

ΟΝΟΜΑ ΥΠΟΨΗΦΙΑΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΑ: ΘΑΝΑΣΑ ΑΝΤΩΝΙΑ ΑΜΑΛΙΑ

ΟΝΟΜΑΤΑ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

1. ΑΡΜΑΚΟΛΑΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)- Αναπληρωτής Καθηγητής, Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας « Φυσιολογείον» Ιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ
2. ΦΙΛΙΠΠΟΥ ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ- Αναπληρωτής Καθηγητής , Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας « Φυσιολογείον» Ιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ
3. ΜΑΥΡΑΓΑΝΗ ΚΛΕΙΩ- Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, , Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας « Φυσιολογείον» Ιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ

ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: ΙΣΤΙΚΟΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ TLRs ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΘΕΜΑΤΟΣ

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς αδένος αποτελεί την πιο συχνή κακοήθεια μεταξύ των ενδοκρινών αδένων. Παρά τους αυξημένους αριθμούς του θηλώδους καρκινώματος (~80%), το διαφοροποιημένο καρκίνωμα του θυρεοειδούς έχει εξαιρετική πρόγνωση με την 10-ετή επιβίωση στους ενήλικες να ανέρχεται 92-98%. Υπάρχουν κάποιοι υπότυποι αυτού που σχετίζονται με πιο επιθετικές μορφές, π.χ. το tall-cell variant. Η χειρουργική αντιμετώπιση είναι η πρωταρχική και πιο αποτελεσματική θεραπεία για το θηλώδες και γενικά για το καλά διαφοροποιημένο καρκίνωμα του θυρεοειδούς αδένος, με ιδιαίτερα χαμηλά ποσοστά επιπλοκών.

Το τρέχον επιστημονικό ερευνητικό ενδιαφέρον στρέφεται πλέον στην μελέτη έκφρασης μοριακών δεικτών που υπερ ή υπο εκφράζονται στον καρκίνο του θυρεοειδούς αδένος και σε καρκίνους διάφορων οργάνων. Η ανίχνευση ειδικών μοριακών δεικτών του καρκίνου του θυρεοειδούς αδένος μπορεί να παρέχει μία πιο ακριβή προεγχειρητική διάγνωση των διάφορων υπότυπων καρκίνου θυρεοειδούς που πιθανόν να είναι και ποιο επιθετικοί. Επίσης, η ερμηνεία αυτών των βιοδεικτών μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο για μία πιο ακριβή προεγχειρητική διάγνωση διάφορων ενδιάμεσων τύπων. Με τον τρόπο αυτό θα μπορούμε να αποφύγουμε την χειρουργική επέμβαση στις περιπτώσεις που ο μοριακός έλεγχος θα εξασφαλίζει την ύπαρξη καλοήθειας ενώ θα οδηγούνται στο χειρουργείο περιπτώσεις που ο μοριακός θα θέτει την υπόνοια παρουσίας κακοήθειας. Η εφαρμογή μεθόδων μοριακής βιολογίας μπορεί να συμβάλει στην ανίχνευση ειδικών βιοδεικτών που θα οδηγήσουν στην ανάπτυξη στοχευμένης ατομικής θεραπείας βελτιώνοντας την πρόγνωση τους και εξασφαλίζοντας την καλύτερη μετεγχειρητική παρακολούθηση τους.

Οι Toll-like receptors (TLRs) είναι διαμεμβρανικοί υποδοχείς που συμβάλλουν στην ενεργοποίηση της φυσικής και ειδικής ανοσίας. Εκφράζονται σε μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα, ουδετερόφιλα, Τ-λεμφοκύτταρα, στο ενδοθήλιο και επιθήλιο, καθώς και σε συμπαγή όργανα, όπως εγκέφαλος, καρδιά, ήπαρ, πνεύμονες και νεφρούς. Εμπλέκονται στην ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων και στη διέγερση των μακροφάγων, συμβάλλοντας στην τοπική φλεγμονή και συσσώρευση λευκοκυττάρων, αποτελώντας γέφυρες μεταξύ φυσικής και ειδικής ανοσίας. Κρατούν σε εγρήγορση το ανοσοποιητικό σύστημα ενάντια στις λοιμώξεις και η ενεργοποίησή τους προκαλεί αυξημένη έκφραση πολλαπλών γονιδίων φλεγμονής, που με τη σειρά τους προστατεύουν από τη φλεγμονή.

Η απορρύθμιση των μονοπατιών των TLR έχει περιγραφεί σε διάφορους καρκίνους όπως του προστάτη, του παχέος εντέρου, πνεύμονα κ.α. και σχετίζεται με υπερέκκριση προφλεγμονωδών κυτοκινών που μεσολαβούν στην εξέλιξη ενός όγκου. Αναγνωρίζουν εξωγενείς συνδέτες (ειδικά μοριακά πρότυπα παθογόνων, PAMPs (pathogen-associated molecular pattern's- όπως LPs, λιποπρωτεΐνες κ.α.), αλλά και ενδογενείς συνδέτες (DAMPs-Damage Associated Molecular Patterns), που παράγονται από τον ίδιο τον οργανισμό, οδηγώντας στην παραγωγή κυτταροκινών μέσω ενός τύπου «αυτό-ανοσίας».

Οι TLR-3, -7,-8,-9, εκφράζονται στα ενδοσώματα των κυττάρων ενώ οι υπόλοιποι υποδοχείς εκφράζονται στην κυτταρική επιφάνεια. Συνολικά, υπάρχουν 10 TLR's στον ανθρώπινο οργανισμό. Υπάρχουν 2 οδοί μεταβίβασης του μηνύματος. Η πρώτη εξαρτάται από την πρωτεΐνη πρωτοπαθούς απάντησης της διαφοροποίησης του μυελού (MyD88) και επάγει την πρώιμη φάση ενεργοποίησης του NF-κΒ, μέσω των JNK's (Jun N-terminal kinases), p38 και ERK's όπως και στους IRF's (interferon regulatory factor) σηματοδοτικών μονοπατιών, με αποτέλεσμα την παραγωγή κυτταροκινών, χημειοκινών και ιντερφερονών, οι οποίες καταστέλλουν την απόπτωση και επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στα καρκινικά κύτταρα.

Η δεύτερη οδός είναι η TRIF μεσολαβούμενη (ή MyD88-independent) η οποία ενεργοποιείται μόνο από τον TLR-3, επάγει την βραδείας φάσης ενεργοποίηση του NF-κΒ και οδηγεί στην παραγωγή INF1 . Υπάρχουν και άλλα δύο ενδιάμεσα μόρια, τα TICAM2 και TIRAP, τα οποία ενεργοποιούν τα MyD88 και TRIF μονοπάτια

Επίσης, οι TLRs, μέσω της επαγωγής της μεταγραφής διαφόρων γονιδίων, αυξάνουν και την έκφραση του VEGF , άρα και της νέο-αγγειογένεσης στον καρκίνο. Η ενεργοποίηση των TLR's στα APC's (antigen-presenting cells) διεγείρει την μη-ειδική ανοσία και την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών, χημειοκινών, όπως και μορίων προσκόλλησης και τελικά ενεργοποιείται η ειδική ανοσία. Επιπλέον, οι TLRs ρυθμίζουν τον κυτταρικό θάνατο και αυξάνουν την έκφραση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών BCL-2 σχετιζόμενη πρωτεΐνη A1 (BCL2A1), αναστολέα της απόπτωσης 1 (cIAP1), cIAP2, XIAP και των πρωτεϊνών της BCL2 οικογένειας.

Τα microRNAs είναι μικρά μη κωδικά RNA με ρυθμιστικές γονιδιακές λειτουργίες, τα οποία απελευθερώνονται από τα καρκινικά κύτταρα και είναι εν δυνάμει συνδέτες των TLRs που εκφράζονται στα γύρω κύτταρα της ανοσίας και τα ενεργοποιούν μέσω παρακρινικής δράσης. Τελικά, τα κύτταρα αυτά εκφράζουν τις κυτταροκίνες του καρκίνου (IL-6, TNFα, IFNα) επάγοντας τον πολλαπλασιασμό και το μεταστατικό δυναμικό.

Ο καρκίνος είναι μία στείρα φλεγμονή. Οι TLRs (ειδικά οι 2,4,7,9) μεσολαβούν στην αναγέννηση του επιθηλίου και στην ενεργοποίηση των ινομοβλαστών. Αν τα μονοπάτια που σηματοδοτούν, ενεργοποιηθούν ανώμαλα , ξεκινάει η καρκινογένεση. Τα TAMs (tumor associated macrophages) παίζουν κεντρικό ρόλο στην καρκινική ανάπτυξη ενεργοποιώντας την νεοαγγειογένεση και καρκινική διασπορά και καθορίζουν την εξαλλαγή των ενδοθηλιακών κυττάρων και τον πολλαπλασιασμό τους. Επιπροσθέτως, τα TAMs παράγουν ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και μόρια αζώτου που έχουν καθοριστικό ρόλο στην εδραίωση μίας συνεχούς φλεγμονώδους διαδικασίας που επάγει ογκογενετικές εξαλλαγές.

Ήδη, έχουν χρησιμοποιηθεί κάποιοι από τους TLRs ως θεραπευτικοί στόχοι σε κάποιες μορφές καρκίνου όπως στον μελάνωμα, στον καρκίνο του προστάτου κ.α., μέσω της χορήγησης αγωνιστών τους π.χ. η imiquimod , ενεργοποιώντας την ειδική

ανοσία εναντίον των καρκινικών κυττάρων ή επάγοντας την κυτταρική απόπτωση καθώς και με άλλους μηχανισμούς.

Πειραματικός Σχεδιασμός

Η έκφραση και η λειτουργία των TLRs και των αναστολέων τους μεταβάλλεται στον καρκίνο. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην ενίσχυση ή την αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων. Αναμένεται ότι η μελέτη της δράσης και της ελεγχόμενης λειτουργίας των TLRs και των συνδετικών μορίων τους θα οδηγήσει πιθανώς στην ανάπτυξη στοχευόμενων θεραπευτικών πρωτοκόλλων. Η παρούσα ερευνητική μελέτη θα εφαρμόσει βιοχημικές, ιστολογικές και μοριακές μεθόδους ανάλυσης ώστε να παρέχει μια πολύπλευρη προσέγγιση του ρόλου του συστήματος των TLRs στην εξέλιξη του θηλώδους καρκίνου του θυρεοειδούς.

Στην ερευνητική διαδικασία, θα εφαρμοστεί ανοσοϊστοχημική ανάλυση ιστών ασθενών με καρκίνο θυρεοειδούς και ασθενών με άλλες καλοήθεις παθήσεις του θυρεοειδούς π.χ. πολυοζώδης βρογχοκήλη. Για τον σκοπό αυτόν θα χρησιμοποιηθούν ειδικά αντισώματα για τον εντοπισμό των πρωτεϊνών TLR-4, TLR-7, MyD88 και Nk-FB.

Επίσης θα εφαρμοστεί ποσοτική μέθοδος της αντίστροφης μεταγραφής-αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real time RT-PCR) ώστε να προσδιοριστεί η σχετική έκφραση των γονιδίων TLR-4, TLR-7, MyD88 και Nk-FB με την χρήση ειδικών εκκινήτων. Συγκεκριμένα, θα απομονωθεί ολικό RNA από περιφερικά εμπύρνηνα μονοπύρνηνα κύτταρα (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) και θα υποβληθεί σε real time RT-PCR. Κατόπιν, θα γίνει σύγκριση της έκφρασης των μορίων μεταξύ των δύο ομάδων καθώς και συσχέτιση αυτών με διάφορους παράγοντες π.χ. δημογραφικούς (φύλο, ηλικία ασθενών) και με πιθανές ταυτόχρονες εξωθυρεοειδικές εντοπίσεις. Επίσης, θα εφαρμοστεί η ενζυμική μέθοδος (ELISA) για την τον προσδιορισμό των TLR4 και TLR9 καθώς και τα συνδετικά μόρια MyD88, NFkB και της IL-1 και IL-6 σε ορό ή πλάσμα.

NAME OF DOCTORAL CANDIDATE: THANASA ANTONIA AMALIA

THREE-MEMBER COMMITTEE NAMES:

1. ARMAKOLAS ATHANASIOS (SUPERVISOR) - Associate Professor, Laboratory of Experimental Physiology "Physiologion" School of Medicine, EKPA
2. PHILIPPOU ANASTASIOS- Associate Professor, Laboratory of Experimental Physiology "Physiologeion" School of Medicine, EKPA
3. MAVRAGANI KLEIO- Associate Professor, "Physiologion" Laboratory of Experimental Physiology, School of Medicine, EKPA

DISSERTATION TITLE: TISSUE AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF TLRs IN HUMAN THYROID CANCER SPECIMENS.

SUBJECT SUMMARY

Thyroid cancer is the most common malignancy among the endocrine glands. Despite the increased numbers of papillary carcinoma (~80%), differentiated thyroid carcinoma has an excellent prognosis with 10-year survival in adults of 92-98%. There are some subtypes of this associated with more aggressive forms, e.g. the tall-cell variant. Surgical treatment is the primary and most effective treatment for papillary and well-differentiated thyroid carcinoma in general, with particularly low complication rates.

Current scientific research interest is now directed to the study of expression of molecular markers that are over- or under-expressed in thyroid cancer and in cancers of various organs. The detection of specific molecular markers of thyroid cancer may provide a more accurate preoperative diagnosis of the various subtypes of thyroid cancer that are likely to be more aggressive. Also, the interpretation of these biomarkers can be a useful tool for a more accurate preoperative diagnosis of various intermediate types. In this way, we will be able to avoid surgery in cases where the molecular test will ensure the existence of benignity, while cases where the molecular test will raise the suspicion of the presence of malignancy will be taken to the operating room. The application of molecular biology methods can contribute to the detection of specific biomarkers that will lead to the development

of targeted individual therapy, improving their prognosis and ensuring the best postoperative follow-up.

Toll-like receptors (TLRs) are transmembrane receptors that contribute to the activation of natural and specific immunity. They are expressed in macrophages, dendritic cells, neutrophils, T-lymphocytes, endothelium and epithelium, as well as in solid organs such as brain, heart, liver, lung and kidney. They are involved in the maturation of dendritic cells and the stimulation of macrophages, contributing to local inflammation and leukocyte accumulation, forming bridges between natural and specific immunity. They keep the immune system on alert against infections, and their activation causes increased expression of multiple inflammatory genes, which in turn protect against inflammation.

The deregulation of TLR pathways has been described in various cancers such as prostate, colon, lung, etc. and is associated with hypersecretion of pro-inflammatory cytokines that mediate the progression of a tumor. They recognize exogenous ligands (especially molecular patterns of pathogens, PAMPs (pathogen-associated molecular patterns- such as LPs, lipoproteins, etc.), but also endogenous ligands (DAMPs-Damage Associated Molecular Patterns), produced by the organism itself, leading to production of cytokines through a type of "auto-immunity".

TLR-3, -7,-8,-9, are expressed in the endosomes of cells while the remaining receptors are expressed on the cell surface. In total, there are 10 TLR's in the human body. There are 2 ways of transmitting the message. The first depends on the primary response protein of myeloid differentiation (MyD88) and induces the early phase of NF- κ B activation, through JNK's (Jun N-terminal kinases), p38 and ERK's as well as IRF's (interferon regulatory factor) signaling pathways, resulting in the production of cytokines, chemokines and interferons, which suppress apoptosis and induce cell proliferation in cancer cells.

The second pathway is TRIF-mediated (or MyD88-independent) which is activated only by TLR-3, induces the slow-phase activation of NF- κ B and leads to the production of INF1. There are two other intermediate molecules, TICAM2 and TIRAP, which activate the MyD88 and TRIF pathways. Also, TLRs, through the induction of the transcription of various genes, increase the expression of VEGF, and therefore neo-angiogenesis in cancer. The activation of TLRs on APCs (antigen-presenting cells) stimulates non-specific immunity and the production of pro-inflammatory cytokines, chemokines, as well as adhesion molecules and finally specific immunity is activated. In addition, TLRs regulate cell death and increase the expression of anti-apoptotic proteins BCL-2 associated protein A1 (BCL2A1), inhibitor of apoptosis 1 (cIAP1), cIAP2, XIAP and BCL2 family proteins.

MicroRNAs are small non-coding RNAs with regulatory gene functions, which are released by cancer cells and are potential ligands of TLRs that are expressed on surrounding immune cells and activate them through paracrine action. Ultimately,

these cells express cancer cytokines (IL-6, TNF α , IFN α) inducing proliferation and metastatic potential. Cancer is a sterile inflammation. TLRs (especially 2,4,7,9) mediate epithelial regeneration and fibrocyte activation. If the signaling pathways are abnormally activated, carcinogenesis begins. TAMs (tumor associated macrophages) play a central role in cancer development by activating neo-angiogenesis and tumor spread and determine the turnover of endothelial cells and their proliferation. In addition, TAMs produce oxygen free radicals and nitrogen molecules that are instrumental in establishing a continuous inflammatory process that induces oncogenetic changes.

Already, some of the TLRs have been used as therapeutic targets in some forms of cancer such as melanoma, prostate cancer, etc., through the administration of their agonists, e.g. imiquimod, by activating specific immunity against cancer cells or by inducing cell apoptosis as well as by other mechanisms.

EXPERIMENTAL DESIGN

The expression and function of TLRs and their inhibitors are altered in cancer. This fact leads to the enhancement or inhibition of the proliferation of cancer cells. It is expected that the study of the action and regulated function of TLRs and their binding molecules will probably lead to the development of targeted therapeutic protocols. The present research study will apply biochemical, histological and molecular methods of analysis to provide a multifaceted approach to the role of the TLRs system in the progression of papillary thyroid cancer.

In the research process, immunohistochemical analysis of tissues of patients with thyroid cancer and patients with other benign thyroid diseases will be applied, e.g. multinodular goiter. For this purpose, specific antibodies will be used to identify TLR-4, TLR-7, MyD88 and Nf- κ B proteins.

A quantitative method of reverse transcription-polymerase chain reaction in real time (real time RT-PCR) will also be applied to determine the relative expression of TLR-4, TLR-7, MyD88 and Nf- κ B genes using specific primers. Specifically, total RNA will be isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and subjected to real time RT-PCR. Afterwards, a comparison of the expression of the molecules between the two groups will be made, as well as their correlation with various factors, e.g. demographic (gender, age of patients) and with possible simultaneous extrathyroidal localizations. Also, the enzyme method (ELISA) will be applied to determine TLR4 and TLR9 as well as the binding molecules MyD88, Nf κ B and IL-1 and IL-6 in serum or plasma.