

Περίληψη Διδακτορικής Διατριβής

Όνομα Υποψηφίου Διδάκτορα: Γρηγόριος Παπαδόπουλος

Τριμελής Επιτροπή:

Αντώνιος Χατζηγεωργίου (Επιβλέπων), Αναπλ. Καθηγητής Ιατρικής ΕΚΠΑ

Μιχάλης Βερυκοκάκης, Ερευνητής Γ', ΕΚΕΒΕ Φλέμινγκ

Θέμις Αλυσσάφη, Επικ. Καθηγήτρια, Ιατρική ΕΚΠΑ

Τίτλος Διατριβής: «Προσδιορισμός των Σηματοδοτικών Μηχανισμών Ογκογένεσης και Καρκινικής Αύξησης στο Σχετιζόμενο με τη Μη-Αλκοολική Λιπώδη Νόσο του Ήπατος Ηπατοκυτταρικό Καρκίνωμα»

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μη-αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος είναι μια χρόνια πάθηση που πλήττει ένα σημαντικό ποσοστό του συνολικού πληθυσμού παγκοσμίως (περί το 25%), χαρακτηρίζεται από υπέρμετρη συσσώρευση λίπους στο ήπαρ απουσία αξιοσημείωτης κατανάλωσης αλκοόλ ή άλλης ηπατοπάθειας και είναι αλληλένδετη με τις ταχέως εξελισσόμενες επιδημίες της παχυσαρκίας και του μεταβολικού συνδρόμου. Η εν λόγω νόσος συνιστά ένα φάσμα παθοφυσιολογίας το οποίο κυμαίνεται από την απλή καλοήγη στεαάτωση, έως και τους πιο δυσμενείς φαινοτύπους της μη-αλκοολικής στεατοηπατίτιδας, της κίρρωσης και του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Σχετικά με το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚΚ), δύναται να προκύψει χωρίς την προγενέστερη εμφάνιση της κίρρωσης (πλήρως ινώδες ήπαρ) και συχνότερα συνδέεται με την προ υπάρχουσα φλεγμονή του ιστού. Η συντριπτική πλειοψηφία των πρωτογενών ηπατικών όγκων (90%) αφορά στον σχηματισμό ΗΚΚ, ενώ ο ηπατικός καρκίνος γενικότερα αποτελεί την 4^η πιο θνησιγενή αιτία σε καρκινοπαθείς ασθενείς, με εκατοντάδες χιλιάδες θανάτους ανά έτος. Συνεπώς, η κατανόηση των μηχανισμών ογκογένεσης και καρκινικής αύξησης στο ΗΚΚ αποτελεί αναγκαία συνιστώσα της βασικής έρευνας, στο πλαίσιο της ανάπτυξης αποτελεσματικών θεραπευτικών προσεγγίσεων έναντι αυτής της μορφής καρκίνου. Οι εξειδικευμένοι μοριακοί μηχανισμοί που ευθύνονται για την ανάπτυξη του ηπατικού καρκίνου και του ΗΚΚ, στα πλαίσια μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος δεν έχουν αποσαφηνιστεί επαρκώς. Μολονότι οι ερευνητικές προσπάθειες της τελευταίας δεκαετίας έχουν αποκαλύψει πληθώρα γενετικών παραγόντων οι οποίοι συμβάλλουν στη παθογένεση και την εξέλιξη της μη-αλκοολικής νόσου του ήπατος, διαθέτουμε περιορισμένη πληροφορία αναφορικά με την φύση των χρόνιων μηχανισμών που επάγουν καρκινογένεση στο ήπαρ στο υπόβαθρο της παραπάνω νόσου, ενώ η μέχρι τώρα ερευνητικές προσπάθειες επικεντρώνονταν κυρίως στην ανάπτυξη ΗΚΚ στα πλαίσια ιογενών νόσων του ήπατος. Είναι γνωστό ότι η ιστική αναγέννηση και επιδιόρθωση του ηπατικού και άλλων ιστών, ενορχηστρώνονται από σηματοδοτικούς μηχανισμούς η παρεκτροπή των οποίων έχουν παραδοσιακά συσχετιστεί με την ογκογένεση και την καρκινική αύξηση. Ως εκ τούτου, λεπτομερής προσδιορισμός και η χαρτογράφηση των προαναφερόμενων μονοπατιών αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον και στην παθοφυσιολογία του ΗΚΚ, η οποία δύναται να επέλθει υπό τις συνθήκες του φλεγμαίνοντος και ινώδους περιβάλλοντος της μη-αλκοολικής νόσου του ήπατος. Ο σηματοδοτικός άξονας του Hes3,

αποτελεί έναν προσφάτως διαλευκαμένο μηχανισμό ο οποίος αναγνωρίστηκε ως μη-κανονικό παρακλάδι της Notch σηματοδότησης, με την ικανότητα να ενεργοποιεί το μονοπάτι των κινασών τρι-φωσφορικών ινοσιτιδίων (PI3K/Akt/mTOR) και να επάγει βασικές φωσφορυλιώσεις της STAT3 πρωτεΐνης. Κατά αυτόν τον τρόπο, αναγνωρίστηκε ότι η έκφραση του Hes3 επιδρά καθοριστικά στην επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση σημαντικών κυτταρικών πληθυσμών, συμπεριλαμβανομένων στελεχιαίων κυτταρικών τύπων που σχετίζονται με την ιστική επιδιόρθωση (π.χ. νευρικά στελεχιαία κύτταρα). Αξίζει να σημειωθεί ότι ο συγκεκριμένος παράγοντας, φαίνεται να είναι ανενεργός υπό απουσία συνθηκών που απαιτούν την αποκατάσταση ιστικής βλάβης, ή σε μη καρκινικούς ιστούς. Εντούτοις, η μελέτη της βιολογίας του Hes3 στο πλαίσιο του ΗΚΚ, θα μπορούσε να οδηγήσει στη ταυτοποίηση εναλλακτικών μηχανισμών που ελέγχουν την καρκινική αύξηση και την ογκογένεση. Τέτοιοι μηχανισμοί εικάζεται ότι περιορίζουν δυνητικά την επάρκεια υπαρχουσών θεραπευτικών επιλογών όπως οι ανοσολογικοί αναστολείς και οι αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών, οι οποίες στοχεύουν μεν κυτταρικούς πληθυσμούς βαρύνουσας σημασίας για την εξέλιξη του καρκίνου, αγνοώντας δε την αυξητική δραστηριότητα έτερων καρκινογενετικών παραμέτρων που προωθούν τη νόσο. Ο απώτερος σκοπός μιας μελέτης όπως η περιγραφόμενη θα ήταν η ταυτοποίηση μηχανιστικών στόχων μείζονος σημασίας, που θα επιτρέπουν τη δημιουργία καινοτόμων στρατηγικών εξατομικευμένης ιατρικής στους ασθενείς με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα.

ΣΚΟΠΟΣ

Οι πρωταρχικοί στόχοι της προτεινόμενης διδακτορικής διατριβής, συνοψίζονται στον προσδιορισμό του ρόλου του Hes3 σηματοδοτικού άξονα κατά την μετάβαση από τη μη-αλκοολική ηπατική λιπώδη νόσο / στεατοηπατίτιδα προς το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, καθώς και την εκτίμηση της συνεισφοράς των Hes3 σχετιζόμενων μηχανισμών στην εξέλιξη του ΗΚΚ. Στην παρούσα προτεινόμενη διδακτορική διατριβή, τα κεντρικά πειράματα και ο μεθοδολογικός σχεδιασμός που θα ακολουθηθούν περιλαμβάνουν τα εξής: α) Χαρακτηρισμός της έκφρασης του Hes3 και των σχετικών με αυτό σηματοδοτικών στοιχείων σε ηπατικούς ιστούς και *in vitro* συστήματα κυτταροκαλλιέργειας, στο πλαίσιο του ΗΚΚ που επάγεται από την μη-αλκοολική νόσο του ήπατος. β) Χωροταξική ανάλυση της κυτταρικής έκφρασης του Hes3 στο μικροπεριβάλλον του όγκου, κατά την ανάπτυξη και πρόοδο αυτού γ) Προσδιορισμός της αξίας του μεταγραφικού παράγοντα Hes3 ως θεραπευτικό στόχο στο επαγόμενο από μη-αλκοολική νόσο του ήπατος ΗΚΚ, μέσω siRNA συστημάτων αποσίωπησης καθώς και με φαρμακολογική αναστολή της δράσης του Hes3.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Μέθοδος 1: Προσομοίωση της μη-αλκοολικής στεατοηπατίτιδας και του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος με χρήση δίαιτας δυτικού τύπου και τετραχλωράνθρακα (CCl₄) σε ποντίκια C57BL/6J. Στο εν λόγω πειραματικό ζωικό μοντέλο μη-αλκοολικής ΣΗ, έχει αποδειχθεί η ταχεία ανάπτυξη ηπατικής ίνωσης και ΗΚΚ μέσω της παροχής δίαιτας δυτικού τύπου, π.χ. υψηλά λιπαρά + φρουκτόζη + χοληστερόλη, σε συνδυασμό με εβδομαδιαία χαμηλή δόση τετραχλωράνθρακα (CCl₄) ενδοπεριτοναϊκά, και η αποτελεσματική προσομοίωση των βασικών παθοφυσιολογικών χαρακτηριστικών της ανθρώπινης μη-αλκοολικής ΣΗ σε 12 εβδομάδες του πρωτοκόλλου, ακολουθούμενη από το σχηματισμό ΗΚΚ στο πέρας των 24 εβδομάδων. Τα πειραματόζωα πρόκειται να θανατωθούν και στις δύο χρονικά διακριτές εκδοχές του πρωτοκόλλου, για την συλλογή του ήπατος και δειγμάτων ορού, που θα προορίζονται για ιστολογικές, ορολογικές και γονιδιακού τύπου αναλύσεις. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα των τρανσαμινασών (ALT/AST) θα αναλυθούν στον συλλεγόμενο ορό για την εκτίμηση των επιπέδων της ιστικής βλάβης, συνοδευόμενα από τις ιστολογικές χρώσεις Picrosirius και δεσμίνης για την αξιολόγηση των επιπέδων ίνωσης στο ήπαρ των πειραματοζώων. Ταυτόχρονα, θα πραγματοποιηθούν αναλύσεις γονιδιακής έκφρασης με qPCR για

προ-ινωτικούς παράγοντες και δείκτες (π.χ. TGF-β, PDGF, κολλαγόνο-1, δεσμίνη, α-SMA, βιμεντίνη. Εν τέλει, οι ΗΚΚ φύσεως όγκοι θα αξιολογηθούν ως προς τα μακροσκοπικά χαρακτηριστικά τους (αριθμός, μέγεθος) και θα αναλυθούν βάση των ήδη περιγραφόμενων τεχνικών για τον χαρακτηρισμό καρκινικού φαινοτύπου στο ήπαρ των ομάδων ελέγχου και παρέμβασης. Επίσης, στους ιστούς αυτούς θα πραγματοποιηθεί αξιολόγηση της φλεγμονής και διερεύνηση του ανοσολογικού μικροπεριβάλλοντος. Πιο συγκεκριμένα, θα πραγματοποιηθούν α) Γονιδιακές αναλύσεις qPCR για κυτταροκίνες, χημειοκίνες και μόρια κυτταρικής προσκόλλησης και β) ανάλυση κυτταρομετρίας ροής για βασικούς πληθυσμούς ανοσοποιητικών κυττάρων (όπως τα M1- και M2- μακροφάγα και τα κύτταρα Kupffer, τα διεισδύοντα μονοκύτταρα, τα CD4+ και CD8+ λεμφοκύτταρα, τα T-ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα, τα NK και NKT κύτταρα, και άλλα).

Μέθοδος 2: Ανάλυση της σχετιζόμενης με τον καρκίνο σηματοδότησης σε ηπατικούς ιστούς, με ιδιαίτερη έμφαση στον μηχανισμό του Hes3. Στους ηπατικούς ιστούς που θα προκύψουν από την 1η Μέθοδο και πιο συγκεκριμένα σε διακριτά τμήματα αυτών που αφορούν σε υγιή και ασθενή ηπατικό ιστό θα μελετηθεί με qPCR η έκφραση σχετικών με το ΗΚΚ παραγόντων κυτταρικής σηματοδότησης [Transforming Growth Factor β (TGF-β), Epidermal Growth Factor (EGF), Hepatocyte Growth Factor (HGF), Vascular Endothelial GrowthFactor (VEGF), Sonic HedgeHog (SHH), mammalian Target Of Rapamycin (mTOR)], και θα συσχετιστούν με την έκφραση του γονιδίου Hes3 που επίσης θα μελετηθεί. Επίσης, θα πραγματοποιηθεί χωροταξική μελέτη των Hes3+ κυττάρων στον ιστό και θα μελετηθεί η συνέκφραση βιοδεικτών του ΗΚΚ με τη χρήση in situ RNA υβριδοποίησης. Προς το σκοπό αυτό, θα μελετηθούν οι δείκτες Ki67, hepatocyte paraffin antigen 1 (Hep Par 1), carcinoembryonic antigen (CEA), glypican-3 για τον καθορισμό των διαφορετικών σταδίων του ΜΑΛΝΗ-ΗΚΚ και την ταυτόχρονη λεπτομερή χαρτογράφηση των μοτίβων του Hes3.

Μέθοδος 3: Μελέτη του ρόλου του Hes3 στην ηπατική ογκογένεση με παρεμβάσεις siRNA και small molecule inhibitors σε καλλιέργειες και in vivo μοντέλα. Θα χρησιμοποιηθούν κυτταρικές σειρές (HepG2, Huh7 and AML-12) οι οποίες είναι διαθέσιμες στο εργαστήριο του επιβλέποντος τη Διατριβή, για την μελέτη του ρόλου του Hes3 και των σχετιζόμενων μηχανισμών κυτταρικής σηματοδότησης στην βιωσιμότητα και τον πολλαπλασιασμό των παραπάνω ηπατικών κυτταρικών σειρών, καθώς και την ανάπτυξη και την διαφοροποίηση επαγόμενων ηπατικών κυττάρων από πλειοδύναμα στελεχιαία κύτταρα (iPSCs). Για τα παραπάνω θα χρησιμοποιηθούν τεχνικές γονιδιακής αποσιώπισης με siRNA και πρωτόκολλα διαφοροποίησης ηπατοκυττάρων που έχουν παγιωθεί βιβλιογραφικά. Τεχνικές αποσιώπισης του Hes3 με siRNA ή στόχευσης των Hes3+ κυττάρων με συγκεκριμένους για αυτόν το σκοπό φαρμακολογικούς παράγοντες θα χρησιμοποιηθούν και στο προαναφερθέν in vivo μοντέλο, ανάλογα με τα αποτελέσματα των in vitro πειραμάτων.

Summary of PhD Dissertation

PhD Candidate: Grigorios Papadopoulos

Three-member Committee:

Antonios Chatzigeorgiou (Supervisor), Associate Professor, Medical School NKUA

Michalis Verykokakis, Researcher C', BSRC 'Alexander Fleming'

Themis Alissafi, Assistant Professor, Medical School NKUA

PhD Dissertation Title: "Identification of the Signaling Mechanisms contributing to Carcinogenesis and Tumor Development in the Non-Alcoholic Fatty Liver Disease -related Hepatocellular Carcinoma"

INTRODUCTION

Non-Alcoholic Fatty Liver Disease is a chronic condition affecting a significant percentage of the global population (approx. 25%), is characterized by aberrant fat accumulation in the liver in the absence of remarkable alcohol consumption or other causes of liver disease and is tightly connected with the rapidly developing epidemics of obesity and metabolic syndrome. This disease represents a spectrum of pathophysiology ranging from simple benign steatosis to the more severe phenotypes of non-alcoholic steatohepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Hepatocellular carcinoma (HCC) may occur without the prior occurrence of cirrhosis (fully fibrotic liver) and is most often associated with pre-existing tissue inflammation. The vast majority of primary liver tumours (90%) involve the formation of HCC, and liver cancer in general is the 4th most lethal cause in cancer patients, with hundreds of thousands of deaths per year. Therefore, understanding the mechanisms of tumorigenesis and cancer growth in HCC is a necessary component of basic research in the context of developing effective therapeutic approaches against this form of cancer. The specific molecular mechanisms responsible for the development of liver cancer and HCC in the context of non-alcoholic fatty liver disease have not been adequately elucidated. Although research over the last decade has revealed a plethora of genetic factors that contribute to the pathogenesis and progression of non-alcoholic fatty liver disease, we have limited information regarding the nature of the chronic mechanisms that induce carcinogenesis in the liver in the background of this disease, and research efforts to date have mainly focused on the development of HCC in the context of viral liver disease. It is well known that tissue regeneration and repair of liver and other tissues are orchestrated by signaling mechanisms whose aberration have traditionally been associated with tumorigenesis and cancer growth. Therefore, detailed identification and mapping of the aforementioned pathways becomes of particular interest, also in the pathophysiology of HCC, which may occur under the conditions of the inflamed and fibrous environment of non-alcoholic fatty liver disease.

The Hes3 signaling axis, is a recently elucidated mechanism identified as a non-canonical offshoot of Notch signaling, with the ability to activate the tri-phosphate inositide kinase pathway (PI3K/Akt/mTOR) and induce key phosphorylation of the STAT3 protein. In this way, Hes3 expression

was identified as critical coordinator of survival, proliferation and differentiation of important cell populations, including stem cell types associated with tissue repair (e.g., neural stem cells). Notably, this particular factor appears to be inactive in the absence of conditions representing repair of tissue damage, or in non-cancerous tissues. However, studying the biology of Hes3 in the context of HCC could lead to the identification of alternative mechanisms controlling cancer growth and tumorigenesis. Such mechanisms are thought to potentially limit the adequacy of existing therapeutic options, such as immunological and protein kinase inhibitors, which target cell populations of major importance for cancer progression, though ignoring the oncogenic activity of other disease-promoting pathways and parameters. The ultimate goal of a study as the one described above, would be to identify mechanistic targets of major importance, allowing the creation of innovative strategies for personalized medicine in patients with hepatocellular carcinoma.

OBJECTIVE

The primary objectives of the proposed PhD thesis are summarized in the identification of the role of the Hes3 signaling axis during the transition from non-alcoholic fatty liver disease/steatohepatitis to hepatocellular carcinoma, and to assess the contribution of Hes3-related mechanisms to the progression of HCC. In this proposed PhD thesis, the central experiments and methodological design to be followed include: a) Characterization of Hes3 expression and its related signaling elements in liver tissues and in vitro cell culture systems in the context of HCC induced by non-alcoholic liver disease. b) Spatial analysis of Hes3 cellular expression in the hepatic tumor microenvironment during its development and progression c) Determination of the value of the transcription factor Hes3, as a therapeutic target in non-alcoholic liver disease-induced HCC, through siRNA silencing systems as well as by pharmacological inhibition of Hes3 activity.

EXPERIMENTAL METHODOLOGY

Method 1: Simulation of non-alcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma using a Western-type diet and carbon tetrachloride (CCl₄) in C57BL6J mice. In this experimental animal model of non-alcoholic fatty liver disease, rapid development of liver fibrosis and HCC have been demonstrated by utilization of a Western-type diet, e.g. high-fat + fructose + cholesterol, combined with weekly low-dose carbon tetrachloride (CCl₄) intraperitoneally, and effective simulation of the key pathophysiological features of human non-alcoholic steatohepatitis at 12 weeks of the protocol, followed by the formation of HCC at the completion of 24 weeks. The experimental animals are to be killed in both time-discrete versions of the protocol, for the collection of liver and serum samples for histological, serological and genomic analyses. Specifically, transaminase levels (ALT/AST) will be analyzed in the collected serum to assess levels of tissue damage, accompanied by Picrosirius red and desmin histological stainings to assess fibrosis levels in the liver of the animals. Simultaneously, gene expression analyses by qPCR for pro-fibrotic factors and markers (e.g. TGF- β , PDGF, collagen-1, desmin, α -SMA, vimentin) will be performed. Finally, tumors corresponding to HCC pathology will be evaluated for their macroscopic characteristics (number, size) and will be analyzed based on the abovementioned techniques, for characterizing tumor phenotype in the liver of both control and intervention groups. Also, in these tissues, inflammation will be evaluated and the immunological microenvironment will be investigated. In particular, a) qPCR analyses for cytokines, chemokines and cell adhesion molecules and b) Flow Cytometry analysis will be performed, for key immune cell populations such as M1- and M2- macrophages and Kupffer cells, infiltrating monocytes, CD4+ and CD8+ lymphocytes, T-regulatory lymphocytes, NK and NKT cells, and others.

Method 2: Analysis of cancer-associated signaling in liver tissues, with particular focus on the mechanism of Hes3. In the liver tissues obtained from Method 1, and more specifically in discrete

sections of healthy and diseased liver tissue, the expression of HCC-related cell signaling factors [Transforming Growth Factor β (TGF- β), Epidermal Growth Factor (EGF), Hepatocyte Growth Factor (HGF), Vascular Endothelial GrowthFactor (VEGF), Sonic HedgeHog (SHH), mammalian Target Of Rapamycin (mTOR)], and will be correlated with the expression of the Hes3 gene which will also be studied. In addition, spatiotemporal study of Hes3+ cells in tissue will be performed and coexpression of HSC biomarkers will be studied using in situ RNA hybridization. To this end, the markers Ki67, hepatocyte paraffin antigen 1 (Hep Par 1), carcinoembryonic antigen (CEA), glypican-3 will be studied to define the different stages of NAFLD-related HCC and to simultaneously map Hes3 histological patterns in detail.

Method 3: Study of the role of Hes3 in liver tumorigenesis by siRNA and small molecule inhibitor interventions in culture and in vivo models. Cell lines (HepG2, Huh7 and AML-12) available in the laboratory of the PhD dissertation's supervisor, will be used to study the role of Hes3 and associated cell signaling mechanisms in the viability and proliferation of the above liver cell lines, as well as the growth and differentiation of induced liver cells from pluripotent stem cells (iPSCs). For the above, gene silencing techniques with siRNA and hepatocyte differentiation protocols that have been consolidated in the literature will be used. Hes3 silencing techniques with siRNA or targeting of Hes3+ cells with pharmacological agents specific for this purpose will also be used in the aforementioned in vivo model, depending on the results of the in vitro experiments.