριλαμβάνουν τη μεθυλίωση του DNA, τις τροποποιήσεις ιστονών και τις δράσεις των miRNAs (**Εικόνα 1.13**) [74]. Φυσιολογικά, αυτές οι διαδικασίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε αναπτυξιακό επίπεδο, κατά τη διαφοροποίηση των κυττάρων και κατά το στάδιο της μορφογένεσης. Η μεγάλη όμως ερευνητική μελέτη έναντι των μηχανισμών αυτών, έγκειται στο γεγονός, ότι απορρύθμιση τους σχετίζεται με την εμφάνιση διαφόρων ασθενειών όπως ο καρκίνος [74].

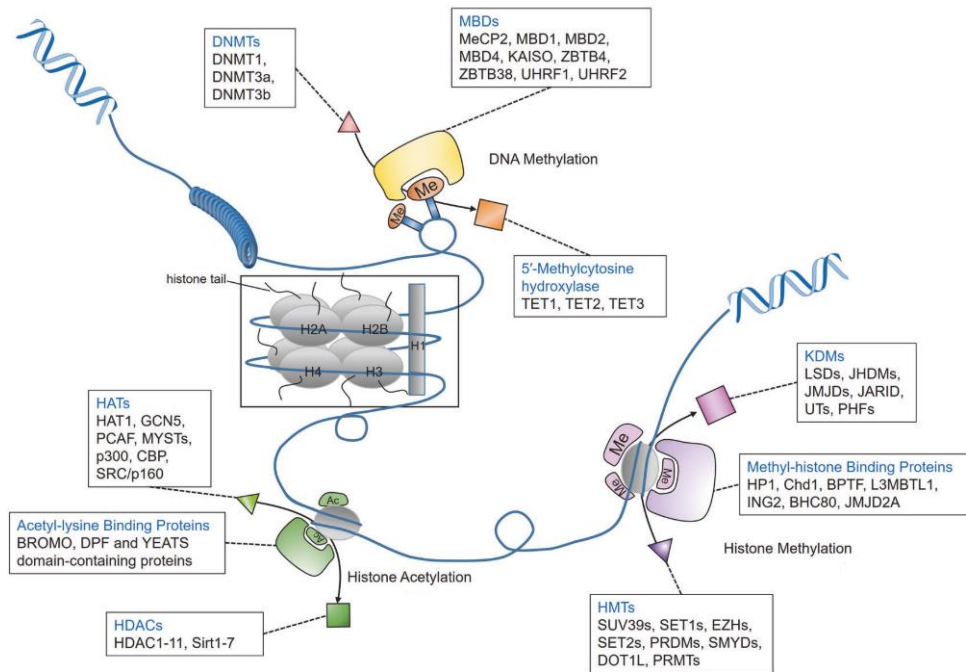
1.6.1 Επιγενετικοί μηχανισμοί

Μεθυλίωση του DNA: Η μεθυλίωση του DNA αποτελεί μια από τις πιο καλά μελετημένες επιγενετικές τροποποιήσεις στα θηλαστικά. Πρόκειται για μια σταθερή, κληρονομήσιμη, ομοιοπολική τροποποίηση του DNA, η οποία συνήθως εντοπίζεται στα CpG δινοκυλεοτίδια και σχετίζεται με τη γονιδιακή αποσιώπηση [74].

Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις ιστονών: Οι ιστόνες περιέχουν μια καρβοξυτελική (Carboxyl Terminal Domain, CTD) και μια αμινοτελική περιοχή (NTD). Η καρβοξυτελική περιοχή αποτελείται από περίπου 100 αμινοξέα και αποτελεί $\approx 50\%$ της πρωτεΐνης, ενώ η αμινοτελική έχει μήκος μεταξύ 20 και 35 αμινοξικά κατάλοιπα. Οι αμινοτελικές ουρές των ιστονών μπορούν και υφίστανται σε συγκεκριμένα κατάλοιπα μια ποικιλία μετα-μεταφραστικών ομοιοπολικών τροποποιήσεων, όπως η μεθυλίωση, η ακετυλίωση, η ουβικιτυνιλίωση, η σουμοϋλίωση και η φωσφορυλίωση, διαδικασίες που σχετίζονται με βασικές κυτταρικές λειτουργίες συμπεριλαμβανομένης της γονιδιακής ρύθμισης [75].

miRNAs: Τα miRNA είναι μικρά, μη κωδικοποιούντα RNA, τα οποία εκφράζονται ιστοειδικά και ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση μέσω της μετα-μεταγραφικής σίγασης των γονιδίων στόχων τους. Συγκεκριμένα, τα miRNAs είναι συμπληρωματικά με την 3' μη μεταφραζόμενη

περιοχή των αγγελιοφόρων RNA (mRNA) και ως αποτέλεσμα συντελούν στον κατακερματισμό των mRNA ή στη διακοπή της διαδικασίας της μετάφρασης [76].



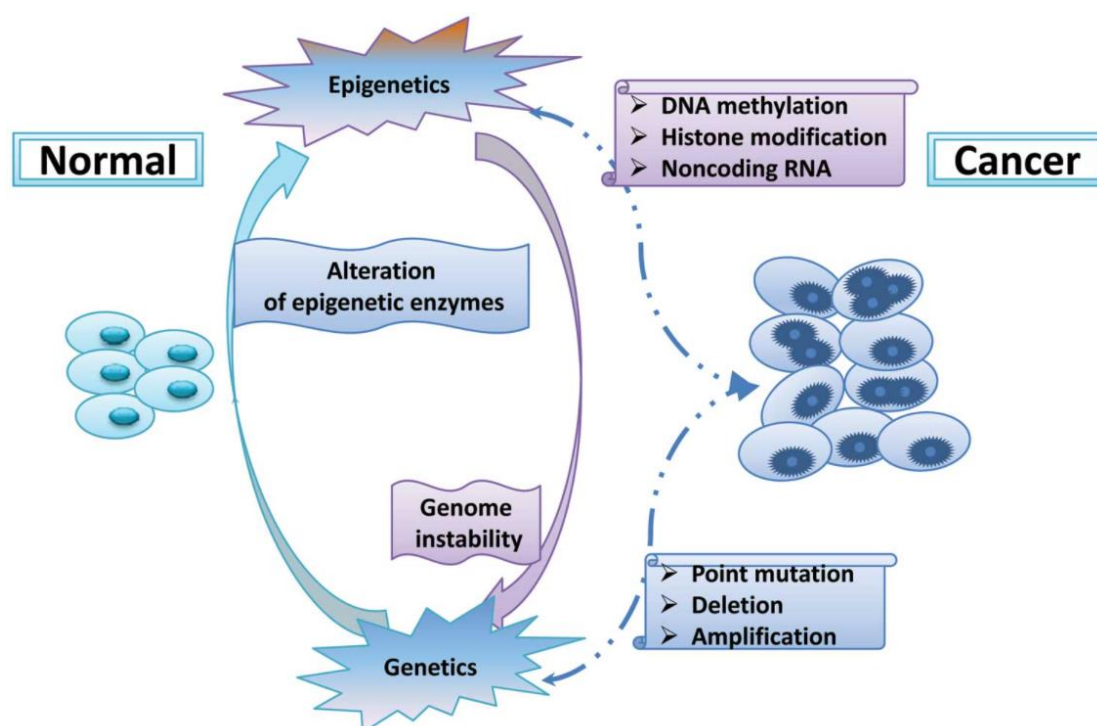
Εικόνα 1.13: Οι κυριότερες επιγενετικές τροποποιήσεις Η γονιδιακή σίγαση στα κύτταρα των θηλαστικών προκαλείται συνήθως από τη μεθυλίωση των νησίδων CpG DNA μαζί με τις υποακετυλιωμένες και υπερμεθυλιωμένες ιστόνες. Τα λεγόμενα ως ένζυμα “writers” (DNMTs, HATs, και HMTs) και “erasers” (HDACs και KDMs), είναι υπεύθυνα για τη μεταφορά ή αφαίρεση χημικών ομάδων από το DNA ή τις ιστόνες [77].

1.6.2 Απορρύθμιση επιγενετικών τροποποιήσεων και Καρκίνος

Ανωμαλίες στη ρύθμιση των επιγενετικών τροποποιήσεων μπορεί να οδηγήσουν στην ακατάλληλη έκφραση ή αποσιώπηση διαφόρων γονιδίων που σχετίζονται με την ογκογένεση. Συγκεκριμένα, η ογκογένεση είναι ένα αποτέλεσμα συσσωρευμένων αλλαγών στο γενετικό αλλά και επιγενετικό επίπεδο, με άμεση συνέπεια τη δημιουργία όγκων με μεγάλη ετερογένεια. Η αυξημένη έκφραση διαφόρων ογκονομιδίων και η αποσιώπηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων συγκαταλέγεται ως ένας από τους παράγοντες που συνδράμουν στην εμφάνιση του καρκίνου, κάτι στο οποίο φαίνεται να συμμετέχουν και οι επιγενετικές τροποποιήσεις (**Εικόνα 1.14**) [78]. Παραδείγματος χάρη, η μεθυλίωση του DNA, και πιο συγκεκριμένα η υπερμεθυλίωση υποκινητών ογκοκατασταλτικών γονιδίων έχει ως αποτέλεσμα την αποσιώπηση των γονιδίων αυτών, όπως στην περίπτωση του νεφρικού καρκίνου για το γονίδιο RASSF10 [79], του γλοιοβλαστώματος για το γονίδιο SIX3 [80] και του μελανώματος για το γονίδιο PTEN [81]. Επιπροσθέτως, δεν είναι μόνο οι υποκινητές ογκοκατασταλτικών γονιδίων που μπορεί να βρίσκονται σε μια υπερμεθυλιωμένη κατάσταση, αλλά επίσης και γονίδια όπως τα CDKN2A, TIMPS και DAPK που σχετίζονται με διαδικασίες όπως ο κυτταρικός κύκλος, η μετάσταση και η απόπτωση στην περίπτωση του καρκίνου του προστάτη [82]. Από την άλλη πλευρά, η υπομεθυλίωση ογκογονιδίων έχει ως αποτέλεσμα την ανεξέλεγκτη δράση τους κάτι που εμφανίζεται σε αρκετούς τύπους καρκίνου

όπως στο γλοιοβλάστωμα για το γονίδιο LYK6 [83] και στον καρκίνο του παχέους εντέρου για το γονίδιο RBBP6 [84].

Επιπλέον, αρκετές έρευνες κατά την τελευταία δεκαετία αποκάλυψαν ότι τόσο ενδογενείς παράγοντες (μεταλλάξεις) όσο και εξωγενείς (περιβαλλοντικοί) ρυθμίζουν το επιγονιδίωμα των καρκινικών κυττάρων και το συνδυαστικό τους αποτέλεσμα καθορίζει ποια κύτταρα θα έχουν την ικανότητα αυτό-ανανέωσης και ογκογόνου δράσης [85]. Αυτά τα κύτταρα, που αναφέρονται ως καρκινικά βλαστικά κύτταρα (KBK) είναι εκείνα που θεωρούνται, συχνά, υπεύθυνα για την ανάπτυξη και την πρόοδο της νόσου [13]. Για παράδειγμα, η μεθυλίωση του DNA που επάγει την αποσιώπηση διαφόρων γονιδίων που εμπλέκονται στην ύπαρξη και στη λειτουργία των βλαστικών κυττάρων, όπως το p16 και το APC, είναι κάτι που παρατηρείται συχνά σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως στην περίπτωση του παχέος εντέρου [86]. Συνεπώς είναι σημαντικό να μελετηθούν σε βάθος οι επιγενετικοί μηχανισμοί που συντελούν στη ρύθμιση των KBK.



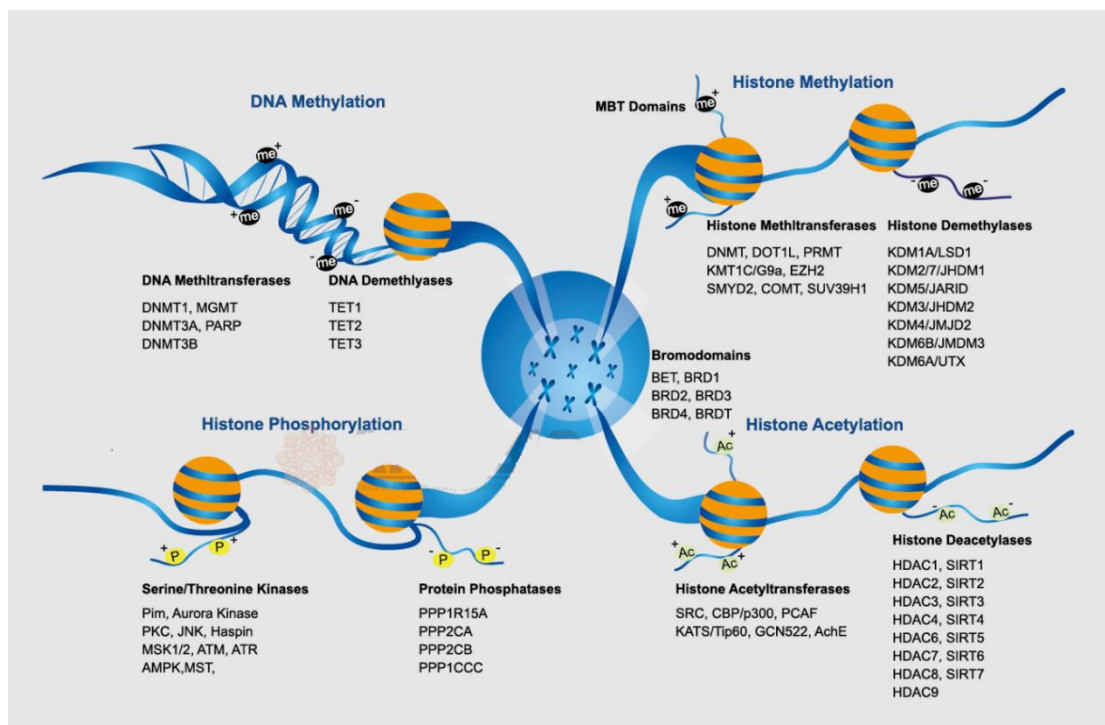
Εικόνα 1.14: Απορρύθμιση των επιγενετικών τροποποιήσεων στον καρκίνο οδηγεί σε γονιδιωματική αστάθεια. Κατά την πρόοδο και ανάπτυξη του καρκίνου ένας μεγάλος αριθμός επιγενετικών τροποποιήσεων μεταλλάσσεται ή/και απορρυθμίζεται. Ταυτόχρονα, επιγενετικές τροποποιήσεις όπως η μεθυλίωση του DNA και οι τροποποιήσεις ιστονών οδηγούν σε γονιδιωματική αστάθεια [87].

1.6.3 Τροποποιήσεις Ιστονών – Μεθυλίωση/Απομεθυλίωση Ιστονών

Η μεθυλίωση των ιστονών εμφανίζεται στα αμινοτελικά άκρα των ιστονών σε κατάλοιπα λυσίνης (K) και αργινίνης (R) [88]. Τέτοιες τροποποιήσεις σχετίζονται τόσο με την ενεργοποίηση όσο και με την αποσιώπηση γονιδίων, ανάλογα με τα κατάλοιπα στα οποία συμβαίνουν [89]. Για παράδειγμα, η μεθυλίωση της λυσίνης 4 (H3K4), της λυσίνης 36 (H3K36) και της λυσίνης 79 στην ιστόνη 3 (H3K79), σχετίζεται με την ενεργοποίηση γονιδίων, ενώ η μεθυλίωση της λυσίνης 9 (H3K9) και της λυσίνης 27 στην ιστόνη 3 (H3K27), καθώς και της λυσίνης 20 στην ιστόνη 4 (H4K20) σχετίζεται με την αποσιώπηση γονιδίων. Τα N – τελικά

άκρα των ιστονών συχνά υποβάλλονται και σε άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες διεργασίες που χρησιμοποιούν ως εκμάγειο το DNA, συμπεριλαμβανομένης και της μεταγραφής [90]. Ως εκ τούτου, οι διάφορες ανωμαλίες στις τροποποιήσεις των ιστονών μπορούν να οδηγήσουν σε απορρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, όπως παρατηρείται σε διάφορες ανθρώπινες ασθένειες και κακοήθειες.

Πιο αναλυτικά, η μεθυλίωση και η απομεθυλίωση των ιστονών λαμβάνει χώρα από συγκεκριμένα ένζυμα (**Εικόνα 1.15**). Τρεις οικογένειες μεθυλοτρανσφερασών έχουν ταυτοποιηθεί τα τελευταία χρόνια, μέσω των οποίων καταλύεται η μεταφορά μεθυλομάδων από την S – αδενυλομεθειονίνη στις ιστόνες. Δύο από αυτές τις οικογένειες, οι λεγόμενες πρωτεΐνες με την SET περιοχή και οι Dot-1 πρωτεΐνες, μεθυλιώνουν κατάλοιπα λυσίνης, ενώ τα μέλη της οικογένειας PRMT μεθυλιώνουν κατάλοιπα αργινίνης [91]. Αντίθετα, οι απομεθυλάσες ιστονών είναι υπεύθυνες για την απομάκρυνση των μεθυλομάδων από τις ιστόνες. Οι δύο οικογένειες που ανήκουν στην κατηγορία των απομεθυλασών λυσίνης είναι, οι αμινο-οξειδάσες και οι διοξυγενάσες με την περιοχή Jumonji που εξαρτώνται από το σίδηρο [92]. Οι απομεθυλάσες λυσίνης, γνωστές και ως KDMs, αποτελούνται από διαφορετικά ένζυμα (**βλ Εικόνα 1.15**), συμπεριλαμβανομένων και των KDM5.



Εικόνα 1.15: Τα κυριότερα επιγενετικά ένζυμα

(<https://www.apexbt.com/signaling-pathways/chromatin-epigenetics.html>)

1.6.4 Επιγενετικοί ρυθμιστές και KBK

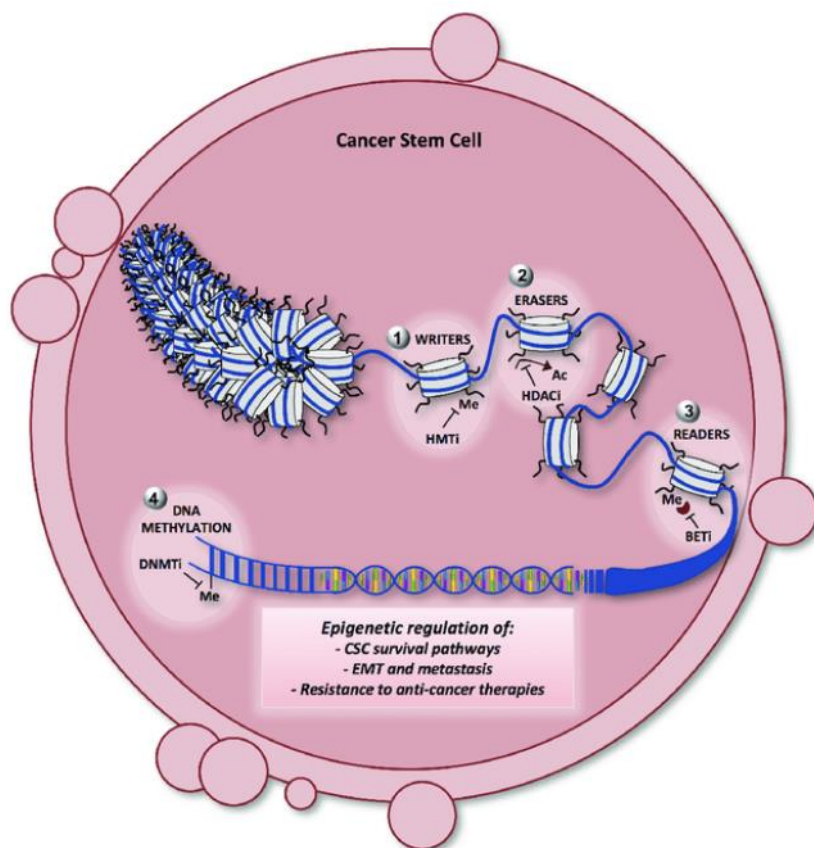
Όπως προηγουμένως αναφέρθηκε, τα επιγενετικά πρότυπα φαίνεται να διαταράσσονται κατά τη διαδικασία ανάπτυξης του καρκίνου. Συγκεκριμένα, όσον αφορά τη μεθυλίωση του DNA, υπομεθυλίωση και υπερμεθυλίωση υποκινητών ογκογονιδίων και ογκοκατασταλιτικών γονιδίων, έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη δράση τους ή αποσιώπηση τους, αντίστοιχα. Παρόμοιες αλλαγές στα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA και γενικότερα του επιγενετικού προφίλ, συμβαίνουν και στην περίπτωση των KBK (**Εικόνα 1.16**), και οι τροποποιήσεις αυτές φαίνεται ότι συνδέονται άρρηκτα με το φαινότυπο και τις λειτουργίες των KBK.

Γενικότερα, η μεθυλίωση σε περιοχές γονιδίων πλούσιες σε CpG σχετίζεται με τη διαφοροποίηση, ενώ η απομεθυλίωση θεωρείται σημαντική για τη διατήρηση μιας πολυδύναμης κατάστασης [93]. Πιο ειδικά, μελέτες έχουν δείξει, ότι η ύπαρξη των KBK μπορεί και βασίζεται στα μειωμένα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου Nanog, κάτι το οποίο οφείλεται στη χαμηλή έκφραση της μεθυλοτρανσφεράσης DNMT1 [94]. Επιπλέον, υποκινητές γονιδίων τα οποία διαδραματίζουν κομβικό ρόλο στην ύπαρξη των KBK, όπως παραδείγματος χάρη το CD133, φαίνεται ότι βρίσκονται σε μια υπομεθυλιωμένη κατάσταση σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως του μαστού, των ωοθηκών και του παχέος εντέρου [95,96,97]. Επίσης, χαρακτηριστικό της διαφοράς των KBK με τα μη-KBK, είναι ότι στη περίπτωση του παγκρεατικού καρκίνου, γονίδια τα οποία εμπλέκονται σε μονοπάτια των KBK, όπως το GATA6, SOX9, και το BMP4, είναι απομεθυλιωμένα στον περισσότερο διεισδυτικό και βλαστικό πληθυσμό εν αντιθέσει με τον υπόλοιπο διαφοροποιημένο πληθυσμό του όγκου [98]. Εδώ χρειάζεται να τονιστεί η σημασία της απομεθυλίωσης, στη διατήρηση των ιδιοτήτων τόσο των φυσιολογικών εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων (ESCs), όσο και των επαγόμενων πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων (iPSCs). Συγκεκριμένα, ο επαναπρογραμματισμός των σωματικών κυττάρων σε βλαστικά μέσω της έκτοπης έκφρασης των Yamanaka factors (Oct4, Sox2, Klf4 και c-Myc), επιτυγχάνεται εξαιτίας επιγενετικών τροποποιήσεων και πιο ειδικά λόγω της απομεθυλίωσης [99]. Παρόλο ταύτα, και η μεθυλίωση του DNA, και συγκεκριμένα το ένζυμο DNMT1, φαίνεται να έχει διττό ρόλο στην εμφάνιση των KBK, ο οποίος είναι είτε να επάγει είτε να αναστέλλει την έκφραση τους. Για παράδειγμα, μελέτες έχουν δείξει ότι το DNMT1 ήταν απαραίτητο στη λειτουργία των KBK σε καρκίνους όπως του μαστού, του πνεύμονα, του παγκρέατος και της λευχαιμίας [100,101,102,103], ενώ αντίθετα στην περίπτωση του καρκίνου του προστάτη, αναστολή του οδηγούσε στην εμφάνιση των KBK μέσω της διαδικασίας του EMT (επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετάβαση) [104].

Οι τροποποιήσεις αυτές, επηρεάζουν την πρόσδεση διαφόρων πρωτεϊνών παραγόντων στις ιστόνες και έτσι η χρωματίνη μπορεί να εναλλάσσεται μεταξύ δύο καταστάσεων. Στην περίπτωση της ευχρωματίνης, είναι εφικτή η πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων και σχετίζεται με την γονιδιακή ενεργότητα, ενώ αντίθετα στην περίπτωση της ετεροχρωματίνης, η δομή της χρωματίνης δεν επιτρέπει την πρόσδεση άλλων μορίων και σχετίζεται με τη γονιδιακή αποσιώπηση. Αυτές οι δύο καταστάσεις διαμεσολαβούνται από πρωτεϊνικά σύμπλοκα όπως αυτά της ομάδας Trithorax (TrxG) και Polycomb (PcG). Συγκεκριμένες τροποποιήσεις ιστονών, είναι χαρακτηριστικές για τα φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα και οι οποίες τα ξεχωρίζουν από τα διαφοροποιημένα κύτταρα. Παρόμοια γεγονότα φαίνεται να ισχύουν και στην περίπτωση των KBK [105]. Συγκεκριμένα, η καταλυτική υπομονάδα του συμπλόκου Polycomb, EZH2 (enhancer of zeste homologue 2), η οποία είναι υπεύθυνη για τη μεθυλίωση της H3K27, φαίνεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ογκογένεση και στην παρουσία των KBK σε διάφορους τύπους καρκίνου [106, 107]. Παρόμοια αποτελέσματα και για άλλες κατηγορίες επιγενετικών ενζύμων, όπως πχ απομεθυλασών ιστονών, έχουν

αποδειξεί τον αναδυόμενο ρόλο της επιγενετικής στη βιολογία των KBK. Αναλυτικότερα, το επιγενετικό ένζυμο KDM1A/LSD1 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο τόσο στη χημειοανθεκτικότητα των καρκινικών κυττάρων του μαστού, όσο και στην παρουσία των KBK καθώς φαίνεται να ελέγχει το δυναμικό αυτό-ανανέωσης των κυττάρων αυτών [108]. Παρόμοια αποτελέσματα, υπάρχουν και στην περίπτωση του γλοιοβλαστώματος, όπου γονιδιακή αποσιώπηση του KDM4C είχε ως συνέπεια την επαγωγή των κυττάρων σε έναν πιο διαφοροποιημένο φαινότυπο και απώλεια έκφρασης του βλαστικού δείκτη CD133 [109]. Επίσης, όσον αφορά την απομεθυλάση ιστονών KDM7A, αποσιώπηση της μειώνει αισθητά το ποσοστό του πληθυσμού των KBK του μαστού, ενώ ταυτόχρονα μειώνει και την ικανότητα σχηματισμού σφαιρικών δομών (mammospheres) *in vitro* και αναστέλλει τη δημιουργία όγκων *in vivo* [110]. Επιπροσθέτως, σε μία πρόσφατη μελέτη, χορήγηση του ειδικού αναστολέα GSK-J4 που στοχεύει τις απομεθυλάσες της οικογένειας KDM6 σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου, αναστέλλει τις ιδιότητες των κυττάρων που επάγουν τη δημιουργία όγκων με ταυτόχρονη μείωση της έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με τη βλαστικότητα, ενώ παράλληλα ο ίδιος ο αναστολέας κάνει τα κύτταρα πιο επιδεκτικά στη χορήγηση χημειοφραμάκων [111]. Για το ίδιο ένζυμο και συγκεκριμένα για το KDM6A στον καρκίνο των ωοθηκών, ο αναστολέας GSK-J4 εμποδίζει την ανάπτυξη των GATA3 θετικών καρκινικών βλαστικών κυττάρων, ενώ η συνδυαστική χορήγηση του με την Πακλιταξέλη ή το Gemcitabine, αυξάνει κατά πολύ την τοξικότητα τους έναντι των κυττάρων αυτών [112]. Παρόμοιας λογικής πειράματα, ανέδειξαν τη χρησιμότητα του αναστολέα QC6352 έναντι των απομεθυλασών KDM4, όπου χορήγηση του μείωσε το πολλαπλασιασμό των KBK του μαστού και την ικανότητα σχηματισμού όγκων τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* [113].

Εκτός από τη μεθυλίωση ιστονών και άλλες τροποποιήσεις έχει φανεί ότι συνεισφέρουν στον φαινότυπο των KBK. Συγκεκριμένα, η υπομονάδα BM1 του συμπλέγματος Polycomb (PCR1), η οποία μονοουβικτινιλιώνει την ιστόνη H2A στην λυσίνη 119, επάγει την έκφραση των KBK τόσο στη λευχαιμία όσο και στο γλοιοβλάστωμα [114,115]. Επιπλέον, και οι τροποποιήσεις ιστονών που σχετίζονται με την ακετυλίωση και πιο ειδικά η αποκετυλάση HDAC7 επάγει την ογκογένεση στην περίπτωση του καρκίνου του πνεύμονα [116]. Επιπροσθέτως, εκτός των ενζύμων που είναι υπεύθυνα για τις τροποποιήσεις ιστονών, απορρύθμιση ορισμένων πρωτεϊνών που ρυθμίζουν τη δομή της χρωματίνης, όπως οι κοχεζίνες, συνηγορούν στην παρουσία των KBK στην περίπτωση της λευχαιμίας [117].



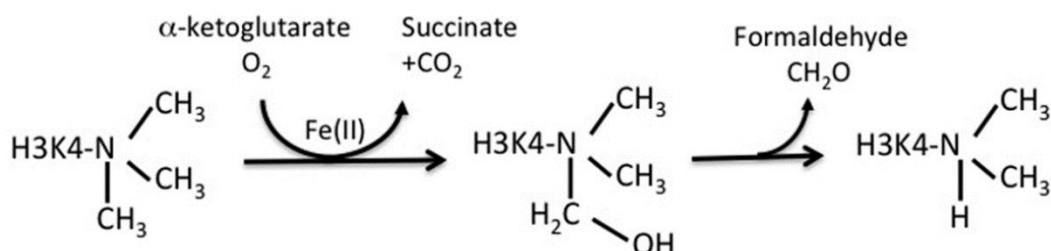
Εικόνα 1.16: Επιγενετική ρύθμιση στα ΚΒΚ. Στην παραπάνω εικόνα φαίνονται τα διαφορετικά επίπεδα επιγενετικής ρύθμισης στα ΚΒΚ και οι πιθανές θεραπευτικές προσεγγίσεις. Τα ινίδια χρωματίνης και το νουκλεόσωμα φαίνονται στον πυρήνα των ΚΒΚ. Τα επιγενετικά ένζυμα, (1) writers, (2) erasers, (3) readers και (4) μεθυλοτρανσφεράσες του DNA είναι οι κύριοι παράγοντες στην ρύθμιση βασικών οδών επιβίωσης στα ΚΒΚ, όπως το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch, Wnt και Hedgehog. Επιπλέον, επιγενετικές τροποποιήσεις μεσολαβούν στην επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετάβαση και στην ανθεκτικότητα των ΚΒΚ στις συμβατικές μορφές θεραπείας [118].

1.7 Η οικογένεια απομεθυλασών KDM5

Η αντίσταση των καρκινικών κυττάρων έναντι των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων παραμένει ένα από τα μείζονα προβλήματα για την εξάλειψη του καρκίνου. Στα προηγούμενα κεφάλαια, περιεγράφηκαν αναλυτικά πιθανοί μηχανισμοί οι οποίοι προσδίδουν αντίσταση στα καρκινικά κύτταρα, όπως αυξημένη έκφραση πρωτεϊνών αντλιών, υπερέκφραση αντι-αποπτωτικών μηχανισμών, αυξημένη έκφραση DNA επιδιορθωτικών μορίων κτλ. Τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερες μελέτες υποδηλώνουν τη μεγάλη συνάφεια που έχει η επιγενετική με την επίκτητη χημειοανθεκτικότητα σε διάφορους τύπους καρκίνου [85]. Η αντιστρεψιμότητα της χημειοανθεκτικότητας που παρουσιάζεται σε πολλές μορφές καρκίνου ύστερα από την παύση των χημειοφαρμάκων για κάποιο χρονικό διάστημα, υποδεικνύει ότι οι γενετικές μεταλλαγές δεν είναι αρκετές από μόνες για την επαγωγή του φαινομένου αυτού [85].

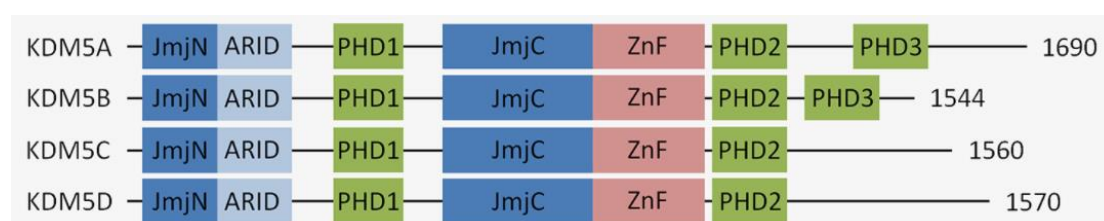
Οι KDMs (lysine demethylases) θα μπορούσαν να βελτιώσουν την ανταπόκριση έναντι των διαφόρων χημειοθεραπευτικών και να αποτελέσουν οι ίδιες έναν πιθανό θεραπευτικό στόχο [85]. Συγκεκριμένα, η οικογένεια των KDM5 απομεθυλασών ανήκει στην κατηγορία των Jumonji C ((JmjC) απομεθυλασών. Τα επιγενετικά ένζυμα αυτά αποτελούν διοξυγονάσες

εξαρτώμενες από το 2-οξαγλουταρικό και απαιτούν για τη δράση τους την παρουσία Fe^{2+} και οξυγόνου, προκειμένου να επιτελέσουν την υδροξυλίωση, η οποία είναι απαραίτητη για την απομάκρυνση μεθυλομάδων (**Εικόνα 1.17**) [119]. Η οικογένεια των KDM5 απομεθυλασών είναι υπεύθυνη για την απομεθυλίωση τρι- και δι-μεθυλωμένων ομάδων από τη λυσίνη 4 στην ιστόνη H3 (H3K4), ενώ η απομεθυλίωση μπορεί να έχει, όσον αφορά τη μεταγραφή, είτε ενεργοποιητικό είτε κατασταλτικό ρόλο.



Εικόνα 1.17: Ο μηχανισμός δράσης των απομεθυλασών KDM5. Η οικογένεια των απομεθυλασών JmjC καταλύει μια αντίδραση διοξυγονάσης, η οποία εξαρτάται από τους συμπαράγοντες $Fe(II)$ και α -κετογλουταρικού για την απομεθυλίωση των λυσινών ιστόνης [120].

Πιο αναλυτικά, υπάρχουν τέσσερα μέλη της οικογένειας KDM5, KDM5A-D, και παρουσιάζουν σε υψηλό βαθμό ομολογία όσον αφορά την αλληλουχία και την οργάνωση των δομών τους. Περιέχουν συντηρημένες δομές: την ARID (τομέας δέσμησης του DNA), τον C5HC2 δακτύλιο ψευδαργύρου και τις JmjC, JmjN και PHD (περιοχές όπου προσδέεται η ιστόνη). Η οικογένεια των KDM5 είναι ξεχωριστή μεταξύ των υπολοίπων Jumonji απομεθυλασών, καθώς οι περιοχές ARID και PHD βρίσκονται ενδιάμεσα του Jumonji τομέα, με συνέπεια η καταλυτική υπομονάδα να διαχωρίζεται σε δύο ξεχωριστά τμήματα (JmjN και JmjC) [121]. Στην **Εικόνα 1.18** φαίνονται οι πρωτεϊνικές δομές των μελών της οικογένειας KDM5.



Εικόνα 1.18: Σχηματική απεικόνιση της δομής των μελών της οικογένειας των KDM5 [122].

Η PHD περιοχή επιτρέπει τη στρατολόγηση και άλλων εταίρων, όπως πχ αποακετυλασών ιστονών (HDACs) στις μεθυλωμένες ιστόνες. Γενικότερα, οι KDM5 απομεθυλάσες σχηματίζουν σύμπλοκα με μεταγραφικούς καταστολείς όπως το REST (RE1-Silencing Transcription factor) και με μεθυλάσες (HMTs) οι οποίες έχουν κατασταλτική γονιδιακή δράση [123]. Με άλλα λόγια, οι KDM5 απομεθυλάσες μπορούν και λειτουργούν είτε ως τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για την απομεθυλίωση (erasers), αλλά και ως ένζυμα που στρατολογούν και άλλα μόρια τα οποία τροποποιούν τον κώδικα των ιστονών (readers) [124]. Παρά την υψηλή ομολογία όμως, τα μέλη της οικογένειας KDM5 διαφέρουν ως προς τις

λειτουργίες και τις βιολογικές επιδράσεις τους, τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις, όπως φαίνεται στον **Πίνακα 1**.

Enzyme	Synonyms	Cancer type	Chromosome
KDM5A	JARID1A	Glioblastoma	12p13.33
	RBP2	Lung	
		Gastric	
		Breast	
		Cervical	
KDM5B	JARID1B	Neuroblastoma	1q32.1
	PLU1	Breast	
	RBBP2H1A	Prostate	
	CT31	Bladder	
	PPP1R98	Lung	
		Melanoma	
		Ovary	
		Colon	
KDM5C	JARID1C	Kidney	Xp11.22
	SMCX	Breast	
		Cervix	
		AML	
KDM5D	JARID1D	Prostate	Yq11.223
	SMCY	Kidney	

Πίνακας 1: Συσχέτιση των KDM5 απομεθυλασών με διάφορους τύπους καρκίνου [122].

1.7.1 KDM5A

Η KDM5A αποτελεί ένα σημαντικό μεταγραφικό ρυθμιστή σε φυσιολογικές αναπτυξιακές διαδικασίες, όπως η κυτταρική διαφοροποίηση [122]. Αρχικά, ανακαλύφθηκε ως ένας δεσμευτικός παράγοντας της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (pRB) και σχετίστηκε με τη ρύθμιση των γονιδίων στόχων της pRB [125]. Η KDM5A αναστέλλει τη διαφοροποίηση των καρκινικών κυττάρων στα οποία απουσιάζει η έκφραση της pRB, ενώ απώλεια της KDM5A αναστέλλει το σχηματισμό όγκων σε ποντίκια τα οποία είναι αρνητικά για τη Rb1 και Men1 [126]. Μετέπειτα, βρέθηκαν και άλλες αλληλεπιδράσεις στις οποίες συμμετέχει η KDM5A, όπως πχ με το σύμπλοκο Polycomb, το οποίο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, καθώς και με το κατασταλτικό σύμπλοκο Sin3 [127]. Επιπλέον, το KDM5A είναι ένα αναπόσπαστο συστατικό του Notch/RBP-J κατασταλτικού συμπλέγματος, και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία απενεργοποίησης των γονιδίων στόχου του Notch [128].

Η υπερέκφραση του συγκεκριμένου ενζύμου έχει παρατηρηθεί σε διάφορους τύπους καρκίνου όπως στο γαστρικό, στον ηπατικό και στο γλοιοβλάστωμα [129,130,131], ενώ

θεωρείται κομβικό γονίδιο για την αναστρέψιμη χημειοανθεκτικότητα σε καρκινικά κύτταρα. Πιο ειδικά, προσδένεται σε υποκινητές γονιδίων κυκλινών που συμμετέχουν στον κυτταρικό κύκλο όπως η p16, p21 και η p27 και απομεθυλιώνει την H3K4me3, με αποτέλεσμα να προκαλεί την αδράνεια των γαστρικών καρκινικών κυττάρων όσον αφορά τον πολλαπλασιασμό [129]. Επίσης, προσδένεται στον υποκινητή του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF), και έτσι υπερέκφραση του KDM5A συνεπάγεται και αύξηση της έκφρασης του VEGF, ενώ αποσιώπηση του KDM5A έχει τα αντίθετα αποτελέσματα. Ο VEGF παράγοντας υποστηρίζει την αγγειογένεση και έτσι επιταχύνεται η αύξηση των γαστρικών καρκινικών κυττάρων. Συμπληρωματικά, σε μοντέλα ποντικών του γαστρικού καρκίνου με απώλεια έκφρασης του KDM5A, παρατηρείται μειωμένη έκφραση του VEGF και μικρότερη αγγειακή πυκνότητα [132].

Επιπροσθέτως, η KDM5A έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκεται στενά σε μονοπάτια που αφορούν την αδράνεια-μείωση κυτταρικού πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων. Αρκετές αναφορές περιγράφουν τη μείωση του ογκογόνου δυναμικού, το αυξημένο ποσοστό κυττάρων στην G1 φάση του κυτταρικού κύκλου και την αυξημένη έκφραση κυκλινών με αρνητική επίδραση στον κυτταρικό κύκλο ύστερα από αποσιώπηση του KDM5A σε διάφορες καρκινικές σειρές [132,133]. Επίσης, γονιδιακή αποσιώπηση του συγκεκριμένου ενζύμου, μειώνει αισθητά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αποκαθιστά την ευαισθησία των καρκινικών σειρών του μαστού Colo524, ZR-751, HCC1937, HCC1428 και SUM 149 στους αναστολείς των υποδοχέων του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα, στις οποίες υπάρχει ενίσχυση έκφρασης του KDM5A [134]. Συμπληρωματικά, μείωση των επιπέδων έκφρασης του KDM5A καταστέλλει την ογκογένεση και τη μεταστατικότητα των καρκινικών κυττάρων του μαστού σε μοντέλα ποντικού, υποδηλώνοντας ότι στόχευση του συγκεκριμένου ενζύμου θα μπορούσε να αποτελέσει έναν πιθανό θεραπευτικό στόχο [135].

Σημαντικό εύρημα επιπλέον αποτελεί το γεγονός, ότι το KDM5A έχει αποδειχθεί ότι αλληλοεπιδρά και με άλλες ομάδες επιγενετικών ενζύμων όπως τις αποκετυλάσες ιστονών (HDACs) [136]. Η Sharma και οι συνεργάτες της, έδειξαν, ότι ύστερα από χορήγηση αναστολέων αποκετυλασών (HDACi), τα ανθεκτικά στο gefitinib καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα (PC9), απέκτησαν εκ νέου την ευαισθησία τους στο φάρμακο αυτό [137]. Εξίσου σημαντικό είναι και το εύρημα, ότι ύστερα από χορήγηση αναστολέων αποκετυλασών, ή γονιδιακή αποσιώπηση του KDM5A σε HeLa και MCF-7 κύτταρα, ενισχύθηκε η ραδιοευαισθησία των κυττάρων αυτών [138].

1.7.2 KDM5B

Ο φυσιολογικός ρόλος του KDM5B έγκειται στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων (ESCs) [122]. Στην περίπτωση του καρκίνου, το KDM5B έχει αποδειχθεί ότι αλληλοεπιδρά με συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες όπως το PAX9, FOXC2 και το FOXG129 [139], και ότι καταστέλλει ή προάγει την ενεργοποίηση γονιδίων-στόχων αλληλοεπιδρώντας με πυρηνικούς υποδοχείς όπως, των οιστρογόνων, της προγεστερόνης και των ανδρογόνων [140]. Οι ορμονικοί αυτοί υποδοχείς παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντι-ορμονική θεραπεία του καρκίνου του μαστού και του προστάτη. Παράλληλα, συνδέεται επίσης με τα συστατικά του συμπλόκου αναδιαμόρφωσης νουκλεοσώματος (NuRD) και αλληλοεπιδρά με την HDAC1 στη γονιδιακή καταστολή [141]. Αρχικά, το KDM5B ταυτοποιήθηκε στον καρκίνο του μαστού [142] ενώ επίσης έχει μελετηθεί ο ρόλος του ως ογκογονίδιο στον καρκίνο του νευροβλαστώματος, του προστάτη, της ουροδόχου κύστης, των ωοθηκών και του πνεύμονα [143,144,145]. Τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του μαζί με την αυξημένη έκφραση του μη κωδικοποιούντος RNA (lncRNA), MALAT1, υποδηλώνουν μια

λειτουργική συσχέτιση στην εξέλιξη της νόσου και στη μετάσταση του τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού (TNBC) [146]. Η υπερέκφραση του KDM5B έχει διαπιστωθεί σε προχωρημένα στάδια του καρκίνου του μαστού και του προστάτη, όπου συμμετέχει στη μετάβαση της G1/S φάσης του κυτταρικού κύκλου και στην εξουδετέρωση των μηχανισμών ελέγχου της μιτωτικής ατράκτου των καρκινικών κυττάρων. Επίσης, το KDM5B καταστέλλει την έκφραση διάφορων ογκοκατασταλτικών γονιδίων όπως του BRCA1 και της Caveolin-1 μέσω της απομεθυλίωσης της H3K4me3 [143]. Απαλοιφή του KDM5B μέσω siRNA στην καρκινική σειρά του παχέος εντέρου Colo201, πυροδοτεί την αδράνεια-μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και την αδυναμία ανάπτυξης όγκων σε μοντέλα ποντικών [147]. Σημαντικό χαρακτηριστικό του συγκεκριμένου ενζύμου, είναι ότι φαίνεται να εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων (ESCs) [148] και ότι επίσης συμμετέχει στην ανάπτυξη του μαστικού αδένου ποντικών. Υπερέκφραση του KDM5B στα ESCs, αυξάνει τον πολλαπλασιασμό τους και μειώνει την έκφραση μοριακών δεικτών διαφοροποίησης όπως πχ το NF, ND2, ISL1 και BMI1 [148].

1.7.3 KDM5C και KDM5D

Όσον αφορά τα υπόλοιπα δύο μέλη της οικογένειας KDM5, το γονίδιο της KDM5C (ή SMCX) εδράζεται στο X χρωμόσωμα και ανήκει στην κατηγορία των γονιδίων που διαφεύγουν της απενεργοποίησης του ενός X χρωμοσώματος [149]. Το KDM5C εμφανίζει αυξημένη έκφραση σε διάφορες κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού και η έκφραση του συνδέεται με την μετάσταση, ενώ έλλειψη έκφρασης του KDM5C επηρεάζει την ικανότητα μετανάστευσης και διεισδυτικότητας των κυττάρων [150]. Από την άλλη, το KDM5D (ή SMCY) εδράζεται στο Y χρωμόσωμα, εμφανίζει 85% ομοιότητα με το KDM5C και διαθέτει βασικό ρόλο στην σπερματογένεση [122]. Συγκριτικά με τα άλλα τρία μέλη της οικογένειας, δεν εμφανίζει τόσο σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου. Φαίνεται όμως να διαδραματίζει ογκοκατασταλτικό ρόλο στον καρκίνο του προστάτη λόγω της αλληλεπίδρασης του με τον υποδοχέα ανδρογόνων (AR) [151].

1.8 Χημειοανθεκτικότητα και KDM5 απομεθυλάσες

Η αντοχή στις συμβατικές μορφές φαρμάκων παραμένει μια πρόκληση για την επιτυχή εξάλειψη και θεραπεία του καρκίνου, ενώ τα τελευταία χρόνια υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις για τον αναδυόμενο ρόλο των επιγενετικών ενζύμων (**Εικόνα 1.19**) και ειδικότερα των KDM5 απομεθυλασών στη χημειοανθεκτικότητα των καρκινικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, η KDM5A και η KDM5B, συμβάλλουν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, ενώ αυξημένη έκφραση τους έχει εντοπιστεί σε ένα μικρό υποπληθυσμό καρκινικών κυττάρων με αργό κυτταρικό κύκλο, υψηλή ογκογόνο δράση και εγγενή ανθεκτικότητα σε μια πληθώρα θεραπευτικών κυτταροτοξικών και στοχευμένων φαρμάκων [αναφέρονται στο 122].

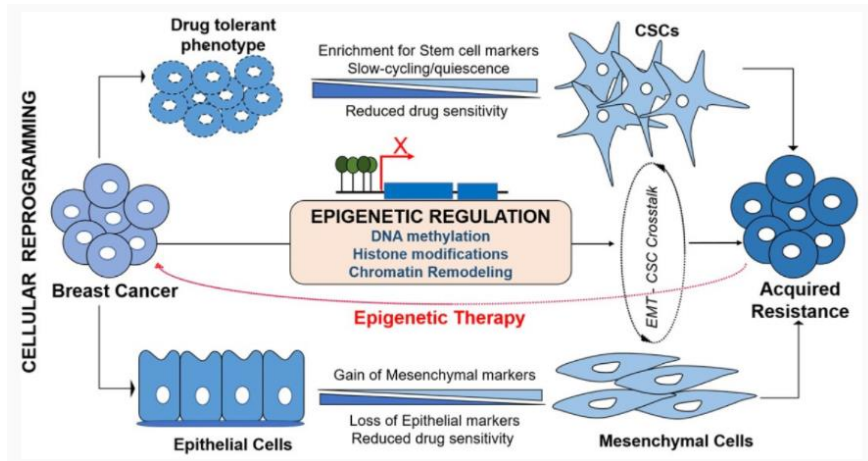
Αυξημένη έκφραση της KDM5A, έχει παρατηρηθεί σε έναν μικρό υποπληθυσμό με αναστρέψιμη ανθεκτικότητα, ή αλλιώς drug-tolerant populations–DTPs, ύστερα από χορήγηση 2μM Gefitinib, όπου η πλειοψηφία των κυττάρων εξουδετερωνόταν από το συγκεκριμένο φάρμακο. Η υψηλή έκφραση της KDM5A στα DTPs, οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα μεθυλίωσης της H3K4me3/2 και στη μείωση της ευαισθησίας έναντι του χημειοφαρμάκου cisplatin. Αποσιώπηση του συγκεκριμένου γονιδίου μειώνει τον αριθμό των DTPs και αυξάνει την ευαισθησία των πατρικών PC9 καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα [137]. Υψηλή έκφραση επίσης της KDM5A έχει παρατηρηθεί και σε ανθεκτικά καρκινικά κύτταρα του γλοιοβλαστώματος στο temozolomide (TMZ). Από την μία πλευρά, στα

ανθεκτικά κύτταρα υπάρχει υπερέκφραση της KDM5A, από την άλλη όμως, τα επίπεδα μεθυλίωσης και οι μηχανισμοί εκροής φαρμάκων δεν παρουσιάζουν διαφορές συγκριτικά με τα πατρικά κύτταρα. Επιπλέον, τα ανθεκτικά κύτταρα παρουσιάζουν μορφολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά διαφοροποίησης (αυξημένο GFAP, β -tub III, μειωμένο Sox2, Olig2), ένα εύρημα το οποίο έρχεται σε αντίθεση με τις αναφερόμενες συνδέσεις μεταξύ ανθεκτικότητας και KBK [152]. Ο Sharma και οι συνεργάτες του, έδειξαν ότι στα DTPs που προέρχονται από την PC9 κυτταρική σειρά υπήρχε αυξημένη έκφραση των βλαστικών δεικτών CD133 και CD24, συγκριτικά με την πατρική σειρά. Επιπροσθέτως, υπερέκφραση της KDM5A σε καρκινικά κύτταρα του μαστού επηρεάζει τα επίπεδα μεθυλίωσης της H3K4, ρυθμίζοντας έτσι την έκφραση διαφόρων γονιδίων συμπεριλαμβανομένου και του προ-αποπτωτικού BAK1 [134].

Αυξημένα επίσης επίπεδα της έκφρασης του KDM5B, έχουν παρατηρηθεί σε ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών συγκριτικά με τους φυσιολογικούς ιστούς των ωοθηκών. Μια πιθανή θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του KDM5B και της χημειοανθεκτικότητας που εμφανίζεται σε περιπτώσεις ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών, θα μπορούσε να αποτελέσει τα θεμέλια, για την αναγνώριση του συγκεκριμένου γονιδίου ως ένα βιοδείκτη για την πρόγνωση και τη χημειοανθεκτικότητα της παραπάνω μορφής καρκίνου [144]. Επιπλέον, το KDM5B αποτελεί ένα ογκογονίδιο στο luminal καρκίνου του μαστού, και όγκοι θετικοί στον υποδοχέα οιστρογόνων (ER⁺) με υψηλή έκφραση του KDM5B, χαρακτηρίζονται από κακή κλινική έκβαση και αντίσταση στην ορμονοθεραπεία [153].

Το KDM5B επίσης διαδραματίζει σημαντικό ρολό στην πρόοδο και στην μεταστατική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων του μελανώματος, όπως αποδεικνύεται από τη χορήγηση ξενομοσχευμάτων σε ανοσοκατασταλμένα ποντίκια [154]. Ο Roesch και οι συνεργάτες του μελέτησαν, εάν η αναστολή της μιτοχονδριακής αναπνοής θα μπορούσε να εξουδετερώσει την εγγενή ανθεκτικότητα των καρκινικών κυττάρων του μελανώματος με αργό κυτταρικό κύκλο. Ο αργός κυτταρικός κύκλος, αποτελεί μια μορφή προστασίας, όπου βοηθά τα κύτταρα να επιβιώσουν ύστερα από την έκθεση τους σε κάποιο χημειοθεραπευτικό φάρμακο [154]. Αυτός ο φαινότυπος υποστηρίζει μια μεταβολική κατάσταση με υψηλή έκφραση μιτοχονδριακών βιοενεργειακών ενζύμων συγκριτικά με τα ταχέως πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα. Τα δεδομένα αυτά, υποστηρίζουν την υπόθεση ότι τα κύτταρα με αργό κυτταρικό κύκλο βασίζονται περισσότερο στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, ενώ τα ταχέως πολλαπλασιαζόμενα στην γλυκόλυση [154]. Επιπροσθέτως, κύτταρα του μελανώματος με αργό κυτταρικό κύκλο χαρακτηρίζονται από υψηλή έκφραση του KDM5B, ενώ η αποσιώπηση του τα ευαισθητοποιεί στα φάρμακα cisplatin και temozolomide [153].

Όπως προαναφέρθηκε, το KDM5B σχετίζεται με αυξημένες βλαστικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένης και της αυξημένης ικανότητας των κυττάρων να σχηματίζουν σφαιρικές δομές (3D spheres), με τη μεταστατικότητα και τη διεισδυτικότητα καθώς επίσης και με τη χημειοανθεκτικότητα. Συγκεκριμένα, αποσιώπηση του KDM5B καταστέλλει την ικανότητα των κυττάρων του νευροβλαστώματος να σχηματίζουν σφαιρικές δομές καθώς επίσης αυξάνει και την ευαισθησία των κυττάρων στη Σισπλατίνη. Επιπλέον, και ποσοστιαία μειώνεται ο πληθυσμός των ALDH⁺ και CD133⁺ κυττάρων μέσω καταστολής του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch. Φαίνεται λοιπόν, πως το KDM5B θα μπορούσε να αποτελέσει έναν θεραπευτικό στόχο για την εξάλειψη των KBK [144].



Εικόνα 1.19: Η επιγενετική απορρύθμιση μεσολαβεί στον κυτταρικό επαναπρογραμματισμό στην επίκτητη χημειοανθεκτικότητα στον καρκίνο του μαστού. Κατά την έκθεση στη χημειοθεραπεία, τα καρκινικά κύτταρα που αναπτύσσουν έναν παροδικό ανθεκτικό φαινότυπο, ενδέχεται να αποκτήσουν περαιτέρω χαρακτηριστικά παρόμοια με τα KBK, όπως εμπλουτισμό σε δείκτες βλαστικότητας και αργό κυτταρικό κύκλο. Ομοίως, καρκινικά κύτταρα υπόκεινται στη διαδικασία του EMT για να αποφύγουν την κυτταροτοξικότητα. Κατά τη διαδικασία του EMT, τα κύτταρα με επιθηλιακό φαινότυπο χάνουν προοδευτικά τους επιθηλιακούς δείκτες και αποκτούν μεσεγχυματικούς, και έτσι γίνονται περισσότερο επιθετικά και διεισδυτικά. Η επιγενετική απορρύθμιση μεσολαβεί τόσο στη διαδικασία του EMT όσο και στη βλαστικότητα των κυττάρων, μέσω των οποίων επάγεται η χημειοανθεκτικότητα [154].

Σκοπός της εργασίας

Τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα (ΚΒΚ) αποτελούν ένα υποσύνολο των καρκινικών κυττάρων, τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση και στην πρόοδο της νόσου. Τα κύτταρα αυτά είναι ανθεκτικά στις συμβατικές μορφές θεραπείας, ενώ επίσης θεωρείται ότι συμβάλλουν και σε διαδικασίες όπως η υποτροπή του όγκου και η μετάσταση. Τα ΚΒΚ θεωρείται ότι βρίσκονται σε ειδικούς θώκους που περιλαμβάνουν διαφοροποιημένα καρκινικά κύτταρα, καρκινικούς ινοβλάστες, κύτταρα του ανοσοποιητικού καθώς και μη κυτταρικά συστατικά όπως η εξωκυττάρια μήτρα και οι αυξητικοί παράγοντες. Οι αλληλεπιδράσεις όλων αυτών των συστατικών φαίνεται ότι επάγουν το φαινότυπο των ΚΒΚ, ενώ επίσης το ίδιο το μικροπεριβάλλον, προστατεύει τα κύτταρα από τις διάφορες μορφές θεραπείας.

Οι επιγενετικοί μηχανισμοί φαίνεται ότι κατέχουν σημαντικό ρόλο στις λειτουργίες και τις ιδιότητες των ΚΒΚ. Τα μέλη της οικογένειας KDM5, αποτελούν μια ομάδα απομεθυλασών ιστονών οι οποίες φαίνεται ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε διαδικασίες όπως η αυτό-ανανέωση των ΚΒΚ, η χημειοανθεκτικότητα και η μετάσταση.

Συμπεριλαμβανομένων λοιπόν των παραπάνω πληροφοριών, και δεδομένου ότι η περισσότερη ερευνητική δουλειά στα ΚΒΚ *in vitro* γίνεται στο σύστημα των λεγόμενων tumorspheres (σφαιρικές δομές που θα δούμε στη συνέχεια, στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας), στόχος της μεταπτυχιακής διατριβής ήταν:

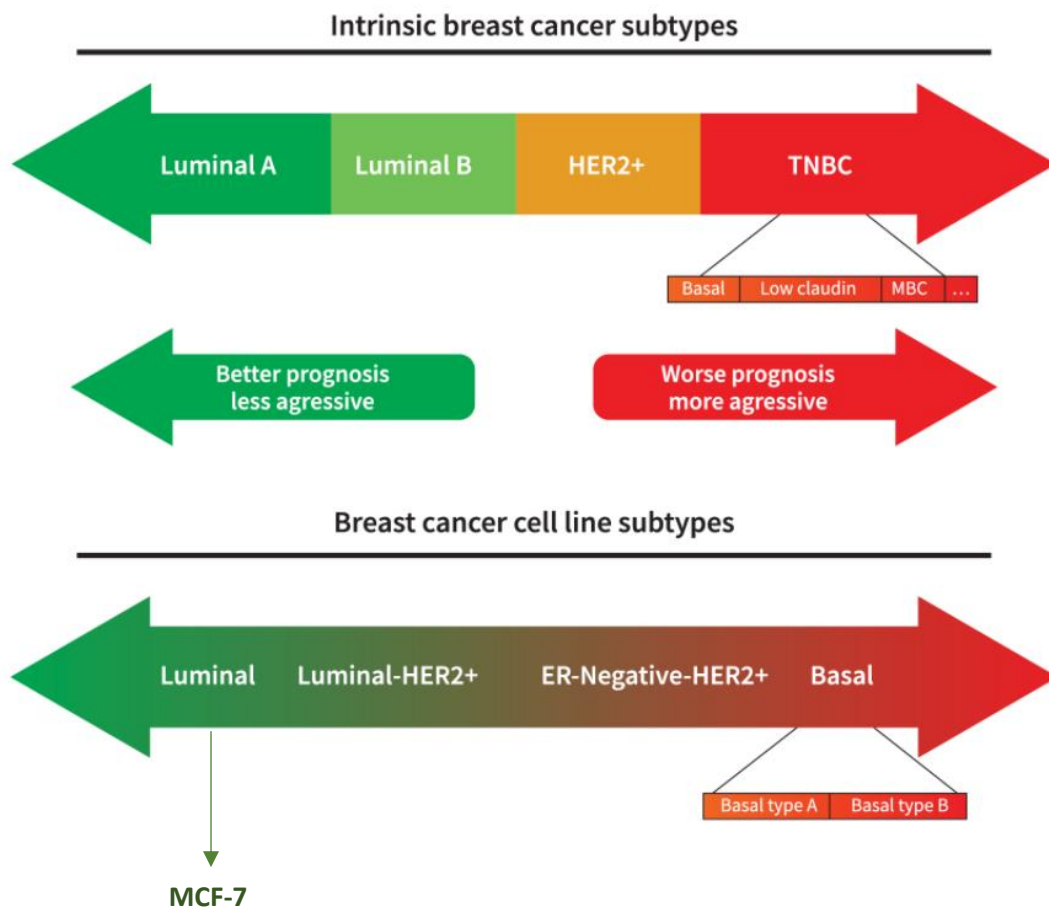
- ❖ Η εγκαθίδρυση και ο χαρακτηρισμός 3D μοντέλων καλλιέργειας που ενσωματώνουν και συστατικά του θώκου (εξωκυττάρια μήτρα και καρκινικοί ινοβλάστες) των ΚΒΚ του μαστού, και τα οποία προσομοιάζουν τις *in vivo* συνθήκες.
- ❖ Η επιβεβαίωση του ρόλου των συστατικών του θώκου (εξωκυττάρια μήτρα και καρκινικοί ινοβλάστες) των ΚΒΚ του μαστού, στη χημειοανθεκτικότητα των κυττάρων αυτών.
- ❖ Η αξιολόγηση της συνδυαστικής χορήγησης ενός επιγενετικού αναστολέα μαζί με χημειοθεραπευτικά φάρμακα, στα 3D συστήματα καλλιέργειας.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Κυτταροκαλλιέργεια

2.1.1 Καρκινικές κυτταρικές σειρές σου μαστού

Στα πειράματα της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε η ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά του μαστού MCF-7 και καρκινικοί ινοβλάστες (Cancer Associated Fibroblasts-CAFs) του μαστού προερχόμενοι από όγκο ασθενή με μοριακά χαρακτηριστικά ER⁺/PR⁺/HER2⁻ υποτύπου. Η MCF-7 καρκινική σειρά απομονώθηκε πρώτη φορά το 1973 από μια 69χρονη γυναίκα με μεταστατικό καρκίνο του μαστού. Το όνομα της συγκεκριμένης σειράς προέρχεται από το ακρωνύμιο Michigan Cancer Foundation-7, όπου και χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά το 1973 από τον Hebert Soule και τους συνεργάτες του.



Εικόνα 2.1 : Μοριακοί υποτύποι καρκίνου του μαστού και η αντίστοιχη κυτταρική τους σειρά [155].

2.1.2 Συνθήκες καλλιέργειας προσκολλημένων κυττάρων

Οι παραπάνω ανθρώπινες καρκινικές σειρές του μαστού καλλιεργήθηκαν σε αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό DMEM (Sigma) υψηλής περιεκτικότητας σε γλουταμίνη εμπλουτισμένο με ορό από έμβρυο μόσχου (FBS) (Gibco-Life Technologies) (περιεκτικότητα 10%) και αντιβιοτικό πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης (Biosera) (περιεκτικότητα 1%). Τα κύτταρα καλλιεργούνταν σε επωαστήρα (incubator) στους 37°C και 5% CO². Κάθε 2-3 μέρες ανάλογα με την πυκνότητα των κυττάρων (~80%) στο εκάστοτε τρυβλίο, πραγματοποιείτο αλλαγή θρεπτικού υλικού ή μεταφορά των κυττάρων σε νέο τρυβλίο (splitting). Πριν τη μεταφορά των κυττάρων στο νέο τρυβλίο πραγματοποιούνται πλύσεις με PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline-Sigma), ενώ για να αποκολληθούν τα κύτταρα από την επιφάνεια του τρυβλίου χρησιμοποιείται τρυψίνη (Trypsin EDTA 1X-Biosera)

2.1.3 Mammosphere Formation Assay (M.F.A)

Η πιο αξιόπιστη *in vitro* δοκιμασία για να ελεγχθεί η βλαστικότητα των KBK του μαστού είναι η M.F.A. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ικανότητα των KBK να σχηματίζουν σφαιρικές δομές (mammospheres), όταν οι συνθήκες δεν επιτρέπουν την προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια των πιατών. Υπό αυτές τις συνθήκες, τα μη KBK πεθαίνουν λόγω ανοικίας (anoikis). Τα πιάτα που χρησιμοποιήθηκαν επιστρώθηκαν με poly (2-hydroxyethyl methacrylate-pHEMA) (SIGMA-Life Science) (non-adherent plates). Πιο αναλυτικά, για να επιτευχθεί αυτό, η pHEMA διαλύεται σε 95% EtOH (αιθανόλη) σε συγκέντρωση 20 mg/ml και επιστρώνεται σε πιάτα 6 θέσεων (6 well plates). Στη συνέχεια τα πιάτα αυτά αφήνονται για 48 ώρες στους 37°C ώστε να στεγνώσουν. Μετά το πέρας των 48 ωρών τα πιάτα μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα ή να φυλαχθούν στους 4°C. Σε ορισμένες περιπτώσεις έγινε χρήση βακτηριακών πιατών, τα οποία δεν επιτρέπουν τη προσκόλληση των κυττάρων στο υπόστρωμα και ευνοούν τη δημιουργία mammospheres.

Συγκεκριμένα, η κυτταρική σειρά MCF-7 καλλιεργήθηκε όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.1.2. Μετά από 5 περάσματα τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για το σχηματισμό mammospheres σύμφωνα με την παρακάτω πειραματική πορεία. Στο 5ο σπάσιμο (split) και αφού τα κύτταρα βρίσκονται σε πυκνότητα 70%-80%, αποκολλώνται από την επιφάνεια του τρυβλίου με τη χρήση τρυψίνης και συλλέγονται σε ένα falcon σωληνάριο. Στη συνέχεια ακολουθεί μέτρηση των κυττάρων ώστε να προσδιοριστεί ο αριθμός αυτών που θα χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία mammospheres. Ακολούθως τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται για 5 λεπτά στους 25°C με ταχύτητα 1800rpm. Αφού τελειώσει η φυγοκέντρηση απορρίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα (κύτταρα) επαναιωρείται σε mammospheres medium, το οποίο αποτελείται από αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό DMEM/F12 (Biosera). Σε αυτό προστίθεται γλουταμίνη (1% περιεκτικότητα), το διατροφικό συμπλήρωμα B27 (Gibco by Life technologies-without vitamin A) (περιεκτικότητα 0,5%) καθώς και οι αυξητικοί παράγοντες EGF και FGF (ImmunoTools) (20 ng/ml). Τελευταίο βήμα αποτελεί η προσθήκη των κυττάρων (25000/θέση) στα επιστρωμένα πιάτα 6 θέσεων με pHEMA. Τα πιάτα τοποθετούνται σε επωαστήρα σε συνθήκες 37°C και 5% CO² για όσο χρονικό διάστημα (7 ημέρες) απαιτείται ώστε να σχηματιστούν οι mammospheres.

Προκειμένου να υπολογιστεί η βλαστικότητα *in vitro*, υπολογίζεται το ποσοστό M.F.E. (mammosphere formation efficiency) σύμφωνα με τον τύπο:

$$M.F.E. = (Number\ of\ mammospheres\ per\ well / Number\ of\ cells\ seeded\ per\ well) \times 100\%$$

2.1.4 Καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων του μαστού σε συνθήκες τρισδιάστατης καλλιέργειας-Matrigel

Η εξωκυττάρια μήτρα είναι ένας βασικός ρυθμιστής της φυσιολογικής ομοιόστασης και του φαινοτύπου των κυττάρων. Σημαντικά σηματοδοτικά μόρια χάνονται όταν τα κύτταρα καλλιεργούνται *ex vivo* και σε δισδιάστατα πλαστικά υποστρώματα. Πολλές από αυτές τις κρίσιμες μικροπεριβαλλοντικές αλληλεπιδράσεις μπορούν να αποκατασταθούν χρησιμοποιώντας τρισδιάστατες καλλιέργειες πλούσιες σε συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκε το υλικό Matrigel (Tebu-bio) για την δημιουργία MCF-7 σφαιρικών δομών. Συγκεκριμένα, η κυτταρική σειρά MCF-7 καλλιεργήθηκε όπως περιεγράφηκε στην παράγραφο 2.1.2 Μετά από 5 περάσματα τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για το σχηματισμό σφαιρικών δομών σύμφωνα με την παρακάτω πειραματική πορεία. Στο 5ο σπάσιμο (split) και αφού τα κύτταρα βρίσκονται σε πυκνότητα 70%-80%, αποκολλώνται από την επιφάνεια του τρυβλίου με τη χρήση τρυψίνης και συλλέγονται σε ένα falcon σωληνάριο. Στη συνέχεια ακολουθεί μέτρηση των κυττάρων ώστε να προσδιοριστεί ο αριθμός αυτών που θα χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία σφαιρικών δομών. Επιπροσθέτως, από την προηγούμενη ημέρα τοποθετείται το Matrigel στους 4°C σε πάγο ώστε να ξεπαγώσει ομαλά. Την επόμενη ημέρα, και λίγο πριν τη συλλογή των κυττάρων, σε προ-ψυγμένα πολυτρυβλία 24 θέσεων και με προ-ψυγμένα ρύγχη πιπετών επιστρώνεται το Matrigel. Στη συνέχεια τα πιάτα αυτά αφήνονται για 30 λεπτά στους 37°C ώστε να στεγνώσουν. Λίγο πριν πήξει το Matrigel, τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται για 5 λεπτά στους 25°C με ταχύτητα 1500rpm. Αφού τελειώσει η φυγοκέντρηση απορρίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα (κύτταρα) επαναιωρείται σε DMEM/F12 (Biosera). Τελευταίο βήμα αποτελεί η προσθήκη των κυττάρων (8000/θέση). Τα πιάτα τοποθετούνται σε επωαστήρα σε συνθήκες 37°C και 5% CO₂ για χρονικό διάστημα 7 ημερών ώστε να σχηματιστούν οι σφαιρικές δομές.

2.1.5 Συγκαλλιέργεια MCF-7 κυττάρων και CAFs

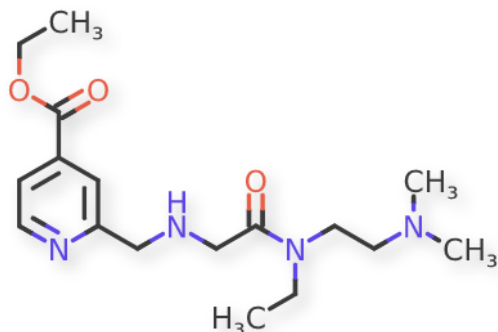
Τα περισσότερα από τα τρέχοντα τρισδιάστατα *in vitro* μοντέλα του καρκίνου αποτελούνται αποκλειστικά και μόνο από καρκινικά κύτταρα και δεν είναι σε θέση να αναπαράγουν τη σύνθετη κυτταρική ετερογένεια του μικροπεριβάλλοντος του όγκου. Προκειμένου να ληφθούν υπόψη οι πολύπλοκες κυτταρικές αλληλεπιδράσεις εντός του όγκου, αναπτύχθηκε ένα τρισδιάστατο *in vitro* σφαιροειδές μοντέλο αποτελούμενο από την MCF-7 κυτταρική σειρά και καρκινικούς ινοβλάστες (CAFs) προερχόμενους από όγκο ασθενή με μοριακά χαρακτηριστικά ER⁺/PR⁺/HER2⁻ υποτύπου. Συγκεκριμένα, οι κυτταρικές σειρές MCF-7 και CAFs καλλιεργήθηκαν όπως περιεγράφηκε στην παράγραφο 2.1.2 Τα σφαιροειδή αυτά σχηματίστηκαν βασιζόμενοι στη μέθοδο που περιγράφεται στην ενότητα 2.1.3. Παρόμοια με την παράγραφο 2.1.3, και οι δύο κυτταρικές σειρές, ταυτόχρονα, επιστρώνονται στα ειδικά πιάτα 6 θέσεων με pHema. Για τα MCF-7 ο αριθμός κυττάρων είναι 25000/θέση, ενώ για τους CAFs είναι 50000/θέση. Τα πιάτα τοποθετούνται σε επωαστήρα σε συνθήκες 37°C και 5% CO₂ για χρονικό διάστημα 7 ημερών ώστε να σχηματιστούν οι σφαιρικές δομές.

2.1.6 Χημικά Φάρμακα – Αναστολείς

2.1.6.1 Αναστολέας των KDM5 απομεθυλασών

Για την αναστολή των KDM5, χρησιμοποιήθηκε ένας εκλεκτικός αναστολέας της οικογένειας των απομεθυλασών ιστόνης KDM5, ο KDM5-C70 (Xcessbio, M60192-2) [182]. Συγκεκριμένα, ο αναστολέας αυτός αποτελεί ένα παράγωγο αιθυλεστέρα του KDM5-C49, ο οποίος εξαιτίας της εξαιρετικά πολικής καρβοξυλικής ομάδας του εμφανίζει περιορισμένη κυτταρική διαπερατότητα. Ο αναστολέας δρα παρεμποδίζοντας την πρόσδεση ενός απαραίτητου

συμπαράγοντα του ενζύμου, του α-κετογλουταρικού, στο ενεργό κέντρο του. Η χημική δομή του KDM5-C70 φαίνεται στην **Εικόνα 2.2**. Ο KDM5-C70 χρησιμοποιείται διαλυμένος σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO-Sigma).



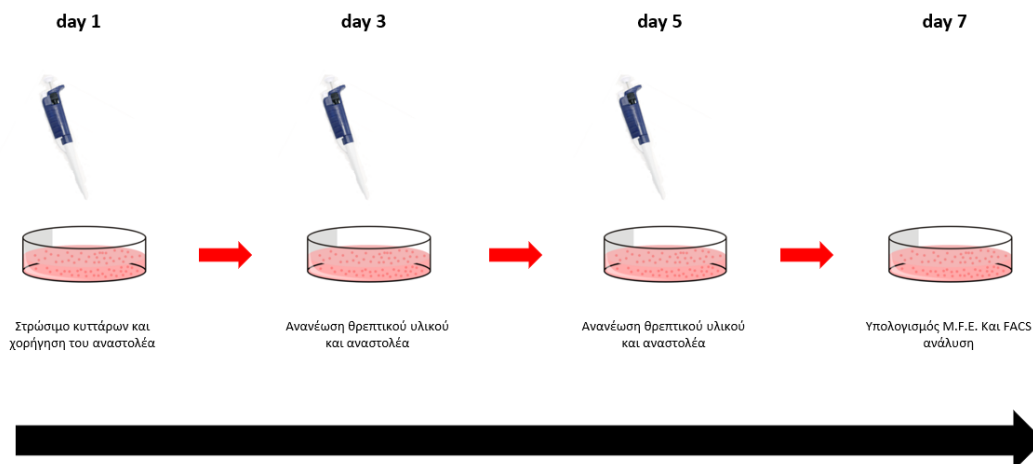
<https://drugs.ncats.io/>

Εικόνα 2.2 : Η χημική δομή του αναστολέα KDM5-C70

2.1.6.2 Αναστολή των KDM5 απομεθυλασών

Για να μελετηθεί ο ρόλος της αναστολής των KDM5 απομεθυλασών, χορηγήθηκε σε σφαιρικές δομές MCF-7 κυττάρων που αναπτύσσονται σε εναιώρημα, σε MCF-7 κύτταρα που αναπτύσσονται στο Matrigel, και σε MCF-7 σφαιρικές δομές που αναπτύσσονται σε εναιώρημα με την ταυτόχρονη παρουσία CAFs, ο KDM5-C70, όπως περιγράφεται παρακάτω. Κάθε 48 ώρες, φρέσκο θρεπτικό μέσο προστίθετο σε κάθε θέση του πολυτρυβλίου μαζί με την κατάλληλη συγκέντρωση του αναστολέα (5 μ M), όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 2.3**. Η χορήγηση του αναστολέα διαρκούσε για 7 ημέρες. Την τελευταία ημέρα μετρούνταν ο αριθμός των σφαιρών και υπολογιζόταν το M.F.E.. Περαιτέρω ανάλυση του υποπληθυσμού των KBK πραγματοποιήθηκε μέσω πειραμάτων κυτταρομετρίας ροής.

KDM5 inhibition

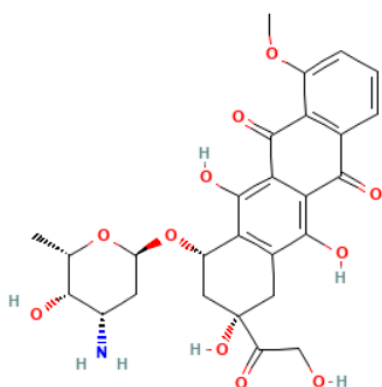


Εικόνα 2.3 : Φαρμακολογική αναστολή των KDM5 απομεθυλασών. Ο χημικός αναστολέας που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο KDM5-C70. Την τελευταία ημέρα υπολογίστηκε το M.F.E. και ποσοτικοποιήθηκε ο υποπληθυσμός των KBK μέσω πειραμάτων κυτταρομετρίας ροής.

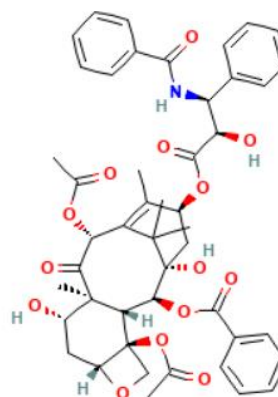
2.1.6.3 Χημειοθεραπευτικά φάρμακα

Στις MCF-7 σφαιρικές δομές χορηγήθηκαν χημειοθεραπευτικά φάρμακα, συγκεκριμένα η Αδριαμυκίνη και η Πακλιταξέλη, που χρησιμοποιούνται κατά κόρον στις ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Η Δοξορουβικίνη (Doxorubicin) είναι ένα χημειοθεραπευτικό φάρμακο που χρησιμοποιείται στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού. Συγκεκριμένα, εντάσσεται στην κατηγορία των ανθρακυκλινών και στοχεύει τα ταχέως πολλαπλασιαζόμενα-διαφοροποιημένα κύτταρα του όγκου. Ο μηχανισμός δράσης του Doxorubicin έχει να κάνει με την αναστολή σύνθεσης του DNA των καρκινικών κυττάρων. Πιο ειδικά, αναστέλλει το ένζυμο τοποϊσομεράση II, το οποίο είναι υπεύθυνο για τη χαλάρωση των υπερελικών του DNA και την επίτευξη της διαδικασίας της αντιγραφής. Η Πακλιταξέλη (Paclitaxel) είναι ένας χημειοθεραπευτικός παράγοντας που επίσης χρησιμοποιείται για την θεραπεία του καρκίνου του μαστού και εντάσσεται στην κατηγορία των μιτωτικών αναστολέων. Μέσω της σύνδεσης της με τα μόρια της τουμπουλίνης σταθεροποιεί την δομή των μικροσωληνίσκων και αποτρέπει τον αποπολυμερισμό τους. Με τον τρόπο αυτό αναστέλλει την αναδιοργάνωση των μικροσωληνίσκων, η οποία είναι απαραίτητη για την διαδικασία της μίτωσης. Η **Εικόνα 2.4** δείχνει τη χημική δομή των παραπάνω φαρμάκων.

Δοξορουβικίνη



Πακλιταξέλη



Εικόνα 2.4 : Οι χημικές δομές των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων Δοξορουβικίνης και Πακλιταξέλης

2.1.6.4 Χορήγηση Χημειοθεραπευτικών φαρμάκων

2.1.6.4.1 Χορήγηση χημειοθεραπευτικών φαρμάκων σε διάφορες συνθήκες καλλιέργειας

Οι MCF-7 σφαιρικές δομές σε εναιώρημα, τα MCF-7 κύτταρα που αναπτύσσονται στο Matrigel, και οι MCF-7 σφαιρικές δομές που αναπτύσσονται σε εναιώρημα με τη ταυτόχρονη παρουσία των CAFs, καλλιεργήθηκαν παρουσία των χημειοφαρμάκων Δοξορουβικίνη και Πακλιταξέλη. Συγκεκριμένα, την 3^η ημέρα από την έναρξη του πειράματος και αφού είχαν ήδη αρχίσει να σχηματίζονται οι σφαιρικές δομές, πραγματοποιήθηκε χορήγηση των χημειοφαρμάκων Δοξορουβικίνης (2.5 μ M) και Πακλιταξέλης (15 μ M). Για την κάθε επόμενη μέρα, και μέχρι την 7^η, μετρούνταν ο αριθμός των σφαιρών και υπολογιζόταν το M.F.E..

2.1.6.4.2 Συνδυαστική χορήγηση χημειοθεραπευτικών φαρμάκων με τον αναστολέα των KDM5 απομεθυλασών

Οι MCF-7 σφαιρικές δομές σε εναιώρημα, τα MCF-7 κύτταρα που αναπτύσσονται στο Matrigel, και οι MCF-7 σφαιρικές δομές που αναπτύσσονται σε εναιώρημα με την παρουσία των CAFs, καλλιεργήθηκαν με την ταυτόχρονη χορήγηση του KDM5-C70 αναστολέα και των χημειοφαρμάκων Δοξορουβικίνη (2.5 μ M) και Πακλιταξέλη (15 μ M). Συγκεκριμένα, την ημέρα έναρξης του πειράματος ο KDM5-C70 (5 μ M) αναστολέας προστέθηκε στα κύτταρα. Για τις πρώτες πέντε μέρες, ανά 48 ώρες, φρέσκο θρεπτικό υλικό προστίθετο σε κάθε συνθήκη μαζί με την κατάλληλη ποσότητα του χημικού αναστολέα. Την πέμπτη ημέρα, πραγματοποιούνταν και η χορήγηση των χημειοφαρμάκων στις ήδη σχηματισμένες σφαιρικές δομές. Τέλος, 48 ώρες μετά την προσθήκη του φαρμάκου μετρούνταν ο αριθμός των σφαιρών και υπολογιζόταν το M.F.E.. Περαιτέρω ανάλυση του υποπληθυσμού των KBK πραγματοποιήθηκε μέσω πειραμάτων κυτταρομετρίας ροής.

2.2 Μοριακές και Βιοχημικές τεχνικές

2.2.1 Έμμεσος ανοσοφθορισμός

Τα MCF-7 καρκινικά κύτταρα και οι CAFs έχουν επιστρωθεί μια ή δυο ημέρες πριν σε γυάλινες καλυπτρίδες και μονιμοποιούνται σε διάλυμα 4% φορμαλδεΐδης αραιωμένης σε PBS για 10 λεπτά. Το μέσο και ο χρόνος επώασης της μονιμοποίησης των κυττάρων εξαρτάται από το εκάστοτε αντίσωμα το οποίο θα χρησιμοποιηθεί. Ακολουθούν πλύσεις με PBS και στη συνέχεια επώαση του δείγματος για 10 λεπτά με διάλυμα γλυκίνης 5mM διαλυτοποιημένης σε PBS, προκειμένου να εξουδετερωθεί το μέσο μονιμοποίησης. Τα δείγματα εκπλύονται με PBS και εν συνεχεία επωάζονται για 15 λεπτά σε ρυθμιστικό διάλυμα Α το οποίο είναι ικανό να αποκλείει μη ειδικές θέσεις. Το συγκεκριμένο διάλυμα περιέχει 150mM NaCl, 20mM TrisHCl, 2mM MgCl₂, 0.1mM EGTA, 0.2% Triton X-100, 0.5% Fish skin gelatin (FSG). Ακολουθεί επώαση 1 ώρας με το πρωτεύον αντίσωμα (anti-α-SMA, BD Bioscience) το οποίο έχει αραιωθεί στο διάλυμα Α αποκλεισμού ειδικών θέσεων σε κατάλληλη συγκέντρωση (1/500). Μετά από τρεις πλύσεις με το διάλυμα Α τα δείγματα επωάζονται με αντίστοιχο δευτερεύον φθορίζον αντίσωμα στις ίδιες συνθήκες με το πρωτεύον αλλά ο χρόνος επώασης είναι 45 λεπτά. Τα δείγματα εκπλύονται τρεις φορές με το διάλυμα Α και άλλες τρεις με PBS έτσι ώστε να ακολουθήσει η χρώση του DNA χρωστικές όπως DAPI, TOPRO-3 είτε ιωδιούχο προπίδιο (PI-propidium iodide) ανάλογα με τις απαιτήσεις του πειράματος. Τέλος, οι καλυπτρίδες εκπλύονται με PBS και αφού καλυφθούν με ένα διάλυμα (Vectashield) το οποίο προστατεύει το δείγμα από την απώλεια του φθορισμού κατά την παρατήρηση, τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρους πλάκες. Τα δείγματα διατηρούνται στους 4°C και εξετάζονται σε συνεστιακό μικροσκόπιο (Confocal microscope Leica SP5 TCII).

2.2.2 Συνεστιακή μικροσκοπία

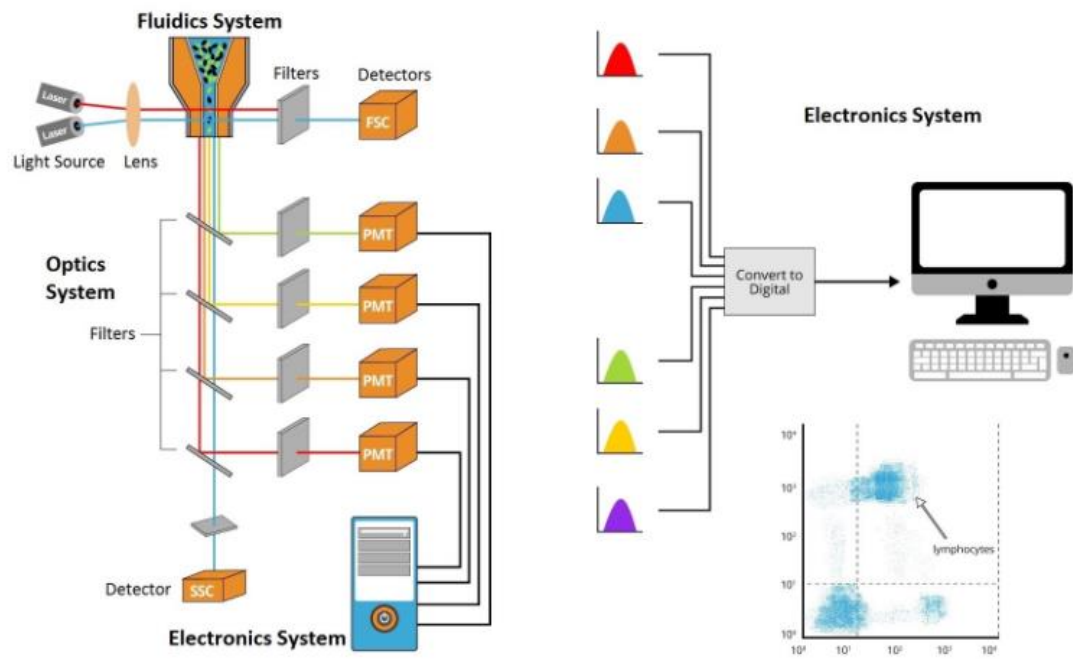
Τα δείγματα εξετάστηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο (confocal microscope) Leica TCS-SP1 και Leica SP5 TCSII ενώ οι φωτογραφίες αναλύθηκαν με χρήση των λογισμικών Fiji (NIH Image), LAS AF Lite (Leica) ή Adobe Photoshop (Adobe) Software.

2.3 Κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry)

Η Κυτταρομετρία Ροής είναι μια σύνθετη, πολυπαραμετρική και αυτοματοποιημένη μέθοδος μέτρησης πολλαπλών φυσικοχημικών και/ή φαινοτυπικών χαρακτηριστικών των κυττάρων ή κυτταρικών οργανιδίων (πυρήνες, μιτοχόνδρια, λυσοσώματα). Τα χαρακτηριστικά προσδιορίζονται άμεσα και διακριτά για το καθένα από τα κύτταρα του εξεταζόμενου δείγματος. Κύριο πλεονέκτημά της αποτελεί η δυνατότητα ταυτόχρονης ανάλυσης περισσότερων της μία παραμέτρου. Πρόκειται για μια ποσοτική μέθοδο που χαρακτηρίζεται από υψηλή αναλυτική ικανότητα, ακρίβεια και αξιοπιστία συγκριτικά με τις συμβατικές τεχνικές όπως η μικροσκοπία. Η κυτταρομετρία ροής παρέχει τη δυνατότητα προσδιορισμού κυτταρικού μεγέθους και κοκκίωσης, ποσοτικών προσδιορισμών των κυτταρικών πληθυσμών ή υποπληθυσμών που εκφράζουν χαρακτηριστικές μεμβρανικές πρωτεΐνες κ.α. Η κυτταρομέτρηση πραγματοποιείται με τη χρήση σύνθετων συσκευών των κυτταρομετρητών ροής. Ένας κυτταρομετρητής ροής αποτελείται από τρία βασικά συστήματα: α) το υδροδυναμικό σύστημα ροής β) το οπτικό σύστημα και γ) το ηλεκτρονικό σύστημα ανάλυσης δεδομένων. Το υδροδυναμικό σύστημα είναι ένα υδραυλικό σύστημα που κατευθύνει τα κύτταρα ή οργανίδια των εξεταζόμενων δειγμάτων, τα οποία βρίσκονται σε μορφή εναιωρήματος, να ρέουν το ένα πίσω από το άλλο (ρευστή νηματοειδής ροή) μπροστά από μία εστιασμένη δέσμη Laser απορροφώντας τα από το εναιώρημα. Αυτό επιτελείται με την εισαγωγή του δείγματος στον κεντρικό ενός καναλιού, περιβαλλόμενο από ρέον αδρανές υγρό (Sheath fluid) κατά μήκος του καναλιού. Το κανάλι τοποθετείται μέσα στο θάλαμο ροής

όπου επιτυγχάνεται η υδροδυναμική εστίαση, με σκοπό το κύτταρο να έρχεται σε επαφή με τη δέσμη Laser. Το οπτικό σύστημα συλλέγει τα φωτεινά σήματα που εκπέμπουν τα κύτταρα από την πρόσπτωση της δέσμης Laser πάνω τους. Η ανάλυση πραγματοποιείται με βάση τη συλλεγόμενη ακτινοβολία, συγκεκριμένα το σκεδασμένο φως και τον εκπεμπόμενο φθορισμό. Όταν το κύτταρο γίνεται δέκτης της κάθετης, σε σύγκριση με την κατεύθυνση ροής, δέσμης Laser, ένα μέρος της προσπίπτουσας απορροφάται από το κύτταρο ενώ το υπόλοιπο σκεδάζεται. Η ακτινοβολία που σκεδάζεται στην κατεύθυνση της δέσμης Laser ονομάζεται πρόσθια σκέδαση (FSC), ένδειξη μεγέθους. Η ακτινοβολία που σκεδάζεται σε κατεύθυνση κάθετη προς τον άξονα της δέσμης Laser ονομάζεται πλευρική σκέδαση (SSC), ένδειξη κοκκίωσης. Ο εκπεμπόμενος φθορισμός συλλέγεται, αναλύεται και μετράται με κατάλληλα συστήματα διχροϊκών κατόπτρων και φίλτρων. Δεδομένων των αρχών λειτουργίας ενός κυτταρομετρητή ροής, απαραίτητες συνθήκες για την προετοιμασία των δειγμάτων και τη μέτρηση τους αποτελούν η παρουσία του υπό εξέταση κυτταρικού πληθυσμού σε εναιώρημα και η σήμανση των κυττάρων με φθορίζουσες χρωστικές συζευγμένες με αντισώματα. Στα πειράματά λοιπόν για το διαχωρισμό φαινοτυπικά διαφορετικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν χρωστικές που φέρουν τα αντισώματα FITC και PE. Στην παρούσα εργασία, αυτή η τεχνική χρησιμοποιήθηκε με σκοπό την ανίχνευση των δεικτών CD44, CD24 ώστε να ελεγχθεί ο εμπλουτισμός των mammospheres (CD44⁺/CD24^{-/low}) σε καρκινικά βλαστικά κύτταρα, με βάση το ακόλουθο πρωτόκολλο.

Κύτταρα της καρκινικής σειράς του μαστού MCF-7 συλλέχθηκαν τόσο από την αρχική καλλιέργεια όσο και από mammospheres, όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Μετά το στάδιο της φυγοκέντρησης για 5 λεπτά στους 25°C σε ταχύτητα 1500 rpm αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζυμα (κύτταρα) επαναδιαλύεται στην κατάλληλη ποσότητα PBS 1X. Το κάθε δείγμα περιέχει 100.000-200.000 κύτταρα σε 100 μl PBS 1X. Το κύριο δείγμα που θέλουμε να εξετάσουμε για τον υποπληθυσμό CD44⁺/CD24^{-/low} επωάζεται αρχικά με 5 μl antiCD44-PE (BD Biosciences) υπό ανάδευση για 20 λεπτά στους 4°C και στην συνέχεια με 5 μl antiCD24-FITC (BD Biosciences) στις ίδιες συνθήκες. Το δείγμα που προορίζεται για αρνητικός μάρτυρας (ισοτυπικό control) επωάζεται ταυτοχρόνως με 2 μl IgG PE και 2 μl IgG FITC για 20 λεπτά στους 4°C υπό ανάδευση. Τελευταίο βήμα πριν την τοποθέτηση των δειγμάτων στο μηχάνημα κυτταρομετρίας ροής, είναι οι τρεις πλύσεις με 100 μl PBS 1X.



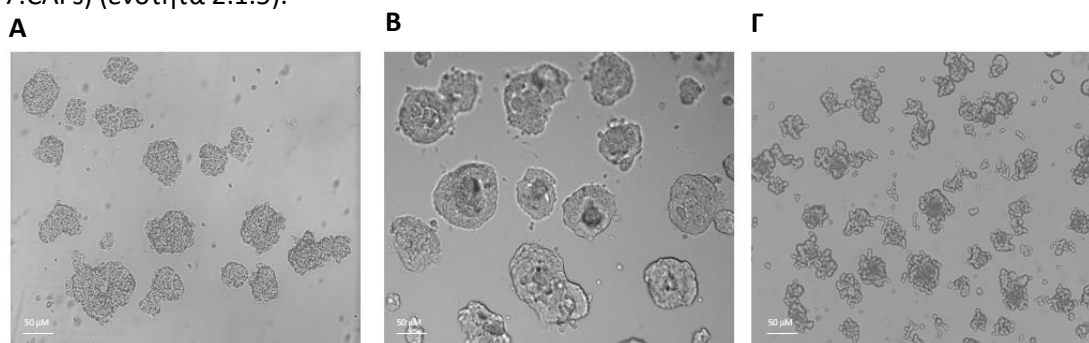
Εικόνα 2.5 : Σχηματική απεικόνιση ενός Κυτταρόμετρου Ροής. Στην αριστερή μεριά της εικόνας φαίνονται οι κεντρικοί παράμετροι του Κυτταρόμετρου, ενώ στη δεξιά μεριά φαίνεται η ανάλυση που προκύπτει από το ηλεκτρονικό σύστημα (<https://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/flow-cytometry-principle>).

3. Αποτελέσματα

3.1 Εγκαθίδρυση και χαρακτηρισμός *in vitro* τρισδιάστατων (3D) συστημάτων καλλιέργειας, εμπλουτισμένων σε καρκινικά βλαστικά κύτταρα, προερχόμενα από την καρκινική σειρά του μαστού MCF-7

3.1.1 Εγκαθίδρυση *in vitro* τρισδιάστατων (3D) συστημάτων καλλιέργειας

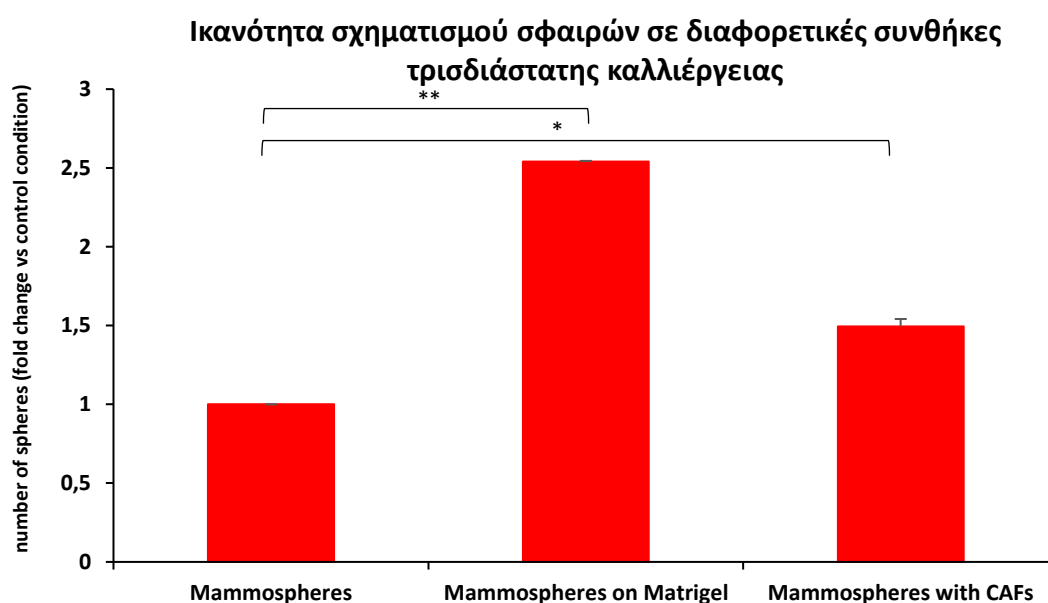
Ο πρώτος στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η εγκαθίδρυση και ο χαρακτηρισμός διαφορετικών *in vitro* τρισδιάστατων καλλιεργειών, οι οποίες θα είναι εμπλουτισμένες σε καρκινικά βλαστικά κύτταρα του μαστού. Για να επιτευχθεί αυτό, μονήρη κύτταρα της καρκινικής σειράς του μαστού MCF-7, καλλιεργήθηκαν, α) σε εναιώρημα, όπου δεν επιτρέπεται η προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια του τρυβλίου και έτσι τα KBK του μαστού είναι ικανά να σχηματίζουν σφαιρικές δομές (mammospheres), ενώ τα υπόλοιπα κύτταρα πεθαίνουν λόγω ανοικίας, β) σε Matrigel, ένα υπόστρωμα το οποίο αποτελείται από συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας (κολλαγόνο, εντακτίνη και λαμινίνη) και προσομοιάζει τις *in vivo* συνθήκες και γ) με την ταυτόχρονη παρουσία καρκινικών ινοβλαστών (Cancer Associated Fibroblasts-CAFs) του μαστού σε εναιώρημα, επιτρέποντας έτσι την ανάπτυξη αλληλεπιδράσεων με κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, οι οποίες προάγουν τη συντήρηση και τον εμπλουτισμό των καρκινικών βλαστικών κυττάρων. Και στα τρία συστήματα, τα MCF-7 κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 7 ημέρες (Εικόνα 3.1). Η καλλιέργεια σε εναιώρημα αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος η οποία περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα 2.1.3. Για την καλλιέργεια σε Matrigel, το ίδιο το υλικό, από την προηγούμενη ημέρα εφαρμογής του πρωτοκόλλου καλλιέργειας, τοποθετείται στους 4°C σε πάγο ώστε να ξεπαγώσει ομαλά. Σημαντικό επίσης είναι, η επίστρωση του υλικού να γίνει σε προψυγμένα τρυβλία και στη συνέχεια να τοποθετηθούν στους 37°C ώστε να πήξει το Matrigel. Ο αριθμός των κυττάρων που επιστρώθηκαν, μετά από βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου, ήταν τέτοιος ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία συσσωματωμάτων (ενότητα 2.1.4). Για τη συγκαλλιέργεια των MCF-7 κυττάρων και των καρκινικών ινοβλαστών, πραγματοποιήθηκαν προκαταρκτικά πειράματα, έτσι ώστε να καθοριστεί η καλύτερη αναλογία MCF-7 κυττάρων και CAFs. Στόχος μας ήταν να καταλήξουμε σε μια συγκέντρωση κυττάρων, η οποία θα επέτρεπε τη δημιουργία σφαιρικών δομών αποτελούμενων και από τους δύο κυτταρικούς πληθυσμούς και επίσης η αποφυγή δημιουργίας συσσωματωμάτων. Για το λόγο αυτό οι κυτταρικοί πληθυσμοί χρησιμοποιήθηκαν τελικά σε αναλογία 1:2 (MCF-7:CAFs) (ενότητα 2.1.5).



Εικόνα 3.1: Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες καλλιέργειας MCF-7 κυττάρων σε διαφορετικά συστήματα τρισδιάστατης καλλιέργειας. MCF-7 κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 7 ημέρες **A**. σε συνθήκες όπου δεν επιτρέπεται η προσκόλληση των κυττάρων **B**. σε Matrigel **Γ**. σε συγκαλλιέργεια μαζί με καρκινικούς ινοβλάστες. Η διάμετρος των σφαιρών μετρήθηκε μέσω του προγράμματος LasX. Κλίμακα μπάρας 50 μM.

3.1.2 Ικανότητα σχηματισμού σφαιρικών δομών μεταξύ των διαφορετικών συστημάτων 3D καλλιέργειας

Η ικανότητα σχηματισμού σφαιρικών δομών (mammospheres) σε αυτά τα συστήματα υποδηλώνει την παρουσία κυττάρων με βλαστικές ιδιότητες. Συγκεκριμένα, η παραπάνω ιδιότητα επιβεβαιώνεται και στα τρία συστήματα μας, όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 3.1**. Περαιτέρω, θελήσαμε να συγκρίνουμε τον αριθμό των σφαιροειδών και στα τρία διαφορετικά συστήματα και για αυτό το λόγο προχωρήσαμε στην ποσοτικοποίηση της ικανότητας σχηματισμού σφαιρικών δομών (M.F.A) (ενότητα 2.1.3). Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.2**, η καλλιέργεια στο Matrigel αποτελεί το σύστημα με το μεγαλύτερο αριθμό σφαιροειδών (περίπου 2,5 φορές περισσότερες από ότι στην καλλιέργεια σε εναιώρημα), ενώ η συγκαλλιέργεια καρκινικών κυττάρων και ινοβλαστών επίσης επιτρέπει τη δημιουργία σφαιροειδών σε μεγαλύτερο ποσοστό από ότι στην καλλιέργεια σε εναιώρημα (περίπου 1,5 φορά περισσότερες). Επομένως, είναι πιθανό η αλληλεπίδραση των καρκινικών κυττάρων με τα συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας (Matrigel) ή με τους καρκινικούς ινοβλάστες, να δημιουργεί ένα περιβάλλον ευνοϊκότερο για την βλαστικότητα των KBK.

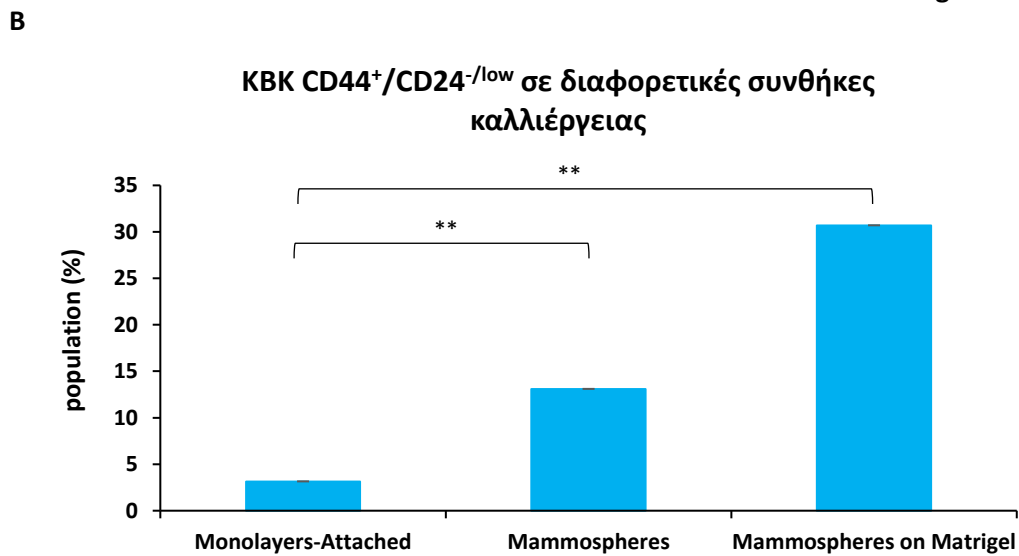
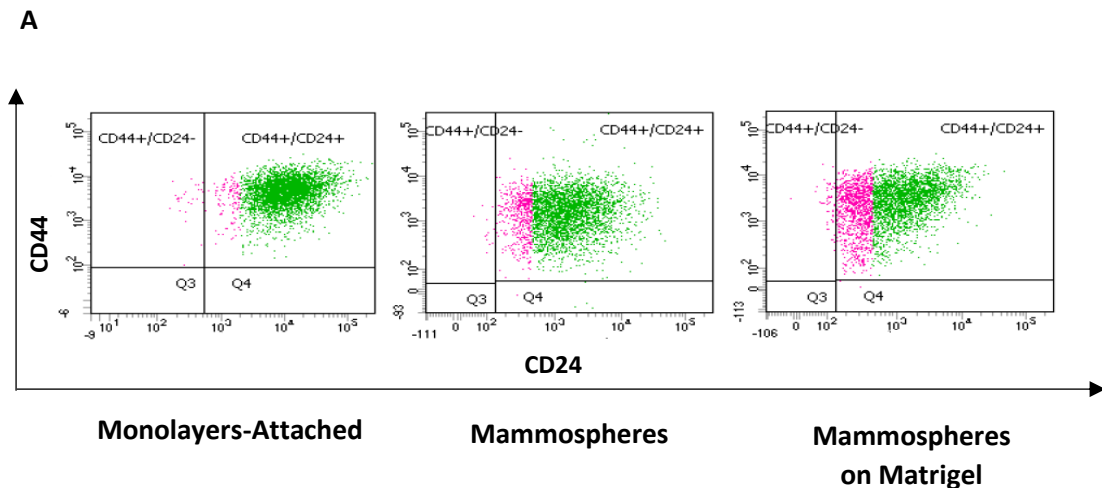


Εικόνα 3.2: Ικανότητα σχηματισμού σφαιρικών δομών μεταξύ των διαφορετικών συστημάτων 3D καλλιέργειας. MCF-7 κύτταρα αναπτύχθηκαν υπό διαφορετικές συνθήκες 3D καλλιέργειας για 7 ημέρες. Ως control συνθήκη ορίστηκε το σύστημα καλλιέργειας σε mammospheres. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τιμή SEM τριών ανεξάρτητων βιολογικών πειραμάτων. (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$)

3.1.3 Εμπλουτισμός των συστημάτων σε KBK μαστού - CD44⁺/CD24^{-/low}

Για να μπορέσουμε περαιτέρω να αποδείξουμε ότι τα *in vitro* 3D συστήματα καλλιέργειας μας ήταν εμπλουτισμένα σε KBK του μαστού, προχωρήσαμε σε πειράματα κυτταρομετρίας ροής (FACS) για τη μέτρηση του ποσοστού του υποπληθυσμού CD44⁺/CD24^{-/low}. Λόγω αντικειμενικής δυσκολίας του διαχωρισμού των καρκινικών κυττάρων από τους καρκινικούς ινοβλάστες, τα πειράματα κυτταρομετρίας ροής πραγματοποιήθηκαν στα δύο από τα τρία συστήματα. Συγκεκριμένα, η ανάλυση έγινε σε επίπεδο σφαιρών αλλά και σε επίπεδο

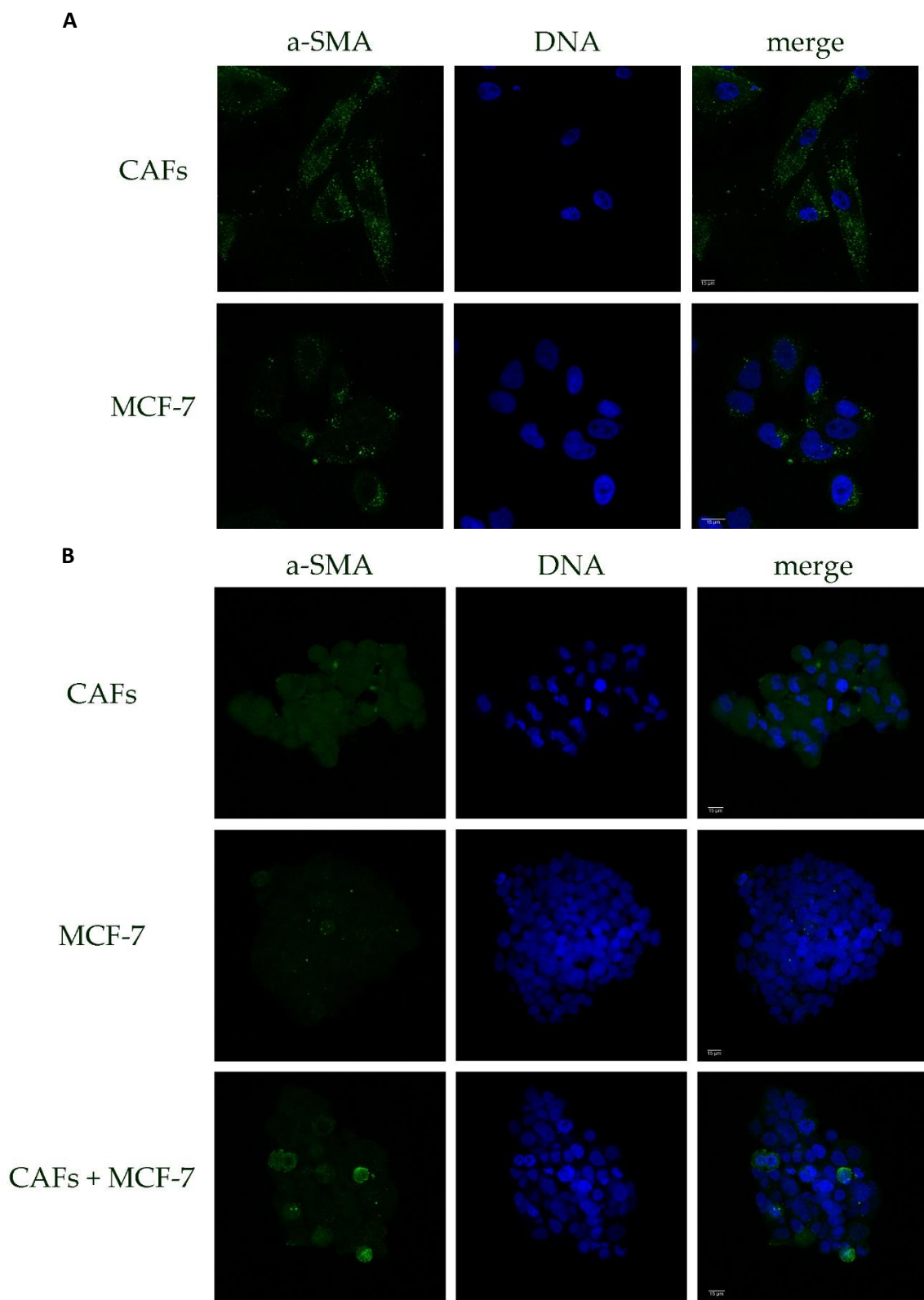
προσκολλημένων κυττάρων (monolayers-attached), και επιβεβαιώθηκε ο εμπλουτισμός των ΚΒΚ στα συστήματα καλλιέργειας μας (Εικόνα 3.3). Συγκεκριμένα, η Εικόνα 3.3 Α δείχνει ότι στις σφαιρικές δομές σε εναιώρημα και στο Matrigel το ποσοστό των ΚΒΚ είναι 13,70% και 30,40% αντίστοιχα, εν αντιθέσει με τα προσκολλημένα κύτταρα που το ποσοστό είναι 3,50%. Επιπροσθέτως, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.3 Β το ποσοστό των ΚΒΚ είναι μεγαλύτερο στην περίπτωση που τα κύτταρα καλλιεργούνται στο Matrigel συγκριτικά με την καλλιέργεια στο εναιώρημα. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η καλλιέργεια στο Matrigel επάγει σε μεγαλύτερο ποσοστό τον εμπλουτισμό των ΚΒΚ συγκριτικά με την καλλιέργεια στο εναιώρημα.



Εικόνα 3.3: Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής MCF-7 κυττάρων σε διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας. Α. Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής σε κύτταρα σε εναιώρημα και σε Matrigel, εν συγκρίσει με τα προσκολλημένα κύτταρα. Χρησιμοποιήθηκαν συζευγμένα αντισώματα φθορισμού έναντι των CD44 και CD24. **Β.** Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας ροής. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τιμή SEM δύο ανεξάρτητων βιολογικών πειραμάτων. (**:p<0,01)

3.1.4 Ταυτοποίηση καρκινικών ινοβλαστών στο *in vitro* τρισδιάστατο σύστημα συγκαλλιέργειας

Για να επιβεβαιώσουμε ότι στα σφαιροειδή συγκαλλιέργειας εντοπίζονταν εκτός των καρκινικών κυττάρων MCF-7 και οι καρκινικοί ινοβλάστες (CAFs), μελετήσαμε την κατανομή πρωτεϊνών οι οποίες είναι χαρακτηριστικές για τους CAFs μέσω έμμεσου ανοσοφθορισμού και παρατηρήθηκαν μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας. Συγκεκριμένα, μελετήσαμε την έκφραση της πρωτεΐνης α -SMA (Alpha Smooth Muscle Actin), η οποία εμπλέκεται στην κινητικότητα, τη δομική οργάνωση και την ακεραιότητα των κυττάρων, και χρησιμοποιείται ως δείκτης ταυτοποίησης καρκινικών ινοβλαστών. Αναλυτικότερα, μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης της α -SMA τόσο σε προσκολλημένα κύτταρα (monolayers) μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών (**Εικόνα 3.4 A**) -για να επιβεβαιωθεί η κυτταροειδική της έκφραση-, όσο και σε σφαιροειδή μόνο/συγκ-καλλιέργειας (**Εικόνα 3.4. B**). Συμπερασματικά, από τις παρακάτω εικόνες επιβεβαιώνεται η παρουσία καρκινικών ινοβλαστών στις σφαιρικές δομές, όταν καλλιεργούνται μαζί με την καρκινική σειρά MCF-7. Χαρακτηριστικό είναι ότι κατά την εξέταση του δείγματος συγκαλλιέργειας, όλες οι σφαιρικές δομές εξέφραζαν την α -SMA πρωτεΐνη, υποδηλώνοντας σε όλες την παρουσία CAFs μαζί με καρκινικών κυττάρων.

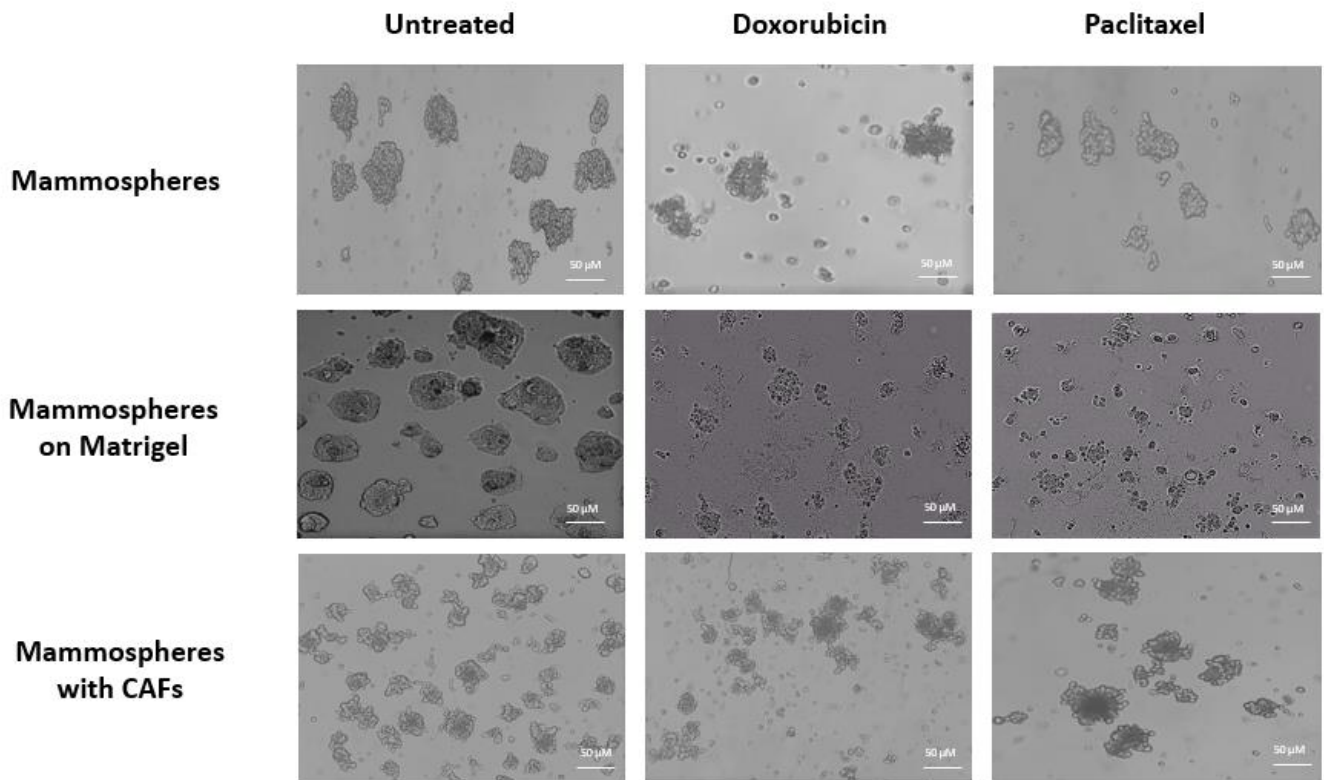


Εικόνα 3.4 Μελέτη έκφρασης της **a-SMA** σε καρκινικούς ινοβλάστες . **A.** Ανοσοφθορισμός σε προσκολλημένα κύτταρα MCF-7 και CAFs **B.** Ανοσοφθορισμός σε σφαιροειδή μόνο/συγκ-καλλιέργειας MCF-7 κυττάρων και CAFs. Στα κύτταρα έγινε χρώση με αντίσωμα έναντι της a-SMA (πράσινο), ενώ η χρώση του DNA έγινε με το TOPRO-3 (μπλε). Κλίμακα μπάρας 15 μM

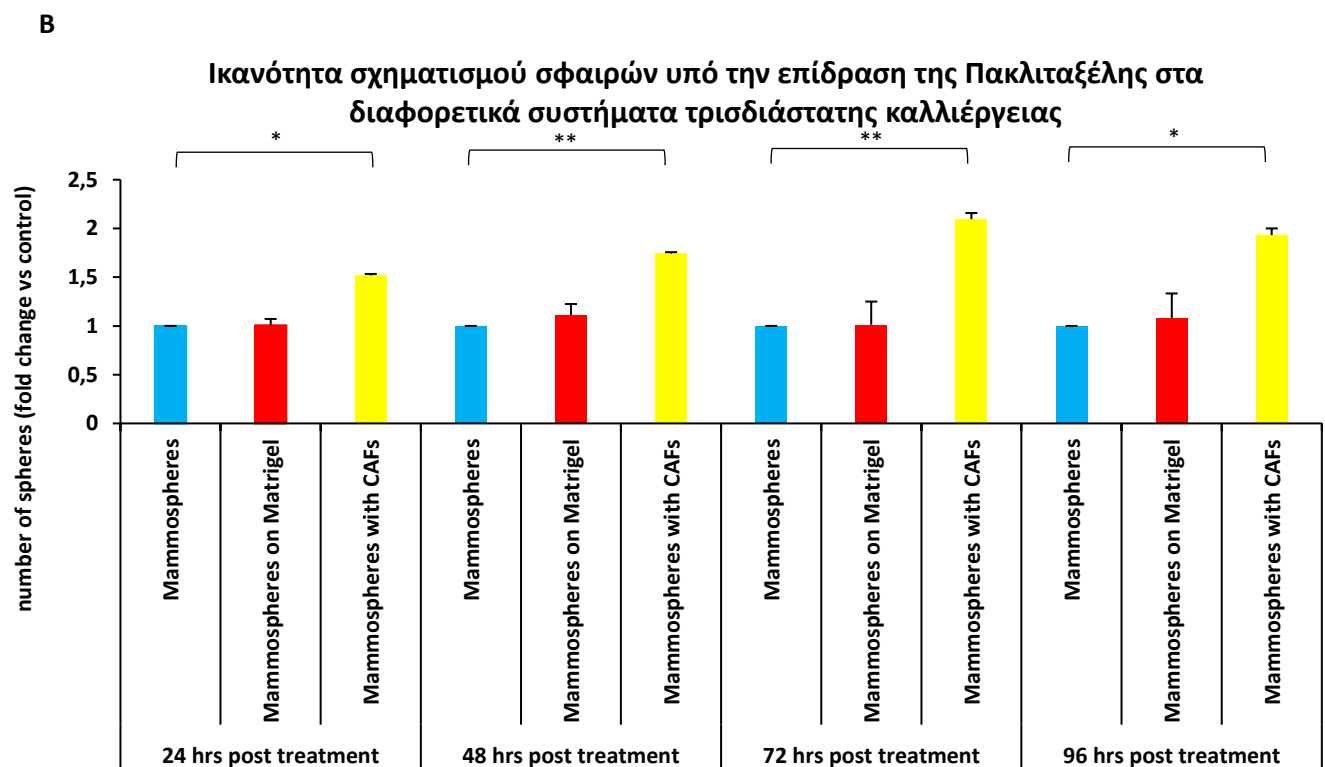
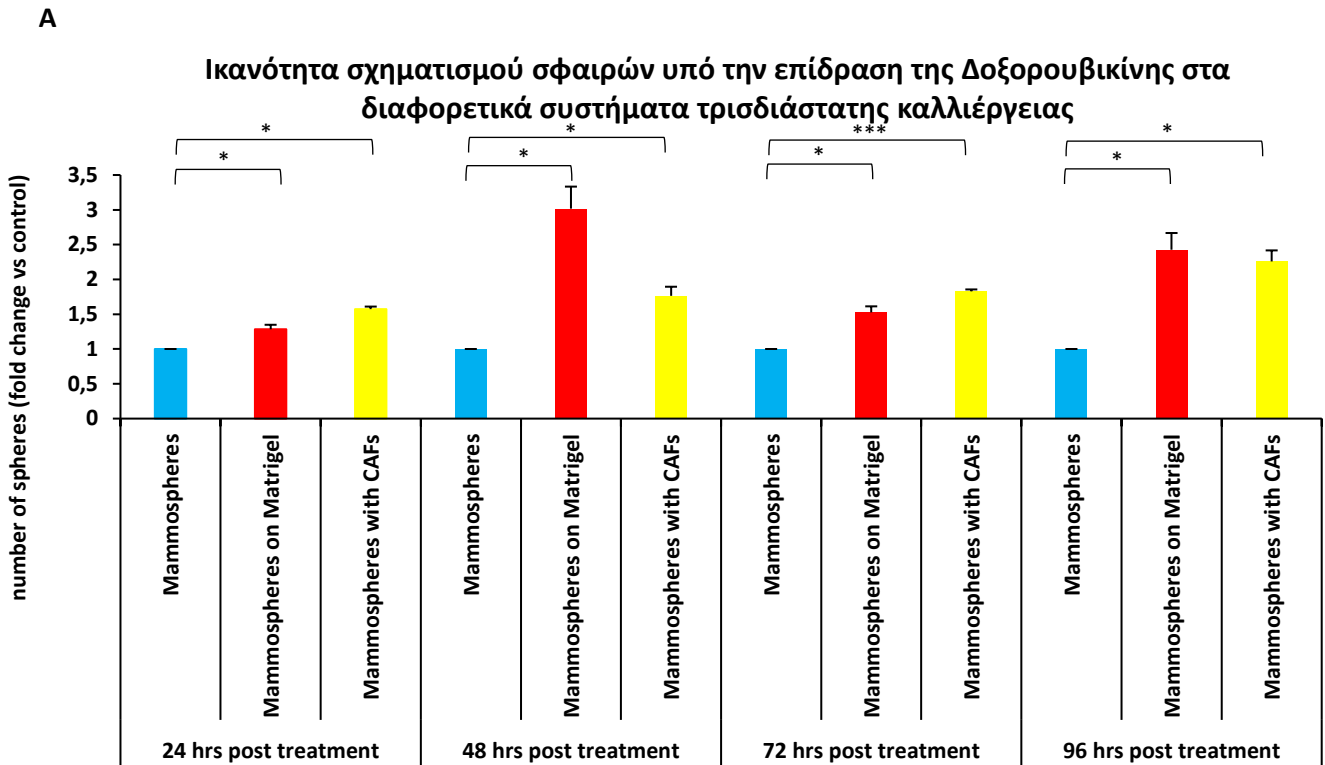
3.2 Μελέτη της χημειοανθεκτικότητας στα διάφορα συστήματα 3D καλλιέργειας KBK

Όπως συζητήθηκε στην εισαγωγή, αρκετές μελέτες έχουν αποδείξει την ικανότητα των KBK να επιβιώνουν μετά από τις συμβατικές μορφές αντικαρκινικής θεραπείας και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την υποτροπή του όγκου και τη μετάσταση. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να μελετήσει τη συνεισφορά του μικροπεριβάλλοντος στην ανθεκτικότητα των KBK in vitro.

Για το λόγο αυτό, θελήσαμε να ελέγξουμε στα συστήματα 3D καλλιέργειας, που αναπτύξαμε, κατά πόσο επηρεάζεται η ικανότητα των MCF-7 κυττάρων να σχηματίζουν σφαιρικές δομές ύστερα από τη χορήγηση των χημειοφαρμάκων Δοξορουβικίνης (2.5 μM) και Πακλιταξέλης (15 μM). Δεδομένου ότι η καλλιέργεια των MCF-7 κυττάρων στα συστήματα 3D καλλιέργειας διαρκεί 7 ημέρες, ξεκινήσαμε τη χορήγηση των παραπάνω χημειοφαρμάκων την 3^η ημέρα (όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.1.4.4.1) και ελέγχαμε καθημερινά μέχρι και την 7^η ημέρα την ικανότητα των κυττάρων να σχηματίζουν σφαιροειδή σε όλες τις συνθήκες. Στην **Εικόνα 3.5** φαίνονται αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες των σφαιροειδών την 7^η ημέρα, υπό τις control συνθήκες και τις συνθήκες που πραγματοποιήθηκε χορήγηση χημειοφαρμάκων, σε όλα τα συστήματα 3D καλλιέργειας. Η ανάπτυξη των MCF-7 σφαιροειδών στο Matrigel, υπό την επίδραση των χημειοφαρμάκων, καταγράφεται και για τις 7 ημέρες σε σχετικό βίντεο (διατίθεται συμπληρωματικό αρχείο). Πιο αναλυτικά, όσον αφορά τη Δοξορουβικίνη, τα περισσότερα χημειοανθεκτικά συστήματα φαίνεται να είναι αυτά της συγκαλλιέργειας και του Matrigel (**Εικόνα 3.6 A**). Ειδικότερα, συγκριτικά με τη καλλιέργεια στο εναιώρημα, στα υπόλοιπα δύο συστήματα ο αριθμός των σφαιροειδών είναι μεγαλύτερος ήδη από τις 48 ώρες αφότου χορηγήθηκε το χημειοφάρμακο. Την 7^η ημέρα καλλιέργειας, ο αριθμός των σφαιροειδών είναι περίπου διπλάσιος στο Matrigel και στη συγκαλλιέργεια από ότι στο εναιώρημα. Δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά μεταξύ συστήματος Matrigel και συγκαλλιέργειας CAFs-MCF7 κυττάρων. Από την άλλη, στην **Εικόνα 3.6 B**, όσον αφορά το χημειοφάρμακο Πακλιταξέλη, το σύστημα το οποίο ξεχωρίζει και φαίνεται να επηρεάζεται λιγότερο από το φάρμακο, είναι αυτό της συγκαλλιέργειας. Από τις 24 ώρες αφότου χορηγήθηκε το χημειοφάρμακο, ο αριθμός των σφαιρών είναι μεγαλύτερος στο εν λόγω σύστημα συγκριτικά με τα υπόλοιπα δύο. Η διαφορά αυτή υπάρχει μέχρι και την 7^η ημέρα και ερμηνεύεται σε περίπου διπλάσιο αριθμό σφαιρών συγκριτικά με τις άλλες συνθήκες καλλιέργειας. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι, το μικροπεριβάλλον των KBK παίζει καθοριστικό ρόλο στην χημειοανθεκτικότητά τους και είναι ένας παράγοντας που θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται σε in vitro συστήματα μελέτης τους. Συνολικά, το σύστημα συγκαλλιέργειας, το οποίο ενσωματώνει και την «επικοινωνία» μεταξύ ινοβλαστών και KBK είναι αυτό που παρουσιάζει τη μεγαλύτερη χημειοανθεκτικότητα, υπογραμμίζοντας το σημαντικό ρόλο των CAFs στην χημειοανθεκτικότητα.



Εικόνα 3.5 Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες καλλιέργειας MCF-7 κυττάρων σε διαφορετικά συστήματα τρισδιάστατης καλλιέργειας υπό την επίδραση των χημειοφαρμάκων Δοξορουβικίνη και Πακλιταξέλη. Οι MCF-7 σφαιρικές δομές καλλιεργήθηκαν για 7 ημέρες υπό την επίδραση χημειοφαρμάκων Δοξορουβικίνη (2.5 μM) και Πακλιταξέλη (15 μM). Η διάμετρος των σφαιρών μετρήθηκε μέσω του προγράμματος LasX. Κλίμακα μπάρας 50 μM .



Εικόνα 3.6 Η επίδραση των χημειοφαρμάκων Δοξορουβικίνης και Πακλιταξέλης στον αριθμό των MCF-7 σφαιρικών δομών. **A.** Αριθμός σφαιρών υπό την επίδραση του χημειοφαρμάκου Δοξορουβικίνης (2,5 μM) **B.** Αριθμός σφαιρών υπό την επίδραση του χημειοφαρμάκου Πακλιταξέλης (15 μM). Ως control συνθήκη ορίστηκε το σύστημα καλλιέργειας σε mamospheres. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τιμή SEM τριών και δύο ανεξάρτητων βιολογικών πειραμάτων. (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$)

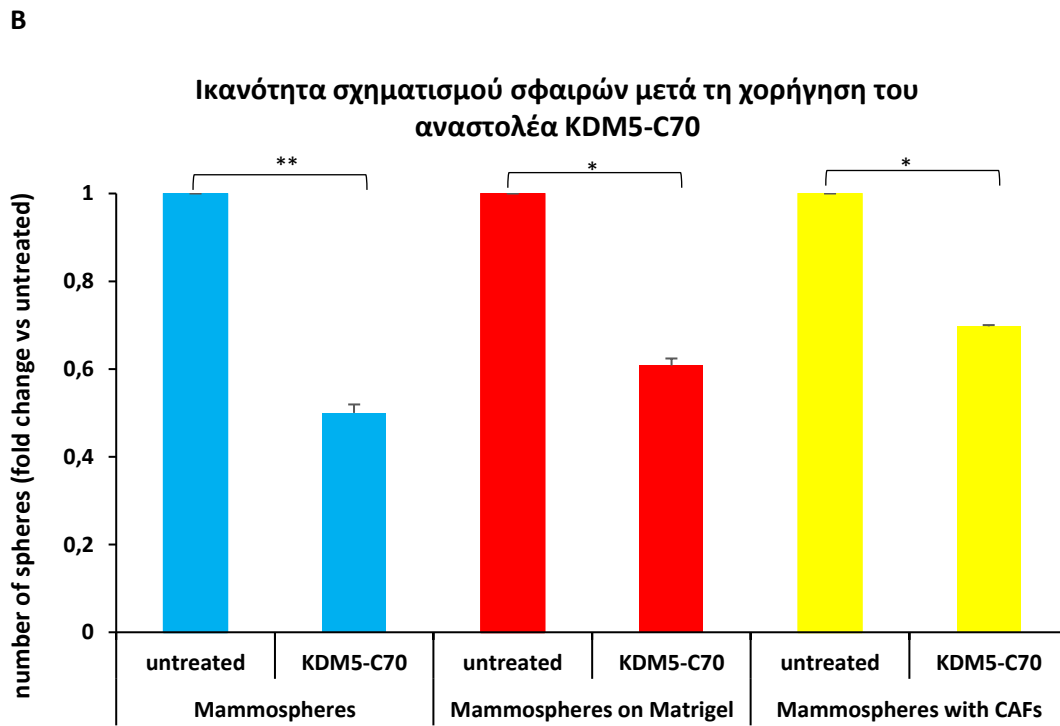
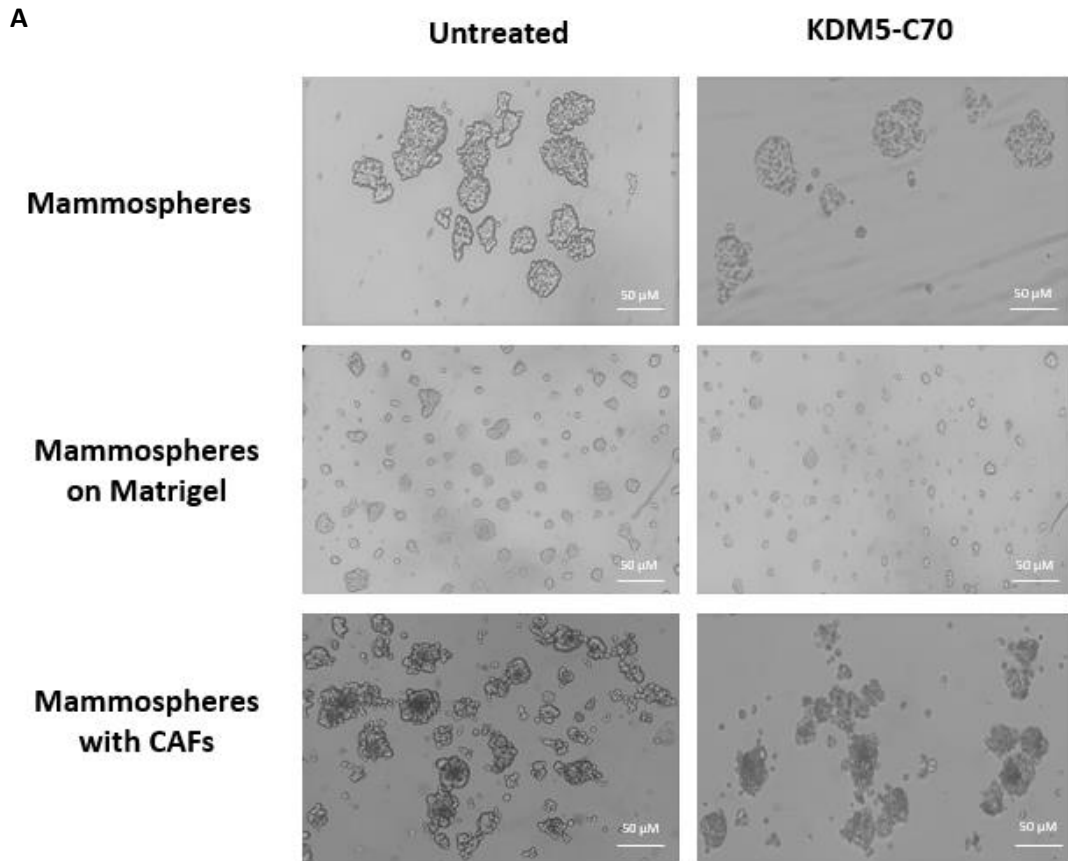
3.3 Η KDM5 απομεθυλάση ιστονών είναι ένας πιθανός θεραπευτικός στόχος στα KBK του μαστού

3.3.1 Η φαρμακολογική αναστολή των KDM5 στοχεύει τα KBK του μαστού

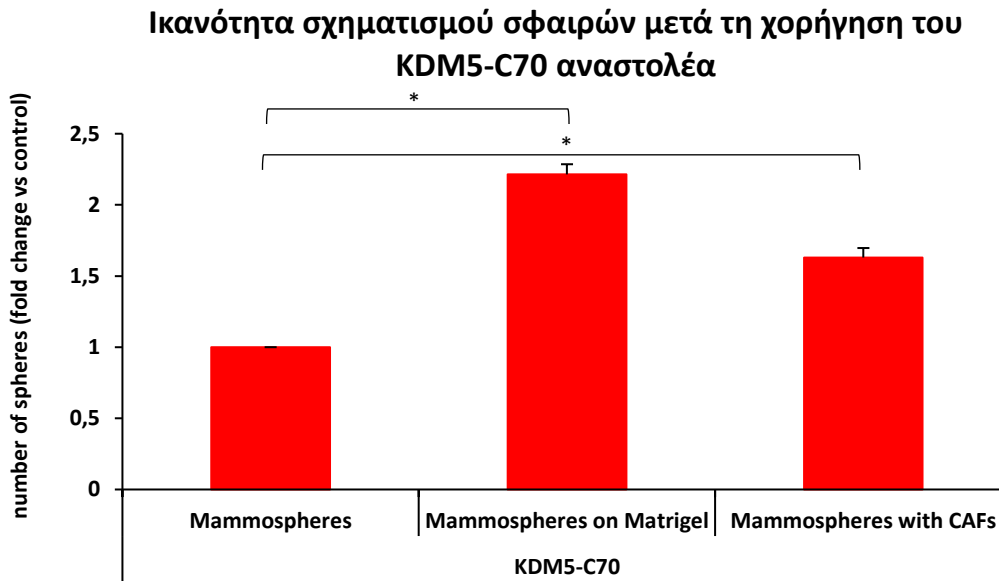
Γνωρίζοντας από τη βιβλιογραφία ότι οι KDM5 απομεθυλάσες ιστονών υπερεκφράζονται σε όγκους ασθενών με ER⁺ μοριακά χαρακτηριστικά, που έχουν κακή κλινική έκβαση και παρουσιάζουν αντίσταση στην ορμονοθεραπεία [182], θελήσαμε να εξετάσουμε τις επιπτώσεις της αναστολής του KDM5 στην χημειοανθεκτικότητα των KBK στα 3 συστήματα που περιγράφησαν παραπάνω.

Προηγούμενα πειράματα στο εργαστήριό μας (Διπλωματική εργασία Ι. Ζηκοπούλου) είχαν δείξει ότι αναστολή του KDM5 στοχεύει τα KBK, που μεγαλώνουν σε εναιώρημα χρησιμοποιώντας έναν ειδικό φαρμακολογικό χημικό αναστολέα, τον KDM5-C70, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε κι εδώ.

Αρχικά, θέλοντας να καταλήξουμε στην κατάλληλη συγκέντρωση αναστολέα αποφεύγοντας τις τοξικές του συνέπειες, προχωρήσαμε στη χορήγηση διαφόρων συγκεντρώσεων σε ένα εύρος από 0.5 μ M έως 10 μ M (τα αποτελέσματα δεν εμφανίζονται). Ακολούθως, ύστερα από την εύρεση της βέλτιστης συγκέντρωσης προχωρήσαμε στη χορήγηση του αναστολέα KDM5-C70 (5 μ M), και στα τρία διαφορετικά *in vitro* 3D συστήματα καλλιέργειας, όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.1.4.2. Συγκεκριμένα, κάθε 2 ημέρες ανανεωνόταν ο αναστολέας στο θρεπτικό μέσο, ενώ η χορήγηση διαρκούσε συνολικά 7 ημέρες. Την τελευταία μέρα ελέγχθηκε η επίδραση του αναστολέα KDM5-C70 στην ικανότητα των κυττάρων για αυτο-ανανέωση. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.7 A-B**, η φαρμακολογική αναστολή των KDM5 απομεθυλασών οδηγεί σε μείωση της ικανότητας των κυττάρων να σχηματίζουν σφαιρικές δομές. Το σύστημα καλλιέργειας σε εναιώρημα φαίνεται να είναι αυτό που επηρεάζεται περισσότερο από τη φαρμακολογική αναστολή, ενώ αντίθετα εκείνο που επηρεάζεται λιγότερο είναι το σύστημα καλλιέργειας σε Matrigel (**Εικόνα 3.7 Γ**). Εν κατακλείδι, η χορήγηση του αναστολέα KDM5-C70 έχει άμεσο αντίκτυπο στην ικανότητα σχηματισμού σφαιρικών δομών -επηρεάζοντας όμως σε διαφορετικό βαθμό το κάθε σύστημα καλλιέργειας- υποδηλώνοντας έτσι, ότι η φαρμακολογική αναστολή των KDM5 ελαττώνει το βλαστικό δυναμικό των KBK του μαστού.



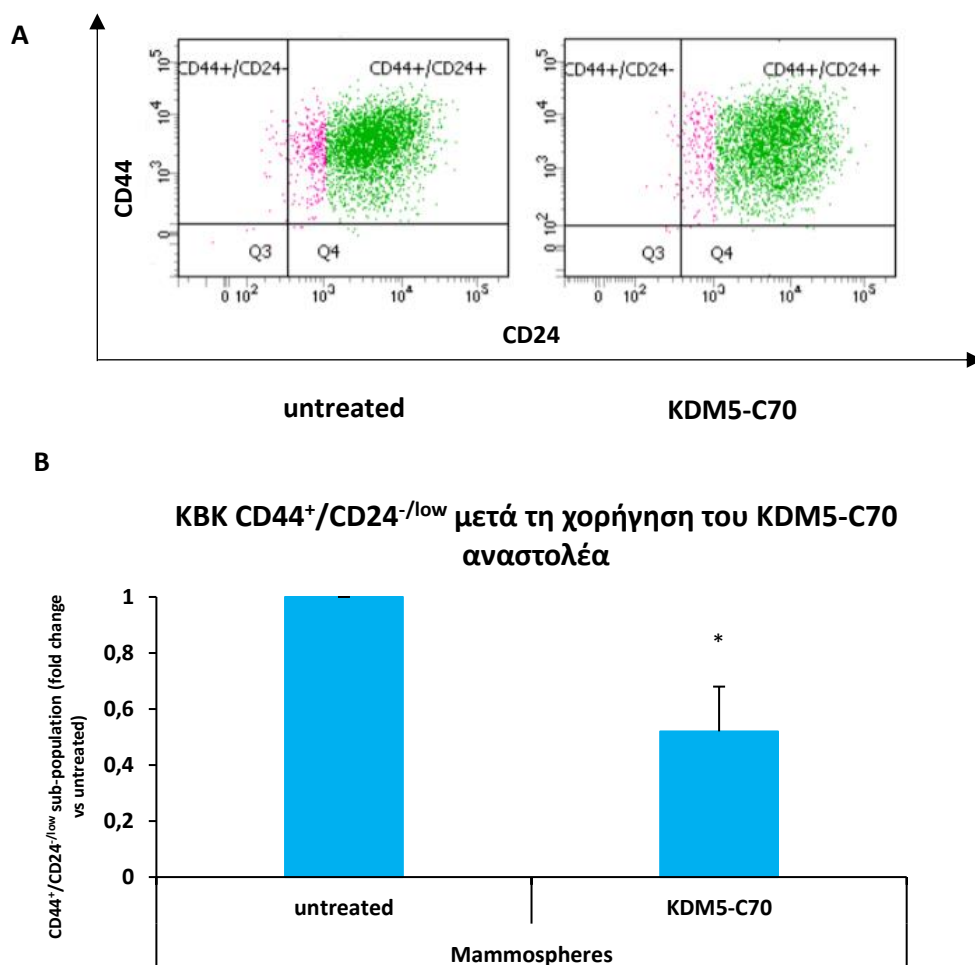
Γ



Εικόνα 3.7 Η επίδραση της αναστολής των KDM5 στον αριθμό των MCF-7 σφαιρικών δομών. Α. Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες καλλιέργειας MCF-7 κυττάρων σε διαφορετικά συστήματα τρισδιάστατης καλλιέργειας υπό την επίδραση του KDM5-C70 (5 μ M) **Β.** Σε MCF-7 σφαιρικές δομές χορηγήθηκε ο αναστολέας KDM5-C70 (5 μ M). Την 7^η ημέρα υπολογίστηκε η ικανότητα σχηματισμού σφαιρικών δομών και στα τρία διαφορετικά 3D συστήματα καλλιέργειας. **Γ.** Σύγκριση ικανότητας σχηματισμού σφαιρικών δομών στα διαφορετικά συστήματα καλλιέργειας υπό την επίδραση του αναστολέα KDM5-C70. Ως control συνθήκη ορίστηκε το σύστημα καλλιέργειας σε mammospheres. Η διάμετρος των σφαιρών μετρήθηκε μέσω του προγράμματος LasX. Κλίμακα μπάρας 50 μ M. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τιμή SEM δύο ανεξάρτητων βιολογικών πειραμάτων. (*: $p < 0,05$)

Στη συνέχεια, θελήσαμε να εξετάσουμε ποσοτικά τον υποπληθυσμό των KBK του μαστού με φαινότυπο CD44⁺/CD24^{-/low}, ύστερα από την αναστολή των KDM5 απομεθυλασών. Για το λόγο αυτό, τη τελευταία μέρα χορήγησης του αναστολέα προχωρήσαμε σε πειράματα κυτταρομετρίας ροής όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.3 (**Εικόνα 3.8 Α**). Λόγω αδυναμίας παραγωγής και εισαγωγής του Matrigel από την εταιρεία αντιπρόσωπο του, και λόγω αντικειμενικής δυσκολίας του διαχωρισμού των καρκινικών κυττάρων από τους καρκινικούς ινοβλάστες,, προχωρήσαμε στην ποσοτικοποίηση των KBK μόνο στο σύστημα καλλιέργειας των κυττάρων σε εναιώρημα. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.8 Β**, υπάρχει μια σημαντική μείωση στον υποπληθυσμό των KBK, από 9% οδηγείται στο 5,7%, συγκριτικά με τη συνθήκη που χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν, ότι πιθανώς η αναστολή των KDM5 στοχεύει τα KBK του μαστού.

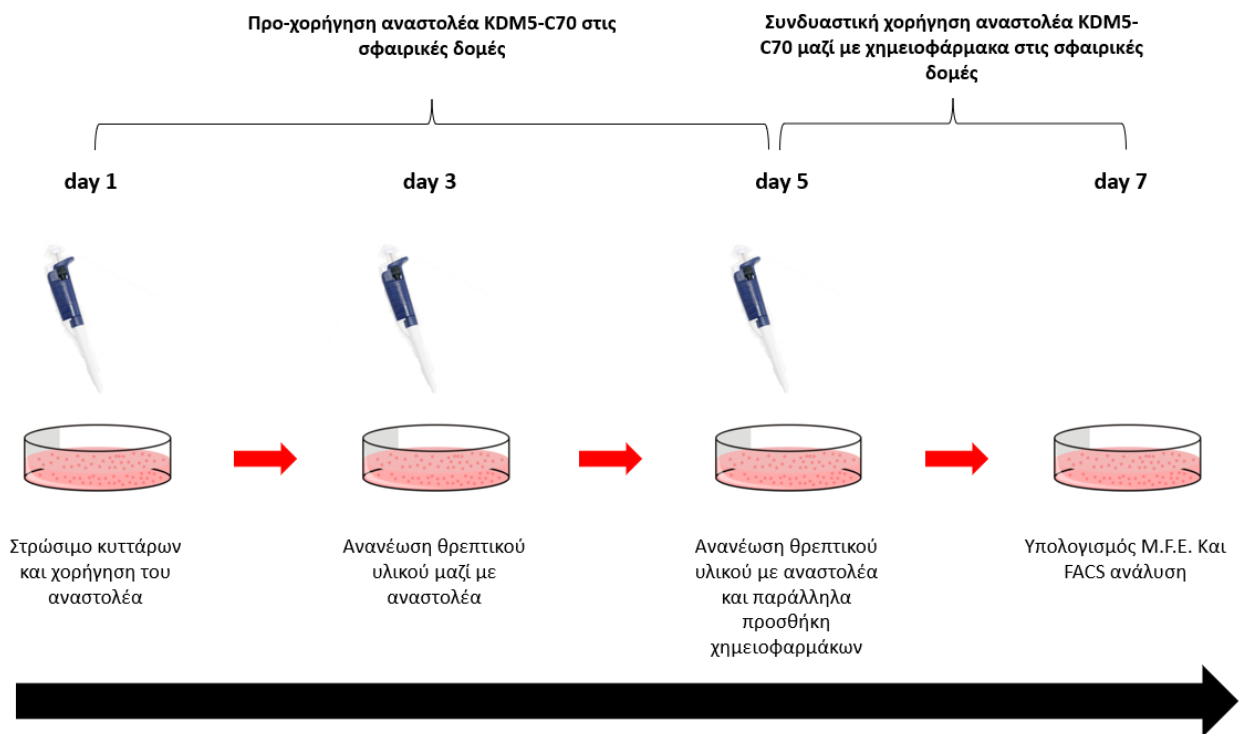
3.3.2 Επίδραση της συνδυαστικής χορήγησης του αναστολέα των KDM5 απομεθυλασών με Δοξορουβικίνη και Πακλιταξέλη σε MCF-7 σφαιροειδή



Εικόνα 3.8 Η αναστολή των KDM5 απομεθυλασών στοχεύει τα ΚΒΚ του μαστού με φαινότυπο CD44⁺/CD24^{-/low} σε MCF-7 κύτταρα σε εναιώρημα. **A.** Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής σε MCF-7 κύτταρα σε εναιώρημα, ύστερα από χορήγηση του αναστολέα KDM5-C70 (5 μΜ) για 7 ημέρες. Χρησιμοποιήθηκαν συζευγμένα αντισώματα φθορισμού έναντι των CD44 και CD24. **B.** Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας ροής. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τιμή SEM τριών ανεξάρτητων βιολογικών πειραμάτων (*: p<0,05).

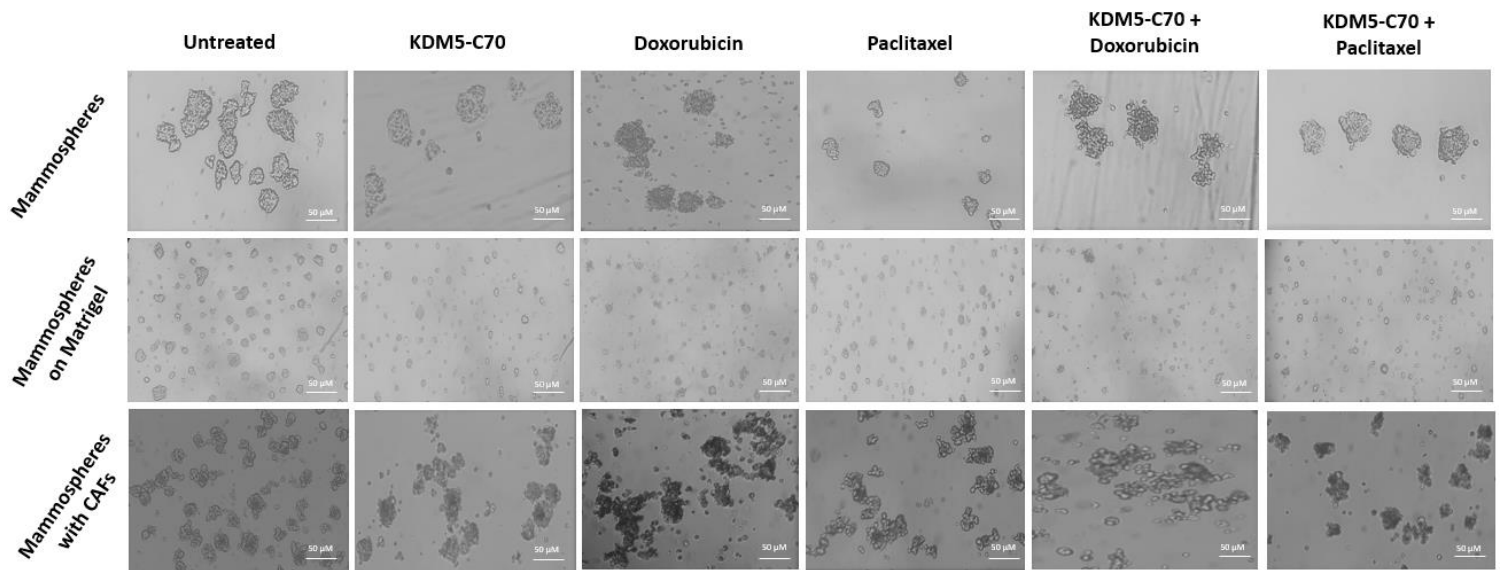
Ακολουθώντας, θέλαμε να ελέγξουμε εάν η συνδυαστική χορήγηση του αναστολέα KDM5-C70 με τα χημειοφάρμακα Δοξορουβικίνη και Πακλιταξέλη, θα μπορούσε να υπερκεράσει την χημειοανθεκτικότητα που παρατηρήσαμε στα 3D συστήματα στα προηγούμενα πειράματα.

Στα πλαίσια αυτά, σχεδιάσαμε ένα φαρμακολογικό πρωτόκολλο, όπου αρχικά μονήρη κύτταρα MCF-7 (αλλά και CAFs στην περίπτωση της συγκαλλιέργειας) καλλιιεργήθηκαν και στα τρία συστήματα τρισδιάστατης καλλιέργειας, και τους χορηγήθηκε ο αναστολέας KDM5-C70 για 5 ημέρες. Την 5^η ημέρα, προστέθηκαν στο θρεπτικό μέσο και τα χημειοφάρμακα Δοξορουβικίνη (2.5 μΜ) και Πακλιταξέλη (15 μΜ) (**Εικόνα 3.9**) (αναλυτική περιγραφή στην ενότητα Υλικά-Μέθοδοι).



Εικόνα 3.9 Πρωτόκολλο για τη συνδυαστική χορήγηση του αναστολέα των KDM5 απομεθυλασών με τα χημειοφάρμακα Δοξορουβικίνη και Πακλιταξέλη. Η αναστολή των KDM5 απομεθυλασών πραγματοποιήθηκε σε συνδυασμό με τη χορήγηση των χημειοφαρμάκων Δοξορουβικίνη και Πακλιταξέλη σε MCF-7 σφαιρικές δομές. Τα κύτταρα επώαστηκαν με τον αναστολέα KDM5-C70 (5 μ M) για 5 ημέρες. Στη συνέχεια προστέθηκαν και τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα, για συνολικά ακόμα 48 ώρες.

Την τελευταία ημέρα του πειράματος, μετρήθηκε ο αριθμός των σφαιρών και υπολογίστηκε το Μ.Φ.Ε. Η **Εικόνα 3.10** παρουσιάζει αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες MCF-7 σφαιρών στα συστήματα 3D καλλιέργειας, σε όλες τις συνθήκες.

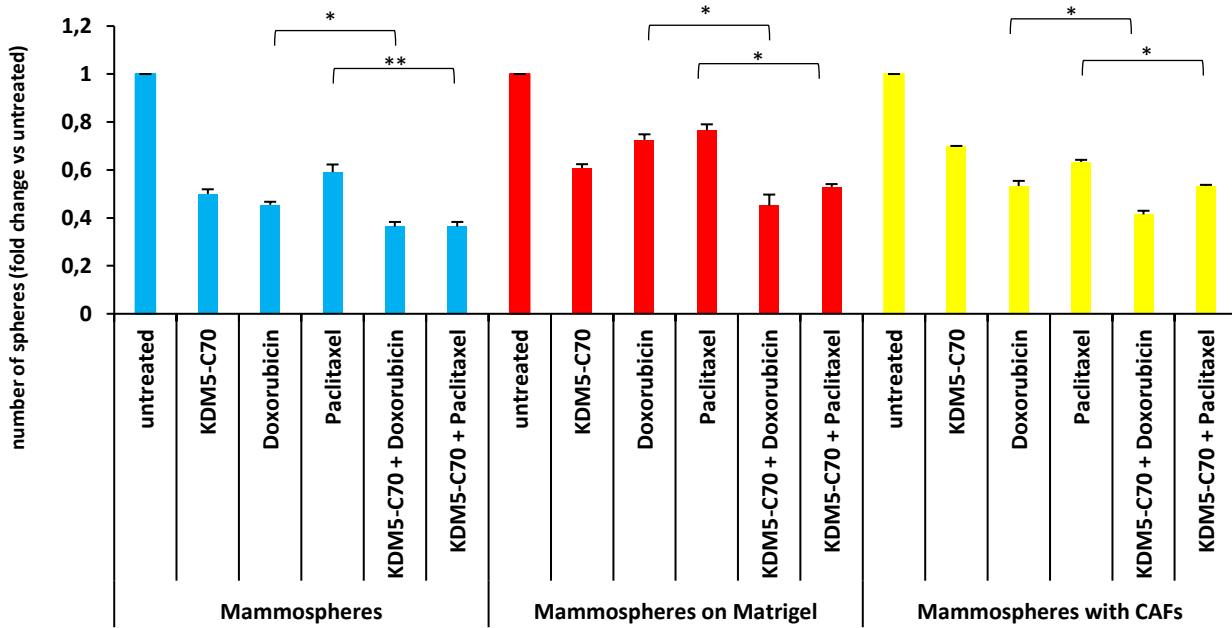


Εικόνα 3.10 Συνδυαστική χορήγηση του αναστολέα KDM5-C70 με τα χημειοφάρμακα Δοξορουβικίνη και Πακλιταξέλη. Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες MCF-7 σφαιρών σε διάφορα συστήματα 3D καλλιέργειας, ύστερα από την επίδραση του KDM5-C70 (5 μ M), των Δοξορουβικίνη (2,5 μ M) και Πακλιταξέλη (15 μ M), ή και το συνδυασμό του αναστολέα με τα χημειοφάρμακα. Η διάμετρος των σφαιρών μετρήθηκε μέσω του προγράμματος LasX. Κλίμακα μπάρας 50 μ M

Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.10**, και στα τρία συστήματα η χορήγηση μόνο του αναστολέα KDM5-C70 ή μόνο των φαρμάκων μειώνει τον αριθμό των σφαιρικών δομών, ενώ η συνδυαστική χορήγηση τους έχει ακόμα μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα. Τα παραπάνω αποτελέσματα, συγκριτικά και στα τρία συστήματα, φαίνονται καλύτερα στην **Εικόνα 3.11**. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση της καλλιέργειας σε εναιώρημα, η συνδυαστική χορήγηση του αναστολέα με τη Δοξορουβικίνη και την Πακλιταξέλη επιφέρει μεγαλύτερη μείωση (περίπου 65% και 65%, αντίστοιχα) στον αριθμό των σφαιροειδών από ότι η Δοξορουβικίνη (περίπου 55%) και η Πακλιταξέλη (περίπου 40%) ξεχωριστά. Παρόμοια είναι τα αποτελέσματα και στην περίπτωση της καλλιέργειας σε Matrigel και της συγκαλλιέργειας, με τη συνδυαστική χορήγηση του αναστολέα με τη Δοξορουβικίνη (περίπου 55% και 60% μείωση, αντίστοιχα) και την Πακλιταξέλη (περίπου 50% και 50% μείωση, αντίστοιχα) να επιφέρει μεγαλύτερη ελάττωση στον αριθμό των σφαιροειδών από ότι η Δοξορουβικίνη (περίπου 30% και 50% μείωση, αντίστοιχα) και η Πακλιταξέλη (περίπου 25% και 35% μείωση, αντίστοιχα) ξεχωριστά.

Συνεπώς, μπορούμε να καταλήξουμε στο ότι το συνδυαστικό αυτό θεραπευτικό σχήμα είναι αποτελεσματικότερο από ότι τα χημειοφάρμακα μόνα τους, πιθανότατα γιατί στοχεύονται τόσο τα KBK όσο και τα διαφοροποιημένα κύτταρα του όγκου. Το κάθε σύστημα όμως εμφανίζει διαφορετικό βαθμό απόκρισης στο χορηγούμενο σχήμα, κάτι που μπορεί να οφείλεται στα διαφορετικά συστατικά και στις διαφορετικές αλληλεπιδράσεις που υπάρχουν στο κάθε σύστημα.

Ικανότητα σχηματισμού σφαιρών μετά την χορήγηση του KDM5-C70 αναστολέα και χημειοθεραπευτικών φαρμάκων

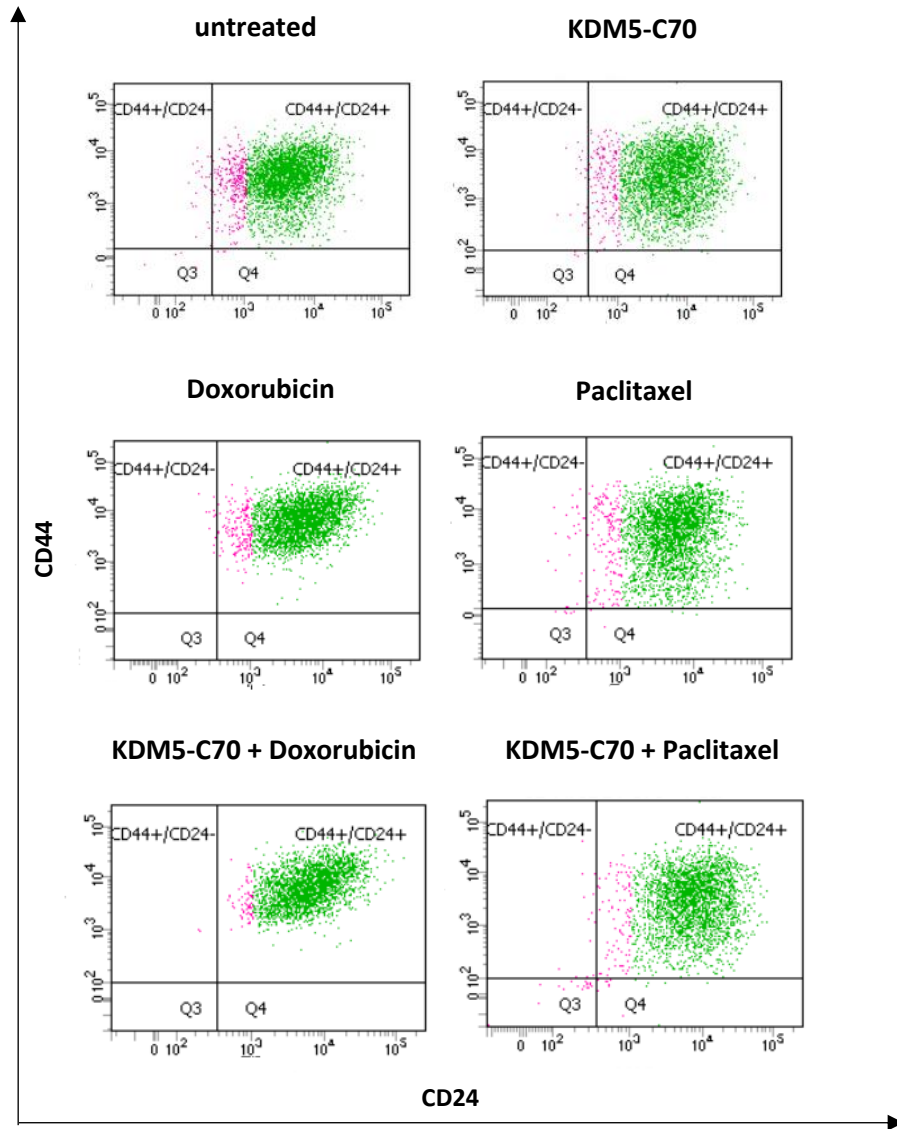


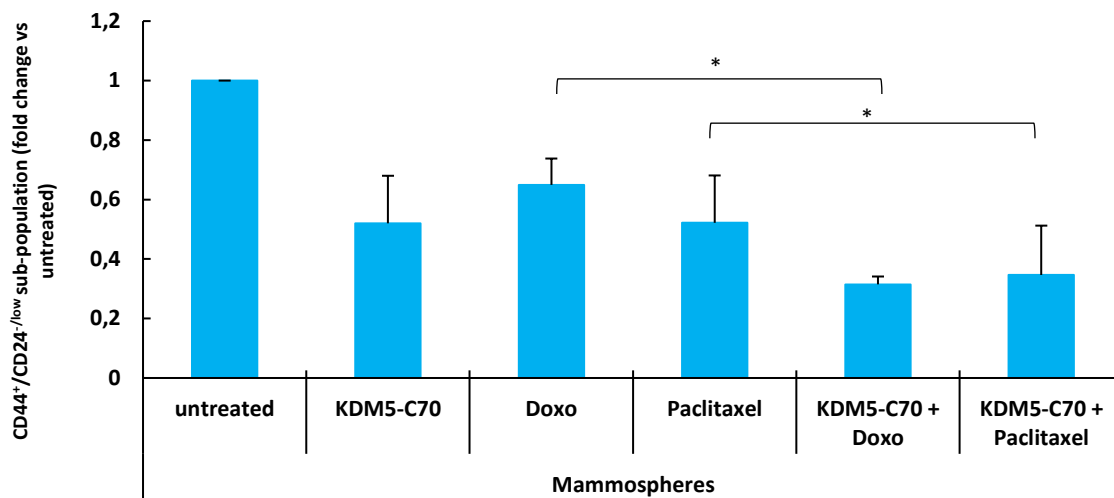
Εικόνα 3.11 Επίδραση της συνδυαστικής αναστολής του KDM5-C70 και των χημειοφαρμάκων Δοξορουβικίνη και Πακλιταξέλη στον αριθμό των MCF-7 σφαιρικών δομών. Για την αναστολή χορηγήθηκε ο KDM5-C70 (5 μ M) αναστολέας για 5 ημέρες, και για επιπλέον 48 ώρες τα χημειοφάρμακα Δοξορουβικίνη (2,5 μ M) και Πακλιταξέλη (15 μ M). Η επίδραση της ικανότητας σχηματισμού σφαιρών στα διαφορετικά 3D συστήματα καλλιέργειας φαίνεται στο παραπάνω διάγραμμα. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τιμή SEM δύο ανεξάρτητων βιολογικών πειραμάτων. (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$)

Στη συνέχεια, θελήσαμε να ελέγξουμε τον ποσοστό των KBK μέσω πειραμάτων κυτταρομετρίας ροής ύστερα από τη συνδυαστική χορήγηση. Για τους παραπάνω λόγους που έχουν αναφερθεί, προχωρήσαμε στην ανάλυση μόνο στο σύστημα καλλιέργειας σε εναιώρημα. Όπως βλέπουμε στην Εικόνα 3.12, η συνδυαστική χορήγηση και με τα δύο φάρμακα μειώνει σε μεγαλύτερο βαθμό το ποσοστό του $CD44^{+}/CD24^{-/low}$ υποπληθυσμού από ότι το κάθε χημειοφάρμακο μόνο του.

Συμπερασματικά, λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω αποτελέσματα, συμπεραίνουμε ότι οι KDM5 απομεθυλάσες ιστονών μπορούν να αποτελέσουν ένα πιθανό φαρμακολογικό στόχο στα KBK του μαστού, καθώς αναστολή τους καθιστά τα KBK περισσότερο ευαίσθητα στις συμβατικές μορφές θεραπείας. Αυτό επίσης που συμπεραίνουμε, είναι ότι μεταξύ των *in vitro* τριασδιάστων συστημάτων καλλιέργειας υπάρχει διαφορετική απόκριση στη συνδυαστική χορήγηση, με τα συστήματα του Matrigel και της συγκαλλιέργειας να αντικατοπτρίζουν, πιθανότατα, καλύτερα την *in vivo* κατάσταση.

A



B**ΚΒΚ CD44⁺/CD24^{-/low} μετά τη χορήγηση του KDM5-C70 αναστολέα και των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων**

Εικόνα 3.12 Η συνδυαστική χορήγηση του KDM5-C70 αναστολέα και χημειοφαρμάκων στοχεύει τα ΚΒΚ του μαστού στο σύστημα καλλιέργειας σε εναιώρημα. **A** . Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής σε MCF-7 κύτταρα σε εναιώρημα, ύστερα από χορήγηση του αναστολέα KDM5-C70 (5 μ M), των χημειοφαρμάκων Δοξορουβικίνης (2,5 μ M) και Πακλιταξέλης (15 μ M) ή και το συνδυασμό των δύο. **B**. Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας ροής. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τιμή SEM τριών ανεξάρτητων βιολογικών πειραμάτων. . (*: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$)

4. Συζήτηση

Ο καρκίνος του μαστού παραμένει η πιο συχνά διαγνωσθείσα κακοήθεια και η πρώτη αιτία θανάτου από καρκίνο στο γυναικείο πληθυσμό, παρά τις προόδους στην πρόγνωση και τη θεραπεία της νόσου (<https://gco.iarc.fr/>). Η εξαιρετικά ετερογενής και πολυπαραγοντική φύση της νόσου αποτελεί εμπόδιο στην ανεύρεση αποτελεσματικών θεραπειών και ως εκ τούτου πολλές ασθενείς δεν ανταποκρίνονται σε αυτές ή αναπτύσσουν ανθεκτικότητα με την πάροδο του χρόνου και εν τέλει υποτροπιάζουν.

Η θεωρία των Καρκινικών Βλαστικών Κυττάρων (ΚΒΚ) είναι ένα από τα μοντέλα που χρησιμοποιείται για να περιγράψει την ετερογένεια των κυτταρικών πληθυσμών που απαρτίζουν έναν όγκο. Τα ΚΒΚ αποτελούν έναν κυτταρικό υποπληθυσμό του όγκου με τα μοναδικά χαρακτηριστικά της αυτο-ανανέωσης και της ικανότητας διαφοροποίησης προς άλλα καρκινικά κύτταρα χωρίς ογκογόνο δράση [157,158]. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, οι όγκοι αναπτύσσονται και διατηρούνται από τα ΚΒΚ, τα οποία χαρακτηρίζονται, επίσης, από αυξημένη ανθεκτικότητα στις συμβατικές μορφές θεραπείας και σχετίζονται με την υποτροπή της νόσου και τη διαδικασία της μετάστασης [158]. Η ανθεκτικότητα των κυττάρων αυτών έχει αυξήσει το ενδιαφέρον για την ανάπτυξη νέων ειδικών θεραπειών, που θα τα στοχεύουν, και σε συνδυασμό με κοινές αντι-καρκινικές θεραπείες, θα μπορούν να οδηγήσουν στην εξάλειψη του όγκου [158].

Τα ΚΒΚ εδράζονται εντός του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, σε ειδικά διαμορφωμένες περιοχές οι οποίες ονομάζονται θώκοι [39]. Οι θώκοι αποτελούνται από κυτταρικά συστατικά, όπως μη βλαστικά καρκινικά κύτταρα, κύτταρα του ανοσοποιητικού, ενδοθηλιακά κύτταρα και καρκινικούς ινοβλάστες, αλλά και από μη κυτταρικά συστατικά, όπως η εξωκυττάρια μήτρα (ECM), κυτοκίνες και αυξητικοί παράγοντες [159]. Η αλληλεπίδραση όλων αυτών των συστατικών του θώκου με τα ΚΒΚ, συντελεί στη διατήρηση των κυττάρων αυτών, ενώ επίσης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανθεκτικότητα τους σε κοινά θεραπευτικά φάρμακα και σε διαδικασίες όπως η μετάσταση [39]. Εκτός της άμεσης στόχευσης των ίδιων των ΚΒΚ, ως ένα θεραπευτικό μέσο, πολλές μελέτες εστιάζουν και στην στόχευση των συστατικών του θώκου των κυττάρων αυτών, καθώς πολλά από τα κυτταρικά και μη συστατικά του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, ευθύνονται για τις ιδιότητες -αυτο-ανανέωση, χημειοανθεκτικότητα κτλ- των ΚΒΚ [39].

Στα πλαίσια της αξιολόγησης της αποτελεσματικότητας διαφόρων χημειοθεραπευτικών φαρμάκων, η προσομοίωση των *in vivo* συνθηκών σε προ-κλινικά μοντέλα, αποτελεί καίριο ζήτημα στην αναζήτηση αποτελεσματικών θεραπειών [160]. Για παράδειγμα, τα καρκινικά κύτταρα στις *in vivo* συνθήκες, οργανώνονται σε μια τρισδιάστατη δομή, με το κάθε σημείο του όγκου να παρουσιάζει διακριτές πολλαπλασιαστικές και μεταβολικές ικανότητες [161]. Επιπλέον, οι αλληλεπιδράσεις των συστατικών που απαρτίζουν το μικροπεριβάλλον του όγκου, φαίνεται ότι συντελούν στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων αλλά και στην απόκριση τους σε διάφορα χημειοθεραπευτικά φάρμακα [162]. Το κενό αυτό που υπάρχει μεταξύ των *in vitro* και των *in vivo* συνθηκών, φαίνεται να γεφυρώνεται με την καλλιέργεια των καρκινικών κυττάρων σε *in vitro* συνθήκες 3D καλλιέργειας. Η μέθοδος αυτή, που αφορά την παρουσία των συστατικών του μικροπεριβάλλοντος του όγκου παράλληλα με τα καρκινικά κύτταρα, αποτελεί εξέχουσας σημασίας εργαλείο για τη μελέτη των ΚΒΚ, καθώς επιτρέπει τον εμπλουτισμό τους, ενώ επίσης τα κύτταρα αναπτύσσονται μιμούμενα κατά πολύ την αρχιτεκτονική δομή και την ανταλλαγή μηνυμάτων που εμφανίζεται σε έναν όγκο ασθενούς [163]. Κατά συνέπεια, αυτές οι ιδιότητες των 3D μοντέλων καλλιέργειας, επιτρέπουν την καλύτερη αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των διαφόρων

χημειοθεραπευτικών φαρμάκων, προσπαθώντας να ερμηνεύσουν τις φαινοτυπικές και γονοτυπικές αλλαγές, την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών και αντι-αποπτωτικών μηχανισμών που οφείλονται στις αλληλεπιδράσεις των συστατικών του μικροπεριβάλλοντος του όγκου [164].

Για το λόγο αυτό, στην παρούσα εργασία, θελήσαμε να εγκαθιδρύσουμε και να χαρακτηρίσουμε διαφορετικά συστήματα 3D καλλιέργειας, τα οποία θα περιέχουν συστατικά του θώκου (εξωκυττάρια μήτρα ή καρκινικούς ινοβλάστες) και να τα χαρακτηρίσουμε όσον αφορά τον εμπλουτισμό τους σε KBK. Στόχος μας ήταν να μελετήσουμε τελικά τη συνεισφορά των συστατικών του μικροπεριβάλλοντος των KBK στη χημειοανθεκτικότητά τους σε δύο ευρέως χρησιμοποιούμενα χημειοφάρμακα στον καρκίνο του μαστού, τη Δοξορουβικίνη και την Πακλιταξέλη.

Συγκεκριμένα, για την εγκαθίδρυση και το χαρακτηρισμό των *in vitro* τρισδιάστατων συστημάτων καλλιέργειας, εμπλουτισμένων σε KBK, χρησιμοποιήσαμε την καρκινική σειρά του μαστού MCF-7 (τα χαρακτηριστικά της αναφέρονται στην παράγραφο 2.1.1). Τα κύτταρα αυτά καλλιεργήθηκαν σε ειδικές συνθήκες που δεν επιτρεπόταν η προσκόλλησή τους στην επιφάνεια των πιάτων και ευνοούνταν ο σχηματισμός σφαιρικών δομών εμπλουτισμένων σε KBK, σε ειδικό υπόστρωμα τύπου Matrigel εμπλουτισμένο σε συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας, και σε συνθήκες συγκαλλιέργειας με καρκινικούς ινοβλάστες σε εναιώρημα. Οι παραπάνω συνθήκες καλλιέργειας ευνοούν το σχηματισμό σφαιρικών δομών εμπλουτισμένες σε KBK [165,166,167,168]. Κάτω από αυτές τις συνθήκες καλλιέργειας που εφαρμόστηκαν, σφαιρικές δομές αναπτύχθηκαν σε όλες τις περιπτώσεις (**Εικόνα 3.1**), υποδηλώνοντας την παρουσία KBK του μαστού στα *in vitro* 3D συστήματα καλλιέργειας μας.

Οι καρκινικοί ινοβλάστες (CAFs) είναι υπεύθυνοι για την αναδιαμόρφωση του στρώματος και χαρακτηρίζονται από αυξημένη έκφραση γονιδίων-δεικτών όπως η α-SMA, η vimentin, η FSP (fibroblast specific protein) και η FAP (fibroblast activating protein) [169]. Όπως προαναφέρθηκε, οι καρκινικοί ινοβλάστες, οι οποίοι ενεργοποιούνται από φυσιολογικούς και υπερεκφράζουν την α-SMA, θεωρούνται η κύρια πηγή των συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας (φιμπρονεκτίνη και κολλαγόνο) [170]. Έτσι, στο σύστημα με τις σφαιρικές δομές συγκαλλιέργειας, επιβεβαιώσαμε την υπερέκφραση της α-SMA συγκριτικά με τις σφαιρικές δομές που προκύπτουν μόνο από την κυτταρική σειρά MCF-7 (**Εικόνα 3.4**), κάτι που υποδηλώνει τη παρουσία των CAFs όταν καλλιεργούνται μαζί με τα MCF-7 κύτταρα.

Εν συγκρίσει με τα δυσδιάστατα μοντέλα καλλιέργειας, τα τρισδιάστατα, επιτρέπουν στα καρκινικά κύτταρα να αναπτυχθούν και στις τρεις διαστάσεις και να σχηματίσουν ένα σύνθετο σύστημα ανταλλαγής πληροφοριών, μιμούμενο τις αλληλεπιδράσεις που παρατηρούνται στον κακοήγη ιστό [171]. Αυτή η κυτταρική επικοινωνία λαμβάνει χώρα μεταξύ των στρωματικών κυττάρων του όγκου, όπως οι καρκινικοί ινοβλάστες (CAFs), αλλά και των συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας [172]. Συγκεκριμένα, τα 3D μοντέλα καλλιέργειας KBK παρέχουν ένα καλύτερο περιβάλλον για τα κύτταρα, ως προς το ρυθμό πολλαπλασιασμού τους και ως προς τη μορφολογία τους [172]. Ειδικότερα, κύτταρα που επάγουν τη δημιουργία όγκων και απομονώθηκαν από *in vivo* όγκους, παρουσίαζαν κοινά χαρακτηριστικά με τα κύτταρα που καλλιεργούνταν σε 3D συνθήκες, όπως το βλαστικό δυναμικό και ο αργός κυτταρικός κύκλος (quiescent state) [171]. Από την άλλη, κύτταρα που αναπτύσσονται σε μονοστιβάδες, έχουν πεπλατυσμένο σχήμα που επάγει το πολλαπλασιασμό με σχετικά ομοιόμορφο ρυθμό κατά μήκος της επιφάνειας του τρυβλίου. Αυτό δεν συμβαίνει στην περίπτωση των KBK που αναπτύσσονται σε 3D συνθήκες, καθώς τα

κύτταρα διαιρούνται πιο γρήγορα στην περιφέρεια του σφαιροειδούς παρά στο εσωτερικό, λόγω της έλλειψης οξυγόνου και μορίων προσκόλλησης [173,174].

Εν συνεχεία του χαρακτηρισμού των διαφορετικών μοντέλων τρισδιάστατης καλλιέργειας, και της σύγκρισης του αριθμού των σφαιροειδών και στα τρία διαφορετικά 3D συστήματα, φαίνεται πως η καλλιέργεια στο Matrigel επάγει τη δημιουργία μεγαλύτερου αριθμού σφαιρών (**Εικόνα 3.2**). Το φαινόμενο αυτό, πιθανώς να οφείλεται στο γεγονός ότι η εξωκυττάρια μήτρα αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα συστατικά του θύκου των KBK, και αποτελεί κρίσιμο στοιχείο για την επαγωγή του φαινοτύπου αυτού [171]. Ειδικότερα, οι πρωτεΐνες και τα συστατικά που υπάρχουν στην εξωκυττάρια μήτρα συμβάλλουν στη διατήρηση και τον εμπλουτισμό των KBK [171]. Το κολλαγόνο αποτελεί ένα από τα κύρια συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας, και συγκεκριμένα το κολλαγόνο τύπου I, ενισχύει το ογκογόνο δυναμικό και την αυτό-ανανέωση των KBK του παγκρέατος, μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού FAK [175]. Επίσης, η λαμινίνη 5, που αποτελεί και αυτή συστατικό της εξωκυττάριας μήτρας, ενισχύει το φαινότυπο των αιμοποιητικών KBK, επάγοντας τον αργό κυτταρικό κύκλο (quiescent state) [176]. Επιπλέον, η εξωκυττάρια μήτρα παρέχει θέσεις προσκόλλησης για τα KBK στο μικροπεριβάλλον του όγκου [177]. Η αλληλεπίδραση εξωκυττάριας μήτρας και KBK, μέσω υποδοχέων των KBK, όπως οι ιντεγκρίνες (π.χ. β1, α6, β3), το CD44 (υποδοχέας υαλουρονικού), και το CD47 (υποδοχέας θρομβοσπονδίνης 1) ενισχύει τις ιδιότητες των KBK [177]. Για παράδειγμα, τα KBK συνδέονται με το υαλουρονικό μέσω του CD44 υποδοχέα και αυτό αυξάνει όχι μόνο την έκφραση των βλαστικών δεικτών Nanog και SOX2, αλλά και την έκφραση αντλιών που σχετίζονται με τη χημειοανθεκτικότητα σε περιπτώσεις του καρκίνου του μαστού και των ωοθηκών [177]. Τα παραπάνω συστατικά-πρωτεΐνες, αποτελούν βασικά στοιχεία των φυσικών υποστρωμάτων (π.χ. Matrigel) που χρησιμοποιούνται στην 3D καλλιέργεια για τον εμπλουτισμό των KBK [17]. Συγκεκριμένα, παρόμοιες μελέτες αποδεικνύουν τον υψηλό αριθμό σφαιροειδών σε υποστρώματα όπως Matrigel, σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως του προστάτη, των ωοθηκών και του γλοιοβλαστώματος [179,180,181].

Εξίσου υψηλός αριθμός σφαιροειδών, συγκριτικά με την ευρέως διαδεδομένη καλλιέργεια σε εναιώρημα [69], παρατηρείται και στη συγκαλλιέργεια καρκινικών ινοβλαστών με τα καρκινικά κύτταρα (**Εικόνα 3.2**). Στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού, το μικροπεριβάλλον του όγκου περιέχει μια αθονία ινοβλαστών που σχετίζονται με τον καρκίνο [182]. Οι καρκινικοί ινοβλάστες διαφέρουν μορφολογικά και λειτουργικά από τους φυσιολογικούς ινοβλάστες (Normal Fibroblasts-NFs), και ενεργοποιούνται από την αλληλεπίδραση και την επικοινωνία μεταξύ των καρκινικών κυττάρων [183]. Τέτοιες αλληλεπιδράσεις μπορούν και ρυθμίζουν διάφορες διαδικασίες, όπως η μετάσταση των καρκινικών κυττάρων [184] και η επιθηλιακή προς μεσεγχυματική κατάσταση, που σχετίζεται με τις βλαστικές ιδιότητες [185]. Για παράδειγμα, η ιντερλευκίνη 6 (IL-6) που εκκρίνεται από τους καρκινικούς ινοβλάστες, επάγει *in vitro* τη δημιουργία σφαιροειδών εμπλουτισμένα σε KBK, μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού JAK/STAT [186]. Επίσης, στην περίπτωση του καρκίνου του πνεύμονα, η εκκρινόμενη από τους CAFs ινσουλίνη αυξητικού παράγοντα 2 (IGFII), ρυθμίζει το μονοπάτι AKT, ενισχύοντας έτσι την έκφραση του γονιδίου Nanog και το ογκογόνο δυναμικό των καρκινικών κυττάρων σε *in vivo* συνθήκες [187]. Επιπροσθέτως, σε μια μελέτη του καρκίνου του προστάτη, η Ανεξίνη A1 (AnxA1), η οποία εκκρίνεται από τους CAFs, ενισχύει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με βλαστικές ιδιότητες και EMT, ενώ παράλληλα αυξάνει την ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να σχηματίζουν σφαιρικές δομές [188]. Επιπλέον, στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού, η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού TGF-β/Smad, από τους καρκινικούς ινοβλάστες, επάγει το τη

διαδικασία του EMT σε κυτταρικές σειρές *in vitro* και παράλληλα αυξάνει την έκφραση βλαστικών δεικτών [189]. Παρομοίως, υπάρχουν μελέτες σε διάφορους τύπους καρκίνων που αποδεικνύουν την ενισχυμένη ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να σχηματίζουν σφαιρικές δομές –χαρακτηριστικό των βλαστικών κυττάρων- όταν καλλιεργούνται παρουσία καρκινικών ινοβλαστών [156,190,191].

Τα KBK του μαστού απομονώθηκαν για πρώτη φορά το 2003, από τον Al-Hajj και τους συνεργάτες του, οι οποίοι διαπίστωσαν ότι μόνο ένας μικρός υποπληθυσμός καρκινικών κυττάρων του μαστού με φαινότυπο ESA+/CD44+/CD24-/low, ήταν ικανός να επάγει τη δημιουργία όγκων σε ποντίκια [19]. Πολλές μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει το συγκεκριμένο φαινότυπο για το διαχωρισμό KBK του μαστού από κυτταρικές σειρές και όγκους, και θεωρείται ο καλύτερος συνδυασμός δεικτών για το συγκεκριμένο σκοπό. Έτσι, για να ταυτοποιήσουμε και εμείς τα KBK του μαστού στα συστήματα μας, προχωρήσαμε σε πειράματα κυτταρομετρίας ροής χρησιμοποιώντας αυτό το συνδυασμό μοριακών δεικτών. Τα πειράματα μας, επιβεβαίωσαν, ότι όντως οι σφαιρικές δομές στα συστήματα καλλιέργειας μας ήταν εμπλουτισμένες σε KBK του μαστού (**Εικόνα 3.3 A**). Στο σύστημα καλλιέργειας σε Matrigel, το ποσοστό των KBK είναι μεγαλύτερο συγκριτικά με την καλλιέργεια σε εναιώρημα (**Εικόνα 3.3 B**), κάτι το οποίο φαίνεται να ταυτίζεται και με το μεγαλύτερο αριθμό σφαιρών στην καλλιέργεια σε Matrigel. Τα παραπάνω αποτελέσματα ταυτίζονται με ευρήματα από άλλες μελέτες, όπου καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων σε ειδικά υποστρώματα 3D καλλιέργειας αυξάνουν το ποσοστό των κυττάρων με φαινότυπο CD44+/CD24-/low, αλλά και μεταγραφικών παραγόντων που σχετίζονται με βλαστικές ιδιότητες (OCT4A, SOX2, JAG1) [192,193]. Λόγω αντικειμενικής δυσκολίας του διαχωρισμού των καρκινικών κυττάρων από τους καρκινικούς ινοβλάστες, η ποσοτικοποίηση των KBK μέσω κυτταρομετρίας ροής, δεν πραγματοποιήθηκε στο σύστημα της συγκαλλιέργειας. Συγκεκριμένα, προκαταρκτικά πειράματα στο εργαστήριο μας έχουν δείξει ότι οι καρκινικοί ινοβλάστες εκφράζουν το συνδυασμό δεικτών επιφανείας CD44+/CD24-/low. Για το λόγο αυτό, δεν ήταν δυνατή η ποσοτικοποίηση των KBK της MCF-7 κυτταρικής σειράς, από τη στιγμή που ο φαινότυπος CD44+/CD24-/low εμφανιζόταν και στους CAFs.

Ένα ακόμα σημαντικό πλεονέκτημα που παρέχει η 3D καλλιέργεια των KBK, είναι η περισσότερο αντιπροσωπευτική συμπεριφορά των κυττάρων σε σχέση με τις *in vivo* συνθήκες, στις χορηγήσεις διάφορων χημειοθεραπευτικών φαρμάκων. Συγκεκριμένα, αρκετές μελέτες αναδεικνύουν την αυξημένη ανθεκτικότητα των καρκινικών βλαστικών κυττάρων που αναπτύσσονται σε 3D συνθήκες, σε διάφορες θεραπείες του καρκίνου [194]. Μια πιθανή εξήγηση του φαινομένου αυτού, είναι ότι τα κύτταρα στο εσωτερικό της σφαιρικής δομής προστατεύονται από τα γύρω περιφερειακά κύτταρα και έτσι τα χημειοφάρμακα δεν εισέρχονται στο εσωτερικό του σφαιροειδούς [159]. Στην περίπτωση μάλιστα των 3D καλλιέργειών, που ως υπόστρωμα χρησιμοποιούνται συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας, τα ίδια, μπορούν και λειτουργούν ως φυσικός φραγμός σε διάφορες στοχευμένες θεραπείες [195]. Συγκεκριμένα, παρόμοιες μελέτες στο καρκίνου του μαστού, αναδεικνύουν την αυξημένη ανθεκτικότητα των σφαιρικών δομών που προκύπτουν από τις κυτταρικές σειρές MDA-MB-231 και MCF-7, στα χημειοφάρμακα Επιρουμπικίνη και Πακλιταξέλη, όταν καλλιεργούνται σε Matrigel, λόγω αυξημένης έκφρασης μονοπατιών που σχετίζονται με την επιδιόρθωση του DNA [196]. Σε μία ακόμα αντίστοιχη μελέτη, η αυξημένη ανθεκτικότητα MCF-7 καρκινικών βλαστικών κυττάρων στο χημειοφάρμακο Δοξορουβικίνη φαίνεται ότι οφείλεται στην υπερέκφραση αντλιών πρωτεϊνών που σχετίζονται με την εκροή φαρμάκων [197]. Παρόμοια αποτελέσματα υπάρχουν και στην περίπτωση της συγκαλλιέργειας καρκινικών ινοβλαστών και καρκινικών σειρών. Σφαιροειδή που έχουν

προκύψει από τη συγκαλλιέργεια MDA-MB-231 κυττάρων και CAFs παρουσιάζουν αυξημένη ανθεκτικότητα στο χημειοφάρμακο Πακλιταξέλη, καθώς λόγω έκκρισης κυτοκινών από τους CAFs ενεργοποιείται το σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK/PI3K που προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική επιβίωση [198]. Επιπροσθέτως, μια πρόσφατη μελέτη στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού και του πνεύμονα, εστιάζει σε έναν ειδικό πληθυσμό CAFs με φαινότυπο CD10⁺/GPR77⁺, ο οποίος μεσολαβεί στον εμπλουτισμό των KBK και στην ανθεκτικότητα των κυττάρων αυτών στη Δοσεταξέλη, μέσω έκκρισης της IL-6 και IL-8 [199].

Για τους παραπάνω λόγους, θελήσαμε να ελέγξουμε τη χημειοανθεκτικότητα των MCF-7 καρκινικών βλαστικών κυττάρων, καλλιεργούμενα σε διαφορετικές τρισδιάστατες συνθήκες, σε δύο ευρέως χρησιμοποιούμενα χημειοφάρμακα στον καρκίνο του μαστού, στη Δοξορουβικίνη και στην Πακλιταξέλη (**Εικόνα 3.5**). Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 3.6 A** για τη Δοξορουβικίνη, τα περισσότερα χημειοανθεκτικά συστήματα φαίνεται να είναι αυτά του Matrigel και της συγκαλλιέργειας, με τον αριθμό των σφαιρών να είναι περίπου διπλάσιος και στις δύο περιπτώσεις συγκριτικά με την μόνο-καλλιέργεια σε εναιώρημα. Από την άλλη, με τη χορήγηση της Πακλιταξέλης (**Εικόνα 3.6 B**) το σύστημα το οποίο φαίνεται να ξεχωρίζει είναι αυτό της συγκαλλιέργειας, με τα υπόλοιπα δύο να κυμαίνονται σε παρόμοια επίπεδα. Τα παραπάνω αποτελέσματα, πιθανώς να ερμηνεύονται από το γεγονός, ότι τόσο η καλλιέργεια στο Matrigel όσο και η συγκαλλιέργεια πρόκειται για δύο σύνθετα συστήματα, με τις αλληλεπιδράσεις των μη κυτταρικών και κυτταρικών συστατικών να είναι περισσότερες, και να είναι αυτές εν τέλει οι οποίες ενισχύουν τη χημειοανθεκτικότητα των καρκινικών βλαστικών κυττάρων. Εν κατακλείδι, τα παραπάνω ευρήματα επιβεβαιώνονται και από άλλες ερευνητικές ομάδες που συσχετίζουν την ανθεκτικότητα των καρκινικών βλαστικών κυττάρων με διάφορα συστήματα 3D καλλιέργειας. Ο Brancato και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η ανθεκτικότητα των MCF-7 σφαιροειδών στη Δοξορουβικίνη, όταν καλλιεργούνται σε ειδικό υπόστρωμα τύπου gelatin, είναι μεγαλύτερη παρουσία ινοβλαστών από ότι χωρίς, εξαιτίας του φυσικού φραγμού που προσφέρουν οι ινοβλάστες [200]. Παρόμοια ευρήματα προκύπτουν και από μια ακόμα μελέτη, όπου MCF-7 καρκινικά βλαστικά κύτταρα παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στη Ταμοξιφαίνη όταν καλλιεργούνται σε υπόστρωμα με συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας από ότι σε εναιώρημα, λόγω υπερέκφρασης αντι-αποπτωτικών μηχανισμών [201].

Πίσω από τις ιδιαίτερες ιδιότητες των KBK φέρονται να κρύβονται επιγενετικές τροποποιήσεις. Οι επιγενετικοί μηχανισμοί γενικότερα, φαίνεται ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον καρκίνο, καθώς προωθούν, διατηρούν ή και ενισχύουν κακοήθεις φαινοτύπους σε διάφορα στάδια της νόσου [78]. Αυξανόμενος αριθμός μελετών υποδεικνύουν ότι οι μοναδικές ιδιότητες των KBK – αυτο-ανανέωση, χημειοανθεκτικότητα και μεταστατική ικανότητα - ρυθμίζονται από επιγενετικούς μηχανισμούς [147].

Το KDM5 είναι μια απομεθυλάση ιστονών, που καταλύει την απομάκρυνση δι- και τρι-μεθυλιώσεων από την λυσίνη 4 της ιστόνης 3 (H3K4me2/3) [202]. Η σημασία του ενζύμου αυτού στον καρκίνο και ειδικότερα στις χαρακτηριστικές ιδιότητες των καρκινικών βλαστικών κυττάρων ενός όγκου υποστηρίζεται από μελέτες και σε άλλους τύπους καρκίνου. Συγκεκριμένα, αποσιώπηση του KDM5B οδηγεί σε μειωμένη ικανότητα των κυττάρων να σχηματίζουν σφαιρικές δομές τόσο στην περίπτωση του μελανώματος όσο και του νευροβλαστώματος [133,144]. Επιπλέον, είναι γνωστό από μελέτες ότι το ένζυμο KDM5B υπερεκφράζεται σε καρκινικές σειρές που ανήκουν στον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού (TNBC), ενώ η αποσιώπηση του έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή του

πολλαπλασιασμού των κυττάρων και την μείωση της ικανότητας σχηματισμού σφαιρών στον υπότυπο αυτό [135]. Παράλληλα, έχει αποδειχθεί ότι το KDM5B εμφανίζει αυξημένη έκφραση σε καρκινικές κυτταρικές σειρές του μαστού θετικές για τον υποδοχέα οιστρογόνων (ER+) [129], ενώ επίσης και το KDM5A φαίνεται ότι υπερεκφράζεται σε ορισμένες σειρές του καρκίνου του μαστού [123]. Επιπροσθέτως, το KDM5A αποτελεί ένα προγνωστικό δείκτη στην περίπτωση του καρκίνου των νεφρών, όπου επάγει την επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετάβαση [203].

Για να ελεγχθεί ο ρόλος των KDM5 στα MCF-7 καρκινικά βλαστικά κύτταρα του μαστού πραγματοποιήθηκε αναστολή του μορίου με τη χορήγηση του ειδικού χημικού αναστολέα KDM5-C70 και στα τρία συστήματα σφαιρών, χαρακτηριστικό των οποίων είναι ο εμπλουτισμός σε καρκινικά βλαστικά κύτταρα. Ο αναστολέας δρα παρεμποδίζοντας την πρόσδεση ενός απαραίτητου συμπαραγόντα του ενζύμου, του α-κετογλουταρικού, στο ενεργό κέντρο του [204]. Πιο συγκεκριμένα, μονήρη κύτταρα καλλιεργήθηκαν όπως περιγράφεται στις ενότητες 2.1.3/4/5. Εν συνεχεία, προχωρήσαμε στη φαρμακολογική αναστολή των KDM5, μέσω ενός ειδικού χημικού αναστολέα του KDM5-C70, όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.1.4.2, και εξετάσαμε τη δράση του στα KBK του μαστού. Η αναστολή των KDM5 απομεθυλασών οδήγησε στη μείωση της ικανότητας σχηματισμού σφαιρικών δομών και στα τρία *in vitro* 3D συστήματα (**Εικόνα 3.7 A-B**). Τα συστήματα με το Matrigel και τη συγκαλλιέργεια είναι αυτά που επηρεάστηκαν λιγότερο από την αναστολή συγκριτικά με την καλλιέργεια σε εναιώρημα (**Εικόνα 3.7 Γ**), αναδεικνύοντας έτσι την πολυπλοκότητα των συστατικών που υπάρχει σε αυτές τις δύο συνθήκες καλλιέργειας και τα καθιστά λιγότερο ευαίσθητα στον αναστολέα KDM5-C70. Επιπροσθέτως, η αναστολή των KDM5 οδήγησε σε μείωση του υποπληθυσμού CD44⁺/CD24^{-low} και συγκεκριμένα των KBK, στην περίπτωση της καλλιέργειας σε εναιώρημα (**Εικόνα 3.8**). Από τα παραπάνω αποτελέσματα γίνεται αντιληπτό πως πιθανώς ο ρόλος των KDM5 σχετίζεται με το δυναμικό βλαστικότητας στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα μαστού, με το κάθε όμως *in vitro* 3D σύστημα να αποκρίνεται διαφορετικά στην αναστολή των KDM5.

Τόσο το KDM5A όσο και το KDM5B, έχει αποδειχθεί σε διάφορους τύπους καρκίνων, ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανθεκτικότητα των καρκινικών κυττάρων (είτε στη χημειοθεραπεία είτε στην ορμονοθεραπεία) και ότι εξάλειψη της έκφρασης τους καθιστά εκ νέου τα κύτταρα ευαίσθητα [143,205,206,207,208,209,210,211]. Για το λόγο αυτό, σε επόμενο στάδιο, και έχοντας ως απώτερο σκοπό την εξάλειψη των όγκων του καρκίνου του μαστού, ελέγχθηκε η συνδυαστική χορήγηση του αναστολέα των KDM5 και των χημειοθεραπευτικών Δοξορουβικίνη και Πακλιταξέλη που θα στόχευε και τα διαφοροποιημένα κύτταρα του όγκου αλλά και τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, στην **Εικόνα 3.10 και 3.11**, φαίνεται ότι ο αριθμός των σφαιρικών δομών είναι μεγαλύτερος όταν γίνεται επώαση μόνο με τον αναστολέα ή τα χημειοφάρμακα, από όταν πραγματοποιείται η συνδυαστική χορήγηση, και στα τρία συστήματα. Επιπροσθέτως, στην περίπτωση της μονο-καλλιέργειας σε εναιώρημα, το ποσοστό των KBK του μαστού είναι μικρότερο ύστερα από τη συνδυαστική χορήγηση, σε αντίθεση με την επώαση μόνο με τα χημειοφάρμακα (**Εικόνα 3.12**). Σε μια αντίστοιχη μελέτη του εργαστηρίου μας, για το επιγενετικό ένζυμο LSD1/KDM1A, επίσης μια απομεθυλάση ιστονών, συνδυαστική χορήγηση του αναστολέα GSK-LSD1 με το χημειοφάρμακο Δοξορουβικίνη και Πακλιταξέλη, μειώνει τα ποσοστά των KBK σε mammospheres της καρκινικής σειράς του μαστού MCF-7 και MDA-MB-468 [212]. Παρόμοια αποτελέσματα υπάρχουν και σε μια άλλη μελέτη για τον καρκίνο του μαστού, όπου συνδυαστική χορήγηση ενός αναστολέα της μεθυλοτρανσφοράσης του DNA (DNMT) με τη Δοξορουβικίνη μειώνει τα ποσοστά των KBK σε mammospheres της καρκινικής

σειράς του μαστού MDA-MB 231 [213]. Είναι σημαντικό εδώ να τονιστεί ότι μια συνδυαστική θεραπεία θα πρέπει να στοχεύει και τα KBK αλλά και τα διαφοροποιημένα κύτταρα του όγκου και αυτό γιατί τα καρκινικά κύτταρα διαθέτουν μια εγγενή πλαστικότητα που τους επιτρέπει να αλλάζουν εύκολα φαινότυπο σε απόκριση νέων σημάτων [78]. Υπάρχουν στοιχεία σε διάφορους τύπους καρκίνου ότι τα διαφοροποιημένα καρκινικά κύτταρα μπορούν να επανακτήσουν την ικανότητα αυτό-ανανέωσης και να επανέλθουν ξανά σε μια βλαστική κατάσταση. Αυτό για παράδειγμα, μπορεί να συμβεί στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού, όπου η ενεργοποίηση του παράγοντα TGF-β επάγει τη μετατροπή των μη ογκογόνων κυττάρων σε ογκογόνα [214].

Συμπερασματικά, από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, φαίνεται ότι τα τρισδιάστατα συστήματα καλλιέργειας αποτελούν ένα καλύτερο εργαλείο για τη μελέτη των χημειοανθεκτικών μηχανισμών στα KBK του μαστού, και ότι η στόχευση των επιγενετικών τροποποιήσεων στα κύτταρα αυτά, θα μπορούσε να αποτελέσει μια πιθανή θεραπευτική προσέγγιση. Συγκεκριμένα, MCF-7 κύτταρα αναπτύχθηκαν σε διαφορετικά συστήματα *in vitro* 3D καλλιέργειας, α) σε εναιώρημα β) σε Matrigel και γ) σε εναιώρημα μαζί με καρκινικούς ινοβλάστες, και τα συστήματα αυτά χαρακτηρίστηκαν για τον εμπλουτισμό τους σε καρκινικά βλαστικά κύτταρα. Τα συστήματα αυτά έδειξαν διαφορετική απόκριση σε δύο ευρέως χρησιμοποιούμενα χημειοφάρμακα στον καρκίνο του μαστού, τη Δοξορουβικίνη και την Πακλιταξέλη. Παράλληλα, στις διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας ελέγχθηκε ο ρόλος των KDM5 απομεθυλασών (ύστερα από χημική αναστολή τους) όπου φάνηκε να σχετίζονται με το δυναμικό βλαστικότητας των KBK. Τέλος, η συνδυαστική χορήγηση του αναστολέα των KDM5 με τα χημειοφάρμακα Δοξορουβικίνη και Πακλιταξέλη στις MCF-7 σφαιρικές δομές, οδηγεί στην μείωση της ικανότητας σχηματισμού σφαιρών αλλά και του ποσοστού των KBK CD44⁺ /CD24^{low}.

Συμπεριλαμβανομένων των ανωτέρω ευρημάτων, που αναδεικνύουν το σημαντικό ρόλο των συστατικών του θώκου στη χημειοανθεκτικότητα των KBK, περαιτέρω πειράματα μπορούν να οδηγήσουν σε μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα των μηχανισμών που συντελούν στη χημειοανθεκτικότητα των KBK στα διάφορα *in vitro* 3D συστήματα καλλιέργειας. Αρχικά, η εγκαθίδρυση ενός πρωτοκόλλου για το διαχωρισμό των CAFs από τα καρκινικά κύτταρα, θα μας επιτρέψει την ποσοτικοποίηση των KBK στο αντίστοιχο σύστημα καλλιέργειας, ύστερα από τη χορήγηση διάφορων χημειοθεραπευτικών φαρμάκων. Επιπλέον, η ταυτόχρονη καλλιέργεια καρκινικών βλαστικών κυττάρων και με Matrigel αλλά και με CAFs, θα προσεγγίσει σε ακόμα μεγαλύτερο βαθμό τις αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν φυσιολογικά στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Το σύστημα αυτό θα αποτελέσει ένα καλύτερο εργαλείο για τη μελέτη της χημειοανθεκτικότητας των KBK. Επιπλέον, από τα παραπάνω πειράματα, στα οποία αναδεικνύεται η σημασία των CAFs στη χημειοανθεκτικότητα, γίνεται αντιληπτό ότι λεπτομερέστερη ανάλυση των αλληλεπιδράσεων των κυττάρων αυτών με τα KBK θα αποκαλύψει τους μηχανισμούς/σηματοδοτικά μονοπάτια και τα γονιδιακά δίκτυα που συντελούν σε αυτή τη διαδικασία. Τέλος, η μελέτη περισσότερων επιγενετικών ενζύμων στα διάφορα 3D συστήματα καλλιέργειας μπορεί να οδηγήσει στην ταυτοποίηση παραγόντων που συντελούν στη χημειοανθεκτικότητα των KBK.

5. Βιβλιογραφία

- [1] https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=2&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0
- [2] <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/300-greece-fact-sheets.pdf>
- [3] Turashvili, G. and E. Brogi, Tumor Heterogeneity in Breast Cancer. *Front Med (Lausanne)*, 2017.
- [4] Fabiana Lüönd, Stefanie Tiede & Gerhard Christofori, Breast cancer as an example of tumour heterogeneity and tumour cell plasticity during malignant progression. *Nature (British Journal of Cancer)*, 2021
- [5] Indrė Januškevičienė, Vilma Petrikaitė., Heterogeneity of breast cancer: The importance of interaction between different tumor cell populations. *Life Sciences.*, 2019
- [6] Gautam K Malhotra, Xiangshan Zhao, Hamid Band, and Vimla Band, Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biology and Therapy*, 2010
- [7] Emad A. Rakha and Andrew R. Green, Molecular classification of breast cancer: what the pathologist needs to know. *Pathology*, 2017
- [8] Harvey, J.M., et al., Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol*, 1999.
- [9] Anders, C.K.; Abramson, V.; Tan, T.; Dent, R. The evolution of triple-negative breast cancer: From biology to novel therapeutics. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2016
- [10] Bianchini, G.; Balko, J.M.; Mayer, I.A.; Sanders, M.E.; Gianni, L. Triple-negative breast cancer: Challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nat Rev Clin Oncol* 2016
- [11] Edoardo Alesse et al., Circulating MicroRNAs as Prognostic and Therapeutic Biomarkers in Breast Cancer Molecular Subtypes, *Journal of Personalized Medicine.*, 2020
- [12] Shackleton, M., et al., Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell*, 2009.
- [13] Antonija Kreso and John E. Dick., Evolution of the Cancer Stem Cell Model, *Cell*, 2014.
- [14] Christine L Chaffer et al., Cell plasticity and heterogeneity in cancer., *Clin Chem.*, 2013
- [15] Shlush, L. I., & Hershkovitz, D., Clonal Evolution Models of Tumor Heterogeneity. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, 2015.
- [16] Greaves, M. and C.C. Maley, Clonal evolution in cancer. *Nature*, 2012.
- [17] Prasetyanti, P. R., & Medema, J. P. Intra-tumor heterogeneity from a cancer stem cell perspective. *Molecular Cancer*, 2017
- [18] Dominique Bonnet & John E. Dick. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine* 1997

- [19] Muhammad Al-Hajj et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. PNAS 2003
- [20] Fillmore, C.M. and Kuperwasser, C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. Breast Cancer Res. 2008.
- [21] O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. Nature 2007
- [22] Singh SK et al. Identification of human brain tumour initiating cells. Nature 2004
- [23] Shibue, T. and R.A. Weinberg, EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. Nat Rev Clin Oncol, 2017.
- [24] Cristian Scatena et al., Recent Advances in Cancer Plasticity: Cellular Mechanisms, Surveillance Strategies, and Therapeutic Optimization., Frontiers in Oncology, 2020
- [25] Chaffer, C.L., et al., Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011.
- [26] Eyler, C.E., et al., Glioma stem cell proliferation and tumor growth are promoted by nitric oxide synthase-2. Cell, 2011.
- [27] Lan Thi Hanh Phi et al., Cancer Stem Cells (CSCs) in Drug Resistance and their Therapeutic Implications in Cancer Treatment., Stem Cells Int., 2018.
- [28] Saygin, C.; Matei, D.; Majeti, R.; Reizes, O.; Lathia, J.D. Targeting cancer stemness in the clinic: From hype to hope. Cell Stem Cell 2019
- [29] Y. Garcia-Mayea et al. Insights into new mechanisms and models of cancer stem cell multidrug resistance. Seminars in Cancer Biology 2019
- [30] Hiba Zahreddine and Katherine L. B. Borden. Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. Frontiers in Pharmacology, 2013
- [31] Heinz Hammerlindl & Helmut Schaidler Tumor cell-intrinsic phenotypic plasticity facilitates adaptive cellular reprogramming driving acquired drug resistance., Journal of Cell Communication and Signaling, 2017
- [32] Azam Bozorgi, Mozafar Khazaei, Mohammad Rasool Khazaei., New Findings on Breast Cancer Stem Cells: A Review. Journal of Breast Cancer., 2015.
- [33] Vaidyanathan, A.; Sawers, L.; Gannon, A.L.; Chakravarty, P.; Scott, A.L.; Bray, S.E.; Ferguson, M.J.; Smith, G. ABCB1 (MDR1) induction defines a common resistance mechanism in paclitaxel- and olaparib-resistant ovarian cancer cells. Br. J. Cancer 2016
- [34] Lal, S.; Wong, Z.W.; Sandanaraj, E.; Xiang, X.; Ang, P.C.; Lee, E.J.; Chowbay, B. Influence of ABCB1 and ABCG2 polymorphisms on doxorubicin disposition in Asian breast cancer patients. Cancer Sci. 2008
- [35] Hirschmann-Jax, C., et al., A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004.

- [36] Chacon-Martinez, C.A., J. Koester, and S.A. Wickstrom, Signaling in the stem cell niche: regulating cell fate, function and plasticity. *Development*, 2018
- [37] C. Peitzsch, A. Tyutyunnykova, K. Pantel, A. Dubrovskaya, Cancer stem cells: The root of tumor recurrence and metastases, *Semin. Cancer Biol.* 2017
- [38] Giuseppe Curigliano et al., Targeting the microenvironment in solid tumors., *Cancer treatment review.*, 2018
- [39] V. Plaks, N. Kong, Z. Werb, The Cancer Stem Cell Niche: How Essential Is the Niche in Regulating Stemness of Tumor Cells?, *Cell Stem Cell*. 2015
- [40] Charles N, Ozawa T, Squatrito M, et al. Perivascular nitric oxide activates notch signaling and promotes stem-like character in PDGF- induced glioma cells. *Cell Stem Cell* 2010
- [41] Lu J, Ye X, Fan F, et al. Endothelial cells promote the colorectal cancer stem cell phenotype through a soluble form of Jagged-1. *Cancer Cell* 2013
- [42] Jiang H, Zhou C, Zhang Z, et al. Jagged1-Notch1-deployed tumor perivascular niche promotes breast cancer stem cell phenotype through Zeb1. *Nat Commun* 2020
- [43] Voron T, Colussi O, Marcheteau E, et al. VEGF-A modulates expression of inhibitory checkpoints on CD8+ T cells in tumors. *J Exp Med* 2015
- [44] M. De Palma, D. Biziato, T.V. Petrova, Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis, *Nat. Rev. Cancer*. 17 (2017)
- [45] M.A. Lakins, E. Ghorani, H. Munir, C.P. Martins, J.D. Shields, Cancer-associated fibroblasts induce antigen-specific deletion of CD8 + T Cells to protect tumour cells, *Nat. Commun.* 9 (2018)
- [46] CD10+GPR77+ Cancer-Associated Fibroblasts Promote Chemoresistance, *Cancer Discov.* 8 (2018)
- [47] S. Xiong, R. Wang, Q. Chen, J. Luo, J. Wang, Z. Zhao, Y. Li, Y. Wang, X. Wang, B. Cheng, Cancer-associated fibroblasts promote stem cell-like properties of hepatocellular carcinoma cells through IL-6/STAT3/Notch signaling, *Am. J. Cancer Res.* 8 2018
- [48] Grivennikov, S.I. et al., Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010
- [49] Gonzalez, H. et al., Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes Dev.* 2018
- [50] Jinushi, M., Chiba, S., Yoshiyama, H., Masutomi, K., Kinoshita, I., Dosaka-Akita, H., Yagita, H., Takaoka, A., and Tahara, H. Tumor-associated macrophages regulate tumorigenicity and anticancer drug responses of cancer stem/initiating cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2011
- [51] Fan, Q.-M., Jing, Y.-Y., Yu, G.-F., Kou, X.-R., Ye, F., Gao, L., Li, R., Zhao, Q.-D., Yang, Y., Lu, Z.-H., and Wei, L.X., Tumor-associated macrophages promote cancer stem cell-like properties via transforming growth factor-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 2014
- [52] Li, S., Xu, F., Zhang, J., Wang, L., Zheng, Y., Wu, X., Wang, J., Huang, Q., and Lai, M. Tumor-associated macrophages remodeling EMT and predicting survival in colorectal carcinoma. *Oncol Immunology* 2018

- [53] Di Tomaso, T., Mazzoleni, S., Wang, E., Sovena, G., Clavenna, D., Franzin, A., Mortini, P., Ferrone, S., Doglioni, C., Marincola, F.M., et al. Immunobiological characterization of cancer stem cells isolated from glioblastoma patients. *Clin. Cancer Res.* 2010
- [54] Schatton, T., Sch€utte, U., Frank, N.Y., Zhan, Q., Hoerning, A., Robles, S.C., Zhou, J., Hodi, F.S., Spagnoli, G.C., Murphy, G.F., and Frank, M.H. Modulation of T-cell activation by malignant melanoma initiating cells. *Cancer Res.* 2010
- [55] Malanchi I, Santamaria-Martínez A, Susanto E, et al. Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature* 2012
- [56] Govaere O, Wouters J, Petz M, et al. Laminin-332 sustains chemoresistance and quiescence as part of the human hepatic cancer stem cell niche. *J Hepatol* 2016
- [57] Angel I, Pilo Kerman O, Rousso-Noori L, et al. Tenascin C promotes cancer cell plasticity in mesenchymal glioblastoma. *Oncogene* 2020
- [58] Wright MH, Calcagno AM, Salcido CD, Carlson MD, Ambudkar SV, Varticovski L. BRCA1 breast tumors contain distinct CD44+/CD24- and CD133+ cells with cancer stem cell characteristics. *Breast Cancer Res.* 2008
- [59] Meyer MJ, Fleming JM, Lin AF, Hussnain SA, Ginsburg E, Vonderhaar BK. CD44posCD49fhiCD133/2hi defines xenograft-initiating cells in estrogen receptor-negative breast cancer. *Cancer Res.* 2010.
- [60] Cariati M, Naderi A, Brown JP, Smalley MJ, Pinder SE, Caldas C, et al. Alpha-6 integrin is necessary for the tumorigenicity of a stem cell-like subpopulation within the MCF7 breast cancer cell line. *Int J Cancer.* 2008
- [61] Vaillant F, Asselin-Labat ML, Shackleton M, Forrest NC, Lindeman GJ, Visvader JE. The mammary progenitor marker CD61/beta3 integrin identifies cancer stem cells in mouse models of mammary tumorigenesis. *Cancer Res.* 2008
- [62] Spring, F.A., et al., The Ina and Inb blood group antigens are located on a glycoprotein of 80,000 MW (the CDw44 glycoprotein) whose expression is influenced by the In(Lu) gene. *Immunology*, 1988.
- [63] Senbanjo, L.T. and M.A. Chellaiah, CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. *Front Cell Dev Biol*, 2017
- [64] Jaggupilli, A. and E. Elkord, Significance of CD44 and CD24 as cancer stem cell markers: an enduring ambiguity. *Clin Dev Immunol*, 2012.
- [65] Fang, X., et al., CD24: from A to Z. *Cell Mol Immunol*, 2010
- [66] Patrawala, L., et al., Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2+ and ABCG2- cancer cells are similarly tumorigenic. *Cancer Res*, 2005.
- [67] Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS, Dontu G. ALDH1 Is a Marker of Normal and Malignant Human Mammary Stem Cells and a Predictor of Poor Clinical Outcome. *Cell Stem Cell* 2007

- [68] Reynolds, B.A. and S. Weiss, Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol*, 1996
- [69] Dontu, G., et al., In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev*, 2003
- [70] Kleinman HK, Martin GR. Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol*. 2005
- [71] Wang F, Weaver VM, Petersen OW, Larabell CA, Dedhar S, Briand P, Lupu R, Bissell MJ. Reciprocal interactions between beta1-integrin and epidermal growth factor receptor in three-dimensional basement membrane breast cultures: A different perspective in epithelial biology. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998
- [72] Christensen M, Najy AJ, Snyder M, Movilla LS, Kim HR. A critical role of the PTEN/PDGF signaling network for the regulation of radiosensitivity in adenocarcinoma of the prostate. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2014
- [73] Deans, C. and K.A. Maggert, What do you mean, "epigenetic"? *Genetics*, 2015
- [74] Sharma, S., T.K. Kelly, and P.A. Jones, Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*, 2010.
- [75] Cohen, I., et al., Histone modifiers in cancer: friends or foes? *Genes Cancer*, 2011.
- [76] Oliveto, S., et al., Role of microRNAs in translation regulation and cancer. *World J Biol Chem*, 2017.
- [77] Yuan Cheng et al., Targeting epigenetic regulators for cancer therapy: mechanisms and advances in clinical trials., *Signal Transduction and Targeted Therapy.*, 2019
- [78] Yibin Feng., et al., Epigenetic regulation in human cancer: the potential role of epi-drug in cancer therapy. *BMC, Molecular Cancer*, 2020
- [79] Richter AM, Woods ML, Küster MM, Walesch SK, Braun T, Boettger T, Dammann RH. RASSF10 is frequently epigenetically inactivated in kidney cancer and its knockout promotes neoplasia in cancer prone mice. *Oncogene*. 2020
- [80] Yu Z, Feng J, Wang W, Deng Z, Zhang Y, Xiao L, Wang Z, Liu C, Liu Q, Chen S. The EGFR-ZNF263 signaling axis silences SIX3 in glioblastoma epigenetically. *Oncogene*. 2020
- [81] Mirmohammadsadegh A, Marini A, Nambiar S, Hassan M, Tannapfel A, Ruzicka T, Hengge UR. Epigenetic silencing of the PTEN gene in melanoma. *Cancer Res*. 2006
- [82] Majumdar S, Buckles E, Estrada J, Koochekpour S. Aberrant DNA methylation and prostate cancer. *Curr Genomics*. 2011
- [83] Sastry NG, Wan X, Huang T, Alvarez AA, Pangeni RP, Song X, James CD, Horbinski CM, Brennan CW, Nakano I. LY6K promotes glioblastoma Tumorigenicity via CAV-1-mediated ERK1/2 signaling enhancement. *Neuro Oncol*. 2020.
- [84] Xiao C, Wu G, Zhou Z, Zhang X, Wang Y, Song G, Ding E, Sun X, Zhong L, Li S. RBBP6, a RING finger-domain E3 ubiquitin ligase, induces epithelial–mesenchymal transition and promotes metastasis of colorectal cancer. *Cell Death Dis*. 2019

- [85] Elanor N. Wainwright, Paola Scaffidi Epigenetics and Cancer Stem Cells: Unleashing, Hijacking, and Restricting Cellular Plasticity. Trends in Cancer, 2017
- [86] Jones, P.A. and S.B. Baylin, The epigenomics of cancer. Cell, 2007
- [87] Z. Q. Meng et al., Epigenetic regulation and cancer (Review)., Oncology Reports, 2013
- [88] Stallcup MR., Role of protein methylation in chromatin remodeling and transcriptional regulation. Oncogene, 2001
- [89] Tan Boon Toh, Jhin Jieh Lim, Edward Kai-Hua Chow., Epigenetics in cancer stem cells. Mol Cancer. 2017
- [90] Kouzarides T., Chromatin modifications and their function. Cell, 2007
- [91] Greer, E.L. and Y. Shi, Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. Nat Rev Genet, 2012
- [92] Shi, Y.G. and Y. Tsukada, The discovery of histone demethylases. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013
- [93] Leitch HG, McEwen KR, Turp A, et al. Naive pluripotency is associated with global DNA hypomethylation. Nat Struct Mol Biol. 2013
- [94] Liu S, Cheng K, Zhang H, et al. Methylation status of the Nanog promoter determines the switch between Cancer cells and Cancer stem cells. Adv Sci. 2020
- [95] Yi JM, Tsai HC, Glockner SC, et al. Abnormal DNA methylation of CD133 in colorectal and glioblastoma tumors. Cancer Res. 2008
- [96] Baba T, Convery PA, Matsumura N, et al. Epigenetic regulation of CD133 and tumorigenicity of CD133+ ovarian cancer cells. Oncogene. 2009
- [97] Kagara N, Huynh KT, Kuo C, et al. Epigenetic regulation of cancer stem cell genes in triple-negative breast cancer. Am J Pathol. 2012
- [98] Sun L, Mathews LA, Cabarcas SM, et al. Epigenetic regulation of SOX9 by the NF-kappaB signaling pathway in pancreatic cancer stem cells. Stem Cells. 2013
- [99] Gao Y, Chen J, Li K, et al. Replacement of Oct4 by Tet1 during iPSC induction reveals an important role of DNA methylation and hydroxymethylation in reprogramming. Cell Stem Cell. 2013
- [100] Trowbridge JJ, Sinha AU, Zhu N, Li M, Armstrong SA, Orkin SH. Haploinsufficiency of Dnmt1 impairs leukemia stem cell function through derepression of bivalent chromatin domains. Genes Dev. 2012
- [101] Pathania R, Ramachandran S, Elangovan S, et al. DNMT1 is essential for mammary and cancer stem cell maintenance and tumorigenesis. Nat Commun. 2015
- [102] Liu CC, Lin JH, Hsu TW, et al. IL-6 enriched lung cancer stem-like cell population by inhibition of cell cycle regulators via DNMT1 upregulation. Int J Cancer. 2015
- [103] Zagorac S, Alcalá S, Fernández Bayón G, et al. DNMT1 inhibition reprograms pancreatic Cancer stem cells via Upregulation of the miR-17-92 cluster. Cancer Res. 2016

- [104] Lee E, Wang J, Yumoto K, et al. DNMT1 regulates epithelial-Mesenchymal transition and Cancer stem cells, which promotes prostate Cancer metastasis. *Neoplasia*. 2016
- [105] Hawkins RD, Hon GC, Lee LK, et al. Distinct epigenomic landscapes of pluripotent and lineage-committed human cells. *Cell Stem Cell*. 2010
- [106] Beguelin W, Popovic R, Teater M, et al. EZH2 is required for germinal center formation and somatic EZH2 mutations promote lymphoid transformation. *Cancer Cell*. 2013
- [107] Venkatesan N, Wong JF, Tan KP, et al. EZH2 promotes neoplastic transformation through VAV interaction-dependent extranuclear mechanisms. *Oncogene*. 2018
- [108] John Verigos et al., The Histone Demethylase LSD1/KDM1A Mediates Chemoresistance in Breast Cancer via Regulation of a Stem Cell Program, *Cancers* 2019
- [109] Jan-Philipp Mallm et al., Glioblastoma initiating cells are sensitive to histone demethylase inhibition due to epigenetic deregulation., *Cancer Genetics and Epigenetics*, 2020
- [110] Zhenzhen Meng et al., Histone demethylase KDM7A is required for stem cell maintenance and apoptosis inhibition in breast cancer *J Cell Physiology*, 2020.
- [111] Junbao Zhang et al., Targeted inhibition of KDM6 histone demethylases eradicates tumor-initiating cells via enhancer reprogramming in colorectal cancer, *Theranostics*, 2020.
- [112] Hsiang-Ju Chen et al., GATA3 as a master regulator and therapeutic target in ovarian high-grade serous carcinoma stem cells, *Cancer Genetics and Epigenetics*, 2018.
- [113] Eric Metzger et al., KDM4 Inhibition Targets Breast Cancer Stem-like Cells, *AACR, Cancer Research*, 2017
- [114] Yuan J, Takeuchi M, Negishi M, Oguro H, Ichikawa H, Iwama A. Bmi1 is essential for leukemic reprogramming of myeloid progenitor cells. *Leukemia*. 2011
- [115] Abdouh M, Facchino S, Chatoo W, Balasingam V, Ferreira J, Bernier G. BMI1 sustains human glioblastoma multiforme stem cell renewal. *J Neurosci*. 2009
- [116] Lei Y, Liu L, Zhang S, et al. Hdac7 promotes lung tumorigenesis by inhibiting Stat3 activation. *Mol Cancer*. 2017
- [117] Mazumdar C, Shen Y, Xavy S, et al. Leukemia-associated Cohesin mutants dominantly enforce stem cell programs and impair human hematopoietic progenitor differentiation. *Cell Stem Cell*. 2015
- [118] Giorgio Stassi et al., Meeting the Challenge of Targeting Cancer Stem Cells., *Front Cell Dev Biol.*, 2019
- [119] Højfeldt JW, Agger K, Helin K. Histone lysine demethylases as targets for anticancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2013
- [120] Joyce Taylor-Papadimitriou & Joy Burchell., JARID1/KDM5 demethylases as cancer targets? *Expert Opinion on Therapeutic Targets.*, 2017
- [121] Pilka ES, James T, Lisztwan JH. Structural definitions of Jumonji family demethylase selectivity. *Drug Discov Today* 2015

- [122] Plch, J., Hrabeta, J. & Eckschlager, T. KDM5 demethylases and their role in cancer cell chemoresistance. *Int. J. Cancer* 2019
- [123] Tahiliani M, Mei P, Fang R, et al. The histone H3K4 demethylase SMCX links REST target genes to X-linked mental retardation. *Nature* 2007
- [124] Chi P, Allis CD, Wang GG. Covalent histone modifications — miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2010
- [125] Defeo-Jones D, Huang PS, Jones RE, et al. Cloning of cDNAs for cellular proteins that bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* 1991
- [126] Lin W, Cao J, Liu J, et al. Loss of the retinoblastoma binding protein 2 (RBP2) histone demethylase suppresses tumorigenesis in mice lacking Rb1 or Men1. *Proc Natl Acad Sci* 2011
- [127] Pasini D, Hansen KH, Christensen J, et al. Coordinated regulation of transcriptional repression by the RBP2 H3K4 demethylase and Polycomb-repressive complex 2. *Genes Dev* 2008
- [128] Liefke R, Oswald F, Alvarado C, et al. Histone demethylase KDM5A is an integral part of the core notch-RBP-J repressor complex. *Genes Dev* 2010
- [129] Zeng J, Ge Z, Wang L, et al. The histone demethylase RBP2 is overexpressed in gastric cancer and its inhibition triggers senescence of cancer cells. *Gastroenterology* 2010
- [130] Banelli B, Carra E, Barbieri F, et al. The histone demethylase KDM5A is a key factor for the resistance to temozolomide in glioblastoma. *Cell Cycle* 2015
- [131] Liang X, Zeng J, Wang L, et al. Histone demethylase retinoblastoma binding protein 2 is overexpressed in hepatocellular carcinoma and negatively regulated by hsa-miR-212. *PLoS One* 2013
- [132] Li L, Wang L, Song P, et al. Critical role of histone demethylase RBP2 in human gastric cancer angiogenesis. *Mol Cancer* 2014
- [133] Teng YC, Lee CF, Li YS, et al. Histone demethylase RBP2 promotes lung tumorigenesis and cancer metastasis. *Cancer Res* 2013
- [134] Hou J, Wu J, Dombkowski A, et al. Genomic amplification and a role in drug-resistance for the KDM5A histone demethylase in breast cancer. *Am J Transl Res* 2012
- [135] Cao J, Liu Z, Cheung WKC, et al. Histone demethylase RBP2 is critical for breast cancer progression and metastasis. *Cell Rep* 2014
- [136] Nishibuchi G, Shibata Y, Hayakawa T, et al. Physical and functional interactions between the histone H3K4 demethylase KDM5A and the nucleosome remodeling and deacetylase (NuRD) complex. *J Biol Chem* 2014
- [137] Sharma SV, Lee DY, Li B, et al. A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell* 2010
- [138] Penterling C, Drexler GA, Böhländ C, et al. Depletion of histone demethylase jarid1a resulting in histone hyperacetylation and radiation sensitivity does not affect DNA double-strand break repair. *PLoS One* 2016

- [139] Cloos PAC, Christensen J, Agger K, et al. Erasing the methyl mark: histone demethylases at the center of cellular differentiation and disease. *Genes Dev* 2008
- [140] Catchpole S, Spencer-Dene B, Hall D, et al. PLU-1/JARID1B/KDM5B is required for embryonic survival and contributes to cell proliferation in the mammary gland and in ER+ breast cancer cells. *Int J Oncol* 2011
- [141] Klein BJ, Piao L, Xi Y, et al. The histone-H3K4-specific demethylase KDM5B binds to its substrate and product through distinct PHD fingers. *Cell Rep* 2014
- [142] Lu PJ, Sundquist K, Baeckstrom D, et al. A novel gene (PLU-1) containing highly conserved putative DNA/chromatin binding motifs is specifically up-regulated in breast cancer. *J Biol Chem* 1999
- [143] Hayami S, Yoshimatsu M, Veerakumarasivam A, et al. Overexpression of the JmjC histone demethylase KDM5B in human carcinogenesis: involvement in the proliferation of cancer cells through the E2F/RB pathway. *Mol Cancer* 2010
- [144] Kuo YT, Liu YL, Adebayo BO, et al. JARID1B expression plays a critical role in chemoresistance and stem cell-like phenotype of neuroblastoma cells. *PLoS One* 2015
- [145] Wang L, Mao Y, Du G, et al. Overexpression of JARID1B is associated with poor prognosis and chemotherapy resistance in epithelial ovarian cancer. *Tumor Biol* 2015
- [146] Bamodu OA, Huang W-C, Lee W-H, et al. Aberrant KDM5B expression promotes aggressive breast cancer through MALAT1 overexpression and downregulation of hsa-miR-448. *BMC Cancer* 2016
- [147] Ohta K, Haraguchi N, Kano Y, et al. Depletion of JARID1B induces cellular senescence in human colorectal cancer. *Int J Oncol* 2013
- [148] Dey BK, Stalker L, Schnerch A, et al. The histone demethylase KDM5b/JARID1b plays a role in cell fate decisions by blocking terminal differentiation. *Mol Cell Biol* 2008
- [149] Blair LP, Cao J, Zou MR, et al. Epigenetic regulation by lysine demethylase 5 (KDM5) enzymes in cancer. *Cancers (Basel)* 2011
- [150] Wang, Q., Wei, J., Su, P. & Gao, P. Histone demethylase JARID1C promotes breast cancer metastasis cells via down regulating BRMS1 expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015
- [151] Komura, K. et al. Resistance to docetaxel in prostate cancer is associated with androgen receptor activation and loss of KDM5D expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2016
- [152] Banelli B, Carra E, Barbieri F, et al. The histone demethylase KDM5A is a key factor for the resistance to temozolomide in glioblastoma. *Cell Cycle* 2015
- [153] Yamamoto S, Wu Z, Russnes HG, et al. JARID1B is a luminal lineage-driving oncogene in breast cancer. *Cancer Cell* 2014
- [154] Roesch A, Fukunaga-Kalabis M, Schmidt EC, et al. A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth. *Cell* 2010

- [155] Kamaleshwar P. Singh et al., Role of cellular reprogramming and epigenetic dysregulation in acquired chemoresistance in breast cancer., *Cancer Drug Resistance.*, 2019
- [156] Iztok Takač et al., Human breast cancer cell lines., *Slovenian Medical Journal.*, 2019
- [157] Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res.* 2006
- [158] Matthew P. Abett, Jagdeep K. Singh, Robert B. Clarke. Stem cells in breast tumours: Are they ready for the clinic? *EJC.* 2012
- [159] Catharina Melzer, Juliane von der Ohe, Hendrik Lehnert, Hendrik Ungefroren & Ralf Hass. Cancer stem cell niche models and contribution by mesenchymal stroma/stem cells. *BMC, Molecular Cancer*, 217
- [160] Maltman DJ, Przyborski SA. Developments in three-dimensional cell culture technology aimed at improving the accuracy of in vitro analyses. *Biochem Soc Trans.* 2010;38: 1072–1075
- [161] Eble JA, Niland S. The extracellular matrix in tumor progression and metastasis. *Clin Exp Metastasis.* 2019;36: 171–198.
- [162] Langhans SA. Three-Dimensional Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. *Front Pharmacol.* 2018;9: 6.
- [163] Antoni D, Burckel H, Josset E, Noel G. Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. *Int J Mol Sci.* 2015;16: 5517–5527
- [164] Takeda M, Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Ito E, Harada A, et al. Development of In Vitro Drug-Induced Cardiotoxicity Assay by Using Three-Dimensional Cardiac Tissues Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Tissue Eng Part C Methods.* 2018;24: 56–67
- [165] Grimshaw, M.J., et al., Mammosphere culture of metastatic breast cancer cells enriches for tumorigenic breast cancer cells. *Breast Cancer Res*, 2008.
- [166] Tibor Valyi-Nagy et al. Stem cell marker CD271 is expressed by vasculogenic mimicry-forming uveal melanoma cells in three-dimensional cultures, *Mol Vis.* 2012
- [167] R. Charles Coombes et al. Nicastrin regulates breast cancer stem cell properties and tumor growth in vitro and in vivo. *PNAS.* 2012
- [168] Euisik Yoon et al. Co-culture of functionally enriched cancer stem-like cells and cancer-associated fibroblasts for single-cell whole transcriptome analysis. *Integr Biol (Camb).* 2019
- [169] Gascard P, Tlsty TD. Carcinoma-associated fibroblasts: orchestrating the composition of malignancy. *Genes Dev.* 2016
- [170] Kaur P, Ward B, Saha B, Young L, Groshen S, Techy G, Lu Y, Atkinson R, Taylor CR, Ingram M, Imam SA. Human breast cancer histoid: an in vitro 3-dimensional co-culture model that mimics breast cancer tissue. *Histochem Cytochem.* 2011
- [171] Anna M. Czarnecka et al. Three-dimensional cell culture model utilization in cancer stem cell research. *Biological Reviews.* 2016

- [172] Kosovsky, M. Culture and assay systems utilized for cancer stem cell research, F12F284 edition. BD Biosciences. 2012
- [173] Feder-Mengus, C., Ghosh, S., Reschner, A., Martin, I. & Spagnoli, G. C. New dimensions in tumor immunology: what does 3D culture reveal? Trends in Molecular Medicine. 2008
- [174] Chang, L., Graham, P. H., Hao, J., Ni, J., Bucci, J., Cozzi, P. J., Kearsley, J. H. & Li, Y. Acquisition of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell phenotypes is associated with activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway in prostate cancer radioresistance. Cell Death & Disease. 2013
- [175] Begum, A., Ewachiw, T., Jung, C., Huang, A., Norberg, K. J., Marchionni, L., et al. The extracellular matrix and focal adhesion kinase signaling regulate cancer stem cell function in pancreatic ductal adenocarcinoma. PLoS One 2017 12:e0180181.
- [176] Govaere, O., Wouters, J., Petz, M., Vandewynckel, Y. P., Van den Eynde, K., Van den Broeck, A., et al. Laminin-332 sustains chemoresistance and quiescence as part of the human hepatic cancer stem cell niche. J. Hepatol. 2016 64, 609–617.
- [177] Bourguignon, L. Y., Wong, G., Earle, C., and Chen, L. Hyaluronan-CD44v3 interaction with Oct4-Sox2-Nanog promotes miR-302 expression leading to self-renewal, clonal formation, and cisplatin resistance in cancer stem cells from head and neck squamous cell carcinoma. J. Biol. Chem. 2012 287, 32800–32824.
- [178] Sameera Nallanthighal, James Patrick Heiserman and Dong-Joo Cheon. The Role of the Extracellular Matrix in Cancer Stemness. Frontiers in Cell Biology, 2019
- [179] Alvero, A. B., Fu, H.-H., Holmberg, J., Visintin, I., Mor, L., Marquina, C. C., Oidtman, J., Silasi, D.-A. & Mor, G. Stem-like ovarian cancer cells can serve as tumor vascular progenitors. Stem Cells. 2009
- [180] Pollard, S. M., Yoshikawa, K., Clarke, I. D., Danovi, D., Stricker, S., Russell, R., Bayani, J., Head, R., Lee, M., Bernstein, M., Squire, J. A., Smith, A. & Dirks, P. Glioma stem cell lines expanded in adherent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens. Cell Stem Cell. 2009
- [181] NJ Maitland et al. Prostate epithelial cell lines form spheroids with evidence of glandular differentiation in three-dimensional Matrigel cultures. British Journal of Cancer 2001
- [182] Andreas Weigert et al. Breast Cancer CAFs: Spectrum of Phenotypes and Promising Targeting Avenues. Int J Mol Sci. 2021
- [183] Kojima, Y. et al. Autocrine TGF-beta and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2010
- [184] Barone, I. et al. Leptin mediates tumor-stromal interactions that promote the invasive growth of breast cancer cells. Cancer Res. 2012
- [185] Giannoni, E. et al. Reciprocal activation of prostate cancer cells and cancer-associated fibroblasts stimulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness. Cancer Res. 2010

- [186] Zhang, M., Yang, H., Wan, L., Wang, Z., Wang, H., Ge, C., et al. Single-cell transcriptomic architecture and intercellular crosstalk of human intrahepatic cholangiocarcinoma. *J. Hepatol.* 2020 73, 1118–1130.
- [187] Chen, W. J., Ho, C. C., Chang, Y. L., Chen, H. Y., Lin, C. A., Ling, T. Y., et al. (2014). Cancer-associated fibroblasts regulate the plasticity of lung cancer stemness via paracrine signalling. *Nat. Commun.* 5:3472.
- [188] Geary, L. A., Nash, K. A., Adisetiyo, H., Liang, M., Liao, C. P., Jeong, J. H., et al. (2014). CAF-secreted annexin A1 induces prostate cancer cells to gain stem cell-like features. *Mol. Cancer Res.* 12, 607–621.
- [189] Y-M Feng et al. Cancer-associated fibroblasts induce epithelial–mesenchymal transition of breast cancer cells through paracrine TGF- β signalling. *British Journal of Cancer.* 2013
- [190] Feng Li. Et al. Carcinoma associated fibroblasts small extracellular vesicles with low miR-7641 promotes breast cancer stemness and glycolysis by HIF-1 α . *Cell Death Discovery.* 2021
- [191] Pan-Chyr Yang et al. Cancer-associated fibroblasts regulate the plasticity of lung cancer stemness via paracrine signalling. *Nature Communications* 2014
- [192] Jianwu Dai et al. The enhancement of cancer stem cell properties of MCF-7 cells in 3D collagen scaffolds for modeling of cancer and anti-cancer drugs. *Biomaterials.* 2012
- [193] Rowehl, R. A., Burke, S., Bialkowska, A. B., Pettet, D. W., Rowehl, L., Li, E., Antoniou, E., Zhang, Y., Bergamaschi, R., Shroyer, K. R., Ojima, I. & Botchkina, G. I. Establishment of highly tumorigenic human colorectal cancer cell line (CR4) with properties of putative cancer stem cells. *PLoS One* 2014
- [194] Kimlin, L. C., Casagrande, G. & Virador, V. M. In vitro three-dimensional (3D) models in cancer research: an update. *Molecular Carcinogenesis* 2013
- [195] Mao, Y., Keller, E. T., Garfield, D. H., Shen, K. & Wang, J. Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. *Cancer Metastasis Reviews.* 2013
- [196] Lovitt, C. J., Shelper, T. B., & Avery, V. M. Doxorubicin resistance in breast cancer cells is mediated by extracellular matrix proteins. *BMC Cancer* 2018
- [197] Ding, Y., Liu, W., Yu, W., Lu, S., Liu, M., Kaplan, D. L., & Wang, X. Three dimensional tissue culture model of human breast cancer for the evaluation of multidrug resistance. *J Tissue Eng Regen Med* 2018
- [198] Ham, S. L., Thakuri, P. S., Plaster, M., Li, J., Luker, K. E., Luker, G. D., & Tavana, H. Three-dimensional tumor model mimics stromal - breast cancer cells signaling. *Oncotarget* 2018
- [199] Erwei Song et al. CD10 + GPR77 + Cancer-Associated Fibroblasts Promote Cancer Formation and Chemoresistance by Sustaining Cancer Stemness, *Cell.* 2018
- [200] Brancato, V., Gioiella, F., Imperato, G., Guarnieri, D., Urciuolo, F., & Netti, P. A. 3D breast cancer microtissue reveals the role of tumor microenvironment on the transport and efficacy of free-doxorubicin in vitro. *Acta Biomater* 2018
- [201] Horning, J. L., Sahoo, S. K., Vijayaraghavalu, S., Dimitrijevic, S., Vasir, J. K., Jain, T. K. Labhasetwar, V. 3-D tumor model for in vitro evaluation of anticancer drugs. *Mol Pharm* 2008

- [202] Blair LP, Cao J, Zou MR, et al. Epigenetic regulation by lysine demethylase 5 (KDM5) enzymes in cancer. *Cancers (Basel)* 2011
- [203] Zhou D, Kannappan V, Chen X, Li J, Leng X, Zhang J, et al. RBP2 induces stem-like cancer cells by promoting EMT and is a prognostic marker for renal cell carcinoma. *Exp Mol Med.* 2016
- [204] KorneliaPolyak et al. KDM5 Histone Demethylase Activity Links Cellular Transcriptomic Heterogeneity to Therapeutic Resistance. *Cancer Cell* 2018
- [205] Choi HJ, Joo HS, Won HY, Min KW, Kim HY, Son T, et al. Role of RBP2-induced ER and IGF1R-ErbB signaling in tamoxifen resistance in breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2018
- [206] Feng T, Wang Y, Lang Y, Zhang Y. KDM5A promotes proliferation and EMT in ovarian cancer and closely correlates with PTX resistance. *Mol Med Rep.* 2017
- [207] Hou J, Wu J, Dombkowski A, Zhang K, Holowatyj A, Boerner JL, et al. Genomic amplification and a role in drug-resistance for the KDM5A histone demethylase in breast cancer. *Am J Transl Res.* 2012
- [208] Banelli B, Carra E, Barbieri F, Würth R, Parodi F, Pattarozzi A, et al. The histone demethylase KDM5A is a key factor for the resistance to temozolomide in glioblastoma. *Cell Cycle.* 2015
- [209] Lu, Y.; Liu, Y.; Oeck, S.; Glazer, P.M. Hypoxia promotes resistance to EGFR inhibition in NSCLC cells via the histone demethylases, LSD1 and PLU-1. *Mol. Cancer Res.* 2018
- [210] Roesch, A.; Vultur, A.; Bogeski, I.; Wang, H.; Zimmermann, K.M.; Speicher, D.; Körbel, C.; Laschke, M.W.; Gimotty, P.A.; Philipp, S.E. Overcoming intrinsic multidrug resistance in melanoma by blocking the mitochondrial respiratory chain of slow-cycling JARID1B(high) cells. *Cancer Cell* 2013
- [211] Xu, W.; Zhou, B.; Zhao, X.; Zhu, L.; Xu, J.; Jiang, Z.; Chen, D.; Wei, Q.; Han, M.; Feng, L. KDM5B demethylates H3K4 to recruit XRCC1 and promote chemoresistance. *Int. J. Biol. Sci.*
- [212] J. Verigos et al. The Histone Demethylase LSD1/KDM1A Mediates Chemoresistance in Breast Cancer via Regulation of a Stem Cell Program. *Cancers*, 2019
- [213] Li SY, Sun R, Wang H2, Shen S, Liu Y, Du XJ, Zhu YH, Jun W. Combination therapy with epigenetic-targeted and chemotherapeutic drugs delivered by nanoparticles to enhance the chemotherapy response and overcome resistance by breast cancer stem cells. *J Control Release.* 2015
- [214] Chaffer CL, Marjanovic ND, Lee T, Bell G, Kleer CG, Reinhardt F, D'Alessio AC, Young RA, Weinberg RA. Poised chromatin at the ZEB1 promoter enables breast cancer cell plasticity and enhances tumorigenicity. *Cell.* 2013