



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ & ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

*Διερεύνηση της σχέσης και του ρόλου του NF-κB και του miR-342 στον καρκίνο του
πνεύμονα*

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Διδρυματικό και Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
«ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»

Αλέξανδρος Σάρρας

Πτυχιούχος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών

Επιβλέπων: Ευάγγελος Κωλέττας

Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Κυτταρικής Βιολογίας

Ιωάννινα 2022

Πρόλογος

Η παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κατά το χρονικό διάστημα 2020-2022, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Μοριακής Κυτταρικής Βιολογίας κ. Ευάγγελου Κωλέττα. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω θερμά, ως επιβλέποντα της διπλωματικής μου εργασίας, ο οποίος με δέχτηκε με θέρμη στο εργαστήριό του και με καθοδήγησε καθ' όλη τη διάρκεια της πορείας αυτής. Τον ευχαριστώ πολύ για όλη την στήριξη και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε εξ αρχής.

Ευχαριστώ τα μέλη της πενταμελούς εξεταστικής επιτροπής τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ευάγγελο Κωλέττα, την Καθηγήτρια κα Μαρίκα Σύρρου και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Παναγιώτη Κούκλη, Μέλη του Εργαστήριο Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής, και τον Καθηγητή κ. Ευστάθιο Φριλίγγο, Διευθυντή του ΔΔΠΜΣ Μοριακή Κυτταρική Βιολογία και Βιοτεχνολογία και Διευθυντή του Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας καθώς επίσης και την καθηγήτρια κα Θωμαις Παπαμαρκάκη, Αναπληρωτή Διευθυντή του ΔΔΠΜΣ Μοριακή Κυτταρική Βιολογία και Βιοτεχνολογία, και Μέλος του Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω, επίσης, στην Δρ. Ευγενία Ρουπακιά, Μοριακή Βιολόγο και Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια του Εργαστηρίου Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Την ευχαριστώ θερμά για όλη την επιστημονική κατάρτιση, που με βοήθησε να αποκτήσω, τόσο σε θεωρητικό επίπεδο, όσο και σε επίπεδο εργαστηριακών τεχνικών. Την ευχαριστώ, επίσης, για την πολύτιμη και ουσιαστική συνδρομή της στην συγγραφή της διπλωματικής μου εργασίας, κυρίως, όμως, την ευχαριστώ για όλη την στήριξη και την καθοδήγησή της. Μου δίδαξε πολλά και την ευχαριστώ βαθύτατα γι' αυτό.

Επιπρόσθετα θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Απόστολο Κλινάκη, Ερευνητή Α' και την Ειδικό Λειτουργικό Επιστήμονα Γ' Δρ. Ζωή Κανάκη του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών για την ανάπτυξη των ξενομοσχευμάτων σε μύες, καθώς και τους Δρ. Χρήστο Πολυτάρχου, Αναπληρωτή Καθηγητή και Μαρία Χατζηαποστόλου, Επίκουρο Καθηγήτρια του Πανεπιστημίου Nottingham Trent της Βρετανίας, για την ανάλυση Nanostring.

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

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου αλλά και τους φίλους μου, για όλη την στήριξη που μου έδειξαν αυτό το διάστημα, την συμπαράστασή τους στις δύσκολες στιγμές και την αγάπη τους με την οποία με ώθησαν σε αυτό το αποτέλεσμα, δίνοντάς μου αστείρευτη δύναμη και κουράγιο. Ελπίζω το αποτέλεσμα να τους κάνει περήφανους για εμένα!

Πίνακας περιεχομένων

1.1 Οι μεταγραφικοί παράγοντες NF-κB.....	9
1.1.1 Η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB.....	10
1.1.2 Η κανονική πορεία ενεργοποίησης του NF-κB	12
1.1.3 Η μη-κανονική πορεία ενεργοποίησης του παράγοντα NF-κB	13
1.1.4 Οι άτυπες πορείες ενεργοποίησης του παράγοντα NF-κB.....	13
1.1.5 Δράσεις των IKK ανεξάρτητες από τον NF-κB.....	16
1.2 Τα microRNA	18
1.2.1 Βιογένεση και ωρίμανση των microRNA	18
1.3 Ο Καρκίνος του πνεύμονα	21
1.3.1 Γενετικές και επιγενετικές μεταβολές στον καρκίνο του πνεύμονα	22
1.3.2 Ο παράγοντας NF-κB στον καρκίνο	25
1.3.3 Τα miRNA στο μονοπάτι του NF-κB	27
1.3.4 Το miR-342 στον καρκίνο του πνεύμονα	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
2.1 Βακτηριακές Τεχνικές	30
2.1.1 Παρασκευή L-broth και τρυβλίων L-άγαρ με αντιβιοτικό	30
2.1.2 Παρασκευή βακτηρίων επιδεκτικών προς μετασχηματισμό (competent cells)	30
2.1.3 Μετασχηματισμός βακτηρίων με πλασμιδιακό DNA.....	31
2.1.4 Ανάπτυξη υγρών καλλιέργειών βακτηρίων	31
2.1.5 Παρασκευή βακτηριακών αποθεμάτων γλυκερόλης	32
2.1.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα	32
2.1.7 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα (midi prep)	32
2.2 Κυτταρικές σειρές και καλλιέργεια	33
2.2.1 Κυτταρικές σειρές	33
2.2.2 Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών	33
2.2.3 Ανακαλλιέργεια κυττάρων	34
2.2.4 Αποθήκευση και διατήρηση των κυττάρων σε υγρό άζωτο	34
2.2.5 Ανασύσταση των κυττάρων	35
2.2.6 Δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών	35
2.2.7 Χορήγηση ετοποσιδίου (VP16) στα κύτταρα	37
2.2.8 Καταμέτρηση κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο.....	37
2.2.9 Προσδιορισμός του κυτταρικού κύκλου με κυτταρομετρία ροής.....	37
2.3 Απομόνωση και ανάλυση RNA	38
2.3.2 Αντίστροφη μεταγραφή RNA	39

2.3.3 Αλυσιδωτή αντίδραση μεταγραφής πραγματικού χρόνου	39
2.3.4 MiRNome Profiling με την τεχνολογία Nanostring.....	40
2.4 Απομόνωση και ανάλυση πρωτεϊνών	41
2.4.1 Απομόνωση ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων	41
2.4.2 Απομόνωση κυτταροπλασματικών και πυρηνικών εκχυλισμάτων.....	42
2.4.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου.....	43
2.4.4 Ανάλυση πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωμα κατά Western (Western blot)..	44
2.5 Ανάπτυξη καρκινικών κυτταρικών σειρών ως ξενομοσχεύματα in vivo (xenografts)	45
3.1 Η επίδραση του ετοποσιδίου στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και στην απόκριση σε βλάβες του DNA σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα.....	47
3.2 Ενεργοποίηση του NF-κB στις ανθρώπινες καρκινικές επιθηλιακές κυτταρικές σειρές πνεύμονα έπειτα από χορήγηση VP16 και επαγωγή δίκλωνων ρήξεων.....	49
3.3 Μειορρύθμιση της κινάσης IKKβ σε καρκινικά κύτταρα NSCLC και μελέτη των επιπέδων έκφρασης των miRNA	50
3.4 Υπερέκφραση του miR-342-3p σε καρκινικές σειρές πνεύμονα	51
3.5 Ταυτοποίηση πιθανών γονιδίων-στόχων του miR-342-3p Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	
3.6 Μελέτη της επίδρασης του miR-342-3p in vivo.....	52
4.1 Διακοπή της προόδου του κυτταρικού κύκλου ως απόκριση στη χορήγηση ετοποσιδίου (VP16)	58
4.2 Μεταγραφική ενεργοποίηση του NF-κB στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα ως απόκριση σε βλάβες στο DNA	59
4.3 Αύξηση των επιπέδων του miR-342-3p έπειτα από αποσιώπηση της κινάσης IKKβ σε συνθήκες γονοτοξικού στρες	60
4.4 Ταυτοποίηση του γονιδίου KDM6B ως στόχο του miR-342-3p.....	62

Περίληψη

Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB έχει συνδεθεί με πληθώρα βιολογικών διεργασιών και ασθενειών, μεταξύ των οποίων και ο καρκίνος. Η εμπλοκή των μελών της υπερικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB στον καρκίνο δεν περιορίζεται μόνο στον ρόλο που διαδραματίζει ως μεσολαβητής των ανοσολογικών αποκρίσεων του κυττάρου, αλλά συμβάλει επίσης στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης, της κυτταρικής επιβίωσης αλλά και της απόκρισης στις διάφορες μορφές στρες. Παράλληλα, τα microRNA (miRNA), τα οποία αποτελούν μικρά μη κωδικά μόρια RNA που παρουσιάζουν ρυθμιστική δράση, μπορούν είτε να καταστείλουν, είτε να προάγουν την ανάπτυξη του όγκου μέσω της μειορρύθμισης ενός ευρέος φάσματος γονιδίων-στόχων. Η έρευνα γύρω από αυτά μπορεί να οδηγήσει στην ταυτοποίηση νέων προγνωστικών βιοδεικτών αλλά και πιθανών θεραπευτικών στόχων.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι (α) η ταυτοποίηση IKKβ/NF-κB-ρυθμιζόμενων miRNA που συμμετέχουν σε ρυθμιστικούς μηχανισμούς του NF-κB στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα υπό την επίδραση γονοτοξικού στρες, και (β) η διερεύνηση του πιθανού μηχανισμού δράσης των ταυτοποιημένων miRNA.

Για να ταυτοποιηθούν τα miRNA που υφίστανται ρύθμιση από την κανονική σηματοδοτική πορεία του NF-κB, η κινάση ενεργοποίησης του NF-κB, IKKβ (IKKβ^{KD}), μειορρυθμίστηκε (knock-down, KD) με τη χρήση ενός ρετροϊκού φορέα. Δύο διαφορετικές κυτταρικές σειρές μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, A549 και H1437, με διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο, μελετήθηκαν υπό την επίδραση του χημειοθεραπευτικού φαρμάκου ετοποσιδίου (VP16). Οι τροποποιημένες κυτταρικές σειρές A549 επιλέχθηκαν για την ταυτοποίηση miRNA που ρυθμίζονται από την κινάση σερίνης/θρεονίνης IKKβ. Η ανάλυση των miRNA με την τεχνολογία Nanostring που ελέγχει τα επίπεδα τους στα κύτταρα A549-IKKβ^{KD} και στα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου, είτε παρουσία είτε απουσία ετοποσιδίου, κατέδειξε μια σειρά από miRNA, τα επίπεδα των οποίων επηρεάστηκαν από τη μειορρύθμιση της IKKβ. Ένα από αυτά, το miR-342-3p, εμφάνισε τη μεγαλύτερη αύξηση, και μελετήθηκε ο ρόλος του στην καρκινογένεση καθώς επίσης και οι πιθανοί του στόχοι.

Η υπερέκφραση του miR-342-3p σε κύτταρα A549 και H1437 είχε σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη σημαντικά μικρότερων όγκων που αναπτύχθηκαν ως σε ξενομοσχεύματα *in vivo* σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια NSG, καταδεικνύοντας τον ογκοκατασταλτικό του ρόλο στον καρκίνο του πνεύμονα.

Προκειμένου να μελετηθεί ο ογκοκατασταλτικός μηχανισμός δράσης του miR-342-3p, πραγματοποιήθηκε εκτεταμένη βιοπληροφορική ανάλυση για την εύρεση πιθανών στόχων του miR-342-3p. Η ανάλυση κατέδειξε ότι στοχεύει, κυρίως, γονίδια με ογκογόνο δράση όπως το γονίδιο *KDM6B* (JMJD3). Το γονίδιο *KDM6B* (JMJD3) κωδικοποιεί την ιστονική απομεθυλάση της λυσίνης 6B η οποία καταλύει την αφαίρεση της τριμεθυλίωσης στη λυσίνη 27 της ιστόνης H3 (H3K27 trimethylation), μιας κατασταλτικής επιγενετικής τροποποίησης της χρωματίνης, η οποία εμπλέκεται στην αναδιοργάνωση της χρωματίνης και στην αποσιώπηση της γονιδιακής έκφρασης. Στην παρούσα μελέτη, επαληθεύτηκε πειραματικά με qPCR η μειορρύθμιση του *KDM6B* σε κύτταρα A549 και H1437 που υπερεκφράζανε το miR-342-3p.

Συμπερασματικά, η IKKβ προάγει την καρκινογένεση του πνεύμονα μειορρυθμίζοντας την έκφραση του ογκοκατασταλτικού miR-342-3p το οποίο στοχεύει τον επιγενετικό ρυθμιστή *KDM6B* (JMJD3) διατηρώντας τη χρωματίνη σε ανοικτή ενεργή μορφή και κατά προάγει την έκφραση γονιδίων που πιθανά εμπλέκονται στην καρκινογένεση του πνεύμονα.

Abstract

The NF-κB transcription factors (TFs) have been associated with a variety of biological functions and pathological conditions, including cancer. The contribution of the NF-κB transcription factor superfamily members in cancer is not limited to its function as a mediator in inflammatory and immune responses, but it is also involved in the regulation of cell proliferation, apoptosis, cell survival and stress responses. NF-κB TFs is involved in these processes by regulating both protein-coding genes and non-coding genes such as microRNAs (miRNAs). MiRNAs are small non-coding RNA molecules that have regulatory activity, and can either suppress or induce cancer cell growth by downregulating a range of target genes. Research around them can help discover predictive biomarkers and potential therapeutic targets. The purpose of the present study is to identify (a) IKKβ/NF-κB-regulated miRNAs that are involved in in non-small cell lung cancer (NSCLC) development, and (b)

potential targets of the identified IKK β -regulated miRNAs that may play a role in NSCLC development.

To identify miRNAs that are regulated by the canonical NF- κ B signalling pathway, the upstream canonical NF- κ B activating serine-/threonine (Ser/Thr) kinase, IKK β , was downregulated using retroviral vectors in human NSCLC cell lines. Two different NSCLC cell lines, A549 and H1437 with different genetic backgrounds, were used to knock-down IKK β (IKK β ^{KD}), and investigate the differential expression of miRNAs in IKK β ^{KD} and vector control cells under treatment with the chemotherapeutic agent etoposide (VP16). The A549 cell line was used to identify miRNAs with altered expression in IKK β ^{KD} cells. Using miRNA Nanostring technology, miRNA levels were analysed in the A549-IKK β ^{KD} cell line and the corresponding control cell line, either in the presence or absence of VP16. One of the identified miRNAs, miR-342-3p, exhibited the highest expression levels in the A549-IKK β ^{KD} cells and it was further analysed to investigate its role in NSCLC development and its potential mechanism of action by identifying potential targets using extensive bioinformatics analysis.

To study the *in vivo* role of miR-342-3p in NSCLC development, two different human NSCLC cancer cell lines A549 and H1437 were generated by overexpressing miR-342-3p. Vector control and miR-342-3p-expressing cells were subcutaneously inoculated in either side of immune-compromised NSG mice and allowed to grow as *in vivo* xenografts for three weeks. The results showed that miR-342-3p suppressed human NSCLC growth *in vivo* xenografts in NSG mice, therefore acted as a tumor suppressor.

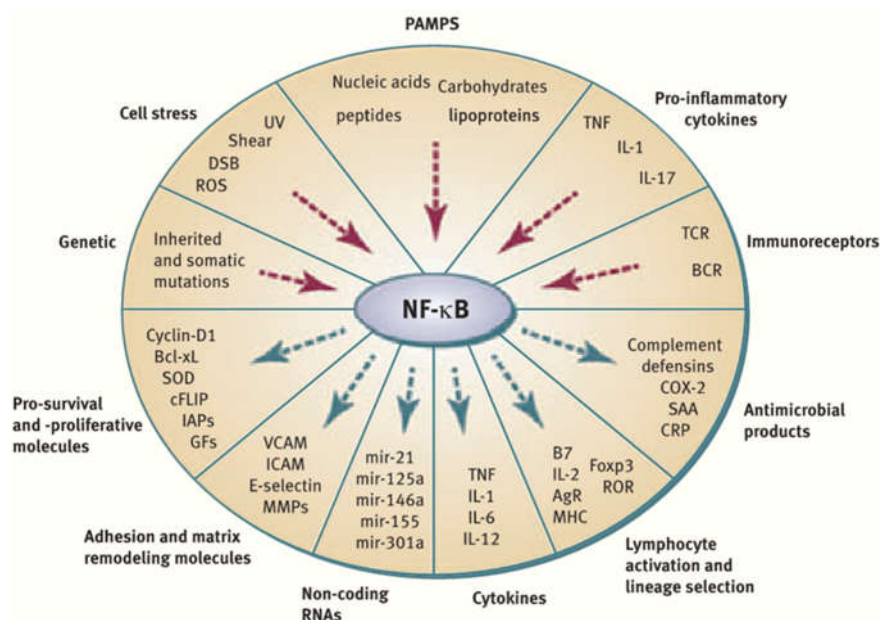
To study the mechanism of the tumour suppressive action of miR-342-3p in lung cancer, an extensive bioinformatics analysis was performed in an attempt to identify potential miR-342-3p targets. Amongst the targets identified, mainly oncogenic molecules, was the *KDM6B* (*JMJD3*) gene, which encodes the *histone lysine demethylase 6B*. This enzyme specifically demethylates di- or tri-methylated lysine 27 of histone H3 (H3K27me2 or H3K27me3). H3K27 trimethylation is a repressive epigenetic mark controlling chromatin organization and gene silencing. The downregulation of *KDM6B* by miR-342-3p was experimentally verified by qPCR in the human NSCLC cells, A549 and H1437 overexpressing miR-342-3p.

In conclusion, IKK β promotes lung carcinogenesis by downregulating the expression of the tumor suppressor miR-342-3p which targets the epigenetic regulator KDM6B (*JMJD3*) maintaining the chromatin in an open active form promoting the expression of genes that likely involved in human non-small cell cancer development.

1. Εισαγωγή

1.1. Οι μεταγραφικοί παράγοντες NF-κB και οι σηματοδοτικές πορείες ενεργοποίησής τους

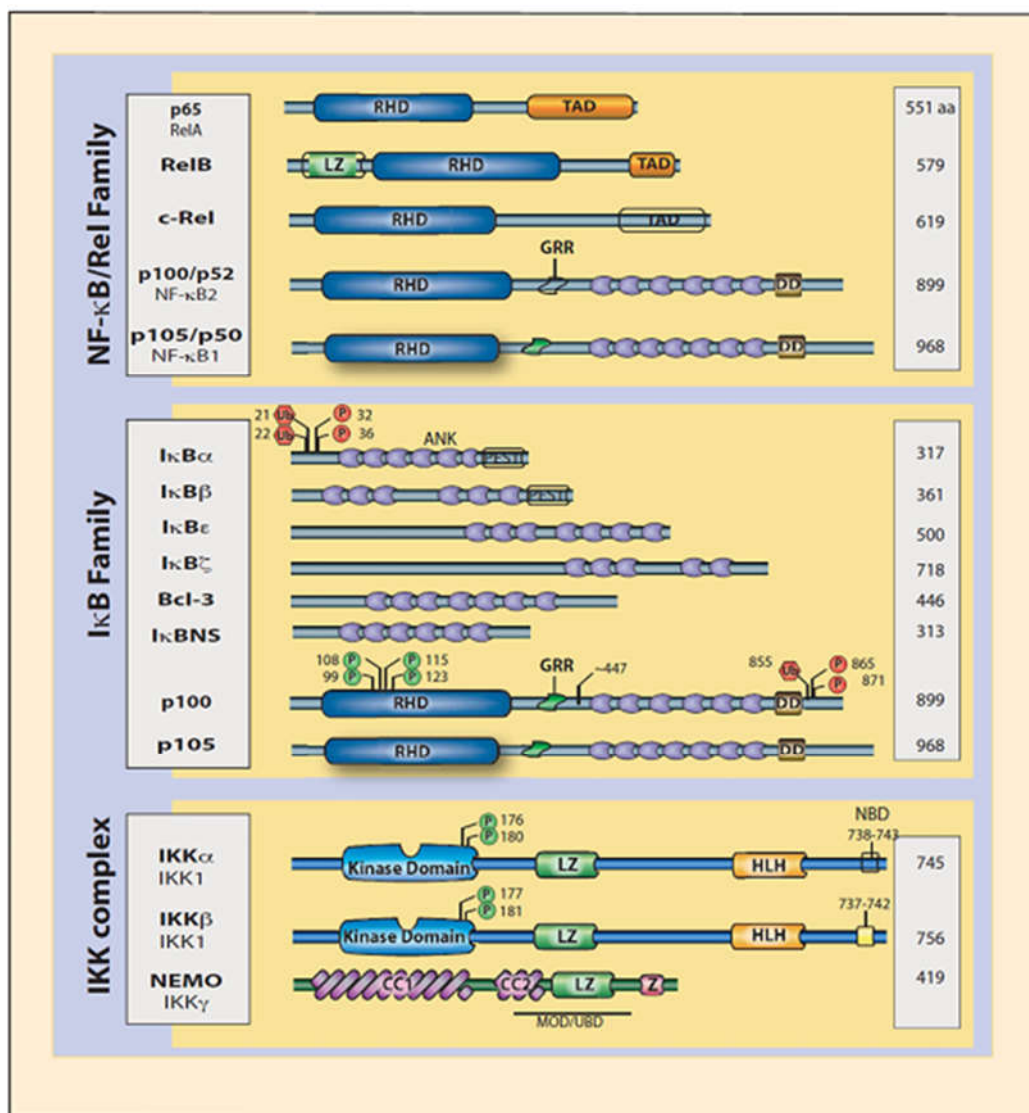
Οι μεταγραφικοί παράγοντες NF-κB (Nuclear Factor-κB) συγκροτούν μια οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι συντονίζουν τη μεταγραφική ρύθμιση πληθώρας γονιδίων ως απόκριση σε μία ποικιλία ερεθισμάτων (Εικόνα 1.1). Βασικός ρόλος του NF-κB αποτελεί η ρύθμιση των φλεγμονωδών και ανοσολογικών αποκρίσεων. Μέσα σε αυτό το πλαίσιο, ο NF-κB διεγείρει τη λειτουργία των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος και δρα με προ-φλεγμονώδη τρόπο επάγοντας την έκφραση κυτταροκινών, χημειοκινών και των υποδοχέων τους¹⁻³. Επιπλέον, συμβάλλει στη ρύθμιση μοριακών πορειών που μεταξύ άλλων εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, την κυτταρική προσκόλληση, τη διαφοροποίηση, την αυτοφαγία και την κυτταρική γήρανση⁴⁻⁸. Επομένως, η απορρύθμιση του NF-κB σχετίζεται με ένα μεγάλο εύρος ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, αυτοάνοσων νοσημάτων, νευροεκφυλιστικών ασθενειών, διαβήτη, αλλά και πολλών ακόμη⁹⁻¹¹. Παρακάτω θα δούμε κάποια χαρακτηριστικά της οικογένειας NF-κB, τα μονοπάτια ενεργοποίησής του παράγοντα, καθώς και το ρόλο του στον καρκίνο του πνεύμονα.



Εικόνα 1.1. Μεταγραφικοί παράγοντες NF-κB. Οι μεταγραφικοί παράγοντες NF-κB ενεργοποιούνται από ποικιλία εξωκυτταρικών και ενδοκυτταρικών ερεθισμάτων, όπως γενετικές μεταλλάξεις, προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και διάφορες μορφές κυτταρικού στρες μεταξύ των οποίων το οξειδωτικό στρες και βλάβες στο DNA. Η ενεργοποίηση του NF-κB έχει σαν αποτέλεσμα τη μεταγραφική ρύθμιση πληθώρας γονιδίων που κωδικοποιούν μεταξύ άλλων, αυξητικούς παράγοντες, κυτταροκίνες, χημειοκίνες, παράγοντες που συμμετέχουν στην έμφυτη και επίκτητη ανοσολογική απόκριση και micro-RNA. PAMPS: Pathogen-associated Molecular Patterns¹².

1.1.1. Η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB

Στα κύτταρα των θηλαστικών, υπάρχουν πέντε υπομονάδες της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB, η RelA (p65), η RelB, η c-Rel, η p105-p50 (NF-κB1) και η p100-p52 (NF-κB2), οι οποίες σχηματίζουν όμο- ή έτερο-διμερή σύμπλοκα (Εικόνα 1.2). Όλες περιέχουν μια ομόλογη επικράτεια 300 αμινοξέων στο αμινοτελικό άκρο τους, που ονομάζεται περιοχή ομολογίας Rel (Rel Homology Domain, RHD), η οποία μεσολαβεί στη δέσμευση των υπομονάδων στο DNA και στον διμερισμό τους^{13,14}. Οι περισσότεροι συνδυασμοί όμο- και ετεροδιμερών είναι εφικτοί¹⁵. Οι υπομονάδες RelA, RelB και c-Rel περιέχουν μια επικράτεια ενεργοποίησης της μεταγραφής (Transactivation domain; TAD) στα καρβοξυτελικά τους άκρα. Οι NF-κB1/p105 και NF-κB2/p100 απαιτούν πρωτεολυτική επεξεργασία για τη δημιουργία των ενεργών μορφών, των p50 και p52, αντίστοιχα, οι οποίες δεσμεύονται στο DNA. Σε φυσιολογικά κύτταρα, απουσία κάποιου ερεθίσματος, οι υπομονάδες του NF-κB διατηρούνται ανενεργές στο κυτταρόπλασμα, δεσμευμένες από ένα μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών IκB (inhibitor of NF-κB) – IκBα, β ή ε^{13,14}. Οι πρόδρομες μορφές NF-κB1/p105 και NF-κB2/p100, που περιέχουν επαναλήψεις αγκυρίνης στο καρβοξυτελικό τους άκρο, όμοιες με εκείνες που παρατηρούνται στις πρωτεΐνες IκB, μπορούν να λειτουργήσουν όμοια με τις πρωτεΐνες IκB, διατηρώντας τα διμερή σύμπλοκα του NF-κB στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου^{13,14}. Οι παράγοντες NF-κB ενεργοποιούνται διαμέσου δύο κύριων πορειών, της κανονικής και της μη-κανονικής πορείας ενεργοποίησης.



Εικόνα 1.2. Σχηματική απεικόνιση των πρωτεϊνών NF-κB, IκB και IKK. Απεικονίζονται τα κύρια δομικά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών που αποτελούν μέλη των οικογενειών NF-κB και IκB, καθώς και των IKK. Η οικογένεια NF-κB αποτελείται από τις μεταγραφικές υπομονάδες (RelA/p65, RelB, c-Rel, p50 και p52), η οικογένεια IκB (IκBα, IκBβ, IκBε, IκBζ, Bcl-3) αποτελεί τους αναστολείς του NF-κB και μαζί με τα πρόδρομα μόρια p100 και p105, και το σηματοδοτικό σύμπλοκο IKK, αποτελείται από τις κινάσες σερίνης/θρεονίνης IKKα και IKKβ, και την προσαρμοστική/ρυθμιστική πρωτεΐνη NEMO/IKKγ. Επίσης, απεικονίζονται οι θέσεις ουβικιτινίωσης (Ub) και φωσφορυλώσης (P) των πρωτεϊνών IκBα και p100 που οδηγούν στην πρωτεολυτική τους επεξεργασία. Δεξιά αναγράφεται ο αριθμός των αμινοξέων (aa) κάθε πρωτεΐνης. RHD, επικράτεια Rel; TAD, επικράτεια ενεργοποίησης της μεταγραφής; NBD, επικράτεια πρόσδεσης NEMO; LZ, φερμουάρ λευκίνης; GRR, περιοχή πλούσια σε γλυκίνη; DD, επικράτεια θανάτου; HLH, δομή έλικα-βρόγχος-έλικα; CC, σπειραμένο σπείραμα; Z, δάκτυλος ψευδαργύρου ¹⁶.

1.1.2. Η κανονική πορεία ενεργοποίησης του NF-κB

Η ενεργοποίηση και μετατόπιση του ετεροδιμερούς NF-κB RelA/p65-p50 από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, προκύπτει ως αποτέλεσμα της αποικοδόμησης του αναστολέα του, IκBa, λόγω της φωσφορυλίωσης της IκBa από την ενεργή κινάση IKKβ του ενεργοποιημένου συμπλόκου IKK, και είναι ευρύτερα γνωστή ως «κανονική» ή «κλασική» πορεία ενεργοποίησης^{1,17} (Εικόνα 1.3). Σε αυτή την πορεία, το σύμπλοκο IKK αποτελείται από τις δύο υπομονάδες τις κινάσες Ser/Thr IKKα και IKKβ και τη ρυθμιστική υπομονάδα IKKγ [επίσης γνωστή και ως NEMO (NF-κB essential modifier)], που απαιτείται για την μεταβίβαση των σημάτων από ανοδικούς υποδοχείς και πρωτεϊνικά μόρια που αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς^{1,17}. Η ενεργοποίηση της κανονικής πορείας λαμβάνει χώρα ως απόκριση σε φλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων α (TNF-α) και οι ιντερλευκίνες-1 (IL-1) και -6 (IL-6), την ενεργοποίηση του υποδοχέα των T-λεμφοκυττάρων (T-cell receptor), αλλά και ως απόκριση σε βακτηριακές μολύνσεις. Το ερέθισμα οδηγεί σε μια σειρά από τροποποιήσεις των συστατικών του συμπλέγματος IKK, συμπεριλαμβανομένης της ουβικιτινίωσης και της φωσφορυλίωσης της IKKγ και της φωσφορυλίωσης δύο καταλοίπων σερίνης στον βρόχο ενεργοποίησης της IKKβ. Η ενεργοποιημένη IKKβ στη συνέχεια φωσφορυλιώνει την IκBa στις σερίνες 32 και 36, γεγονός που καθιστά την IκBa υπόστρωμα του συμπλέγματος λιγάσης ουβικιτίνης Skp1/Cul1/F-box-β-TrCP. Η ουβικιτινωμένη IκBa αποικοδομείται από το πρωτεάσωμα¹. Το ετεροδιμερές NF-κB RelA/p65-p50 που απελευθερώνεται, μετακινείται στη συνέχεια στον πυρήνα¹⁸. Στους περισσότερους τύπους κυττάρων, η ενεργοποίηση της κανονικής πορείας έχει ως αποτέλεσμα τον πυρηνικό εντοπισμό του ετεροδιμερούς μεταγραφικού παράγοντα NF-κB RelA/p65-p50 μέσα σε λίγα λεπτά. Επιπλέον, η πλήρης ενεργοποίηση της κανονικής πορείας μπορεί να περιλαμβάνει έναν αριθμό μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων των υπομονάδων του NF-κB, συμπεριλαμβανομένης της φωσφορυλίωσης και της ακετυλίωσης της RelA/p65^{17,19}.

Η κανονική πορεία του NF-κB μπορεί να τερματιστεί με διάφορους τρόπους. Ένας από τους καλύτερα χαρακτηρισμένους τρόπους περιλαμβάνει την επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου IκBa από τον ενεργοποιημένο RelA/p65³. Η νεοσυντιθέμενη πρωτεΐνη IκBa μπορεί στη συνέχεια να εισέλθει στον πυρήνα, να δεσμεύσει τον NF-κB και να τον οδηγήσει στο κυτταρόπλασμα¹. Όπως η IκBa, έτσι και άλλες δύο IκB των θηλαστικών, η β και η ε, απενεργοποιούνται μέσω ενός παρόμοιου μηχανισμού, δηλαδή μέσω της IKK-επαγόμενης φωσφορυλίωσης και αποικοδόμησης^{1,17}. Η μεταγραφή των IκBβ και IκBe δεν ρυθμίζεται

από τον NF-κB, αλλά από εξωτερικά ερεθίσματα, όμως αυτές οι πρωτεΐνες οδηγούν σε μειωμένη ενεργοποίηση του NF-κB, και επηρεάζουν την μεταφορά του από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, κάτι που παρατηρείται και με την IκBα²⁰.

1.1.3. Η μη-κανονική πορεία ενεργοποίησης του παράγοντα NF-κB

Ερεθίσματα όπως η CD40 και η λεμφοτοξίνη-β, ο παράγοντας ενεργοποίησης των B κυττάρων της οικογένειας TNF, LPS και η λανθάνουσα μεμβρανική πρωτεΐνη 1 (LMP-1) του ιού Epstein-Barr (EBV), μπορούν να ενεργοποιήσουν τη «μη-κανονική» (ή εναλλακτική) πορεία ενεργοποίησης του NF-κB^{1,2} (Εικόνα 1.3). Η μη-κανονική πορεία επάγεται μέσω της ενεργοποίησης της κινάσης που επάγει τον NF-κB (NIK; NF-κB Inducing Kinase), η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί ένα ομοδιμερές IKKα. Το ενεργό ομοδιμερές φωσφορυλιώνει την υπομονάδα p100 (NF-κB2), επάγοντας την πρωτεολυτική της επεξεργασία με αποτέλεσμα το σχηματισμό της ώριμης υπομονάδας p52^{1,2}. Η ενεργοποίηση της μη-κανονικής πορείας οδηγεί συνηθέστερα στην ενεργοποίηση των ετεροδιμερών συμπλόκων p52/RelB, τα οποία μετατοπίζονται στον πυρήνα και δεσμεύονται στις ρυθμιστικές αλληλουχίες κB γονιδίων-στόχων τους ρυθμίζοντας την έκφραση τους.

Ερεθίσματα που επάγουν τόσο την κανονική όσο και τη μη κανονική πορεία ενεργοποίησης οδηγούν στην ενεργοποίηση διαφορετικών υπομονάδων του NF-κB, με αποτέλεσμα τη ρύθμιση διαφορετικών γονιδίων-στόχων.

1.1.4. Οι άτυπες πορείες ενεργοποίησης του παράγοντα NF-κB

Παρόλο που η κανονική και η μη κανονική πορεία ενεργοποίησης συνιστούν τις κύριες οδούς ενεργοποίησης του NF-κB, υπάρχουν και άλλοι λιγότερο συχνά παρατηρούμενοι μηχανισμοί ενεργοποίησης, οι οποίοι συνολικά αναφέρονται ως άτυπες πορείες ενεργοποίησης. Οι μηχανισμοί αυτοί μπορεί να είναι εξαρτώμενοι ή ανεξάρτητοι από την ενεργοποίηση του συμπλόκου IKK (Εικόνα 1.3).

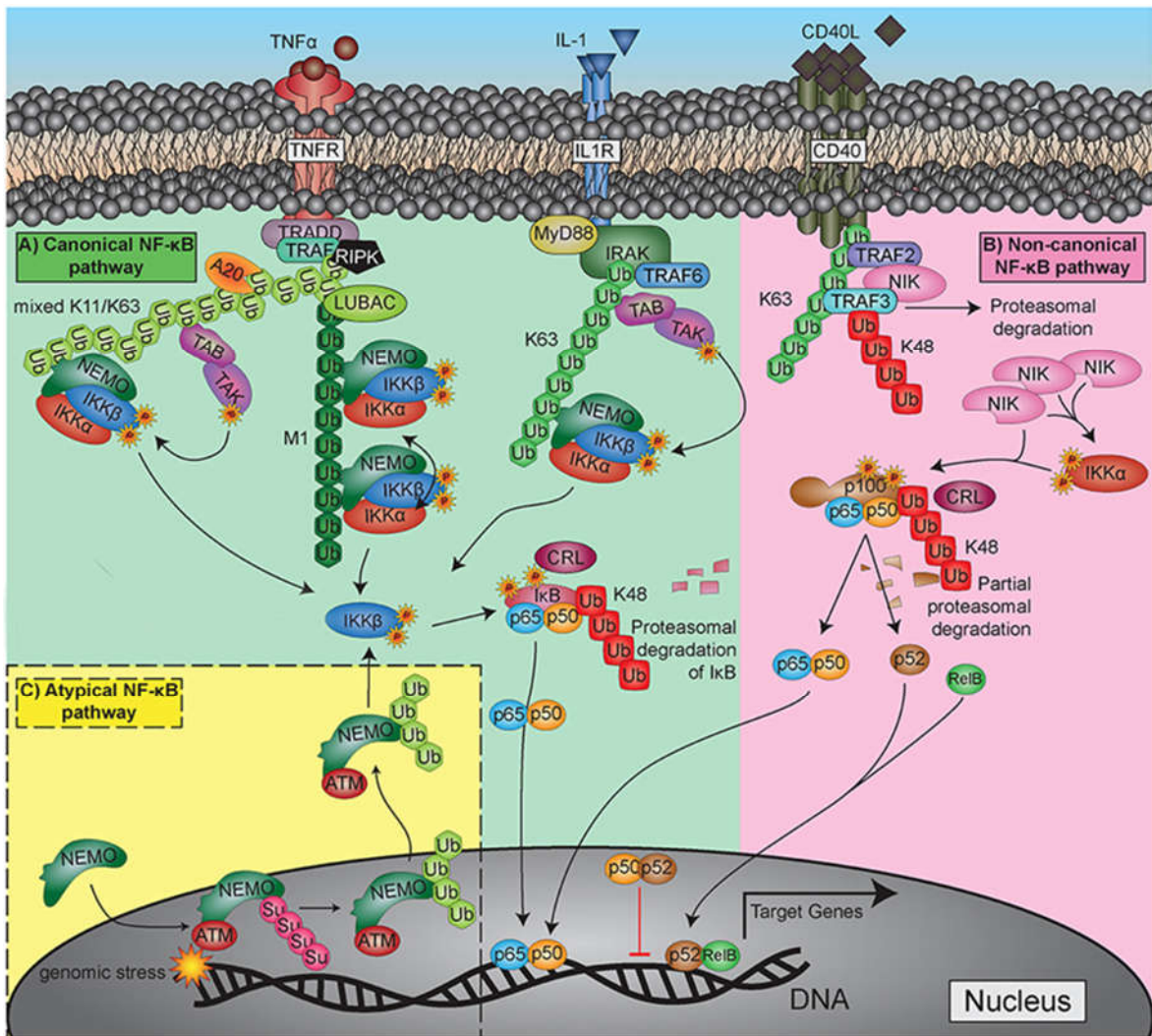
Οι πορείες ενεργοποίησης του NF-κB που είναι ανεξάρτητες από το σύμπλοκο IKK περιλαμβάνουν την εξαρτώμενη από τη κινάση της κασεΐνης 2 (CK2) φωσφορυλίωση και αποικοδόμηση της IκBα, η οποία επάγεται είτε ως απόκριση στην υπεριώδη ακτινοβολία χαμηλού μήκους κύματος (UV-C) είτε όταν εκφράζεται το ογκογονίδιο Her2/Neu^{21,22}. Υπό αυτές τις συνθήκες, η φωσφορυλίωση της IκBα πραγματοποιείται στις καρβοξυτελικές θέσεις, και όχι στις σερίνες 32/36²¹. Στην περίπτωση έκθεσης σε UV-C, η φωσφορυλίωση

της IκBα μέσω της CK2 εξαρτάται επίσης από την πορεία της κινάσης p38 MAP18, ενώ με την ενεργοποίηση του ογκογονιδίου Her2/Neu, η αποικοδόμηση της IκBα είναι το αποτέλεσμα της δραστηριότητας της καλπαΐνης και όχι του πρωτεασώματος²².

Μια άλλη καλά μελετημένη πορεία ενεργοποίησης του NF-κB ανεξάρτητη από τις IKK είναι η φωσφορυλίωση της IκBα στο κατάλοιπο της τυροσίνης 42 (Tyr42). Τα ερεθίσματα που σχετίζονται με αυτήν την πορεία περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, την υποξία και το υπεροξείδιο του υδρογόνου²³⁻²⁶. Η φωσφορυλίωση της Tyr42 οδηγεί σε αποικοδόμηση της IκBα^{25,26}. Ωστόσο, σε άλλες περιπτώσεις, η φωσφορυλιωμένη IκBα^{Tyr42} αποδεσμεύεται από την RelA/p65 χωρίς να προηγηθεί αποικοδόμηση^{23,26}.

Ορισμένοι μηχανισμοί επαγωγής του NF-κB RelA/p65 μπορεί να εξαρτώνται από τις IKK αλλά παρουσιάζουν διακριτές λειτουργικές διαφορές με άλλες οδούς ενεργοποίησης που εξαρτώνται από το σύμπλοκο IKK. Για παράδειγμα, έπειτα από διέγερση με γονοτοξικά ερεθίσματα όπως ή έκθεση σε UV-C και στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα καμπτοθεκίνη και ετοποσίδιο, η επαγωγή του NF-κB RelA/p65 είναι διαφορετική απ' αυτήν που παρατηρείται από τον TNF-α¹. Επιπλέον, το ετοποσίδιο οδηγεί στη σουμοϋλίωση της IKKγ. Η σουμοϋλιωμένη IKKγ εντοπίζεται εκ νέου στον πυρήνα όπου ουβικιτινιώνεται με τρόπο εξαρτώμενο από την κινάση ATM προτού εξαχθεί πίσω στο κυτταρόπλασμα²⁷.

Η ενεργοποίηση της ATM είναι αναγκαία μα όχι και ικανή συνθήκη για την ενεργοποίηση του NF-κB, καθώς αποτελεί ενδιάμεσο γεγονός κατά την ενεργοποίηση. Για την ενεργοποίηση του NF-κB είναι απαραίτητη και η IKKγ. Σε μελέτες που έχουν διενεργηθεί, όταν υπάρχουν μεταλλάξεις στην καρβοξυτελική της περιοχή δακτυλίου ψευδαργύρου ο ρόλος της IKKγ ως ενεργοποιητής του NF-κB στον πυρήνα λόγω γονοτοξικού στρες διαχωρίζεται από τον ρόλο της ως ρυθμιστική υπομονάδα του κανονικού συμπλέγματος IKK στο κυτταρόπλασμα. Σε αυτές υπάγεται και η προαναφερθείσα ανεξάρτητη από την ATM σουμοϋλίωση των καταλοίπων λυσίνης 277 και 309 (K207 και K309), αλλά και η εξαρτώμενη από την ATM φωσφορυλίωση στη σερίνη 85 της IKKγ και μονο-ουβικιτινώσεις στις λυσίνες 277 και 309 (Εικόνα 1.3). Αυτές οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της IKKγ θεωρούνται κρίσιμες για την ενεργοποίηση του NF-κB από παράγοντες που επάγουν δίκλωνες ρήξεις στο DNA, υποδηλώνοντας την παρουσία μιας πορείας ενεργοποίησης του NF-κB, την οποία μοιράζονται διάφοροι παράγοντες που προκαλούν βλάβες στο DNA²⁸.



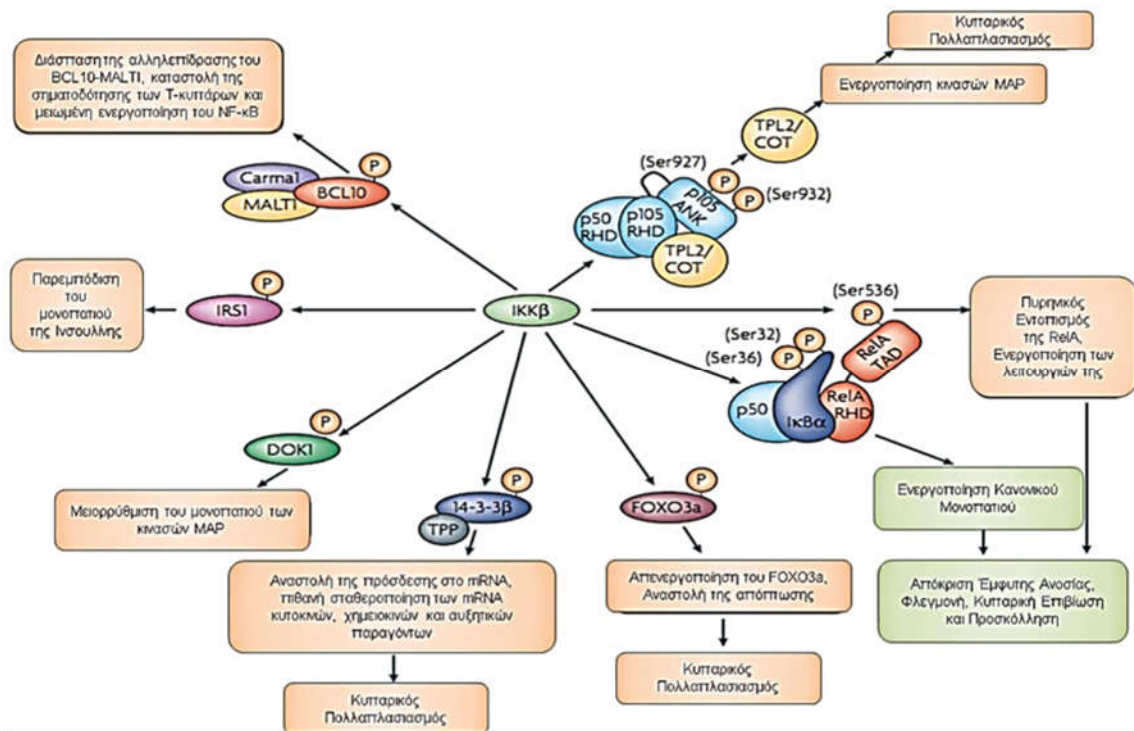
Εικόνα 1.3. Πορείες ενεργοποίησης των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB. (A) Ερεθίσματα όπως ο TNFα και η IL-1, επάγουν τη κανονική πορεία ενεργοποίησης του NF-κB. Η πορεία χαρακτηρίζεται από την ταχεία φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης IκBα, κυρίως από την κινάση IKKβ, η οποία ακολούθως αποικοδομείται από το πρωτεόσωμα 26S με αποτέλεσμα την απελευθέρωση, συνήθεστερα, διμερών p65:p50, τη μετακίνησή τους στον πυρήνα και τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων. (B) Ερεθίσματα όπως ο προσδέτης CD40 ενεργοποιούν τη μη κανονική πορεία ενεργοποίησης, στην οποία κεντρικό ρόλο διαδραματίζει η IKKα, η οποία φωσφορυλιώνεται από την ανοδική κινάση NIK. Η IKKα προάγει την επεξεργασία της υπομονάδας p100 από την οποία προκύπτει η ώριμη υπομονάδα p52. Τα σύμπλοκα RelB-p52 εισέρχονται στον πυρήνα όπου ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων. (C) Η IKK εξαρτώμενη πορεία ενεργοποίησης μπορεί να επαχθεί και από την επίδραση γονοτοξικού στρες. Κύριο ρόλο διαδραματίζει η υπομονάδα NEMO, η οποία εισέρχεται στον πυρήνα όπου σουμοϋλιώνεται και ακολούθως ουβικιτινώνεται με έναν ATM εξαρτώμενο τρόπο. Η NEMO εξέρχεται από τον πυρήνα σε σύμπλοκο με την ATM όπου και πραγματοποιείται η ενεργοποίηση της IKKβ. Ub; ουβικιτινίωση, P; φωσφορυλίωση, Su; σουμοϋλίωση, TAD; K; λυσίνη, M; μεθειονίνη²⁹.

1.1.5. Δράσεις των IKK ανεξάρτητες από τον NF-κB

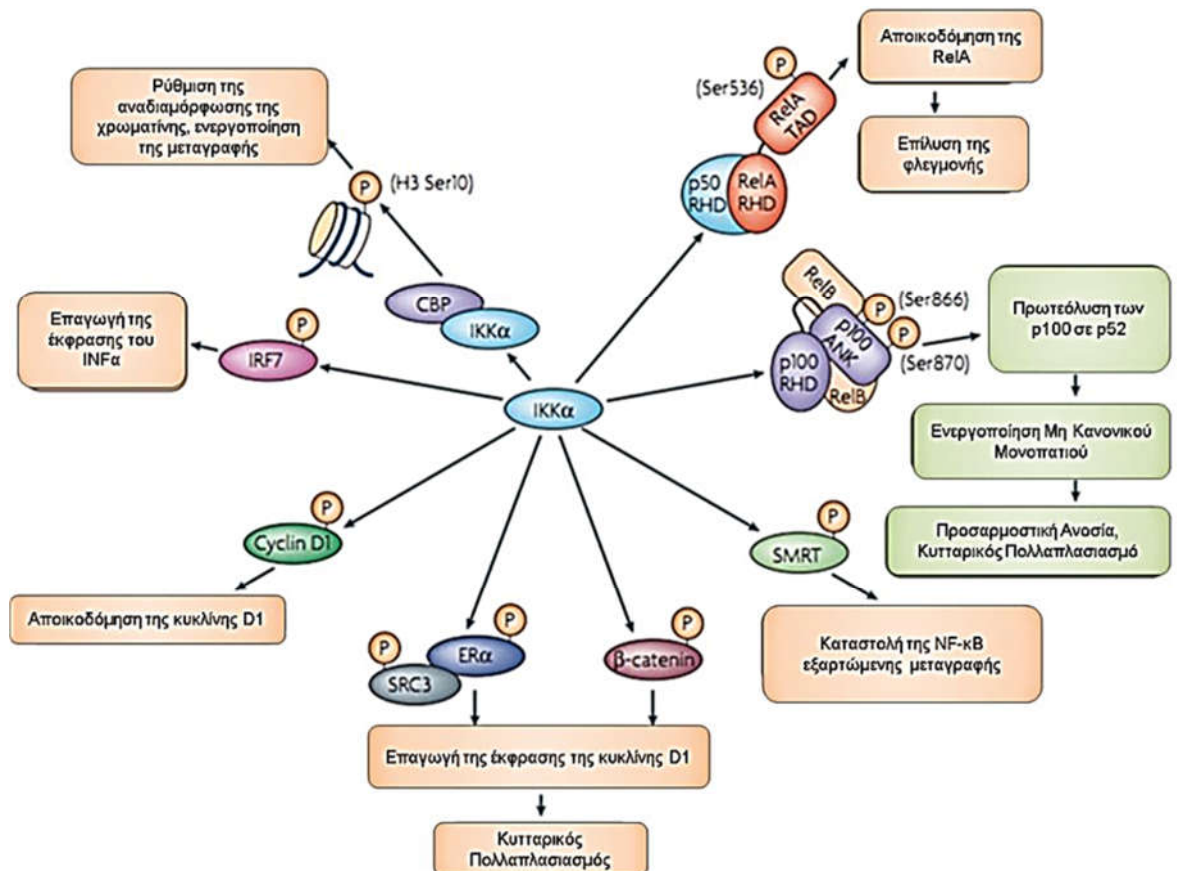
Έχουν περιγραφεί λειτουργίες των IKK ανεξάρτητες από τις σηματοδοτικές πορείες ενεργοποίησης του NF-κB (Εικόνες 1.4 και 1.5). Σε αυτές περιλαμβάνονται η φωσφορυλίωση της ιστόνης H3 από την IKKα, η φωσφορυλίωση του συν-καταστολέα της SMRT³⁰ καθώς και του υποδοχέα οιστρογόνου α και του συν-ενεργοποιητή του SRC-3/AIB1³¹.

Η IKKβ προάγει τη φωσφορυλίωση της 14-3-3β⁷ και της Dok1³² αλλά και του μεταγραφικού παράγοντα FOXO3a της οικογενείας Forkhead³³. Στην τελευταία περίπτωση, η φωσφορυλίωση του FOXO3a με τη μεσολάβηση της IKK λειτουργεί ανασταλτικά, με αποτέλεσμα τη μεταφορά του στο κυτταρόπλασμα και την αποικοδόμησή του, η οποία ενισχύει την εξαρτώμενη από την IKK επαγωγή του πολλαπλασιασμού και την ογκογένεση. Ομοίως, μια μεταλλαγμένη πρωτεΐνη Dok1 που δεν μπορεί να φωσφορυλιωθεί από την IKK δεν είναι σε θέση να αναστείλει την επαγόμενη από το PDGF ανάπτυξη των κυττάρων³². Επομένως, τέτοιου είδους σηματοδοτικές διεπαφές των IKK θα διαμορφώσουν τη φύση του κυτταρικού περιεχομένου, μέσα στο οποίο θα λειτουργήσουν οι υπομονάδες του NF-κB, επηρεάζοντας έτσι την λειτουργία τους και τις συνέπειες που θα έχει η ενεργοποίηση του NF-κB στο κύτταρο. Επιπροσθέτως, αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι οι φαινότυποι των knockout IKK μυών δεν αντανακλούν αποκλειστικά και μόνο τις επιδράσεις των IKK στον NF-κB, αλλά συνολικά τις επιδράσεις τους στο κυτταρικό περιβάλλον³⁴.

Ακόμη, έχουν αναφερθεί επιδράσεις της IKKα που είναι ανεξάρτητες τόσο από τον NF-κB όσο και από την καταλυτική της δράση (Εικόνα 1.5). Σε αυτές περιλαμβάνονται η ρύθμιση της διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων³⁵ και η ανάπτυξη των δοντιών³⁶. Η IKKγ μπορεί επίσης και να ρυθμίσει τον επαγόμενο από την υποξία παράγοντα 2a (HIF-2a), ανεξάρτητα από τις καταλυτικές υπομονάδες IKK³⁷.



Εικόνα 1.4. Λειτουργίες της IKKβ. Η IKKβ εμπλέκεται στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού, αντιαποπτωτικών και προφλεγμονωδών αποκρίσεων και στην αυτοφαγία μέσω της αλληλεπίδρασης με ποικίλα μόρια που δεν σχετίζονται με το μονοπάτι του NF-κΒ³⁸.



Εικόνα 1.5. Λειτουργίες της IKKα. Η IKKα φωσφορυλιώνει άμεσα ποικίλα άλλα μόρια και εμπλέκεται στη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων, τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και σε πολλές άλλες διεργασίες που δεν σχετίζονται με το μονοπάτι του NF-κΒ³⁸.

1.2. Τα microRNA

Τα microRNA (miRNA) παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά στο νηματώδη σκώληκα *Caenorhabditis elegans*³⁹ και αποτελούν το πιο άφθονο μόριο RNA μικρού μεγέθους⁴⁰. Έχουν πλέον ανιχνευθεί σε όλα σχεδόν τα ζωικά μοντέλα και ο αριθμός τους συσχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με την πολυπλοκότητα του οργανισμού⁴¹. Οι άνθρωποι έχουν περίπου 2000 καταγεγραμμένα γονίδια miRNA και ο συνολικός αριθμός των καταγεγραμμένων γενετικών τόπων miRNA είναι 24.521 τόποι σε 206 είδη⁴². Το ανθρώπινο γονιδίωμα αποτελείται από μεγάλο αριθμό γονιδίων miRNA που αντιπροσωπεύουν το 1-5% του συνόλου των ανθρώπινων γονιδίων⁴³, ενώ τα miRNA των θηλαστικών είναι γνωστό ότι ρυθμίζουν περίπου το 30% όλων των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες⁴⁴. Καθώς πολλά miRNA στοχεύουν το ίδιο mRNA, δεν υπάρχει κάποια γραμμική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης miRNA και mRNA⁴⁵.

Τα miRNA είναι μικρά, μη-κωδικά, μονόκλιωνα μόρια RNA, με μέγεθος μεταξύ 21-23 νουκλεοτιδίων. Τα miRNA έχουν μια ουριδίνη στο 5'-άκρο τους και είναι μερικώς συμπληρωματικά με την 3'-αμετάφραστη περιοχή του αγγελιοφόρου RNA (mRNA). Τα miRNA επιστρατεύουν το πρωτεϊνικό σύμπλοκο Argonaute (AGO) για να έρθουν σε επαφή με το συμπληρωματικό mRNA-στόχο, το οποίο και οδηγεί σε μεταφραστική αναστολή ή σε αποικοδόμηση ή σε από-αδενυλίωση του mRNA⁴⁶.

1.2.1. Βιογένεση και ωρίμανση των microRNA

Η βιογένεση των miRNA στον άνθρωπο ακολουθεί μια διαδικασία δύο σταδίων που περιλαμβάνει μια πυρηνική και μια κυτταροπλασματική διάσπαση (Εικόνα 1.6). Εντός του πυρήνα τα miRNA μεταγράφονται ως ένα μακρύ πρώιμο μετάγραφο που ονομάζεται pri-miRNA (primary miRNA), επαγόμενα είτε από τους δικούς τους υποκινητές είτε μέσω των υποκινητών των γονιδίων ξενιστών τους⁴⁷. Η πλειονότητα των miRNA μεταγράφεται από την RNA pol II⁴⁸⁻⁵⁰.

Η πυρηνική διάσπαση του pri-miRNA, πραγματοποιείται από την ενδοουκλεάση Drosha που ανήκει στην οικογένεια της RNase III. Η ενδοουκλεάση Drosha διαχωρίζει τους δύο κλώνους της φουρκέτας σε θέσεις κοντά στη βάση του πρωτευούσης φουρκέτας απελευθερώνοντας ~60-70 νουκλεοτίδια ενδιάμεσης φουρκέτας, που ονομάζεται πρόδρομο miRNA (precursor miRNA), ή εν συντομία pre-miRNA (Εικόνα 1.6). Η διάσπαση μεσολαβείται από την ενδοουκλεάση Drosha και την πρωτεΐνη που δεσμεύεται σε δίκλωνο

RNA, DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8) ⁴⁷. Το pre-miRNA έχει δομή φουρκέτας με εξέχοντα 2 νουκλεοτίδια στο 3'-άκρο και μια φωσφορική ομάδα στο 5'-άκρο ⁵¹. Το pre-miRNA μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα μέσω της αλληλεπίδρασης με την εξπορτίνη 5 και το σύμπλοκο Ran-GTP ⁵².

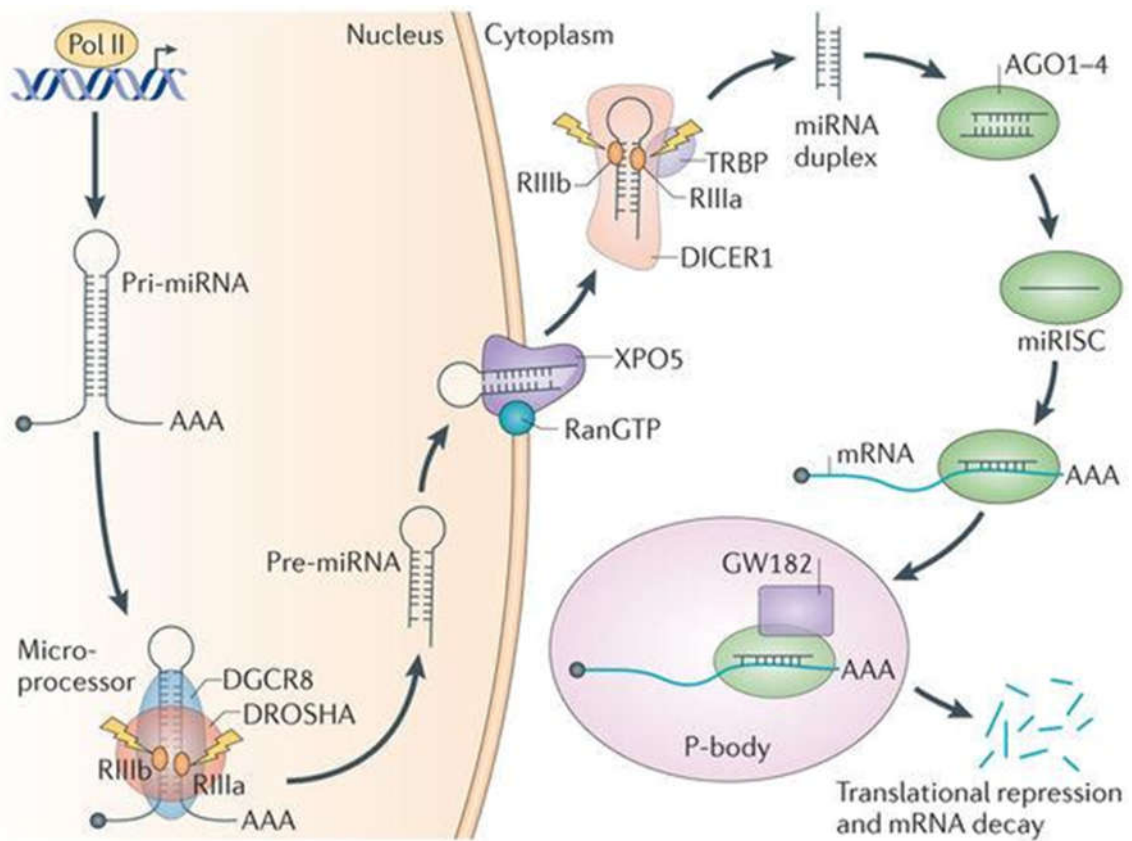
Η περαιτέρω ωρίμανση του pre-miRNA στο κυτταρόπλασμα πραγματοποιείται από την ενδονουκλεάση Dicer της οικογενείας της RNάσης III. Η Dicer χαρακτηρίζεται από την παρουσία ελικάσης, μιας περιοχής PAZ, μια περιοχή δέσμευσης δίκλωνου RNA και μια περιοχή RNAIII. Η περιοχή PAZ αναγνωρίζει την προεξοχή στο 3'-άκρο ⁵³. Η περιοχή της ελικάσης αναγνωρίζει την περιοχή του βρόχου και η περιοχή της RNAIII διασπά και τους δύο κλώνους, με την όλη διαδικασία να συμβαίνει μόνο όταν το σύμπλεγμα miRNA εισάγεται στη Dicer ^{53,54}.

Η Dicer αναγνωρίζει τη φωσφορική ομάδα στο 5'-άκρο και την προεξοχή στο 3'-άκρο περίπου στις δύο ελικοειδείς στροφές μακριά από τη βάση, και κόβει το δίκλωνο στέλεχος (Εικόνα 1.6). Η διάσπαση απομακρύνει τη δομή του βρόχου και το δίκλωνο στέλεχος είναι γνωστό ως σύμπλοκο miRNA:miRNA*. Το miRNA είναι το ώριμο miRNA ενώ το miRNA* είναι η συμπληρωματική αλυσίδα του miRNA η οποία είναι βραχύβια και θα διασπαστεί σε σύντομο χρονικό διάστημα ^{55,56}. Αντίθετα, το ώριμο miRNA προστατεύεται από την υποοικογένεια πρωτεϊνών Argonaute (AGO). Η πρωτεΐνη Argonaute, ένα καταλυτικό δομικό συστατικό του RISC συμβάλει στη δέσμευση του miRNA και στην απελευθέρωση της Dicer. Σε μερικές περιπτώσεις, όπως στα κύτταρα των θηλαστικών, η Ago2, μια πρωτεΐνη της οικογενείας Argonaute έχει δραστηριότητα ενδονουκλεάσης και αποκόπτει το 3'-άκρο από το miRNA προτού αυτό δεχθεί επεξεργασία από την Dicer, γεγονός το οποίο μπορεί να βοηθήσει στον καθορισμό του ώριμου κλώνου miRNA ^{57,58}. Η δομή των miRNA είναι πιθανόν πως καθορίζει την εξειδίκευση της Ago2 ^{58,59}. Υπάρχουν τρεις κατηγορίες στην οικογένεια Argonaute, (1) η Ago, που λειτουργεί σε μονοπάτια miRNA και siRNA, (2) η piwi, η οποία ρυθμίζει τα piRNA, και (3) κάποιες υπο-οικογένειες ειδικές για σκώληκες ⁶⁰.

Τόσο στα φυτά όσο και στα ζώα, τα miRNA αλληλεπιδρούν με άλλες πρωτεΐνες για το σχηματισμό του συμπλόκου επαγόμενης αποσιώπησης του RNA (RNA-induced silencing complex, RISC), το οποίο καθοδηγεί τα miRNA στα mRNA στόχους και συμβάλει στη γονιδιακή αποσιώπηση ⁵⁷.

Το miRNA είτε αποκόπτει το mRNA-στόχο, αν αυτό έχει την απαραίτητη συμπληρωματικότητα με το miRNA, είτε καταστέλλει τη διαδικασία της μετάφρασης του mRNA ⁶¹. Η αναγνώριση του mRNA-στόχου από το miRNA γίνεται από μια συντηρημένη

περιοχή του miRNA, όπως στην περίπτωση των miRNAs στα ασπόνδυλα, όπου 2-8 κατάλοιπα είναι πλήρως συμπληρωματικά με τα μοτίβα στις 3'-αμετάφραστες περιοχές (3'-UTRs) και με αυτή τη συμπληρωματικότητα φαίνεται πως διαμεσολαβείται η μετά-μεταφραστική αποσιώπηση ⁶² (Εικόνα 1.6).



Nature Reviews | Cancer

Εικόνα 1.6. Η διαδικασία σύνθεσης, ωρίμανσης και δράσης των microRNA. Τα γονίδια των miRNA μεταγράφονται ως πρώιμα miRNA (pri-miRNAs) από την RNA πολυμεράση II (Pol II) στον πυρήνα. Τα μακριά pri-miRNAs κόβονται από τον Μικροεπεξεργαστή, ο οποίος περιλαμβάνει την Drosha και την DGCR8, και οδηγεί στην παραγωγή των πρόδρομων miRNA (pre-miRNA) τα οποία έχουν μέγεθος 60-70 νουκλεοτίδια. Έπειτα τα pre-miRNA εξέρχονται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα με την εξπορτίνη 5 και δέχονται περαιτέρω επεξεργασία από την Dicer1, μια ριβονουκλεάση III που παράγει τα ώριμα miRNA. Η μία αλυσίδα του ώριμου miRNA (η αλυσίδα οδηγός) στο σύμπλοκο miRISC (σύμπλοκο σίγασης που προκαλείται από miRNA), το οποίο περιέχει πρωτεΐνες Dicer1 και Argonaute (AGO), κατευθύνει το miRISC στα mRNA στόχους, μέσω δέσμωσης συμπληρωματικής αλληλουχίας, και μεσολαβεί στη γονιδιακή καταστολή μέσω της αποικοδόμησης των mRNA στόχων και της μεταφραστικής καταστολής στα P-bodies ⁶³.

1.3. Ο Καρκίνος του πνεύμονα

Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί την πρώτη αιτία των θανάτων που σχετίζονται με καρκίνο σε όλο τον κόσμο, με τα νέα περιστατικά να ξεπερνούν τις 200.000 το χρόνο⁶⁴. Ο καρκίνος του πνεύμονα χωρίζεται σε δύο ιστολογικές ομάδες: το μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC) (~85% των περιπτώσεων) και το μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (~15% των περιπτώσεων). Ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα χωρίζεται σε επιπλέον υπο-τύπους, με συχνότερο το αδενοκαρκίνωμα (LUAD) (~70% των περιπτώσεων), τον καρκίνο του πλακώδους επιθηλίου (LUSC) (~15-20% των περιπτώσεων) και το μεγαλοκυτταρικό καρκίνο (~10-15% των περιπτώσεων), που όλα μαζί αποτελούν περίπου το 85% όλων των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα, ενώ παράλληλα ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα είναι ελάχιστα πιο κοινός, με σχεδόν όλες τις γνωστές περιπτώσεις να οφείλονται στο κάπνισμα.

Δυνητικά, πολλοί παράγοντες συμβάλλουν στο σχηματισμό και την εκδήλωση καρκίνου του πνεύμονα, όπως παραδείγματος χάριν, το κάπνισμα, η ιονίζουσα ακτινοβολία και η ιικές μολύνσεις, παρ' όλα αυτά, οι μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην καρκινογένεση στον πνεύμονα παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άγνωστοι. Επιπλέον, η έλλειψη εργαλείων άμεσης διαγνωστικής, έχει ως αποτέλεσμα περισσότερο από το 60% των ασθενών να διαγιγνώσκονται όταν η ασθένεια είναι σε προχωρημένο ή μεταστατικό στάδιο^{65,66}, και κατά συνέπεια δεν είναι δυνατή η εγχείρηση ως θεραπευτική επιλογή.

Το συνολικό ποσοστό επιβίωσης έπειτα από πέντε έτη για ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα είναι μικρότερο από 15% και έχει παραμείνει σε μεγάλο βαθμό अपαράλλαχτο τις τελευταίες τρεις δεκαετίες. Παρόλα τα νέα φάρμακα και τις συνδυαστικές θεραπευτικές αγωγές, η χειρουργική εκτομή παραμένει η πιο πολλά υποσχόμενη μέθοδος αντιμετώπισης, κυρίως για το ~25% των ασθενών που ανακαλύπτουν πως πάσχουν σε πρώιμα στάδια της νόσου (στάδια I-IIIΑ), παρόλο που το 65% αυτών θα επανεμφανίσουν τη νόσο μέσα σε δύο έτη⁶⁷. Τα δεδομένα αυτά επισημαίνουν πόσο σημαντικές είναι οι στρατηγικές για έγκαιρη ανίχνευση του καρκίνου του πνεύμονα, στοχεύουν στο να εντοπίσουν τον όγκο σε στάδιο στο οποίο είναι ακόμα μικρός και περιορισμένος σε συγκεκριμένο σημείο, ενώ είναι άμεσα απαραίτητες για να αυξηθούν και οι πιθανότητες θεραπείας⁶⁵.

Ένα ακόμη μεγάλο πρόβλημα που συνδέεται με την ασθένεια αυτή, καθώς και με άλλους τύπους καρκίνου, είναι η ανάγκη να βρεθούν νέες και πιο εξειδικευμένες χημειοθεραπείες.

1.3.1. Γενετικές και επιγενετικές μεταβολές στον καρκίνο του πνεύμονα

Διάφοροι παράγοντες συντελούν στην ανάπτυξη του καρκίνου του πνεύμονα: το κάπνισμα, η ιονίζουσα ακτινοβολία και οι ικές μολύνσεις είναι κάποιες από τις πιο γνωστές και πιο μελετημένες. Ωστόσο, οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην καρκινογένεση στους πνεύμονες παραμένουν υπό συνεχή μελέτη ⁶⁸.

Όπως και στις περισσότερες άλλες μορφές καρκίνων, όπου εμπλέκεται μια πληθώρα διαφορετικών γονιδίων, έτσι συμβαίνει και στον καρκίνο του πνεύμονα ⁶⁸, όπου η καρκινογένεση ξεκινά από την ενεργοποίηση ογκογονιδίων ή και από την καταστολή ογκοκατασταλτικών γονιδίων.

Το πρωτο-ογκογονίδιο *KRAS* παρατηρείται συχνά μεταλλαγμένο καθώς μεταλλάξεις του παρατηρούνται στο 10-30% των αδενοκαρκινωμάτων του πνεύμονα ^{69,70}. Ταυτόχρονα, τα γονίδια *MYC* και *CCND1* ⁷¹ εντοπίζονται ενεργά στο 2,5-10% και 5%, αντίστοιχα, των περιπτώσεων του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα. Τα γονίδια *ERBB2* (επίσης γνωστό και ως *HER-2/neu*) και *BCL2* υπερεκφράζονται στο 25% των περιπτώσεων ⁷². Επιπλέον, πολλές μελέτες έχουν δείξει πως σε μια μικρή υποκατηγορία ασθενών εμφανίζονται μεταλλάξεις στο γονίδιο *ERBB2* (στα εξόνια 19-20). Οι μεταλλάξεις αυτές συνήθως αφορούν πρώιμα γεγονότα στη διαδικασία της καρκινογένεσης του αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα σε μη-καπνιστές ασθενείς ^{73,74}. Νέες μεταλλάξεις στο γονίδιο *BRAF* ταυτοποιήθηκαν μέσω συστηματικής επαναλληλούχισης των ογκογονιδίων και είναι παρούσες στο ~2% των πασχόντων με αδενοκαρκίνωμα αλλά η έκφρασή τους περιορίζεται σε όγκους οι οποίοι δεν εμφανίζουν μεταλλάξεις του γονιδίου *KRAS* ⁷⁵.

Ο επιδερμικός υποδοχέας του αυξητικού παράγοντα (EGFR), ο οποίος ρυθμίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, την αγγειογένεση και τη μετάσταση ⁶⁹, υπερεκφράζεται ή σε ορισμένες περιπτώσεις επηρεάζεται από ογκογόνες μεταλλάξεις που εμφανίζονται στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και αποτελεί έναν από τους βασικότερους στόχους θεραπείας του καρκίνου του πνεύμονα. Επιπροσθέτως, κάποιες μεταλλάξεις του EGFR, κυρίως απαλοιφές στο εξόνιο 19 ή μια σημειακή μετάλλαξη στο εξόνιο 21, η L858R, συσχετίζονται με ενισχυμένη απόκριση και επιβίωση έπειτα από θεραπείες με αναστολείς κινασών τυροσίνης, ενώ η σημειακή μετάλλαξη T790M ή ενθέσεις στο εξόνιο 20 του EGFR, συσχετίζονται με αποτυχία ενεργοποίησης του υποδοχέα και απόκριση των ασθενών στη θεραπεία ⁷⁶⁻⁷⁸. Μεταλλαγές οι οποίες πραγματοποιούνται στα γονίδια *EGFR*, *ERBB2* και *KRAS* είναι αμοιβαία αποκλειόμενες και θεωρείται πως

αντιπροσωπεύουν πρώιμα γεγονότα στην καρκινογένεση του αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα σε καπνιστές (*KRAS*) και μη (*EGFR* και *ERBB2*)⁷⁹.

Άλλα ογκογονίδια, των οποίων η έκφραση έχει βρεθεί πως επηρεάζεται στον καρκίνο του πνεύμονα, είναι τα *MET*, *NKX2-1* και *PIK3CA*⁶⁹. Η πρωτεΐνη SRC, που είναι μια κινάση τυροσίνης, επίσης ενεργοποιείται και υπερεκφράζεται σε καρκίνους του επιθηλίου, ενώ τα επίπεδα της έκφρασης και της ενεργοποίησης συσχετίζονται γενικά με την πρόοδο της ασθένειας⁸⁰, αν και τέτοιου είδους ενεργοποιητικές μεταλλάξεις είναι σπάνιες⁸¹. Μελέτες έχουν δείξει πως η SRC ενεργοποιείται σε ιστούς από όγκους μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα^{82,83}, και η αναστολή της οδηγεί σε μειωμένη κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμό και σε παύση του κυτταρικού κύκλου και τελικά σε απόπτωση⁸⁴.

Πρόσφατα, η σύντηξη των πρωτεϊνών ALK (anaplastic lymphoma kinase) και EML4 (echinoderm microtubule-associated protein-like 4) έχει ανιχνευθεί σε μια υποκατηγορία του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα. Κατά προσέγγιση, το 5% όλων των περιπτώσεων NSCLC περιέχουν μια μετατόπιση *EML4-ALK*. Αυτό συμβαίνει σε αμοιβαίο αποκλεισμό με τις μεταλλάξεις *EGFR* και *KRAS* και συσχετίζεται με μη-καπνιστές. Από τη στιγμή που η δράση της τυροσινικής κινάσης ALK είναι ογκογόνος, τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*, εξετάζονται σε προκλινικές δοκιμές νέοι αναστολείς της κινάσης ALK για την καταπολέμηση του καρκίνου του πνεύμονα^{85,86}.

Επίσης, η απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων παίζει έναν πολύ σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση του πνεύμονα, όπως για παράδειγμα το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *TP53*, το οποίο μεταλλάσσεται σε ένα μεγάλο ποσοστό των καρκίνων του πνεύμονα συμπεριλαμβανομένων τόσο του μη μικροκυτταρικού όσο και του μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα. Ακόμη ένα σημαντικό ογκοκατασταλτικό γονίδιο είναι το *LKB1*, του οποίου η απώλεια λειτουργίας μέσω μεταλλαγής είτε αποκοπής τμήματος του χρωμοσώματος στο οποίο εντοπίζεται παρατηρείται στο 30% των αδενοκαρκινωμάτων του πνεύμονα και στο 20% των καρκίνων του πλακώδους επιθηλίου⁸⁷.

Επιπροσθέτως, οι επιγενετικές τροποποιήσεις είναι πλέον γνωστό πως συμβάλλουν στην καρκινογένεση του πνεύμονα. Παραδείγματος χάριν, ένας μεγάλος αριθμός μη φυσιολογικά μεθυλιωμένων γονιδίων έχουν εντοπιστεί στον καρκίνο του πνεύμονα. Ένα καλά μελετημένο παράδειγμα είναι η μη φυσιολογική μεθυλίωση του υποκινητή του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *CDKN2A*, γεγονός που οδηγεί σε αποσιώπηση του γονιδίου, κάτι που λαμβάνει χώρα στα πρώιμα στάδια της καρκινογένεσης^{88,89}. Άλλα παραδείγματα αποτελούν τα γονίδια της Η-καντερίνης⁹⁰, της DAPK1 (death-associated protein kinase 1), της πρωτεΐνη 14-3-3σ και το γονίδιο *RASSF1A*⁹¹.

Παρόλο που η επιστημονική μελέτη που βασίζεται σε ήδη γνωστά γονίδια, πρωτεΐνες και επιγενετικές τροποποιήσεις έχει ήδη δώσει νέες πληροφορίες όσον αφορά τη νόσο, μέσα στις δύο προηγούμενες δεκαετίες ο τομέας έρευνας των miRNA έχει μελετηθεί πιο διεξοδικά και μπορεί να προσφέρει μια βαθύτερη κατανόηση της βιολογίας του καρκίνου του πνεύμονα, όπως και σε γενικότερο πλαίσιο του καρκίνου. Όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω τα miRNA είναι μικρά, μη-κωδικά RNA με μέγεθος περίπου 22 νουκλεοτίδια που παίζουν ρόλους-κλειδιά στην γονιδιακή ρύθμιση μέσω της μεταφραστικής ρύθμισης και αποικοδόμησης των mRNA-στόχων^{39,92,61}.

Αναλύσεις μικροσυστοιχιών miRNA για τον καρκίνο του πνεύμονα που πραγματοποιήθηκαν τα τελευταία έτη για να διερευνηθεί ο ρόλος των miRNA στην καρκινογένεση του πνεύμονα, έδειξαν πως τα miRNA μπορεί να εκφράζονται διαφορετικά στους καρκινικούς και υγιείς ιστούς των πνευμόνων, οδηγώντας έτσι στην υπόθεση πως τα προφίλ έκφρασης των miRNA μπορούν να λειτουργήσουν ως διαγνωστικοί και προγνωστικοί δείκτες του καρκίνου του πνεύμονα⁹³. Παραδείγματα miRNA τα οποία εμπλέκονται στον καρκίνο του πνεύμονα αποτελούν τα μέλη της οικογένειας του miR-29, τα οποία στοχεύουν τις δύο DNA μεθυλοτρανσφεράσες DNMT3A και -3B. Πιο συγκεκριμένα, έχει δειχθεί πως η έκφραση μελών της οικογένειας του miR-29 συσχετίζεται αντίστροφα με την έκφραση των DNMT3A και -3B στους καρκίνους των πνευμόνων και πως αυτά τα miRNA μειορρυθμίζουν τα επίπεδα έκφρασης και των δύο ενζύμων. Επιπροσθέτως, αυξημένη έκφραση αυτών των miRNA σε καρκινικά κύτταρα πνεύμονα οδηγεί σε μειωμένη μεθυλίωση του DNA, αποκαθιστά την έκφραση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων και αναστέλλει την καρκινογένεση τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*⁹⁴.

Μια ακόμη σημαντική μελέτη έδειξε πως το miR-107 και το miR-185 μειορρυθμίζονται στον καρκίνο του πνεύμονα, σε σύγκριση με φυσιολογικά κύτταρα πνεύμονα και πως η υπερέκφραση αυτών των miR σε κυτταρικές σειρές μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα είναι ικανή να καταστείλει την κυτταρική αύξηση⁹⁵. Παρομοίως, τα miR-15a και miR-16, τα οποία προκαλούν την παύση του κυτταρικού κύκλου που διαμεσολαβείται από την πρωτεΐνη RB1, μέσω της μειορρυθμίστη των κυκλινών της φάσης G1, μειορρυθμίζονται στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα⁹⁶.

1.3.2. Ο παράγοντας NF-κB στον καρκίνο

Ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχει καταδείξει το σημαντικό ρόλο του παράγοντα NF-κB στην ανάπτυξη και την πρόοδο του καρκίνου, όπως επίσης και τις δυνατότητές του ως θεραπευτικό στόχο. Είναι καλά τεκμηριωμένο το γεγονός πως ο NF-κB ενεργοποιείται από μια ευρεία γκάμα ιών, βακτηριακών ενδοτοξινών, καρκινογόνων αλλά και χημειοθεραπευτικών ουσιών, κυτοκινών αλλά και από τη ραδιενέργεια⁹⁷, επιβεβαιώνοντας έτσι το ρόλο του NF-κB στη διατήρηση της κυτταρικής ακεραιότητας καθώς και στους μηχανισμούς άμυνας του κυττάρου⁹⁸. Λόγω των πολυεπίπεδων και πολυδιάστατων ρόλων του, αλλά και των εκ διαμέτρου αντίθετων λειτουργιών του NF-κB στον καρκίνο, η αναστολή του έχει χαρακτηριστεί ως «δίκικοπο μαχαίρι»⁹⁹. Αν και παίζει κρίσιμο ρόλο για την έναρξη της ανοσοαπόκρισης απέναντι στον καρκίνο, ταυτόχρονα, οργανώνει τη φλεγμονώδη απόκριση και συνδέει την χρόνια φλεγμονή με την καρκινογένεση¹⁰⁰. Ο ενεργοποιημένος NF-κB μπορεί να επηρεάσει την πρόοδο ενός όγκου είτε θετικά είτε αρνητικά όπως έχει αναφερθεί παραπάνω.

1.3.2.1. Ο ρόλος του NF-κB στον NSCLC

Η ενεργοποίηση του παράγοντα NF-κB στα επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα έχει συσχετιστεί με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω της αυξορρύθμισης της κυκλίνης D1 (CcnD1) και της καταστολής της PTEN (phosphatase and tensin homolog)¹⁰¹. Επιπλέον, η ενεργοποίηση του NF-κB και η επακόλουθη αυξορρύθμιση της κυκλίνης D1 σε φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα των βρόγχων λόγω της NNK (nicotine-derived nitrosamine ketone), μιας νιτροζαμίνης που εντοπίζεται αποκλειστικά στον καπνό του τσιγάρου, μπορεί να διεγείρει τον πολλαπλασιασμό¹⁰². Έχει επίσης δειχθεί πως το miR-505, το οποίο μειορρυθμίζεται στο NSCLC, μπορεί να αναστείλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την μετάσταση, τη διείσδυση και την EMT στο NSCLC, έχοντας ως στόχο του τη σηματοδοτική πορεία AKT (RAC-alpha serine/threonine-protein kinase)-NF-κB¹⁰³. Επιπροσθέτως, έχει δειχθεί πως η galectin-3, ένας προσδέτης του TLR4 (toll-like receptor 4), ενεργοποιεί τη σηματοδότηση του TLR4, οδηγώντας στη μετατόπιση της υπομονάδας p65 του NF-κB στον πυρήνα και στον περαιτέρω πολλαπλασιασμό και τη μετάσταση του πνευμονικού αδενοκαρκινώματος μέσω της επαγόμενης έκφρασης του lncRNA-NEAT1 (nuclear enriched abundant transcript 1)¹⁰⁴.

Είναι γνωστό πως ο NF-κB προάγει την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων ρυθμίζοντας την πορεία προς την απόπτωση, οδηγώντας σε ενεργοποίηση αντι-αποπτωτικών γονιδίων. Όπως αναφέρθηκε, ο NF-κB τροποποιεί την PTEN, γεγονός που οδηγεί σε μειορρύθμιση της σηματοδοτικής πορείας PI3K/AKT, και μέσω αυτού και την κυτταρική επιβίωση ¹⁰⁵. Επιπρόσθετα, η ενεργοποίηση του NF-κB οδηγεί σε μεταγραφή του μεταγραφικού παράγοντα παράγοντα Snail, ο οποίος λειτουργεί σαν μεταγραφικός καταστολέας της PTEN ¹⁰⁶. Η αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2, η υπερέκφραση της οποίας έχει συσχετιστεί με το κάπνισμα και τη χρόνια φλεγμονή, αποτελεί επίσης στόχο του ενεργού NF-κB ¹⁰¹.

Η αγγειογένεση αποτελεί ένα κρίσιμο βήμα για την ανάπτυξη του όγκου, καθώς παρέχει στα καρκινικά κύτταρα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά και οξυγόνο ^{107,108}. Ο παράγοντας NF-κB έχει σημαντικό ρόλο και στην αγγειογένεση στον καρκίνο εφόσον λειτουργεί ρυθμιστικά για τη μεταγραφή παραγόντων που προάγουν την αγγειογένεση, όπως είναι ο VEGF και η IL8. Σε συν-καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων πνεύμονα που εξέφραζαν IL1β με μακροφάγα, η παραγωγή VEGF και IL8 σταμάτησε έπειτα από επαγόμενη αναστολή του NF-κB ¹⁰⁹. Επιπλέον, ένας αριθμός ερευνών έχει δείξει ότι, υπό συνθήκες υποξίας, ο NF-κB επάγει τη μεταγραφή του παράγοντα HIF1α (hypoxia-inducible factor-1 alpha), ο οποίος με τη σειρά του ελέγχει την έκφραση γονιδίων που ρυθμίζουν την αγγειογένεση ¹¹⁰⁻¹¹².

Ο ισχυρός συσχετισμός μεταξύ του NF-κB και της μετάστασης έχει δειχθεί κυρίως σε μελέτες με χρήση *in vivo* μοντέλων. Πιο συγκεκριμένα, η εισαγωγή κυττάρων αδενοκαρκινώματος σε μοντέλα ποντικών συσχετίστηκε άμεσα με υψηλότερο αριθμό μεταστάσεων, ειδικά όταν η RelA ήταν ενεργοποιημένη στα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών ¹¹³. Αξίζει να σημειωθεί πως η έκφραση της IκBβ (που αποτελεί ισομορφή της IκBa, και λειτουργεί ως αναστολέας και ρυθμιστής του NF-κB) σε κύτταρα αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα A549, οδηγεί σε μειωμένη μετάσταση όταν αυτά τα κύτταρα εισαχθούν σε μοντέλα ποντικών ¹¹⁴. Επιπλέον, ο NF-κB αυξάνει τη μεταγραφή την ιντεγκρίνης ανβ3, η οποία συμμετέχει στη μετάσταση των κυττάρων του καρκίνου του πνεύμονα και ενισχύει τη σηματοδότηση του NF-κB ¹¹⁵. Μια ακόμη μελέτη έδειξε πως, η οστεοποντίνη ενεργοποιεί τον υποδοχέα της, την ιντεγκρίνη ανβ3 στα κύτταρα A549, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί τον NF-κB, τα μονοπάτια της PI3K, της AKT ¹¹⁶ και της ERK, οδηγώντας σε ραγδαία αύξηση του ρυθμού μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα ¹¹⁷.

Μια ακόμα πλευρά του πολύπλευρου ρόλου του NF-κB στον καρκίνο του πνεύμονα είναι η ρύθμιση της αντίστασης απέναντι στη θεραπεία. Η ενεργοποίηση της κανονικής σηματοδοτικής πορείας του NF-κB έχει συσχετιστεί με αυξημένη ανθεκτικότητα στη

χημειοθεραπεία όπως και στη ραδιοθεραπεία. Έχει αναφερθεί πως η κυτταρική ευαισθησία στα χημειοθεραπευτικά (π.χ. cisplatin και paclitaxel) μπορεί να συνδέεται αντιστρόφως ανάλογα με την ενεργότητα του NF-κB, με τα στοιχεία να βασίζονται σε κυτταρικές σειρές όπως η H460 ¹¹⁸. Επιπρόσθετα, μελέτες έχουν δείξει πως κύτταρα από καρκίνο του πνεύμονα με ανθεκτικότητα στο φάρμακο cisplatin έχουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του NF-κB σε σύγκριση με κύτταρα ευαίσθητα στο ίδιο φάρμακο, γεγονός που υποδεικνύει πως ο NF-κB συμβάλλει στην απόκτηση ανθεκτικότητας απέναντι στη cisplatin ¹¹⁹. Ο εντοπισμός στο κυτταρόπλασμα της RAP1 (Ras-related protein Rap-1A), που αποτελεί θετικό ρυθμιστή για τη σηματοδότηση του NF-κB, έχει επίσης συσχετιστεί με την ανθεκτικότητα απέναντι στο φάρμακο cisplatin στον NSCLC μέσω ενεργοποίησης του άξονα NF-κB/BCL2 ¹²⁰.

Σε αυτό το πλαίσιο, μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε δύο δεκαετίες πριν από τον Jones και τους συνεργάτες του απέδειξε ότι η θεραπεία με gemcitabine *in vitro* οδήγησε σε ενεργοποίηση του NF-κB, ενώ η αναστολή του NF-κB οδήγησε σε αυξημένα επίπεδα απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα H157, γεγονός που συνιστά πως ο NF-κB είναι παράγοντας απαραίτητος για την κυτταρική επιβίωση μετά από χημειοθεραπείες ¹²¹. Σε παρόμοια μελέτη, ο Denlinger και οι συνεργάτες του έδειξαν τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* πως όταν το πρωτεάσωμα αποτελεί στόχο του φαρμάκου bortezomib, αναστέλλεται η επαγόμενη από gemcitabine ενεργοποίηση του NF-κB και συνεπώς αυξάνεται η ευαισθησία του NSCLC στον κυτταρικό θάνατο ¹²⁰. Επιπλέον, η επαγόμενη αναστολή του NF-κB, σε ανθεκτικά στη cisplatin κύτταρα NSCLC, μπορεί να εμποδίσει την έκφραση της P-γλυκοπρωτεΐνης (P-glycoprotein), που είναι υπεύθυνη για την ανθεκτικότητα σε σωρεία φαρμάκων ^{122,123}.

1.3.3. Σχέση μεταξύ του NF-κB και των miRNA

Τα miRNA κατέχουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία και την εξέλιξη του καρκίνου ¹²⁴. Έχει δειχθεί ότι πολλά miRNA σχετίζονται με τις σηματοδοτικές πορείες του NF-κB. Κάποια από αυτά φαίνεται να επάγονται από τον παράγοντα NF-κB, ενισχύοντας την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου, ενώ άλλα φαίνεται να δρουν ως δικλείδα ασφαλείας, δημιουργώντας έναν αρνητικό βρόχο ρύθμισης, καταστέλλοντας τον NF-κB και δρώντας ογκοκατασταλτικά ^{124,125}.

Το σημαντικότερο miR που επάγει τον NF-κB (RelA/p65) είναι το miR-301a ¹²⁶ και καταστέλλει τον παράγοντα καταστολής του NF-κB (NKRF) ¹²⁷, δημιουργώντας ένα θετικό

βρόχο ρύθμισης. Η εμπλοκή του στον καρκίνο όμως φαίνεται να περιορίζεται στο παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα ¹²⁸ και στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα ¹²⁹ χωρίς να έχει διευκρινιστεί ακόμη πλήρως ο μηχανισμός δράσης του. Άλλο παράδειγμα miR που επάγεται από τον NF-κΒ και εμφανίζει ογκογόνο δράση είναι το miR-181b, το οποίο προάγει τη δυνατότητα των MCF-10A να σχηματίζουν αποικίες και να μετασχηματίζονται. Το miR-181b φαίνεται να επάγεται από τον NF-κΒ μέσω του STAT3 και στοχεύει τον CYLD, έναν καταστολέα του NF-κΒ ^{130,131}.

Από την άλλη, πολλά NF-κΒ-επαγόμενα miR έχουν ογκοκατασταλτικό χαρακτήρα, όπως τα miR-146a/b και miR-15/16. Το miR-146a/b δρα ογκοκατασταλτικά, αναστέλλοντας την μετανάστευση και τη διεισδυτικότητα κυττάρων καρκίνου του μαστού ^{132,133}, ενώ η υπερέκφρασή του επάγει την απόπτωση στα παγκρεατικά β-κύτταρα ¹³⁴. Στόχοι του είναι τα mRNA των TRAF6 και IPAK1 που ενεργοποιούν το μονοπάτι του NF-κΒ, υποδηλώνοντας την ύπαρξη ενός αρνητικού ρυθμιστικού κυκλώματος ¹³⁵. Το miR-15/16 μαζί με το miR-223 παίζουν σημαντικό ρόλο στο μη-κανονικό μονοπάτι του NF-κΒ ¹³⁶ και δρουν ογκοκατασταλτικά αναστέλλοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επάγοντας την απόπτωση. Αυτό το επιτυγχάνουν στοχεύοντας ποικίλα μόρια, όπως η αντιαποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2, η McI1, η CcnD1, η Wnt3A και η IKKα καταστέλλοντας την εναλλακτική πορεία του NF-κΒ ¹³⁷.

Τέλος, τα miR-21 και miR-155 είναι δύο αρκετά καλά χαρακτηρισμένα και μελετημένα miRNA που σχετίζονται με το μονοπάτι του NF-κΒ. Παρά τις εκτεταμένες έρευνες δεν έχει διευκρινιστεί ο ρόλος τους στον καρκίνο καθώς φαίνεται να υπάρχουν δεδομένα που να υποστηρίζουν έναν διττό ρόλο. Το miR-21 ενοχοποιείται για τον καρκίνο του πνεύμονα ποντικού που επάγεται από το K-Ras ¹³⁸. Ο υποκινητής του miR-21 φέρει ρυθμιστικά στοιχεία NF-κΒ ¹³⁹ ενώ ταυτόχρονα επάγεται από την STAT3. Από την μία το miR-21 στοχεύει την PTEN, ενεργοποιώντας τον NF-κΒ μέσω της AKT, από την άλλη φαίνεται να στοχεύει άμεσα την PDCD4, αναστέλλοντας τον NF-κΒ ¹⁴⁰ υποδηλώνοντας την ύπαρξη ενός μηχανισμού που μάλλον εξαρτάται από τον τύπο του κυττάρου ¹²⁵.

Τα επίπεδα του miR-155, το οποίο αποτελεί στόχο του NF-κΒ ¹⁴¹ εμφανίζονται αυξημένα στον καρκίνο του πνεύμονα ⁹³. Αυτό με τη σειρά του στοχεύει τα FADD, Ripk1, PU1 και την IKKε, ενώ έχει δειχθεί σε μια μελέτη ότι η υπερέκφραση του miR-155 μειώνει τα επίπεδα της IKKβ ¹⁴²⁻¹⁴⁵, άρα λογικά θα έπρεπε η κανονική πορεία NF-κΒ να καταστέλλεται, κάτι που δεν αποδεικνύεται, ωστόσο, από άλλες μελέτες ¹⁴⁶⁻¹⁴⁸ υπονοώντας την ύπαρξη ενός πολυπλοκότερου ρυθμιστικού δικτύου. Φυσικά υπάρχουν πολλά ακόμα miR που σχετίζονται με το μονοπάτι του NF-κΒ.

Σκοπός

Τα μέλη της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων NF-κB είναι ευρέως γνωστά για τον ρόλο τους στις προ-φλεγμονώδεις και ανοσολογικές αποκρίσεις του κυττάρου αλλά και στη ρύθμιση μιας ποικιλίας βιολογικών διεργασιών μεταξύ των οποίων ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η απόπτωση, αλλά και των αποκρίσεων σε διάφορες μορφές στρες, όπως είναι το γονοτοξικό στρες. Συνεπώς, η απορρύθμιση της ενεργότητας των υπομονάδων του NF-κB έχει συσχετιστεί με διάφορες παθολογικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου. Ο NF-κB παρατηρείται ιδιοστατικά ενεργός σε πολλούς τύπους καρκίνου μεταξύ των οποίων και ο καρκίνος του πνεύμονα, ο οποίος αποτελεί την πρώτη αιτία θανάτων από καρκίνο παγκοσμίως. Ταυτόχρονα, σημαντική είναι και η δράση των miRNA, τα οποία μπορούν να εμφανίζουν τόσο ογκοκατασταλτική όσο και ογκογόνο δράση.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν:

1. Η ταυτοποίηση IKKβ/NF-κB-ρυθμιζόμενων miRNA σε συνθήκες γονοτοξικού στρες στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα.
2. Ο μηχανισμός δράσης των IKKβ/NF-κB-ρυθμιζόμενων miRNA με την ταυτοποίηση πιθανών γονιδίων-στόχων τους.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Βακτηριακές Τεχνικές

2.1.1. Παρασκευή L-broth και τρυβλίων L-άγαρ με αντιβιοτικό

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

100 mg/ml Αμικικιλίνης: Σκόνη αμικικιλίνης διαλύθηκε σε κατάλληλη ποσότητα αποστειρωμένου ddH₂O, φιλτραρίστηκε μέσω ενός αποστειρωμένου μικροφίλτρου 0.2 µm και διατηρήθηκε στους -20°C σε μικρές ποσότητες (aliquots).

2.1.2. Παρασκευή βακτηρίων επιδεκτικών προς μετασχηματισμό (competent cells)

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

Αρχικά, μη επιδεκτικά βακτήρια τοποθετήθηκαν σε 4 ml L-Broth και επώαστηκαν σε θερμαινόμενο τροχιακό αναδευτήρα στους 37°C ολονύκτια ώστε να αναπτυχθούν. Την επόμενη ημέρα, 0.2 ml της ολονύχτιας υγρής βακτηριακής καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό 20 ml L-broth (αραίωση 1/100) σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη 25 cm², όπου επώαστηκαν για 2-3 ώρες στους 37°C, μέχρι η OD₆₀₀ να φτάσει 0.5. Έπειτα, η καλλιέργεια μοιράστηκε σε 2 σωλήνες των 15 ml και φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά σε 3000g στους 4°C. Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 4 ml διαλύματος χλωριούχου ασβεστίου (CaCl₂) και φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στις 2000Xg στους 4°C. Το ίζημα επαναιωρήθηκε με άλλα 4 ml CaCl₂ και επώαστηκε για 30 λεπτά στον πάγο. Ακολούθως

πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση για 7 λεπτά στις 2500 στροφές και τους 4°C. Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 1,5 ml CaCl₂ και δείγματα των 100 µl βακτηρίων τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένους σωλήνες erpendorff και αποθηκεύτηκαν στους -80°C για μελλοντική χρήση.

Διάλυμα γλωρικού ασβεστίου (CaCl₂): 60 mM CaCl₂, 15% γλυκερόλη, 10 mM PIPES pH 7.0

2.1.3. Μετασχηματισμός βακτηρίων με πλασμιδιακό DNA

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

2.1.4. Ανάπτυξη υγρών καλλιιεργειών βακτηρίων

Για απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρούς όγκους (mini prep) ήταν απαραίτητη η ανάπτυξη υγρών καλλιιεργειών βακτηρίων. 4 ml L-Broth με 100 µg/ml αμπικιλίνης εμβολιάστηκαν με αποικίες ή αποθέματα γλυκερόλης βακτηρίων, με τη χρήση κρικοφόρου στυλεού και επώαστηκαν σε θερμαινόμενο τροχιακό αναδευτήρα (orbital shaker) στους 37°C για όλη τη νύχτα (>16 ώρες).

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

2.1.5. Παρασκευή βακτηριακών αποθεμάτων γλυκερόλης

Τα αποθέματα βακτηρίων παρασκευάστηκαν αναμιγνύοντας 1200 μl αναπτυγμένης υγρής καλλιέργειας βακτηρίων και 300 μl γλυκερόλης (10% τελική συγκέντρωση γλυκερόλης) και διατηρήθηκαν στους -80°C για περαιτέρω χρήση.

2.1.6. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα

1.5 ml υγρής καλλιέργειας βακτηρίων, προερχόμενες από αποικίες, τοποθετήθηκαν σε έναν αποστειρωμένο σωλήνα eppendorff και φυγοκεντρήθηκαν στις 6.500 στροφές για 2 λεπτά στους 4°C. Στη συνέχεια, το βακτηριακό ίζημα εναιωρήθηκε με δίνη (vortexing) σε 70 μl ρυθμιστικού διαλύματος STET και 25 μl λυσοζύμης (10 mg/ml). Μετά από 5 λεπτά επώασης σε θερμοκρασία δωματίου, τα δείγματα θερμάνθηκαν στους 100°C για 45 δευτερόλεπτα και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά στις 13000 στροφές. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε προσεκτικά και μεταφέρθηκε σε καθαρό σωλήνα eppendorff, όπου προστέθηκαν 100 μl ισοπροπανόλης. Το πλασμιδιακό DNA αφέθηκε να κατακρημνιστεί για 5 λεπτά στους -70°C και συλλέχθηκε με φυγοκέντρωση για 7 λεπτά στις 13000 στροφές. Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 25 μl διαλύματος 1X TE και αποθηκεύτηκε στους -20°C για περαιτέρω χρήση.

Ρυθμιστικό διάλυμα STET: 8% σουκρόζη (σακχαρόζη), 5% Triton X-100, 50 mM EDTA pH8.0, 50 mM Tris-HCl pH 8.0

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

2.1.7. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα (midi prep)

Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA έγινε με τη χρήση Nucleobond kit Xtra Midi EF/Maxi EF, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Εν συντομία, οι καλλιέργειες των βακτηρίων που αναπτύχθηκαν σε 150-200 ml L-Broth με 100 μg/ml αμπικιλίνης, φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά, στις 6000 στροφές στους 4°C. Το βακτηριακό ίζημα υπέστη αλκαλική λύση και έπειτα εισήχθη σε ειδική στήλη Nucleobond tip-100, που κατακρατά το πλασμιδιακό DNA. Στη συνέχεια, οι στήλες εκπλύθηκαν με ρυθμιστικά διαλύματα έκπλυσης (wash buffer) και απομάκρυνσης των ενδονουκλεασών και το πλασμιδιακό DNA εκχυλίστηκε σε 5 ml ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης (elution buffer).

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

2.2. Κυτταρικές σειρές και καλλιέργεια

2.2.1. Κυτταρικές σειρές

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη αναφέρονται στον Πίνακα 2.1.

Πίνακας 2.1: Κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

Κυτταρική σειρά	Περιγραφή	Πηγή
A549	Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα (κακοήθη επιθηλιακά)	ATCC
H1437	Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα (κακοήθη επιθηλιακά)	ATCC
Phoenix	Ανθρώπινα κύτταρα από νεφρό εμβρύου	ATCC
HEK293T	Ανθρώπινα κύτταρα από νεφρό εμβρύου	ATCC

ATCC: American Type Culture Collection

2.2.2. Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών

Η κυτταρική σειρά A549 καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) με χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης (DMEM-low glucose, 1000 mg/L) (Sigma), οι σειρές Phoenix και HEK293T σε DMEM με υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης (DMEM-high glucose, 4500mg/L) (Sigma) και η σειρά H1437 σε θρεπτικό υλικό RPMI-1640 (Sigma). Τα θρεπτικά υλικά εμπλουτίστηκαν με 10% εμβρυϊκό ορό μόσχου (Foetal Calf Serum; FCS) (Gibco), 100 IU/ml πενικιλίνη, 100 μg/ml στρεπτομυκίνη (Biowest) και 1.4 mM L-γλουταμίνη (Biowest). Οι κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο με ελεγχόμενο περιβάλλον στους 37°C, 5% CO₂.

2.2.3. Ανακαλλιέργεια κυττάρων

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

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

2.2.4. Αποθήκευση και διατήρηση των κυττάρων σε υγρό άζωτο

Τα κύτταρα ψύχθηκαν και αποθηκεύθηκαν σε υγρό άζωτο (-196°C) με την εξής διαδικασία: Τρυβλία με συγκέντρωση κυττάρων 80-90%, εκπλύθηκαν με 10 ml ρυθμιστικό διάλυμα PBS και στη συνέχεια προστέθηκε σε αυτά 1 ml διάλυμα θρυψίνης-EDTA. Μετά την αποκόλληση των κυττάρων από το τρυβλίο, προστέθηκαν 7-8 ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS και το ελαιώδες των κυττάρων μεταφέρθηκε σε σωλήνες Falcon των 15 ml. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά, στις 1500 στροφές. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, το υπερκείμενο απορρίφθηκε και στο ίζημα, το οποίο περιείχε τα κύτταρα, προστέθηκε διάλυμα, που αποτελούνταν από FBS και διμεθυλοσουλφοξείδιο (Dimethyl sulfoxide; DMSO) σε αναλογία 9:1 για τελικό όγκο 1 ml. Μετά την επαναιώρηση των κυττάρων με το συγκεκριμένο διάλυμα, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε ειδικές αμπούλες (cryovials) και τοποθετήθηκαν σε ισοθερμικό δοχείο, που περιείχε ισοπροπανόλη (μείωση θερμοκρασίας κατά 1°C το λεπτό). Το δοχείο παρέμεινε για 24 ώρες στους -80°C και στη συνέχεια οι αμπούλες μεταφέρθηκαν στο υγρό άζωτο.

2.2.5. Ανασύσταση των κυττάρων

Οι αμπούλες από το υγρό άζωτο μεταφέρονταν σε υδατόλουτρο στους 37°C και παρέμεναν εκεί για 1-3 λεπτά. Εν συνεχεία, το περιεχόμενο των αμπούλων προστίθεντο στάγδην σε τρυβλίο των 100 mm, στα οποία είχαν ήδη προστεθεί 13 ml πλήρους θρεπτικού υλικού. Τα τρυβλία, έπειτα, τοποθετούνταν στον κλίβανο για την καλλιέργεια των κυττάρων. Την επόμενη μέρα, πραγματοποιούνταν αλλαγή θρεπτικού υλικού (10 ml).

2.2.6. Δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών

2.2.6.1. Αποσιώπηση της κινάσης ΙΚΚβ

Για τη μειορρύθμιση της έκφρασης της κινάσης ΙΚΚβ στις κυτταρικές σειρές A549 και H1437 χρησιμοποιήθηκε ο ρετροϊκός φορέας ελέγχου pSuper-Retro (control vector) και ο φορέας pSuper-Retro-shIKKβ που έφερε ένα ολιγονουκλεοτίδιο ενάντια στην ΙΚΚβ (IKKβ^{KD}). Οι φορείς ήταν ευγενική προσφορά του Καθηγητή Kenneth B. Marcu, (Πανεπιστήμιο Stony Brook, Νέα Υόρκη, ΗΠΑ).

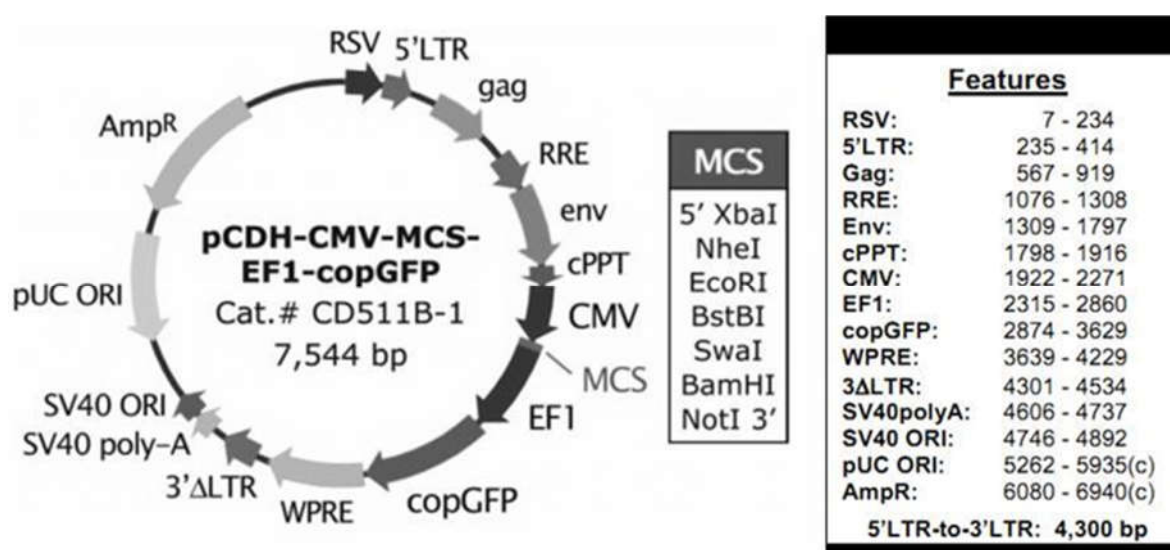
Για την παραγωγή των ρετροϊκών σωματιδίων χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά Phoenix, η οποία διαμολύνθηκε (transfection) με τους επιθυμητούς ρετροϊκούς φορείς με τη χρήση λιπιδίων PEI. 10 μg του επιθυμητού πλασμιδίου αναμείχθηκαν με 125 μl θρεπτικού υλικού (χωρίς προσθήκη ορού) και 30 μg λιπιδίου, για κάθε διαμόλυνση, και αφέθηκαν για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Σε καλλιεργούμενα κύτταρα Phoenix πραγματοποιήθηκε μία πλύση με PBS και ακολούθησε προσθήκη 10 ml πλήρους θρεπτικού υλικού, στο οποίο προστέθηκε στάγδην το διάλυμα των πλασμιδίων. Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο 37°C, 5% CO₂.

Έπειτα από 24 ώρες στα κύτταρα Phoenix πραγματοποιήθηκε αλλαγή του θρεπτικού υλικού και έπειτα από άλλες 24 ώρες η συλλογή των ικών σωματιών. Συλλέχθηκε το θρεπτικό υλικό των κυττάρων Phoenix, το οποίο περιείχε τα ικά σωματίδια, φιλτραρίστηκε μέσω ενός αποστειρωμένου μικροφίλτρου 0.45 μm και προστέθηκε σε αυτό πολυβρίνη (polybrene) (8 μl ανά 10 ml ιού). Το διάλυμα αυτό, στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε για την επιμόλυνση των καλλιεργούμενων κυττάρων. Η ανωτέρω διαδικασία πραγματοποιήθηκε ξανά την επόμενη ημέρα για να επιτευχθεί μεγαλύτερος αριθμός επιμολυσμένων κυττάρων.

Η επιλογή των κυττάρων που επιμολύνθηκαν με τους φορείς pSuper-Retro και pSuper-Retro-shIKKβ έγινε με χορήγηση πουρομυκίνης (puromycin). Το αντιβιοτικό χορηγήθηκε σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις με τελική συγκέντρωση 10 µg/ml για 10 ημέρες.

2.2.6.2. Κατασκευή κυτταρικών σειρών πνεύμονα που υπερεκφράζουν το miR-342-3p

Η κατασκευή κυτταρικών σειρών A549 και H1437 που υπερεκφράζουν σε υψηλά επίπεδα το miR-342-3p, έγινε με τη χρήση του λεντιφορέα pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-pre-miR-342-3p (System Biosciences, Mountain View, CA) (Εικόνα 2.1).



Εικόνα 2.1. Χάρτης του φορέα pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP (System Biosciences, Mountain View, CA), που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή των σειρών A549 και H1437 που υπερεκφράζουν το miR-342-3p.

Για την παραγωγή λεντι-ϊικών σωματιδίων χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά HEK293T, η οποία διαμολύνθηκε με τους επιθυμητούς λεντι-ϊικούς φορείς με τη χρήση λιπιδίων PEI. 4.5 µg του επιθυμητού πλασμιδίου, 2.2 µg του πλασμιδίου VSVG (κωδικοποιεί για τις G γλυκοπρωτεΐνες του ιού VSV) και 3.3 µg του πλασμιδίου pBR8.91 (κωδικοποιεί για τις κύριες δομικές πρωτεΐνες του ιοσωματίου) αναμείχθηκαν με 125 µl θρεπτικού υλικού (χωρίς προσθήκη ορού) και 15 µl λιπιδίου, για κάθε διαμόλυνση, και αφέθηκαν για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Σε καλλιεργούμενα κύτταρα HEK293T πραγματοποιήθηκε μία πλύση με PBS και ακολούθησε προσθήκη 10 ml πλήρους θρεπτικού υλικού στο οποίο προστέθηκε στάγδην το διάλυμα των πλασμιδίων. Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν στον επωαστικό κλίβανο 37°C, 5% CO₂.

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

2.2.7. Χορήγηση ετοποσιδίου (VP16) στα κύτταρα

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε σπορά των κυττάρων σε τρυβλία διαμέτρου 100 mm με πλήρες θρεπτικό υλικό. Έπειτα από 24 ώρες έγινε αλλαγή του θρεπτικού υλικού και χορήγηση των επιθυμητών συγκεντρώσεων ετοποσιδίου (0-10 μM). Τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω πειράματα μετά το πέρας 24 ωρών από τη χορήγηση του χημειοθεραπευτικού. Το ετοποσίδιο ήταν κατάλληλο για ενδοφλέβια χρήση με αρχική συγκέντρωση 34 mM. Η χορήγησή του στα κύτταρα πραγματοποιήθηκε έπειτα από τη δημιουργία των κατάλληλων αραιώσεων με DMSO.

2.2.8. Καταμέτρηση κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο

Καλλιεργούμενα κύτταρα αποκολλήθηκαν από το τρυβλίο με διάλυμα θρυψίνης. Μετά την αποκόλληση των κυττάρων, προστέθηκε πλήρες θρεπτικό υλικό και 10 μl από το εναιώρημα των κυττάρων τοποθετήθηκαν στο αιμοκυτταρόμετρο (Neubauer Chamber), όπου μετρήθηκαν τα κύτταρα στα 4 μεγάλα γωνιακά εξωτερικά τετράγωνα μήκους 1mm, το κάθε ένα από τα οποία υποδιαιρείται σε 16 μικρότερα τετράγωνα. Ο μέσος όρος των κυττάρων των τεσσάρων τετραγώνων πολλαπλασιάστηκε x104, δίνοντας έτσι τον αριθμό των κυττάρων ανά 1 ml του αρχικού εναιωρήματος. Η κάθε μέτρηση επαναλήφθηκε 2 φορές.

2.2.9. Προσδιορισμός του κυτταρικού κύκλου με κυτταρομετρία ροής

Κύτταρα από τρυβλία διαμέτρου 60 mm συλλέχθηκαν με θρυψινοποίηση (0.5 ml θρυψίνης), και προστέθηκαν 0.5 ml PBS ανά τρυβλίο. Στη συνέχεια, το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρθηκε σε ειδικά σωληνάρια, τα οποία φυγοκεντρήθηκαν για 3 λεπτά στα 6000Xg. Ακολούθως, τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 0.5 ml διαλύματος χρώσης ιωδιούχου

προπιδίου (PI), μετρήθηκαν σε μηχανήμα BD – FACSCALIBUR και αναλύθηκαν με τη χρήση του προγράμματος cellquest.

Διάλυμα χρώσης ιωδιούχου προπιδίου (propidium iodide, PI): 0,1% Triton X-100, 0.1% κιτρικό νάτριο, 50 ng/ml ιωδιούχο προπίδιο (Santa Cruz Biotechnology, sc-3541)

2.3. Απομόνωση και ανάλυση RNA

2.3.1. Απομόνωση RNA

2.3.1.1. Απομόνωση RNA καλλιιεργούμενων κυττάρων

Ολικό RNA από τα καλλιιεργούμενα κύτταρα απομονώθηκε με τη χρήση του RNeasy Mini Kit (QIAGEN), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Μετά την απομόνωση του RNA, πραγματοποιήθηκε υπολογισμός της συγκέντρωσής του με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου Thermo Scientific™ NanoDrop 2000. Το RNA διατηρήθηκε στους -80°C μέχρι την περαιτέρω χρήση.

2.3.1.2. Απομόνωση RNA από τους όγκους των μυών

Η απομόνωση ολικού RNA από τους όγκους των μυών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του TRIzol™ (Invitrogen, #15596018) και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Περιληπτικά, 50-100 mg ιστού ομογενοποιήθηκαν σε 1 ml TRIzol και αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά για τη λύση των κυττάρων. Ακολούθησε προσθήκη 200 μl χλωροφορμίου και επώαση για 3 λεπτά. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε 12000Xg για 15 λεπτά. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης στα δείγματα δημιουργήθηκαν τρεις διακριτές φάσεις. Η ανώτερη υδάτινη, διάφανη φάση χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του RNA. Η ανώτερη υδάτινη φάση μεταφέρθηκε προσεκτικά σε νέο eppendorff, προστέθηκε 0.5 ml ισοπροπανόλης για την κατακρήμνιση του RNA και αφέθηκε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στα 12000 g στους 4°C. Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 1 ml 75% αιθανόλης, αναδεύθηκε με δίνη και φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στα 7500 g στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και αφέθηκε να στεγνώσει πλήρως από την αιθανόλη για 5-10 λεπτά. Τέλος το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 30-60 μl νερού ελεύθερου RNασών (RNase-free water). Η συγκέντρωση του RNA υπολογίστηκε με τη χρήση του Thermo Scientific™ Nanodrop 2000. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80°C για περαιτέρω χρήση.

2.3.2. Αντίστροφη μεταγραφή RNA

Η αντίστροφη μεταγραφή του ολικού RNA σε cDNA έγινε με τη χρήση του PrimeScript™ RT reagent Kit (TaKaRa, #RR037A), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η αντίστροφη μεταγραφή των micro-RNA έγινε με τη χρήση του kit TaqMan Advanced miRNA Assays (Applied Biosystems) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα δείγματα cDNA αποθηκεύτηκαν στους -20°C για περαιτέρω χρήση.

2.3.3. Αλυσιδωτή αντίδραση μεταγραφής πραγματικού χρόνου

Προκειμένου να μελετηθεί η έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων, τα δείγματα cDNA ενισχύθηκαν για αυτούς τους συγκεκριμένους στόχους με τη χρήση του KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (Kapa Biosystems) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και τη χρήση κατάλληλων εκκινητών (primers), οι οποίοι σχεδιάστηκαν με το πρόγραμμα Primer BLAST και παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.3.. Ως γονίδιο αναφοράς (housekeeping gene) χρησιμοποιήθηκε η έκφραση της RNA πολυμεράσης II (RPII).

Για την ανάλυση της έκφρασης του miR-342-3p χρησιμοποιήθηκε το miRNA assay hsa-miR-342-3p (Assay ID: 478043_mir, Thermo Fisher Scientific) και το assay has-miR-25-3p (Assay ID: 000403, Thermo Fisher Scientific) για την έκφραση του miR-25-3p ως microRNA αναφοράς. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του TaqMan Fast Advanced Master Mix σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στο θερμοκυκλοποιητή StepOne Real-Time PCR system (Applied Biosystems). Η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο ΔΔCT.

Πίνακας 2.2: Ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

Εκκινητής	Αλληλουχία
MAF	F: 5'- ATACGAGAAGTTGGTGAGCAG -3' R: 5'- CGAGTGGGCTCAGTTATGAA -3'
PDGFRA	F: 5'- TTGAAGGCAGGCACATTTACA -3' R: 5'- GCGACAAGGTATAATGGCAGAAT -3'
E2F1	F: 5'- AGCTCATTGCCAAGAAGTCCA -3' R: 5'- AGGGTCTGCAATGCTACGAA -3'
CcnD1	F: 5'- CCGAGGAGCTGCTGCAAATG -3' R: 5'- AGGGCGGATTGGAAATGAACT -3'
FosB	F: 5'- CTGTCTTCGGTGGACTCCTT -3' R: 5'- TGGTGTGGAGTAGCTGGTTC -3'
KDM6B	F: 5'- AGACAGGGCACACCAAATC -3' R: 5'- GCTGCCTCAGTCCTTTCACA -3'
GAPDH	F: 5'- TCGGAGTCAACGGATTTGGT -3' R: 5'- TTCCCGTTCTCAGCCTTGAC -3'
RPII	F: 5'- TCAATGCTGGTTTTGGTGACG -3' R: 5'- GCATGTTGGACTCGATGCAG -3'

2.3.4. MiRNome Profiling με την τεχνολογία Nanostring

Η μελέτη της διαφορικής έκφρασης των miRNA πραγματοποιήθηκε με την τεχνολογία NanoString nCounter της ομώνυμης εταιρίας. Η τεχνολογία αυτή αποτελεί μια παραλλαγή των μικροσυστοιχιών για τα νουκλεϊκά οξέα και χρησιμοποιεί ιχνηθέτες που φέρουν “molecular barcodes”, χρησιμοποιώντας μικροσκοπική απεικόνιση για να ανιχνεύσει και να ποσοτικοποιήσει έως 800 διαφορετικά μόρια ανά αντίδραση υβριδισμού. Τα “molecular barcodes” είναι ουσιαστικά μια σειρά από χρωμοφόρα μόρια, των οποίων η διαφορετική διάταξη δημιουργεί ένα μοναδικό κωδικό που αντιστοιχεί σε έναν μοναδικό ιχνηθέτη, ο οποίος προσδένεται μόνο στο μόριο που μελετάτε. Η τεχνική παρουσιάζει το πλεονέκτημα μη απαίτησης ενίσχυσης των μορίων-στόχων, χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία, και δεν χρειάζεται επιπλέον επικύρωση με άλλες μεθόδους όπως η αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου.

Εν συντομία, η διαδικασία περιλαμβάνει τρία βήματα.

- Υβριδισμός: Σε κάθε αντίδραση δύο ιχνηθέτες (35-50 νουκλεοτιδίων) υβριδοποιούνται ειδικά σε ένα miRNA στόχο και ο ένας φέρει το “molecular barcode” και ονομάζεται ιχνηθέτης ανταποκριτής. Ο δεύτερος ιχνηθέτης, της σύλληψης, φέρει μόρια βιοτίνης και ακινητοποιεί το σύμπλοκο για τη συλλογή των δεδομένων.
- Καθαρισμός και Ακινητοποίηση: Μετά από την υβριδοποίηση, η περίσσεια των ιχνηθετών που δεν έχουν υβριδοποιηθεί απομακρύνονται και τα σύμπλοκα ανιχνευτή/στόχου ευθυγραμμίζονται και ακινητοποιούνται στο ειδικό μικροπλακίδιο nCounter Cartridge.
- Συλλογή των δεδομένων: Το δείγμα τοποθετείται στον ψηφιακό αναλυτή προκύπτει ένα αρχείο με αναγνώσεις ταξινομημένες και αρχειοθετημένες για κάθε μόριο.

Η προετοιμασία πραγματοποιήθηκε στον σταθμό nCounter Prep ενώ η ανίχνευση των ιχνηθετών έγινε με τη χρήση του αναλυτή nCounter Digital.

2.4. Απομόνωση και ανάλυση πρωτεϊνών

2.4.1. Απομόνωση ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων

Για την απομόνωση πρωτεϊνών, καλλιεργούμενα κύτταρα σε τρυβλία των 100 mm εκπλύθηκαν εις διπλούν με 10 ml ψυχρού ρυθμιστικού διαλύματος PBS-EDTA pH 8.0 και εν συνεχεία προστέθηκε 1 ml από το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα και με τη βοήθεια ειδικού σιλικονούχου υλικού, πραγματοποιήθηκε η συλλογή των κυττάρων από τα τρυβλία. Τα εναιωρήματα των κυττάρων μεταβιβάστηκαν σε σωλήνες erpendorf των 1.5 ml, τα οποία φυγοκεντρήθηκαν για 1.5 λεπτό, στις 6.500 στροφές, στους 4°C. Στη συνέχεια, απορρίφθηκαν τα υπερκείμενα και προστέθηκε διάλυμα RIPA σε ποσότητες από 50 έως και 200 µl, αναλόγως της ποσότητας του ιζήματος που σχηματιζόταν μετά την φυγοκέντρηση. Ακολούθησε επώαση σε πάγο με το διάλυμα RIPA για 30 λεπτά και ανά 10 λεπτά ανάδευση με δίνη. Εν συνεχεία, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 13.000 στροφές, για 20 λεπτά, στους 4°C. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, συλλέχθηκε το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης σε καινούριους σωλήνες erpendorf και μικρή ποσότητα των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη χρήση του Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fischer Scientific™, #23225). Η μέτρηση της

συγκέντρωσής τους έγινε με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου Thermo Scientific™ NanoDrop 2000. Τέλος, τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80°C για περαιτέρω χρήση.

Διάλυμα RIPA: 150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1% NP-40, 0,5% Triton X-100, 1 mM EDTA pH 8.0, 0.5% δεοξυχολικό άλας του νατρίου (sodium deoxycholate), 1mM Dithiothreitol (DTT), 1 mM PMSF, 1 mM ορθοβαναδικό άλας του νατρίου (Na₃VO₄) και 1X αναστολείς πρωτεασών (Sigma, S8820).

2.4.2. Απομόνωση κυτταροπλασματικών και πυρηνικών εκχυλισμάτων

2.4.2.1. Κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα

Τρυβλία διαμέτρου 100 mm εκπλύθηκαν αρχικά μια φορά με 5 ml ψυχρής PBS-1mM EDTA pH 8.0 και στη συνέχεια προστέθηκε 1 ml ψυχρής PBS-1mM EDTA pH 8.0 και τα κύτταρα συλλέχθηκαν με ειδικό σιλικονούχο υλικό (rubber policeman) σε σωλήνα erpendorff. Το εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε στις 6500 στροφές για 2 λεπτά στους 4°C και το υπερκείμενο αφαιρέθηκε. Κατόπιν τα κύτταρα εκπλύθηκαν μία φορά με 1,5 ml υποτονικού διαλύματος και φυγοκεντρήθηκαν εκ νέου στις 6500 στροφές για 2 λεπτά στους 4°C και το υπερκείμενο αφαιρέθηκε. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 50-70 μl υποτονικού διαλύματος το οποίο περιείχε 0,1 % NP-40 και το μίγμα παρέμεινε στον πάγο για 10 λεπτά. Ακολούθησε ανάδευση με δίνη (vortex) για περίπου 20 δευτερόλεπτα και φυγοκέντρωση στις 13000 στροφές για 10 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καθαρό, αποστειρωμένο σωλήνα erpendorff και μικρή ποσότητα από τα δείγματα χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη χρήση του Pierce™ BCA Protein Assay Kit. Τέλος, τα εκχυλίσματα διατηρήθηκαν στους -80°C μέχρι την περαιτέρω χρήση τους.

2.4.2.2. Πυρηνικά εκχυλίσματα

Μετά την απομόνωση των κυτταροπλασματικών εκχυλισμάτων, στο ίζημα προστέθηκε 1 ml ψυχρό υποτονικό διάλυμα (χωρίς NP-40) και φυγοκεντρήθηκε στις 13000 στροφές για 10 λεπτά στους 4°C. Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 50 μl διάλυμα απομόνωσης με υψηλή συγκέντρωση άλατος το οποίο προστέθηκε στάγδην και στη συνέχεια το μίγμα ομογενοποιήθηκε με δίνη (vortex) και αφέθηκε στον πάγο για 20 λεπτά. Οι πυρηνικές πρωτεΐνες απομονώθηκαν με φυγοκέντρωση στις 13.000 στροφές για 30 λεπτά στους 4°C. Τα εκχυλίσματα διατηρήθηκαν στους -80°C για περαιτέρω χρήση.

Υποτονικό διάλυμα: 10 mM HEPES pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 5 mM KCl

Διάλυμα απομόνωσης με υψηλή συγκέντρωση άλατος: 20 mM HEPES pH 7.9, 25% Glycerol, 450 mM KCl, 1 mM EDTA

Στα διαλύματα προστέθηκαν ακριβώς πριν τη χρήση τους τα εξής: 1 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM Dithiothreitol (DTT), 1 μg/ml απροτίνη (aprotin), 1 μg/ml πεψιστατίνη (pepstatin) και 1 μg/ml λευπεψίνη (leupeptin).

2.4.3. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

Με την ηλεκτροφόρηση πηκτής SDS-πολυακρυλαμιδίου επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε σύστημα κάθετων γυάλινων πλακών. Η πηκτή αποτελείται από δύο μέρη: Από την πηκτή επιστοιβάξης με μεγάλο μέγεθος πόρων και την πηκτή διαχωρισμού με μικρότερο μέγεθος πόρων. Τα πρωτεϊνικά μόρια διαπερνούν γρήγορα την πρώτη συσσωρεύονται σε μια λεπτή στιβάδα και εισέρχονται ταυτόχρονα στη δεύτερη πηκτή, όπου και γίνεται ο διαχωρισμός. Η αναλογία όγκων πηκτής διαχωρισμού: πηκτή επιστοιβάξης είναι ~5:1 και η σύστασή τους περιγράφεται στον Πίνακα 2.2, όπως φαίνεται παρακάτω.

Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE), που πραγματοποιήθηκε σε μικρή διπλή συσκευή Mini-Protean gel electrophoresis tank (Bio-Rad), παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν πηκτές διαχωρισμού συγκέντρωσης ακρυλαμιδίου 10% (Πίνακας 2.3.), σύμφωνα με προηγούμενες μεθόδους. Το μίγμα αφέθηκε να πολυμεριστεί σε θερμοκρασία δωματίου. Στα πρωτεϊνικά δείγματα (40-60 μg πρωτεΐνης) προστέθηκε 1X διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών (loading buffer) και αφού θερμάνθηκαν για 10 λεπτά στους 100°C, φορτώθηκαν στην πηκτή. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 115 V σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης για ~2 ώρες. Ως δείκτης του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε ο πρότυπος έγχρωμος μάρτυρας πρωτεϊνών BlueStar Plus Prestained Protein Marker (Nippon Genetics, MWP04).

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

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

Πίνακας 2.3: Σύσταση των πηκτών επιστοιβάξης και διαχωρισμού

Πηκτή επιστοιβάξης 5%		
Διάλυμα	Όγκος (ml)	Τελική συγκέντρωση
Αποστειρωμένο ddH ₂ O	1.4	
30% μίγμα ακρυλαμιδίου (29,2% ακρυλαμίδιο, 0.8% Δις-ακρυλαμίδιο)	0.33	5% w/v
1.0 M Tris pH 6.8	0.25	0.125 M
10% SDS	0.02	0.1%
10% υπερθειικό αμμώνιο	0.02	0.1%
TEMED	0.002	
Τελικός όγκος (ml)	2	
Πηκτή διαχωρισμού 10%		
Διάλυμα	Όγκος (ml)	Τελική συγκέντρωση
Αποστειρωμένο ddH ₂ O	4	
30% μίγμα ακρυλαμιδίου	3.3	10% w/v
1.5 M Tris pH 8.8	2.5	0.375 M
10% SDS	0.1	0.1%
10% υπερθειικό αμμώνιο	0.1	0.1%
TEMED	0.004	
Τελικός όγκος (ml)	10	

2.4.4. Ανάλυση πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωμα κατά western (western blot)

Μετά την ηλεκτροφόρηση σε 1X ρυθμιστικό διάλυμα Tris-γλυκίνης που περιείχε SDS, οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Amersham #10600018) σε 1X ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών για όλη τη νύχτα (>16 ώρες) στους 4°C και τάση 25V.

Μετά την μεταφορά των πρωτεϊνών, οι μεμβράνες επώαστηκαν για 1 ώρα σε 5% άπαχο γάλα σε σκόνη ελεύθερο λιπιδίων διαλυμένο σε PBS (5% blocking solution). Στην συνέχεια, οι μεμβράνες επώαστηκαν με το κατάλληλο πρωτογενές αντίσωμα (Πίνακας 2.4.) σε 3.5% blocking solution ολονύκτια στους 4°C υπό ανάδευση. Οι μεμβράνες εκπλύθηκαν 3 φορές για 10 λεπτά με PBS και επώαστηκαν με κατάλληλο δευτερογενές αντίσωμα (Jackson Immunoresearch) σε 3.5% blocking solution για 1.5 ώρα, υπό ανάδευση. Οι μεμβράνες εκπλύθηκαν 3 φορές για 10 λεπτά με PBS και στη συνέχεια αναπτύχθηκαν σε σκοτεινό

θάλαμο με τη χρήση του Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad). Η έκθεση των μεμβρανών πραγματοποιήθηκε στο Molecular Imager[®] Chemi Doc[™] XRS (Bio-Rad).

1XΡυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών (Transfer blotting buffer): 0.0025 M Tris, 0.192 M γλυκίνη, 20% μεθανόλη

Πίνακας 2.4.: Πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

Αντίσωμα	Οργανισμός	Εταιρεία	Κωδικός
phospho-ATM (Ser1981)	Rabbit	Cell Signaling	#5883
ATM	Mouse	Santa Cruz Biot.	sc-23921
phospho-p53 (Ser15)	Mouse	Cell Signaling	#9286
p53	Mouse	Santa Cruz Biot.	sc-126
phospho-Chk2 (Thr68)	Rabbit	Novus Biologicals	NB100-92502
Chk2	Rabbit	Santa Cruz Biot.	sc-9064
IKKβ	Rabbit	Cell Signaling	2678T
IKKβ	Rabbit	Proteintech	15649-1-AP
β-actin	Mouse	Sigma Aldrich	A5441

2.5. Ανάπτυξη καρκινικών κυτταρικών σειρών ως ξενομοσχεύματα *in vivo* (xenografts)

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

Για την ανάπτυξη των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων ως ξενομοσχεύματα *in vivo*, 2×10^6 κύτταρα σε 200 μl PBS εμβολιάστηκαν υποδόρια σε ανοσοκατεσταλμένους μύες NSG

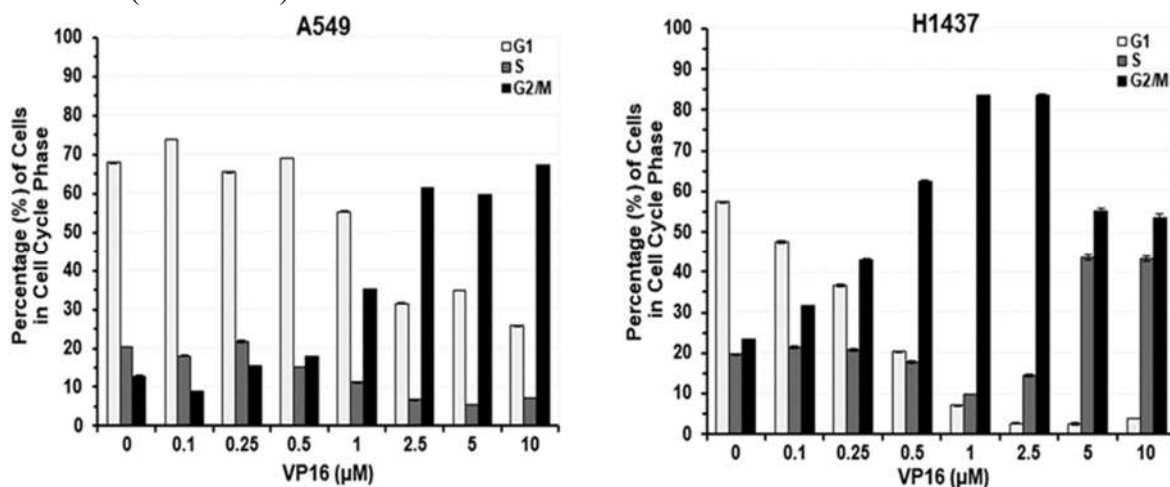
(NOD-SCID-IL2Rgamma) ηλικίας 5 εβδομάδων. Κάθε ζώο εμβολιάστηκε αμφίπλευρα και συγκεκριμένα στη δεξιά πλευρά εμβολιάστηκαν τα τροποποιημένα κύτταρα (A549 miR-342-3p^{OE} και H1437 miR-342-3p^{OE}) και στην αριστερή πλευρά εμβολιάστηκαν τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου.

Τα ζώα θυσιάστηκαν με τη μέθοδο της αυχενικής μετατόπισης 3-4 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό των κυττάρων για την απομόνωση των όγκων. Οι όγκοι που απομονώθηκαν ζυγίστηκαν και τμήματα αυτών (50-100 mg) εμβαπτίστηκαν άμεσα σε υγρό άζωτο (snap freeze) και διατηρήθηκαν στους -80°C για την απομόνωση RNA.

3. Αποτελέσματα

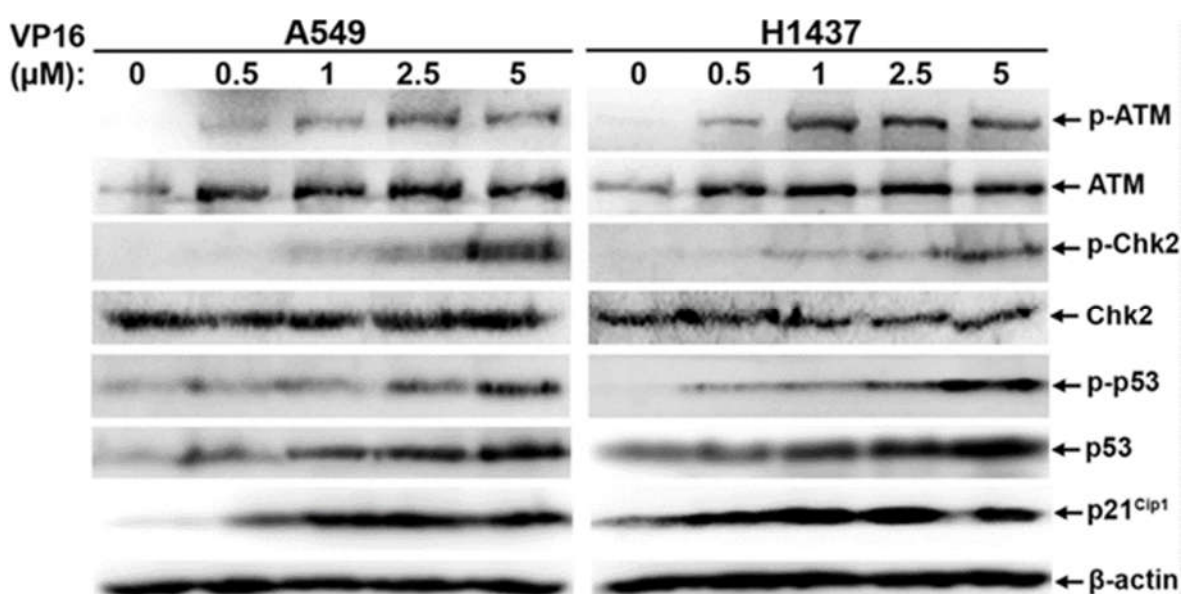
3.1. Η επίδραση του ετοποσιδίου στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και στην απόκριση σε βλάβες του DNA σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα

Το ετοποσίδιο (VP16) αποτελεί ένα χημειοθεραπευτικό φάρμακο το οποίο δρα προκαλώντας την αναστολή της τοποϊσομεράσης II του DNA και χρησιμοποιείται ως θεραπεία σε κάποιες μορφές καρκίνου, μεταξύ των οποίων και στον καρκίνο του πνεύμονα. Η κυτταροτοξικότητα του ετοποσιδίου οφείλεται στη δημιουργία θραύσεων στη διπλή έλικα του DNA. Προκειμένου να μελετηθεί ο ρόλος του NF-κB στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα σε συνθήκες γονοτοξικού στρες χρησιμοποιήθηκαν δύο κυτταρικές σειρές: η κυτταρική σειρά A549 και η H1437, στις οποίες χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις VP16. Πιο συγκεκριμένα, χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις ετοποσιδίου από 0 μM έως 10 μM για 24 ώρες και με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής μελετήθηκε η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου στα κύτταρα. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.1 υπάρχει μια θετική συσχέτιση του ετοποσιδίου και του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση G_2/M . Όσο η συγκέντρωση του χορηγούμενου VP16 αυξάνεται, τόσο μεγαλύτερο είναι και το ποσοστό των κυττάρων στη φάση G_2/M . Παρατηρείται πως τα κύτταρα A549 παρουσιάζουν διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G_2/M . Παρ' όλα αυτά, η κυτταρική σειρά H1437, παρουσιάζει ομοίως διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G_2/M μέχρι τη συγκέντρωση των 2,5 μM , ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (5-10 μM), η διακοπή του κυτταρικού κύκλου πραγματοποιείται και στη φάση S σε αρκετά υψηλά ποσοστά (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1. Επίδραση του ετοποσιδίου στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου στις κυτταρικές σειρές A549 και H1437. Σε καλλιεργούμενα κύτταρα A549 και H1437 χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις (0-10 μM) VP16 για 24 ώρες και μέσω της κυτταρομετρίας ροής μελετήθηκε η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου.

Για να μελετηθεί περαιτέρω η δράση του ετοποσιδίου στις καρκινικές σειρές, αναλύθηκε με ανοσοαποτύπωμα κατά Western η έκφραση των πρωτεϊνών που ενεργοποιούνται ως απόκριση σε βλάβες του DNA. Στις καρκινικές σειρές A549 και H1437, χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις VP16 (0-5 μ M) και έπειτα από 24 ώρες απομονώθηκαν ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα και αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα κατά western, για την έκφραση της φωσφορυλιωμένης (ενεργής) μορφής της κινάσης ATM (ATM-S1981), ενδεικτικής της ενεργοποίησης της πορείας σε βλάβες του DNA, καθώς και των καθοδικών μορίων που ενεργοποιεί όπως η Chk2, η p53, η p21 αλλά και της β -ακτίνης ως μάρτυρα ελέγχου (Εικόνα 3.2).



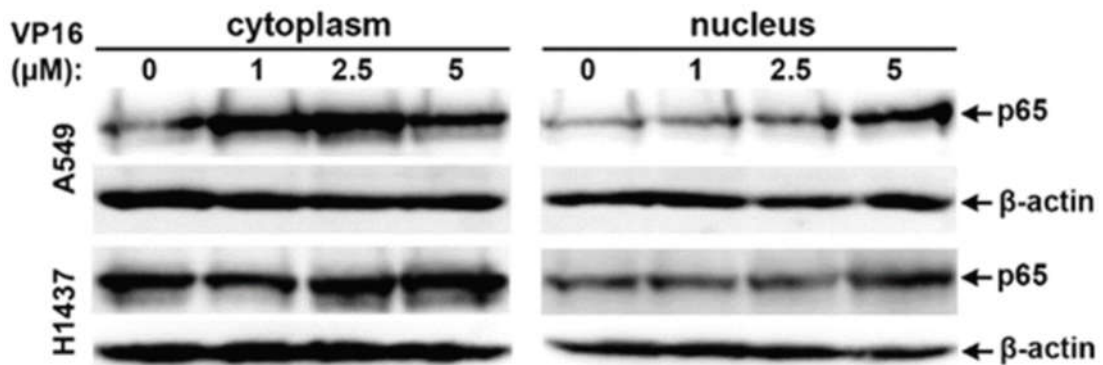
Εικόνα 3.2. Επίδραση του ετοποσιδίου στην επαγωγή των πορειών απόκρισης σε βλάβες στο DNA στις κυτταρικές σειρές A549 και H1437. Κύτταρα A549 και H1437 καλλιεργήθηκαν απουσία ή παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ετοποσιδίου (0,5-5 μ M) για 24 ώρες και εν συνεχεία απομονώθηκαν ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με Ανοσοαποτύπωμα κατά western για τις πρωτεΐνες p-ATM, ATM, p-Chk2, Chk2, p-p53, p53 και p21. Η έκφραση της β -ακτίνης χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ελέγχου.

Τα αποτελέσματα κατέδειξαν μια δόσο-εξαρτώμενη αύξηση της φωσφορυλιωμένης, ενεργής μορφής της κινάσης ATM (p-ATM) και στις δύο κυτταρικές σειρές, γεγονός αναμενόμενο, καθώς αποτελεί τον πρωταρχικό ρυθμιστή της πορείας επιδιόρθωσης διπλών θραύσεων στο DNA (Εικόνα 3.2). Επιπλέον, παρατηρήθηκε μια δόσο-εξαρτώμενη αύξηση της ενεργής μορφής της κινάσης Chk2 (p-Chk2), η οποία αποτελεί στόχο της ATM, και στις δύο κυτταρικές σειρές (Εικόνα 3.2). Η Chk2 με τη σειρά της ενεργοποιεί την πρωτεΐνη p53

για τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων που φέρουν βλάβες στο DNA. Στην κυτταρική σειρά A549 η πρωτεΐνη p53 φαίνεται ότι αυξάνεται κυρίως στις συγκεντρώσεις 2,5 μM και 5 μM , ενώ το επόμενο βήμα είναι η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης p21 της οποίας η συγκέντρωση αυξάνεται όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του VP16 (Εικόνα 3.2).

3.2. Ενεργοποίηση του NF- κB σε ανθρώπινες καρκινικές επιθηλιακές κυτταρικές σειρές πνεύμονα έπειτα από χορήγηση VP16 και επαγωγή δίκλωνων ρήξεων στο DNA

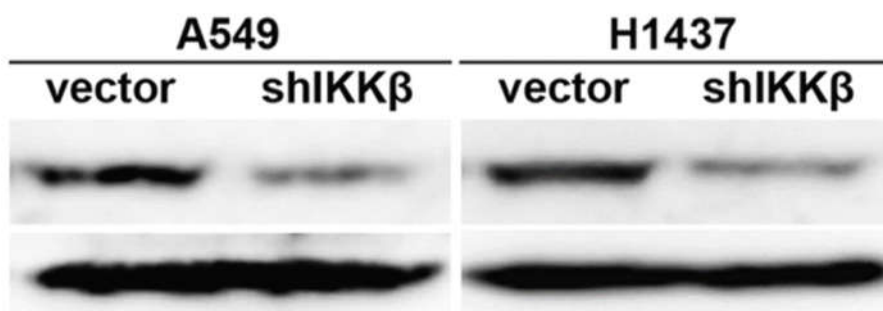
Ενώ οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες ενεργοποιούν την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53, ορισμένα χημειοθεραπευτικά ενεργοποιούν, ενώ άλλα καταστέλλουν τις σηματοδοτικές πορείες του NF- κB , ένα φαινόμενο που εξαρτάται από τον τύπο του κυττάρου. Στη συνέχεια, λοιπόν, μελετήθηκε η ενεργοποίηση της κανονικής πορείας του NF- κB ως απόκριση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις ετοποσιδίου στις κυτταρικές σειρές μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα A549 και H1437. Στα κύτταρα χορηγήθηκε VP16 σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (0-5 μM) και μελετήθηκε με ανοσοαποτύπωμα κατά western, τόσο σε κυτταροπλασματικά όσον και σε πυρηνικά εκχυλίσματα, η έκφραση της πρωτεΐνης p65, η οποία αποτελεί την κύρια υπομονάδα που ενεργοποιείται διαμέσου της κανονικής πορείας του NF- κB (Εικόνα 3.3). Ως μάρτυρας ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η β -ακτίνη. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν την ενεργοποίηση της κανονικής πορείας του NF- κB ως απόκριση στις αυξανόμενες συγκεντρώσεις VP16, με τη μέγιστη ενεργοποίηση της p65 να παρατηρείται στη συγκέντρωση των 5 μM και στις δύο κυτταρικές σειρές (Εικόνα 3.3). Επομένως, οι δίκλωνες ρήξεις στο DNA από το VP16 οδηγούν στην ενεργοποίησης της κανονικής σηματοδοτικής πορείας του NF- κB .



Εικόνα 3.3. Ο μεταγραφικός παράγοντας NF- κB ενεργοποιείται μετά τη χορήγηση VP16 και την επαγωγή δίκλωνων ρήξεων στο DNA. Ανοσοαποτύπωμα κατά western σε κυτταροπλασματικά και πυρηνικά εκχυλίσματα των κυτταρικών σειρών A549 και H1437 για την έκφραση της υπομονάδας p65, έπειτα από χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων VP16 (0-5 μM) για 24 ώρες. Το ετοποσίδιο επάγει την ενεργοποίηση της υπομονάδας p65 και τη μετατόπιση της στον πυρήνα, ιδιαίτερα στη συγκέντρωση των 5 μM .

3.3. Μειορρύθμιση της κινάσης IKKβ σε καρκινικά κύτταρα NSCLC και μελέτη των επιπέδων έκφρασης των miRNA

Για να μελετηθεί η επίδραση της κανονικής πορείας του NF-κB στα επίπεδα έκφρασης των miRNA, αρχικά κατασκευάστηκαν σταθερές κυτταρικές σειρές NSCLC, A549 και H1437 στις οποίες μειορρυθμίστηκαν τα επίπεδα της κινάσης Ser/Thr, IKKβ, που αποτελεί ανοδική κινάση ενεργοποίησης της κανονικής πορείας του NF-κB. Οι καρκινικές κυτταρικές σειρές A549 και H1437 επιμολύνθηκαν με τον πρότυπο λεντιϊκό φορέα pSuper-Retro (vector), είτε με το λεντιϊκό φορέα pSuper-Retro-shIKKβ, που έφερε ένα shRNA-ολιγονουκλεοτίδιο για την αποσιώπηση της έκφρασης της IKKβ. Η επιλογή των επιμολυσμένων κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε πουρομυκίνη, για τη δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών. Ακολούθως, απομονώθηκαν ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα τα οποία αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα κατά western για την έκφραση της κινάσης IKKβ (Εικόνα 3.4).

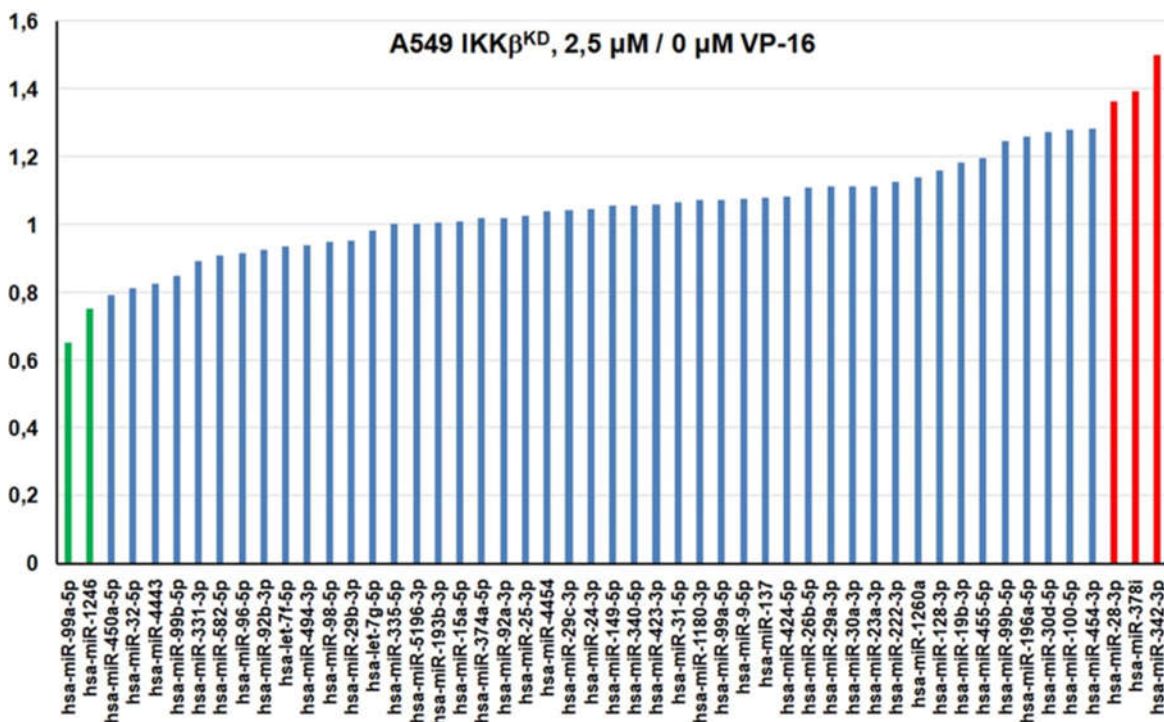


Εικόνα 3.4. Μειορρύθμιση της κινάσης IKKβ σε καρκινικά κύτταρα πνεύμονα. Ανοσοαποτύπωμα κατά western για την αποσιώπηση της κινάσης IKKβ στις κυτταρικές σειρές NSCLC A549 και H1437. Τα κύτταρα επιμολύνθηκαν με τον πρότυπο λεντιϊκό φορέα (vector), είτε με λεντιϊκό φορέα που έφερε ένα shRNA-ολιγονουκλεοτίδιο για την μειορύθμιση της έκφρασης της IKKβ (shIKKβ) και στη συνέχεια επιλέχθηκαν σε πουρομυκίνη. Ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα απομονώθηκαν και αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα κατά Western για την έκφραση της IKKβ. Ως μάρτυρας ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η έκφραση της β-ακτίνης.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης κατέδειξαν την αποτελεσματική μειορρύθμιση των επιπέδων έκφρασης της IKKβ και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές.

Στη συνέχεια, για να μελετηθεί η επίδραση της κινάσης IKKβ στη ρύθμιση των επιπέδων των miRNA, σε συνθήκες γονοτοξικού στρες, επιλέχθηκε η κυτταρική σειρά A549, η οποία φέρει αγρίου τύπου p53, για τη μελέτη του προφίλ έκφρασης των miRNA. Για το σκοπό αυτό, η κυτταρική σειρά NSCLC A549 IKKβ^{KD}, καθώς και τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου, καλλιεργήθηκαν παρουσία ή απουσία 2,5 μM VP16 για 24 ώρες. Μετά το πέρας της επίδρασης του VP16, συλλέχθηκαν δείγματα ολικού RNA στα οποία ακολούθησε ανάλυση MiRNome Profiling με τη χρήση της τεχνολογίας Nanostring, σε συνεργασία με τους Δρ.

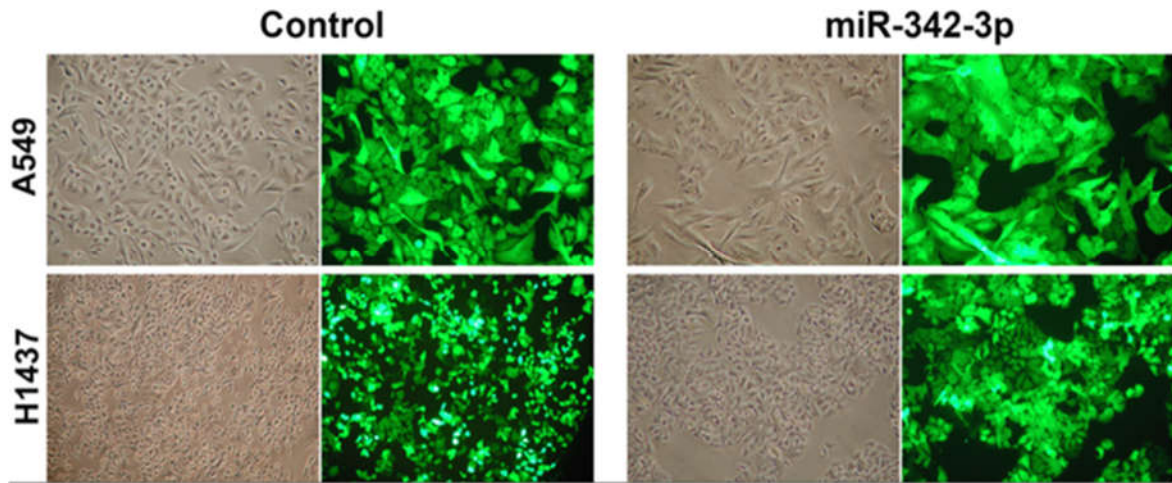
Χρήστο Πολυτάρχου και Μαρία Χατζηαποστόλου, στο Πανεπιστήμιο Nottingham Trent της Αγγλίας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, σε συνθήκες γονοτοξικού στρες, η αποσιώπηση της ΙΚΚβ οδήγησε στη στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων του miR-342-3p στα κύτταρα A549-ΙΚΚβ^{KD} σε σύγκριση με τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου (Εικόνα 3.5).



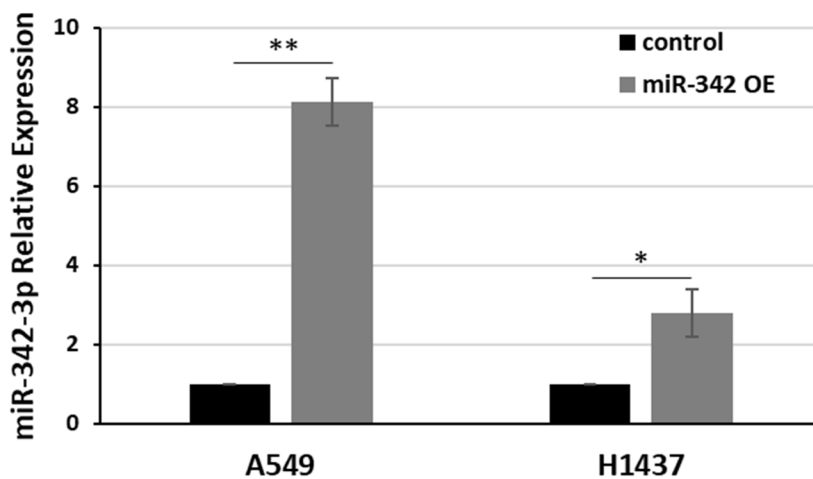
Εικόνα 3.5. Επίπεδα έκφρασης miRNA σε κύτταρα A549 ΙΚΚβ^{KD} ως απόκριση σε βλάβες του DNA, που προέκυψαν από το MiRNome Profiling με τη μέθοδο Nanostring. Στην κυτταρική σειρά A549 ΙΚΚβ^{KD} παρουσία 2,5 μΜ VP16 τα επίπεδα του miR-342-3p παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική αύξηση το miR-342-3p σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου.

3.4. Υπερέκφραση του miR-342-3p σε καρκινικές σειρές πνεύμονα

Για την περαιτέρω μελέτη του ρόλου του miR-342-3p στα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα, καθώς και για την πειραματική ταυτοποίηση πιθανών γονιδίων-στόχων, κατασκευάστηκαν σταθερές κυτταρικές σειρές που υπερεκφράζουν το miR-342-3p. Για το σκοπό αυτό, οι κυτταρικές σειρές A459 και H1437 διαμολύνθηκαν με τον πρότυπο λεντιφορέα pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP (pCDH-GFP) ή με το λεντιφορέα pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-MiR-342 (pCDH- miR-342-3p) για την υπερέκφραση του miR-342-3p. Η επιτυχής διαμόλυνση των κυττάρων επιβεβαιώθηκε βάσει της εκπομπής φθορισμού της ανασυνδυασμένης πράσινης πρωτεΐνης GFP, με τη βοήθεια της μικροσκοπίας φθορισμού (Εικόνα 3.6) ενώ τα επίπεδα έκφρασης του miR-342-3p επιβεβαιώθηκαν με τη διενέργεια qPCR (Εικόνα 3.7).



Εικόνα 3.6. Κατασκευή ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων που υπερεκφράζουν το miR-342-3p. Οι ανθρώπινες καρκινικές σειρές πνεύμονα A549 και H1437 διαμολύνθηκαν είτε με τον πρότυπο λεντιφορέα pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP (pCDH-GFP) ή με το λεντιφορέα pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-MiR-342 (pCDH-miR-342-3p) για την υπερέκφραση του miR-342-3p. Η επιτυχής διαμόλυνση των κυττάρων επιβεβαιώθηκε με τη χρήση μικροσκοπίου-φθορισμού και την έκφραση της φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP.

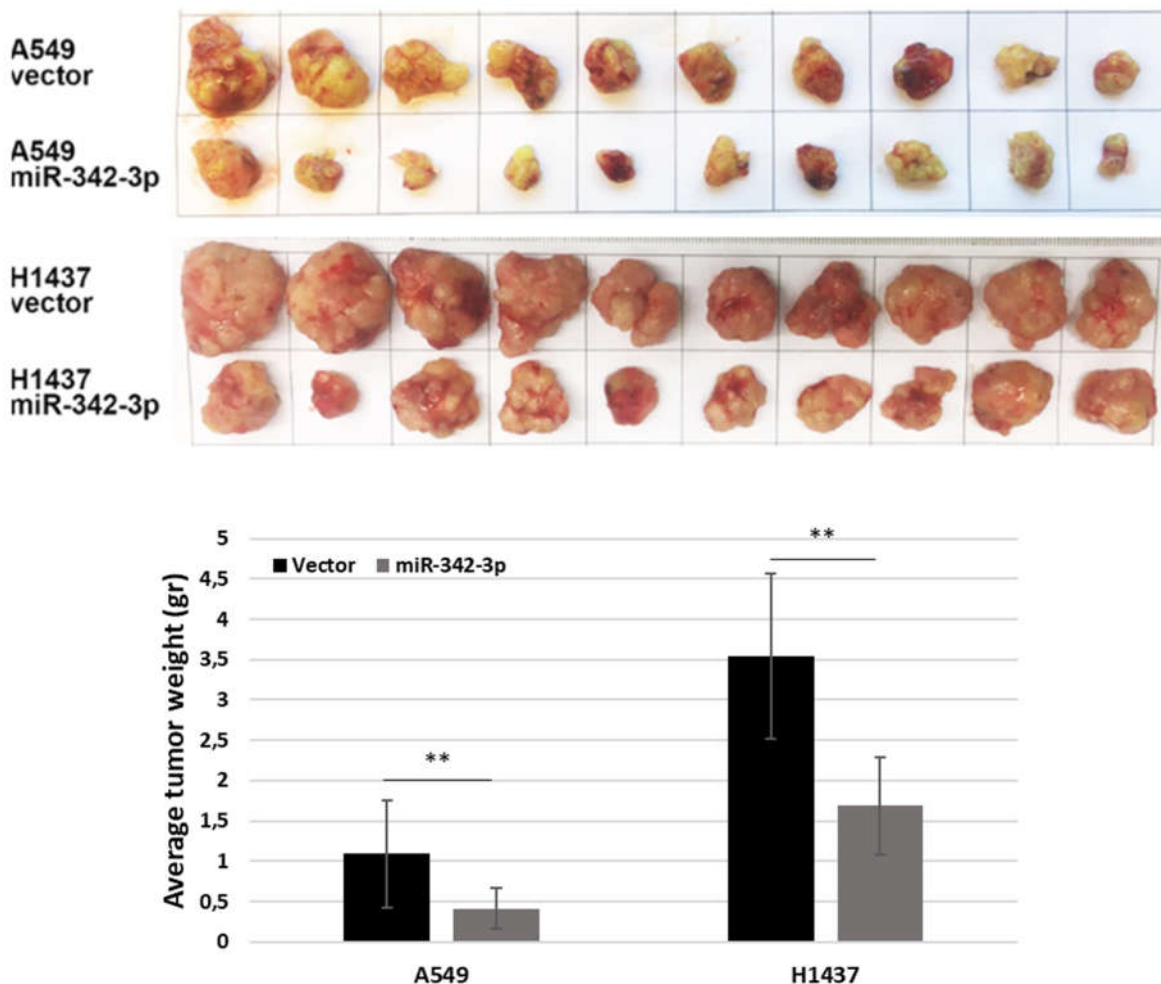


Εικόνα 3.7. Επίπεδα έκφρασης του miR-342-3p στις κυτταρικές σειρές A549 και H1437. Από καλλιιεργούμενα κύτταρα A549-miR-342-3pOE και H1437-miR-342-3pOE αλλά και τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου απομονώθηκε ολικό RNA και μέσω της qPCR ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του miR-342-3p. ** $p < 0.01$ και * $p < 0.05$, οι μπάρες αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση (\pm SD).

3.6 Μελέτη της επίδρασης του miR-342-3p *in vivo*

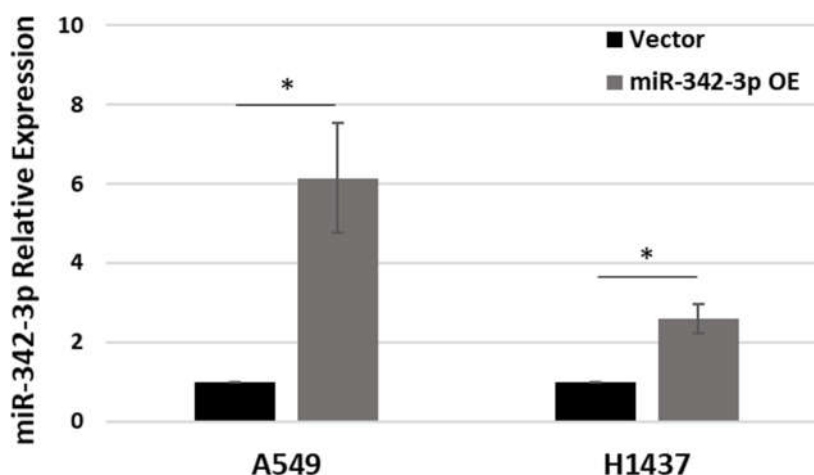
Ειδικά η IKK β και η RelA/p65 είναι απαραίτητη για την καρκινογένεση του πνεύμονα¹⁴⁹⁻¹⁵³ σε διαγονιδιακά ζώα, μελετήσαμε το ρόλο του IKK β -ρυθμιζόμενου miR-342-3p στην ανάπτυξη NSCLC *in vivo*, σε συνεργασία με τον Δρ. Απόστολο Κλινάκη, Ερευνητή Α' και την επιστημονική συνεργάτη Ζωή Κανάκη στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑ). Καρκινικά κύτταρα A549-miR-342-3p^{OE} και H1437-miR-342-3p^{OE} καθώς και τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου εμβολιάστηκαν υποδόρια και

αμφίπλευρα σε αθυμικούς μύες NSG για την ανάπτυξη όγκων. Έπειτα από τρεις εβδομάδες, οι μύες θυσιάστηκαν για την απομόνωση και ανάλυση των όγκων (Εικόνα 3.8). Και στις δύο περιπτώσεις, η υπερέκφραση του miR-342-3p στα καρκινικά κύτταρα είχε σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη στατιστικά σημαντικά μικρότερων σε μέγεθος όγκων σε σύγκριση με τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου. Πιο συγκεκριμένα, η κυτταρική σειρά H1437 παρουσίασε τη μεγαλύτερη διαφορά στο μέγεθος των όγκων, καθώς η υπερέκφραση του miR-342-3p είχε σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη όγκων με βάρος περίπου 2,5 φορές μικρότερο από τα κύτταρα ελέγχου. Στην κυτταρική σειρά A549 το βάρος των όγκων ήταν περίπου 2 φορές μικρότερο (Εικόνα 3.10). Επομένως, τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν τον ογκοκατασταλτικό ρόλο του miR-342-3p στην ανάπτυξη του ανθρώπινου NSCLC *in vivo*.



Εικόνα 3.8. Το miR-342-3p μειώνει την ανάπτυξη του NSCLC *in vivo*. Μετά τον υποδόριο ενοφθαλμισμό κυττάρων ελέγχου και A549-miR-342-3p^{OE} ή H1437-miR-342-3p^{OE} σε αθυμικούς μύες NSG τα ζώα διατηρήθηκαν για ένα διάστημα 3 εβδομάδων κατά το οποίο ανέπτυξαν όγκους. Αντιπροσωπευτικές εικόνες των όγκων που απομονώθηκαν από τους αθυμικούς μύες. Στα διαγράμματα απεικονίζεται το μέσο βάρος των όγκων σε χιλιογραμμάρια. ** $p < 0,01$, οι μπάρες αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση (\pm SD).

Για να επιβεβαιωθεί πως η διαφορά στο μέγεθος των όγκων που αναπτύχθηκαν οφείλεται στην υπερέκφραση του miR-342-3p, απομονώθηκαν ολικά εκχυλίσματα RNA από τους όγκους που αναπτύχθηκαν από τα κύτταρα miR-342-3p^{OE} και τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου, τα οποία αναλύθηκαν με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qPCR) για τη σχετική έκφραση του miR-342-3p (Εικόνα 3.9). Και στις δύο περιπτώσεις το miR-342-3p παρουσίασε στατιστικά σημαντική αυξημένη έκφραση στα κύτταρα miR-342-3p^{OE} σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου.



Εικόνα 3.9. Τα επίπεδα έκφρασης του miR-342-3p σε κύτταρα ξενομοσχευμάτων. Απομονώθηκε ολικό RNA από τους όγκους που αναπτύχθηκαν ως ξενομοσχεύματα και αναλύθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου για την έκφραση του miR-342-3p. Οι όγκοι που αναπτύχθηκαν από τα κύτταρα A549-miR-342-3pOE και H1437-miR-342-3pOE παρουσίασαν στατιστικά σημαντικά αυξημένη έκφραση του miR-342-3p σε σύγκριση με τα αντίστοιχα δείγματα ελέγχου. * $p < 0.05$, οι μπάρες αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση (\pm SD).

3.5. Ταυτοποίηση πιθανών γονιδίων-στόχων του miR-342-3p

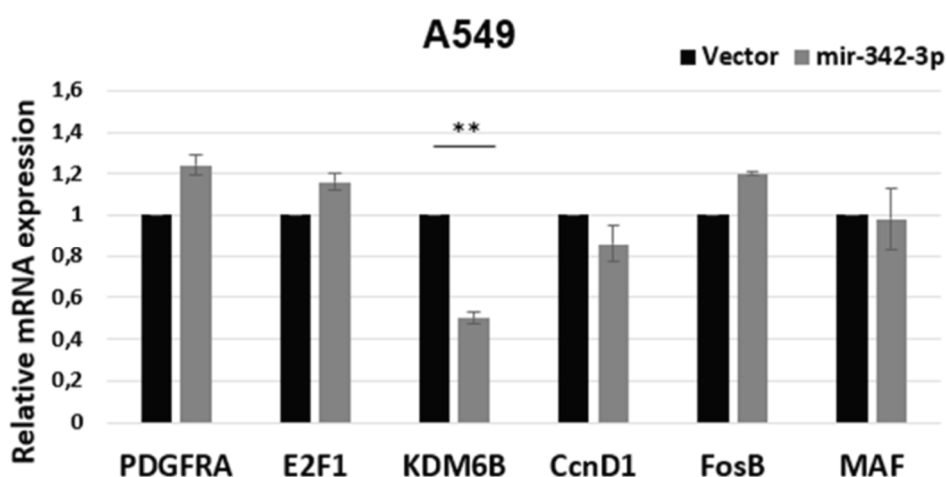
Στη συνέχεια της μελέτης σκοπός ήταν η ταυτοποίηση πιθανών γονιδίων στόχων του miR-342-3p προκειμένου να διερευνηθεί ο μηχανισμός δράσης του. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν αλγόριθμοι πρόβλεψης στόχων. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν ένα σύνολο πιθανών στόχων, και οι στόχοι με το υψηλότερο σκορ παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1. Από αυτό το σύνολο των γονιδίων, έξι γονίδια παρουσίασαν ιδιαίτερο ενδιαφέρον και επιλέχθηκαν για περαιτέρω έλεγχο. Αυτά τα έξι γονίδια ήταν τα *PDGFRA*, *E2F1*, *KDM6B*, *CCND1*, *FOSB* και *MAF*. Για τη μελέτη των επιπέδων έκφρασης των πιθανών γονιδίων στόχων, απομονώθηκε ολικό RNA από τα κύτταρα A549-miR-342-3p^{OE} και τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου, το οποίο αναλύθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qPCR) με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών για τους έξι αυτούς πιθανούς στόχους

(Εικόνα 3.10). Τα αποτελέσματα έδειξαν πως από τα έξι πιθανά γονίδια στόχους μόνο τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *KDM6B*, που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη HMJD3, μια απομεθυλάση της λυσίνης, και αποτελεί μόριο που εμπλέκεται στην αναδιάταξη και ενεργοποίηση της χρωματίνης στον πυρήνα, μειώθηκαν σημαντικά και επομένως το γονίδιο αυτό καταδείχθηκε πως αποτελεί στόχο του miR-342-3p. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώθηκε και στην κυτταρική σειρά H1437 (Εικόνα 3.11).

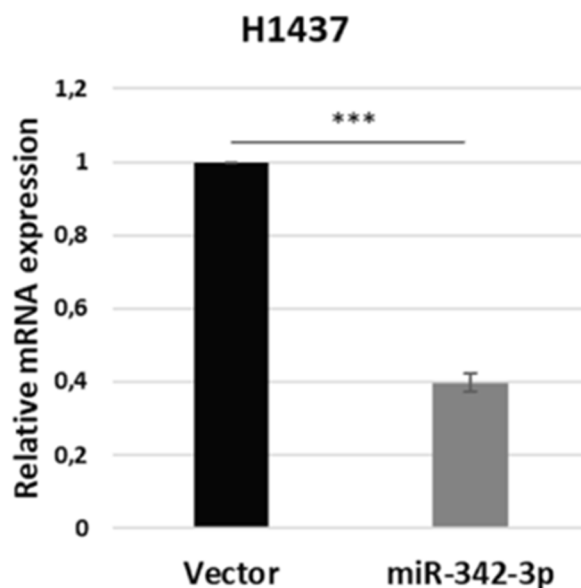
Πίνακας 3.1. Πιθανά γονίδια-στόχοι του miR-342-3p.

Gene Symbol	Uniprot	Integrated Score	Number of Sources
PDGFRA	P16234	0,6227449	13
KDM6B	O15054	0,7142336	11
FOSB	P53539	0,6135071	10
MAF	O75444	0,43754	10
E2F1	Q01094	0,2763938	8
CCND1	P24385	0,2811844	7

Στις στήλες παρουσιάζονται κατά σειρά το όνομα του γονιδιού, ο κωδικός της πρωτεΐνης στη βάση δεδομένων Uniprot, το score που πέτυχε το υποψήφιο γονίδιο-στόχος, δηλαδή το πόσο πιθανό είναι να αποτελεί στόχο του miR-342-3p ανάλογα με τον αριθμό των αλγορίθμων στον οποίο παρουσιάζεται, και τέλος ο αριθμός των αλγορίθμων στους οποίους εμφανίστηκε το συγκεκριμένο γονίδιο.

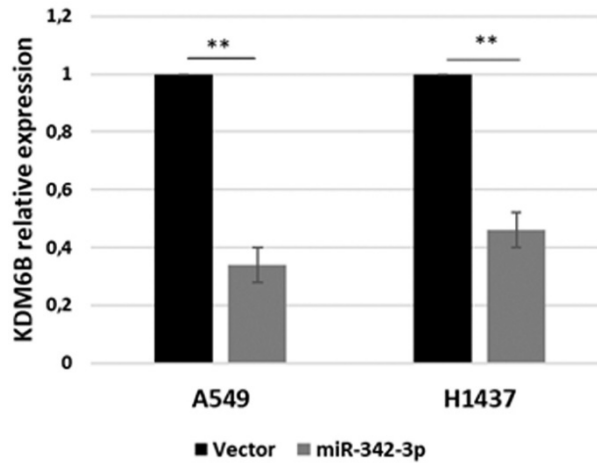


Εικόνα 3.10. Επίπεδα έκφρασης mRNA των πιθανών γονιδίων στόχων του miR-342-3p. Τα επίπεδα έκφρασης των πιθανών γονιδίων στόχων του miR-342-3p αναλύθηκαν με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου σε εκχυλίσματα ολικού RNA των κυττάρων A549-miR-342-3pOE και των αντίστοιχων κυττάρων ελέγχου. Από τα έξι γονίδια σημαντική μείωση της έκφρασης παρατηρήθηκε για το γονίδιο *KDM6B*, η έκφραση του οποίου μειώθηκε κατά δύο φορές στα κύτταρα miR-342-3pOE σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου. $**p < 0.01$, οι μπάρες αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση (\pm SD).



Εικόνα 3.11. Επίπεδα έκφρασης του mRNA του γονιδίου KDM6B στην καρκινική κυτταρική σειρά H1437. Σε καλλιεργούμενα κύτταρα H1437-miR-342-3p και τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου, απομονώθηκε ολικό RNA το οποίο αναλύθηκε με qPCR για τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου KDM6B. *** $p < 0,001$, οι μπάρες αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση (\pm SD).

Στη συνέχεια, μελετήθηκε με qPCR η έκφραση του επιλεγμένου στόχου του miR-342-3p, *KDM6B*. Η έκφραση του *KDM6B* μελετήθηκε σε ολικά δείγματα RNA που απομονώθηκαν από τους όγκους των ανοσοκατεσταλμένων μυών (ξеноμοσχεύματα) που αναπτύχθηκαν από κύτταρα A549-miR-342-3p^{OE} και H1437-miR-342-3p^{OE} και τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου (Εικόνα 3.12.). Παρατηρήθηκε πως η έκφραση του γονιδίου *KDM6B* είναι στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη στους όγκους που έχουν προκύψει από τα κύτταρα που υπερεκφράζουν το miR-342-3p σε σχέση με εκείνους που έχουν προκύψει από τα κύτταρα ελέγχου. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν πως το γονίδιο *KDM6B* αποτελεί στόχο του miR-342-3p όχι μόνο *in vitro* αλλά και *in vivo*.



Εικόνα 3.12. Επίπεδα έκφρασης του KDM6B σε κύτταρα ξενομοσχευμάτων. Σε ολικά δείγματα RNA που απομονώθηκαν από τους όγκους που αναπτύχθηκαν ως ξενομοσχεύματα από τα κύτταρα A549-miR-342-3p, H1437-miR-342-3p και τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου, μελετήθηκε η έκφραση του γονιδίου KDM6B με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου. Η υπερέκφραση του miR-342-3p οδήγησε στα στατιστικά σημαντικά μειωμένα επίπεδα έκφρασης του KDM6B *in vivo*. ** $p < 0,01$, οι μπάρες αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση (\pm SD).

Συνοπτικά, τα αποτελέσματα κατέδειξαν πως η χορήγηση ετοποσιδίου στις καρκινικές κυτταρικές σειρές NSCLC, A549 και H1437 προκαλεί παύση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M. Παράλληλα, επάγει την ενεργοποίηση του μονοπατιού επιδιόρθωσης του DNA ενώ οδηγεί και στην ενεργοποίηση του NF-κB. Επιπλέον, κατέδειξαν πως η αποσιώπηση της κινάσης IKKβ επάγει την έκφραση του miR-342-3p σε συνθήκες γονοτοξικού στρες, το οποίο παρεμποδίζει την ανάπτυξη του NSCLC *in vivo*, μεταξύ άλλων, διαμέσου της στόχευσης του *KDM6B*.

4.Συζήτηση

Οι μεταγραφικοί παράγοντες NF-κB αποτελούν μια οικογένεια πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι ρυθμίζουν μια ποικιλία κυτταρικών διεργασιών όπως είναι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κυτταρική επιβίωση και η διαφοροποίηση. Η εμπλοκή τους σε τόσο σημαντικές κυτταρικές διεργασίες, αλλά και η πληθώρα των γονιδίων-στόχων τους, έχει σαν αποτέλεσμα η απορρύθμισή του να οδηγεί σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις με πιο χαρακτηριστικά παραδείγματα, τα φλεγμονώδη και αυτοάνοσα νοσήματα, τον καρκίνο αλλά και νευροεκφυλιστικές ασθένειες ¹³⁵. Μελέτες έχουν καταδείξει πως η κανονική πορεία ενεργοποίησης του NF-κB παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη αδενοκαρκινώματος μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, ενός τύπου καρκίνου που αποτελεί την πιο συχνή αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως ^{136,137}.

Τα miRNA είναι μικρά, μη-κωδικά, μονόκλωνα μόρια RNA, με μέγεθος μεταξύ 21-23 νουκλεοτιδίων. Τα miRNA έχουν μια ουριδίνη στο 5'-άκρο τους και είναι μερικώς συμπληρωματικά με την 3'-αμετάφραστη περιοχή του αγγελιοφόρου RNA (mRNA). Τα miRNA επιστρατεύουν το πρωτεϊνικό σύμπλοκο Argonaute (AGO) για να έρθουν σε επαφή με το συμπληρωματικό mRNA-στόχο, το οποίο και οδηγεί σε μεταφραστική αναστολή ή σε αποικοδόμηση ή σε από-αδενυλίωση του mRNA ⁴⁶. Πρόσφατες μελέτες κατέδειξαν πως τα miRNA είναι πιθανόν να παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη διάφορων τύπων καρκίνου, δρώντας ως ογκογονίδια, είτε ως ογκοκατασταλτικά γονίδια ¹²⁴. Σύμφωνα με νεότερες έρευνες, το 50% των χαρακτηρισμένων miRNA στον άνθρωπο εντοπίζονται σε περιοχές του γονιδιώματος γνωστές ως «εύθραυστες θέσεις», οι οποίες εμπλέκονται στον καρκίνο ¹³⁸. Είναι λοιπόν ιδιαίτερος σημαντικό να διερευνηθεί η συσχέτιση της έκφρασης των miRNA με τη μεταγραφική πορεία του NF-κB.

4.1. Διακοπή της προόδου του κυτταρικού κύκλου ως απόκριση στη χορήγηση ετοποσιδίου (VP16)

Το ετοποσιδίο (VP16) είναι ένας χημειοθεραπευτικός παράγοντας ο οποίος προκαλεί μονόκλωνες (SSBs) και κυρίως αμφίκλωνες ρήξεις (DSBs) στο DNA καθώς στοχεύει το ένζυμο DNA τοποϊσομεράση II (Topo-II) και σταθεροποιεί τις DSBs. Το VP16 καταστέλλει τη σύνθεση του DNA σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο με την Topo-II και το DNA, το οποίο επάγει τη διακοπή της αντιγραφής του DNA και δημιουργεί DSBs, παρεμποδίζοντας την επιδιόρθωση του DNA από την Topo-II. Το ετοποσιδίο επάγει ακόμη την παραγωγή

δραστικών μορφών οξυγόνου. Ως απόρροια αυτής της δράσης, το ετοποσίδιο χρησιμοποιείται ως αντινεοπλαστικός χημειοθεραπευτικός παράγοντας για τη θεραπεία διαφορετικών τύπων καρκίνου ¹⁰⁵.

Η χορήγηση ετοποσιδίου στις δύο ανθρώπινες καρκινικές σειρές μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, A549 και H1437, ενεργοποίησε την πορεία απόκρισης σε βλάβες του DNA ^{106,121}, όπως καταδείχθηκε από την ενεργοποίηση της πορείας ATM-Chk2-p53 η οποία αποτελεί την άμεση απόκριση των κυττάρων που εκτίθενται σε γονοτοξικούς παράγοντες, με σκοπό την παύση του κυτταρικού κύκλου και την επιδιόρθωση του DNA. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε με ανοσοστύπωμα κατά western η ενεργή (φωσφορυλιωμένη) μορφή των πρωτεϊνών ATM, Chk2 και p53, τα επίπεδα των οποίων αυξήθηκαν κατά δοσοεξαρτώμενο τρόπο έπειτα από τη χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων ετοποσιδίου ¹⁰⁷ (Εικόνα 3.2).

Η ενεργοποίηση της πορείας απόκρισης σε βλάβες στο DNA από το VP16 διαμέσου του άξονα ATM-p53-p21, οδήγησε στη διακοπή της προόδου του κυτταρικού κύκλου στη φάση G₂/M ανεξάρτητα από την κατάσταση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53, όπως αναλύθηκε με κυτταρομετρία ροής και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές πνεύμονα ^{108,154,155} (Εικόνα 3.1).

4.2 Μεταγραφική ενεργοποίηση του NF-κB στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα ως απόκριση σε βλάβες στο DNA

Ορισμένα χημειοθεραπευτικά οδηγούν σε ενεργοποίηση ενώ άλλα σε καταστολή των σηματοδοτικών πορειών του NF-κB, ένα φαινόμενο που εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από τον κυτταρικό τύπο ^{146-148,156-162}.

Το ετοποσίδιο ενεργοποιεί τις σηματοδοτικές πορείες του NF-κB σε ανθρώπινα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα συμπεριλαμβανομένων των καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα, και ιδιαίτερα την κανονική πορεία ενεργοποίησης ΙΚΚβ-p65/p50 ^{156,159,163-165} που εξαρτάται από την πορεία ενεργοποίησης της ATM ^{162,166-168}. Για να μελετηθεί η ενεργοποίηση της κανονικής πορείας του NF-κB υπό την επίδραση του VP16 διενεργήθηκε ανοσοστυπωμα κατά western σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις VP16 (0-5 μM), ενώ ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη. Κυτταροπλασματικά και πυρηνικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν για την έκφραση της υπομονάδας p65. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν ότι το VP16 ενεργοποίησε την κανονική πορεία του NF-κB κυρίως στις

υψηλότερες συγκεντρώσεις των 2,5 και 5 μM και στις δύο κυτταρικές σειρές και ιδιαίτερα στα κύτταρα A549 (Εικόνα 3.3).

4.3. Αύξηση των επιπέδων του miR-342-3p έπειτα από αποσιώπηση της κινάσης IKK β σε συνθήκες γονοτοξικού στρες

Προκειμένου να ερευνηθούν τα miRNA τα οποία ρυθμίζονται από την κανονική πορεία ενεργοποίησης του NF- κB επιλέχθηκε η κυτταρική σειρά A549, γιατί φέρει την αγρίου τύπου μορφή της p53. Επομένως, για τη μελέτη της διαφορικής έκφρασης των miRNA, κατασκευάστηκαν κύτταρα A549 τα οποία έχουν μειορρυθμισμένη την κινάση ενεργοποίησης του NF- κB , IKK β (κύτταρα IKK β^{KD}) (Εικόνα 3.4).

Για την ταυτοποίηση των miRNA που παρουσιάζουν διαφορετικά πρότυπα έκφρασης κατά την αποσιώπηση της κινάσης IKK β χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία Nanostring. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν ένα διαφορετικό πρότυπο έκφρασης για τα miR-494-3p, miR-378i και miR-342-3p τα επίπεδα των οποίων αυξήθηκαν και για τα miR-99a-5p και miR-450a-5p τα επίπεδα των οποίων μειώθηκαν (Εικόνα 3.5).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε το miR-342-3p το οποίο θεωρείται ένα ογκοκατασταλτικό miRNA καθώς μειώνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διήθηση και τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων, ενώ παράλληλα επάγει την απόπτωση και αυξάνει την ευαισθησία των κυττάρων σε διάφορα χημειοθεραπευτικά σκευάσματα¹⁶⁹⁻¹⁷³. Επιπλέον, τα επίπεδα έκφρασής του παρατηρούνται μειωμένα στον καρκίνο του πνεύμονα, συμπεριλαμβανομένων των αδενοκαρκινωμάτων¹³¹, ωστόσο ο μηχανισμός δράσης του δεν είναι κατανοητός. Το miR-342 είναι ένα ιντρονικό miRNA, το οποίο εντοπίζεται μεταξύ του τρίτου και του τέταρτου εξονίου του γονιδίου *EVL* (Enah/Vasp-Like; Chr14q32.2), το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που δεσμεύει την ακτίνη και την προφιλίνη, και η οποία παίζει σημαντικό ρόλο σε διάφορες διαδικασίες, όπως η αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού, η πολικότητα των κυττάρων και η μετανάστευσή τους. Το miR-342 διαθέτει υποκινητή ο οποίος περιλαμβάνει στοιχεία δέσμευσης της υπομονάδας RelA/p65 ενώ είναι γνωστό για τις προ-αποπτωτικές και ογκοκατασταλτικές του ιδιότητες σε διάφορους τύπους καρκίνου. Το miR-342 εμφανίζει σημαντική ογκοκατασταλτική δράση μεταξύ άλλων στη λευχαιμία, στον καρκίνο του μαστού, της κεφαλής και τραχήλου, της μήτρας, του ορθού και του εντέρου, στο ρινοφαρυγγικό καρκίνο αλλά και στον καρκίνο του πνεύμονα^{123,125,174}.

Έχει καταδειχθεί πειραματικά πως τα επίπεδα του miR-342 μειώθηκαν αισθητά σε κυτταρικές σειρές NSCLC, ενώ μειωμένα επίπεδα του miR-342 παρατηρήθηκαν και στον

ορό ατόμων που έπασχαν από NSCLC (τόσο με αδενοκαρκίνωμα όσο και με καρκίνο του πλακώδους επιθηλίου) σε σχέση με υγιή άτομα, σε βαθμό που να υποδεικνύεται ο κλινικός διαχωρισμός. Επιπλέον, τα χαμηλά επίπεδα του miR-342 σχετίζονται με πτωχή πρόγνωση του NSCLC, που σημαίνει είτε προχωρημένο στάδιο της νόσου είτε μετάσταση στους λεμφαδένες. Αυτό καθιστά το miR-342-3p έναν πιθανό προληπτικό και προγνωστικό στόχο για το NSCLC, ενώ δημιουργείται και η υπόθεση πως τα καρκινικά κύτταρα στον πνεύμονα παράγουν σημαντικά μικρότερες ποσότητες miR-342-3p, με αποτέλεσμα τα μειωμένα επίπεδα του miR στα δείγματα ορού από ασθενείς με NSCLC. Αξίζει εδώ να σημειωθεί πως η έκφραση του miR-342-3p ήταν ιδιαίτερα μειωμένη σε ασθενείς με NSCLC με αναδιατάξεις στο γονίδιο *ALK* σε σχέση με εκείνους με μεταλλάξεις στο *EGFR* ή το *KRAS*, ενώ το miR-342 αποδείχθηκε πως αναστέλλει την αύξηση και την ανάπτυξη και των κυττάρων μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα. Ωστόσο τα δεδομένα αυτά χρειάζονται περαιτέρω έλεγχο και επιβεβαίωση ¹⁴¹.

Έχει καταδειχθεί ότι σε κυτταρικές σειρές NSCLC υπάρχει μειορρύθμιση του miR-342-3p, ενώ όταν επάγεται υπερέκφραση του miR-342-3p καταστέλλεται σημαντικά ο πολλαπλασιασμός κυττάρων NSCLC. Σε περαιτέρω έλεγχο των αιτίων αυτής της καταστολής φάνηκε πως η RAP2B (Ras-related protein Rap-2b) αποτελεί στόχο του miR-342-3p, μέσω στόχευσης της 3'-αμετάφραστης περιοχής του mRNA που μεταφράζεται σε πρωτεΐνη. Επίσης, όταν η RAP2B υπερεκφράζεται, χωρίς την 3'-αμετάφραστη περιοχή του mRNA, τότε, ακόμα και αν υπερεκφράζεται το miR-342-3p, ο πολλαπλασιασμός, η μεταστατικότητα και η διείσδυση των καρκινικών κυττάρων του NSCLC διατηρούνται σε υψηλά επίπεδα. Ένας ενδιαφέρων συσχετισμός που προέκυψε από τη μελέτη αυτή είναι πως, επειδή σε κύτταρα από καρκίνο του πνεύμονα τα επίπεδα της RAP2B είναι αρκετά υψηλά σε σχέση φυσιολογικά κύτταρα, και εφόσον τα επίπεδα έκφρασης της RAP2B και του miR-342-3p είναι αντιστρόφως ανάλογα σε ιστούς NSCLC, είναι ιδιαίτερα πιθανόν το γεγονός πως η αυξορρύθμιση της RAP2B έρχεται ως αποτέλεσμα της καταστολής του miR-342-3p στον NSCLC ¹⁴². Σε παρόμοια έρευνα για την πρωτεΐνη AGR2, δείχθηκε πως η AGR2 αποτελεί στόχο του miR-342-3p, το οποίο στοχεύει την 3'-αμετάφραστη περιοχή του mRNA της πρωτεΐνης. Η καταστολή της AGR2 από το miR-342-3p οδηγεί σε ραγδαία αναστολή του πολλαπλασιασμού καθώς και της μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων. Όταν η έκφραση της AGR2 αποκαθίσταται επάγεται η ενεργοποίηση του μονοπατιού AKT. Με την αποκατάσταση των φυσιολογικών επιπέδων της AGR2 σε καρκινικά κύτταρα πνεύμονα, παρατηρείται αυξημένη βιωσιμότητα των κυττάρων, σχηματισμός αποικιών και μετανάστευση. Καταδεικνύεται έτσι ο ρόλος του miR-342-3p ως ογκοκαταστολέα, μέσω

της στόχευσης της AGR2. Ταυτόχρονα, με τη χρήση qRT-PCR και ανοσοϊστοχημείας, δείχθηκε πως τα επίπεδα της AGR2 και του mRNA της ήταν αρκετά αυξημένα σε μεταστατικούς ιστούς NSCLC σε σχέση με φυσιολογικούς ιστούς πνεύμονα, γεγονός που δείχνει πως η AGR2 λειτουργεί ως ογκογονίδιο στον NSCLC ¹⁴³.

Συμπερασματικά, το miR-342-3p φαίνεται να διαδραματίζει έναν ογκοκατασταλτικό ρόλο στον καρκίνο του πνεύμονα, ωστόσο ο μηχανισμός δράσης του δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Επομένως, στη συνέχεια της μελέτης μας εστίασαμε στη διερεύνηση του ρόλου του miR-342-3p.

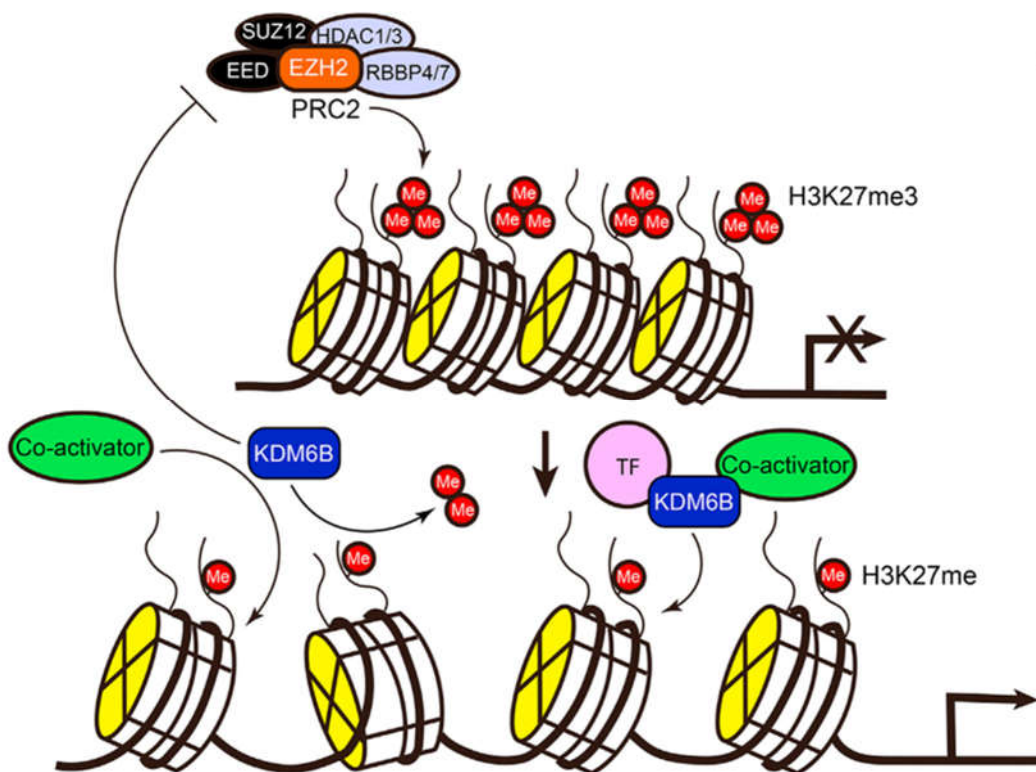
4.4. Ταυτοποίηση του γονιδίου *KDM6B* ως στόχο του miR-342-3p

Προκειμένου, να μελετηθεί περαιτέρω ο ρόλος του miR-342-3p και να ταυτοποιηθούν πιθανά mRNA στόχοι χρησιμοποιήθηκαν αλγόριθμοι πρόβλεψης στόχων, οι οποίοι κατέδειξαν μια σειρά από πιθανούς στόχους του miR-342-3p. Μεταξύ των στόχων 6 γονίδια παρουσίασαν ιδιαίτερο ενδιαφέρον (Πίνακας 3.1). Αυτά ήταν το γονίδιο του μεταγραφικού παράγοντα FOSB, που εμπλέκεται στη ρύθμιση διαδικασιών όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και ο μετασχηματισμός, το γονίδιο του υποδοχέα PDGFRA, ο οποίος επίσης οδηγεί σε ενεργοποίηση μονοπάτια που προάγουν την κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση, το γονίδιο του μεταγραφικού παράγοντα MAF, που αποτελεί γνωστό πρωτο-ογκογονίδιο, το γονίδιο του μεταγραφικού παράγοντα E2F1, που έχει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και στη δράση ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών, το γονίδιο της κυκλίνης D1, *CCND1*, που είναι εξαιρετικά σημαντική στη φάση G₁ του κυτταρικού κύκλου, και τέλος το γονίδιο *KDM6B*. Για αυτά τα 6 γονίδια ενδιαφέροντος πραγματοποιήθηκε qPCR και βρέθηκε πως τα επίπεδα έκφρασης του mRNA του γονιδίου *KDM6B* υφίστανται σημαντική μειορρύθμιση όταν υπάρχει υπερέκφραση του miR-342-3p.

Το γονίδιο *KDM6B* (JMJD3) κωδικοποιεί μια απομεθυλάση της λυσίνης των ιστονών η οποία αφαιρεί μεθυλομάδες από τις θέσεις H3K27me₃, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την έκφραση των γονιδίων-στόχων της. Μελέτες έχουν καταδείξει πως η απομεθυλάση της λυσίνης *KDM6B*, αποτελεί μια κρίσιμη απομεθυλάση των ιστονών σε διάφορες φυσιολογικές ή παθολογικές καταστάσεις όπως η φλεγμονή, η κυτταρική ανάπτυξη και γήρανση ή και ο καρκίνος μεταξύ άλλων. Ο εντοπισμός της *KDM6B* στο κύτταρο ρυθμίζεται μεταξύ του κυτταροπλάσματος και του πυρήνα, ως απόκριση σε εξωκυττάρια

σήματα ή σε εξωγενές στρες. Η εξαπορτινή α είναι υπεύθυνη για την έξοδο της από τον πυρήνα και η ιμπορτινή α για την εισαγωγή της¹⁷⁵.

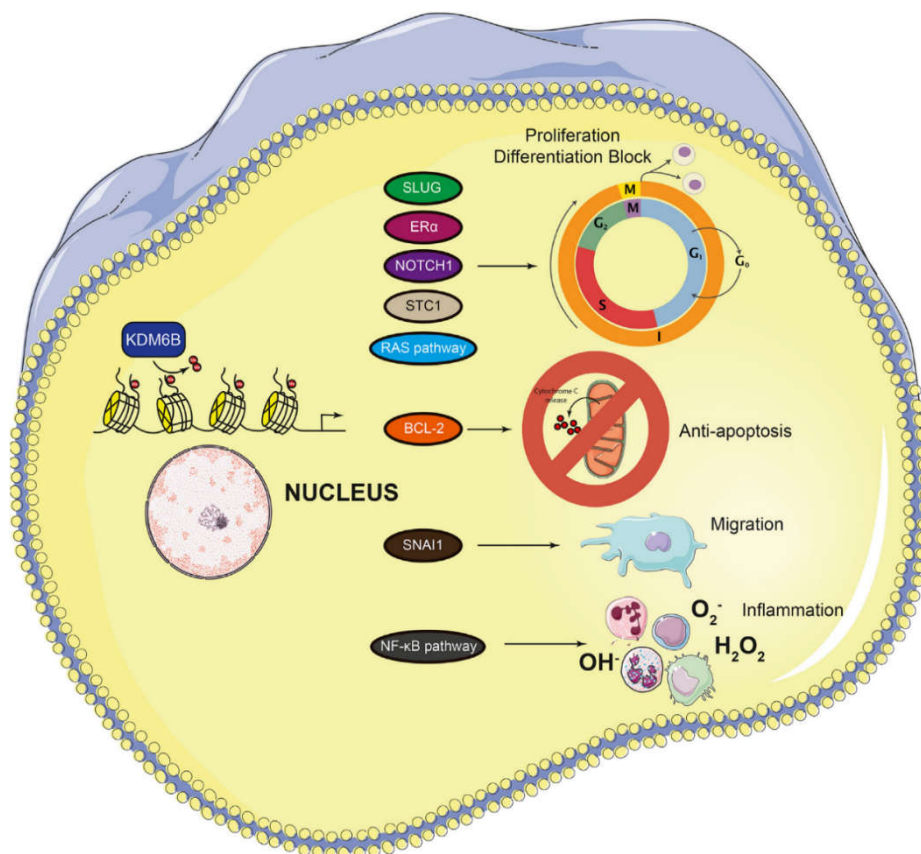
Η KDM6B μπορεί να προάγει τη γονιδιακή μεταγραφή με τρόπο εξαρτώμενο ή ανεξάρτητο από την ενεργότητά της ως απομεθυλάση (Εικόνα 4.1.). Ο πρώτος μπορεί να συμβεί με απομεθυλίωση της H3K27me3 στον υποκινητή των γονιδίων-στόχων του, αποτρέποντας τη δέσμευση των κατασταλικών συμπλεγμάτων PRC2 ή δεσμεύοντας το σύμπλοκο επιμήκυνσης Pol II και βελτιώνοντας την αποτελεσματικότητά στις περιοχές όπου τα γονίδια είναι πλούσια σε H3K27me3. Ο δεύτερος τρόπος πραγματοποιείται με τη στρατολόγηση συν-ενεργοποιητών στους υποκινητές των γονιδίων-στόχων και τη μεσολάβηση στην αλληλεπίδρασή τους με μεταγραφικούς παράγοντες¹⁷⁵.



Εικόνα 4.1. Οι μηχανισμοί με τους οποίους η KDM6B προάγει τη γονιδιακή μεταγραφή. Η KDM6B μπορεί να προάγει τη γονιδιακή μεταγραφή με τρόπο που εξαρτάται ή όχι από την ενεργότητα της απομεθυλάσης, είτε αφαιρώντας τη H3K27me3 στον υποκινητή των γονιδίων-στόχων και αποτρέποντας τη δέσμευση του PRC2, είτε στρατολογώντας συν-ενεργοποιητές και μεσολαβώντας στην αλληλεπίδρασή τους με μεταγραφικούς παράγοντες (TF)¹⁷⁵.

Ωστόσο, η υπερέκφραση της KDM6B οδηγεί σε ανεξέλεγκτη μεταγραφή και καταστροφή της δομής του πυρήνα λόγω των μειωμένων επιπέδων H3K27me3. Είναι γνωστό πως η KDM6B μπορεί να λειτουργήσει τόσο ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο όσο και ως

ογκογονίδιο, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο ¹⁷⁵. Η ογκογόνος δράση της KDM6B μπορεί να φανεί μέσα από διάφορους μηχανισμούς οι οποίοι προάγουν τον πολλαπλασιασμό, τη φλεγμονή και τη μετανάστευση, αλλά και οδηγούν τα κύτταρα στην αποφυγή της διαφοροποίησης και της απόπτωσης. Παραδείγματος χάριν, η έκφραση της KDM6B αυξάνεται σημαντικά σε πρώιμα στάδια του καρκίνου του παγκρέατος, σε σχέση με φυσιολογικά κύτταρα, ενώ όσο η νόσος προχωρά τα επίπεδα της απομεθυλάσης μειώνονται, δείχνοντας έτσι το σημαντικό ρόλο που κατέχει στην καρκινογένεση. Στο χονδροσάρκωμα και στο χόρδωμα, η επαγόμενη αποσιώπηση της KDM6B οδηγεί σε μειωμένη επιβίωση και πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, ενώ στο οστεοσάρκωμα η αποσιώπηση της αυξάνει την αποτελεσματικότητα της σισπλατίνης (cisplatin) μέσω της μείωσης των καρκινικών βλαστικών κυττάρων και την αναστολή των αντιαποπτωτικών μονοπατιών. Η υπερέκφραση της KDM6B στον καρκίνο του στομάχου συνδέεται με πτωχή κλινική πρόγνωση.



Εικόνα 4.2. Το KDM6B ως ογκογονίδιο. Η KDM6B, μέσω της ρύθμισης συγκεκριμένων γονιδίων και της αλληλεπίδρασης με ορισμένες πρωτεΐνες, μπορεί να προάγει τον πολλαπλασιασμό, τη φλεγμονή και τη μετανάστευση, αλλά και να οδηγήσει σε αποφυγή της διαφοροποίησης και της απόπτωσης, μεταξύ άλλων ¹⁷⁵.

Στον καρκίνο του πλακώδους επιθηλίου του οισοφάγου η υπερέκφραση της *KDM6B* επάγεται από την πορεία RAS/MEK, και συνδέεται με χαμηλή επιβίωση των ασθενών, ενώ στα κύτταρα του μελανώματος προωθεί την ανάπτυξη του όγκου μέσω της ενεργοποίησης της πορείας PI3K και επάγει την αυτοανανέωση μέσω της υπερέκφρασης της STC1. Στον καρκίνο του προστάτη η υπερέκφραση της *KDM6B* συνδέεται με το στάδιο της νόσου, με τα επίπεδά της να είναι πολύ αυξημένα στο στάδιο της μετάστασης¹⁷⁵.

Για τον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, μια σειρά από μελέτες έχουν καταδείξει πως το γονίδιο *KDM6B* έχει ογκογόνο δράση. Έχει παρατηρηθεί πως η *KDM6B* είναι ρυθμιστής της έκφρασης της συντενίνης, στις οποίες τον υποκινητή προσδένεται και απομεθυλιώνει, η οποία με τη σειρά της προάγει την ενεργοποίηση της Smad μέσω του TGF-β1 και έτσι την EMT, όπου και πάλι εμφανίζονται γονίδια-στόχοι της *KDM6B*, τα *INHBB*, *WNT5B* και *ADAMTS6*, που μπορούν να επηρεάσουν τη διεισδυτική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων^{176,177}. Τα επίπεδα της *KDM6B* είναι αρκετά υψηλά σε καρκινικά κύτταρα πνεύμονα σε σχέση με φυσιολογικά κύτταρα με την έκφρασή της να ρυθμίζεται από τη Ras, ενώ στους ασθενείς με υψηλά ποσοστά παρατηρείται μεγαλύτερη μεταστατικότητα στους λεμφαδένες και χαμηλότερα επίπεδα επιβίωσης. Η ενζυμική δράση της *KDM6B* μπορεί να αποτελεί έναν σημαντικό θεραπευτικό στόχο στον ανθρώπινο καρκίνο του πνεύμονα^{176,178}.

Για να επιβεβαιωθεί πειραματικά ότι το *KDM6B* αποτελεί στόχο του miR-342-3p, κατασκευάστηκαν κύτταρα A549 και H1437 που υπερεκφράζουν το miR-342-3p. (Εικόνα 3.6 και 3.7). Στα κύτταρα αυτά αλλά και τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του mRNA του γονιδίου *KDM6B* με ποσοτική αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν πως τα επίπεδα έκφρασης του *KDM6B* μειώθηκαν στατιστικά σημαντικά και στις δύο κυτταρικές σειρές (Εικόνα 3.8 και 3.9) και επομένως επιβεβαιώθηκε πως το *KDM6B* αποτελεί στόχο του miR-342-3p.

Στη συνέχεια, για να μελετηθεί η επίδραση του miR-342-3p *in vivo*, κύτταρα A549-miR-342-3p^{OE} και H1437-miR-342-3p^{OE} και τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου, εμβολιάστηκαν αμφίπλευρα σε αθυμικούς μύες, για την ανάπτυξη όγκων. Οι όγκοι που αναπτύχθηκαν από τα κύτταρα με υπερέκφραση του miR-342-3p οδήγησαν στην ανάπτυξη όγκων στατιστικά σημαντικά μικρότερων σε μέγεθος σε σύγκριση με τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου (Εικόνα 3.10). Τα δεδομένα αυτά καταδεικνύουν τον ογκοκατασταλτικό ρόλο του miR-342-3p στον καρκίνο του πνεύμονα *in vivo* και ενισχύουν προηγούμενες μελέτες όπου το miR-342-3p έχει καταδειχθεί ότι φέρει ογκοκατασταλτική δράση¹⁷⁹.

Για την περαιτέρω διερεύνηση του μηχανισμού δράσης του miR-342-3p *in vivo* απομονώθηκε RNA από τους όγκους των ποντικών, το οποίο αναλύθηκε με qPCR αρχικά για τα επίπεδα έκφρασης του miR-342-3p, όπου επιβεβαιώθηκε η υπερέκφραση του miR-342-3p στους όγκους που αναπτύχθηκαν από τα κύτταρα A549-miR-342-3p και H1437-miR-342-3p σε σύγκριση με τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου (Εικόνα 3.11). Επιπλέον, τα δείγματα αυτά αναλύθηκαν για την έκφραση του *KDM6B* όπου επιβεβαιώθηκε η στατιστικά σημαντικά μειωμένη έκφρασή του στα κύτταρα που υπερεκφράζουν το miR-342-3p (Εικόνα 3.12). Συνεπώς, και στις δύο κυτταρικές σειρές καρκίνου του πνεύμονα, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, καταδείχθηκε πως το γονίδιο *KDM6B* αποτελεί στόχο του miR-342-3p.

Συνολικά, η παρούσα μελέτη κατέδειξε ένα νέο μηχανισμό δράσης της κανονικής πορείας IKKβ/NF-κB υπό την επίδραση γονοτοξικού ερεθίσματος στον καρκίνο του πνεύμονα. Η αποσιώπηση της κινάσης IKKβ οδηγεί στην αύξηση των επιπέδων του ογκοκατασταλτικού miR-342-3p, το οποίο με τη σειρά του μειώνει τα επίπεδα της απομεθυλάσης *KDM6B*, συμβάλλοντας στη μείωση της ανάπτυξης του όγκου. Ωστόσο, περαιτέρω μελέτη απαιτείται για την αποσαφήνιση του μηχανισμού δράσης της *KDM6B* στο NSCLC.

5. Συμπεράσματα

- Ο χημειοθεραπευτικός παράγοντας ετοποσίδιο (VP16), επάγει τη συσσώρευση ανθρωπίνων καρκινικών κυττάρων πνεύμονα στη φάση G2/M του κυτταρικού κύκλου, ανεξάρτητα από την κατάσταση της p53, διαμέσου της ενεργοποίησης της πορείας ATM-Chk2, που επάγεται έπειτα από βλάβες στο DNA.
- Το VP16 επάγει την ενεργοποίηση της κανονικής πορείας του NF-κB.
- Η αναστολή της ενεργοποίησης της κανονικής πορείας του NF-κB υπό συνθήκες γονοτοξικού στρες οδηγεί στην αύξηση των επιπέδων του miR-342-3p.
- Το miR-342-3p στοχεύει το mRNA του γονιδίου *KDM6B*, μεταξύ άλλων, και παρεμποδίζει την ανάπτυξη του NSCLC τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*.

Βιβλιογραφία

1. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF- κ B. *Genes Dev.* 2004;18(18):2195-2224.
2. Bonizzi G, Karin M. The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 2004;25(6):280-288.
3. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene.* 1999;18(49):6853-6866.
4. Taniguchi K, Karin M. NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: Coming of age. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(5):309-324. doi:10.1038/nri.2017.142
5. Perkins ND. The diverse and complex roles of NF- κ B subunits in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(2):121-132.
6. Dimitrakopoulos FID, Kottorou AE, Kalofonou M, Kalofonos HP. The fire within: NF- κ B involvement in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2020;80(19):4025-4036.
7. Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF- κ B and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(1):49-62.
8. Karin M. NF- κ B as a critical link between inflammation and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(5):1-15. doi:10.1101/cshperspect.a000141
9. Kucharczak J, Simmons MJ, Fan Y, G elinas C. To be, or not to be: NF- κ B is the answer - Role of Rel/NF- κ B in the regulation of apoptosis. *Oncogene.* 2003;22(56 REV. ISS. 8):8961-8982.
10. Karin M, Yamamoto Y, Wang QM. The IKK NF- κ B system: A treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(1):17-26.
11. Pande V, Ramos M. NF- κ B in Human Disease: Current Inhibitors and Prospects for De Novo Structure Based Design of Inhibitors. *Curr Med Chem.* 2012;12(3):357-374.
12. Zorn H. Celebrating 25 years of ideas. *JEC Compos Mag.* 2012;49(70):10-11.
13. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF- κ B and rel proteins: Evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:225-260.
14. Perkins ND. The Rel/NF- κ B family: Friend and foe. *Trends Biochem Sci.* 2000;25(9):434-440.
15. Perkins ND. Achieving transcriptional specificity with NF- κ B. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997;29(12):1433-1448.
16. Viatour P, Merville MP, Bours V, Chariot A. Phosphorylation of NF- κ B and I κ B proteins: Implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem Sci.* 2005;30(1):43-52.
17. Nelson DE, Ihekwaba AEC, Elliott M, et al. Oscillations in NF- κ B signaling control the dynamics of gene expression. *Science (80-).* 2004;306(5696):704-708.
18. Campbell KJ, Perkins ND. Post-translational modification of RelA(p65) NF- κ B. *Biochem Soc Trans.* 2004;32(6):1087-1089.
19. Hoffmann A, Levchenko A, Scott ML, Baltimore D. The I κ B-NF- κ B signaling module: Temporal control and selective gene activation. *Science (80-).* 2002;298(5596):1241-1245.
20. Saccani S, Pantano S, Natoli G. Modulation of NF- κ B activity by exchange of dimers. *Mol Cell.* 2003;11(6):1563-1574.
21. Imbert V, Rupec RA, Livolsi A, et al. Tyrosine phosphorylation of I kappa B-alpha

- activates NF-kappa B without proteolytic degradation of I kappa B-alpha. *Cell*. 1996;86(5):787-798.
22. Schoonbroodt S, Ferreira V, Best-Belpomme M, et al. Crucial Role of the Amino-Terminal Tyrosine Residue 42 and the Carboxyl-Terminal PEST Domain of IκBα in NF-κB Activation by an Oxidative Stress. *J Immunol*. 2000;164(8):4292-4300.
 23. Bui NT, Livolsi A, Peyron JF, Prehn JHM. Activation of nuclear factor κB and bcl-x survival gene expression by nerve growth factor requires tyrosine phosphorylation of IκBα. *J Cell Biol*. 2001;152(4):753-763.
 24. Huang TT, Wuerzberger-Davis SM, Wu ZH, Miyamoto S. Sequential Modification of NEMO/IKKγ by SUMO-1 and Ubiquitin Mediates NF-κB Activation by Genotoxic Stress. *Cell*. 2003;115(5):565-576.
 25. Mussbacher M, Salzmann M, Brostjan C, et al. Cell type specific roles of nf-kb linking inflammation and thrombosis. *Front Immunol*. 2019;10(FEB).
 26. Hoberg JE, Yeung F, Mayo MW. SMRT Derepression by the IκappaB Kinase alpha : A Prerequisite to NF-kappa B Transcription and Survival. *Mol Cell*. 2004;16:245-255.
 27. Gringhuis SI, García-Vallejo JJ, van het Hof B, van Dijk W. Convergent Actions of IκB Kinase β and Protein Kinase Cδ Modulate mRNA Stability through Phosphorylation of 14-3-3β Complexed with Tristetraprolin. *Mol Cell Biol*. 2005;25(15):6454-6463.
 28. Miyamoto S. Nuclear initiated NF-κB signaling: NEMO and ATM take center stage. *Cell Res*. 2011;21(1):116-130.
 29. Hu Y, Baud V, Oga T, Kim K Il, Yoshida K, Karin M. IKKα controls formation of the epidermis independently of NF-κB. *Nature*. 2001;410(6829):710-714.
 30. Ohazama A, Hu Y, Schmidt-Ullrich R, et al. A dual role for Ikkα in tooth development. *Dev Cell*. 2004;6(2):219-227.
 31. Bracken CP, Whitelaw ML, Peet DJ. Activity of hypoxia-inducible factor 2α is regulated by association with the NF-κB essential modulator. *J Biol Chem*. 2005;280(14):14240-14251.
 32. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science (80-)*. 2001;294(5543):862-864.
 33. Felekis K, Touvana E, Stefanou C, Deltas C. MicroRNAs: A newly described class of encoded molecules that play a role in health and disease. *Hippokratia*. 2010;14(4):236-240.
 34. Friedländer MR, Lizano E, Houben AJS, et al. Evidence for the biogenesis of more than 1,000 novel human microRNAs. *Genome Biol*. 2014;15(4):1-17.
 35. Kozomara A, Griffiths-Jones S. MiRBase: Integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(SUPPL. 1):1-6.
 36. Bentwich I, Avniel A, Karov Y, et al. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet*. 2005;37(7):766-770.
 37. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: Are the answers in sight? *Nat Rev Genet*. 2008;9(2):102-114.
 38. Sætrom P, Heale BSE, Snøve O, Aagaard L, Alluin J, Rossi JJ. Distance constraints between microRNA target sites dictate efficacy and cooperativity. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(7):2333-2342.
 39. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000;403(6772):901-906.
 40. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science (80-)*. 2001;294(5543):853-858.

41. Wu L, Fan J, Belasco JG. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(11):4034-4039.
42. Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: Stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*. 2002;21(17):4663-4670.
43. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs Modulate Hematopoietic Lineage Differentiation. *Science (80-)*. 2004;303(5654):83-86.
44. Monteys AM, Spengler RM, Wan J, et al. Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *Rna*. 2010;16(3):495-505.
45. Martinez NJ, Ow MC, Barrasa MI, et al. A C. elegans genome-scale microRNA network contains composite feedback motifs with high flux capacity. *Genes Dev*. 2008;22(18):2535-2549.
46. Aravin AA, Lagos-Quintana M, Yalcin A, et al. The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev Cell*. 2003;5(2):337-350.
47. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific MicroRNAs from mouse. *Curr Biol*. 2002;12(9):735-739.
48. MacRae IJ, Doudna JA. Ribonuclease revisited: structural insights into ribonuclease III family enzymes. *Curr Opin Struct Biol*. 2007;17(1):138-145.
49. Lau PW, Guiley KZ, De N, Potter CS, Carragher B, MacRae IJ. The molecular architecture of human Dicer. *Nat Struct Mol Biol*. 2012;19(4):436-440.
50. Sanghvi VR, Steel LF. The Cellular TAR RNA Binding Protein, TRBP, Promotes HIV-1 Replication Primarily by Inhibiting the Activation of Double-Stranded RNA-Dependent Kinase PKR. *J Virol*. 2011;85(23):12614-12621.
51. Yang N, Cao Y, Han P, Zhu X, Sun L, Li G. Tools for investigation of the RNA endonuclease activity of mammalian argonaute2 protein. *Anal Chem*. 2012;84(5):2492-2497.
52. Tolia NH, Joshua-Tor L. Slicer and the Argonautes. *Nat Chem Biol*. 2007;3(1):36-43.
53. Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(6):321-333.
54. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T. Cancer Statistics , 2007. 2007;57(1):43-66.
55. Caudy AA, Hammond SM, Rauhut R, et al. A microRNA in a Multiple- Turnover RNAi Enzyme Complex. 2002;297(September):2056-2061.
56. Lai EC. Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat Genet*. 2002;30(4):363-364.
57. Wang L, Xiong Y, Sun Y, et al. HlungDB: An integrated database of human lung cancer research. *Nucleic Acids Res*. 2009;38(SUPPL.1):665-669.
58. Herbst. Lung cancer Lung cancer Lung cancer. *Conn's Curr Ther 2020*. 2013;2030(November):133-141. <https://www.nhs.uk/conditions/lung-cancer/>
59. Aviel-Ronen S, Blackhall FH, Shepherd FA, Tsao MS. K-ras mutations in non-small-cell lung carcinoma: A review. *Clin Lung Cancer*. 2006;8(1):30-38.
60. Reissmann PT, Koga H, Figlin RA, Holmes EC, Slamon DJ. Amplification and overexpression of the cyclin D1 and epidermal growth factor receptor genes in non-small-cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1999;125(2):61-70.
61. Shimizu S, Mitsudomi T. Molecular abnormalities in lung cancer. *Nippon rinsho Japanese J Clin Med*. 2002;60 Suppl 5(3):73-77.
62. Shigematsu H, Takahashi T, Nomura M, et al. Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas. *Cancer Res*. 2005;65(5):1642-1646.
63. Irby RB, Yeatman TJ. Role of Src expression and activation in human cancer. *Oncogene*. 2000;19(49):5636-5642.

64. Irby RB, Mao W, Coppola D, et al. Activating SRC mutation in a subset of advanced human colon cancers. *Nat Genet.* 1999;21(2):187-190.
65. Mazurenko NN, Zborovskaya IB, Kissel'ov FL, Kogan EA. Expression of pp60c-src in human small cell and non-small cell lung carcinomas. *Eur J Cancer.* 1992;28(2-3):372-377.
66. Song L, Turkson J, Karras JG, Jove R, Haura EB. Activation of Stat3 by receptor tyrosine kinases and cytokines regulates survival in human non-small cell carcinoma cells. *Oncogene.* 2003;22(27):4150-4165.
67. Sasaki T, Rodig SJ, Chirieac LR, Jänne PA. The biology and treatment of EML4-ALK non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer.* 2010;46(10):1773-1780.
68. Ding L, Getz G, Wheeler DA, et al. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature.* 2008;455(7216):1069-1075.
69. Slack-Davis J, DaSilva JO, Parsons SJ. LKB1 and Src: Antagonistic Regulators of Tumor Growth and Metastasis. *Cancer Cell.* 2010;17(6):527-529.
70. Classon M, Harlow E. The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(12):910-917.
71. Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell.* 2002;2(2):103-112.
72. Grasemann C, Gratiass S, Stephan H, et al. Gains and overexpression identify DEK and E2F3 as targets of chromosome 6p gains in retinoblastoma. *Oncogene.* 2005;24(42):6441-6449.
73. Olsson AY, Feber A, Edwards S, et al. Role of E2F3 expression in modulating cellular proliferation rate in human bladder and prostate cancer cells. *Oncogene.* 2007;26(7):1028-1037.
74. Ho VM, Schaffer BE, Karnezis AN, Park KS, Sage J. The retinoblastoma gene Rb and its family member p130 suppress lung adenocarcinoma induced by oncogenic K-Ras. *Oncogene.* 2009;28(10):1393-1399.
75. Engels EA, Wu X, Gu J, Dong Q, Liu J, Spitz MR. Systematic evaluation of genetic variants in the inflammation pathway and risk of lung cancer. *Cancer Res.* 2007;67(13):6520-6527.
76. Wenzlaff AS, Cote ML, Bock CH, et al. CYP1A1 and CYP1B1 polymorphisms and risk of lung cancer among never smokers: A population-based study. *Carcinogenesis.* 2005;26(12):2207-2212.
77. Son JW, Kang HK, Chae MH, et al. Polymorphisms in the caspase-8 gene and the risk of lung cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 2006;169(2):121-127.
78. Yin J, Vogel U, Ma Y, Qi R, Sun Z, Wang H. The DNA repair gene XRCC1 and genetic susceptibility of lung cancer in a northeastern Chinese population. *Lung Cancer.* 2007;56(2):153-160.
79. Zöchbauer-Müller S, Fong KM, Virmani AK, Geradts J, Gazdar AF, Minna JD. Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Res.* 2001;61(1):249-255.
80. Kersting BM, Friedl C, Kraus A, Behn M, Pankow W, Schuermann M. Differential Frequencies of p16 INK4a Promoter Hypermethylation, p53 Mutation, and K-ras Mutation in Exfoliative Material Mark the Development of Lung Cancer in Symptomatic Chronic Smokers. 2019;18(18):3221-3229.
81. Sato M, Mori Y, Sakurada A, Fujimura S, Horii A. The H-cadherin (CDH13) gene is inactivated in human lung cancer. *Hum Genet.* 1998;103(1):96-101.
82. Dammann R, Li C, Yoon JH, Chin PL, Bates S, Pfeifer GP. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus

- 3p21.3. *Nat Genet.* 2000;25(3):315-319.
83. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell.* 2006;9(3):189-198.
 84. Gee G V., Koestler DC, Christensen BC, et al. Downregulated microRNAs in the differential diagnosis of malignant pleural mesothelioma. *Int J Cancer.* 2010;127(12):2859-2869.
 85. Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(40):15805-15810.
 86. Takahashi Y, Forrest ARR, Maeno E, Hashimoto T, Daub CO, Yasuda J. MiR-107 and MiR-185 can induce cell cycle arrest in human non small cell lung cancer cell lines. *PLoS One.* 2009;4(8).
 87. Bandi N, Zbinden S, Gugger M, et al. miR-15a and miR-16 are implicated in cell cycle regulation in a Rb-dependent manner and are frequently deleted or down-regulated in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2009;69(13):5553-5559.
 88. Cai Z, Tchou-Wong KM, Rom WN. NF-kappaB in lung tumorigenesis. *Cancers (Basel).* 2011;3(4):4258-4268.
 89. Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(4):276-285.
 90. He G, Karin M. NF-κB and STAT3- key players in liver inflammation and cancer. *Cell Res.* 2011;21(1):159-168.
 91. Li Y, Du H, Qin Y, Roberts J, Cummings OW, Yan C. Activation of the signal transducers and activators of the transcription 3 pathway in alveolar epithelial cells induces inflammation and adenocarcinomas in mouse lung. *Cancer Res.* 2007;67(18):8494-8503.
 92. Westholm JO, Lai EC. Mirtrons: MicroRNA biogenesis via splicing. *Biochimie.* 2011;93(11):1897-1904.
 93. Ho YS, Chen CH, Wang YJ, et al. Tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) induces cell proliferation in normal human bronchial epithelial cells through NFκB activation and cyclin D1 up-regulation. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005;205(2):133-148.
 94. Zhou W, Chen X, Hu Q, Chen X, Chen Y, Huang L. Galectin-3 activates TLR4/NF-KB signaling to promote lung adenocarcinoma cell proliferation through activating lncRNA-NEAT1 expression. *BMC Cancer.* 2018;18(1):1-14.
 95. Xu L, Wu Q, Zhou X, Wu Q, Fang M. TRIM13 inhibited cell proliferation and induced cell apoptosis by regulating NF-κB pathway in non-small-cell lung carcinoma cells. *Gene.* 2019;715(July).
 96. Zhang S, Yu D. PI(3)king apart PTEN's role in cancer. *Clin Cancer Res.* 2010;16(17):4325-4330.
 97. Jones DR, Broad RM, Madrid L V., Baldwin AS, Mayo MW. Inhibition of NF-κB sensitizes non-small cell lung cancer cells to chemotherapy-induced apoptosis. *Ann Thorac Surg.* 2000;70(3):930-936.
 98. Jackson AL, Zhou B, Kim WY. HIF, hypoxia and the role of angiogenesis in non-small cell lung cancer. *Expert Opin Ther Targets.* 2010;14(10):1047-1057.
 99. Li L, Li JC, Yang H, et al. Expansion of cancer stem cell pool initiates lung cancer recurrence before angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(38):E8948-E8957.
 100. Sheng J, Yang Y, Ma Y, et al. The efficacy of combining antiangiogenic agents with chemotherapy for patients with advanced non-small cell lung cancer who failed first-line chemotherapy: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.*

- 2015;10(6):1-13.
101. Walmsley SR, Print C, Farahi N, et al. Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1 α -dependent NF- κ B activity. *J Exp Med*. 2005;201(1):105-115.
 102. Huang CY, Fong YC, Lee CY, et al. CCL5 increases lung cancer migration via PI3K, Akt and NF- κ B pathways. *Biochem Pharmacol*. 2009;77(5):794-803.
 103. Chang YW, Chiu CF, Lee KY, et al. CARMA3 represses metastasis suppressor NME2 to promote lung cancer stemness and metastasis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;192(1):64-75.
 104. Fong YC, Liu SC, Huang CY, et al. Osteopontin increases lung cancer cells migration via activation of the α β 3 integrin/FAK/Akt and NF- κ B-dependent pathway. *Lung Cancer*. 2009;64(3):263-270.
 105. Yang CJ, Liu YP, Dai HY, et al. Nuclear HDAC6 inhibits invasion by suppressing NF- κ B/MMP2 and is inversely correlated with metastasis of non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2015;6(30):30263-30276.
 106. Kumar M, Allison DF, Baranova NN, et al. NF- κ B Regulates Mesenchymal Transition for the Induction of Non-Small Cell Lung Cancer Initiating Cells. *PLoS One*. 2013;8(7):1-10.
 107. Asgarova A, Asgarov K, Godet Y, et al. PD-L1 expression is regulated by both DNA methylation and NF- κ B during EMT signaling in non-small cell lung carcinoma. *Oncoimmunology*. 2018;7(5):1-13.
 108. Shibue T, Weinberg RA. EMT, CSCs, and drug resistance: The mechanistic link and clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14(10):611-629.
 109. Zakaria N, Yusoff NM, Zakaria Z, Widera D, Yahaya BH. Inhibition of NF- κ B signaling reduces the stemness characteristics of lung cancer stem cells. *Front Oncol*. 2018;8(MAY):1-12.
 110. Boroughs LK, Deberardinis RJ. Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. *Nat Cell Biol*. 2015;17(4):351-359.
 111. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674.
 112. Szymura SJ, Zaemes JP, Allison DF, et al. NF- κ B upregulates glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 2 to promote migration in non-small cell lung cancer. *Cell Commun Signal*. 2019;17(1):1-16.
 113. Chuang SE, Yeh PY, Lu YS, et al. Basal levels and patterns of anticancer drug-induced activation of nuclear factor- κ B (NF- κ B), and its attenuation by tamoxifen, dexamethasone, and curcumin in carcinoma cells. *Biochem Pharmacol*. 2002;63(9):1709-1716.
 114. Godwin P, Baird AM, Heavey S, Barr MP, O'Byrne KJ, Gately K. Targeting nuclear factor-kappa B to overcome resistance to chemotherapy. *Front Oncol*. 2013;3 MAY(May):1-10.
 115. Chen PM, Cheng YW, Wu TC, Chen CY, Lee H. MnSOD overexpression confers cisplatin resistance in lung adenocarcinoma via the NF- κ B/Snail/Bcl-2 pathway. *Free Radic Biol Med*. 2015;79:127-137.
 116. Xiao L, Lan X, Shi X, et al. Cytoplasmic RAP1 mediates cisplatin resistance of non-small cell lung cancer. *Cell Death Dis*. 2017;8(5):e2803.
 117. Denlinger CE, Rundall BK, Keller MD, Jones DR. Proteasome inhibition sensitizes non-small-cell lung cancer to gemcitabine-induced apoptosis. *Ann Thorac Surg*. 2004;78(4):1207-1214.
 118. Zhang Z, Ma J, Li N, Sun N, Wang C. Expression of Nuclear Factor- κ B and Its Clinical Significance in Nonsmall-Cell Lung Cancer. *Ann Thorac Surg*. 2006;82(1):243-248.

119. Dimitrakopoulos FID, Antonacopoulou AG, Kottorou AE, et al. Expression Of Intracellular Components of the NF- κ B Alternative Pathway (NF- κ B2, RelB, NIK and Bcl3) is Associated With Clinical Outcome of NSCLC Patients. *Sci Rep.* 2019;9(1):1-12.
120. Saxon JA, Yu H, Polosukhin V V., et al. P52 expression enhances lung cancer progression. *Sci Rep.* 2018;8(1):1-13.
121. Zhao Y, Xu Y, Li Y, et al. NF- κ B-Mediated Inflammation Leading to EMT via miR-200c is involved in cell transformation induced by cigarette smoke extract. *Toxicol Sci.* 2013;135(2):265-276.
122. Jin X, Wang Z, Qiu L, et al. Potential biomarkers involving IKK/RelA signal in early stage non-small cell lung cancer. *Cancer Sci.* 2008;99(3):582-589.
123. Tang X, Liu D, Shishodia S, et al. Nuclear factor- κ B (NF- κ B) is frequently expressed in lung cancer and preneoplastic lesions. *Cancer.* 2006;107(11):2637-2646.
124. Markopoulos GS, Roupakia E, Tokamani M, et al. A step-by-step microRNA guide to cancer development and metastasis. *Cell Oncol.* 2017;40(4):303-339.
125. Thompson RC, Herscovitch M, Zhao I, Ford TJ, Gilmore TD. NF- κ B down-regulates expression of the B-lymphoma marker CD10 through a miR-155/PU.1 pathway. *J Biol Chem.* 2011;286(3):1675-1682.
126. Costinean S, Zanesi N, Pekarsky Y, et al. Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E μ -miR155 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(18):7024-7029.
127. Wang B, Majumder S, Nuovo G, et al. Role of microRNA-155 at early stages of hepatocarcinogenesis induced by choline-deficient and amino acid-defined diet in C57BL/6 mice. *Hepatology.* 2009;50(4):1152-1161.
128. Xiao B, Liu Z, Li BS, et al. Induction of microRNA-155 during helicobacter pylori infection and its negative regulatory role in the inflammatory response. *J Infect Dis.* 2009;200(6):916-925.
129. Bala S, Marcos M, Kodys K, et al. Up-regulation of microRNA-155 in macrophages contributes to increased Tumor Necrosis Factor α (TNF α) production via increased mRNA half-life in alcoholic liver disease. *J Biol Chem.* 2011;286(2):1436-1444.
130. Tai MC, Kajino T, Nakatochi M, et al. miR-342-3p regulates MYC transcriptional activity via direct repression of E2F1 in human lung cancer. *Carcinogenesis.* 2015;36(12):1464-1473.
131. Dacic S, Kelly L, Shuai Y, Nikiforova MN. MiRNA expression profiling of lung adenocarcinomas: Correlation with mutational status. *Mod Pathol.* 2010;23(12):1577-1582.
132. Qin Y, Zhou X, Huang C, et al. Serum miR-342-3p is a novel diagnostic and prognostic biomarker for non-small cell lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2018;11(5):2742-2748.
133. Xie X, Liu H, Wang M, et al. miR-342-3p targets RAP2B to suppress proliferation and invasion of non-small cell lung cancer cells. *Tumor Biol.* 2015;36(7):5031-5038.
134. Xue X, Fei X, Hou W, Zhang Y, Liu L, Hu R. miR-342-3p suppresses cell proliferation and migration by targeting AGR2 in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* 2018;412:170-178.
135. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF- κ B Family of Transcription Factors and. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* Published online 2009:1-15.
136. van Waes C. Targeting NF- κ B in mouse models of lung adenocarcinoma. *Cancer Discov.* 2011;1(3):200-202.

137. Wong KK, Jacks T, Dranoff G. NF- κ B fans the flames of lung carcinogenesis. *Cancer Prev Res.* 2010;3(4):403-405.
138. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - MicroRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(4):259-269.
139. Montecucco A, Biamonti G. Cellular response to etoposide treatment. *Cancer Lett.* 2007;252(1):9-18.
140. Ciccia A, Elledge SJ. The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. *Mol Cell.* 2010;40(2):179-204.
141. Harper JW, Elledge SJ. The DNA Damage Response: Ten Years After. *Mol Cell.* 2007;28(5):739-745.
142. Bakkenist CJ, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature.* 2003;421(6922):499-506.
143. Chiu CC, Li CH, Ung MW, Fuh TS, Chen WL, Fang K. Etoposide (VP-16) elicits apoptosis following prolonged G2-M cell arrest in p53-mutated human non-small cell lung cancer cells. *Cancer Lett.* 2005;223(2):249-258.
144. Ding H, Duan W, Zhu WG, et al. p21 response to DNA damage induced by genistein and etoposide in human lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;305(4):950-956.
145. Schmitt CA, Fridman JS, Yang M, et al. A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell.* 2002;109(3):335-346.
146. Wu H, Ye C, Ramirez D, Manjunath N. Alternative processing of primary microRNA transcripts by Drosha generates 5' end variation of mature microRNA. *PLoS One.* 2009;4(10).
147. Schneider G, Henrich A, Greiner G, et al. Cross talk between stimulated NF- κ B and the tumor suppressor p53. *Oncogene.* 2010;29(19):2795-2806.
148. Schneider G, Krämer OH. NF κ B/p53 crosstalk-a promising new therapeutic target. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer.* 2011;1815(1):90-103.
149. Bassères DS, Ebbs A, Levantini E, Baldwin AS. Requirement of the NF- κ B subunit p65/RelA for K-Ras-induced lung tumorigenesis. *Cancer Res.* 2010;70(9):3537-3546.
150. Xia Y, Yeddula N, Leblanc M, et al. Reduced cell proliferation by IKK2 depletion in a mouse lung-cancer model. *Nat Cell Biol.* 2012;14(3):257-265.
151. Chavdoula E, Habiél DM, Roupakia E, et al. CHUK/IKK- α loss in lung epithelial cells enhances NSCLC growth associated with HIF up-regulation. *Life Sci Alliance.* 2019;2(6):1-17.
152. Carneiro-Lobo TC, Scalabrini LC, Magalhães L da S, et al. IKK β targeting reduces KRAS-induced lung cancer angiogenesis in vitro and in vivo: A potential anti-angiogenic therapeutic target. *Lung Cancer.* 2019;130(October 2018):169-178.
153. Roupakia E, Chavdoula E, Karpathiou G, et al. Canonical NF- κ B promotes lung epithelial cell tumour growth by downregulating the metastasis suppressor CD82 and enhancing epithelial-to-mesenchymal cell transition. *Cancers (Basel).* 2021;13(17).
154. Aponte PM, Caicedo A. Stemness in cancer: Stem cells, cancer stem cells, and their microenvironment. *Stem Cells Int.* 2017;2017. doi:10.1155/2017/5619472
155. Rinkenbaugh AL, Baldwin AS. The NF- κ B Pathway and Cancer Stem Cells. *Cells.* 2016;5(2):1-19.
156. Campbell KJ, O'Shea JM, Perkins ND. Differential regulation of NF- κ B activation and function by topoisomerase II inhibitors. *BMC Cancer.* 2006;6:1-9.
157. Campbell KJ, Perkins ND. Reprogramming RelA. *Cell Cycle.* 2004;3(7):867-870.

158. Campbell KJ, Rocha S, Perkins ND. Active repression of antiapoptotic gene expression by RelA(p65) NF- κ B. *Mol Cell*. 2004;13(6):853-865. doi:10.1016/S1097-2765(04)00131-5
159. Campbell KJ, Witty JM, Rocha S, Perkins ND. Cisplatin mimics ARF tumor suppressor regulation of RelA (p65) nuclear factor- κ B transactivation. *Cancer Res*. 2006;66(2):929-935.
160. Janssens S, Tschopp J. Signals from within: The DNA-damage-induced NF- κ B response. *Cell Death Differ*. 2006;13(5):773-784. doi:10.1038/sj.cdd.4401843
161. Wu ZH, Miyamoto S. Induction of a pro-apoptotic ATM-NF- κ B pathway and its repression by ATR in response to replication stress. *EMBO J*. 2008;27(14):1963-1973.
162. Wu ZH, Miyamoto S. Many faces of NF- κ B signaling induced by genotoxic stress. *J Mol Med*. 2007;85(11):1187-1202.
163. Spalding AC, Jotte RM, Scheinman RI, et al. TRAIL and inhibitors of apoptosis are opposing determinants for NF- κ B-dependent, genotoxin-induced apoptosis of cancer cells. *Oncogene*. 2002;21(2):260-271.
164. Tabata M, Tabata R, Grabowski DR, Bukowski RM, Ganapathi MK, Ganapathi R. Roles of NF- κ B and 26 S Proteasome in Apoptotic Cell Death Induced by Topoisomerase I and II Poisons in Human Nonsmall Cell Lung Carcinoma. *J Biol Chem*. 2001;276(11):8029-8036.
165. Wuerzberger-davis SM, Chang P, Berchtold C, Miyamoto S. Enhanced G2 -M Arrest by Nuclear Factor- κ B-Dependent. *Mol Cancer Res*. 2005;3(June):345-353.
166. Wu ZH, Shi Y, Tibbetts RS, Miyamoto S. Molecular linkage between the kinase ATM and NF- κ B signaling in response to genotoxic stimuli. *Science (80-)*. 2006;311(5764):1141-1146.
167. Hinz M, Stilmann M, Arslan SÇ, Khanna KK, Dittmar G, Scheidereit C. A cytoplasmic ATM-TRAF6-cIAP1 module links nuclear DNA damage signaling to ubiquitin-mediated NF- κ B activation. *Mol Cell*. 2010;40(1):63-74.
168. Sabatel H, Di Valentin E, Gloire G, Dequiedt F, Piette J, Habraken Y. Phosphorylation of p65(ReLA) on ser 547 by ATM represses NF- κ B-dependent transcription of specific genes after genotoxic stress. *PLoS One*. 2012;7(6).
169. Li XR, Chu HJ, Lv T, Wang L, Kong SF, Dai SZ. MiR-342-3p suppresses proliferation, migration and invasion by targeting FOXM1 in human cervical cancer. *FEBS Lett*. 2014;588(17):3298-3307.
170. Weng C, Nguyen T, Shively JE. miRNA-342 regulates CEACAM1-induced lumen formation in a three-dimensional model of mammary gland morphogenesis. *J Biol Chem*. 2016;291(32):16777-16786.
171. Weng W, Okugawa Y, Toden S, Toiyama Y, Kusunoki M, Goel A. FOXM1 and FOXQ1 are promising prognostic biomarkers and novel targets of tumor-suppressive miR-342 in human colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2016;22(19):4947-4957.
172. Li X, Chen YT, Josson S, et al. MicroRNA-185 and 342 Inhibit Tumorigenicity and Induce Apoptosis through Blockade of the SREBP Metabolic Pathway in Prostate Cancer Cells. *PLoS One*. 2013;8(8).
173. Wang H, Wu J, Meng X, et al. MicroRNA-342 inhibits colorectal cancer cell proliferation and invasion by directly targeting DNA methyltransferase 1. *Carcinogenesis*. 2011;32(7):1033-1042.
174. Zhang D, Jin X, Wang F, et al. Combined prognostic value of both RelA and I κ B- α expression in human non-small cell lung cancer. *Ann Surg Oncol*. 2007;14(12):3581-3592.

175. Lagunas-Rangel FA. KDM6B (JMJD3) and its dual role in cancer. *Biochimie*. 2021;184:63-71.
176. Lee SH, Kim O, Kim HJ, Hwangbo C, Lee JH. Epigenetic regulation of TGF- β -induced EMT by JMJD3/KDM6B histone H3K27 demethylase. *Oncogenesis*. 2021;10(2).
177. Lachat C, Bruyère D, Etcheverry A, et al. EZH2 and KDM6B expressions are associated with specific epigenetic signatures during EMT in non small cell lung carcinomas. *Cancers (Basel)*. 2020;12(12):1-22.
178. Zhang Y, Hua PY, Jin CY, Li JD, Zhang GX, Wang B. JMJD3 enhances invasiveness and migratory capacity of non-small cell lung cancer cell via activating EMT signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019;23(11):4784-4792.
179. Cui Z, Zhao Y. MicroRNA-342-3p targets FOXQ1 to suppress the aggressive phenotype of nasopharyngeal carcinoma cells. *BMC Cancer*. 2019;19(1):1-10.